



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό
αλλεργιογόνων ξηρών καρπών σε τρόφιμα με LC-MS/MS.**

**ΡΟΔΗ ΚΑΛΛΙΡΡΟΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΗΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων ξηρών καρπών σε τρόφιμα με LC-MS/MS.

ΡΟΔΗ ΚΑΛΛΙΡΡΟΗ

A.M.: 11709

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Γκίκας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 8/10/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τροφική αλλεργία είναι μία ανεπιθύμητη αντίδραση στις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες των τροφίμων. Μεγάλη μερίδα του πληθυσμού πάσχει από τέτοια συμπτώματα ωστόσο, θεραπεία της αλλεργίας δεν υπάρχει συνεπώς, η προνοητική απόκλιση και η αποφυγή τροφών, που περιέχουν ή ενδέχεται να τα περιέχουν αλλεργιογόνα, είναι επιτακτική. Στην παρούσα έρευνα μελετάται η αλλεργία και τα αλλεργιογόνα των ξηρών καρπών και πιο συγκεκριμένα του αράπικου φιστικιού λόγω της ευρείας χρήσης στην τροφική βιομηχανία και της βιβλιογραφίας και μετέπειτα του αμυγδάλου, του καρυδιού, του κάσιους, του πεκάν, του φουντουκιού και του φιστικιού Αιγίνης. Για τα πειράματα επιλέχθηκαν δείγματα τροφίμων με υπόστρωμα σοκολάτας και συγκεκριμένα σοκολάτες που δεν περιείχαν ξηρούς καρπούς αλλά, και τρόφιμα που είναι γνωστό ότι περιέχουν ξηρούς καρπούς. Επίσης, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος ανάλυσης των αλλεργιογόνων πεπτιδίων του αράπικου φιστικιού με υγροχρωματογράφο με φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) και θετικό ιοντισμό (+) ESI. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης όσον αφορά στην προκατεργασία των δειγμάτων και των παραμέτρων του MS/MS, πειράματα επαλήθευσης της μεθόδου σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε σοκολάτες με ξηρούς καρπούς καθώς, και πειράματα επικύρωσης. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε αποτελείται από τα στάδια της απομάκρυνσης του λίπους, της εκχύλισης των πρωτεϊνών, της ενζυματικής πέψης, του καθαρισμού με SPE, της εξάτμισης σε ρεύμα αζώτου, της ανασύστασης και της τελικής εισαγωγής του δείγματος στο LC-MS/MS. Στη συνέχεια, η μέθοδος επικυρώθηκε και έδειξε ικανοποιητική γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, ενδιάμεση πιστότητα και πολύ καλά όρια ανίχνευσης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αναλυτική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αλλεργιογόνα τροφίμων, ενζυματική πέψη, αράπικο φιστίκι, ξηροί καρποί, LC-MS/MS

ABSTRACT

Allergy is an intense response of the immune system due to a type of antigen, the allergen. Allergens may be found in different foods and refer to proteins or peptides responsible for the allergenic activity. Most of these allergens are generally resistant to food processing. For example, peanut allergens are the most common cause of fatal anaphylaxis caused by food because, heat treatment of the food can increase their allergenicity and the reactions can be activated by some micrograms of the proteins. This research aims at the determination of allergenic proteins from nuts present in foods, such as chocolates, with ultra-High Performance Liquid Chromatography - tandem mass spectrometry (uHPLC-MS/MS). Until now, ELISA was been applied to allergen determination. LC-MS/MS technique is regarded as a new approach to detect multiple allergens. In this study an uHPLC-MS/MS method was developed and applied for the simultaneous identification and determination of the traces of tree nut allergens (peanut, pecan, pistachio, hazelnuts). Method's protocol includes extraction of protein, trypsin digestion, purification with SPE and LC-MS/MS injection. Method's parameters, such as time of digestion, were optimized. Moreover, LC-MS/MS detection was achieved based on subsequent peptides generated by enzymatic digestion. Specifically, for every peptide (two for every allergenic protein), the molecular mass and their two products were determined. Despite, time-consuming sample preparation, the developed method has many advantages. The method is characterized by high sensitivity, low limits of detection and it can provide simultaneous analysis of multiple tree nut allergens in a single preparation and a single injection step.

SUBJECT AREA: Analytical Chemistry

KEYWORDS: food allergens, trypsin digestion, peanut, tree nut, LC-MS/MS

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Θωμαΐδη Νικόλαο, Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέποντα της ερευνητικής εργασίας για την επιστημονική καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον Δρ. Μάριο Κωστάκη για τις γνώσεις, την εκπαίδευση, την καθοδήγηση και όλες τις συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Νάνσυ Χριστοπούλου, Ευαγγελία Κρητικού και Κατερίνα Γαλάνη, για την ανιδιοτελή βοήθειά τους, το ευχάριστο εργαστηριακό κλίμα αλλά και, την συμπαράστασή τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την τριμελή επιτροπή για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας, για το χρόνο που διέθεσαν για την διόρθωσή της και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους όπως επίσης και για όλες τις συμβουλές και καθοδηγήσεις τους καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη, την υπομονή και τη συμπαράστασή τους καθώς, και, τους φίλους και συμφοιτητές μου για την ψυχολογική υποστήριξη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	15
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	16
1.1 Εισαγωγικά	16
1.2 Τύποι αλλεργιογόνων	16
1.3 Διαδικασία δράσης	17
1.4 Συμπτώματα - εμφάνιση δράσης- τρόποι αντιμετώπισης	18
1.4.1 Κατηγορίες συμπτωμάτων	19
1.4.2 Αναφυλαξία	20
1.4.3 Επιδημιολογία	20
1.4.4 Διάγνωση	21
1.4.5 Τρόποι αντιμετώπισης	22
1.5 Πρόβλημα	23
1.6 Νομοθεσία - κανονισμός	24
1.6.1 Τρόφιμα που περιλαμβάνονται στο παράρτημα της οδηγίας 2003/89/ΕΚ και συνοπτική αξιολόγησή τους	25
1.7 Ξηροί καρποί και αλλεργία	30
1.8 Πρωτεΐνες και αλλεργία ξηρών καρπών	32
1.8.1 Κατηγορίες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών	32
1.8.2 Γνωστοί ξηροί καρποί υπεύθυνοι για αλλεργίες	36
1.9 Σκοπός εργασίας	41
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	42
2.1 Μέθοδοι για την ανίχνευση αλλεργιογόνων και αλλεργιογόνων συστατικών στα τρόφιμα	42
2.1.1 Ανίχνευση αλλεργιογόνων χωρίς να προηγηθεί διαχωρισμός πρωτεϊνών .	43
2.1.2 Ανοσολογικές Μέθοδοι.....	44

2.1.3	Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο (ELISA).....	44
2.1.4	Βιοαισθητήρες πρωτεϊνών	46
2.1.5	Αποτελέσματα από Ανοσολογικές Μεθόδους	46
2.1.6	Ανίχνευση αλλεργιογόνων με διαχωρισμό πρωτεϊνών	47
2.1.7	Ανίχνευση αλλεργιογόνων με ανάλυση DNA.....	48
2.1.8	Ανίχνευση αλλεργιογόνων με PCR	48
	• Ανίχνευση αλλεργιογόνων σε επεξεργασμένα τρόφιμα	49
2.1.9	Ανίχνευση αλλεργιογόνων με Φασματομετρία Μάζων	50
2.2	Προτεινόμενη μέθοδος.....	52
2.3	Πρόταση μεθόδου.....	53
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Προκατεργασία Δείγματος - Αναλυτικές Τεχνικές -Πειραματικό Μέρος.....	54
3.1	Προκατεργασία δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) 54	
3.2	Τεχνικές ανάλυσης και προσδιορισμού ενώσεων (χρωματογραφία)	59
3.2.1	Υγροχρωματογραφία (HPLC)	59
3.2.2	Οργανολογία της HPLC	61
3.3	Φασματομετρία μαζών - τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου	63
3.4	Πηγές ιόντων	65
3.4.1	Ηλεκτροψεκασμός (ESI).....	66
3.5	Αναλυτές Μαζών.....	68
3.5.1	Τετραπολικός αναλυτής μαζών	68
3.5.2	Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (Tandem MS) με τεχνολογία τριπλού τετραπόλου.....	70
3.5.3	Σύζευξη της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS) 71	
3.6	Πειραματικό μέρος.....	72
3.6.1	Εργαστηριακός εξοπλισμός και αντιδραστήρια	72

3.6.2	Αντιδραστήρια-Διαλύτες	75
3.6.3	Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα.....	76
3.6.4	Παρασκευή αντιδραστηρίων	77
3.7	Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αλλεργιογόνων αράπικου φιστικιού και ξηρών καρπών με LC-MS/MS.....	78
3.7.1	Εισαγωγή.....	78
3.7.2	Προκατεργασία Δείγματος.....	79
3.7.3	Εύρεση πρόδρομων και προϊόντων ιόντων αράπικου φιστικιού	82
3.7.4	Βελτιστοποίηση παραμέτρων φασματομετρίας μαζών (MS/MS)	90
3.7.5	Βελτιστοποίηση παραμέτρων προκατεργασίας δειγμάτων	96
3.7.6	Επαλήθευση προκατεργασίας και ιόντων σε δείγματα που περιείχαν αράπικο φιστίκι	101
3.7.7	Εφαρμογή μεθόδου σε δείγματα που εμβολιάστηκαν με χαμηλές συγκεντρώσεις – Τεχνικές δυσκολίες.....	106
3.7.8	Επικύρωση μεθόδου	107
3.8	Συμπεράσματα - Συζήτηση.....	115
3.9	Συζήτηση	116
4.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	119
5.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	120
6.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	121

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Μορφές συμπτωμάτων αλλεργίας τροφίμων [5].	19
Σχήμα 2 Αιτίες αναφυλακτικού επεισοδίου [9].	21
Σχήμα 3 Φυσίγγιο SPE [40].	55
Σχήμα 4 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της εκχύλισης στερεάς φάσης με κατακράτηση [41].	56
Σχήμα 5 Συσσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης με κενό (αριστερά) και αυτόματη συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης (δεξιά) [42-43].	57
Σχήμα 6 Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγρής χρωματογραφίας HPLC [48].	61
Σχήμα 7 Σχηματική παρουσίαση λειτουργίας MS [41].	64
Σχήμα 8 Τετραπολικός ανιχνευτής μαζών (quadrupole mass) [59].	69
Σχήμα 9 Διάταξη τριπλού τετραπόλου [49].	70
Σχήμα 10 Υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών με τριπλό τετράπολο (LC-MS/MS) της Thermo Scientific Quantum.	73
Σχήμα 11 Συσσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης.	74
Σχήμα 12 Ραβδογράμματα έντασης κορυφής πιο άφθονων ιόντων ανά ένεση.	95
Σχήμα 13 Εμβαδόν κορυφής του ιόντος με m/z 703,3 για το αράπικο φιστίκι με διαλύτη απομάκρυνσης λίπους Πετρελαϊκό αιθέρα (Α) και εξάνιο (Β).	97
Σχήμα 14 Ένταση κορυφής ιόντων συναρτήσει της ποσότητας της διθειοθρεϊτόλης.	98
Σχήμα 15 Ένταση κορυφής συναρτήσει της ποσότητας της θρυψίνης.	99
Σχήμα 16 Ένταση κορυφής συναρτήσει των ωρών της ενζυματικής πέψης.	100
Σχήμα 17 Ένταση κορυφής συναρτήσει της ποσότητας του ιωδοακεταμιδίου.	101
Σχήμα 18 Χρωματογραφήματα για τα 4 πιο άφθονα ιόντα του αράπικου φιστικιού σε ξηρό καρπό (α) και σε προϊόν του εμπορίου σοκολάτας (β).	103
Σχήμα 19 Χρωματογραφήματα για τα 4 πιο άφθονα ιόντα του αμυγδάλου σε ξηρό καρπό (α) και σε προϊόν του εμπορίου σοκολάτας (β).	104
Σχήμα 20 Χρωματογραφήματα για τα 4 πιο άφθονα ιόντα του φουντουκιού σε ξηρό καρπό (α) και σε προϊόν του εμπορίου σοκολάτας (β).	105

