

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ Ι ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ**



**Ανοσολογικός προσδιορισμός
βενζο[a]πυρενίου σε βρώσιμα έλαια**

Διπλωματική εργασία

Στεργιόπουλος Χρύσανθος

**Επίβλεψη: Μ. Ώξενκιουν Πετροπούλου
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.**

Αθήνα 2013

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Ανοσολογικός προσδιορισμός βενζο[α]πυρενίου σε βρώσιμα έλαια», ολοκληρώθηκε στα πλαίσια της εκπαιδευτικής διαδικασίας του 10^{ου} Εξαμήνου της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Το πειραματικό μέρος της εργασίας διεξήχθη στο Ινστιτούτο Υδροχημείας του Πολυτεχνείου Μονάχου Γερμανίας, κατά το διάστημα Μάρτιος – Αύγουστος 2012, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Dietmar Knorr, στα πλαίσια του Προγράμματος Ανταλλαγής Φοιτητών ERASMUS – SOCRATES.

Από τη θέση αυτή θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου διατριβής κ. Μαρία Όξενκιουν – Πετροπούλου, καθηγήτρια Ε.Μ.Π., για τη δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω το πειραματικό μέρος της εργασίας μου στο εξωτερικό, καθώς και τη στήριξη και ουσιαστική συμμετοχή της στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Dietmar Knorr, για την ανάθεση αυτού του ιδιαίτερα ενδιαφέροντος θέματος, το οποίο αποτελεί μέρος της ευρύτερης ερευνητικής δραστηριότητας του Ινστιτούτου Υδροχημείας σε θέματα βιοαναλυτικής χημείας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον υποψήφιο διδάκτορα Michael Pschenitzka από την ομάδα Βιοαναλυτικής Χημείας του καθηγητή Dietmar Knorr, για όλη τη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας, η οποία και αποτελεί μέρος της διδακτορικής του διατριβής. Η συνεργασία μου και με τους δύο ήταν άψογη και η στήριξή τους πολύτιμη, σε όλα τα στάδια της πειραματικής προσέγγισης του εν λόγω θέματος, καθώς και της διεκπεραίωσης της παρούσας εργασίας.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
I ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ	8
1.1. Εισαγωγή.....	9
1.2. Σκοπός.....	11
II ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
2.1. Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες.....	13
2.1.1. Παραγωγή και περιβαλλοντική σημασία.....	13
2.1.2. Προσδιορισμός των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων..	17
2.1.2.1. Κλασικές μέθοδοι διαχωρισμού και προσδιορισμού.....	17
2.1.2.2. Ανοσοαναλυτικές μέθοδοι.....	18
2.2. Ανοσοδοκιμές.....	19
2.2.1. Αντισώματα.....	19
2.2.1.1. Δομή και λειτουργία των αντισωμάτων.....	20
2.2.1.2. Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα.....	22
2.2.1.3. Δευτερογενή αντισώματα.....	25
2.2.2. Σύνθεση ανοσογόνων και συμπλόκου επίστρωσης.....	25
2.2.3. Ανοσολογική μέθοδος ενάντια σε απτένια.....	26
2.2.3.1. Βασικές αρχές ανταγωνιστικής ELISA.....	26
2.2.4. Εκτίμηση αποτελεσμάτων ανοσοδοκιμών.....	28
2.2.5. Ανασκόπηση.....	30
III ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32
3.1. Σχεδιασμός.....	33
3.2. Χρησιμοποιηθέντα υλικά.....	34
3.2.1. Όργανα και συσκευές.....	34
3.2.2. Αναλώσιμα και χημικά.....	35
3.2.3. Λογμικό.....	40
3.3. Αναλυτική διαδικασία.....	41
3.3.1. Υγρή-υγρή εκχύλιση ελαιόλαδου (LLE).....	41

3.3.1.1.	Εκχυλίσεις υγρού-υγρού χρωματογραφικών μεθόδων.....	41
3.3.1.2.	Εκχυλίσεις υγρού-υγρού ανοσολογικών μεθόδων.....	42
3.3.2.	Εκχυλίσεις στερεάς φάσης (SPE).....	43
3.3.2.1.	Εκχυλίσεις ανεστραμμένης φάσης (RPE).....	44
3.3.2.2.	Εκχυλίσεις κανονικής φάσης (NPE).....	45
3.3.3.	Διεξαγωγή έμμεσης ανταγωνιστικής ELISA.....	45
3.3.4.	Συνθήκες διεξαγωγής ELISA.....	47
3.3.5.	Εμβολιασμός δειγμάτων με B[a]P (Spiking).....	48
3.3.6.	Διαδικασία υπολογισμού ποσοστών ανάκτησης.....	49

IV ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....50

4.1.	Βαθμονομήσεις.....	51
4.1.1.	Εκχύλιση με μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο.....	51
4.1.2.	Εκχύλιση με DMF.....	54
4.1.3.	Εκχύλιση με καφεΐνη/φορμικό οξύ.....	56
4.1.4.	Άμεση εκχύλιση με DMSO (1:1).....	58
4.1.5.	Εκχύλιση με DMSO (1:1) με προεκχύλιση με HCL/DMSO (1:1).....	61
4.1.6.	Εκχύλιση με στήλη C18.....	65
4.1.7.	Εκχύλιση με στήλη SDB-L.....	68
4.1.8.	Εκχύλιση με στήλες Silica.....	70
4.2.	Δοκιμές HPLC διαφόρων στηλών ανεστραμμένης φάσης.....	75
4.3.	Έλεγχος της επίδρασης του διαλύτη έκλουσης στο ELISA κατά την εφαρμογή των στηλών Silica.....	76
4.4.	Ποσοστά ανάκτησης.....	77

V ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....80

5.1.	Συμπεράσματα και προοπτικές.....	81
------	----------------------------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....83

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....91

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) αποτελούν μία ομάδα υψηλά λιποφιλικών οργανικών ενώσεων και έχουν προκαλέσει τα τελευταία χρόνια μια αυξανόμενη προσοχή, λόγω των καρκινογενών και μεταλλαξιογόνων ιδιοτήτων τους, καθώς και της παρουσίας τους παντού στο περιβάλλον. Το βενζο[α]πυρένιο (B[a]P) είναι ένα από τα πιο γνωστά καρκινογόνα PAHs και παράγεται κυρίως από την ατελή καύση και πυρόλυση οργανικών υλικών. Έχει επίσης ανιχνευθεί σε καπνό από τσιγάρο, ιζήματα, νερό, αέρα, θαλάσσιους οργανισμούς και τρόφιμα. Το B[a]P μπορεί να εμφανιστεί επίσης και στα βρώσιμα έλαια. Το γεγονός αυτό συνδέεται κυρίως με διάφορους παράγοντες κατά την παραγωγική διαδικασία, όπως χρήση οργανικών διαλυτών για την εκχύλιση του ελαίου από την ελαιόμαζα, έκθεση της ελαιόμαζας σε καυσαέρια ή χρήση υψηλών θερμοκρασιών κατά την εξάτμιση του διαλύτη. Για το λόγο αυτό, το B[a]P έχει αναγνωρισθεί ως δείκτης παρουσίας των PAHs και έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή το όριο των 2 µg B[a]P ανά kg βρώσιμου ελαίου. Οι μέχρι σήμερα γνωστές μέθοδοι ανάλυσης των PAHs σε βρώσιμα έλαια και λίπη περιλαμβάνουν περίπλοκες, χρονοβόρες και ακριβές διαδικασίες εκχύλισης και στάδια καθαρισμού, ώστε να απομονωθούν τα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης από τη μήτρα του ελαίου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε σκοπό την εύρεση μιας κατάλληλης και γρήγορης μεθόδου εκχύλισης ελαιόλαδου, η οποία να είναι συμβατή με την ανοσολογική μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Η ανάγκη ανάπτυξης μιας τέτοιας μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι η ELISA προσφέρει μια ελκυστική εναλλακτική μέθοδο από τις συμβατικές, λόγω της απλότητας, ταχύτητας, ευαισθησίας και εξοικονόμησης κόστους.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας εξετάστηκαν υγρές-υγρές εκχυλίσεις αγορασμένου ελαιόλαδου Κρήτης, της εταιρίας Bio-zentrales GmbH, Ulbering, που χρησιμοποιούνται τόσο σε χρωματογραφικές, όσο και σε ανοσολογικές μεθόδους, αποκλείοντας τα στάδια καθαρισμού. Αρχικά επιχειρήθηκε εκχύλιση ελαίου με μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και διάλυμα DMF/νερού (9:1), όμως δεν μπόρεσε να ληφθεί καμπύλη βαθμονόμησης με καμία από αυτές τις μεθόδους. Εν συνεχεία, η εκχύλιση με διάλυμα καφεΐνης/φορμικού οξέος έδωσε μη επαναλήψιμα αποτελέσματα με υψηλή απόκλιση δοκιμής. Κατά την εκχύλιση του ελαίου με DMSO (1:1) αποδείχτηκε ότι η προεκχύλιση του ελαίου με 0,3 M HCL/DMSO (1:1) δίνει πιο επαναλήψιμα αποτελέσματα. Διάφορες αραιώσεις του εκχυλίσματος σε 10% μεθανόλη/νερό εφαρμόστηκαν σε αυτή τη μέθοδο, με βέλτιστη την 1:500 και για τα δύο χρησιμοποιηθέντα αντι-B[a]P-αντισώματα 22F12 και 5E11. Η καμπύλη βαθμονόμησης έδωσε για το αντίσωμα 22F12 $IC_{50} = 118,62 \mu\text{g}/\text{kg}$ και εύρος εργασίας 35,71-448,52

μg/kg, ενώ για το αντίσωμα 5E11 $IC_{50} = 181,01$ μg/kg και εύρος εργασίας 64,07-518,91 μg/kg. Έπειτα, δείγματα ελαίου εμβολιάστηκαν με πρότυπο B[a]P σε συγκεντρώσεις 56, 111, 278 και 556 μg/kg με σκοπό τον καθορισμό των ποσοστών ανάκτησης, τα οποία κυμαίνονταν από 74 μέχρι 104%. Η αραίωση των αντισωμάτων και του αντιγόνου 1,3-βενζο[a]πυρενίου–BSA αντίστοιχα σε κάθε περίπτωση ήταν 1:20000 v/v σε PBS - 1:5000 v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης για το αντίσωμα 22F12 και 1:5000 v/v σε PBS - 1:10000 v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης για το αντίσωμα 5E11.

Σε δεύτερο στάδιο επιχειρήθηκε η χρήση στηλών ανεστραμμένης και κανονικής φάσης για την εκχύλιση του ελαίου. Η C18-τροποποιημένη Silica στήλη δεν έδωσε επαναλήψιμα αποτελέσματα, ενώ τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με τη στήλη SDB–L ενός πολυμερούς που βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο της εταιρείας Phenomenex δεν είχαν ικανοποιητικά εύρη εργασίας. Όσον αφορά τις στήλες Silica, εφαρμόστηκαν δύο τρόποι έκλουσης, ένας με εξάνιο και ένας με διχλωρομεθάνιο. Από τους δύο διαλύτες, το εξάνιο αποδείχτηκε προβληματικό. Έτσι, η έκλουση με διχλωρομεθάνιο, έδωσε για το 22F12 $IC_{50} = 45,01$ μg/kg με εύρος εργασίας 9,01–249,22 μg/kg και για το 5E11 $IC_{50} = 175,27$ μg/kg με εύρος εργασίας 33,83–575,63 μg/kg. Οι συνθήκες αντισωμάτων–αντιγόνων για την προαναφερθείσα μέθοδο ήταν 1:5000 v/v σε PBS - 1:1000 v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης για το αντίσωμα 22F12 και 1:2500 v/v σε PBS - 1:5000 v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης για το αντίσωμα 5E11. Τέλος, προσδιορίστηκαν τα ποσοστά ανάκτησης για τις στήλες Silica με διχλωρομεθάνιο, τα οποία κυμαίνονταν από 50 μέχρι 85 % για το 22F12 και για εμβολιασμένες συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 75 και 100 μg/kg.

Το όριο ανίχνευσης των μεθόδων ήταν υψηλότερο από το ανώτατο επιτρεπτό όριο των 2 μg/kg B[a]P. Το λάδι αποτελείται από μία πολύ περίπλοκη μήτρα, της οποίας τα συστατικά (τριγλυκερίδια, λιπαρά οξέα) περνάνε στο εκχύλισμα και προκαλούν προβλήματα στο ELISA, για αυτό δε λαμβάνονται βαθμονομήσεις ή απαιτούνται υψηλές αραιώσεις που όμως αυξάνουν το εύρος εργασίας. Είναι λοιπόν προφανές ότι απαιτείται ακόμα βελτιστοποίηση των μεθόδων εκχύλισης προς αυτή την κατεύθυνση.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a group of highly lipophilic organic compounds, have caused increasing attention in recent years because of their carcinogenicity, mutagenicity and ubiquitousness in the environment. Benzo[a]pyrene (B[a]P) is one of the best known carcinogenic PAHs and it is generally formed by incomplete combustion and pyrolysis of organic materials. It has also been detected in tobacco smoke, sediment, soils, water, air, marine organisms and even food. B[a]P occurs also in edible oils. This is associated with several factors during the production process, like: use of contaminated solvent for extraction of the oil mash, exposure of the mash to gasoline exhaust, or extensive use of heat during solvent evaporation. Therefore, B[a]P is used as an indicator of the presence of PAHs and the European Community has established a maximum residue limit (MRL) of 2 µg/kg B[a]P in edible oils. The known methods of analysis of PAHs in edible oils and fats comprise complex, time consuming and expensive extraction procedures and clean-up steps to isolate the low levels of PAHs present in the oil matrix.

The goal of this thesis was to find a suitable and fast oil extraction procedure that would be compatible with the immunological method of ELISA. The need of the development of such a method stands to the fact that ELISA offers an attractive alternative from the conventional methods, due to the fact that it is simple, fast, sensitive and inexpensive.

In the first part of this work fluid-fluid oil extractions used both for chromatographic and immunological methods were examined, skipping the clean-up steps. At first, oil extractions with methanol, acetonitrile and a mixture of DMF/water (9:1) were attempted. However, no calibration with these methods was possible. Nextly, the caffeine/formic acid extraction gave no reproducible curves with a high inter-assay deviation. During the DMSO - oil (1:1) extraction it was proved, that the pre-extraction of the oil with 0,3 M HCL/DMSO (1:1) gives more reproducible results. Different extract dilutions in 10% methanol/water were applied to this method. The most optimal of them for both anti-B[a]P-antibodies 22F12 and 5E11 was the 1:500. The calibration curve gave for the 22F12 antibody a value of $IC_{50} = 118,62 \mu\text{g}/\text{kg}$ and a working range of 35,71-448,52 µg/kg, while for the 5E11 antibody a value of $IC_{50} = 181,01 \mu\text{g}/\text{kg}$ and a working range of 64,07-518,91 µg/kg. Then, oil samples were spiked with the B[a]P standard to the concentrations of 56, 111, 278 και 556 µg/kg with the intention of determining the recovery rates, which ranged from 74 to 104 %. The dilution of the antibodies and the antigen conjugate 1,3-B[a]P-BSA were in each case 1:20000 v/v in PBS - 1:5000 v/v

in Coating-Buffer for the 22F12 antibody and 1:5000 v/v in PBS - 1:10000 v/v in Coating-Buffer for the 5E11 antibody respectively.

In the second step, the use of reversed and normal phase columns for the oil extraction was tested. The C18-modified Silica column had no reproducible results, while the SDB-L column of a proprietary polymer of the company Phenomenex gave calibration curves of unsatisfactory working ranges. Regarding the Silica columns, two ways of elution were applied, one with hexane and one with dichloromethane. From these elution solvents, hexane was proven problematic. For that reason, the elution with dichloromethane (DCM) gave for 22F12 antibody a value of $IC_{50} = 45,01 \mu\text{g}/\text{kg}$ with a working range of 9,01–249,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and for the 5E11 antibody a value of $IC_{50} = 175,27 \mu\text{g}/\text{kg}$ with a working range of 33,83–575,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In this method, the conditions of antibodies–antigen were 1:5000 v/v in PBS - 1:1000 v/v in Coating-for the 22F12 antibody and 1:2500 v/v in PBS - 1:5000 v/v in Coating-Buffer for the 5E11 antibody. Finally, recovery rates for this method were determined, with percentages of 50–85 % for the 22F12 and spiked concentrations of 10, 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

None of these methods could determine to the maximum residue limit of 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ B[a]P. Oil has a very complex matrix, the components of which are extracted along with the B[a]P. These matrix components cause problems to ELISA. For that reason it is impossible to gain calibrations or otherwise a high dilution factor of the oil extract is needed, a step that increases the values of the working range. It is obvious that more optimization of the extraction methods is yet to be done.

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Με το πέρασμα των αιώνων, η βιομηχανία παραδοσιακού ελαιόλαδου έχει παίξει πολύ σημαντικό ρόλο στην εθνική οικονομία και παράδοση των μεσογειακών χωρών. Το ελαιόλαδο έχει αναφερθεί ως πρωταρχικό προϊόν κατανάλωσης και απαραίτητο συστατικό υγιεινής διατροφής για την πλειοψηφία των ανθρώπων σε αυτήν την περιοχή εξαιτίας των πλούσιων θρεπτικών αξιών, των υψηλών αντιοξειδωτικών και των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων του. Λαμβάνοντας υπόψη τις ευεργετικές του ιδιότητες και την αυξανόμενη παγκόσμια διανομή, έχει υπάρξει μια εκτεταμένη ζήτηση για μια αποτελεσματική καλλιέργεια και μαζική παραγωγή ελαιόλαδου. Πέρα από τις σχετικές εξελίξεις στην παραγωγή, υπάρχει μια ανησυχία για την υγεία σχετικά με την παρουσία των PAHs στα λίπη και τα έλαια [1]. Τα PAHs είναι διάφοροι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες με καρκινογενείς και μεταλλαξιογόνες ιδιότητες. Οι μεταβολίτες τους συνδέονται με το DNA και μπορούν να προκαλέσουν όγκους. Εκτός αυτού, θεωρείται επίσης ότι δρουν ως χημικά διαταραχής ενδοκρινών [2]. Παράγονται κατά την διάρκεια μιας ποικιλίας διαδικασιών ατελούς καύσης και πυρόλυσης οργανικών υλικών. Είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον εξαιτίας του λιπόφιλου χαρακτήρα τους που τους επιτρέπει την απορρόφησή τους στα ατμοσφαιρικά σωματίδια και την άμεση εναπόθεσή τους σε ιζήματα, στο έδαφος, στο νερό και στα φυτά. PAH έχουν ανιχνευθεί επίσης σε καπνό από τσιγάρο, καθώς και σε φαγητά ψητά, στη σχάρα ή στα κάρβουνα [3]. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται κάποιοι αντιπροσωπευτικοί PAHs με τις τιμές LD₅₀ (Lethal Dose, 50%) τους, από τα οποία το ισχυρότερο καρκινογόνο είναι το βενζο[α]πυρένιο.

Πίνακας 1: Οι σημαντικότεροι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) με τους αντίστοιχους δείκτες LD₅₀ [106]

PAH	LD ₅₀ (mg/kg)	Πειραματόζωο	Τρόπος Έκθεσης
Ναφθαλίνιο	533-710	Αρσενικά/Θηλυκά ποντίκια αντίστοιχα	Στόμα
Φαινανθρένιο	710	Ποντίκια	Στόμα
Ανθρακένιο	>430	Ποντίκια	Ενδοπεριτοναϊκώς
Φλουρανθένιο	232	Ποντίκια	Ενδοφλεβίως
Πυρένιο	514	Ποντίκια	Ενδοπεριτοναϊκώς
Βενζο[α]πυρένιο	100	Ποντίκια	Ενδοπεριτοναϊκώς

Η παρουσία των PAHs στα βρώσιμα έλαια οφείλεται κυρίως στους εξής λόγους:

1. Τη ρύπανση του φυτού από τον ατμοσφαιρικό αέρα, ιδίως αν αυτό μεγαλώνει σε αστικές ή βιομηχανικές περιοχές.
2. Στην παραγωγή κατά τη διάρκεια ξήρανσης
3. Τη χρήση ρυπασμένου διαλύτη για την εκχύλιση του ελαίου από τον ελαιοπολτό
4. Την εκτενή χρήση υψηλών θερμοκρασιών κατά τη διάρκεια εξάτμισης του διαλύτη [4]

Λόγω της αυξημένης κατανάλωσης τροφίμων στην κοινωνία μας, ο κίνδυνος έκθεσης των ανθρώπων στα PAHs μεγαλώνει από την πιθανή κατανάλωση μολυσμένου φαγητού. Αυτό το ρίσκο έχει αναγνωριστεί από την ευρωπαϊκή επιτροπή, η οποία έχει ορίσει το μέγιστο όριο υπολείμματος (MRL – Maximum Residue Limit) των 2 µg/kg βενζο[α]πυρενίου (B[a]P) στα βρώσιμα έλαια. Για τοξικολογικούς λόγους το B[a]P ταξινομήθηκε ως PAH προτεραιότητας που θα πρέπει να αναλύεται στα τρόφιμα (Σύσταση 2005/108/EC) [5]. Το ίδιο όριο έγινε δεκτό από το Food Safety Authority της Αγγλίας και της Ιρλανδίας και το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου [4].

1.2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση μιας κατάλληλης και γρήγορης μεθόδου εκχύλισης ελαιόλαδου, η οποία να είναι συμβατή με την ανοσολογική μέθοδο ELISA και να δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η ανάγκη εύρεσης μιας τέτοιας μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι η ELISA αποτελεί μια ελκυστική αναλυτική μέθοδο σε σχέση με τις μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές μεθόδους, οι οποίες είναι ακριβές και χρονοβόρες. Η ELISA προσφέρει σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους ευαισθησία, ταχύτητα, απλούς χειρισμούς και εξοικονόμηση κόστους.

Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκαν δύο είδη υγρής-υγρής εκχύλισης ελαιόλαδου. Το πρώτο περιλαμβάνει εκχυλίσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται σε χρωματογραφικές εφαρμογές. Για την απλούστευση των συγκεκριμένων μεθόδων παραλήφθηκε το στάδιο καθαρισμού που απαιτείται μετά την εκχύλιση. Το δεύτερο αφορά μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των PCBs (Polychlorinated Biphenyls) σε έλαια μετασχηματιστών, οι οποίες είναι πιο συμβατές με ανοσολογικές μεθόδους και χαρακτηρίζονται από απλές διαδικασίες εκχύλισης.

Σε επόμενο στάδιο και λόγω της ανάγκης βημάτων καθαρισμού της μήτρας εφαρμόστηκαν εκχυλίσεις στερεάς φάσης. Συγκεκριμένα, επιχειρήθηκε η χρήση στηλών τόσο ανεστραμμένης, όσο και κανονικής φάσης.

Τέλος, σε όσες μεθόδους επιτεύχθηκε βαθμονόμηση και επαναληψιμότητα υπολογίστηκαν τα ποσοστά ανάκτησης, ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθή λειτουργία της μεθόδου και να εξεταστεί αν το εύρος εργασίας και το όριο ανίχνευσης είναι μέσα στα νομικά ισχύοντα όρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο στη βαθμονόμηση όσο και στη μέτρηση δειγμάτων εφαρμόστηκε ο εμβολιασμός των δειγμάτων και των εκχυλισμάτων ελαίου με πρότυπο δείγμα B[a]P. Σε όλα τα χρησιμοποιηθέντα δείγματα ήταν γνωστή η συγκέντρωση του αναλύτη.

II ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

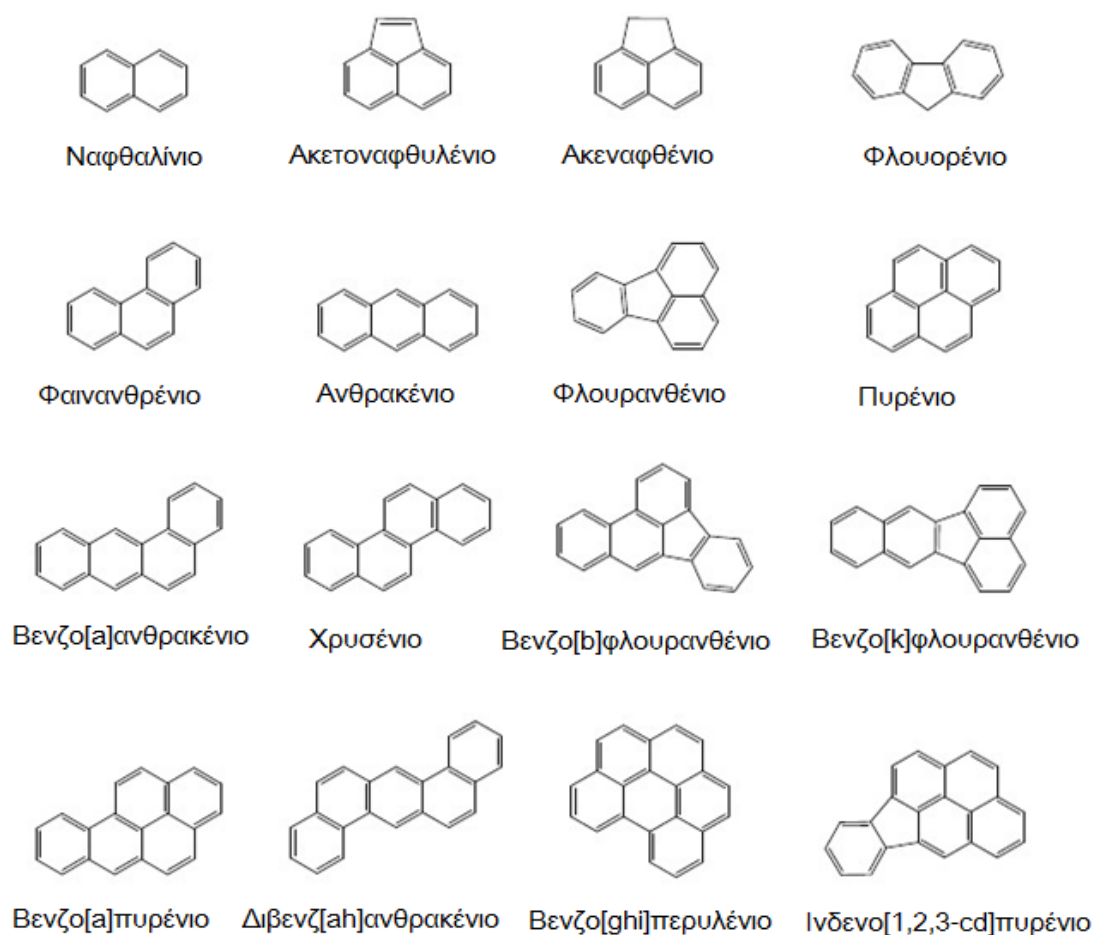
2.1. Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) είναι αρωματικές ενώσεις που αποτελούνται τουλάχιστον από δύο ενωμένα συστήματα δακτυλίων, τα οποία εκτείνονται σε ένα επίπεδο. Συνολικά μάζ είναι γνωστές πάνω από 200 διαφορετικές ενώσεις πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Αυτές οι ενώσεις είναι άπολες, κυρίως ουδέτερα φορτισμένες και σχηματίζουν άχρωμους, κίτρινους ή πρασινωπούς κρυστάλλους. Επιπλέον, παρουσιάζουν χαμηλή τάση ατμών και υψηλά σημεία τήξεως και ζέσεως. Πολλοί εμφανίζουν επίσης υψηλό φθορισμό [3]. Παρακάτω παρουσιάζονται πιο αναλυτικά οι πιο αντιπροσωπευτικές ενώσεις των PAHs. Έμφαση δίνεται ιδιαίτερα στο βενζο[α]πυρένιο (B[a]P), ένωση που θεωρείται η πιο αντιπροσωπευτική εξ' αυτών [2].