Σχήμα 21 Διάγραμμα γραμμικότητας (Α) πρώτου σταδίου και (Β) δεύτερου σταδίου για το ιόν 703,3.....	110
Σχήμα 22 SD εμβαδών κορυφών συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (mg/kg).	112
Σχήμα 23 Σχηματική απεικόνιση προκατεργασίας δείγματος	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Αλλεργιογόνα Φουντουκιού [35].....	37
Πίνακας 2 Αλλεργιογόνα καρυδιού [35]	38
Πίνακας 3 Άλλα επισήμως αναγνωρισμένα αλλεργιογόνα ξηρών καρπών [35].....	40
Πίνακας 4 Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανάλυση αλλεργιογόνων τροφίμων [16]	43
Πίνακας 5 Βιβλιογραφικές πηγές μεθόδων προσδιορισμού αλλεργιογόνων και πρωτεϊνών [23-29].....	51
Πίνακας 6 Στάδια βαθμιδωτής έκλουσης	81
Πίνακας 7 Πρόδρομα ιόντα και τα προϊόντα του για το αράπικο φιστίκι όπως βρέθηκαν πειραματικά.	83
Πίνακας 8 Τα ιόντα που επαληθεύτηκαν για το αράπικο φιστίκι μέσω SKYLINE.....	84
Πίνακας 9 Πρόδρομα ιόντα και τα προϊόντα του για όλους τους ξηρούς καρπούς όπως βρέθηκαν πειραματικά.	85
Πίνακας 10 Τα ιόντα που επαληθεύτηκαν για όλους τους ξηρούς καρπούς μέσω SKYLINE	87
Πίνακας 11 Παράμετροι Βελτιστοποίησης MS/MS.....	92
Πίνακας 12 Επικρατέστερες συνθήκες MS	96
Πίνακας 13 Εξίσωση γραμμικότητας 1 ^{ου} και 2 ^{ου} σταδίου.	111
Πίνακας 14 Αποτελέσματα επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης πιστότητας	114
Πίνακας 15 Συνοπτικά αποτελέσματα επικύρωσης μεθόδου.....	116
Πίνακας 16 Σύγκριση LOD, % RSD μεθόδου με βιβλιογραφία και αποδεκτά κριτήρια[26]	117
Πίνακας 17: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	119
Πίνακας 18 Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	120

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Αναλυτική Χημεία» με στόχο την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού αλλεργιογόνων τροφίμων και συγκεκριμένα ξηρών καρπών σε προϊόντα σοκολατοποιίας με υγροχρωματογραφία με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) και ιοντισμό με θετικό ηλεκτροψεκασμό (ESI). Η εκπόνηση της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Νικόλαου Θωμαΐδη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικά

Αλλεργιογόνο είναι ένας τύπος αντιγόνου που παράγει μια ασυνήθιστα έντονη ανοσοαπόκριση κατά την οποία, το ανοσοποιητικό σύστημα καταπολεμά μια αντιληπτή απειλή, που υπό άλλες συνθήκες, θα ήταν αβλαβής για το σώμα. Αυτές οι αντιδράσεις ονομάζονται αλλεργίες [1]. Ο όρος αλλεργιογόνο τροφίμου περιορίζεται και αναφέρεται σε πρωτεΐνες ή πεπτίδια που είναι υπεύθυνα για την αλλεργιογόνο δράση συγκεκριμένων τροφίμων / συστατικών, γνωρίζοντας βέβαια ότι ορισμένα τμήματα υδατανθράκων μπορούν επίσης να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο στην αλλεργιογένεση των τροφίμων. Η ολική πρωτεΐνη αναφέρεται στην ποσότητα πρωτεΐνης μέσα σε ένα αλλεργιογόνο τρόφιμο / συστατικό, ανεξάρτητα από το αν είναι αλλεργιογόνο ή όχι, και όχι στην ποσότητα συγκεκριμένου αλλεργιογόνου[1].

1.2 Τύποι αλλεργιογόνων

Τα αλλεργιογόνα μπορούν να προέρχονται από ποικίλες πηγές, όπως η απέκκριση ακάρεων σκόνης, η γύρη, η μούχλα κατοικίδιων ζώων ή ακόμα και ο βασιλικός πολτός. Παρόλα αυτά, οι τροφικές αλλεργίες δεν είναι τόσο συχνές αλλά, ορισμένα τρόφιμα, όπως τα φιστίκια, τα καρύδια, τα θαλασσινά και τα οστρακοειδή, είναι η αιτία σοβαρών αλλεργιών σε πολλούς ανθρώπους. Επίσημως, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων αναγνωρίζει οκτώ τρόφιμα ως κοινά για αλλεργικές αντιδράσεις σε ένα μεγάλο τμήμα του ευαίσθητου πληθυσμού. Αυτά περιλαμβάνουν τα φιστίκια, τα αράπικα φιστίκια, τα αυγά, το γάλα, τα οστρακοειδή, τα ψάρια, το σιτάρι και τα παράγωγά τους, καθώς και τη σόγια και τα παράγωγά τους καθώς, και τα θειώδη άλατα σε συγκεντρώσεις 10 ppm και άνω. Λόγω των διαφορών στα

γενετικά χαρακτηριστικά των πολιτών τους, των διαφορετικών επιπέδων έκθεσης σε συγκεκριμένα τρόφιμα και λόγω διαφορετικών διατροφικών συνηθειών, πολλές χώρες, έχουν τροποποιημένο κατάλογο αλλεργιογόνων. Για παράδειγμα, ο Καναδάς αναγνωρίζει και τα οκτώ αλλεργιογόνα που αναγνωρίζονται από τις ΗΠΑ και αναγνωρίζει επίσης τους σπόρους σησαμιού και τη μουστάρδα [2]. Αντίθετα, η Ευρωπαϊκή Ένωση αναγνωρίζει επιπλέον άλλα δημητριακά που περιέχουν γλουτένη καθώς και το σέλινο και το λούπινο. Τα πιο γνωστά τρόφιμα που ευθύνονται για την προσβολή του οργανισμού με αλλεργιογόνα είναι το σέλινο, το καλαμπόκι, τα αυγά, τα όσπρια, τα φιστίκια, το γάλα, τα θαλασσινά, το σουσάμι, η σόγια, ξηροί καρποί κλπ [3].

1.3 Διαδικασία δράσης

Ο μηχανισμός των αλλεργικών αντιδράσεων χωρίζεται σε δύο διαδοχικές φάσεις. Η πρώτη φάση είναι αυτή της ευαισθητοποίησης κατά την οποία, το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει την ουσία ως αλλεργιογόνο. Το στάδιο αυτό μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε χρονική στιγμή στη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Κατά τη διάρκεια της 1ης φάσης, η τροφή, μετά την κατανάλωσή της, φτάνει στο στομάχι και το λεπτό έντερο όπου, και διασπάται, με ατελή πέψη των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, οι ακέραιες πρωτεΐνες περνούν από το τοίχωμα του εντέρου και απορροφούνται στην κυκλοφορία ενώ, το ανοσολογικό σύστημα τις αντιλαμβάνεται ως επιβλαβείς και ξεκινά να παράγει αντισώματα εναντίον τους για να τις απομακρύνει. Έτσι, έχουμε παραγωγή αντισωμάτων τύπου IgE εναντίον αυτών των πρωτεϊνών (αλλεργιογόνα). Ύστερα όμως, οι IgE συνδέονται στην επιφάνεια μαστοκυττάρων και βασεοφίλων και είναι έτοιμες να αντιδράσουν σε επόμενη έκθεση στο αλλεργιογόνο. Σε αυτήν τη φάση έχουμε την εκδήλωση αλλεργικών συμπτωμάτων.

Από την άλλη πλευρά, έχουμε τη 2^η φάση η οποία καλείται και αλλεργική φάση ή φάση αλλεργικής αντίδρασης διότι, όταν ο οργανισμός έρθει σε επαφή

και πάλι με το ίδιο αλλεργιογόνο, προκαλείται η αλλεργική αντίδραση. Συγκεκριμένα, όταν ο αλλεργικός ασθενής καταναλώσει εκ νέου την τροφή στην οποία έχει ευαισθησία, η πρωτεΐνη, που ευθύνεται για την αλλεργία, εισέρχεται στην κυκλοφορία και συνδέεται με δύο γειτονικές IgE στην επιφάνεια του κυττάρου. Αυτό προκαλεί ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων και βασεοφίλων με αποτέλεσμα, να εκκρίνουν διάφορες ουσίες που βρίσκονται στα κοκκία τους. Τα κοκκία αυτά περιέχουν περισσότερες από 40 διαφορετικές ουσίες, όπως: ισταμίνη, προσταγλανδίνες λευκοτριένες κ.α.. Οι παραγόμενες ουσίες είναι ικανές να προκαλέσουν τα συμπτώματα της αλλεργίας.


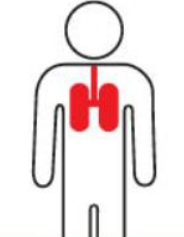
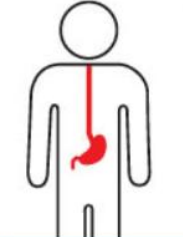


1.4 Συμπτώματα - εμφάνιση δράσης- τρόποι αντιμετώπισης

Μια αλλεργική αντίδραση μπορεί να προκληθεί από οποιαδήποτε μορφή άμεσης επαφής με τα αλλεργιογόνα που περιέχονται στα τρόφιμα ή ποτά που καταναλώνουμε. Τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως μέσα σε λίγες έως αρκετές ώρες μετά την κατανάλωση του φαγητού στο οποίο, ο καταναλωτής είναι αλλεργικός και ενδέχεται να προκαλέσουν διάφορων ειδών βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό. Για παράδειγμα, μια αλλεργική αντίδραση στα τρόφιμα μπορεί να επηρεάσει το δέρμα, τον γαστρεντερικό σωλήνα, την αναπνευστική οδό και, στις πιο σοβαρές περιπτώσεις, το καρδιαγγειακό σύστημα. Επίσης, αυτές οι αντιδράσεις ενίοτε εμφανίζονται σε ήπια μορφή αλλά και, σε πιο σοβαρή, συμπεριλαμβανομένης της αναφυλαξίας που, είναι ικανή να απειλήσει την ανθρώπινη ζωή. Οι τροφικές αλλεργίες περιλαμβάνουν ανοσομεσολαβούμενες αντιδράσεις σε τρόφιμα που προκαλούνται είτε από αντισώματα IgE ή από άλλες ανοσολογικές οδούς [13].

1.4.1 Κατηγορίες συμπτωμάτων

Τα συμπτώματα των αλλεργικών αντιδράσεων που προκαλούνται από τα αλλεργιογόνα τροφίμων διακρίνονται σε ήπια και σοβαρά όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω. Στη συνέχεια, αναφέρονται τα πιο σημαντικά από κάθε κατηγορία.

Συγκεκριμένα, τα ήπια έως μέτρια συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα: εξανθήματα, εκζέματα, ερυθρότητα δέρματος, ιδιαίτερα γύρω από το στόμα ή τα μάτια, φλεγμονή στο στόμα ή στο εσωτερικό του αυτιού, ναυτία ή έμετος, διάρροια, πόνος στο στομάχι, ρινική συμφόρηση, φτάρνισμα, ελαφρύς και ξηρός βήχας κ.α. [4].

				
SKIN	RESPIRATORY	GASTROINTESTINAL	CARDIOVASCULAR	NEUROLOGICAL
hives, swelling, itching, warmth, redness	coughing, wheezing, shortness of breath, chest pain or tightness, throat tightness, trouble swallowing, hoarse voice, nasal congestion or hay fever-like symptoms, (sneezing or runny or itchy nose; red, itchy or watery eyes)	nausea, stomach pain or cramps, vomiting, diarrhea	dizziness/ lightheadedness, pale/blue colour, weak pulse, fainting, shock, loss of consciousness	anxiety, feeling of "impending doom" (feeling that something really bad is about to happen), headache
				OTHER ^{2,3} uterine cramps

Σχήμα 1 Μορφές συμπτωμάτων αλλεργίας τροφίμων [5].

Ενώ από την άλλη πλευρά, τα σοβαρά συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα από τα εξής: οίδημα των χειλιών, της γλώσσας και/ή του λαιμού που εμποδίζει την αναπνοή, προβλήματα κατάποσης, δύσπνοια ή συριγγμός, πτώση της αρτηριακής πίεσης

δημιουργώντας έτσι αίσθημα αδυναμίας και σύγχυσης, απώλεια συνείδησης, πόνος στο στήθος κ.α. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονίσουμε ότι τα σοβαρά συμπτώματα, μόνα τους ή σε συνδυασμό με ηπιότερα συμπτώματα, μπορεί να είναι ενδείξεις αναφυλαξίας, μια άμεσα απειλητική κατάσταση για τον οργανισμό που απαιτεί άμεση θεραπεία.