2.1.1. Παραγωγή και περιβαλλοντική σημασία

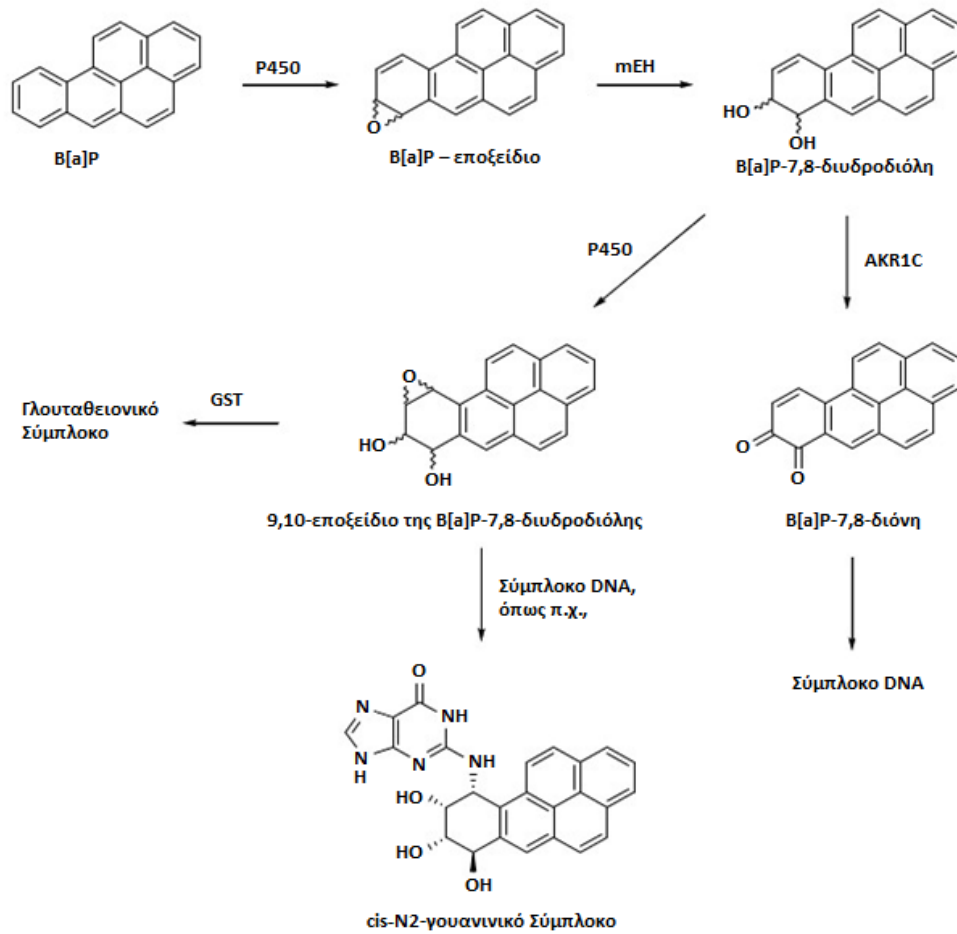
Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι περιβαλλοντικοί ρύποι, οι οποίοι απαντώνται παντού στο περιβάλλον και παράγονται από μία σειρά φυσικών και ανθρωπογενών πηγών [6]. Σχηματίζονται από την ατελή καύση ή την απανθράκωση της οργανικής ύλης. Ως ανθρωπογενείς πηγές θεωρούνται κυρίως τα συστήματα καύσης άνθρακα, οι κινητήρες εσωτερικής καύσης και η πυρόλυση. Επίσης, τρόφιμα ψητά ή στη σχάρα όπως και καπνός από τσιγάρο μπορούν να αποτελέσουν πηγές έκθεσης για τον άνθρωπο [7]. Φυσικές πηγές των PAHs είναι η τύρφη, ο άνθρακας και το αργό πετρέλαιο. Ηφαιστειογενείς εκρήξεις και πυρκαγιές δασών αποτελούν πηγή εναπόθεσης PAHs στο περιβάλλον. Τα PAHs εναποθέτονται συνήθως στην ατμόσφαιρα ως συμπλέγματα σωματιδίων [109]. Μέσω της ξηρής ή υγρής εναπόθεσης καθώς και διαδικασιών έκπλυσης επέρχεται η προσρόφησή τους στην υδρογέωσφαιρα [8]. Γι' αυτό το λόγο μπορούν να ανιχνευθούν συχνά υψηλές συγκεντρώσεις PAHs σε επιφανειακά και χαμηλότερες σε υπόγεια νερά. Μαζί με τα υποκατεστημένα PAHs υπάρχει επίσης μία ποικιλία από παράγωγα με ετεροάτομα, όπως αζώτου (αμίνο, νίτρο-PAHs), και οξυγόνου (αλδευδών, κετονών, εποξειδίων) [9,10]. Αυτά τα παράγωγα προκύπτουν από την καύση ορυκτών καυσίμων και βιοκαυσίμων ή μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων στην ατμόσφαιρα [10]. Επειδή είναι γνωστό ότι πολλά PAHs μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο των πνευμόνων, του δέρματος και του προστάτη [11,12], καθώς και να δράσουν ως χημικά διαταραχής ενδοκρινών [13], υπάρχουν σε πολλές χώρες κατευθυντήριες γραμμές ως προς τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση των PAHs. Στην Ε.Ε. σύμφωνα με την οδηγία 98/83/EC της Ευρωπαϊκής Επιτροπής έχει οριστεί το όριο των 100 ng/L για το

σύνολο των PAHs βενζο[b]φλουρανθένιο, φλουορανθένιο, βενζο[k]περυλένιο, βενζο[ghi]περυλένιο και ινδανο[1,2,3-cd]πυρένιο στο πόσιμο νερό. Επίσης ισχύει για την κύρια ένωση βενζο[a]πυρένιο το ακόμα πιο αυστηρό όριο των 10 ng/L [13]. Στις Η.Π.Α. έχει οριστεί από την αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA) μία λίστα από 16 υποκατεστημένα PAHs, γνωστά και ως EPA PAHs, ως πρωτεύοντες περιβαλλοντικοί ρύποι (Σχήμα 1). Τα δείγματα νερού, αέρα και εδάφους εξετάζονται συχνά ως προς αυτά τα 16 EPA PAHs, διότι έτσι είναι δυνατόν να αναλυθούν όλα τα υπάρχοντα PAH τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά [108]. Αυτά τα 16 EPA PAHs περιλαμβάνουν PAHs με δύο έως έξι δακτύλιους και έτσι δίνουν μια καλή εικόνα για τη συνολική επιβάρυνση του προς εξέταση δείγματος [3].



Σχήμα 1: Δομή και ονομασία των 16 UPA PAHs [3]

Είναι πλέον αποδεδειγμένο, ότι η μακροχρόνια πρόσληψη PAHs οδηγεί στο σχηματισμό PAH-DNA προσαγωγών, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο [14,15]. Το καταλληλότερο PAH που προσφέρεται για ανάλυση λόγω της υψηλής του ικανότητας να προκαλεί καρκινογένεση είναι το βενζο[α]πυρένιο (B[a]P). Σύμφωνα με την IUPAC, το B[a]P είναι ο πιο γνωστός εκπρόσωπος των πιο ισχυρά καρκινογόνων PAH από τέσσερις μέχρι έξι δακτύλιους. Παρόλο που το B[a]P καταλαμβάνει μόνο το 1-20% της συνολικής συγκέντρωσης των PAHs σε ένα ρυπασμένο δείγμα, έχει καθιερωθεί ως κύρια ένωση [16]. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται ο ενζυμικός μεταβολισμός, όπως αυτός εκτυλίσσεται στον ανθρώπινο οργανισμό μετά την πρόσληψη PAH. Σε πρώτο στάδιο μετατρέπεται το B[a]P μέσω των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 CYP1A1 και CYP1B1 σε B[a]P-7,8-εποξειδίο. Έπειτα μπορεί το B[a]P-7,8-εποξειδίο με τη βοήθεια του μικροσωματιδιακού εποξειδίου της υδρολάσης (mEH) να μετατραπεί σε B[a]P-7,8-διυδροδιόλη. Αυτή μπορεί σε σπάνιες περιπτώσεις να μετατραπεί μέσω της αλδοδικής κετοαναγωγής σε ένα ενδιάμεσο κατεχόλης και στη συνέχεια δημιουργείται μέσω μίας αυτοκαταλυόμενης αντίδρασης η B[a]P-7,8-διόνη, η οποία ενώνεται άμεσα με το DNA ή έμμεσα μέσω επιπρόσθετων αντιδραστικών ειδών [18]. Κυρίως η B[a]P-7,8-διυδροδιόλη μετατρέπεται από τα CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 σε 9,10-εποξειδίο της B[a]P-7,8-διυδροδιόλης, το οποίο μπορεί να δεσμευτεί ομοιοπολικά με το DNA [19]. Το κύριο προϊόν αυτής της αντίδρασης είναι το 9,10-εποξειδίο της (+)-αντι-B[a]P-7,8-διυδροδιόλης [20], που είναι και το πιο καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο προϊόν του μεταβολισμού του B[a]P [21,22]. Αυτό μπορεί να δεσμευτεί στη γλουταθειόνη μέσω της γλουταθειονικής S-τρανσφεράσης (GST), να απομακρυνθεί από τον οργανισμό (αποτοξίνωση) ή να συνδεθεί με το DNA [23,24,25]. Αν ενωθεί με το DNA, τότε δημιουργεί δεσμό στη θέση N² της γουανίνης [26]. Η ένωση αυτή με το DNA δικαιολογεί την μετάλλαξη-καρκινογένεση [27,28].



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση της ενζυμικής μετατροπής του Β[α]Ρ μέσω του κυτοχρώματος [17]

2.1.2. Προσδιορισμός των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων

2.1.2.1. Κλασικές μέθοδοι διαχωρισμού και προσδιορισμού

Καθώς τα PAHs απαντώνται παντού στο περιβάλλον, υπάρχει ένα πλήθος από μήτρες, όπως έδαφος, σκόνη, ιζήματα, νερό, συμπυκνώματα αερίων, τρόφιμα, καπνός από τσιγάρο ή υδάτινα αιωρήματα. Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων PAHs βρίσκονται στη χαμηλή ppm περιοχή, κάτι που κάνει την ποσοτική ανάλυσή τους δαπανηρή και χρονοβόρα. Η επιλογή της καταλληλότερης αναλυτικής μεθόδου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες:

- Τη μήτρα του δείγματος
- Τη μέθοδο δειγματοληψίας
- Την προετοιμασία του δείγματος
- Τη διαδικασία ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης των PAHs

Υγρά και αέρια δείγματα μπορούν συνήθως να εκχυλιστούν άμεσα. Τα στερεά πρέπει αρχικά να ξηρανθούν, να ομογενοποιηθούν και στη συνέχεια να εκχυλιστούν. Στο παρελθόν χρησιμοποιούταν κυρίως για την εκχύλιση η τεχνική Soxhlet, η οποία όμως απαιτούσε μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών [29]. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν άλλες μέθοδοι εκχύλισης, όπως η υγρή εκχύλιση με υπερήχους [30], η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού [31], η επιταχυνόμενη υγρή εκχύλιση [32] και η εκχύλιση ρευστοποιημένης κλίνης [33]. Μαζί με την εκχύλιση του δείγματος αυτές οι μέθοδοι έχουν επίσης ως στόχο τον εμπλουτισμό των αναλυτών.

Κλασικές μέθοδοι διαχωρισμού για την ανάλυση των PAHs αποτελούν η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (GC) [35]. Η HPLC και η GC είναι πολύ ευαίσθητες και απαιτούν εντατική προετοιμασία και καθαρισμό του δείγματος. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) [36], η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) [36], η εκχύλιση νανοστερεάς φάσης (SPNE) [37] και τα μοριακά αποτυπώματα πολυμερών (MIPs – Molecular Imprinted Polymers) [38]. Για την ανίχνευση των PAHs στη μέθοδο HPLC χρησιμοποιούνται ανιχνευτές UV και φθορισμού [40]. Από την άλλη, η ανίχνευση με GC επιτυγχάνεται κυρίως μέσω ανιχνευτών μάζας (MS) [41,42] και ιονισμού φλόγας (FID) [43]. Η επιλεκτικότητα, η ευαισθησία και η ανάλυση στη μέθοδο GC είναι μεγαλύτερη από ότι στην HPLC [44]. Αυτό είναι κυρίως

μεγάλης σημασίας όταν για παράδειγμα πρέπει να ανιχνευτούν σε άνθρακα ή βαρύ πετρέλαιο εκατοντάδες ουσιών ταυτόχρονα. Ακόμα και η συζευγμένη GC/MS παρουσιάζει πλεονεκτήματα ως προς την ανάλυση των PAHs σε σχέση με τη συζευγμένη HPLC/FID. Ωστόσο, οι διαδικασίες κλασματοποίησης και καθαρισμού του δείγματος που χρησιμοποιούνται στην HPLC μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη GC. Αυτό έχει μεγάλα οφέλη, διότι στις εφαρμογές GC απαιτείται εντατικότερη προετοιμασία του δείγματος από ότι στην HPLC.

2.1.2.2. Ανοσοαναλυτικές μέθοδοι

Είναι γνωστό ότι οι ανοσοδοκιμές είναι πολύ ευαίσθητες για αναλύτες μικρού μοριακού βάρους (απτένια). Επίσης, είναι εφαρμόσιμες χωρίς να απαιτούν τις περισσότερες φορές περίπλοκες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος, όπως ο καθαρισμός του δείγματος και ο εμπλουτισμός του αναλύτη. Ως προς τη συνεχή και απλή παρακολούθηση για παράδειγμα του πόσιμου νερού, οι ανοσολογικές εφαρμογές αποτελούν μία καλή και οικονομικότερη εναλλακτική από τις συμβατικές μεθόδους GC και HPLC. Το κλειδί μιας ανοσολογικής μεθόδου είναι ένα εκλεκτικό και ευαίσθητο αντίσωμα (οι αρχές των ενζυμικών προσροφητικών ανοσοδοκιμών παρουσιάζονται στην παράγραφο 2.2.3.). Τόσο για την επιλεκτική, όσο και για την ευαίσθητη αναγνώριση των PAHs από τα αντισώματα υπάρχουν δυσκολίες. Εξαιτίας της δομικής ομοιότητας των PAHs δεν είναι δυνατόν να αναπτυχθεί ένα αντίσωμα, το οποίο να αναγνωρίζει μόνο ένα PAH. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ παρόμοιων PAHs είναι πολύ υψηλή. Ένα ακόμη πρόβλημα οφείλεται στο γεγονός ότι τα PAHs από τέσσερις με έξι δακτύλιους είναι πολύ υδροφοβικά, κάτι που δυσχεραίνει την ανάπτυξη ευαίσθητων αντισωμάτων. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι ανοσοδοκιμών για το B[a]P [45-53]. Καμία ωστόσο από αυτές δε φθάνει το όριο των 10 ng/L B[a]P στο πόσιμο νερό. Εκτός από τις ανοσοδοκιμές έχουν αναπτυχθεί κι άλλες ανοσολογικές μέθοδοι, όπως η μικροεξισορρόπηση (microbalances) [54], οι βιοαισθητήρες SPR (Surface Plasmon Resonance) [55,56], η υπέρυθη φασματοσκοπία πόλωσης, διαμόρφωσης, αντανάκλασης και απορρόφησης (PM-RAIRS, Polarization Modulation Reflection Absorption Infrared Spectroscopy) [57] και οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες [58]. Με τους βιοαισθητήρες SPR επιτεύχθηκε το όριο ανίχνευσης των 50 ng/L B[a]P. Εντούτοις, δεν παρουσιάστηκε καμία μέτρηση πραγματικών δειγμάτων. Επίσης, ο βιοαισθητήρας οπτικών ινών για την ανίχνευση B[a]P παρουσιάζεται ευρέως τα τελευταία χρόνια [59,60]. Σε αυτόν ακινητοποιούνται ειδικά B[a]P αντισώματα στην κεφαλή του οπτικού αισθητήρα και αυτός βυθίζεται στο δείγμα. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται μέσω μίας μέτρησης φθορισμού από μία συζευγμένη στην οπτική ίνα ακτίνα λέιζερ, η οποία

διεγείρει το B[a]P. Στη συνέχεια, το σήμα φθορισμού δεσμεύεται στην ίδια ίνα και διέρχεται μέσω ενός διαχωριστή δέσμης στον ανιχνευτή. Αυτός ο βιοαισθητήρας έχει σχεδιαστεί να αναγεννάται. Αυτή η νέα μέθοδος, η οποία φθάνει τα όρια ανίχνευσης των 4 ng/L B[a]P στο νερό [61], μάς επιτρέπει μέτρηση στα ανώτατα επιτρεπτά όρια.

2.2. Ανοσοδοκιμές

Ένα μειονέκτημα των κλασικών τεχνικών ανάλυσης για την ανάλυση των PAH είναι η απαραίτητη εντατική προετοιμασία του δείγματος. Για να ξεπεραστεί αυτό, χρησιμοποιείται η ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Τα αντισώματα μπορούν όχι μόνο να αναγνωρίσουν τις πρωτεΐνες και άλλες μεγάλες δομές επιλεκτικά και ευαίσθητα, αλλά και αππένια. Γι' αυτόν το λόγο έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες διάφορες ανοσολογικές μέθοδοι, όπως η ενζυμική ανοσορροφητική δοκιμή (ELISA) [62], η ανοσοδοκιμή πόλωσης φθορισμού (FPIA - Fluorescence Polarization Immunoassay) [63,64], ο επιφανειακός συντονισμός πλάσματος (SPR) [64,65] και οι ηλεκτροχημικοί ανοσοαισθητήρες [66], οι οποίες εκτός από την υγρή-στερεά εκχύλιση απαιτούν από μια πολύ απλή έως και καμία προεπεξεργασία του δείγματος. Ήδη από το 1959 περιγράφηκε για πρώτη φορά η ραδιοανοσοανάλυση για τη μέτρηση της ινσουλίνης [67]. Εν τω μεταξύ, οι ανοσοδοκιμές χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική διάγνωση, όπως και στο περιβάλλον και στα τρόφιμα. Οι ανοσοδοκιμές μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορα κριτήρια. Εκτός από την ταξινόμηση του τρόπου ανίχνευσης (ραδιοανοσοανάλυση RIA - Radioimmunoassay, ενζυμική ανοσοανάλυση EIA - Enzymimmunoassay, ανοσοανάλυση φωταύγειας και φθορισμού [68] ή ηλεκτροχημικός ανοσοπροσδιορισμός [69]) και των διαφορετικών μορφών (ομοιογενείς, ετερογενείς), μπορούν να χωριστούν σε άμεσες και έμμεσες. Στις ετερογενείς ανοσοαναλύσεις μπορεί κανείς επίσης να διακρίνει ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές μεθόδους [70].

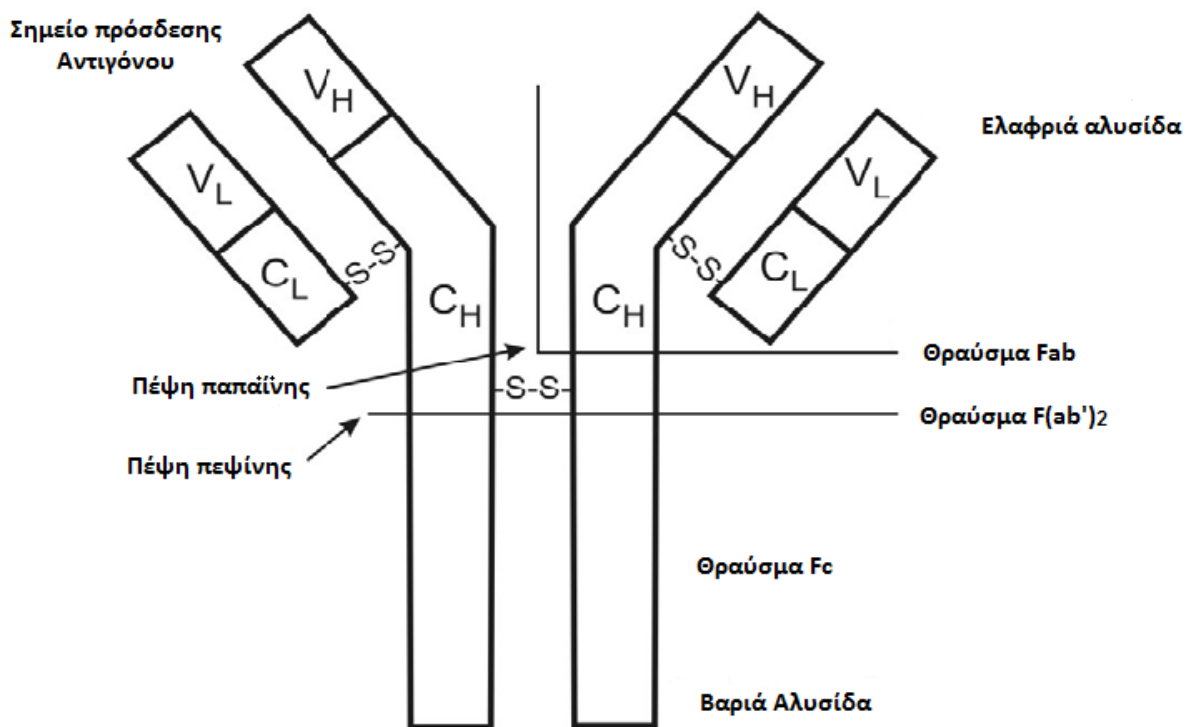
2.2.1. Αντισώματα

Τα αντισώματα είναι μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος των σπονδυλωτών ζώων. Κύριος σκοπός τους είναι να συνδέονται ειδικά με τα παθογόνα και να τα μαρκάρουν, ώστε να αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Παράγονται ως αντίδραση στα αντιγόνα, όταν αυτά εισβάλλουν στον οργανισμό [71]. Σύμφωνα με μία εκτίμηση, ένα ζώο μπορεί

να παράξει τουλάχιστον 10^5 διαφορετικά αντισώματα, το ανώτερο όριο είναι όμως άγνωστο [72]. Τα αντισώματα είναι η καρδιά κάθε ανοσοδοκιμής. Καθορίζουν το βαθμό εξειδίκευσης και ευαισθησίας και χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μικρότερων συγκεντρώσεων αναλυτών. Είναι λοιπόν σημαντικό να χαρακτηριστούν τα απαραίτητα ανοσοαντιδραστήρια [73].

2.2.1.1. Δομή και λειτουργία των αντισωμάτων

Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας των ανοσοσφαιρίνων (Ig - Immunoglobulin), οι οποίες παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα. Λόγω της δομής και της λειτουργίας τους χωρίζονται στα θηλαστικά σε πέντε διαφορετικές τάξεις (IgG, IgA, IgM, IgD und IgE) και στα πουλιά σε τρεις (IgY, IgM und IgA), ανάλογα από τη μορφή των βαριών αλυσίδων από τις οποίες αποτελούνται. Από αυτά στον φυσιολογικό ορό απαντάται κυρίως το IgG σε συγκεντρώσεις από 6 έως 12 mg/mL. Ως προς τη δομή τα αντισώματα είναι με τον ίδιο τρόπο δομημένα. Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται σχηματικά η δομή ενός αντισώματος.



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός αντισώματος [74]

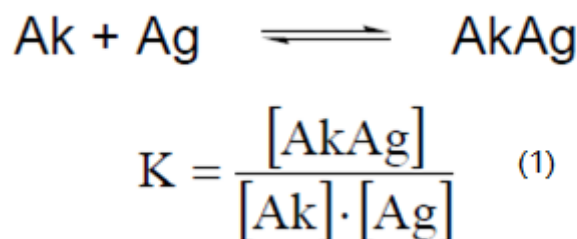
Τα αντισώματα αποτελούνται από δύο όμοιες βαριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες με μοριακό βάρος περίπου 50 kDa και δύο όμοιες ελαφριές αλυσίδες με μοριακό βάρος 25 kDa, οι οποίες συνδέονται ομοιοπολικά μέσω ενδο και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών [78,79]. Έτσι, δημιουργείται η δομή σχήματος Y των αντισωμάτων, όπως επιβεβαιώνεται με μονοκρυσταλλική ανάλυση ακτίνων X [74,75,76]. Και οι δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες αποτελούνται από μεταβλητές και σταθερές περιοχές. Ενώ οι ελαφριές αλυσίδες χωρίζονται σε μία σταθερά και μία μεταβλητή περιοχή (V_L και C_L), οι βαριές αλυσίδες χωρίζονται ανάλογα με την τάξη του αντισώματος σε μία μεταβλητή περιοχή (V_H) και σε τρεις (IgG, IgA) ή τέσσερις (IgM, IgE) σταθερές περιοχές ($C_{H1-3(4)}$). Οι σταθερές περιοχές C_{H1} και C_{H2} συνδέονται μεταξύ τους μέσω της άρθρωσης [78]. Η ανάλυση αλληλουχίας αμινοξέων έδειξε ότι οι σταθερές περιοχές σε μία τάξη έχουν την ίδια σειρά αμινοξέων, ενώ οι μεταβλητές περιοχές παρουσιάζουν διαφορετικές αλληλουχίες, κάτι που μεταβάλλει την εξειδίκευση των αντισωμάτων στην περιοχή σύνδεσης του αντιγόνου [77]. Τα αντισώματα μπορούν να διασπαστούν στην άρθρωση από ένζυμα όπως π.χ. η παπαΐνη και η πεψίνη. Η παπαΐνη διασπά από την επάνω μεριά τις δισουλφιδικές γέφυρες που ενώνουν τις βαριές αλυσίδες μεταξύ τους. Από την διάσπαση προκύπτουν δύο θραύσματα, ένα Fab (antigen binding fragment) των 50 kDa και ένα Fc (crystalizable fragment) των 50 kDa. Η πέψη της πεψίνης συμβαίνει από την κάτω μεριά των δισουλφιδικών γεφυρών και από αυτήν δημιουργούνται τα θραύσματα $F(ab)_2$ και Fc [79].

Οι δύο κύριες λειτουργίες ενός αντισώματος είναι:

- Η πρόσδεση του αντιγόνου μέσω της θέσης πρόσδεσης του θραύσματος Fab.
- Η πυροδότηση βιολογικών λειτουργιών, όπως η ενεργοποίηση των κυττάρων φονέων, η ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος ή των φαγοκυττάρων μέσω του θραύσματος Fc.

Η σύνδεση του αντιγόνου επιτυγχάνεται στην τερματική θέση σύνδεσης του αντιγόνου N, η οποία δημιουργείται από τη σύνδεση των δύο μεταβλητών αλυσίδων. Έτσι σχηματίζονται οι τρεις υπερμετάβλητες περιοχές (5-10 αμινοξέα), οι οποίες ονομάζονται περιοχές διαπίστωσης συμπληρωματικότητας (CDRs - Complementarity Determining Regions), στις ελαφριές και βαριές αλυσίδες στην πραγματική θέση σύνδεσης του επίτοπου (παράτοπο). Ως παράτοπο χαρακτηρίζονται τα έξι υπερμετάβλητα τμήματα των μεταβλητών περιοχών των ελαφριών και βαριών αλυσίδων του αντισώματος. Το επίτοπο από την άλλη σχηματίζει μια συμπληρωματική στο αντίσωμα επιφάνεια. Στο παράτοπο μπορούν να συνδεθούν αντιγόνα διαφόρων μεγεθών, με το να χρησιμοποιούνται όλες οι CDRs [73,78]. Εκεί επιδρούν στερικές δυνάμεις, δεσμοί υδρογόνου, ιοντικοί δεσμοί, δυνάμεις

Van-der-Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η σύνδεση αντισώματος (Ak) – αντιγόνου (Ag) είναι αντιστρέψιμη και μπορεί να περιγραφεί από το νόμο ισορροπίας μάζας:



με K τη σταθερά συγγένειας, [Ak] τη συγκέντρωση του ελεύθερου αντισώματος, [Ag] τη συγκέντρωση του ελεύθερου αντιγόνου και [AkAg] τη συγκέντρωση του αντισώματος. Οι σταθερές συγγένειας έχουν τυπικές τιμές από $10^4 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$, που αντιστοιχούν μέσω της σχέσης 2 σε ενέργεια δεσμών 25 – 65 kJ/mol [78,79].

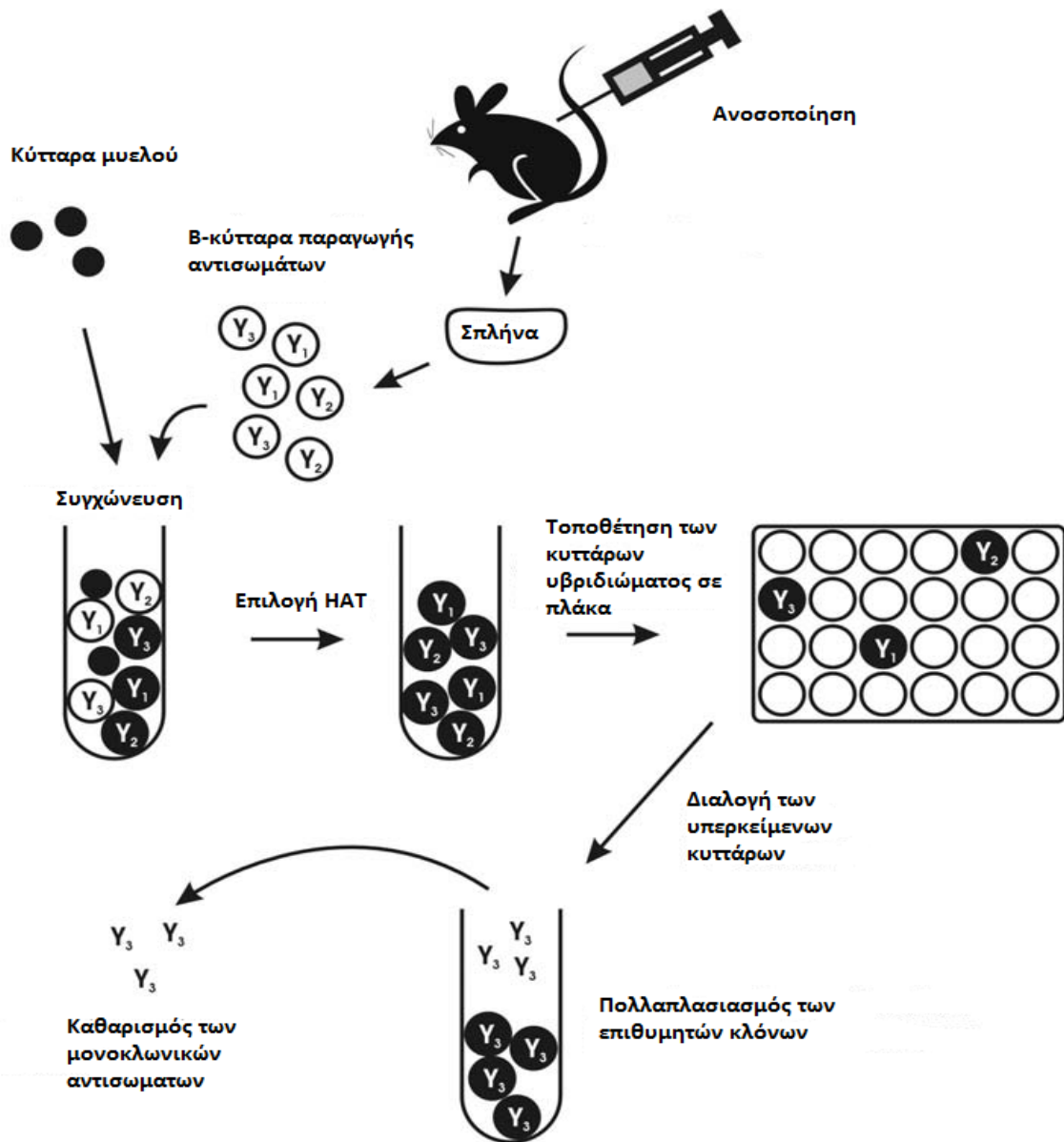
$$\Delta G = RT \ln K \quad (2)$$

με G την ενέργεια δεσμού, K τη σταθερά συγγένειας, T τη θερμοκρασία και R την παγκόσμια σταθερά των αερίων. Η δύναμη του δεσμού μεταξύ του αντισώματος και του μονοσθενούς επίτοπου ονομάζεται συγγένεια, ενώ η δύναμη δεσμού μεταξύ ενός αντισώματος και πολυσθενών αντιγόνων, που κατέχουν πολλά επίτοπα, ονομάζεται πολυσυγγένεια [78].

2.2.1.2. Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα

Για να ληφθούν πολυκλωνικά (pABs – polyclonal antibodies), όπως και μονοκλωνικά αντισώματα (mABs – monoclonal antibodies), ανοσοποιούνται αρχικά διάφορα σπονδυλωτά ζώα (κυρίως κουνέλια, ποντίκια, άλογα, πρόβατα και αίγες). Ανοσογόνα είναι όλα τα ξενοσωματικά μόρια με μοριακή μάζα μεγαλύτερη από 5 kDa [81]. Μικρότερα ξενοσωματικά μόρια, τα οποία δεν προκαλούν καμία ανοσολογική απόκριση, χαρακτηρίζονται ως απτένια και απαιτούν για την ανοσοποίηση τη σύζευξη με έναν φορέα πρωτεΐνη. Η ανοσοποίηση λαμβάνει χώρα σύμφωνα με ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο,

που περιγράφει όλους τους σχετικούς παράγοντες της ανοσοποίησης. Στη λήψη των pAB συλλέγεται μετά από ένα συγκεκριμένο χρόνο ο ορός και απομονώνεται το τμήμα της ανοσοσφαιρίνης. Επειδή κατά τη συγκεκριμένη παραγωγή αντισωμάτων συμμετέχουν διάφορα B-λεμφοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν διαφορετικά αντισώματα, θεωρούνται τα συγκεκριμένα αντισώματα πολυκλωνικά. Αντίθετα, τα αντισώματα τα οποία παράγονται από ένα μοναδικό B-λεμφοκύτταρο, και γι' αυτό είναι και όμοια μεταξύ τους, χαρακτηρίζονται ως μονοκλωνικά. Αυτά τα αντισώματα έχουν μόνο μία εξειδίκευση, που σημαίνει ότι συνδέονται μόνο με ένα επίτοπο [79]. Ένα σχήμα για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων παρουσιάζεται στο σχήμα 4. Μετά την ανοσοποίηση λαμβάνονται κάποια σπληνικά κύτταρα, τα οποία λόγω της ανοσοποίησης παράγουν πολλά αντισώματα εναντίον του αντιγόνου. Αυτά τα κύτταρα είναι βραχύβια και μπορούν να επιβιώσουν μόνο λίγες μέρες σε ένα μέσο καλλιέργειας, διότι τους λείπει το ένζυμο HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase). Για αυτό το λόγο ενώνονται με κάποια κύτταρα όγκου του ίδιου ζώου και αποκτούν μεγαλύτερο χρόνο ζωής. Τα προκύπτοντα κύτταρα υβριδισμού απομονώνονται μέσω αραιώσεων και μπορούν να καλλιεργηθούν σε ένα επιλεκτικό μέσο (HAT – Hypoxanthine-Aminopterin-Thymine). Μετά από μια διαδικασία διαλογής σύμφωνα με τα καταλληλότερα αντισώματα πολλαπλασιάζονται οι επιθυμητοί κλώνοι και καθαρίζονται τα μονοκλωνικά αντισώματα. Τα mAB όπως και τα pAB έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα για τις διάφορες εφαρμογές, τα οποία παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 2. Έτσι αφήνεται να εννοηθεί, ότι η επιλογή μεταξύ pAB που παρασκευάζονται οικονομικά, απλά και γρήγορα και ομοιογενών, αλλά ακριβών mAB εξαρτάται πολλές φορές από την εφαρμογή [73,82].



Σχήμα 4: Σχήμα παρασκευής μονοκλωνικών αντισωμάτων [81]

Πίνακας 2: Σύγκριση μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων [80]

Πλεονεκτήματα μονοκλωνικών αντισωμάτων	Πλεονεκτήματα πολυκλωνικών αντισωμάτων
Εξειδίκευση	Γρήγορη και οικονομική παραγωγή
Δυνατότητα ανάλυσης δομής	Δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για την παραγωγή
Μοριακή ομοιογένεια	Σταθερά σε μια ευρεία περιοχή PH και συγκεντρώσεων αλάτων
Διαθέσιμα σε απεριόριστες ποσότητες	Περιορισμένες ποσότητες ορού
Επαναλήψιμα σε ποντίκια, αρουραίους και κουνέλια	Επαναλήψιμα και σε μεγάλα ζώα, όπως άλογα

2.2.1.3. Δευτερογενή αντισώματα

Τα αντισώματα μπορούν εκτός από την ειδικότητα συνδέσεώς τους να δρουν και μόνα τους ως αντιγόνα. Οι σταθερές περιοχές των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων στα IgG των ποντικών έχουν για παράδειγμα μία άλλη αλληλουχία αμινοξέων από τις βαριές και ελαφριές αλυσίδες στα IgG των αλόγων και έτσι μία διαφορετική τρισδιάστατη δομή. Όταν για παράδειγμα εγχυθεί IgG ποντικού σε άλογο, τότε αυτό παράγει ειδικά αντισώματα ενάντια στο IgG ποντικού, που χαρακτηρίζεται ως IgG αλόγου αντι-ποντικού [73].

2.2.2. Σύνθεση ανοσογόνων και συμπλόκου επίστρωσης

B[a]P – πρωτεϊνικά σύμπλοκα χρησιμοποιούνται για βιοαναλυτικούς σκοπούς, π.χ. ως ανοσογόνα για τη δημιουργία εκλεκτικών μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων ενάντια στο B[a]P ή ως σύμπλοκο επικάλυψης για το ELISA. Για την ανοσοποίηση πρέπει το B[a]P να μεταχειριστεί ως απτένιο, διότι λόγω του μικρού μεγέθους του δεν προκαλεί ανοσολογική απόκριση. Επομένως, συνδέονται ομοιοπολικά με ένα μόριο φορέα, όπως η αλβουμίνη (π.χ. bovine serum albumin BSA, ωλεουκωματίνη, αιμοκυανίνη πεταλίδας), πολυαμινοξέα (π.χ. πολυλυσίνη και πολυγλουταμίνης) ή με αδρανούς φορείς, όπως αγαρόζη, σεφαρόζη, μικροσωματίδια και μεμβράνες. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη σύνθεση χρήσιμων παραγώγων PAHs και πρωτεϊνικών συμπλόκων. Σε κάθε περίπτωση πρέπει η δομή των PAHs να μεταβάλλεται όσο το δυνατόν λιγότερο μέσω της σύνδεσης και η επίδραση να μειώνεται. Αυτό είναι απαραίτητο ώστε να παραχθούν

αντισώματα υψηλής συγγένειας. Επιπλέον, ο φορέας πρωτεΐνης βοηθά στην επιλεκτική αναγνώριση του B[a]P από το αντίσωμα [83].

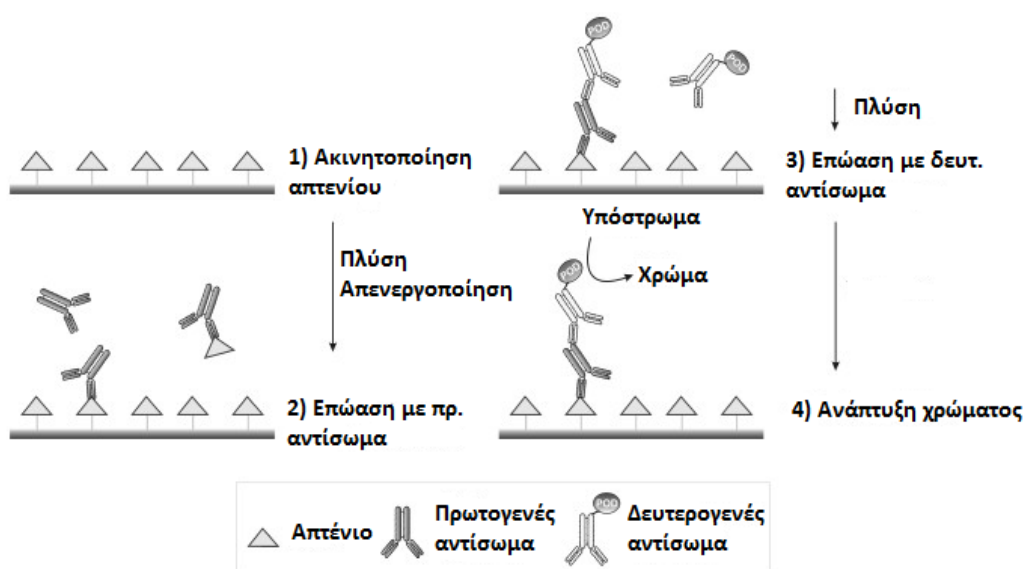
2.2.3. Ανοσολογική μέθοδος ενάντια σε απτένια (ELISA)

Η ενζυμική ανοσορροφητική διαδικασία (ELISA) είναι σήμερα η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μορφή ποσοτικών ανοσοαναλύσεων. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1971 από δύο παράλληλες ομάδες από τη Γαλλία και τη Σουηδία [84,85]. Στην ELISA χρησιμοποιείται, όπως λέει και το όνομα της μεθόδου, ένα ένζυμο ως σημείο αναφοράς. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται το αντιγόνο ή η συγκέντρωση του αναλύτη έμμεσα μέσω της μετατροπής του υποστρώματος. Το όνομα ELISA σημαίνει επίσης, ότι είτε το αντίσωμα είτε το αντιγόνο προσροφώνται σε μία στερεή φάση. Με ένα στάδιο πλύσης δίνεται η δυνατότητα να διαχωριστεί η απορροφημένη από την ελεύθερη φάση, χωρίς να απαιτούνται χρονοβόρες και ακριβές διεξαγωγές βημάτων διαχωρισμού [78]. Η ELISA προσφέρει μια οικονομική εναλλακτική για τις συμβατικές μεθόδους. Τα πλεονεκτήματα της ELISA είναι η υψηλή ειδικότητα, η ευαισθησία, η ταχύτητα και η εξοικονόμηση κόστους. Επιπλέον η μέθοδος επιτρέπει τη διερεύνηση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ταυτόχρονα, διότι οι πλάκες που χρησιμοποιούνται έχουν 96 κοιλότητες. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου ωστόσο είναι το γεγονός ότι επιτρέπει την εξέταση της μήτρας [87,88]. Ένα μειονέκτημα της ELISA είναι η μεταβαλλόμενη σταθερότητα των βιολογικών συστημάτων (αντισώματα, ένζυμα). Τα διαλύματα αντισωμάτων μπορούν για παράδειγμα να σταθεροποιηθούν με αζίδιο, κάτι που όμως δεν είναι δυνατόν με π.χ. την περοξειδάση χραΐνας (HRP - Horseradish Peroxidase), λόγω αντίδρασης αναστολής [86]. Από το ξεκίνημα αυτής της νέας μεθόδου έχουν υπάρξει μέχρι σήμερα πολλές εξελίξεις. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές, όπως η Sandwich-ELISA, η ανταγωνιστική και μη ανταγωνιστική ELISA, καθώς και η άμεση και έμμεση ELISA [78]. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται ανταγωνιστική ELISA, της οποίας οι βασικές αρχές περιγράφονται παρακάτω.

2.2.3.1. Βασικές αρχές ανταγωνιστικής ELISA

Στην έμμεση ανταγωνιστική ELISA ο αναλύτης ακινητοποιείται πάνω στην επιφάνεια [90]. Η επιφάνεια μπορεί να αποτελείται από πλαστικό, γυαλί, μέταλλο και πολλά άλλα υλικά. Ανάλογα με την επιφάνεια η ακινητοποίηση

μπορεί να πραγματοποιηθεί ομοιοπολικά (γυαλί, χρυσός) ή να προσροφηθεί σε αυτήν (πλαστικό). Για την προσρόφηση μικρών μορίων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (MTP - Microtiter Plates), τα απτένια συνδέονται συνήθως με μια πρωτεΐνη. Στο σχήμα 5 παρουσιάζονται τα διάφορα στάδια της έμμεσης ανταγωνιστικής ELISA. Μετά την ακινητοποίηση του απτενίου ακολουθεί η αντίδραση ανταγωνισμού. Το πρωτογενές αντίσωμα επωάζεται με το δείγμα και στη συνέχεια προστίθεται στον ακινητοποιημένο αναλύτη. Ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα συνδέονται περισσότερα ή λιγότερα πρωτογενή αντισώματα στην επιφάνεια. Μετά από ένα στάδιο πλύσης, προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι μαρκαρισμένο με περοξειδάση (POD - Peroxidase). Το δευτερογενές αντίσωμα έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με το πρωτογενές. Στο τελευταίο στάδιο προκαλείται μέσω της προσθήκης υποστρώματος μία αντίδραση χρωματισμού, η οποία μπορεί να παρακολουθηθεί μέσω μετρήσεων απορρόφησης. Αντί για την αντίδραση χρωματισμού μπορεί επίσης να καταλυθεί μια αντίδραση χημειοφωταύγειας. Επίσης είναι εφικτός ένας ανοσοπροσδιορισμός ή μία μέτρηση φθορισμού [88,89].



Σχήμα 5: Αρχές του έμμεσου ανταγωνιστικού ELISA: 1) Τα απτένια ακινητοποιούνται (έμμεσο ELISA). 2) Ακολουθεί επώαση του δείγματος με το πρωτογενές αντίσωμα (Ανταγωνισμός). 3) Τα πρωτογενή αντισώματα αναγνωρίζονται από τα δευτερογενή. 4) Με την προσθήκη υποστρώματος ξεκινά η αντίδραση χρωματισμού. [90]

Αν στο πρώτο βήμα δεν ακινητοποιηθεί ο αναλύτης αλλά το αντίσωμα, τότε μιλάμε για την άμεση ELISA [90]. Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται η άμεση

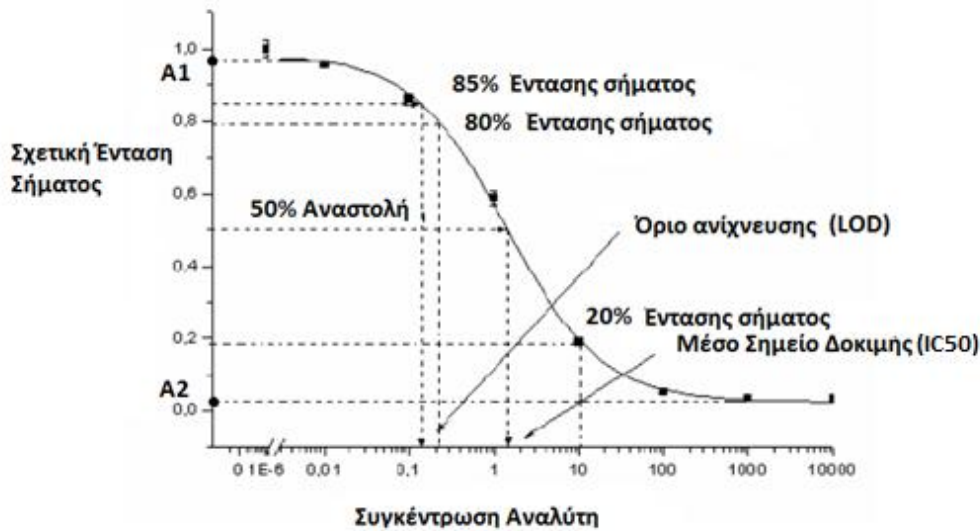
ανταγωνιστική ELISA. Επειδή τα απτένια είναι μικρά μόρια, καταλαμβάνουν μόνο ένα επίτοπο. Γι' αυτό το POD συνδέεται άμεσα με το απτένιο. Ο ανταγωνισμός τότε λαμβάνει χώρα μεταξύ των ελεύθερων αναλυτών στο δείγμα και το σύμπλοκο αναλύτη – POD. Στο τελευταίο βήμα μπορεί πάλι να συμβεί μία αντίδραση χρωματισμού [88,89].



Σχήμα 6: Αρχή του άμεσου ανταγωνιστικού ELISA: 1) Τα πρωτογενή αντισώματα ακινητοποιούνται (άμεσο ELISA). 2) Ακολουθεί επώαση με το δείγμα. 3) Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με το μαρκαρισμένο με POD αναλύτη (Ανταγωνισμός). 4) Με την προσθήκη υποστρώματος ξεκινά μία αντίδραση χρωματισμού. [90]

2.2.4. Εκτίμηση αποτελεσμάτων των ανοσοδοκιμών

Με γραφική αναπαράσταση της σχετικής έντασης σήματος (απορρόφηση ή χημειοφωταύγεια) έναντι της συγκέντρωσης του αναλύτη ημιλογαριθμικά [91], λαμβάνεται μία καμπύλη βαθμονόμησης με σιγμοειδές σχήμα (σχήμα 7).



Σχήμα 7: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης ενός έμμεσου ανταγωνιστικού ELISA [93]

Με τη βοήθεια τετραπαραμετρικής συνάρτησης προσαρμόζεται η καμπύλη βαθμονόμησης και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί το περιεχόμενο σε αναλύτη ενός άγνωστου δείγματος [92,93] (A_1 : μέγιστη απορρόφηση, A_2 : ελάχιστη απορρόφηση, x_0 : μέσο σημείο δοκιμής, σημείο καμπής, p : κλίση στο σημείο καμπής)

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{\left[1 + \left(\frac{x}{x_0} \right)^p \right]} + A_2 \quad (3)$$

Με λύση της σχέσης 3 ως προς x λαμβάνεται η άγνωστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα.

$$x = \sqrt[p]{\frac{(A_1 - A_2)}{(y - A_2)} - 1} \cdot x_0 \quad (4)$$

Το p δηλώνει την κλίση στο μέσο σημείο δοκιμής (IC_{50}) και δείχνει τον αριθμό των θέσεων δέσμησης ενός αντισώματος. Το IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) βρίσκεται στο 50% της σχετικής έντασης και αποτελεί το μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ένωσης στην αναστολή μιας βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Αυτό το ποσοτικό μέτρο δείχνει πόση ποσότητα από μια συγκεκριμένη ουσία (αναστολέας) απαιτείται για την αναστολή μιας βιολογικής διαδικασίας ή συστατικού κατά το ήμισυ [93]. Το IC_{50} είναι πολύ σημαντική παράμετρος στις ανοσοδοκιμές, αφού μάς υποδεικνύει το εύρος στο οποίο μπορούμε να εργαστούμε για τον προσδιορισμό της ένωσης-αναστολέα. Το όριο ανίχνευσης (LOD) υπολογίζεται στο 85% της συνολικής απορρόφησης, ενώ το ανώτερο και το κατώτερο όριο του εύρους εργασίας (γραμμικό τμήμα καμπύλης) στο 80 και 20% αντίστοιχα [92,93].

Επί το πλείστον ισχύει ότι τα δεδομένα από διαφορετικά MTP δεν μπορούν να συγκριθούν άμεσα μεταξύ τους, διότι η ακρίβεια της επαναληψιμότητας της ELISA δεν είναι συχνά καλή. Ο λόγος είναι ότι οι συνθήκες, όπως η θερμοκρασία, οι αραιώσεις κτλ δεν μπορούν να διατηρηθούν ακριβώς σταθερές. Γι' αυτό πραγματοποιούνται σε κάθε MTP πρότυπα βαθμονόμησης.

2.2.5. Ανασκόπηση

Στο Ινστιτούτο Υδροχημείας του Πολυτεχνείου του Μονάχου έχουν γίνει μέχρι σήμερα πολλές έρευνες σχετικά με ανοσοδοκιμές σε νερό και γάλα. Όσον αφορά τα έλαια, μία πρώτη προσέγγιση επιχειρήθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Μέχρι σήμερα οι περισσότερες μέθοδοι απομόνωσης του B[a]P στο λάδι ή σε άλλα είδη που περιέχουν λίπη περιλαμβάνουν χρονοβόρες διαδικασίες που αποτελούνται από σαπωνοποίηση των λιπαρών, εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες (κυκλοεξάνιο, DMSO, εξάνιο, N-N'-διμεθυλοφορμαμίδιο, ακετονιτρίλιο) και καθαρισμό με στήλες (Silica, χρωματογραφικές). Οι περιγραφείς μέθοδοι θεωρούνται λόγω των πολλών σταδίων επιρρεπείς σε λάθη και μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη ακρίβεια της ανάλυσης. Εκτός αυτού, η χρήση μεγάλης ποσότητας χημικών προκαλεί μεγάλο κόστος. Αυτές οι μέθοδοι περιγράφηκαν από τους Moret και Conte [94]. Αυτοί οι συγγραφείς κατέδειξαν την ανάγκη γρήγορων αναλυτικών μεθόδων, βασιζόμενες σε

συνδυασμένες χρωματογραφικές τεχνικές με UV, ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές και ανιχνευτές φθορισμού, καθώς και φασματομετρία μάζα. Οι Moret και Conte απομόνωσαν επίσης PAHs από βρώσιμα έλαια χρησιμοποιώντας SPE σε φυσίγγια Silica, ακολουθούμενα από HPLC με ανιχνευτή φθορισμού [95]. Ο διεθνής οργανισμός τυποποίησης δημοσίευσε μία μέθοδο HPLC για τον προσδιορισμό του B[a]P σε ζωικά και φυτικά λίπη και έλαια, χρησιμοποιώντας HPLC ανεστραμμένης φάσης και φθορισμομετρική ανίχνευση [96]. Τα τελευταία χρόνια, μερικοί συγγραφείς εφάρμοσαν διασπορά μήτρας στερεάς φάσης (MSPD - Matrix Solid Phase Dispersion) ως μέθοδο απομόνωσης του B[a]P και άλλων PAHs σε στερεά και ημιστερεά δείγματα [97,98,99]. Και οι δύο χρωματογραφικές μέθοδοι (HPLC, GC/MS) θεωρούνται συμπληρωματικές στην ανάλυση των PAHs.