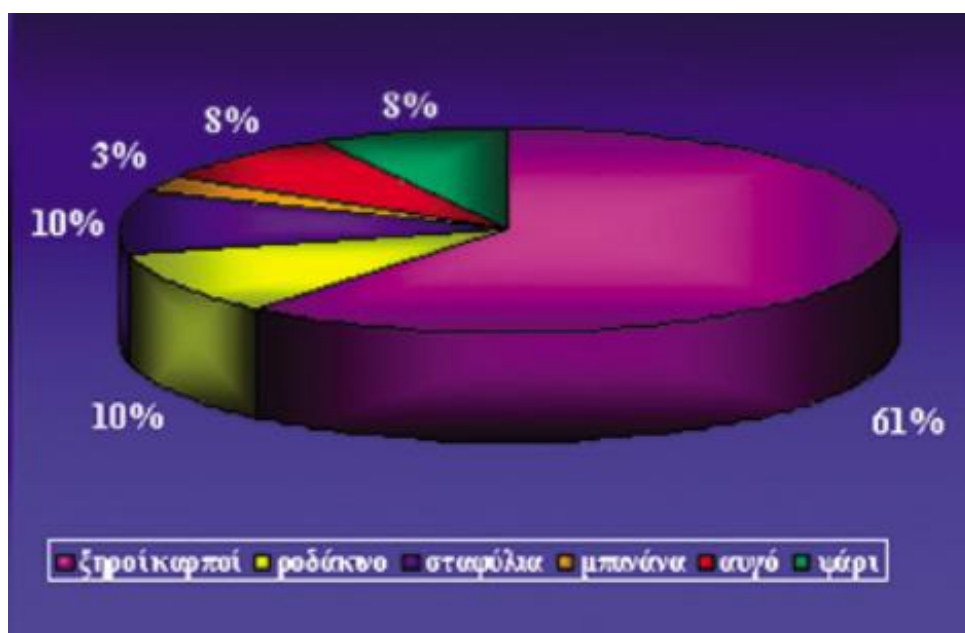
1.4.2 Αναφυλαξία

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αναφυλαξία είναι η πιο σοβαρή κατάσταση στην οποία, μπορεί να βρεθεί ο ανθρώπινος οργανισμός κατά τη διάρκεια μιας αλλεργικής αντίδρασης [6]. Συγκεκριμένα, με τον όρο αναφυλαξία γίνεται αναφορά στην οξεία και γενικευμένη αλλεργική αντίδραση που προκαλείται μετά την επαφή του ατόμου με κάποιο αντιγόνο από την αναπνευστική, στοματική, εντερική ή διαδερμική οδό [7]. Η αναφυλαξία είναι αποτέλεσμα υπερευαισθησίας έναντι της κατανάλωσης κρίσιμων τροφίμων. Σύμφωνα με ανοσολογικές μελέτες ο ορισμός της αναφυλαξίας από τρόφιμα περιλαμβάνει την εμπλοκή δύο ή περισσότερων συστημάτων από τα ακόλουθα: δέρμα (π.χ. εξάνθημα), αναπνευστικό (π.χ. οίδημα χειλιών, γλώσσας ή λαιμού, δυσκολία στην αναπνοή, αναπνευστικό συριγμό, άσθμα), καρδιαγγειακό (π.χ. υπόταση, ζάλη ή λιποθυμία, επηρεασμένη νοητική κατάσταση), γαστρεντερικό (π.χ. κοιλιακό πόνο) [8]. Η παρουσία της υπότασης που ορίζεται ως συστολική πίεση κάτω από 100 mm Hg, αυτόματα οδηγεί στην υποψία αναφυλακτικής αντίδρασης .

1.4.3 Επιδημιολογία

Λόγω της έλλειψης διεθνώς αποδεκτών διαγνωστικών κριτηρίων , δεν είναι εφικτός ο ακριβής καθορισμός των επιπτώσεων των τροφικών αλλεργιών. Περισσότερα στοιχεία υπάρχουν για τον σύγχρονο δυτικό κόσμο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) καταγράφεται ποσοστό της τάξης του

36% του συνόλου των επεισοδίων που αποδίδεται σε αλλεργία σε κάποιο τρόφιμο ενώ το 1,1% των αναφυλακτικών επεισοδίων οφείλεται σε φιστίκια και καρύδια [10] . Για την Ελλάδα δεν υπάρχουν ακριβή επιδημιολογικά στοιχεία για τις τροφικές αλλεργίες και τις περιπτώσεις αναφυλαξίας που οφείλονται σε αυτές. Στο γενικό πληθυσμό υπολογίζεται ότι αλλεργία στο γάλα αγελάδας παρουσιάζει ένα ποσοστό περίπου 3%, στα αυγά περίπου 1,5%, στους ξηρούς καρπούς περίπου 1%, στο σιτάρι και στη σόγια περίπου 0,5% [9].



Σχήμα 2 Αιτίες αναφυλακτικού επεισοδίου [9].

1.4.4 Διάγνωση

Απαιτείται όσο γίνεται πιο ταχεία και ακριβής διάγνωση των παθόντων που βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για την άμεση, γρήγορη και αποτελεσματική αντιμετώπιση του επεισοδίου. Ιδιαίτερα στα παιδιά, το ενδεχόμενο αναφυλακτικής αντίδρασης πρέπει να εξετάζεται σε κάθε περίπτωση καταπληξίας (shock). Η διάγνωση περιλαμβάνει συνήθως, το

λεπτομερές ιστορικό και την αντικειμενική εξέταση. Επίσης, πραγματοποιείται ένας τύπος εργαστηριακής εξέτασης γνωστός και ως αλλεργιοκαθήλωση (RAST) ή δερμοαντίδραση για την ανίχνευση IgE. Το αποτέλεσμα των εξετάσεων αυτών θα πρέπει να σχετίζεται με το ύποπτο τρόφιμο ωστόσο, σε περίπτωση που η εξέταση δείξει αρνητικό αποτέλεσμα, δεν αποκλείεται η αναφυλακτική ευαισθησία [7,9].

1.4.5 Τρόποι αντιμετώπισης

Παρόλο που το φαινόμενο αυτό των αλλεργιογόνων επηρεάζει μεγάλη μερίδα του πληθυσμού σε όλο τον πλανήτη ανεξάρτητα από την γεωγραφική θέση, δεν είναι αντιμετωπίσιμο σε ολικό επίπεδο ούτε μπορεί αποφευχθεί η ανάπτυξη αλλεργικής αντίδρασης. Πιο αναλυτικά, σε περιπτώσεις ήπιων αντιδράσεων το φαινόμενο μπορεί να καταπολεμηθεί με χορήγηση αντιισταμινικών και κορτιζονούχων φαρμάκων ενώ από την άλλη πλευρά, οι οξείες και σοβαρές περιπτώσεις αντιμετωπίζονται μόνο με χορήγηση αδρεναλίνης. Συγκεκριμένα, οι οδηγίες για την αντιμετώπιση των σοβαρότερων αλλεργικών επεισοδίων, που παρέχονται από την Αμερικανική Ακαδημία για τις Αλλεργίες, το Άσθμα και την Ανοσολογία (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology) κάνουν λόγο για χρήση επινεφρίνης (αδρεναλίνης), καθώς και, αυτοχορήγηση ένεσης αδρεναλίνης, διαδικασία και τεχνική που μαθαίνεται από ειδικό αλλεργιολόγο[12]. Παρόλα αυτά, η βαρύτητα των συμπτωμάτων επηρεάζει την αντιμετώπιση και την ιατρική περίθαλψη του ασθενούς. Σε ακραίες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η εξασφάλιση ανοικτής αεροφόρου οδού και φλεβικής προσπέλασης έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η ενδοφλέβια χορήγηση φαρμάκων - αντιισταμινικών και κορτικοστεροειδών - και υγρών. Τέλος, φαίνεται πως η ταχύτητα εκδήλωσης των συμπτωμάτων σχετίζεται με τη σοβαρότητα του περιστατικού της αλλεργικής αντίδρασης.

Η επινεφρίνη είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για αναφυλαξία και το σχέδιο αναφυλαξίας πρέπει να εξατομικεύεται από τον παροχέα υγειονομικής

περίθαλψης. Οι καθυστερήσεις στη χορήγηση επινεφρίνης για σοβαρά ή επίμονα συμπτώματα μπορεί να είναι πολύ επικίνδυνες, ειδικά όταν η καθυστέρηση είναι μια ώρα ή περισσότερο [4].

1.5 Πρόβλημα

Έχει αναφερθεί ότι όλα τα αλλεργιογόνα και τα προϊόντα τους μπορούν να προκαλέσουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία και σε ορισμένες περιπτώσεις η έκθεση σε αυτά μπορεί να είναι θανατηφόρα. Συνήθως, τα περισσότερα από αυτά τα αλλεργιογόνα τροφίμων είναι γενικά ανθεκτικά στην επεξεργασία τροφίμων και έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση σε ευαίσθητο καταναλωτή εάν προστεθούν σε τρόφιμα. Ορισμένα από αυτά τα αλλεργιογόνα είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλη την Ευρώπη, ενώ άλλα, όπως η μουστάρδα και το σέλινο, περιορίζονται περισσότερο γεωγραφικά. Για αυτόν τον λόγο ο κατάλογος που περιέχει τα αλλεργιογόνα θα πρέπει να επανεξετάζεται υπό το φως των μεταβαλλόμενων πρακτικών τροφίμων και της εμφάνισης νέων κλινικών παρατηρήσεων και άλλων επιστημονικών πληροφοριών. Συγκεκριμένα, σημειώνεται μεγάλη μεταβλητότητα στην ευαισθησία μεταξύ διαφορετικών ευαίσθητων ατόμων σε σχέση με τη δόση των αλλεργιογόνων που απαιτείται για να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες [14]. Επιπλέον, για δεοντολογικούς λόγους, τα ιδιαίτερα ευαίσθητα άτομα συχνά δεν δοκιμάζονται με κατάλληλο τρόπο για να καθοριστούν κατώτατα όρια. Ως εκ τούτου, οι διαθέσιμες πληροφορίες δεν επαρκούν για την εξαγωγή ισχυρών συμπερασμάτων σχετικά με την υψηλότερη δόση που δεν θα προκαλούσε ανεπιθύμητες ενέργειες. Επομένως, μέχρι τώρα δεν εφαρμόζεται ένα σύστημα αξιολόγησης κινδύνου που να βασίζεται στην αξιολόγηση των επιπέδων ανεπιθύμητων επιπτώσεων (NOAEL).

Επιπρόσθετα, η επεξεργασία μπορεί να επηρεάσει την αλλεργιογένεια των τροφίμων, όπως και η μήτρα τροφίμων στην οποία υπάρχουν τα αλλεργιογόνα στον καταναλωτή. Ενώ επίσης, τα άτομα που υποφέρουν από αλλεργίες στο ίδιο τρόφιμο μπορούν να αντιδράσουν σε διαφορετικά

συστατικά του εν λόγω τροφίμου. Παρόλα αυτά, τα διαθέσιμα δεδομένα δεν δείχνουν ότι η επεξεργασία τροφίμων επηρεάζει προβλέψιμα την αλλεργιογένεση και επίσης, δεν μπορεί να προβλεφθεί η επίδραση του υποστρώματος. Επομένως, είναι επιτακτική ανάγκη να προσδιορισθεί αυτή η εξάρτηση [15]

1.6 Νομοθεσία - κανονισμός

Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου του καταναλωτή, είναι επιθυμητή η ανάλυση των τροφίμων για ίχνη πιθανών αλλεργιογόνων τροφίμων. Ωστόσο, ενώ είναι δυνατή και διαθέσιμη στο εμπόριο η χρήση των ευαίσθητων συστημάτων δοκιμών για ανάλυση ορισμένων αλλεργιογόνων στα τρόφιμα, εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικά προβλήματα όπως: ανεπαρκής εξαγωγή, όρια ανίχνευσης εκτός του πεδίου κλινικής ευαισθησίας, ανεπαρκής ειδικότητα λόγω διασταυρούμενης έκθεσης και αντίδρασης και ανεπαρκής διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα. Για αυτόν τον λόγο, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο προχώρησε στην τροποποίηση της οδηγίας 2000/13/EK εισάγοντας μία νέα οδηγία, την 2003/89/EK που αφορά τα συστατικά που περιέχονται στα τρόφιμα δίνοντας μεγαλύτερη βαρύτητα στα αλλεργιογόνα των τροφίμων. Στις 13 Δεκεμβρίου τέθηκε σε εφαρμογή ο κανονισμός (ΕΕ) 1169/2011, ο οποίος, τροποποιεί υφισταμένες νομοθετικές διατάξεις σχετικά με την σήμανση των τροφίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Ο νέος κανονισμός αποσκοπεί στην παροχή πληροφοριών στους καταναλωτές για να εξασφαλιστεί η ασφαλής κατανάλωση τροφίμων που διατίθενται στην αγορά. Ο καταναλωτής πληροφορείται πλέον για τις ουσίες και τα προϊόντα που περιέχονται στα τρόφιμα και προκαλούν αλλεργίες ή δυσανεξία. Συγκεκριμένα, ο κανονισμός επιβάλλει: α) την υποχρεωτική αναγραφή στον κατάλογο των συστατικών του τροφίμου του συστατικού που προκαλεί αλλεργία ή δυσανεξία, β) την σαφή διάκριση του συστατικού αυτού από τα υπόλοιπα με διαφοροποίηση της σήμανσης του (γραμματοσειρά, μορφή, χρώμα του φόντου) και γ) την υποχρέωση σήμανσης για την ύπαρξη

αλλεργιογόνων στα μη προσυσκευασμένα τρόφιμα της επισιτιστικής βιομηχανίας (π.χ. εστιατόρια, ξενοδοχεία, καντίνες, φούρνοι κλπ) με βάση εθνικές νομοθεσίες που θα θεσπίσουν τα Κράτη Μέλη.