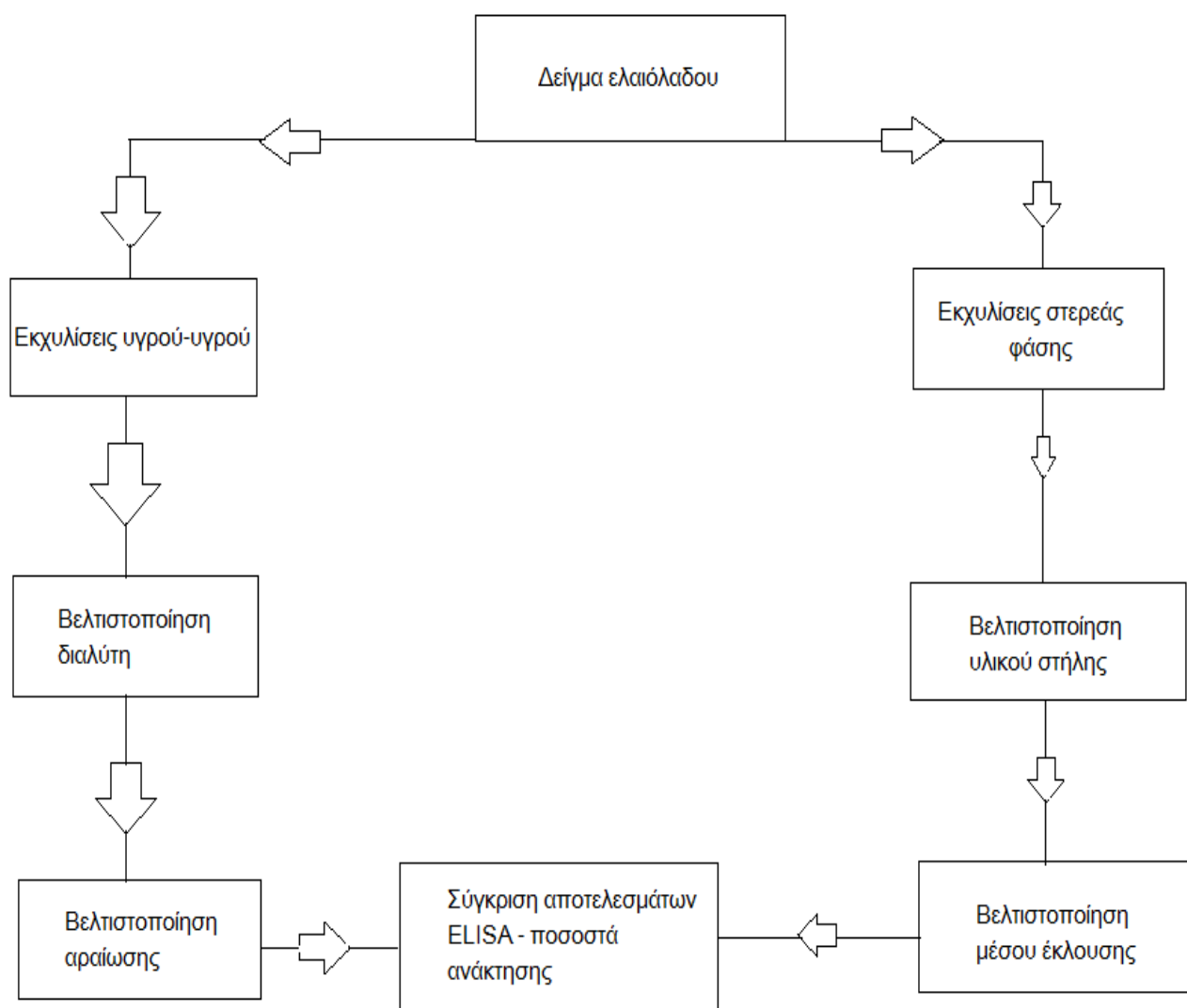
Άλλες προσεγγίσεις σε αυτό τον τομέα περιλαμβάνουν την εκχύλιση ελαίων με συμπλοκοποίηση καφεΐνης και προσδιορισμό σε GC γυάλινου τριχοειδούς. Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της δημιουργίας συμπλόκου της καφεΐνης με το τμήμα του ελαίου που περιέχει B[a]P [102]. Άλλη μέθοδος προϋποθέτει τη χρήση στηλών C18 και Fluorisil για την εκχύλιση με χρήση GC/MS με τριχοειδές και χαμηλής πίεσης, ευρείας οπής HPLC/GC/MS για ανάλυση [103].

Από όλες τις προαναφερθείσες μεθόδους, η υγρή χρωματογραφία δότη-δέκτη (DACC – Donor Acceptor Complex Chromatography) θεωρείται η πιο πολλά υποσχόμενη. Το αρωματικό σύστημα του αναλύτη λειτουργεί ως π-δότης ηλεκτρονίων, που αλληλεπιδρά επιλεκτικά με το υλικό του DACC. Η φάση DACC πλένεται με κατάλληλο διαλύτη, απομακρύνοντας τα άπολα συστατικά, αφού η έκλυση του B[a]P επιβραδύνεται. Έπειτα ακολουθεί αλλαγή του διαλύτη για την εφαρμογή HPLC. Η μέθοδος δε χρησιμοποιεί μεγάλη ποσότητα χημικών και είναι απλή στη διεξαγωγή [101]. Εκτός αυτού, ο van Stijn αυτοματοποίησε τη μέθοδο, χρησιμοποιώντας καθαρισμό του δείγματος σε απευθείας σύνδεση σε μία χρωματογραφική στήλη δότη-δέκτη (DACC) με συνεχή αλλαγή διεύθυνσης σε μία ODS (Octadecylsilane) αναλυτική στήλη και ανιχνευτή φθορισμού [100].

III ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Σχεδιασμός

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στο να βρεθεί μια κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης ελαιόλαδου, που να είναι συμβατή με την ανοσοδοκιμή ELISA. Διάφορες εκχυλίσες υγρού-υγρού και στερεάς φάσης δοκιμάστηκαν με βελτιστοποίηση παραγόντων, όπως παράγοντας αραιώσης και διαλύτες. Στο σχήμα 8 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της συνολικής διαδικασίας, ώστε να γίνουν πιο αντιληπτά τα στάδια που ακολουθήθηκαν.



Σχήμα 8: Διάγραμμα ροής διαδικασιών που ακολουθήθηκαν

3.2. Χρησιμοποιηθέντα υλικά

3.2.1. Όργανα και συσκευές

ELISA

Συσκευή πλύσης ELx405 Select (BioTek, Bad Friedrichshall)

Συσκευή ανάγνωσης Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall)

Φασματόμετρο UV-Vis, 450 nm, Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall)

Ανακινήτης Easyshaker EAS 2/4 (SLT, Crailsheim)

Ανακινήτης MS1 Minishaker (IKA Labortechnik, Staufen)

Σύνθεση

Περιστροφικός εξατμιστήρας RE 111 (Büchi, Flawil, Schweiz)

Αντλία υψηλού κενού RC 5 (Vacuubrand, Wertheim)

Λοιπά

Σύστημα καθαρισμού νερού Milli-Q plus 185 (Millipore, Schwalbach)

Αναδευτήρας MR 3002 S (Heidolph, Kelheim)

Φούρνος 20-250 °C (Memmert, Büchenbach)

Vortex TopMix Fisherbrand 15024 (Novodirect, Kehl)

Ζυγαριά Mettler AT261 Delta Range τριών δεκαδικών (Mettler-Toledo, Giessen)

Ζυγαριά Mettler PM4600 Delta Range τεσσάρων δεκαδικών (Mettler-Toledo, Giessen)

Φυγόκεντρος Universal 30F, 10000 rpm (Hettich, Tuttlingen)

Φυγόκεντρος Universal 320R, 14000 rpm (Hettich, Tuttlingen)

3.2.2. Αναλώσιμα και χημικά

Λίστα αναλώσιμων

Σύριγγα μίας χρήσης 1 mL (H.999.1, Roth, Karlsruhe)

Σύριγγα μίας χρήσης 5 mL (0057.1, Roth, Karlsruhe)

Σύριγγα μίας χρήσης 10 mL (0058.1, Roth, Karlsruhe)

Σύριγγα μίας χρήσης, 0,90 x 40 mm (C721.1, Roth, Karlsruhe)

Σύριγγα μίας χρήσης, 0,80 x 120 mm (C630.1, Roth, Karlsruhe)

Πιπέτες Eppendorf (0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L, 1-5 mL, πιπέττα πολλαπλών καναλιών 20-300 μ L) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Πτυχωτό φίλτρο 210 mm (531-021, Macherey-Nagel, Düren)

Γάντια, Nitril (P778.1, Roth, Karlsruhe)

Πλάκες μικροπιλοδότησης 96 κοιλοτήτων υψηλής δεσμευτικής ικανότητας (655061, Greiner, Frickenhausen)

Παραφίλμ (H666.1, Roth, Karlsruhe)

Πιπέτες παστέρ (4522, Roth, Karlsruhe)

Σύριγγες πιπεττών:

- Μικροσύριγγες, 0,1-10 μ L (K138.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Σύριγγες πιπεττών, 0,5-5 mL (Brand, Wertheim, Deutschland)
- Σύριγγες πιπεττών μπλε, 100-1000 μ L (2679.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Σύριγγες Universal, 1-200 μ L (B007.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Φυαλίδια δειγμάτων, 4 mL (E155.1, Roth, Karlsruhe)

Δοχεία αντίδρασης, 1,5 mL (4190.1, Roth, Karlsruhe)

Δοχείο πολλαπλών αντιδράσεων, 0,65 mL (7060.1, Roth, Karlsruhe)

Φυαλίδια κυκλικού χείλους, 10 mL (X655.1, Roth, Karlsruhe)

Διαχωριστικές χοάνες, 5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL (Roth, Karlsruhe)

Σιφώνια, 1 mL, 4 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL (Roth, Karlsruhe)

Κολλητική ταινία για μικροπλάκες (EN76.1, Roth, Karlsruhe)

Στήλες στερεάς φάσης:

- C18 – τροποποιημένη Silica στήλη, ποσότητας πολυμερούς 200 mg/ όγκου 3 mL (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Strata-X, στήλη στυρενίου – διβινυλβενζενίου, ποσότητας πολυμερούς 200 mg/ χωρητικότητας 3 mL (Phenomenex)
- SDB-L, στήλη πολυμερούς σε ερευνητικό στάδιο, ποσότητας πολυμερούς 200 mg/ όγκου 3 mL (Phenomenex)
- Ethyl – Phenyl, τροποποιημένη Silica στήλη με αιθυλ-φαινύλιο, ποσότητας πολυμερούς 200 mg/ όγκου 3 mL (Phenomenex)
- Silica στήλη, ποσότητας πολυμερούς 500 mg/ όγκου 5 mL (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Λίστα χημικών

Όλα τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας $\geq 99.0\%$.

Ακετόνη, Laboratory Reagent (179973, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ακετονιτρίλιο, HPLC grade (34998, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Καζεΐνη, (C5890, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Όξινο φωσφορικό δικάλιο (60220, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Δισόξινο κάλιο (60214, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (04248, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Σορβικό κάλιο (85520, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Περοξειδάση (814393, Roche, Basel, Schweiz)

Tween 20 (8.17072, Merck, Darmstadt)

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (95321, Sigma-Aldrich, Steinheim)

3,3', 5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνη (860336, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Αζίδιο του νατρίου (S2002, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ανθρακικό νάτριο (71.628, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Δωδεκυλοθειικό νάτριο (71728, Fluka, Buchs)
Όξινο ανθρακικό νάτριο (K28996729, Merck, Darmstadt)
Διχλωρομεθάνιο, (66738, Sigma-Aldrich, Steinheim)
N,N'- Διμεθυλοφορμαμίδιο, (494488, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Διμεθυλοσουλφιδικό οξύ, (41647, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Μεθανόλη, (65548, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Εξάνιο, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Κυκλοεξάνιο, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
n-πεντάνιο, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Φορμικό οξύ, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Καφεΐνη, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Υδροχλωρικό οξύ, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Τολουόλιο, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ισο-προπανάλη, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Αιθανόλη, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Χλωριούχο νάτριο, (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Καυστικό κάλιο, (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Αντιγόνα και αντισώματα

Μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια στο B[a]P (22F12, 5E11) από ποντίκι (PAH Research Institute, Greifenberg)

Αντίσωμα αλόγου αντιποντικού, απαλλαγμένο από συγγένειες και συζευγμένο με περοξειδάση (Axxora, Lörrach)

1,3-βενζο[α]πυρένιο–BSA, αντιγόνο συζευγμένο με αλβουμίνη βόειου ορού, (PAH Research Institute, Greifenberg)

Πρότυπα και δείγματα

Ντόπιο ελαιόλαδο έξτρα, κρητικής προέλευσης (Bio-zentrales GmbH, Ulbering)

Πρότυπο B[a]P 222,5 µg/L σε ακετονιτρίλιο (PAH Research Institute, Greifenberg)

Πρότυπο B[a]P 1000 µg/L σε διχλωρομεθάνιο (PAH Research Institute, Greifenberg)

Ρυθμιστικά διαλύματα για το ELISA

Για όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται χημικά καθαρότητας p.a. (pro analysi) και προκατεργασμένο με UV ακτινοβολία υπερκαθαρό νερό.

Διάλυμα μπλοκαρίσματος ELISA (1% καζεΐνη)

1 g Καζεΐνη

PBS (Phosphate Buffered Saline) 100 mL

Το διάλυμα ζεσταίνεται στους 90 °C, έπειτα ψύχεται στους 25 °C και φιλτράρεται με πτυχωτό φίλτρο.

Διάλυμα επικάλυψης ELISA (pH 9,6)

Na₂CO₃, 1,59 g

NaHCO₃, 2,93 g

NaN₃, 0,20 g

Απιονισμένο νερό 1000 mL

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS, pH 7,6)

KH_2PO_4 , 1,36 g

K_2HPO_4 , 12,2 g

NaCl , 8,50 g

Απιονισμένο νερό 1000 mL

Διάλυμα τερματισμού ELISA (5 % H_2SO_4)

98 % H_2SO_4 , 50 mL

Απιονισμένο νερό 1000 mL

Διάλυμα υποστρώματος ELISA

Ρυθμιστικό υποστρώματος, 25 mL

Διάλυμα TMB (Tetramethylbenzidine), 500 μL

H_2O_2 (1 %), 100 μL

Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος ELISA

Δισόξινο κάλιο, 46,04 g

Σορβικό κάλιο, 0,10 g

Απιονισμένο νερό 1000 mL

TMB διάλυμα ELISA

3,3', 5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη, 375 mg

DMSO, 30 mL

Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ELISA

KH₂PO₄, 8,17 g

K₂HPO₄, 73,16 g

NaCl, 52,60 g

Tween 20, 30 mL

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης ELISA (pH 7,6)

Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης, 42 mL

Απιονισμένο νερό 2500 mL

3.2.3. Λογισμικό

Gen5 (BioTek, Bad Friedrichshall)

Origin 7G (OriginLab Corporation, Northampton, USA)

3.3. Αναλυτική διαδικασία

3.3.1. Υγρή-υγρή εκχύλιση ελαιόλαδου (LLE)

3.3.1.1. Εκχυλίσεις υγρού - υγρού χρωματογραφικών μεθόδων

Πριν την περιγραφή των συγκεκριμένων μεθόδων αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω της ανάγκης να βρεθεί μία γρήγορη μέθοδος εκχύλισης για την εφαρμογή της ELISA, έχουν παραληφθεί στάδια καθαρισμού του εκχυλίσματος, ενώ όλες οι μέθοδοι περιλαμβάνουν διαλυτοποίηση του δείγματος ελαίου σε κυκλοεξάνιο. Ακόμα, λόγω της ασυμβατότητας της ELISA με άπολους οργανικούς διαλύτες απαιτήθηκε πολλές φορές η διαλυτοποίηση του εκχυλίσματος με διάλυμα νερού/μεθανόλης, διότι η μεθανόλη θεωρείται μέχρι σήμερα ο καλύτερος και πιο συμβατός διαλύτης για εφαρμογές ELISA. Τέλος, οι αναλογίες των διαλυτών προέκυψαν από τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές.

Εκχύλιση με μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο

Λαμβάνονται 2 mL ελαιόλαδου, τα οποία προστίθενται σε διαχωριστική χοάνη, η οποία περιέχει 2 mL κυκλοεξάνιο. Εκεί, μετά την πλήρη διαλυτοποίηση του ελαίου στο κυκλοεξάνιο, το διάλυμα αναμειγνύεται με 8 mL μεθανόλης ή ακετονιτρίλιου και το δοχείο ανακινείται για περίπου ένα λεπτό. Το δοχείο αφήνεται για 5 λεπτά σε ηρεμία και συλλέγεται η ελαφριά φάση, η οποία και διαλύεται σε 5 mL νερό [49].

Εκχύλιση με διάλυμα DMF/νερού (9:1)

4 mL ελαίου διαλύονται σε 15 mL κυκλοεξάνιου. Το διάλυμα προστίθεται σε δοχείο ανακίνησης που περιέχει 15 mL διαλύματος DMF/νερού (9:1 v/v). Το μείγμα ανακινείται για ένα λεπτό και αφήνεται να ηρεμήσει. Έπειτα απορρίπτεται η ελαφριά φάση του κυκλοεξάνιου και η DMF φάση

επανεκχυλίζεται δύο φορές με 15 mL κυκλοεξανίου, αφού πρώτα διαλυτοποιηθεί σε 15 mL νερό. Τα δύο επανεκχυλίσματα συλλέγονται και εξατμίζονται πλήρως σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό πίεση (45°C, 180 mbar). Το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιείται με 20 mL 20% μεθανόλη/νερό [105].

Εκχύλιση με διάλυμα 15% καφεΐνης σε φορμικό οξύ

5 mL ελαιόλαδου διαλύονται σε 20 mL κυκλοεξάνιο και προστίθενται σε δοχείο ανακίνησης με 5 mL διαλύματος 15% καφεΐνης σε φορμικό οξύ. Το δοχείο ανακινείται για ένα λεπτό και αφήνεται άλλα δέκα να ηρεμήσει. Η φάση του φορμικού οξέος συλλέγεται και διαλύεται με διάλυμα 2% χλωριούχου νατρίου σε 70 mL νερό. Μετά από ανακίνηση του μείγματος για ένα λεπτό, η φάση του χλωριούχου νατρίου επανεκχυλίζεται δύο φορές με 50 mL κυκλοεξανίου. Τα εκχυλίσματα κυκλοεξανίου συλλέγονται και εξατμίζονται πλήρως σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό χαμηλής πίεσης (45°C, 180 mbar). Το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιείται με 50 mL 20% μεθανόλη/νερό. Για την μείωση της επίδρασης του διαλύτη (κυκλοεξάνιο), χρησιμοποιήθηκε στη θέση του εναλλακτικά για τις επανεκχυλίσεις n-πεντάνιο, το οποίο είναι πιο πτητικό [102].

3.3.1.2. Εκχυλίσεις υγρού - υγρού ανοσοαναλυτικών μεθόδων

Λόγω της πολυπλοκότητας και της δυσκολίας εφαρμογής των παραπάνω μεθόδων στο ELISA, επιχειρήθηκε η εξέταση των παρακάτω μεθόδων υγρής-υγρής εκχύλισης, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή στην ανοσολογική ανάλυση των πολυχλωριωμένων διφαινυλικών ενώσεων (PCBs) σε έλαια μετασχηματιστών [104,107].

Άμεση εκχύλιση ελαίου με DMSO (1:1)

Δείγμα 900μL ή 1,5 mL ελαίου, ανάλογα με την μετέπειτα αραίωση, προστίθεται σε μικρό πλαστικό δοχείο Eppendorf. Σε αυτό προστίθεται ίση ποσότητα DMSO και το μείγμα ανακινείται σε Vortex για ένα λεπτό. Μετά το δοχείο τοποθετείται σε φυγόκεντρο για άλλο ένα λεπτό στα 10000 rpm. Έπειτα, η φάση του ελαίου απορρίπτεται και λαμβάνεται το 66% της DMSO

φάσης. Το εκχύλισμα διαλυτοποιήθηκε με 10% μεθανόλη/νερό σε αραιώσεις 1:25, 1:50, 1:500, 1:1000. Οι διάφορες αραιώσεις προέκυψαν από βελτιστοποίηση.

Προεκχύλιση με 10% 0,3 M HCl/DMSO (1:1)

Πριν από την παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται μία προεκχύλιση με 0,3 M υδροχλωρικό οξύ σε DMSO. Το δείγμα του ελαίου τοποθετείται στο δοχείο Eppendorf όπου εισάγεται ίση ποσότητα 10% 0,3 M HCl σε DMSO. Το μείγμα αναμειγνύεται για ένα λεπτό στο Vortex και μετά φυγοκεντράζεται για άλλο ένα. Από τη φάση του ελαίου λαμβάνεται το 75% και ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία όπως ακριβώς περιγράφηκε.

3.3.2. Εκχυλίσεις στερεάς φάσης (SPE)

Λόγω της πολυπλοκότητας της μήτρας που λαμβάνεται από τις υγρές-υγρές εκχυλίσεις δε συνεχίστηκαν δοκιμές σε αυτήν την κατεύθυνση. Αντίθετα, κρίθηκε απαραίτητο ένα στάδιο καθαρισμού της μήτρας, το οποίο θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη χρήση στηλών για την εκχύλιση στερεάς φάσης των δειγμάτων ελαίου [94,95,101,103]. Καθώς στη βιβλιογραφία έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο στήλες ανεστραμένης, όσο και στήλες κανονικής φάσης, δοκιμάστηκαν στην παρούσα εργασία και οι δύο αυτοί μέθοδοι. Η διαφορά αυτών των μεθόδων έγκειται στο υλικό της εκάστοτε στήλης. Οι στήλες κανονικής φάσης αποτελούνται από πολικά ενεργό πυρίτιο (Silica) συνδεδεμένο σε βραχείες αλυσίδες άνθρακα, υλικό το οποίο έχει πολικό χαρακτήρα, επομένως κατά τη διέλευση του δείγματος από τη στατική φάση, ο αναλύτης αλληλεπιδρά και διατηρείται επί του προσροφητικού υλικού, ενώ περαιτέρω ακαθαρσίες απομακρύνονται. Η έκλουση του αναλύτη μπορεί να γίνει μόνο με άπολο διαλύτη. Αντίθετα, οι στήλες ανεστραμένης φάσης διαχωρίζουν αναλύτες με βάση την πολικότητά τους. Η στατική φάση, η οποία είναι συχνά μια φάση πυριτίου με αλυσίδες άνθρακα ή με άλλα πολυμερή, είναι άπολη και μπορεί να διατηρήσει ενώσεις μέτριας ή χαμηλής πολικότητας λόγω υδρόφοβων επιδράσεων. Για αυτόν το λόγο, ο αναλύτης εκλύεται μόνο με πολικό διαλύτη, ο οποίος μπορεί να διαταράξει αυτήν την αλληλεπίδραση στατικής φάσης – αναλύτη.

3.3.2.1. Εκχυλίσεις ανεστραμμένης φάσης (RPE)

Τροποποιημένη C18-Silica στήλη

Δείγμα ελαίου 10 μL προστίθεται σε μία C18 στήλη. Η στήλη εκλούεται με 10 mL ακετονιτρίλιο και το εκχύλισμα συμπυκνώνεται στα 500 μL μέσω θέρμανσης και ρεύματος αέρα. Ακολουθεί διαλυτοποίηση με νερό μέχρι τα 5 mL [103].

Εξέταση διαφόρων στηλών ανεστραμμένης φάσης με HPLC

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μάς στάλθηκαν δώρο από την εταιρία Phenomenex τρεις RPC (Reversed Phase Columns). Αυτές περιλαμβάνουν μία Strata-X στήλη ενός ιδιόκτητου πολυμερούς, μία SDB-L πολυμερική στήλη στυρενίου - διβινυλβενζενίου και μία τροποποιημένη αιθυλφαινυλική στήλη. Πριν την διεξαγωγή του ELISA ερευνήθηκε η συμπεριφορά αυτών των στηλών ως προς την έκλουση του B[a]P. Συγκεκριμένα, οι στήλες φορτώθηκαν με 10 μL ελαίου εμβολιασμένου με B[a]P και εκλούστηκαν με 13 mL ακετονιτρίλιου. Κάθε εκχύλισμα κλασματοποιήθηκε ανά mL και στάλθηκε για HPLC τεστ. Η στήλη που παρουσίασε την πιο ομαλή έκλουση του B[a]P χρησιμοποιήθηκε για εφαρμογή της ELISA.

Στήλη SDB-L

50 μL ελαίου προστέθηκαν σε μία στήλη SDB-L. Η στήλη πλύθηκε με 4 mL 2-προπανόλης και 3 mL ACN/νερού 20%. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με 15 mL ACN. Το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε στα 1,5 mL και διαλύθηκε με 10% μεθανόλη/νερό 1:10 [101].

3.3.2.2. Εκχυλίσεις κανονικής φάσης (NPE)

Στήλες Silica

600 μL ελαίου προστέθηκαν σε μία στήλη Silica (3 g). Η στήλη εκλούστηκε με 60 mL εξάνιο και το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε στα 150 μL και επανεκχυλίστηκε με DMSO (1:1), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.1.2. Τέλος το εκχύλισμα αραιώθηκε με 10% μεθανόλη/νερό 1:25. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα έκλουσης το διχλωρομεθάνιο και το τολουόλιο. Η χρήση διαφορετικών μέσων έκλουσης αποτελεί προϊόν βελτιστοποίησης. Στην εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε στα 300 μL και αραιώθηκε 1:100 [94,95].

3.3.3. Διεξαγωγή έμμεσης ανταγωνιστικής ELISA

Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης (MTP) 96 κοιλοτήτων επικαλύπτονται με τα ανάλογα διαλύματα συμπλόκου-αντιγόνου διαφόρων αραιώσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης (200 μL/κοιλότητα). Οι πλάκες καλύπτονται με αυτοκόλλητο και αποθηκεύονται μία νύχτα στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Μετά το πλύσιμο με το ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος, επιφάνεια των πλακών μικροτιτλοδότησης που τυχόν δεν έχει επικαλυφθεί με αντιγόνο μπλοκάρεται για μία ώρα με διάλυμα 1% καζεΐνης σε PBS (w/v, 300 μL/κοιλότητα) πάνω στον ανακινητή. Μετά την επώαση και την εκ νέου πλύση προστίθενται στις MTP πρώτα τα διαλύματα του B[a]P (100 μL/κοιλότητα) και μετά τα διαλύματα των πρωτογενών αντισωμάτων σε PBS (100 μL/κοιλότητα). Ακολουθεί ακόμα μία ώρα επώασης και στη συνέχεια οι πλάκες πλένονται και προστίθεται το διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος σε PBS (1:10000 v/v, 200 μL/κοιλότητα). Με την πάροδο άλλης μίας ώρας ακολουθεί η αντίδραση χρωματισμού (Εικόνα 1). Η πλάκα πλένεται μία τελευταία φορά και σε αυτήν προστίθεται διάλυμα υποστρώματος (200 μL/κοιλότητα). Η αντίδραση χρωματισμού σταματάει μετά από περίπου 20 λεπτά, αφού η πλάκα έχει χρωματιστεί επαρκώς με το διάλυμα τερματισμού (100 μL/κοιλότητα) (Εικόνα 2). Η απορρόφηση προσδιορίζεται μέσω του UV/Vis-MTP reader στα 450 nm.