Σύμφωνα με τον κανονισμό στο Παράρτημα IIIa της οδηγίας, γίνεται αναφορά στα τρόφιμα που αποτελούν κίνδυνο λόγω ύπαρξης αλλεργιογόνων και ανάπτυξης αλλεργιογόνου δράσης. Η πιθανότητα ότι συγκεκριμένα παράγωγα των αλλεργιογόνων τροφίμων που απαριθμούνται στο παράρτημα IIIa της οδηγίας είναι απίθανο να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση.

1.6.1 Τρόφιμα που περιλαμβάνονται στο παράρτημα της οδηγίας 2003/89/ΕΚ και συνοπτική αξιολόγησή τους.

- **Σιτηρά που σχετίζονται με τη νόσο κοιλιοκάκη**

Η κοιλιοκάκη είναι ανοσολογική ασθένεια που προκαλείται από τη γλουτένη, την κύρια πρωτεΐνη των αλεύρων. Η όξινη υδρόλυση μπορεί να καταστρέψει τις ιδιότητες της γλουτένης που προκαλούν κοιλιοκάκη. Ωστόσο, η μερική υδρόλυση, η ενζυματική αποικοδόμηση και η θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τροφίμων δεν καταστρέφουν τις μονάδες πεπτιδίου που ενεργοποιούν την κοιλιοκάκη. Το ισχύον όριο του Codex Alimentarius για τροφές χωρίς γλουτένη 200 mg / kg τροφής για ασθενείς με κοιλιοκάκη απαιτεί επανεξέταση.

- **Σιτηρά που σχετίζονται με την τροφική αλλεργία**

Τα δημητριακά μπορούν να προκαλέσουν τροφική αλλεργία. Η αλλεργία στα δημητριακά στον γενικό πληθυσμό δεν είναι πολύ συχνή καθώς, λίγες περιπτώσεις αναφέρονται σε σχέση με την εκτεταμένη κατανάλωση. Στα παιδιά, ωστόσο, το σιτάρι αποτελεί συχνή αιτία τροφικής αλλεργίας. Τα αλλεργιογόνα δημητριακών αντιδρούν εγκάρσια με τα αλλεργιογόνα της γύρης. Δεδομένου ότι το σιτάρι καταναλώνεται κατά κύριο λόγο μαγειρεμένο ή θερμικώς επεξεργασμένο, είναι προφανές ότι η αλλεργιογένειά του επιβιώνει

κατά τη θερμική επεξεργασία. Ορισμένα αλλεργιογόνα σίτου μπορούν να καταστραφούν με θέρμανση, ενώ άλλα είναι θερμοσταθερά. Η χαμηλότερη αναφερόμενη ποσότητα σίτου ικανή να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση είναι 500 mg. Παρόλα αυτά, Δεν έχει αναφερθεί καμία ανοσοχημική μέθοδος για την ανάλυση τροφίμων για αλλεργιογόνα δημητριακών χωρίς γλουτένη.

- **Ψάρια και καρκινοειδή**

Τα ψάρια και τα οστρακόδερμα είναι γνωστά για την αλλεργιογόνο δράση τους. Όλα τα μεγάλα αλλεργιογόνα ψαριών αντιδρούν εγκάρσια και κανένα ψάρι δεν έχει βρεθεί ότι είναι ασφαλές σε αλλεργικούς ασθενείς. Η επεξεργασία τροφίμων μπορεί να επηρεάσει την αλλεργιογένεση, αλλά δεν είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για τη μείωση της αλλεργιογένεσης. Έχει αναφερθεί ότι δόσεις ιχθύων που προκαλούν αλλεργική αντίδραση είναι της τάξης των mg και για γαρίδες ως μέλος καρκινοειδών σε g. Τα κατώτερα όρια δεν έχουν τεκμηριωθεί. Για τα οστρακόδερμα υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι ανοσοχημικής ανίχνευσης αλλά δεν είναι επαρκώς ευαίσθητες για να ανιχνεύσουν τη χαμηλότερη ποσότητα που αποδεικνύεται ότι προκαλούν αλλεργική αντίδραση.

- **Αυγό**

Οι πρωτεΐνες αυγών συχνά ευθύνονται για την εκδήλωση αλλεργικών αντιδράσεων. Έχει παρατηρηθεί ότι η θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών και άλλες επεξεργασίες δεν μειώνουν την αλλεργιογένεση. Οι δόσεις που αναφέρθηκαν για να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις σε κλινικές μελέτες κυμαίνονται από επίπεδα μικρογραμμαρίων έως χαμηλά χιλιοστογραμμάρια πρωτεϊνών αυγών.

- **Αράπικο φιστίκι- γεωκαρύδι**

Το αράπικο φιστίκι ανήκει στα όσπρια και αποτελεί μία από τις πιο γνωστές αιτίες αλλεργικών αντιδράσεων των τροφίμων. Η δράση τους συνδυάζεται με

τη δράση άλλων μελών της οικογένειας οσπρίων, όπως η σόγια και το λούπινο. Είναι η πιο συνηθισμένη αιτία της θανατηφόρας αναφυλαξίας που προκαλείται από τρόφιμα. Η θερμική επεξεργασία μπορεί να αυξήσει την αλλεργιογένεσή τους ενώ, οι αντιδράσεις μπορούν να ενεργοποιηθούν με ποσότητες μικρογραμμαρίων. Οι ευαίσθητες μέθοδοι ανίχνευσης για αλλεργιογόνα φιστικιών είναι εμπορικά διαθέσιμες, αλλά δεν είναι κατάλληλες για την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων στα επεξεργασμένα τρόφιμα.

- **Σόγια**

Η σόγια είναι γνωστό αλλεργιογόνο και η πρωτεΐνη της χρησιμοποιείται ευρέως σε επεξεργασμένα τρόφιμα. Ως όσπριο, η σόγια μπορεί να αντιδράσει συνδυαστικά με άλλα όσπρια, συμπεριλαμβανομένων των φιστικιών. Επίσης, έχει παρατηρηθεί διασταυρούμενη αντίδραση με αλλεργιογόνα του αγελαδινού γάλακτος. Όπως σε πολλά αλλεργιογόνα τροφίμων, η θερμική μετουσίωση και η ενζυματική πέψη της σόγιας επηρεάζουν την αλλεργιογένεση και μπορεί να δημιουργήσουν καινούργιους αλλεργιογόνους επίτοπους. Τα επίπεδα για την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών σε αλλεργικά άτομα σόγιας είναι μεταβλητά και βρίσκονται στην κλίμακα χαμηλών μικρογραμμαρίων, αν και οι μελέτες δεν είναι αξιόπιστες. Έχουν περιγραφεί ανοσοχημικές μέθοδοι ανίχνευσης και η PCR για την ανάλυση αλλεργιογόνων σόγιας αλλά, φαίνεται να είναι ακατάλληλες για ανίχνευση στα τρόφιμα.

- **Γάλα**

Οι περισσότερες πρωτεΐνες αγελαδινού γάλακτος χαρακτηρίζονται ως πιθανά τροφικά αλλεργιογόνα. Πολλά αλλεργιογόνα γάλακτος έχουν ταυτοποιηθεί και αρκετά παραμένουν ενεργά κατά την προετοιμασία φαγητού και κατά την πέψη. Τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι ένα σημαντικό ποσοστό αλλεργικών ατόμων αντιδρά σε πολύ χαμηλές ποσότητες αλλεργιογόνων (σε κλίμακα μικρογραμμαρίων), αλλά δεν επαρκούν για την καθιέρωση επικυρωμένου χαμηλότερου επιπέδου έκθεσης. Οι παραπάνω εκτιμήσεις

μπορούν να εφαρμοστούν και στο βουβαλίσιο, κατσικίσιο και πρόβειο γάλα πέρα από το αγελαδινό. Έχουν περιγραφεί ανοσοχημικές μέθοδοι ανίχνευσης για τα πιο σημαντικά αλλεργιογόνα γάλακτος, αλλά μπορεί να μην είναι κατάλληλες για τα επεξεργασμένα τρόφιμα.

- **Ξηροί Καρποί**

Οι ξηροί καρποί είναι μια κοινή αιτία αλλεργικών αντιδράσεων. Το ψήσιμο μπορεί να μειώσει αλλά, να μην εξαλείψει την αλλεργιογένεση των ξηρών καρπών. Μερικά μικρογραμμάρια μπορεί να προκαλέσουν αντιδράσεις σε ευαίσθητα άτομα, αλλά δεν έχουν καθοριστεί τα κατώτερα όρια που μπορούν να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση. Λόγω της συχνής ύπαρξης σε αρκετά τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί αρκετά συστήματα ανιχνεύσεως αλλεργιογόνων ξηρών καρπών στα τρόφιμα.

- **Σέλινο**

Το σέλινο βρίσκεται αρκετά συχνά σε προσσκευασμένα τρόφιμα καθώς, χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικό αρώματος και γεύσης. Οι αλλεργικές αντιδράσεις παρατηρούνται κυρίως στο νωπό σέλινο και λιγότερο στο μαγειρεμένο σέλινο, αλλά η αλλεργιογένεση της σκόνης σέλινου είναι συγκρίσιμη με εκείνη του ακατέργαστου σέλινου. Οι αλλεργικοί ασθενείς μπορούν να αντιδράσουν σε δόσεις αλλεργιογόνου εύρους χιλιοστογραμμαρίων αλλά, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τον καθορισμό των κατώτατων ορίων πρόκλησης αντίδρασης. Για την ώρα, δεν υπάρχει διαθέσιμη δοκιμασία ανίχνευσης.

- **Μουστάρδα**

Τα κυριότερα αλλεργιογόνα της μουστάρδας είναι ανθεκτικά στη θερμότητα και σε άλλες διαδικασίες επεξεργασίας τροφίμων. Οι δόσεις αλλεργιογόνων που προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις σε αλλεργικούς ασθενείς μπορεί να βρίσκονται σε υψηλή περιοχή μικρογραμμαρίων, αν και δεν έχουν καθοριστεί

τα κατώτερα όρια. Επιπλέον, Δεν έχει περιγραφεί καμία ειδική μέθοδος ανίχνευσης αλλεργιογόνων μουστάρδας.

- **Σπόροι σουσαμιού**

Οι σπόροι σησαμιού είναι ευρέως γνωστοί και χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο σε πολλά επεξεργασμένα τρόφιμα. Μερικά χιλιοστόγραμμα σισαμίνης είναι ικανά να προκαλέσουν αλλεργικά συμπτώματα ενώ, παρέχονται προσδιορισμοί για ανίχνευση αλλεργιογόνων σησαμιού.

- **Θειώδη**

Οι θειώδεις ενώσεις χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές αντιδράσεις σε ευαίσθητα άτομα, κυρίως σε ασθματικούς ασθενείς. Η παθογένεια των ανεπιθύμητων αντιδράσεων από θειώδη δεν έχει τεκμηριωθεί με σαφήνεια αλλά, είναι απίθανο οι αντιδράσεις θειώδων να είναι αλλεργικές ή να προκαλούνται από ανοσοποίηση ή να προκαλούν αναφυλακτικές αντιδράσεις. Τα ευαίσθητα, σε θειώδη, άτομα θα αντιδράσουν στον κατάποση μεταδιθειώδους σε ποσότητες που κυμαίνονται από 20 έως 50 mg θειωδών στα τρόφιμα. Η μικρότερη συγκέντρωση θειωδών που μπορεί να προκαλέσει αντίδραση σε ευαίσθητα άτομα δεν έχει τεκμηριωθεί. Η Ευρωπαϊκή Ένωση απαιτεί να γίνεται επισήμανση των τροφίμων που περιέχουν θειώδη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 mg / kg παρόλο που το όριο για πρόκληση αντίδρασης μπορεί να είναι ακόμη χαμηλότερο.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, από τον Νοέμβρη του 2011 βάσει του κανονισμού 1169/2011, σε όποιο προσυσκευασμένο τρόφιμο, στο οποίο, περιέχεται κάποιο αλλεργιογόνο συστατικό που, αναγράφεται στη λίστα, είναι υποχρεωτικό να αναγράφεται στην επισήμανση των τροφίμων καθώς, θεωρείται ότι η ύπαρξή τους ενδέχεται να προκαλέσουν αλλεργίες σε ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού ή ευπαθή άτομα. Ωστόσο, πέρα από τα

συσκευασμένα τρόφιμα, υπάρχουν και «μη προσυσκευασμένα τρόφιμα» προς πώληση που προορίζονται να παρουσιασθούν ως έχει στον τελικό καταναλωτή και στις μονάδες ομαδικής εστίασης και συνήθως αφορούν τρόφιμα σε ελάχιστη προστατευτική συσκευασία που είτε συσκευάζονται στον τόπο πώλησης ή προσυσκευάζονται για άμεση πώληση (π.χ. ψωμί από φούρνο). Για αυτόν τον λόγο ο κανονισμός επεκτάθηκε και σε αυτά τα είδη και η απαίτηση αφορά σε όλες τις επιχειρήσεις που σερβίρουν ή διανέμουν μη συσκευασμένο φαγητό, από αλυσίδες λιανικής πώλησης (ζαχαροπλαστεία, αρτοποιεία, παντοπωλεία) έως τη μαζική εστίαση και τα ξενοδοχεία [22]. Σύμφωνα με την απαίτηση αυτή η ενημέρωση πρέπει να δίδεται πάντα πριν την πώληση και περιλαμβάνει:

- Αναγραφή των συστατικών που προκαλούν αλλεργίες και δυσανεξίες στους τιμοκαταλόγους της επιχείρησης.
- Πινακίδες σε εμφανές σημείο του καταστήματος που αναγράφουν τα περιεχόμενα συστατικά που προκαλούν αλλεργίες ή δυσανεξίες ανά είδος τροφίμου.

Η δυνατότητα προφορικής ενημέρωσης ταυτόχρονα με:

- Πινακίδες σε εμφανές σημείο του καταστήματος ή/και ένδειξη επί των τιμοκαταλόγων που να παραπέμπουν τις ευπαθείς ομάδες να συμβουλευτούν το εξειδικευμένο προσωπικό το οποίο θα πρέπει να είναι διαθέσιμο όλες τις ώρες την ημέρα εντός της επιχείρησης.
- Αναγραφή των συστατικών που προκαλούν αλλεργίες και δυσανεξίες σε έντυπο ή ηλεκτρονικό υλικό, άμεσα διαθέσιμο στον πελάτη.

1.7 Ξηροί καρποί και αλλεργία

Οι ξηροί καρποί είναι μία σημαντική και συχνή πηγή πρόκλησης αλλεργικής αντίδρασης λόγω της ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Συγκεκριμένα, η IgE είναι ο

κύριος παράγοντας στην αντίδραση υπερευαισθησίας τύπου 1 (άμεση, σε λίγα μόνο δευτερόλεπτα από την έκθεση στο αλλεργιογόνο). Αυτός ο τύπος αντίδρασης οδηγεί σε ποικίλα συμπτώματα όπως, αλλεργικό άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα, τροφική αλλεργία, και ορισμένους τύπους χρόνιας κνίδωσης και ατοπικής δερματίτιδας. Αυτό που συμβαίνει επι της ουσίας, είναι ότι τα αντισώματα IgE μέσω των Fc τμημάτων τους συνδέονται με τους αντίστοιχους υποδοχείς των σιτευτικών και των βασεόφιλων κυττάρων και η σύνδεση των αντισωμάτων αυτών με ειδικά αντιγόνα προκαλεί απελευθέρωση φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών που ευθύνονται για την εκδήλωση των συμπτωμάτων αναφυλαξίας από τα κύτταρα αυτά. Τα συμπτώματα αυτά κάνουν την εμφάνισή τους σε ελάχιστο χρόνο από τη στιγμή του αντιγονικού ερεθισμού. Σε περιπτώσεις έντονης και βαριάς αλλεργικής αντίδρασης, γίνεται λόγος για αναφυλαξία δηλαδή, οι ίδιοι μεσολαβητές είναι δυνατόν να προκαλέσουν στένωση των αεραγωγών, μέχρι πλήρους απόφραξης και καρδιακή καταπληξία [30]. Μορφολογικά, οι ξηροί καρποί αποτελούνται από ένα ξηρό και σκληρό κέλυφος το οποίο, περιβάλλει τον καρπό ή το αδρανοποιημένο έμβρυο. Συνήθως, οι σπόροι αυτοί περιέχουν υψηλό αριθμό θρεπτικών στοιχείων καθώς, με αυτόν τον τρόπο παρέχουν στους σπόρους βλάστησης ενέργεια για επιβίωση και πολλαπλασιασμό. Όπως γίνεται αντιληπτό, λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας των ξηρών καρπών θεωρούνται ένα σημαντικό κομμάτι της διατροφής των ανθρώπων και η κατανάλωσή τους προτείνεται τακτικά. Αυτό αντανακλάται και στα στατιστικά αποτελέσματα που κοινοποιούνται ετησίως από την FAO/STAT και αφορούν την παγκόσμια παραγωγή ξηρών καρπών. Συγκεκριμένα, η στατιστική εταιρεία αναφέρει ότι το 2018 για παράδειγμα, παράχθηκαν 4,9 εκατομμύρια τόνοι ξηρού καρπού κάσιους και 1,1 εκατομμύρια τόνοι ξηρού καρπού φιστικιού[31]. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ξηροί καρποί δεν καταναλώνονται μόνο ως μεμονωμένα προϊόντα ως σνακ ή σε μίγμα ξηρών καρπών αλλά, βρίσκονται στα συστατικά πολλών τροφίμων και απαντώνται σε μεγάλο εύρος των τροφίμων που βρίσκονται στα ράφια των καταναλωτών όπως, οι σοκολάτες, γάλατα εναλλακτικών πηγών προέλευσης, λάδια, δημητριακά, μπισκότα, αρωματισμένους καφέδες,

σαλάτες κλπ. Αυτό μας αποδεικνύει ότι ο καταναλωτής είναι ακόμα πιο πολύ εκτεθειμένος σε προϊόντα που περιέχουν ξηρούς καρπούς έμμεσα, χωρίς να γίνεται πάντα αντιληπτό ή να το αγνοεί ενώ επίσης, υπάρχει και η τάση της κατανάλωσής τους από χορτοφάγους και αυστηρά χορτοφάγους κλπ ως εναλλακτική πηγή ενέργειας. Επομένως, όλο και περισσότερο ελλοχεύει ο κίνδυνος να προκληθεί αλλεργική αντίδραση λόγω ύπαρξης κάποιας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης που προέρχεται από ξηρό καρπό. Μία εξίσου σημαντική παρατήρηση είναι πως φαίνεται κάποια αλλεργιογόνα να αδρανοποιούνται ή ακόμα και να καταστρέφονται με διάφορες επεξεργασίες του τροφίμου π.χ. θερμική επεξεργασία καρυδιών και φουντουκιών, παρόλα αυτά άλλα αλλεργιογόνα, όπως αυτά των αράπικων φιστικιών, είναι ανθεκτικά σε τέτοιου είδους επεξεργασίες και παραμένουν επικίνδυνα και ενεργά και διατηρούν την ικανότητά τους να προσδένονται με την ανοσοσφαιρίνη IgE [32-35].

1.8 Πρωτεΐνες και αλλεργία ξηρών καρπών

Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στην αλλεργία που οφείλεται στους ξηρούς καρπούς, ανήκουν στις πρωτεϊνικές οικογένειες των 2S αλβουμίνων (albumins), των βισιλίνων (vicilins), των λεγουμίνων (legumins) και των nsLTPs [35,36]. Επίσης, οι ολεοσίνες (oleosins) και οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με τις ταυματίνες (thaumatins) αποτελούν σημαντικά αλλεργιογόνα όπως αποδείχθηκε μελετώντας τη δράση τους.

1.8.1 Κατηγορίες αλλεργιογόνων πρωτεϊνών

- **2S αλβουμίνες**

Οι 2S αλβουμίνες μαζί με τις nsLTPs ανήκουν στην ευρεία οικογένεια της προλαμίνης. Αυτές οι πρωτεΐνες παρέχουν μια συνολική α ελικοειδή κυρίαρχη

δομή και να μοιράζονται 6-8 υπολείμματα κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικές γέφυρες δημιουργώντας έτσι μια συμπαγή δομή. Πέρα από την χαρακτηριστική δομή τους, οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των μελών αυτής της οικογένεια πρωτεϊνών δεν εμφανίζουν ομοιότητες. Οι 2S αλβουμίνες κωδικοποιούνται από οικογένεια πολυγονιδίων και περιέχουν μεγάλο αριθμό αμινοξέων πλούσια σε θείο. Τα περισσότερα από αυτά διασπώνται σε μια μεγάλη υπομονάδα, περίπου 9 kDa και μια μικρή υπομονάδα, περίπου 4 kDa. Λόγω της συμπαγούς δομής τους, οι 2S αλβουμίνες εμφανίζουν μεγάλη θερμική και ενζυματική αντίσταση. Συνεπώς, σε τέτοιες επεξεργασίες μένουν αναλλοίωτες.

- **Μεταφορείς λιπιδίων-Non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs)**

Τα nsLTPs πιστεύεται ότι μεταφέρουν φωσφολιπίδια σε μεμβράνες και αναπροσαρμόζονται όταν το φυτό, στο οποίο βρίσκονται, προσβληθεί από κάποιο μύκητα ή βακτήριο. Τα nsLTPs χαρακτηρίζονται από μια κοινή δομή συγκεκριμένα, 4 δισουλφιδικών γεφυρών που σχηματίζουν μια εσω-τερική κοιλοότητα που επιτρέπει τη μεταφορά συμπλόκων όπως, λιπαρά οξέα, λιπαρά ακυλο-CoA, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα και προσταγλανδίνη B2. Τα nsLTPs έχουν ταυτοποιηθεί ως αλλεργιογόνα από ένα ευρύ φάσμα π.χ. δικοτυλήδονα φυτά, τη γύρη, τα φρούτα, τους ξηρούς καρπούς και τους σπόρους. Κατά κύριο λόγο αυτά τα αλλεργιογόνα θεωρούνται ως αλλεργιογόνα ανεπεξέργαστων τροφίμων, υποδηλώνοντας ότι η ευαισθητοποίηση πραγματοποιείται μέσω γαστρεντερικού σωλήνα. Αυτά τα αλλεργιογόνα συσσωρεύονται στα εξωτερικά στρώματα φρούτων, σπόρων και καρπών και εμφανίζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα έναντι θερμικής επεξεργασίας και ενζυματικής αποικοδόμησης, ωστόσο η σταθερότητά τους εξαρτάται από το pH.

- **Βισιλίνες (Vicilins)**

Οι βισιλίνες (7S globulins), μαζί με τις λεγουμίνες (11S globulins), ανήκουν στην υπεροικογένεια κίουπινών (cupin) που, χαρακτηρίζεται από δομή β-βαρελίου. Γενικά, αυτές οι γλυκοπρωτεΐνες επεξεργάζονται πρωτεολυτικά

παρέχοντας έτσι μια σειρά ισομορφών. Στη φυσική τους μορφή, οι βισιλίνες εμφανίζονται ως τριμερή με συνολική μοριακή μάζα περίπου, 150-190 kDa. Τέλος, παρουσιάζουν μια ενδιάμεση σταθερότητα όταν υποβάλλονται σε θερμότητα και ενζυματική επεξεργασία.

- **Λεγουμίνες (Legumins)**

Οι λεγουμίνες είναι πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους (περίπου 350 kDa) που αποτελούνται από έξι υπομονάδες. Η πρόδρομη πρωτεΐνη υποβάλλεται σε επεξεργασία για να σχηματιστούν τριμερή στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια, μεταφέρονται στην αποθήκη πρωτεϊνών. Εκεί κάθε υπομονάδα διασπάται σε όξινο (40 kDa) και βασικό πολυπεπτίδιο (20 kDa). Αυτές οι υπομονάδες παραμένουν συνδεδεμένες με δισουλφιδική γέφυρα και τελικά σχηματίζουν μία εξαμερή δομή.