Εικόνα 1: Αντίδραση χρωματισμού



Εικόνα 2: Τερματισμός αντίδρασης χρωματισμού

3.3.4. Συνθήκες διεξαγωγής ELISA

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια, καρδιά κάθε ανοσολογικής μεθόδου αποτελεί η αντίδραση αντιγόνου–αντισώματος. Επομένως, οι συγκεντρώσεις αντιγόνων–αντισωμάτων και η βελτιστοποίηση αυτών αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αραιώσεις αντιγόνων και αντισωμάτων, καθώς και οι φορές προσδιορισμού στην MTP της κάθε μεθόδου που εφαρμόστηκε. Οι αραιώσεις παρουσιάζονται πρώτα με την αραιώση του αντιγόνου και μετά των αντισωμάτων (mab-monoclonal antibody) v/v. Να σημειωθεί ότι 22F12 και 5E11 αποτελούν τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα και 1,3-βενζο[α]πυρένιο–BSA το σύμπλοκο αντιγόνου. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκαν σε PBS, ενώ του αντιγόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης. Τα δεδομένα αφορούν και τις εφαρμογές ποσοστών ανάκτησης, όπου αυτές διεξήχθησαν.

Εκχυλίσεις υγρού-υγρού (όλες), εκχύλιση με στήλες C18, SDB-L

mab 22F12 (1:20000-1:5000)

mab 5E11 (1:5000-1:10000)

εξαπλός προσδιορισμός

Εκχύλιση με στήλη Silica και εξάνιο

mab 22F12 (1:20000-1:5000)

mab 5E11 (1:5000-1:10000)

τριπλός προσδιορισμός

Σύγκριση διαλυτών έκλουσης στήλης Silica

mab 22F12 (1:5000-1:1000)

mab 5E11 (1:2500-1:5000)

εξαπλός προσδιορισμός

Εκχύλιση με στήλη Silica και διχλωρομεθάνιο

mab 22F12 (1:5000-1:2500)

mab 5E11 (1:5000-1:5000)

εξαπλός προσδιορισμός

3.3.5. Εμβολιασμός δειγμάτων με B[a]P (Spiking)

Λόγω της σιγμοειδούς μορφής της καμπύλης βαθμονόμησης στην ELISA, χρειαζόμαστε από 5 μέχρι 8 σημεία για τη λήψη της. Για το λόγο αυτό παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα, τα οποία και αποτελούν τα σημεία βαθμονόμησης της καμπύλης. Συγκεκριμένα, αφού έχει ολοκληρωθεί η εκχύλιση του ελαίου, λαμβάνεται τμήμα του εκχυλίσματος και εμβολιάζεται με συγκεκριμένη ποσότητα πρότυπου διαλύματος B[a]P (παράγραφος 3.1.1.) ως μια επιθυμητή συγκέντρωση. Στη συνέχεια ακολουθεί μια σειρά αραιώσεων, ώστε να δημιουργηθούν τόσα πρότυπα, όσα και τα σημεία που επιθυμούμε.

Οι συνηθέστερες συγκεντρώσεις των προτύπων σε B[a]P είναι: 1000 µg/L, 100 µg/L, 10 µg/L, 1 µg/L, 0,1 µg/L, 0,01 µg/L, 0,001 µg/L, 0,0001 µg/L. Ο συνήθης τρόπος παρασκευής του προτύπου των 1000 µg/L περιλαμβάνει 995,51 µL εκχυλίσματος και 4,49 µL από το πρότυπο B[a]P 222,5 µg/L σε ακετονιτρίλιο. Τα υπόλοιπα παρασκευάζονται από αυτό μέσω μιας σειράς αραιώσεων.

3.3.6. Διαδικασία υπολογισμού ποσοστών ανάκτησης

Απόδειξη για την αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου εκχύλισης ως προς την απομόνωση του αναλύτη είναι τα ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης. Στη συγκεκριμένη εργασία υπολογίστηκαν ποσοστά ανάκτησης με την προαναφερθείσα διαδικασία Spiking. Βασική διαφορά με τα πρότυπα διαλύματα καμπύλης βαθμονόμησης είναι ότι τα δείγματα ελαίου πρέπει να εμβολιαστούν πριν από τη διαδικασία εκχύλισης και να αφεθούν μία νύχτα στον απαγωγό, ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης του προτύπου B[a]P. Την επόμενη μέρα τα δείγματα εκχυλίζονται κανονικά και τα εκχυλίσματα προστίθενται πάντα στην ίδια MTP με την καμπύλη βαθμονόμησης. Προσοχή κατά τον εμβολιασμό των δειγμάτων πρέπει να δίνεται στο συντελεστή αραίωσης, διότι αυτός μετατοπίζει τις πραγματικές συγκεντρώσεις από την καμπύλη. Αν για παράδειγμα θέλουμε να εντοπίσουμε ποσοστά ανάκτησης στην περιοχή των 2 μg/L της καμπύλης βαθμονόμησης και έχουμε έναν παράγοντα αραίωσης 500, τότε η συγκέντρωση στο δείγμα θα πρέπει να είναι $2 \mu\text{g/L} * 500 / 0,952 \text{ kg/L} = 1000 \mu\text{g/kg}$, με $\rho_{\text{λάδι}} = 0,952 \text{ kg/L}$ την πυκνότητα του ελαιόλαδου. Μέσω των μετρήσεων απορρόφησης των δειγμάτων και της καμπύλης βαθμονόμησης υπολογίζονται οι πειραματικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων και από τις γνωστές πραγματικές συγκεντρώσεις τα ποσοστά ανάκτησης, όπως παρουσιάζεται στη σχέση 5:

$$WFR = \frac{x_{ist}}{x_{soll}} \quad (5)$$

όπου WFR = Recovery rates, x_{ist} = πειραματική συγκέντρωση, x_{soll} = εμβολιασμένη συγκέντρωση. Μαζί με τα δείγματα προστίθενται στην MTP και δύο σειρές από τυφλό διάλυμα εκχυλίσματος, μία στην αρχή και μία στο τέλος. Αυτό εξυπηρετεί στον εντοπισμό απωλειών κατά την προσθήκη δείγματος στην πλάκα.

IV ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Βαθμονομήσεις

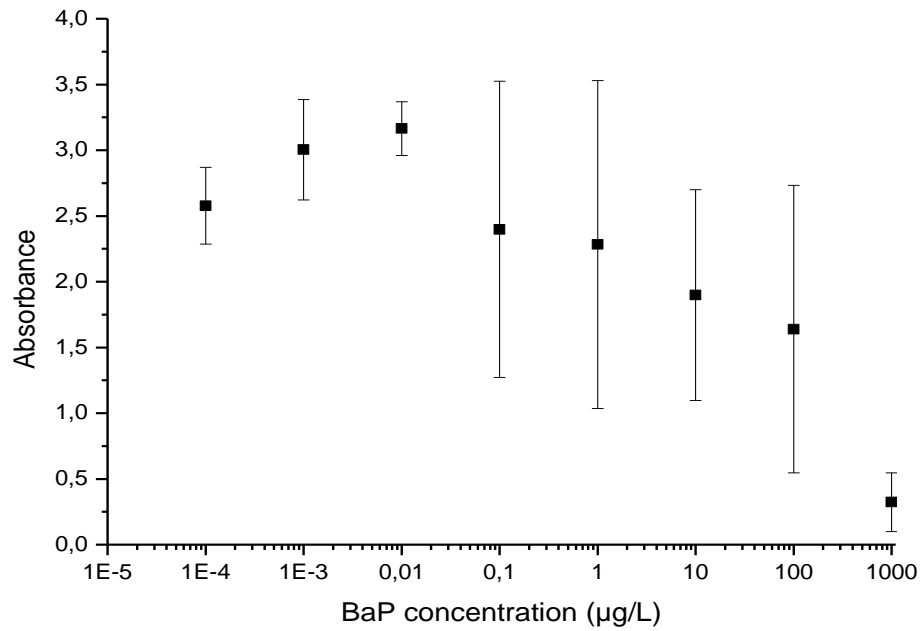
Σε πρώτη φάση της διαδικασίας δοκιμάστηκαν διάφοροι διαλύτες για την εκχύλιση υγρού-υγρού που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (παράγραφος 2.2.5.). Τα εκχυλίσματα εμβολιάστηκαν με πρότυπο B[a]P σε γνωστές συγκεντρώσεις (παράγραφος 3.2.5.) και εφαρμόστηκαν στο ELISA. Στόχος ήταν η εύρεση του καταλληλότερου διαλύτη που θα έδινε καμπύλη βαθμονόμησης. Ο άξονας x αφορά τη συγκέντρωση B[a]P προσθήκης. Κάθε εκχύλισμα εφαρμόστηκε στην ELISA με τη χρήση δύο διαφορετικών αντι-B[a]P αντισωμάτων, τα 22F12 και 5E11. Η διαφορά αυτών των δύο αντισωμάτων έγκειται στο γεγονός ότι το 5E11 παρουσιάζει χαμηλότερη ευαισθησία δοκιμής από το 22F12 λόγω της μικρότερης επιλεκτικότητάς του ως προς το B[a]P. Για το λόγο αυτό δίνεται μεγαλύτερη βαρύτητα στις εφαρμογές με το αντίσωμα 22F12, με το 5E11 να ακολουθεί ως συμπληρωματικό των αναλύσεων με το 22F12.

4.1.1. Εκχύλιση με μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο

Οι πρώτοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν τη μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Ο λόγος επιλογής των παραπάνω διαλυτών είναι ότι αυτοί παρουσιάζουν συμβατότητα με το ELISA σε εφαρμογές ανάλυσης νερού [49], οπότε η διαδικασία γίνεται πιο γρήγορη, με το εκχύλισμα να εφαρμόζεται κατευθείαν στη μέθοδο. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στα Σχήματα 9-12:

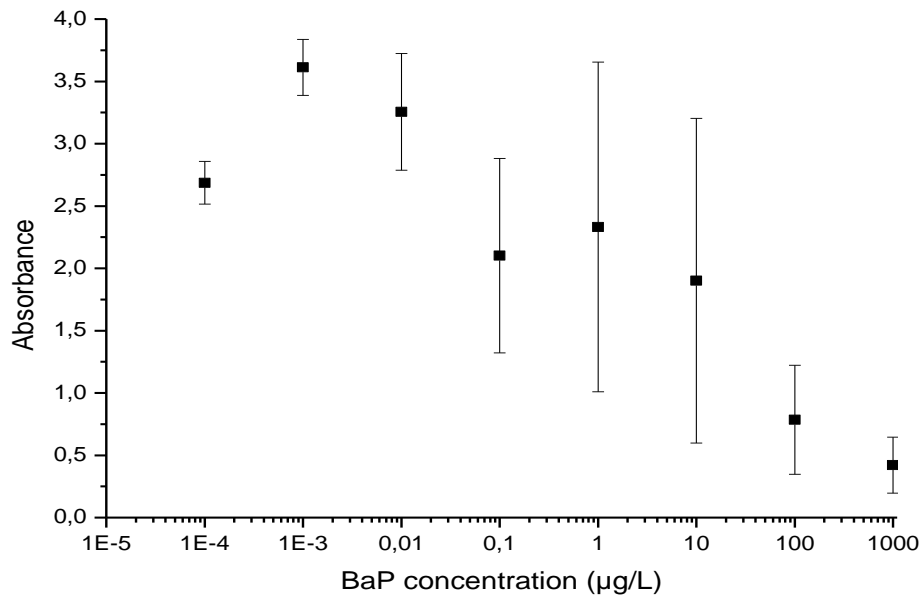
Μεθανόλη

mab 22F12



Σχήμα 9: Βαθμονόμηση εκχύλισης με μεθανόλη για το αντίσωμα 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

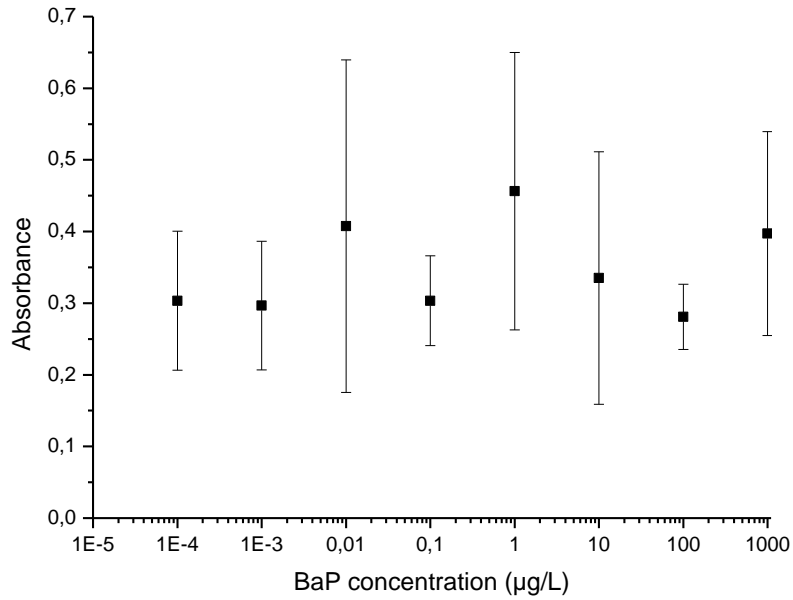
mab 5E11



Σχήμα 10: Βαθμονόμηση εκχύλισης με μεθανόλη για το αντίσωμα 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

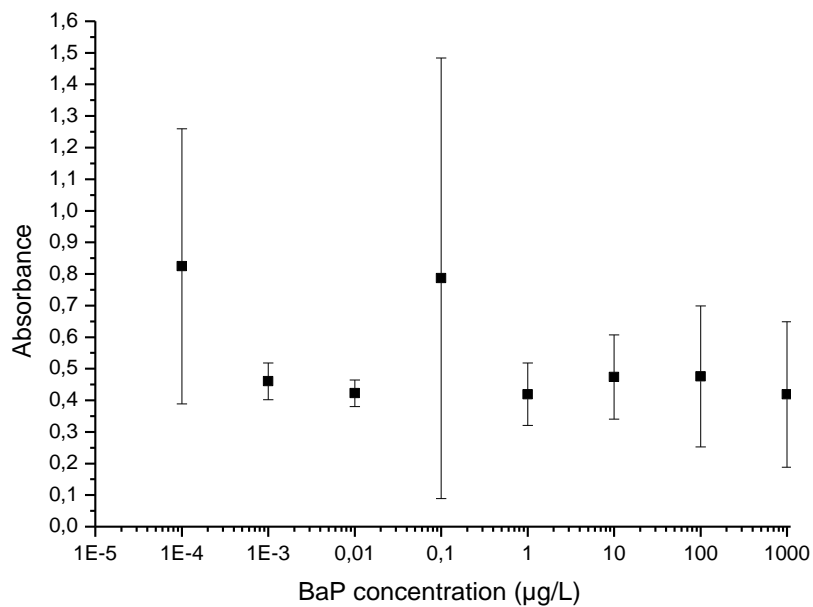
Ακετονιτρίλιο

mab 22F12



Σχήμα 11: Βαθμονόμηση εκχύλισης με ακετονιτρίλιο για το αντίσωμα 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

mab 5E11



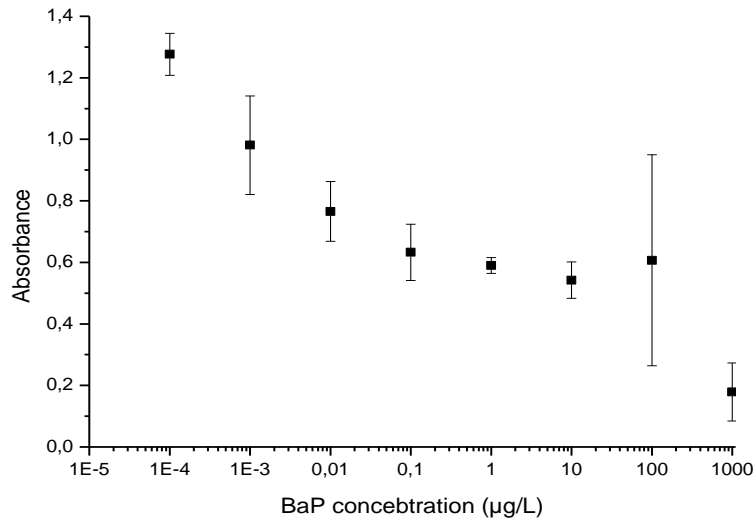
Σχήμα 12: Βαθμονόμηση εκχύλισης με ακετονιτρίλιο για το αντίσωμα 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Όπως φαίνεται από τα Σχήματα 9-12, για τις προαναφερθείσες μεθόδους δεν ήταν εφικτή η βαθμονόμηση, καθώς τα σημεία που λήφθηκαν δε σχηματίζουν σιγμοειδή καμπύλη αναφοράς. Το πρόβλημα έγκειται στο γεγονός ότι η εκχύλιση με τους συγκεκριμένους διαλύτες έχει ως αποτέλεσμα τη συνεκχύλιση του B[a]P με πλήθος άπολων συστατικών της μήτρας του ελαιόλαδου (π.χ. τριγλυκερίδια, λιπαρά οξέα), τα οποία παρεμποδίζουν τη διαδικασία της ELISA. Αυτό γίνεται αντιληπτό και κατά την πειραματική διαδικασία από τη θολότητα του εκχυλίσματος. Επίσης, παρατηρούνται στα Σχήματα 9-12 σημεία με μεγάλες αποκλίσεις (RSD% της τάξης των 46 με 78%), παρόλο που ο προσδιορισμός του εκάστοτε σημείου που επιχειρήθηκε ήταν εξαπλός. Αυτό έρχεται να δικαιολογήσει τον παραπάνω ισχυρισμό, δηλαδή την ασυμβατότητα των μεθόδων αυτών με την ELISA, λόγω προβλημάτων καθαρότητας της μήτρας του εκχυλίσματος, τα οποία προκαλούν αποκλίσεις ακόμα και μεταξύ μετρήσεων του ίδιου δείγματος. Παρατηρούμε ακόμα ότι η μεθανόλη δίνει καλύτερα αποτελέσματα από το ακετονιτρίλιο. Ο λόγος είναι ότι το ακετονιτρίλιο είναι άπολος διαλύτης, δηλαδή ασύμβατος με το ELISA.

4.1.2. Εκχύλιση με DMF

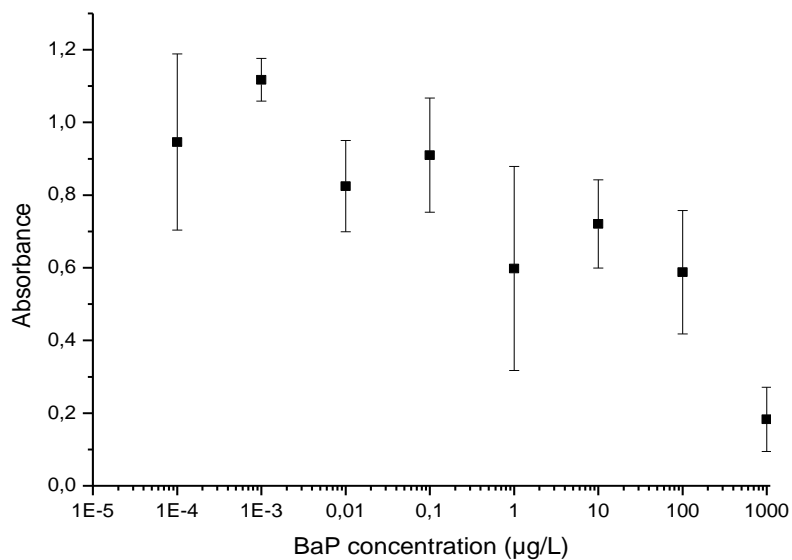
Ο επόμενος διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DMF. Η μέθοδος επιλέχθηκε από τη βιβλιογραφία, αφού έχει χρησιμοποιηθεί σε έλαια για την εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας [105]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Σχήματα 13-14:

mab 22F12



Σχήμα 13: Βαθμονόμηση εκχύλισης με DMF για το αντίσωμα 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

5E11



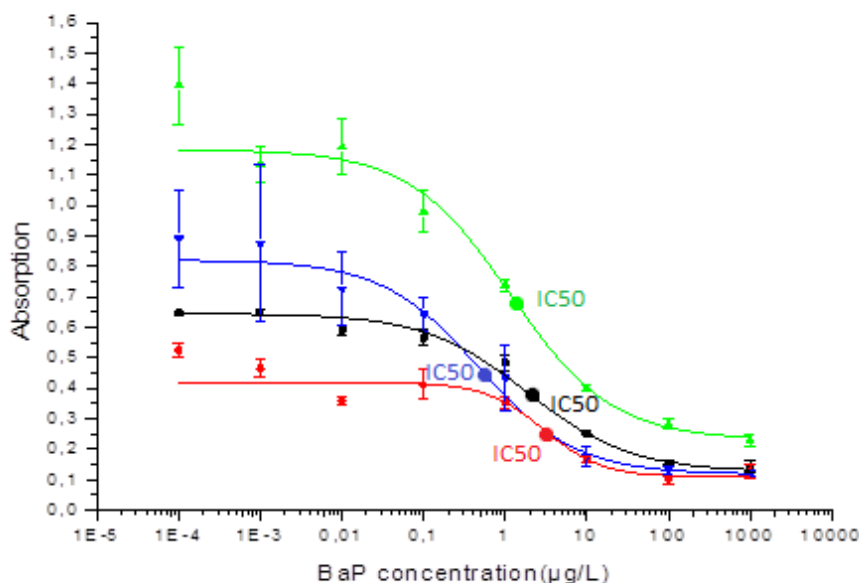
Σχήμα 14: Βαθμονόμηση εκχύλισης με DMF για το αντίσωμα 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και σε αυτήν τη μέθοδο. Όπως γίνεται αντιληπτό από τα Σχήματα 13-14, δεν επιτεύχθηκε βαθμονόμηση, ενώ οι μεγάλες αποκλίσεις σημείων επανεμφανίζονται (RSD% της τάξης των 58%). Ο λόγος παραμένει ίδιος με τον παραπάνω· το εκχύλισμα είναι πολύ περίπλοκο λόγω της επίδρασης της μήτρας του λαδιού και έτσι η αναγνώριση του αναλύτη από τα αντισώματα δυσχεραίνει, επομένως η διαδικασία της ELISA παρεμποδίζεται.

4.1.3. Εκχύλιση με καφεΐνη/φορμικό οξύ

Η επόμενη μέθοδος επιλέχθηκε από τη βιβλιογραφία, καθώς η συμπλοκοποίηση της καφεΐνης με το κλάσμα του B[a]P υπόσχεται την επιλεκτικότερη εκχύλισή του [102]. Η συγκεκριμένη υγρή-υγρή εκχύλιση έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους και έτσι επιτεύχθηκε βαθμονόμηση. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσίασε μεγάλη απόκλιση μεταξύ των δοκιμών. Στο Σχήμα 15 παρουσιάζονται τέσσερις καμπύλες βαθμονόμησης που αντιστοιχούν στην ίδια μέθοδο και που λήφθηκαν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος. Ενδεικτικά δίνονται και οι τιμές του IC₅₀ της κάθε καμπύλης, όπως αυτές λαμβάνονται από το στατιστικό πρόγραμμα Origin (μέσο σημείο δοκιμής στο 50% του σήματος). Η σειρά παρουσίασης των τιμών IC₅₀ στον Πίνακα 3 αντιστοιχεί στη σειρά διεξαγωγής πειραμάτων για τη λήψη των βαθμονομήσεων του Σχήματος 15. Όπως φαίνεται τόσο οι καμπύλες όσο και οι τιμές IC₅₀ παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ τους.

mab 22F12



Σχήμα 15: Σύγκριση καμπύλων βαθμονόμησης μεθόδου καφεΐνης/φορμικού οξέος (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 3: Σύγκριση τιμών IC_{50} καμπυλών βαθμονόμησης με καφεΐνη/φορμικό οξύ

($\mu\text{g/L}$)	Καμπύλη 1	Καμπύλη 2	Καμπύλη 3	Καμπύλη 4	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %
IC_{50}^1	2,967	1,161	0,418	1,897	1,606	1,086	67,61

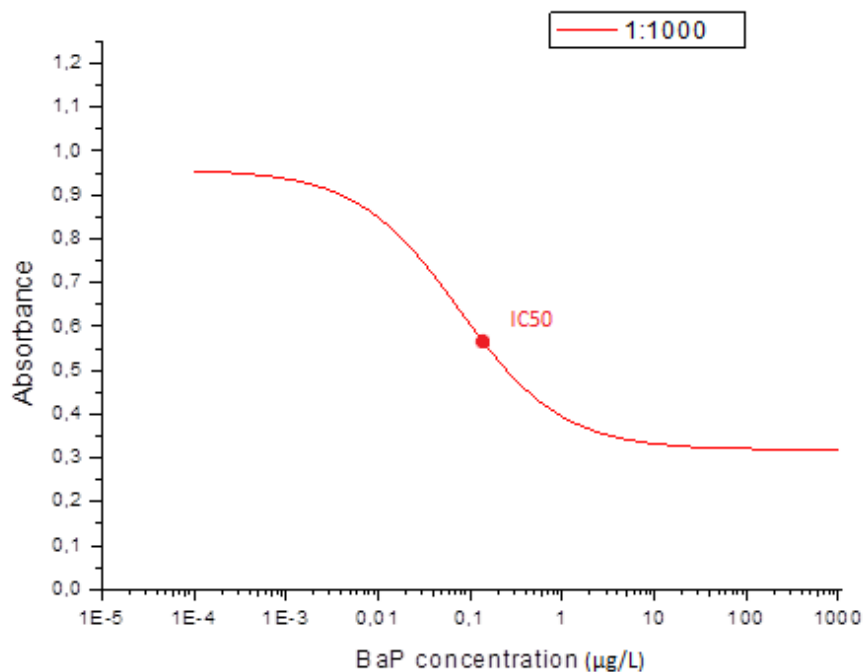
¹ 50% του σήματος

Μπορεί μεν η εκχύλιση να είναι εν μέρη επιτυχής, δηλαδή να προσαρμόζεται μια σιγμοειδής καμπύλη αναφοράς, το πρόβλημα όμως με τη μήτρα δεν μπορεί να αποφευχθεί, επομένως συνεχίζουμε να έχουμε μεγάλες αποκλίσεις και να μην λαμβάνουμε επαναλήψιμα αποτελέσματα.

4.1.4. Άμεση εκχύλιση με DMSO (1:1)

Αφού το πρόβλημα με τη μήτρα παίζει σημαντικό ρόλο στις εκχυλίσεις υγρού-υγρού που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία, επιχειρήθηκε σε επόμενο στάδιο η εφαρμογή μιας μεθόδου η οποία είναι συμβατή με ανοσοδοκιμές σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όμως μέχρι σήμερα δεν είχε χρησιμοποιηθεί σε ελαιόλαδο. Η μέθοδος αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Kim et al. [104,107] ως μια συνδιασμένη εκχύλιση ελαίων μετασχηματιστών, η οποία περιλαμβάνει εκχύλιση στερεάς φάσης με στήλες C18, εκχύλιση υγρού-υγρού με DMSO και εκχύλιση με KOH/αιθανόλη-θειϊκό οξύ για τον προσδιορισμό Aroclor (μείγμα PCBs) με ανοσοδοκιμή. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η άμεση εκχύλιση με DMSO και δοκιμάστηκαν διάφορες αραιώσεις του εκχυλίσματος, μέχρι την επίτευξη αναπαραγωγίσιμων αποτελεσμάτων. Οι καμπύλες βαθμονόμησης που λήφθηκαν παρουσιάζονται στα Σχήματα 16-17, ενώ στους Πίνακες 4-5 συγκρίνονται τα IC₅₀ των καμπυλών ανάλογα με τις διαφορετικές αραιώσεις, όπως αυτά προκύπτουν από αυτές. Οι συγκεντρώσεις των αναλυτικών παραμέτρων δίνονται σε μg/L, όπως δηλαδή λαμβάνονται από το Origin, και σε μg/kg, συνυπολογίζοντας τον παράγοντα αραιώσης και την πυκνότητα του ελαίου (παράγραφος 3.3.6.).

mab 22F12



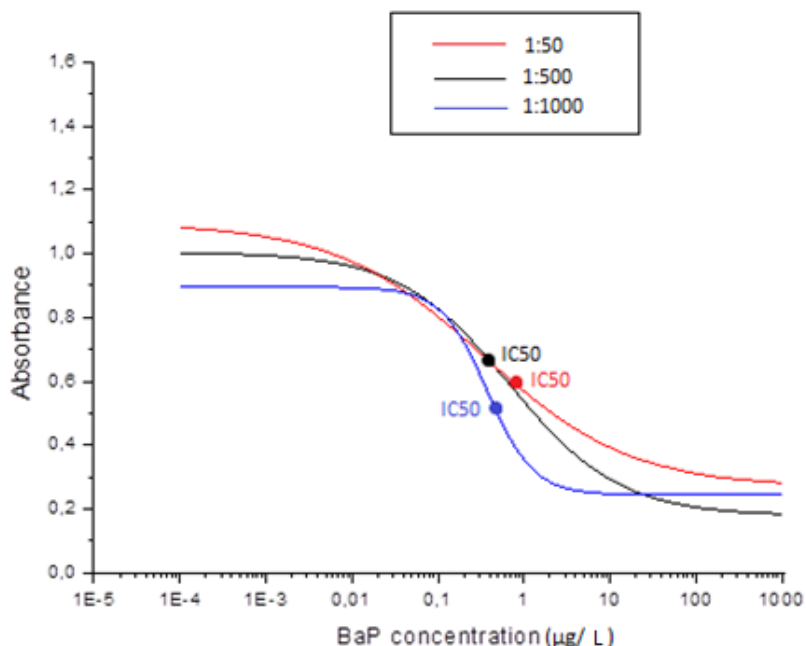
Σχήμα 16: Σύγκριση καμπυλών βαθμονόμησης μεθόδου DMSO για τις διάφορες αραιώσεις, αντίσωμα mab 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 4: Αποτελέσματα εκχύλισης DMSO και σύγκριση μεταξύ παραγόντων αραιώσης για το αντίσωμα mab 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Αραίωση	IC ₅₀ ¹ (µg/L)	IC ₅₀ (µg/kg)	Παράγοντας αραιώσης
1 : 25	NA	NA	-
1 : 50	NA	NA	-
1 : 500	NA	NA	-
1 : 1000	0,076 ± 0,058	53,17 ± 40,58	666

NA=Not Applicable, ¹ 50% του σήματος

mab 5E11



Σχήμα 17: Σύγκριση καμπυλών βαθμονόμησης μεθόδου DMSO για τις διάφορες αραιώσεις, αντίσωμα mab 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 5: Αποτελέσματα εκχύλισης DMSO και σύγκριση μεταξύ παραγόντων αραιώσης για το αντίσωμα mab 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

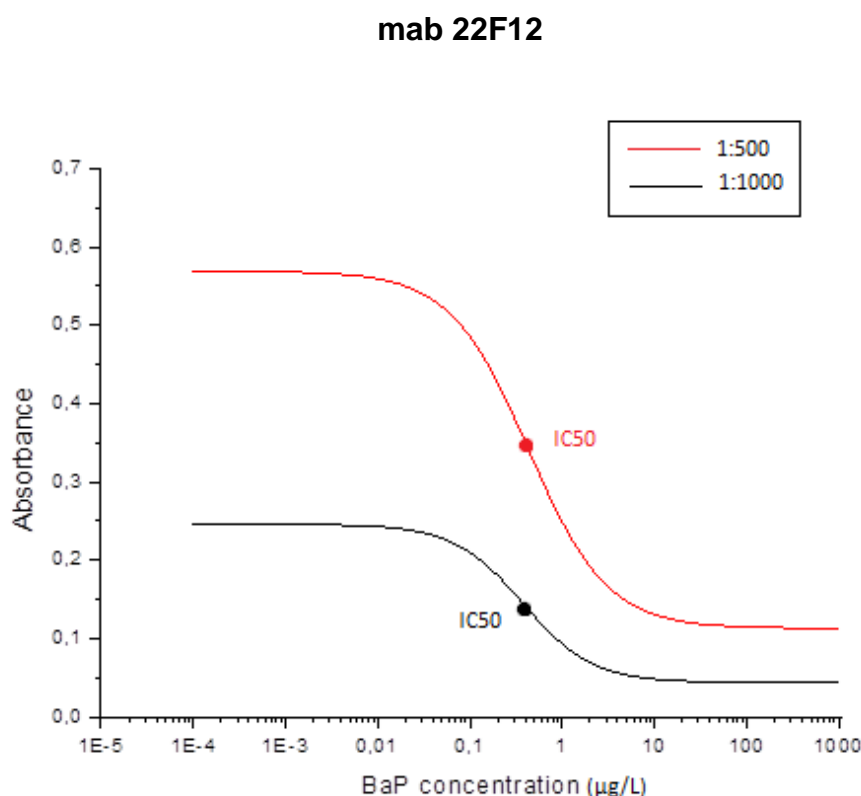
Αραίωση	IC ₅₀ (µg/L)	IC ₅₀ (µg/kg)	Παράγοντας αραιώσης
1 : 25	NA	NA	-
1 : 50	0,675 ± 0,211	23,4 ± 7,31	33
1 : 500	0,331 ± 0,156	115,78 ± 54,57	333
1 : 1000	0,369 ± 0,077	258,14 ± 53,87	666

Από το Σχήμα 16 προκύπτει ότι για το αντίσωμα 22F12 ήταν εφικτή η βαθμονόμηση μόνο σε μεγάλες αραιώσεις (1:1000). Για το αντίσωμα 5E11 επιτεύχθηκαν βαθμονομήσεις σε τρεις διαφορετικές αραιώσεις, όμως όπως συμπεραίνεται από τον Πίνακα 5, η πιο επαναλήψιμη εξ'αυτών λήφθηκε για αραιώση 1:1000, αφού το σφάλμα του μέσου σημείου δοκιμής για τη συγκεκριμένη αραιώση είναι πολύ μικρότερο σε σχέση με των υπολοίπων αραιώσεων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει και το Σχήμα 17, αφού όσο μεγαλώνει η αραιώση, τόσο πιο καλή μορφή λαμβάνει η σιγμοειδής καμπύλη βαθμονόμησης. Ο επιτυγχανόμενος παράγοντας αραιώσης όμως δε μας εξυπηρετεί, γιατί μας απομακρύνει από το εύρος το οποίο θέλουμε να προσδιορίσουμε. Οι μεγάλες αραιώσεις μειώνουν την ευαισθησία δοκιμής της μεθόδου, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τον παράγοντα αραιώσης. Αυτό

δικαιολογεί την τάση μείωσης της έντασης σήματος (Σχήμα 17) καθώς την αύξηση του μέσου σημείου δοκιμής (Πίνακας 5) αυξανόμενης της αραιώσης. Η μεγάλη αραιώση μάς δείχνει επίσης ότι η επίδραση της μήτρας παραμένει.

4.1.5. Εκχύλιση με DMSO (1:1) με προεκχύλιση με HCL/DMSO (1:1)

Εδώ επιχειρήθηκε προεπεξεργασία του δείγματος πριν την εκχύλισή του. Το βήμα αυτό προβλεπόταν από τη βιβλιογραφία [104,107], όμως παραλήφθηκε πριν για λόγους ευκολίας και ταχύτητας. Παρόμοιες διαδικασίες με την παραπάνω μέθοδο εφαρμόστηκαν και σε αυτήν την εκχύλιση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα Σχήματα 18-19 και στους Πίνακες 6-7.

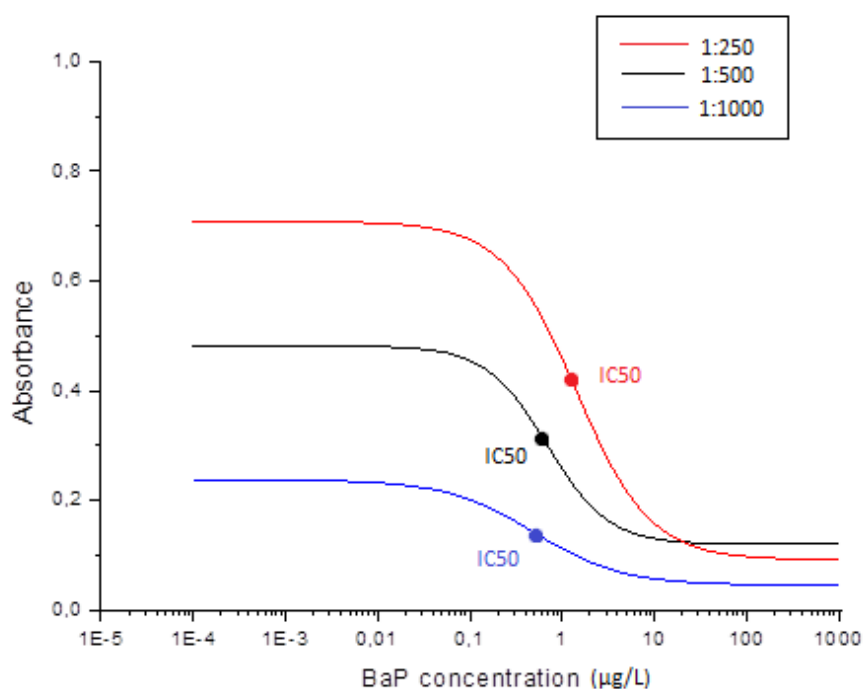


Σχήμα 18: Σύγκριση καμπυλών βαθμονόμησης μεθόδου DMSO με προεκχύλιση για τις διάφορες αραιώσεις, αντίσωμα mab 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 6: Αποτελέσματα εκχύλισης με DMSO με προεκχύλιση και σύγκριση μεταξύ παραγόντων αραιώσης για το αντίσωμα mab 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Αραίωση	IC ₅₀ (μg/L)	IC ₅₀ (μg/kg)	Παράγοντας αραιώσης
1 : 50	NA	NA	-
1 : 100	NA	NA	-
1 : 250	NA	NA	-
1 : 500	0,452 ± 0,024	118,69 ± 6,3	250
1 : 1000	0,374 ± 0,046	196,42 ± 24,16	500

mab 5E11



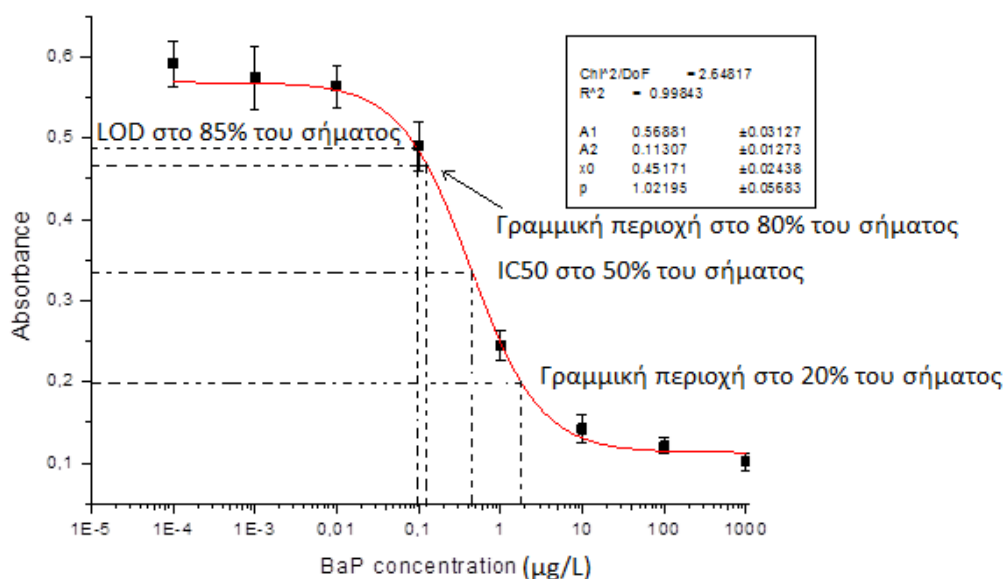
Σχήμα 19: Σύγκριση καμπυλών βαθμονόμησης μεθόδου DMSO με προεκχύλιση για τις διάφορες αραιώσεις, αντίσωμα mab 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 7: Αποτελέσματα εκχύλισης με DMSO με προεκχύλιση και σύγκριση μεταξύ παραγόντων αραιώσης για το αντίσωμα mab 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Αραίωση	IC₅₀ (μg/L)	IC₅₀ (μg/kg)	Παράγοντας αραιώσης
1 : 50	NA	NA	-
1 : 100	NA	NA	-
1 : 250	1,419 ± 0,482	186,32 ± 63,29	125
1 : 500	0,689 ± 0,066	181,01 ± 17,23	250
1 : 1000	0,498 ± 0,059	261,55 ± 30,99	500

Η προεκχύλιση, η οποία αποτελεί στην ουσία στάδιο καθαρισμού της μήτρας, φαίνεται ότι λειτουργεί. Με τη μέθοδο προεκχύλισης επιτεύχθηκε λήψη επαναλήψιμων καμπυλών σε αραιώση μικρότερη από τη μέθοδο χωρίς προεκχύλιση (βαθμονόμηση σε αραιώση 1:500 με τη μέθοδο προεκχύλισης έναντι αραιώσης 1:1000 με την άμεση εκχύλιση και παράγοντας αραιώσης 250 έναντι 666 αντίστοιχα). Η μέθοδος αυτή αποτελεί την καλύτερη υγρή-υγρή εκχύλιση που επιτεύχθηκε. Παρόλα αυτά, ακόμα ο παράγοντας αραιώσης παραμένει υψηλός, οδηγώντας σε χαμηλή ευαισθησία δοκιμής και άρα αδυναμία προσδιορισμού σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Το πρόβλημα με τη μήτρα λοιπόν δε σταματάει να εμφανίζεται ακόμα και σε μεθόδους συμβατές με ανοσοδοκιμές, αφού το ελαιόλαδο είναι πολύ περίπλοκο στα συστατικά του. Στα Σχήματα 20-21 παρουσιάζονται οι βέλτιστες καμπύλες που λήφθηκαν για αραιώση 1:500 μαζί με τις αναλυτικές τους παραμέτρους στους Πίνακες 8-9. Η επιλογή αυτής της αραιώσης οφείλεται στην επαναληψιμότητα και στο χαμηλό συγκριτικά συντελεστή αραιώσης και για τα δύο αντισώματα. Οι αναλυτικές παράμετροι δίνονται σε μg/kg, έχοντας συνυπολογίσει στις τιμές τον παράγοντα αραιώσης και την πυκνότητα του ελαίου.

mab 22F12

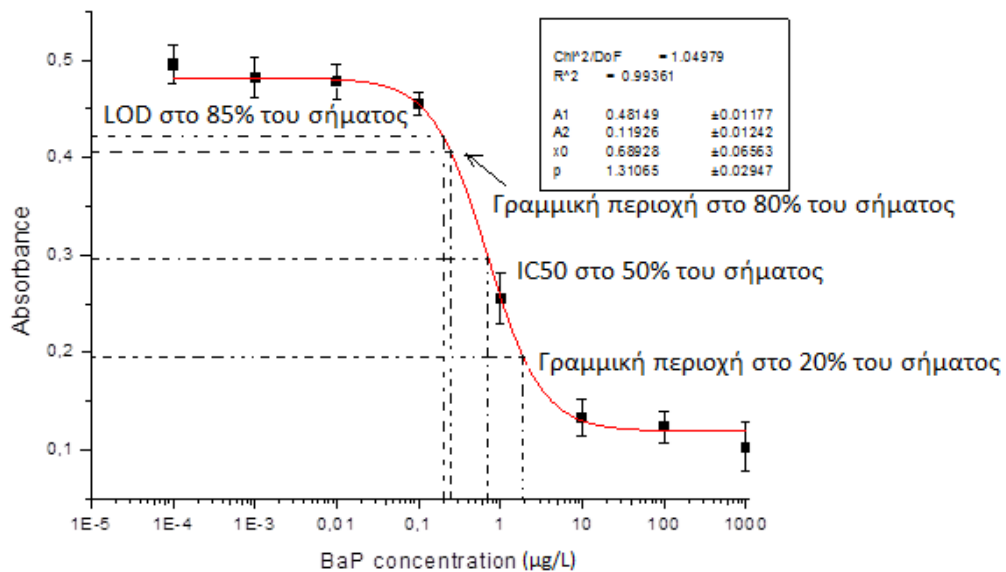


Σχήμα 20: Καμπύλη βαθμονόμησης εκχύλισης DMSO με προεκχύλιση για το αντίσωμα 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 8: Παράμετροι ανάλυσης εκχύλισης DMSO με προεκχύλιση για το αντίσωμα 22F12

(μg/kg)	22F12
Εύρος εργασίας	35,71 – 448,52
IC ₅₀	118,62 ± 6,4
LOD	24,47
Παράγοντας αραίωσης	250
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

mab 5E11



Σχήμα 21: Καμπύλη βαθμονόμησης εκχύλισης DMSO με προεκχύλιση για το αντίσωμα 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 9: Παράμετροι ανάλυσης εκχύλισης DMSO με προεκχύλιση για το αντίσωμα 5E11

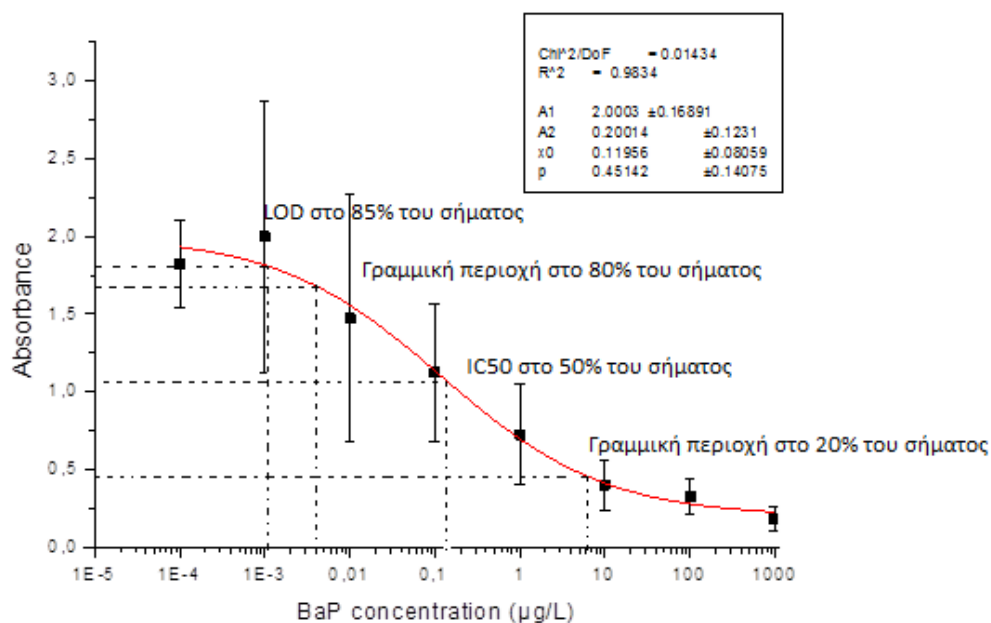
(µg/kg)	22F12
Εύρος εργασίας	64,07 – 518,91
IC ₅₀	181,01 ± 17,23
LOD	39,39
Παράγοντας αραίωσης	250
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

4.1.6. Εκχύλιση με στήλη C18

Σε επόμενη φάση και λόγω ανάγκης σταδίου καθαρισμού της μήτρας εφαρμόστηκαν εκχυλίσεις στερεάς φάσης. Στόχος ήταν να απομακρυνθούν όσο γίνεται τα ανεπιθύμητα άπολα συστατικά (τριγλυκερίδια, λιπαρά οξέα) του ελαιόλαδου που δημιουργούν προβλήματα στην ELISA. Πρώτη στήλη που δοκιμάστηκε ήταν η C18-τροποποιημένη Silica στήλη [103]. Τα καλύτερα

αποτελέσματα που λήφθηκαν μέσω αυτής της μεθόδου παρουσιάζονται στα σχήματα 22-23.

mab 22F12

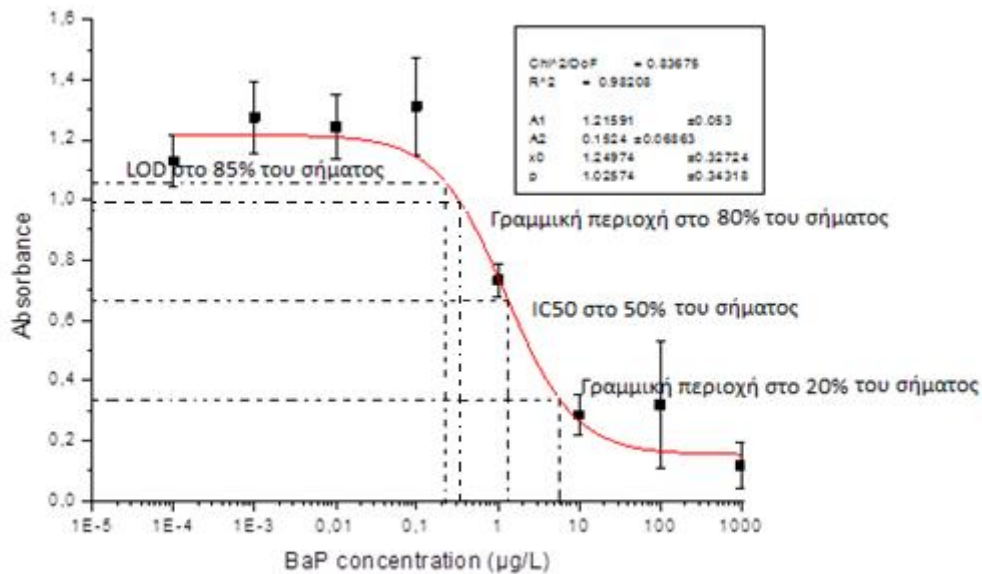


Σχήμα 22: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου C18 για το αντίσωμα 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 10: Παράμετροι ανάλυσης μεθόδου C18 για το αντίσωμα 22F12

(µg/kg)	22F12
Εύρος εργασίας	1,62 – 3355,28
IC ₅₀	62,79 ± 42,32
LOD	5,96
Παράγοντας αραίωσης	500
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

mab 5E11



Σχήμα 23: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου C18 για το αντίσωμα 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 11: Παράμετροι ανάλυσης μεθόδου C18 για το αντίσωμα 5E11

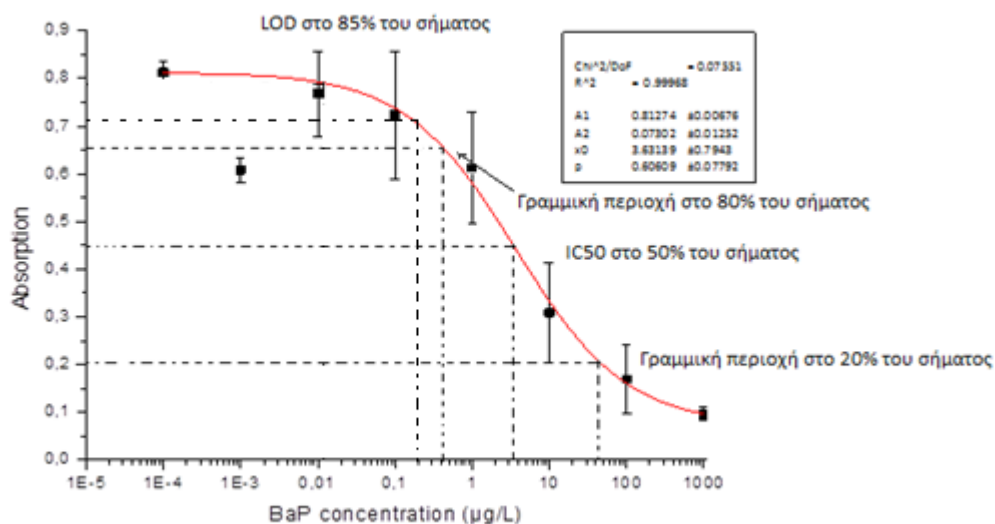
(µg/kg)	5E11
Εύρος εργασίας	169,91 – 2535,71
IC ₅₀	656,24 ± 171,86
LOD	120,75
Παράγοντας αραίωσης	500
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

Η μέθοδος δε δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα, αφού τα σφάλματα των αναλυτικών παραμέτρων είναι πολύ μεγάλα και κάποια σχεδόν ίσα με τις τιμές των παραμέτρων. Εκτός αυτού, η καμπύλη στο αντίσωμα 22F12 μετατοπίζεται ως προς την κλίση της, ενώ τα RSD κάποιων σημείων είναι μεγάλα (43% με 53%). Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν επίδραση της μήτρας στην εφαρμογή. Στην παράγραφο 4.2. αναλύεται περισσότερο ο λόγος αστοχίας της συγκεκριμένης στήλης.