- **Ολεοσίνες (Oleosins)**

Οι ολεοσίνες, που εμφανίζονται σε αφθονία σε σπόρους και καρπούς, είναι δομικές πρωτεΐνες των λιπαρών σωμάτων. Αυτά τα σώματα αποτελούνται από ουδέτερα λιπίδια (92-98 %), κυρίως τριακυλγλυκερόλες, εξωτερικές μονοστιβάδες φωσφολιπιδίων (1-4 %) και πρωτεΐνες (1-4 %), κυρίως ολεοσίνες. Οι πρωτεΐνες (~15-26 kDa) έχουν παρόμοιες δομές, με ένα υδρόφοβο κέντρο με περίπου 68-74 υπολείμματα αμινοξέων, πλαισιωμένο από υδρόφιλες N- και C-τελικές ομάδες μεταβλητού μήκους (κατάλοιπα 50-70 και 55-98). Εκτός από δομικό ρόλο σε λιπαρά σωματίδια, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορούν επίσης να βοηθήσουν στη βιοσύνθεση και κινητοποίηση ελαίων. Αν και οι ολεοσίνες έχουν ταυτοποιηθεί ως αλλεργιογόνα από φουντούκι, φιστίκια και σπόρους, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για αυτήν τη δράση τους λόγω της χαμηλής τους διαλυτότητας σε υδατικά διαλύματα.

- **Πρωτεΐνες όμοιες με τις Bet v 1**

Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις Bet v 1 έχουν ταυτοποιηθεί σε είδη του φυτικού βασιλείου. Οι πρωτεΐνες από την οικογένεια Bet v 1 (154-160 υπολείμματα αμινοξέος) δεν είναι γλυκοζυλιωμένα, εμφανίζουν υψηλή ομοιότητα όσον αφορά στην αλληλουχία τους και συνήθως, κωδικοποιούνται από οικογένεια πολυγονιδίων. Η συνολική δομή τους διατηρείται χάρη στις επτάκλωνες αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες που κάμπτονται γύρω από μία μακρά έλικα C-τελικού άκρου και δύο επιπλέον ελίκων, παρέχοντας έτσι ένα μεγάλο υδρόφοβο θύλακα ο οποίος είναι ικανός να δεσμεύει σύμπλοκα όπως, φυτικά στεροειδή. Οι πρωτεΐνες αυτές συναντώνται σε φυτικούς οργανισμούς, κυρίως στη γύρη, σε φρούτα και σπόρους. Συνήθως, προκαλούν εισπνεόμενες αλλεργίες και οι περισσότεροι ασθενείς αναπτύσσουν αλλεργικά συμπτώματα κατά την κατάποση πρωτεϊνών από τα τρόφιμα. Συνήθως, τα συμπτώματα τείνουν να περιορίζονται στην στοματική κοιλότητα και σπάνια προκαλούν σοβαρότερα συμπτώματα. Τέλος, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται ταχέως όταν υποβάλλονται σε θέρμανση ή ενζυματική επεξεργασία.

- **Προφιλίνες (Profilins)**

Οι προφιλίνες είναι μικρές, μη γλυκοζυλιωμένες κυτοσολικές πρωτεΐνες (12-15 kDa) που, βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και τελούν κάποιες βασικές λειτουργίες όπως η ρύθμιση της ενδοκυτταρικής μεταφοράς. Έχει παρατηρηθεί ότι οι αλληλουχίες προφιλινών από ανώτερα φυτά είναι εξαιρετικά ομόλογες. Πιο αναλυτικά, έχουν μια σφαιρική δομή με μια κεντρική επτάκλωνη αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια που περικλείεται από N- και C-τελικές α-έλικες. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ενδιάμεση σταθερότητα όταν υποβάλλονται σε θέρμανση, πίεση και ενζυματική επεξεργασία. Επίσης, έχουν αναγνωρισθεί ως αλλεργιογόνα της γύρης και των φυτικών τροφίμων.

1.8.2 Γνωστοί ξηροί καρποί υπεύθυνοι για αλλεργίες

- **Φουντούκι**

Τα φουντούκια (*Corylus avellana*) ταξινομούνται ως καρποί με κέλυφος που ανήκουν στην οικογένεια των *Betulaceae*. Λόγω της υψηλής τους θρεπτικής αξίας και της ωφέλιμης επίδρασης στην υγεία των ανθρώπων καταναλώνονται παγκοσμίως. Παρόλο που υπάρχουν σημαντικές γεωγραφικές και ηλικιακές διακυμάνσεις όσον αφορά στη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, η αλλεργία από φουντούκια έχει αναφερθεί ότι είναι η πιο κοινή αλλεργία στην Ευρώπη [37]. Μέχρι σήμερα, έχουν καταχωρηθεί οκτώ αλλεργιογόνα από φουντούκια στη βάση δεδομένων του IUIS (International Union of Immunological Societies). Η αλλεργία στο φουντούκι σχετίζεται κυρίως με την αντίδραση της IgE με την Bet v 1 και την Bet v 2, προκαλώντας συνήθως ήπια συμπτώματα. Τα συστατικά διασταυρούμενης αντίδρασης στο φουντούκι είναι η Cor a 1 (17 kDa, από Bet v 1) και Cor a 2 (14 kDa, από προφιλίνη), και είναι άφθονα τόσο στη γύρη όσο και στους σπόρους [38]. Έχουν περιγραφεί δύο παραλλαγές προφιλίνης φουντουκιού, η Cor a 2.0101 και η Cor a 2.0102. Μεταξύ των ασθενών με αλλεργία από φουντούκια στο 42% παρατηρήθηκε αντίδραση IgE σε rCor a 2. Ενώ, στις μεσογειακές περιοχές, η αλλεργία από φουντούκια συνδέεται κυρίως με την nsLTP, Cora 8 (9 kDa) και σχετίζεται με πιο σοβαρές αντιδράσεις. Τέλος, έχουν βρεθεί και κάποιες πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των λεγουμινών και είναι ικανές να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση [35]. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με τα γνωστά αλλεργιογόνα του φουντουκιού.

Πίνακας 1 Αλλεργιογόνα Φουντουκιού [35]

Allergen	Protein family	Accession No. (Uniprot)	IgE reactivity (% of tested patients)
Cor a 1	Bet v 1-like (PR10)	Q9SWR4	65 of 65 (100%)
		Q9FPK4	310 of 423 (74.3%)
Cor a 2	Profilin	Q9FPK3	83 of 423 (19.6%)
		Q9FPK2	
		Q9AXH5	
Cor a 8	nsLTP	Q9AXH4	48 of 423 (11.3%)
		Q9ATH2	
Cor a 9	Legumin	Q8W1C2	12 of 14 ^a (86%)
			42 of 423 (9.9%)
Cor a 11	Vicilin	Q8S4P9	15 of 423 (3.5%)
Cor a 12	Oleosin	Q84T21	60 of 423 (14.2%)
Cor a 13	Oleosin	Q84T91	
Cor a 14	2S albumin	D0PWG2	25 of 423 (5.9%)

- **Καρύδι**

Η κοινή καρυδιά (*Juglans regia*) ανήκει στην οικογένεια του *Juglandaceae* και καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο, κατά κύριο λόγο στα εύκρατα κλίματα. Οι καρποί της καρυδιάς αποτελούν μέρος μιας υγιούς και ισορροπημένης διατροφής λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και αντιοξειδωτικά. Γενικά, υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την επικράτηση της αλλεργίας από καρυδιές. Στην Ευρώπη, η αλλεργία σε καρυδιές είναι μάλλον χαμηλός με συνολική επίπτωση 2,2% ενώ, στις ΗΠΑ είναι η συχνότερα αναφερθείσα αλλεργία σε ξηρούς καρπούς. Μέχρι τώρα,

έχουν αναγνωριστεί επίσημα επτά αλλεργιογόνα του. Κάποια από αυτά έχουν ταυτοποιηθεί και έχει βρεθεί ότι ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών της 2S αλβουμίνης. Στον παρακάτω πίνακα τα αλλεργιογόνα του καρυδιού [35].

Πίνακας 2 Αλλεργιογόνα καρυδιού [35]

Allergen	Protein family	Accession No. (Uniprot/ GeneBan Nucleotide)	IgE reactivity (% of tested patients)
Jug r 1	2S albumin	P93198	12 of 16 (75%)
			25 of 31 (80.6%)
Jug r 2	Vicilin	Q9SEW4	9 of 15 (60%)
Jug r 3	nsLTP	C5H617	37 of 46 (80%)
Jug r 4	Legumin	Q2TPW5	15 of 23 (65%)
			21 of 37 (57%)
Jug r 5	Bet v 1-like	APD76154.1	5 of 9 (55%)
Jug r 6	Vicilin	XM_018959147.1	19 of 76 (25%)
Jug r 7	Profilin	MG366484	48 of 217 (22%)

- **Πεκάν**

Το πεκάν (*Carya illinoensis*) ανήκει στην οικογένεια των *Juglandaceae* όπως και το καρύδι. Η αλληλουχία των τριών αναγνωρισμένων αλλεργιογόνων του, Car i 1 (2S albumin), Car i 2 (vicilin), and Car i 3 (legumin), παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την αλληλουχία των αντίστοιχων αλλεργιογόνων του καρυδιού γεγονός που εξηγεί την ομοιότητα και των 2 αυτών αλλεργιών [35].

- **Αμύγδαλο**

Το αμύγδαλο είναι ένας καρπός του *Prunus dulcis*, δέντρο από την οικογένεια *Rosaceae*. Είναι ένας από τους πιο συχνά παραγόμενους και

καταναλισκομένους ξηρούς καρπούς στον κόσμο [31]. Η αλλεργία των καρπών αυτών κατατάσσεται στην 4η θέση ανάμεσα στις αλλεργίες των υπόλοιπων ξηρών καρπών. Έχουν αναγνωρισθεί έξι αλλεργιογόνα αμυγδαλού, τέσσερις εκ των οποίων περιλαμβάνονται στον κατάλογο αλλεργιογόνων του IUIS. Συγκεκριμένα στη λίστα υπάρχει το Pru du 3 (nsLTP), το Pru du 4 (προφιλίνη), το Pru du 5 (ριβοσωματική πρωτεΐνη 60S) και Pru du 6 (λεγουμίνη) [35].

- **Κάσιους**

Το κάσιους είναι ο σπόρος του ομώνυμου φυτού (*Anacardium occidentale*), μέλος της οικογένειας *Anacardiaceae*. Τα αλλεργιογόνα του κάσιους μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές αντιδράσεις σε μικρές δόσεις και όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του καταναλισκόμενου καρπού τόσο πιο έντονη και διαρκής είναι η αλλεργία και τα συμπτώματα [39]. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί επίσημα 3 αλλεργιογόνα του, το Ana o 1, πρωτεΐνη τύπου vicilin, το Ana o 2, πρωτεΐνη που μοιάζει με λεγουμίνη, και το Ana o 3, μια 2S αλβουμίνη [35].

- **Φιστίκια**

Τα φιστίκια (*Pistacia vera*) ανήκουν στην ίδια οικογένεια *Anacardiaceae* και εμφανίζουν ομοιότητες με τα κάσιους όσον αφορά στο πρωτεϊνικό προφίλ. Τα αναγνωρισμένα αλλεργιογόνα τους ανήκουν στις οικογένειες πρωτεϊνών των 2S αλβουμίνων (Pis v 1), των λεγουμίνων (Pisv2 και Pisv5) και των βισιλίνων (Pis v 3) [35].

Πίνακας 3 Άλλα επισήμως αναγνωρισμένα αλλεργιογόνα ξηρών καρπών [35]

Allergen	Protein family or function	IgE reactivity % of tested patients
<i>Pecan (Carya illinoensis)</i>		
Car i 1	2S albumin	79% of 25
Car i 2	Vicilin	24% of 25
Car i 4	Legumin	59% of 27
<i>Almond (Prunus dulcis)</i>		
Pru du 3	nsLTP	16% of 31
Pru du 4	Profilin	Rec. 33% of 18 Nat. 44% of 18
Pru du 5	60 s acidic ribosomal prot. P2	6 pooled sera
Pru du 6	Legumin	46% of 13 30% of 13
<i>Cashew (Anacardium occidentale)</i>		
Ana o 1	Vicilin	50% of 20
Ana o 2	Legumin	62% of 21
Ana o 3	2S albumin	81% of 28
<i>Pistachio (Pistacia vera)</i>		
Pis v 1	2S albumin	68% of 28
Pis v 2	Legumin	50% of 28
Pis v 3	Vicilin	36% of 14
Pis v 4	Manganese superoxide dismutase	59% of 27
Pis v 5	Legumin	36% of 28
<i>Brazil nut (Bertholletia excelsa)</i>		
Ber e 1	2S albumin	89% of 9
Ber e 2	Legumin	44% of 27

1.9 Σκοπός εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας νέας μεθόδου ταυτόχρονης ταυτοποίησης και προσδιορισμού εφτά αλλεργιογόνων ξηρών καρπών σε δείγματα σοκολάτας. Οι ξηροί καρποί που επιλέχθηκαν είναι το αμύγδαλο, το αράπικο φιστίκι, το καρύδι, το κάσιους, το πεκάν, το φιστίκι Αιγίνης και το φουντούκι. Η επιλογή δεν ήταν τυχαία μιας και, ο στόχος ήταν η μελέτη ξηρών καρπών που είτε, έχουν ελληνική προέλευση όπως το φιστίκι Αιγίνης είτε, στατιστικά καταναλώνονται σε μεγάλο βαθμό από τους Έλληνες. Στη μελέτη εφαρμόστηκε η τεχνική της υγροχρωματογραφίας φασματομετρίας μαζών, τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) σε θετικό ηλεκτροψεκασμό (ESI).