4.1.7. Εκχύλιση με στήλη SDB-L

Αφού η βιβλιογραφία προέβλεπε εκχυλίσεις ελαίου με στήλες ανεστραμμένης φάσης, δοκιμάστηκε και η συγκεκριμένη στήλη, η οποία μάς χορηγήθηκε από την εταιρεία Phenomenex. Με τον ίδιο τρόπο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα (Σχήματα 24-25):

mab 22F12

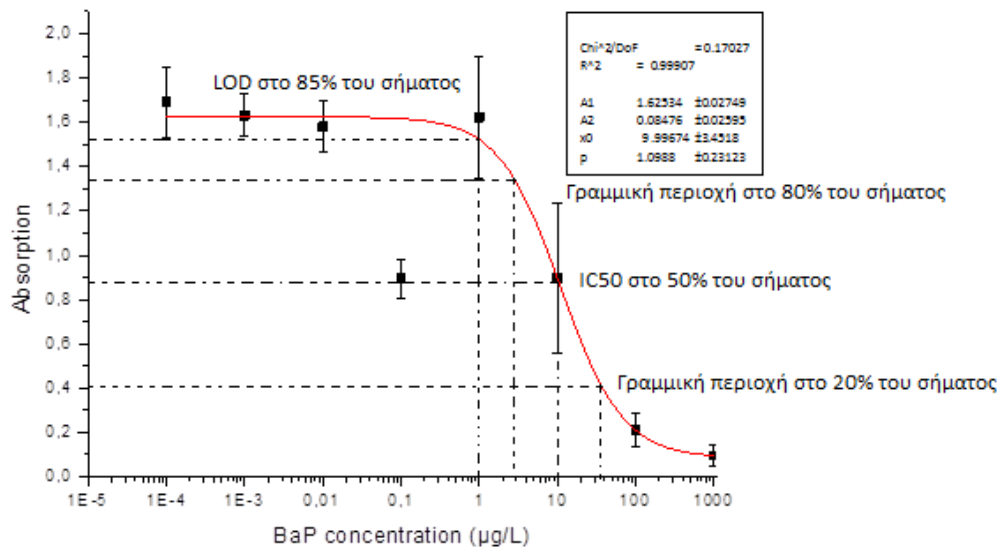


Σχήμα 24: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου SDB-L για το αντίσωμα 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 12: Παράμετροι ανάλυσης μεθόδου SDB-L για το αντίσωμα 22F12

(µg/kg)	22F12
Εύρος εργασίας	116,18 - 11269,64
IC ₅₀	1270,22 ± 277,83
LOD	68,91
Παράγοντας αραιώσης	333
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

mab 5E11



Σχήμα 25: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου SDB-L για το αντίσωμα 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 13: Παράμετροι ανάλυσης μεθόδου SDB-L για το αντίσωμα 5E11

(µg/kg)	5E11
Εύρος εργασίας	981,3 - 12236,97
IC ₅₀	3496,76 ± 1207,4
LOD	253,78
Παράγοντας αραιώσης	333
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

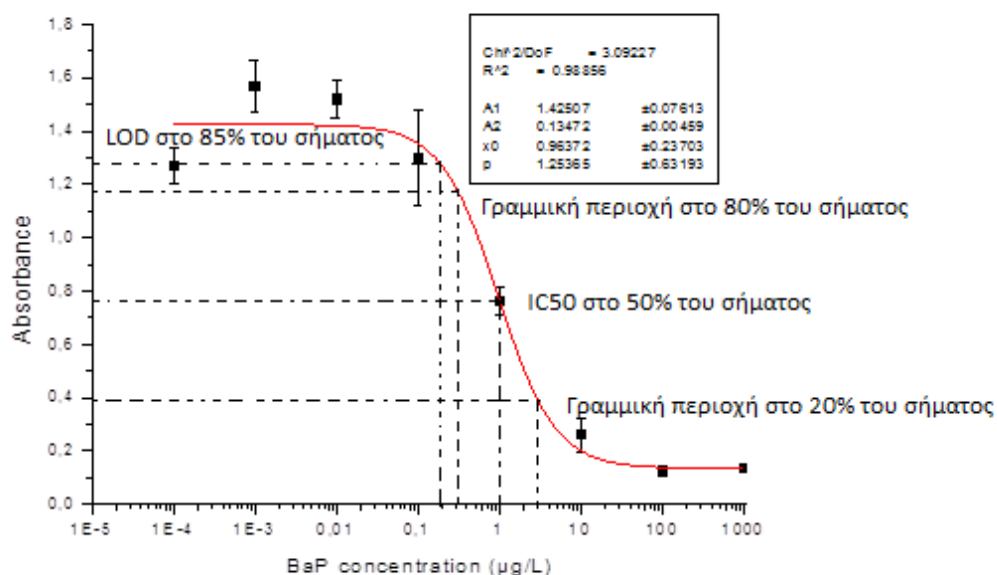
Τα σημεία που βρίσκονται εκτός καμπυλών δε λήφθηκαν υπόψη κατά την βαθμονόμηση, καθώς πρόκειται πολύ πιθανόν για πειραματικά λάθη. Η μέθοδος παρουσιάζει μια σχετική επαναληψιμότητα, παρόλα αυτά δεν κρίνεται κατάλληλη για τον προσδιορισμό που επιθυμούμε, καθώς έχουμε υψηλό συντελεστή αραιώσης, ο οποίος και μας απομακρύνει αρκετά από το ανώτατο επιτρεπτό όριο. Ο μεγάλος συντελεστής αραιώσης οφείλεται στο ότι το εκχύλισμα ακετονιτριλίου δεν ήταν δυνατόν να συμπυκνωθεί κάτω από 1,5 mL, αφού γινόταν θωλό εξαιτίας της μήτρας και άρα μη εφαρμόσιμο στην ELISA.

4.1.8. Εκχύλιση με στήλες Silica

Επειδή με τις στήλες ανεστραμμένης φάσης δεν μπόρεσαν να ληφθούν βαθμονομήσεις οι οποίες να μας επιτρέπουν να προσδιορίσουμε στο ανώτατο επιτρεπτό όριο, επιχειρήθηκε στη συνέχεια η χρήση στηλών κανονικής φάσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στις μεθόδους ανίχνευσης ως στάδιο καθαρισμού [94,95]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 3.3.2.2., σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες έκλουσης, το εξάνιο και το διχλωρομεθάνιο, αφού ο πολικός χαρακτήρας των στηλών επιτρέπει τη χρήση διαφόρων άπολων διαλυτών. Τα αποτελέσματα και των δύο αυτών εναλλακτικών δοκιμών ακολουθούν στα Σχήματα 26-29:

Έκλυση με εξάνιο

mab 22F12

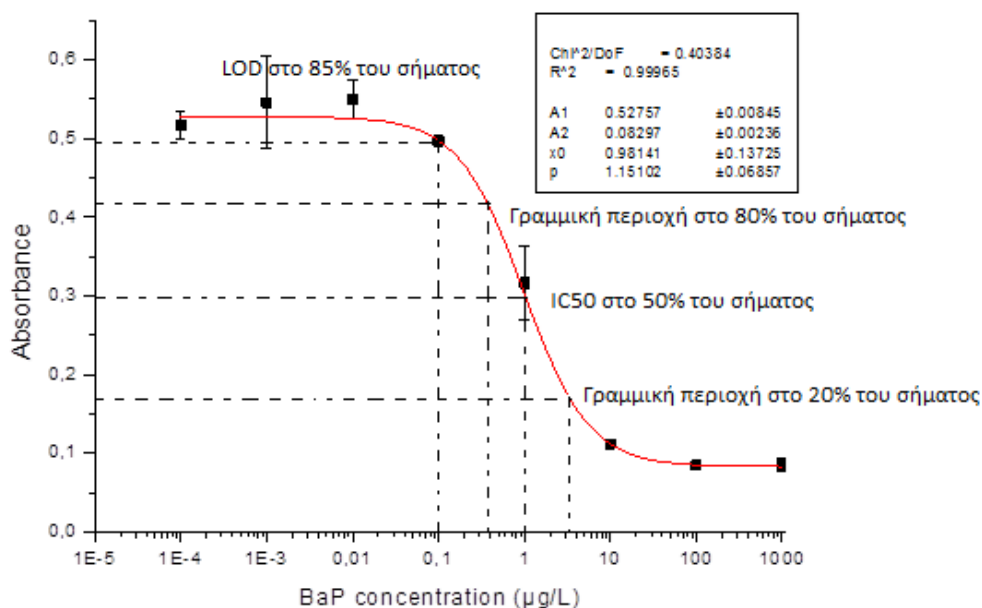


Σχήμα 26: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου Silica με εξάνιο για το αντίσωμα 22F12 (τυπική απόκλιση για τριπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 14: Παράμετροι ανάλυσης μεθόδου Silica με εξάνιο για το αντίσωμα 22F12

(µg/kg)	22F12
Εύρος εργασίας	2,09 - 19,12
IC ₅₀	6,33 ± 1,56
LOD	1,86
Παράγοντας αραιώσης	6,25
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

mab 5E11



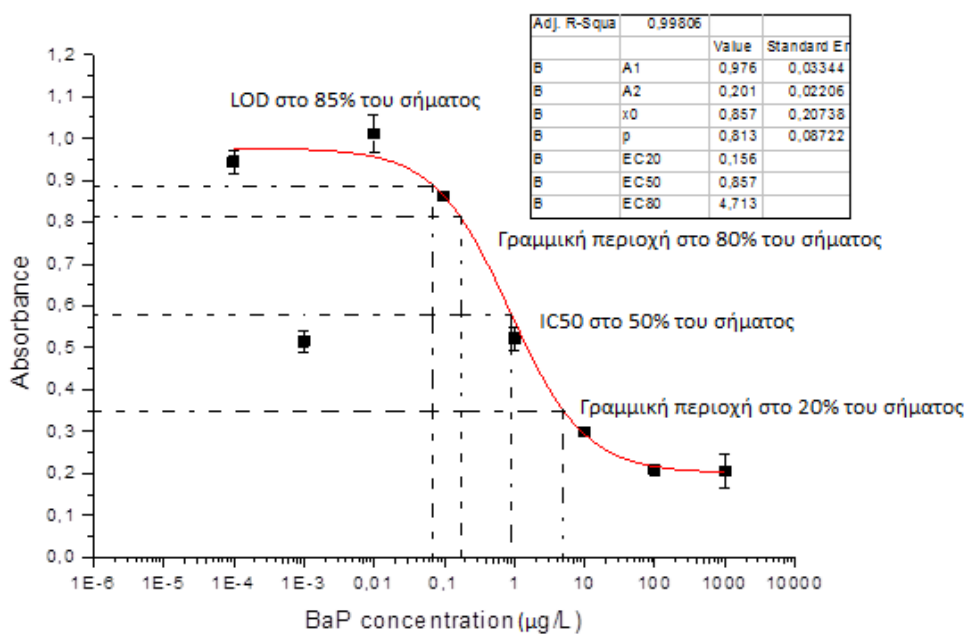
Σχήμα 27: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου Silica με εξάνιο για το αντίσωμα 5E11 (τυπική απόκλιση για τριπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 15: Παράμετροι ανάλυσης μεθόδου Silica με εξάνιο για το αντίσωμα 5E11

($\mu\text{g}/\text{kg}$)	5E11
Εύρος εργασίας	1,93 - 21,49
IC_{50}	$6,44 \pm 0,91$
LOD	0,55
Παράγοντας αραίωσης	6,25
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

Έκλυση με διχλωρομεθάνιο

mab 22F12

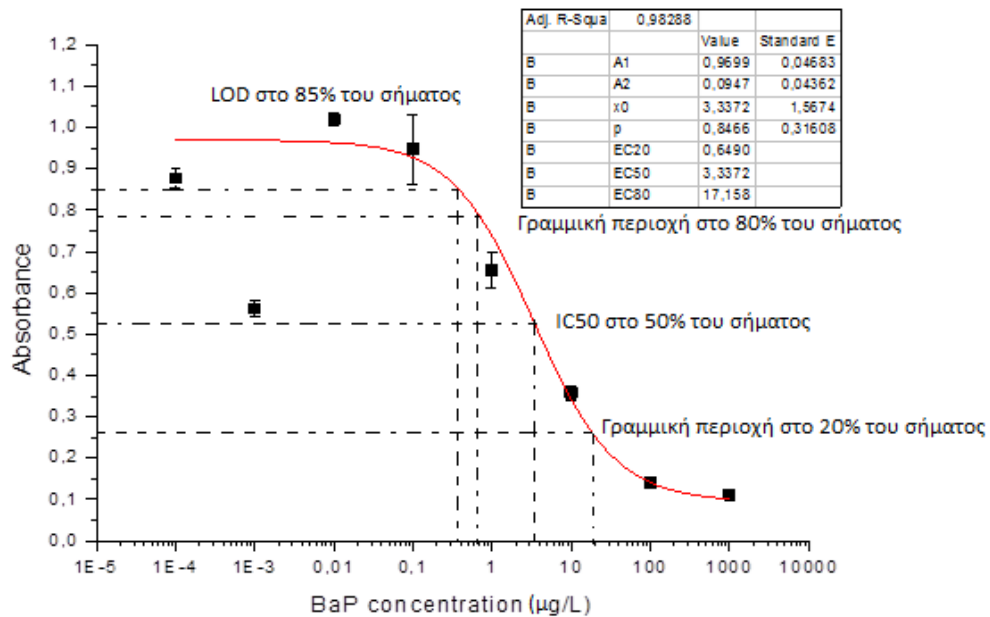


Σχήμα 28: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου Silica με διχλωρομεθάνιο για το αντίσωμα 22F12 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

Πίνακας 16: Παράμετροι ανάλυσης μεθόδου Silica με διχλωρομεθάνιο για το αντίσωμα 22F12

(µg/kg)	22F12
Εύρος εργασίας	9,01 – 249,22
IC ₅₀	45,01 ± 10,89
LOD	3,72
Παράγοντας αραίωσης	50
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

mab 5E11



Σχήμα 29: Καμπύλη βαθμονόμησης μεθόδου Silica με διχλωρομεθάνιο για το αντίσωμα 5E11 (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

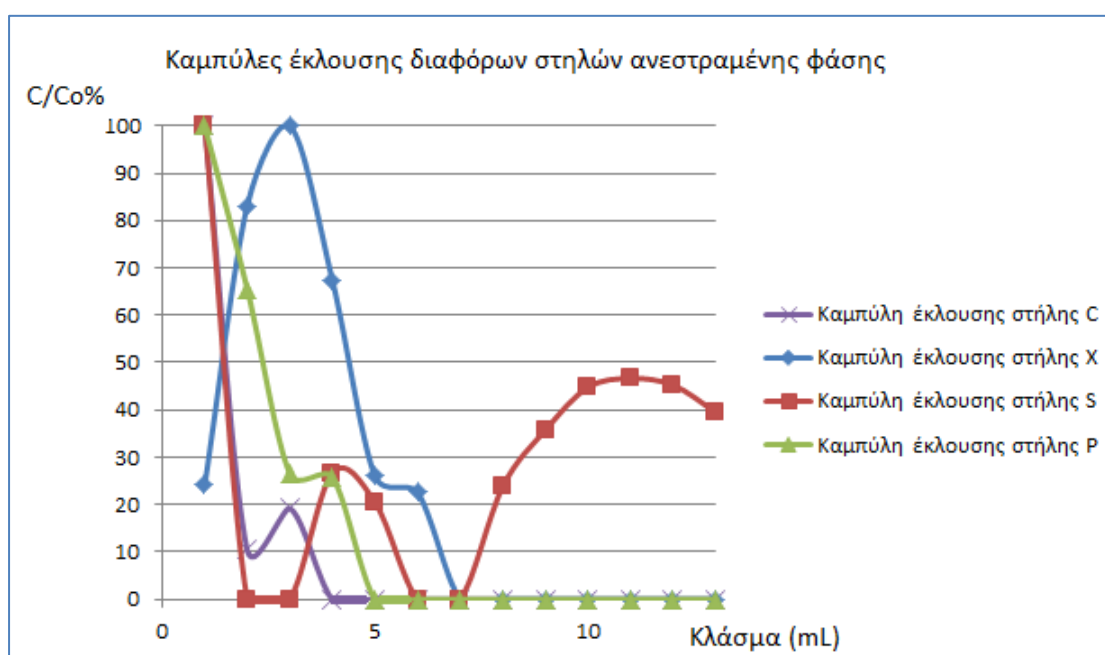
Πίνακας 17: Παράμετροι ανάλυσης μεθόδου Silica με διχλωρομεθάνιο για το αντίσωμα 5E11

(µg/kg)	5E11
Εύρος εργασίας	33,83 – 575,63
IC ₅₀	175,27 ± 82,32
LOD	19,63
Παράγοντας αραιώσης	50
Ανώτατο επιτρεπτό όριο σε ελαιόλαδο	2

Τα σημεία εκτός καμπύλης δεν λήφθηκαν υπόψη στη βαθμονόμηση, καθώς αποτελούν πειραματικά λάθη. Παρατηρείται ότι και οι δύο μέθοδοι παρουσιάζουν επαναληψιμότητα και μικρό παράγοντα αραιώσης. Από τις δύο, η πιο ικανοποιητική λόγω του εύρους εργασίας είναι η έκλουση με εξάνιο, καθώς περιέχει το όριο των 2 mg B[a]P ανά kg ελαίου. Δυστυχώς όμως το εξάνιο αποδείχτηκε προβληματικός διαλύτης και δημιούργησε προβλήματα κατά τον υπολογισμό των ποσοστών ανάκτησης, καθώς εμπόδιζε την ανίχνευση B[a]P από τα εκχυλισμένα δείγματα κατά την εφαρμογή της ELISA. Τα προβλήματα αυτά αναφέρονται στην ενότητα 4.3.

4.2. Δοκιμές HPLC διαφόρων στηλών ανεστραμμένης φάσης

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3.2.1. διάφορες στήλες ανεστραμμένης φάσης εξετάστηκαν με HPLC ως προς τη συμπεριφορά τους κατά την έκλυση B[a]P. Στο Σχήμα 30 παρουσιάζονται οι καμπύλες έκλυσης των στηλών που εξετάστηκαν. Οι στήλες αυτές περιλαμβάνουν τις C: C18, X: Strata-X, S: SDB-L, P: Ethyl-Phenyl.



Σχήμα 30: Καμπύλες έκλυσης διαφόρων στηλών στηλών ανεστραμμένης φάσης

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 30, οι στήλες C, X, και P παρουσιάζουν μια γρήγορη έκλυση του B[a]P από τα πρώτα κιάλας κλάσματα. Αυτό έχει ως συνέπεια την ταυτόχρονη εκχύλιση του B[a]P με άλλα μη επιθυμητά συστατικά μήτρας, τα οποία δυσχεραίνουν την εφαρμογή του ELISA. Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί η στήλη C18 (C) -παράγραφος 4.1.6.- δεν δίνει καλά και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Την καλύτερη συμπεριφορά παρουσίασε η στήλη SDB-L (S), η οποία και εφαρμόστηκε με την ELISA και είχε καλά αποτελέσματα, με μεγάλο όμως LOD για την περίπτωση μας (παράγραφος 4.1.7.), ενώ οι άλλες απορρίφθηκαν.

4.3. Έλεγχος της επίδρασης του διαλύτη έκλουσης στο ELISA κατά την εφαρμογή των στηλών Silica

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 4.1.8., το εξάνιο παρουσίασε προβλήματα κατά την εφαρμογή της ELISA, όχι κατά τη βαθμονόμηση, όπου έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα από όλες τις μεθόδους, αλλά κατά τον προσδιορισμό των ποσοστών ανάκτησης, όπου και ο διαλύτης εμπόδιζε την ανίχνευση B[a]P στα δείγματα ελαίου. Για να εξεταστεί κατά πόσον έφταιγε για αυτό ο διαλύτης ή η μέθοδος, εμβολιάστηκαν τρία δείγματα ελαίου με πρότυπα B[a]P σε τρεις ακραίες συγκεντρώσεις – μία πολύ μικρή, μία μεσαία και μία πολύ μεγάλη – και αφού εκχυλίστηκαν με τρεις διαφορετικούς άπολους διαλύτες (εξάνιο, διχλωρομεθάνιο και τολουόλιο) εφαρμόστηκαν στο ELISA με σκοπό την παρουσίαση εξάρτησης απορρόφησης–συγκέντρωσης. Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:100. Σημειώνεται ότι σε αυτό το τεστ δεν υπολογίστηκαν ποσοστά ανάκτησης, αφού δεν έγινε βαθμονόμηση. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι απορροφήσεις που λήφθηκαν ανάλογα με τη συγκέντρωση (H: εξάνιο, DCM: διχλωρομεθάνιο, T: τολουόλιο):

Πίνακας 18: Σύγκριση τριών διαφορετικών διαλυτών έκλουσης κατά την εκχύλιση με στήλες Silica για το αντίσωμα 22F12 (σχετική τυπική απόκλιση RSD για εξαπλό προσδιορισμό)

Διαλύτης	H			DCM			T		
Συγκέντρωση B[a]P (µg/kg)	10	75	250	10	75	250	10	75	250
Απορρόφηση	1,034	0,914	0,968	1,575	0,739	0,367	0,683	0,614	0,658
RSD%	10,924	26,996	23,531	32,943	37,520	31,631	11,806	22,795	16,923

H: Hexane, DMC: Dichloromethane, T: Toluol

Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του Πίνακα 18, το εξάνιο και το τολουόλιο παρουσιάζουν παρόμοιες και σχεδόν ίσες απορροφήσεις για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλύτη στο δείγμα. Επομένως δεν υπάρχει εξάρτηση συγκέντρωσης B[a]P και απορρόφησης. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι διαλύτες δεν είναι συμβατοί με την ELISA, αφού δεν είναι δυνατή η ανίχνευση B[a]P στα δείγματα με τη χρήση αυτών των διαλυτών. Αντίθετα, το διχλωρομεθάνιο παρουσιάζει συμβατότητα με τη μέθοδο, αφού η απορρόφηση δείχνει εξάρτηση από τη συγκέντρωση του αναλύτη. Παρόλα αυτά εμφανίζονται μεγάλες τιμές RSD που υποδεικνύουν ακόμα σε κάποιο μικρότερο βαθμό επίδραση διαλύτη.

4.4. Ποσοστά ανάκτησης

Ποσοστά ανάκτησης εκχύλισης με DMSO (1:1) και προεκχύλιση

Για τις μεθόδους που έδωσαν καλά και επαναλήψιμα αποτελέσματα υπολογίστηκαν τα ποσοστά ανάκτησης. Η πρώτη εξ'αυτών είναι η εκχύλιση με DMSO (1:1) με προεκχύλιση. Οι αναλυτικές παράμετροι προκύπτουν από τις βέλτιστες καμπύλες (Πίνακες 8-9). Ο εμβολιασμός των δειγμάτων έγινε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3.6., ενώ ο υπολογισμός της πειραματικής συγκέντρωσης υπολογίστηκε από τις εκάστοτε προκύπτουσες απορροφήσεις μέσω των Σχημάτων 20-21 και με λύση της σχέσης (4). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 19. Η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:500.

Πίνακας 19: Ποσοστά ανάκτησης εκχύλισης με DMSO (1:1) προεκχύλιση (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

αντίσωμα	Εμβολιασμένη συγκέντρωση B[a]P [μg/kg]	Πειραματική συγκέντρωση B[a]P [μg/kg]	Ποσοστά ανάκτησης [%]	IC ₅₀ /εύρος εργασίας [μg/kg]
22F12	56	56 ± 3	100	119/ 36 - 449
	111	100 ± 5	90	
	278	245 ± 14	74	
	556	469 ± 62	εκτός ε.ε. ¹	
5E11	56	96 ± 2	εκτός ε.ε.	181/ 64 - 519
	111	116 ± 7	104	
	278	246 ± 13	88	
	556	450 ± 50	81	

¹ ε.ε. = εύρος εργασίας

Από τους Πίνακες 6-7 προέκυψε ότι η βέλτιστη αραιώση και για τα δύο αντισώματα είναι η 1:500, λόγω επαναληψιμότητας και χαμηλότερου συγκριτικά παράγοντα αραιώσης για το σύνολο των αραιώσεων που δοκιμάστηκαν, η οποία και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ποσοστών ανάκτησης. Από αυτά όχι μόνο επιβεβαιώνεται ότι η μέθοδος εκχύλισης λειτουργεί, αλλά έχουμε και πολύ καλή ανάκτηση - μεταξύ 74 και 104 %. Δυστυχώς όμως η ανάγκη μεγάλης αραιώσης του εκχυλίσματος σε μεγάλα ποσά νερού/μεθανόλης έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή ευαισθησία δοκιμής, η οποία μετατοπίζει το εύρος εργασίας σε υψηλά επίπεδα μακριά από το ανώτατο επιτρεπτό όριο.

Ποσοστά ανάκτησης εκχύλισης με στήλες Silica

Σε πρώτη φάση επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των ποσοστών ανάκτησης με διαλύτη το εξάνιο. Η λήψη όμως ποσοστών ανάκτησης δεν ήταν εφικτή, αφού όπως συζητήθηκε στην παράγραφο 4.3., το εξάνιο δεν είναι συμβατό με την ELISA και εμποδίζει την ανίχνευση του αναλύτη στα δείγματα. Μετά τη σύγκριση τριών διαλυτών επιλέχθηκε το διχλωρομεθάνιο ως καλύτερο μέσο έκλουσης των στηλών και αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τα ποσοστά ανάκτησης. Οι αναλυτικές παράμετροι προκύπτουν από τις βέλτιστες καμπύλες (Πίνακες 24-25, Σχήματα 28-29), ενώ οι υπολογισμοί των πειραματικών συγκεντρώσεων έγιναν όπως εξηγήθηκε στην παραπάνω παράγραφο. Η αραιώση του εκχυλίσματος σε αυτή την περίπτωση ήταν 1:100. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20 : Ποσοστά ανάκτησης εκχύλισης με στήλες Silica (τυπική απόκλιση για εξαπλό προσδιορισμό)

αντίσωμα	Εμβολιασμένη συγκέντρωση B[a]P [μg/kg]	Πειραματική συγκέντρωση B[a]P [μg/kg]	Ποσοστά ανάκτησης [%]	IC ₅₀ /εύρος εργασίας [μg/kg]
22F12	10	6 ± 1	60	45/ 9 - 249
	25	20 ± 2	80	
	50	29 ± 3	59	
	75	64 ± 1	85	
	100	50 ± 7	50	
5E11	10	24 ± 1	εκτός ε.ε.	175/ 34 - 576
	25	31 ± 6	εκτός ε.ε.	
	50	82 ± 1	164	
	75	18 ± 4	24	
	100	12 ± 2	12	

Η μέθοδος λειτουργεί εν μέρη για το αντίσωμα 22F12, με ποσοστά ανάκτησης από 50 μέχρι 85 %, τα οποία βέβαια δε θεωρούνται και τόσο ικανοποιητικά. Όσον αφορά το αντίσωμα 5E11, σε αυτό παρατηρούνται υπό και υπέρ προσδιορισμοί, κάτι που προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το αντίσωμα δεν είναι συμβατό με τον συγκεκριμένο διαλύτη, ο οποίος, αν και πειραματικά καλύτερος, συνεχίζει να προκαλεί προβλήματα στις εφαρμογές ELISA λόγω του άπολου χαρακτήρα του.

Από τη σύγκριση των Πινάκων 19-20 προκύπτει λοιπόν ότι σε σχέση με τη μέθοδο Silica, η μέθοδος εκχύλισης με DMSO με προεκχύλιση δίνει πιο ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης και αποδεικνύεται έτσι η καταλληλότερη και πιο συμβατή από όλες τις μεθόδους που δοκιμάστηκαν για την εκχύλιση ελαιόλαδου και την εφαρμογή στην ELISA.

V ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

5.1. Συμπεράσματα και προοπτικές

Από το σύνολο των μεθόδων εκχύλισης ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία μπορούν να εξαχθούν διάφορα συμπεράσματα σχετικά με την ικανότητα και συμβατότητά τους με την ανοσολογική μέθοδο ELISA.