Συγκεντρωτικά οι στόχοι της έρευνας ήταν:

- η διερεύνηση της παρουσίας των ξηρών καρπών σε δείγματα χωρίς αυτούς, που διατίθενται προς πώληση και κατανάλωση
- η επικύρωση της μεθόδου και τα αξιόπιστα αποτελέσματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 Μέθοδοι για την ανίχνευση αλλεργιογόνων και αλλεργιογόνων συστατικών στα τρόφιμα

Οι αξιόπιστες μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης αλλεργιογόνων τροφίμων είναι απαραίτητες προκειμένου να εξασφαλιστεί η συμμόρφωση με τη νομοθεσία για την επισήμανση των τροφίμων. Ωστόσο, έχουν σχεδιαστεί και αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι για την ανίχνευση των αλλεργιογόνων συστατικών σε τρόφιμα. Ανάλογα με το αλλεργιογόνο που πρέπει να ανιχνευθεί, τη μήτρα τροφίμων και τις τεχνολογικές επεξεργασίες που εφαρμόζονται δεν έχει αναπτυχθεί μέθοδος που να πληροί τους παραπάνω στόχους.

Η επιλογή της μεθόδου απαιτεί πρώτα την ταυτοποίηση και την επιλογή των αναλυτών. Αρκετές μέθοδοι στοχεύουν μια συγκεκριμένη αλλεργιογόνο πρωτεΐνη ή έναν αριθμό αλλεργιογόνων πρωτεϊνών που υπάρχουν στην τροφή (άμεση ανάλυση), ενώ άλλες στοχεύουν στο DNA ως δείκτη του αλλεργιογόνου συστατικού (έμμεση ανάλυση) [16].

Η ανάλυση των πρωτεϊνών συνήθως πραγματοποιείται με ανοσολογικές (κυρίως ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)) και φυσικοχημικές μεθόδους (συγκεκριμένα MS). Η ανάλυση του DNA βασίζεται στην ενίσχυση ειδικών θραυσμάτων DNA μέσω της PCR (Polymerase Chain Reaction) και στη χρήση ειδικών εκκινήτων, οι οποίοι προσδιορίζουν την αλληλουχία του συστατικού του τροφίμου που πρόκειται να ενισχυθεί. Στον Πίνακα 4 φαίνονται οι κυριότερες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αλλεργιογόνων, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 4 Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανάλυση αλλεργιογόνων τροφίμων [16]

Ανάλυση πρωτεϊνών		Ανάλυση DNA
Φυσικοχημικές μέθοδοι	Ανοσολογικές μέθοδοι	Μεσολαβούμενες με PCR μεθόδους
<ul style="list-style-type: none"> • SDS- PAGE • HPLC • Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση MS 	<ul style="list-style-type: none"> • ELISA • Ανοσοκλιδωση • RIE (Reactive-ion etching) • LFD • Dot- blot • Βιοαισθητήρες πρωτεϊνών 	<ul style="list-style-type: none"> • PCR τελικού σημείου • Real- time PCR • Βιοαισθητήρες DNA • DNA microarrays

Οποιαδήποτε δεδομένη αναλυτική μέθοδος χρειάζεται ένα καλά καθορισμένο υλικό αναφοράς και μια αξιόπιστη μέθοδο ανάκτησης. Πρέπει να πληρούνται τα συνήθη κριτήρια της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της ακρίβειας και της πιστότητας (επαναληψιμότητα, ενδιάμεση πιστότητα). Θα πρέπει επίσης, να ληφθεί υπόψη η διασταυρούμενη δραστηριότητα (για τις ανοσοχημικές μεθόδους), οι επιδράσεις της μήτρας και η επεξεργασία τροφίμων [17].

2.1.1 Ανίχνευση αλλεργιογόνων χωρίς να προηγηθεί διαχωρισμός πρωτεϊνών

Η διαδικασία της εκχύλισης (χρησιμοποιώντας διαλύτες και ρυθμιστικά διαλύματα) είναι ένα κρίσιμο στάδιο στην ανάλυση αλλεργιογόνων τροφίμων το οποίο, επηρεάζει σημαντικά την ανάκτηση της μεθόδου. Η εκχύλιση των πρωτεϊνών εξαρτάται από το ισοηλεκτρικό τους σημείο, από την πολικότητα, το pH και τη θερμοκρασία του διαλύτη εκχύλισης, την παρουσία ενδεχομένων παρεμβολών στο τρόφιμο, τη μήτρα τροφίμων και την παραγωγική διαδικασία, έτσι ώστε να μην υπάρχει ένας συγκεκριμένος διαλύτης / ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την εκχύλιση όλων των πρωτεϊνών. Η χρήση ενός αναγωγικού μέσου (π.χ. μερκαπτοαιθανόλης) ή ενός μίγματος χαστροπικών παραγόντων (θειουρία / ουρία) και απορρυπαντικών (π.χ. CHAPS), αν και βελτιώνει τη διαλυτότητα, μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση

της πρωτεΐνης και να παρεμποδίσει την ανίχνευσή της από αντισώματα. Παρακάτω αναφέρονται ανα κατηγορία οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται.

2.1.2 Ανοσολογικές Μέθοδοι

Οι ανοσολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούν αντισώματα για την αναγνώριση συγκεκριμένων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών και μπορούν να εκτελεστούν είτε απευθείας σε ένα μείγμα πρωτεϊνών είτε με προηγούμενο διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι περιλαμβάνουν ELISA, συσκευές πλευρικής ροής (LFD), ράβδους μέτρησης, ανοσοηλεκτροφόρηση πύραυλος (RIE), dot-immunoblotting (dot-blot), μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών και βιοαισθητήρες πρωτεϊνών, οι οποίες είναι ταχείες μέθοδοι διαλογής. Οι τελευταίες μέθοδοι περιλαμβάνουν προκαταρκτικό διαχωρισμό με μονο- ή δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτώματος (1DE ή 2DE SDS-PAGE), HPLC ή τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) των πρωτεϊνών, ακολουθούμενη από ανοσοκλιδωση. Παρακάτω αναπτύσσονται κάποιες από τις πιο γνωστές.

2.1.3 Ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο (ELISA)

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική ανίχνευσης αλλεργιογόνου είναι η ELISA, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση γνωστών αλλεργιογόνων χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Τα "σάντουιτς" και "ELISA ανταγωνιστικής αναστολής" είναι εμπορικά διαθέσιμα, με άμεση και έμμεση ανίχνευση. Στην ELISA σάντουιτς, το αντιγόνο που υπάρχει στο δείγμα τροφίμων δεσμεύεται από ένα ειδικό αντίσωμα ακινητοποιημένο σε μια στερεή επιφάνεια που σχηματίζει ένα σύμπλεγμα Ab-Ag (αντισώματος- αντιγόνου). Το σύμπλοκο αντιδρά με ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για την αναλυόμενη ουσία που είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο, σχηματίζοντας ένα «σάντουιτς» και το ένζυμο αντιδρά με ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα αναπτύσσοντας

χρώμα. Η συγκέντρωση του συμπλέγματος Ab-Ag, μετρούμενη με την απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος, είναι άμεσα ανάλογη με την ποσότητα του αλλεργιογόνου που υπάρχει στο δείγμα (άμεση ανίχνευση).

Στις ανταγωνιστικές ELISA, το αντιγόνο δεσμευμένο στη στερεά φάση ανταγωνίζεται το αντιγόνο τροφίμου που υπάρχει στο δείγμα για σύνδεση με ένα συγκεκριμένο αντίσωμα σε αναλύτη. Εάν δεν είναι διαθέσιμο δεύτερο επισημασμένο ένζυμο, εξειδικευμένο σε αναλύτη-αντίσωμα, χρησιμοποιείται ένα επισημασμένο ένζυμο με ειδικό αντίσωμα (έμμεση ανίχνευση). Η απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος που σχηματίζεται μετά την προσθήκη του υποστρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Οι μέθοδοι ELISA έχουν αυτοματοποιηθεί επιτρέποντας υψηλή απόδοση και ανάλυση ρουτίνας με περιορισμένη ποσότητα αντιδραστηρίων. Είναι γρήγοροι και σχετικά εύκολοι στη χρήση. Η ανάκτηση και η εκλεκτικότητα εξαρτώνται από τον διαλύτη εκχύλισης πρωτεΐνης, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει τη δέσμευση Ag-Ab. Η ευαισθησία είναι καλή, με όριο ανίχνευσης / ορίου ποσοτικοποίησης (LOD/LOQ) στην περιοχή από 0,1 έως 1,5 mg/kg ανάλογα με το αλλεργιογόνο συστατικό και την τροφική μήτρα. Τα αποτελέσματα μπορούν να αναπαραχθούν για το ίδιο kit ELISA και το πλέγμα τροφίμων, ενώ τα αποτελέσματα από διαφορετικά kit μπορεί να αποκλίνουν ανάλογα με την ειδικότητα του αντισώματος και του χρησιμοποιούμενου υλικού αναφοράς (RM) ή του βαθμονομητή [18]. Πολύ σημαντικό για την ποσοτικοποίηση των αλλεργιογόνων είναι η ύπαρξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRM). Τα υλικά αναφοράς που αναπτύσσονται από διάφορους παραγωγούς είναι εμπορικά διαθέσιμα για τα περισσότερα κύρια αλλεργιογόνα τροφίμων. Ωστόσο, τα αναλυτικά αποτελέσματα που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας αυτά τα υλικά αναφοράς (αλλά όχι πιστοποιημένα) ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του αλλεργιογόνου-αντισώματος και τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την απόκτηση αυτών. Η ELISA συνδυάστηκε με άλλες τεχνικές, όπως η φασματομετρία μάζων με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (ICP-MS), προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία και η ακρίβεια της ανάλυσης. Στην ELISA-ICP-MS, το δευτερεύον αντίσωμα είναι επισημασμένο

με σταθερό ισότοπο (Europium), έτσι ώστε το σύμπλοκο Ag-Ab1-Ab2 να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με MS (Mass Spectrometry). Η μέθοδος ήταν ικανή να ανιχνεύσει μικρές ποσότητες φιστικιών (έως περίπου 2 mg/kg) σε μια μήτρα με βάση τα δημητριακά [19].

2.1.4 Βιοαισθητήρες πρωτεϊνών

Οι βιοαισθητήρες βασίζονται σε μια ενσωματωμένη συσκευή μεταγωγέα-υποδοχέα που είναι σε θέση να παρέχει ημιποσοτικά ή ποσοτικά σήματα και παρέχει μια νέα προσέγγιση για την ανίχνευση αλλεργιογόνων. Γενικά, ο υποδοχέας είναι ένα αντίσωμα που δημιουργείται έναντι μιας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, η οποία είναι ακινητοποιημένη πάνω στην επιφάνεια ενός αισθητήρα τσιπ. Διάφοροι βιοαισθητήρες για αλλεργιογόνες πρωτεΐνες έχουν αναφερθεί ότι είναι αρκετά ευαίσθητοι (LOD/LOQ 0,5-2 mg/kg). Οι βιοαισθητήρες είναι γρήγοροι, εύχρηστοι και κατάλληλοι για αυτοματοποίηση και έτσι μπορούν να εφαρμοστούν ως μέθοδοι διαλογής κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας [20].