Για τις υγρές-υγρές εκχυλίσεις που βρίσκουν εφαρμογή στη χρωματογραφία γίνεται αντιληπτό ότι στο σύνολό τους δεν είναι συμβατές με το ELISA. Ο λόγος είναι ότι η μήτρα είναι πολύ σύνθετη, αφού το λάδι αποτελείται από ένα πλήθος άπολων συστατικών, όπως τριγλυκερίδια και λιπαρά οξέα, τα οποία εκχυλίζονται μαζί με τον αναλύτη, κάτι που μπορεί να γίνει αντιληπτό κατά την πειραματική διαδικασία από τη θολότητα του εκχυλίσματος. Αυτό δημιουργεί προβλήματα στις εφαρμογές ELISA, διότι τα συστατικά αυτά εμποδίζουν την αναγνώριση του αναλύτη από τα αντισώματα και για αυτό το λόγο δεν μπορούν να ληφθούν βαθμονομήσεις και επαναλήψιμα αποτελέσματα (εκχυλίσεις με DMF, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, καφεΐνη/φορμικό οξύ). Ένας άλλος λόγος είναι ότι απαιτούνται πολλά και περίπλοκα στάδια εκχύλισης με τη χρήση πολλών άπολων διαλυτών (πχ. εξάνιο), οι οποίοι εξορισμού δεν είναι συμβατοί με το ELISA.

Οι υγρές-υγρές εκχυλίσεις που χρησιμοποιούνται σε ανοσολογικές μεθόδους (εκχυλίσεις με DMSO) δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα με το ELISA, όπως επαναλήψιμες καμπύλες και πολύ ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης. Το πρόβλημα όμως εδώ παρουσιάζεται στον υψηλό παράγοντα αραίωσης, ο οποίος μειώνει την ευαισθησία δοκιμής, οπότε δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός σε μικρές συγκεντρώσεις της τάξης των ανώτατων επιτρεπτών ορίων.

Όσον αφορά τις εκχυλίσεις με τη βοήθεια των στήλων ανεστραμμένης φάσης, η άμεση έκλουση του αναλύτη που παρουσιάζουν παρεμποδίζει στάδια πρόπλυσης της στήλης για βελτιστοποίηση της εκχύλισης και οδηγεί σε συνέκλουση του αναλύτη με πολλά μη επιθυμητά συστατικά μήτρας, τα οποία, όπως και στις άλλες μεθόδους, δημιουργούν προβλήματα στην αναλυτική εφαρμογή και κατεπέκταση δε δίνουν ικανοποιητικά και επαναλήψιμα αποτελέσματα (στήλη C18). Κατά την πειραματική διαδικασία αυτό μπορεί να γίνει αντιληπτό από τα πρώτα κλάσματα έκλουσης, τα οποία τείνουν πάντα να αποκτούν ένα κιτρινωπό χρώμα.

Τέλος, οι στήλες κανονικής φάσης δίνουν πολύ καλές καμπύλες βαθμονόμησης με ταυτόχρονα μικρό παράγοντα αραίωσης. Τα προβλήματα δημιουργούνται από την ανάγκη χρήσης άπολου μέσου έκλουσης (π.χ. εξάνιο, διχλωρομεθάνιο), το οποίο εμποδίζει τη διεξαγωγή του ELISA και για αυτό απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο υγρής-υγρής επανεκχύλισης (DMSO)

πριν την εφαρμογή, κάτι που κάνει τη μέθοδο εξαιρετικά χρονοβόρα. Εκτός αυτού, όπως αποδείχτηκε από τα ποσοστά ανάκτησης, οι συνέπειες της χρήσης άπολων διαλυτών συνεχίζουν να παρουσιάζονται με αποτέλεσμα μικρά ή μηδαμικά ποσοστά ανάκτησης, καθώς και υπό ή υπέρ προδιορισμούς.

Από το σύνολο λοιπόν των μεθόδων που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία, καταλληλότερη κρίνεται η μέθοδος εκχύλισης με DMSO με προεκχύλιση, αφού είναι η πιο συμβατή με την ανοσοδοκιμή ELISA δίνοντας επαναλήψιμες καμπύλες και πολύ καλά ποσοστά ανάκτησης, ενώ ταυτόχρονα αποτελείται από γρήγορες και απλές διαδικασίες εκχύλισης.

Γενικά πρέπει να σημειωθεί ότι το λάδι αποτελεί μια πολύ δύσκολη μήτρα λόγω της προαναφερθείσας πολυπλοκότητάς του, κάτι που κάνει τις αναλυτικές εφαρμογές – και πόσο μάλλον τις ανοσοαναλυτικές, οι οποίες έχουν μεγάλη ευαισθησία – αρκετά δύσκολες, με πολλά προβλήματα, τα οποία δεν είναι πάντα εύκολο να αντιμετωπιστούν ή να ξεπεραστούν.

Σε αυτήν την κατεύθυνση χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω βελτιστοποιήσεις των μεθόδων εκχύλισης. Μία μέθοδος που βρίσκεται σε εξέλιξη είναι η χρήση των μοριακών αποτυπωμάτων πολυμερών (MIP). Τα MIP είναι πολυμερή τα οποία έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύονται επιλεκτικά γύρω από το B[a]P και να παίρνουν το εξωτερικό σχήμα της μοριακή του δομής, οπότε κατά τη μέθοδο αυτή δίνεται η δυνατότητα απόρριψης των μη επιθυμητών συστατικών της μήτρας [1].

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bakas I., Oujji N. B., Moczko E., Istamboulie G., Piletsky S., Piletska E., Ait-Ichou I., Noguer T., Rouillon R., "Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil", *Anal. Chim. Acta* 734 (2012), 99-105.
2. Lai J. P., Niessner R., Knopp D., "Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water and coffee samples", *Anal. Chim. Acta* 522 (2004), 137-144.
3. Danyi S., Brose F., Brasseur C., Schneider Y. J., Larondelle Y., Pussemier L., Robbins J., Saeger S., Maghuin-Rogister G., Scippo M.-L., "Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector", *Anal. Chim. Acta* 633 (2009), 293-299.
4. Bogusz M. J., Hajj E. S. A., Ehaideb Z., Hassan H., Tufail A. M., "Rapid determination of benzo[a]pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection", *JOC A* 1026 (2004), 1-7.
5. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *OJ L* 364, 20.12.2006, p. 5-24.
6. Vo-Dinh T., Fetzner J., Campiglia A. D., "Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment", *Talanta* 47, 1999, 943-969.
7. Gundel L. A., Mahanama K. R. R., Daisey J. M., "Semivolatile and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental tobacco smoke: cleanup, speciation, and emission factors", *Environ. Sci. Technol.* 29, 1995, 1607-1614.
8. Nießner R. (Hrsg.), "Holl: Wasser - Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung", 9. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin/New York, 2010.
9. Letzel T., Rosenberg E., Wissiack R., Grasserbauer M., Niessner R., "Separation and identification of polar degradation products of benzo[a]pyrene with ozone by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry after optimized column chromatographic clean-up", *J. Chromatogr. A* 855, 1999, 501-514.
10. Schauer C., Niessner R., Poschl U., "Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detection: air particulate matter, soot, and reaction product studies", *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 2004, 725-736.

11. Rybicki B. A., Nock N. L., Savera A. T., Tang D., Rundle A., "Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in prostate formation", *Cancer Lett.* 239, 2006, 157-167.
12. Hecht S. S., Carmella S. G., Villalta P. W., Hochalter J. B., "Analysis of phenanthrene and benzo[a]pyrene tetraol enantiomers in human urine: relevance to the bay region diol epoxide hypothesis of benzo[a]pyrene carcinogenesis and to biomarker studies", *Chem. Res. Toxicol.* 23, 2010, 900-908.
13. Kumar A., Xagorarakis I., "Pharmaceuticals, personal care products and endocrine-disrupting chemicals in U.S. surface and finished drinking waters: a proposed ranking system", *Sci. Tot. Environ.* 408, 2010, 5972-5989.
14. Ovrebo S., Haugen A., Hemminki K., Szyfter K., Drablos P. A., Skogland M., "Studies of biomarkers in aluminum workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Detect*". *Prev.* 19, 1995, 258-267.
15. Pavanello S., Siwinska E., Mielzynska D., Clonfero E., "GSTM1 null genotype as a risk factor for anti-BPDE-DNA adduct formation in mononuclear white blood cells of coke-oven workers", *Mutat. Res.* 558, 2004, 53-62.
16. Ravindra K., Sokhi R., van Grieken R., "Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation", *Atmos. Environ.* 42, 2008, 2895-2921.
17. Shimada T., Yamazaki H., Foroozesh M., Hopkins N. E., Alworth W. L., Guengerich F. P., "Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1", *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1998, 1048-1056.
18. Burczynski M. E., Penning T. M., "Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon orthoquinones generated by aldo-keto reductase induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor", *Cancer Res.* 60, 2000, 908-915.
19. Sims P., Grover P. L., Swaisland A., Pal. K., Hewer A., "Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide", *Nature* 252, 1974, 326-328.
20. Yang S. K., McCourt D. W., Roller P. P., Gelboin H. V., "Enzymatic conversion of benzo(a)pyrene leading predominantly to the diol-epoxide *r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-1,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene* through a single enantiomer of *r-7,t-8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene*", *Proc. Natl Acad. Sci.* 73, 1976, 2594-2598.
21. Wood A. W., Chang R. L., Levin W., Thakker D. R., Yagi H., Sayer J. M., Jerina D. M., Conney A. H., "Mutagenicity of the enantiomers of the diastereomeric bay-region benzo(c)phenanthrene 3,4-diol-1,2-epoxides in bacterial and mammalian cells", *Cancer Res.* 44, 1984, 2320-2324.
22. Levin W., Chang R. L., Wood A. W., Thakker D. R., Yagi H., Jerina D. M., Conney A. H., "Tumorigenicity of optical isomers of the diastereomeric bay-region 3,4-diol-1,2-epoxides of

- benzo(c)phenanthrene in murine tumor models”, *Cancer Res.* 46, 1986, 2257-2261.
23. Sundberg K., Widersten M., Seidel A., Mannervik B., Jernstrom B., “Glutathion conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1”, *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1997, 1221-1227.
 24. Weinstein I. B., Jeffrey A. M., Jennette K. W., Blobstein S. H., Harvey R. G., Harris C., Autrup H., Kasai H., Nakanishi K., “Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo”, *Science* 193, 1976, 592-595.
 25. Melendez-Colon V. J., Luch A., Seidel A., Baird W. M., “Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites”, *Carcinogenesis* 20, 1999, 1885-1891.
 26. Alexandrov K., Rojas M., Satarug S., “The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation”, *Toxicol. Lett.* 198, 2010, 63-68.
 27. Denissenko M. F., Pao A., Tang M., Pfeifer G. P., “Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53”, *Science* 274, 1996, 430-432.
 28. Yakovleva L., Handy C. J., Yagi H., Sayer J. M., Jerina D. M., Shuman S., “Intercalating polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts poison DNA religation by vaccinia topoisomerase and act as roadblocks to digestion by exonuclease III”, *Biochemistry* 46, 2006, 7644-7653.
 29. Malawska M., Bojakowska I., Wilkomirski B., “Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in peat and plants from selected peat-bogs in the north-east of Poland”, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 2002, 686-691.
 30. Aamot E., Steinnes E., Schmid R., “Polycyclic aromatic hydrocarbons in Norwegian forest soils: impact of long range atmospheric transport”, *Environ. Pollut.* 92, 1996, 275-280.
 31. Wilcke W., Lilienfein J., Lima S. D., Zech W., “Contamination of highly weathered urban soils in Uberlandia”, Brazil, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162, 1999, 539-548.
 32. Dreyer A., Radke M., Turunen J., Blodau C., “Long-term change of polycyclic hydrocarbon deposition to peatlands of eastern Canada”, *Environ. Sci. Technol.* 39, 2005, 3918-3924.
 33. Gfrerer M., Serschen M., Lankmayr E., “Optimized extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil samples”, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 53, 2002, 203-216.
 34. Simon R., Gomez-Ruiz J. A., Wenzl T., “Results of an European inter-laboratory comparison study on the determination of the 15 + 1 EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in liquid smoke condensates”, *Food Chem.* 123, 2010, 819-826.
 35. Brum D. M., Casella R. J., Netto A. D. P., “Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection”, *Talanta* 74, 2008, 1392-1399.
 36. Prieto-Blanco M. C., Iglesias M. P., Lopez-Mahia P., Lorenzo S. M., Rodriguez D. P., “Simultaneous determination of carbonyl compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter

- by liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection”, *Talanta* 80, 2010, 2083-2093.
37. Wang H., Campiglia D., “Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples by solid-phase nanoextraction and high-performance liquid chromatography”, *Anal. Chem.* 80, 2008, 8202-8209.
 38. Traviesa-Alvarez J. M., Sanchez-Barragan I., Costa-Fernandez J. M., Pereiro R., Sanz-Medel A., “Room temperature phosphorescence optosensing of benzo[a]pyrene in water using halogenated molecularly imprinted polymers”, *Analyst* 132, 2007, 218-223.
 39. Fetzer J. C., Kershaw J. R., “Identification of large polycyclic aromatic hydrocarbons in coal tar pitch”, *Fuel* 74, 1995, 1533-1536.
 40. Simon R., Palme S., Anklam E., “Validation (in-house and collaborative) of a method based on liquid chromatography for the quantitation of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke flavourings: HPLC-method validation for 15 EU priority PAH in smoke condensates”, *Food Chem.* 104, 2007, 876-887.
 41. Simon R., Palme S., Anklam E., “Determination of the 15 European priority PAHs in primary smoke condensates by GC-MS: collaborative validation”, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 98a, 2006, 772-781.
 42. Simon R., Palme S., Anklam E., “Single-laboratory validation of a gaschromatography-massspectrometry method for quantification of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in spiked smoke condensates”, *J. Chromatogr. A* 1103b, 2006, 307-313.
 43. Bagheri H., Mohammadi A., “Pyrrole-based conductive polymer as the solid-phase extraction medium for the preconcentration of environmental pollutants in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection”, *J. Chromatogr. A* 1015, 2003, 23-30.
 44. Poster D. L., Sander L. C., Wise S. A., In: “The handbook of environmental chemistry, PAHs and related compounds”, O. Hutzinger (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1998.
 45. Roda A., Bacigalupo M. A., Ius A., Minutello A., “Development and applications of an ultrasensitive quantitative enzyme immuno-assay for benzo(a)pyrene in environmental samples”, *Environ. Technol.* 12, 1991, 1027-1035.
 46. Roda A., Pistillo A., Jus A., Armanino C., Baraldini M., “Analysis of air particulate benzo[a]pyrene by a specific enzyme immunoassay: correlation with chemical and atmospheric parameters”, *Anal. Chim. Acta* 298, 1994, 53-64.
 47. Li K., Chen R., Zhao B., Liu M., Karu A. E., Roberts V. A., Li Q. X., “Monoclonal antibodybased ELISAs for part-per-billion determination of polycyclic aromatic hydrocarbons: effects of haptens and formats on sensitivity and specificity”, *Anal. Chem.* 71, 1999, 302-309.
 48. Quelven E., Tjollyn S., Rocher L., Mille G., Fourneron J.-D., “Development of an antibody against polycyclic aromatic hydrocarbons, *Polycycl. Aromat. Comp.* 13, 1999, 93-103.
 49. Knopp D., Seifert M., Vaeaeanaenen V., Niessner R., “Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated water and soil by

- immunological and chromatographic methods”, *Environ. Sci. Technol.* 34, 2000, 2035-2041.
50. Scharnweber T., Suchanek M., Fisher M., Knopp D., Niessner R., “Monoclonal antibody to polycyclic aromatic hydrocarbons based on a new benzo[a]pyrene immunogen”, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371, 2001, 578-585.
 51. Fähnrich K. A., Pravda M., Guilbault G. G., “Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)”, *Anal. Lett.* 35, 2002, 1269-1300.
 52. Matschulat D., Deng A., Niessner R., Knopp D., “Development of a highly sensitive monoclonal antibody based ELISA for detection of benzo[a]pyrene in potable water”, *Analyst* 130, 2005, 1078-1086.
 53. Moore E. J., Kreuzer M. P., Pravda M., Guilbault G. G., “Development of a rapid single-drop analysis biosensor for screening of phenanthrene in water samples”, *Electroanalysis* 16, 2004, 1653-1659.
 54. Liu M., Li Q. X., Rechnitz G. A., “Flow injection immunosensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with a quartz crystal microbalance”, *Anal. Chim. Acta* 387, 1999, 29-38.
 55. Gobi K. V., Miura N., “Highly sensitive and interference-free simultaneous detection of two polycyclic aromatic hydrocarbons at parts-per-trillion levels using a surface plasmon resonance immunosensors”, *Sensor. Actuat. B* 103, 2004, 265-271.
 56. Dostalek J., Pribyl J., Homola J., Skladal P., “Multichannel SPR biosensor for detection of endocrine-disrupting compounds”, *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 2007, 1841-1847.
 57. Boujday S., Gu C., Girardot M., Salmain M., Pradier C.-M., “Surface IR applied to rapid and direct immunosensing of environmental pollutants”, *Talanta* 78, 2009, 165-170.
 58. Wang C., Lin M., Liu Y., Lei H., A dendritic nanosilica-functionalized electrochemical immunosensor with sensitive enhancement for the rapid screening of benzo[a]pyrene, *Electrochim. Acta* 56, 2011, 1988-1994.
 59. Vo-Dinh T., Tromberg B. J., Griffin G. D., Ambrose K. R., Sepaniak M. J., Gardenhire E. M., “Antibody-based fiberoptics biosensor for the carcinogen benzo(a)pyrene”, *Appl. Spectrosc.* 41, 1987, 735-738.
 60. Alarie J. P., Bowyer J. R., Sepaniak J. M., Hoyt A. M., Vo-Dinh T., “Fluorescence monitoring of a benzo[a]pyrene metabolite using a regenerable immunochemical-based fiber-optic sensor”, *Anal. Chim. Acta* 236, 1990, 237-244.
 61. Beloglazova N. V., Goryacheva I. Y., de Saeger S., Louise-Scippo M., Niessner R., Knopp D., “New approach to quantitative analysis of benzo[a]pyrene in food supplements by an immunochemical column test”, *Talanta* Volume 85, Issue 1, 2011, 151-156.
 62. Barna-Vetro I., Solti L., Teren J., Gyongyosi A., Szabo E., Wolfing A., “Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A”, *J. Agric. Food Chem.* 44, 1996, 4071-4074.
 63. Cruz-Aguado J. A., Penner G., “Fluorescence polarisation based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers”, *Anal. Chem.* 80, 2008, 8853-8855.

64. Shim W.-B., Kolosova A. Y., Kim Y.-J., Yang Z.-Y., Park S.-J., Eremin S. A., Lee I.-S., Chung D. H., "Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A", *Int. J. Food Sci. Technol.* 39, 2004, 829-837.
65. Van der Gaag B., Spath S., Dietrich H., Stigter E., Boonzaaijer G., van Osenbruggen T., Koopal K., "Biosensors and multiple mycotoxin detection", *Food Control* 14, 2003, 251-254.
66. Alarcon S. H., Palleschi G., Compagnone G., Pascale M., Visconti A., Barna-Vetro I., "Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat", *Talanta* 69, 2006, 1031-1037.
67. Yalow R. S., Berson S. A., "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man", *J. Clin. Invest.* 39 (1960) 1157-1175.
68. Rosen H., Sunnerhagen K. S., Herlitz J., Blomstrand C., Rosengren L., "Serum levels of the brain-derived proteins S-100 and NSE predict long-term outcome after cardiac arrest", *Resuscitation* 49 (2001) 183-191.
69. Heineman W. R., Halsall H. B., Wehmeyer K. R., Doyle M. J., Wright D. S., "Immunoassay with electrochemical detection", *Anal. Proc.* 24 (1987) 324-325.
70. Diamandis E. P., Christopoulos T. K., "Immunoassay, Academic Press", Inc. San Diego 1996.
71. Duebel S., Rohrbach P., Schmiedl A.: "Recombinant antibodies", *Biol. Unserer Zeit* 34 (2004) 372-379.
72. Singer S. J., Doolittle R. F.: "Antibody active sites and immunoglobulin molecules", *Science* 153 (1966) 13-25.
73. "The Use of Antibodies in Immunoassay", KPL Technical Note (2005)
74. Ely K. R., Colman P. M., Abola E. E., Hess A. C., Peabody D. S., Parr D. M., Connel G. E., Laschinger C. A., Edmundson A. B., "Mobile Fc region in the Zie IgG2 Cryoglobulin: Comparison of crystals of the F(ab')₂ fragment and the intact immunoglobulin", *Biochemistry* 17 (1978) 820-825.
75. Marquart M., Deisenhofer J., Huber R., Palm W., "Crystallographic refinement and atomic models of the intact immunoglobulin molecule Kol and its antigen- binding fragment at 3.0 Å and 1.9 Å resolution", *J. Mol. Biol.* 141 (1980) 369-391.
76. Silverton E. W., Navia M. A., Davies D. R., "Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 (1977) 5140-5144.
77. Vollmar A., Dingermann T., "Immunologie", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, mbH, Stuttgart 2005.
78. W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, D. Myrtek: "Der Experimentator – Immunologie", Elsevier GmbH, München (2006).
79. Mikkelsen S. R., Corton E.: "Bioanalytical Chemistry", John Wiley & Sons Inc. (2004).
80. Lipman N. S., Jackson L. R., Trudel L. J., Weis-Garcia F., "Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources", *ILAR J.* 46 (2005) 258-268.
81. Peters J. H., Baumgarten H., "Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung", Springer Verlag, Berlin, 1990.

82. Lottspeich F., Engels J. W. (Hrsg.), "Bioanalytik", 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag München 2006.
83. Hermanson G. T.: "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego (1996).
84. Avrameas S., Guilbert B.: "A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies", *Eur. J. Immunol.* 1 (1971) 394-396.
85. Engvall E., Perlmann P.: "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G", *Immunochemistry* 8 (1971) 871-874.
86. Kolosova A. Y., Shim W.-B.: "Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples". *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 2006, 286-294.
87. Moises S. S., Schäferling M.: "Toxin immunosensors and sensor array for food quality control". *Bioanal. Rev.* 1, 2009, 73-104.
88. Camman K. (Hrsg.): "Instrumentelle Analytische Chemie". Verlag Heidelberg 2001, Heidelberg.
89. Knopp D., Niessner R.: "Biomonitoring based on immunological principles". In Twardowska T., Allen H. E., Kettrup A. A. F., Lacy W. J. (Ed.): "Solid waste: Assessment, monitoring and remediation", Elsevier Science B.V. 2004, Amsterdam.
90. Cervino C., Weber W., Knopp D., Niessner R.: "Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies". *J. Immunol. Methods* 329, 2008, 184-193.
91. Berkson J.: "Application of the logistic function to bio-assay". *J. Am. Stat. Assoc.* 39, 1944, 357-365.
92. Gottschalk P. G., Dunn J. R., "Determining the error of dose estimates and minimum and maximum acceptable concentrations from assays with nonlinear dose-response curves", *Comput. Meth. Prog. Bio.* 80, 2005, 204-215.
93. Findlay J. W. A., Dillard A. F., "Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays", *The APPS Journal* 9, 2007, 260-267.
94. Moret S., Conte L. S., *J. Chromatogr. A* 882 (2002) 245.
95. Moret S., Conte L. S., *J. Sep. Sci* 25 (2002) 96.
96. International Organization for Standardization, Method ISO 15302-1. Ed., 1998.
97. Barker S.A., Long A.R., Short C.R., *J. Chromatogr.* 475 (1989) 353.
98. Crouch M.D., Barker S.A., *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 127.
99. Loveland P.M., Reddy A.P., Pereira C.B., Field J.A., Bailey G.S., *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 33.
100. Van Stijn F., Kerkhoff M.A., Vandegiste B.G., *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 263.
101. Maio G., Arnold F., Franz H., "Analysis of PAHs in Edible Oils by DACC-HPLC Coupling with Fluorescence Detection", Dionex Softron GmbH, Germering, Germany
102. Kolarovic L., Traitler H., "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vegetable Oils by Caffeine Complexation and Glass Capillary Gas Chromatography", *J. Chromatogr.* 237 (1982) 236-272.

103. Maciej J. Bogusz, Samir Abu El Hajj, Zeyad Ehaideb, Huda Hassan, Mohammad Al-Tufail, "Rapid determination of Benzo[a]pyrene in olive oil with solid phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 1-7.
104. Kim I. S., Setford S. J., Saini S., "Determination of polychlorinated biphenyl compounds in electrical insulating oils by enzyme immunoassay", *Anal. Chim. Acta* 422 (2000) 167-177.
105. Mottier P., Parisod V., Turesky R. J., "Quantitative Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Barbequed Meat Sausages by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry", *J. Agric. Food Chem.* 48, 2000, 1160-1166.
106. Maiti A., Das S., Bhattacharyya N., "Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Bacillus thuringiensis* Strain NA2", *Journal of Science (JOS)* 72, Vol. 1, No. 4, 2012.
107. Kim I. S., Setford S. J., Saini S., "Immunochemical Measurement of Polychlorinated Biphenyl Compounds in Transformer Oils", *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, Vol. 8 No5, 2001, 799-804.
108. Ochsenkuehn-Petropoulou M., Staikos K., Matuschek G., Kettrup A. "On-line determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter by using pyrolysis/GC-MS", *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 70, 2003, 73-85.
109. Ochsenkuehn-Petropoulou M., Lampropoulou A., Becker H., Spyra W., "Polycyclic Aromatic hydrocarbons in wooden railway beams impregnated with coal tar: extraction and quantification by GC-MS", *Mikrochim. Acta* 136, 2001, 185-191.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ab	Antibody
ACN	Acetonitrile
Ag	Antigen
Ak	Antikoeper - Antibody
AKR1C	Aldo-Keto Reductases
B[a]P	Benzo[a]pyrene
BSA	Bovine Serum Albumin
C _H	Constant Region Heavy
C _L	Constant Region Light
CDRs	Complementarity Determining Regions
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, member A1
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, member B1
DACC	Donor Acceptor Complex Chromatography
DCM	Dichloromethane
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EIA	Enzymimmunoassay
EPA	Environmental Protection Agency US
Fab	Antigen Binding Fragment
Fc	Crystalizable Fragment
FID	Flame Ionization Detector
FPIA	Fluorescence Polarization Immunoassay
GC	Gas Chromatography
GST	Glutathione S-Transferase
H	Hexane
HAT	Hypoxanthine-Aminopterin-Thymine
HCL	Hydrogen Chloride
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
Ig	Immunoglobulin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD ₅₀	Lethal Dose, 50%
LLE	Liquid-Liquid extraction
LOD	Limit of Detection
mAB	monoclonal Antibody
mEH	microsomal Epoxide Hydrolase
MIPs	Molecular Imprinted Polymers
MRL	Maximum Residue Limit
MS	Mass Spectrometry
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
MTP	Microtiter Plates
NPCE	Normal-Phase Column Extraction
ODS	Octadecylsilane

p.a.	pro analysi
pAB	polyclonal Antibody
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCBs	Polychlorinated Biphenyls
PM-RAIRS	Polarization Modulation Reflection Absorption Infrared Spectroscopy
POD	Peroxidase
RPCE	Reversed-Phase Column Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
SPNE	Solid Phase Nano Extraction
SPR	Surface Plasmon Resonance
T	Toluol
TMB	Tetramethylbenzidine
UV	Ultraviolet
V _H	Variable Region Heavy
V _L	Variable Region Light
WFR	Wiederfindungsrate – Recovery Rates