2.1.5 Αποτελέσματα από Ανοσολογικές Μεθόδους

Το ευρωπαϊκό πρότυπο, σχετικά με την έρευνα για τα αλλεργιογόνα με ανοσολογικές μεθόδους, επιβάλλει τα αποτελέσματα να εκφράζονται ως συνολική ποσότητα αλλεργιογόνου συστατικού ανά χιλιόγραμμο τροφίμου (mg/kg) ή ως συνολική ποσότητα πρωτεΐνης ανά χιλιόγραμμο τροφής, χρησιμοποιώντας έναν κατάλληλο παράγοντα που επιτρέπει τη μετατροπή σε ποσότητα αλλεργιογόνου συστατικού ανά χιλιόγραμμο τροφής. Ωστόσο, είναι δύσκολο να υπολογιστούν οι συντελεστές μετατροπής όταν η σύνθεση του τροφίμου δεν είναι πολύ γνωστή και η ποσότητα πρωτεΐνης ανά χιλιόγραμμο τροφίμου μπορεί να αλλάξει ανάλογα με την προέλευση του συστατικού και μετά από τις τεχνολογικές επεξεργασίες ή το μαγείρεμα. Τα LOD και τα LOQ

εκφράζονται ως επί το πλείστον στη βιβλιογραφία ως χιλιοστόγραμμα αλλεργιογόνου πρωτεΐνης ανά χιλιόγραμμο τροφίμου ή ως mg/L στην περίπτωση υγρών τροφίμων ή σε mg/mL ρυθμιστικού διαλύματος.

2.1.6 Ανίχνευση αλλεργιογόνων με διαχωρισμό πρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών αποτελεί βασικό σημείο για την ανίχνευση των αλλεργιογόνων. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών είναι η SDS-PAGE η οποία διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με τη μοριακή τους μάζα σε σχέση με τη μετανάστευση πρότυπων δεικτών πρωτεΐνης [21]. Μόλις διαχωριστούν οι πρωτεΐνες ενός εκχυλίσματος τροφίμων, μεταφέρονται σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή ενός υδρόφοβου πολυμερούς (π.χ. PVDF) με κηλίδωση (ή εκτύπωση). Η ανίχνευση των ακινητοποιημένων αλλεργιογόνων πραγματοποιείται με επώαση με ένα διάλυμα αντισώματος, συνήθως έναν ανθρώπινο αλλεργικό ορό ή με αντισώματα που δημιουργούνται έναντι των αλλεργιογόνων στα ζώα. Τα αντισώματα που είναι ειδικά για τα ακινητοποιημένα αλλεργιογόνα στη συνέχεια ανιχνεύονται με επώαση της κηλίδας με ένα δεύτερο αντίσωμα επισημασμένο με ένζυμο, ακολουθούμενο από την προσθήκη του υποστρώματος ενζύμου. Για να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα κάθε ανοσοαντιδραστικής πρωτεΐνης, το σημείο που λαμβάνεται από 2DE αποκόπτεται από το πήκτωμα, χωνεύεται με πρωτεολυτικά ένζυμα (π.χ. τρυψίνη) σε πεπτίδια και αναλύονται σε MS.

Το 2D-SDS-PAGE είναι ένα εξαιρετικά ισχυρό εργαλείο για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με παρόμοια μοριακή μάζα. Ωστόσο, υπάρχει ανάγκη για επιβεβαίωση και ταυτοποίηση της πρωτεΐνης εκτός γραμμής (με MS) επίσης, απαιτείται ένας ικανός χειριστής και είναι χρονοβόρα διαδικασία. Ακόμη, έχει ορισμένους περιορισμούς για υδρόφοβες και αλκαλικές πρωτεΐνες ενώ, δεν είναι ποσοτική και δεν είναι κατάλληλη για ανάλυση ρουτίνας.

2.1.7 Ανίχνευση αλλεργιογόνων με ανάλυση DNA

Οι έμμεσες μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA για την αλλεργιογόνο πρωτεΐνη ή τα αλλεργιογόνα τρόφιμα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν οι άμεσες μέθοδοι ανίχνευσης αλλεργιογόνων πρωτεϊνών αποτύχουν (π.χ. τρόφιμα που περιέχουν χαμηλές ποσότητες πρωτεϊνών και επεξεργασμένων τροφίμων με εκτεταμένη τροποποίηση φυσικών πρωτεϊνών). Οι μέθοδοι DNA για την ανίχνευση αλλεργιογόνων μπορούν να θεωρηθούν συμπληρωματικές, των μεθόδων για την ανάλυση πρωτεϊνών, ιδιαίτερα για την ELISA. Ωστόσο, η εκχύλιση DNA από λιπόφιλες μήτρες (π.χ. λίπη και έλαια) με χαμηλές ποσότητες DNA και από πολύπλοκες μήτρες που περιέχουν τασιενεργά και γαλακτωματοποιητές είναι μερικές φορές δύσκολη και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [17]. Η εφαρμογή των τεχνικών αυτών σε διάφορα αλλεργιογόνα τρόφιμα αναλύεται παρακάτω.

2.1.8 Ανίχνευση αλλεργιογόνων με PCR

Οι μέθοδοι DNA βασίζονται στην ενίσχυση ειδικών θραυσμάτων DNA μέσω PCR, η οποία, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμεύουν ως εκκινητές, ενισχύει μόνο το DNA που προέρχεται από την τροφή που έχει προσβληθεί. Ορισμένα τρόφιμα ενδέχεται να περιέχουν ενώσεις που είναι αναστολείς PCR, όπως πολυφαινόλες, έτσι ώστε να είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί μια προκαταρκτική εκχύλιση αυτών των ενώσεων πριν από την ενίσχυση του DNA. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω ακατάλληλης επιλογής των εκκινητών ή της ομοιότητας της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί με άλλα είδη είναι λιγότερο συχνά. Το DNA μπορεί να ενισχυθεί με PCR τελικού σημείου που, ανιχνεύει την παρουσία μιας ειδικής αλληλουχίας DNA, ή με PCR πραγματικού χρόνου, η οποία είναι

ποσοτική, με την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιείται επαρκές υλικό αναφοράς. Οι στοχευμένες αλληλουχίες DNA δεν εντοπίζονται αναγκαστικά στα γονίδια που κωδικοποιούν την αλλεργιογόνο πρωτεΐνη και έτσι η ανάλυση ανιχνεύει γονιδιωματικό DNA του παραβατικού συστατικού αλλά δεν υποδεικνύει απαραίτητα την παρουσία της πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για την αλλεργική αντίδραση. Αρκετά kit PCR είναι εμπορικά διαθέσιμα.

- **Ανίχνευση αλλεργιογόνων σε επεξεργασμένα τρόφιμα**

Οι τεχνολογικές διεργασίες και το μαγείρεμα γενικά, επηρεάζουν τη δομή των πρωτεϊνών, ενώ το DNA είναι πιο ανθεκτικό στις τεχνολογικές επεξεργασίες (δηλαδή το DNA διασπάται μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες ή σε όξινο pH). Η επεξεργασία τροφίμων τροποποιεί επίσης τη μήτρα τροφίμων (π.χ. καταστροφή της δομής των πρωτεϊνών και των κυττάρων, πηκτωματοποίηση, δημιουργία νέων ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών, συσσωματώματα και άλλες υπερμοριακές δομές). Έτσι, η δυνατότητα εξαγωγής της πρωτεΐνης/DNA από τα επεξεργασμένα τρόφιμα μπορεί να είναι είτε ευκολότερη είτε δυσκολότερη από αυτή των πρώτων υλών.

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, η μειωμένη ανιχνευσιμότητα των αλλεργιογόνων από τα επεξεργασμένα τρόφιμα μπορεί να οφείλεται είτε σε χαμηλή απόδοση εκχύλισης είτε σε μειωμένη προσβασιμότητα στα επίτοπα στην ανοσολογική δοκιμασία. Έχουν εξεταστεί αρκετοί ρυθμιστικοί παράγοντες και τρόποι εκχύλισης (συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αναγωγικών μέσων όπως η μερκαπτοαιθανόλη), ανάλογα με τη φύση της πρωτεΐνης (υδρόφιλη/λιπόφιλη) και της μήτρας. Η εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα αύξησε την ομοιογενοποίηση πρωτεϊνών και την εκχύλιση των αλλεργιογόνων από αλεύρι σόγιας και αμύγδαλα. Η απόδοση των διαθέσιμων kit εκχύλισης για ανάλυση DNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μήτρα τροφίμων. Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι οι μέθοδοι με εκχύλιση των πρωτεϊνών είναι προτιμότερη και αποτελεσματικότερη από τις μεθόδους χωρίς [25].

2.1.9 Ανίχνευση αλλεργιογόνων με Φασματομετρία Μάζων

Η φασματομετρία μαζών είναι χρήσιμη όχι μόνο για τον εντοπισμό των αλλεργιογόνων αλλά, και για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίησή τους στα τρόφιμα. Το MS χρησιμοποιείται επί του παρόντος ως μέθοδος επιβεβαίωσης μολονότι, εφαρμόζεται ολοένα και περισσότερο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αλλεργιογόνων. Η φασματομετρία μαζών επιτρέπει τόσο την ταυτοποίηση όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αλλεργιογόνων σε σύνθετα δείγματα τροφίμων ακόμη και σε επίπεδο ιχνοποσοτήτων. Αυτές οι μέθοδοι απαιτούν τη χρήση εξωτερικών ή εσωτερικών προτύπων και βασίζονται στη σύγκριση μεταξύ των εντάσεων σήματος MS του αναλύτη και εκείνων του προτύπου.

Σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τεχνικές, η ανίχνευση των αλλεργιογόνων με LC-MS/MS δεν είναι ακόμα τόσο διαδεδομένη ενώ, ούτε αρκετή βιβλιογραφία υπάρχει που να αναφέρεται στην συγκεκριμένη τεχνική. Ωστόσο, ο εργαστηριακός εξοπλισμός, η ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδου με τη συγκεκριμένη τεχνική και η πρωτοπορία του θέματος, οδήγησαν στην επιλογή του LC-MS/MS για την παρούσα μελέτη.

Κάποιες από τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για την ανίχνευση των αλλεργιογόνων με LC-MS/MS αναγράφονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5 Βιβλιογραφικές πηγές μεθόδων προσδιορισμού αλλεργιογόνων και πρωτεϊνών [23-29]

α/α	Μήτρα	Συνθήκες	Κινητή Φάση	Στατική Φάση	Ιόντα	Ref.
1	Ψωμί, μπισκότα, σάλτσα σαλάτας, κρασί, μαύρη σοκολάτα, δημητριακά, σοκολάτα γάλακτος	Inj: 30 μL t=13 min	Βαθμιδωτή έκλυση [A]: H ₂ O + 0,1% HCOOH [B]: ACN	Phenomenex Kinetex C18	Peanut Hazelnut	[26]
2	Μπισκότα (sugar cookies)	Inj: 5 μL t=35 min	Βαθμιδωτή έκλυση [A]: 99,5% H ₂ O + 0,1% HCOOH [B]: 0,5% CAN + 0,1% HCOOH	Acquity UPLC M-Class trap column C18	Peanut	[27]
3	Αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος και λευκό κρασί	Inj: 2 μL t= 16 min	Βαθμιδωτή έκλυση [A]: H ₂ O + 0.1% HCOOH [B]: ACN + 0.1% HCOOH	Thermo Scientific Hypersil C8 column (1.0 x 100 mm, 5.0 μm) Thermo Scientific Acclaim 120 C18 (3.0 x 10 mm, 5.0 μm particle) Thermo Scientific Acclaim PepMap100 C18 Thermo Scientific Acclaim 120 C18 Thermo Scientific Hypersil C8		[23]
4	Λευκό κρασί	Inj: 10 μL t= 50 min	Βαθμιδωτή έκλυση (A) H ₂ O + 0.1% HCOOH (B) CH ₃ CN + 0.1% HCOOH	Jupiter Proteo C12		[25]
5	Πολτός αβοκάντο	Inj: 8 μL t= 30 min	Βαθμιδωτή έκλυση [A]: H ₂ O + 0.1% HCOOH [B]: ACN + 0.1% HCOOH	Acclaim PepMap C18		[62]
6	Σοκολάτα, σάλτσα ντομάτας, παγωτό και μπισκότα	Inj: 20 μL t= 24 min	Βαθμιδωτή έκλυση [A]: 0.1% HCOOH [B]: ακετονιτρίλιο + 0.1% HCOOH	Acquity BEH130 C18 Waters	Peanut	[28]
7	Μπισκότα πριν και μετά το ψήσιμο	Inj: 5 μL t= 45 min	[A]: 0,1% HCOOH [B]: TFA σε ακετονιτρίλιο	NanoAcquity UPLC BEH130 C18		[24]

2.2 Προτεινόμενη μέθοδος

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς παραπάνω, η υγροχρωματογραφία σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), παρέχει τη δυνατότητα της ταυτόχρονης εξέτασης και ποσοτικοποίησης πολλών πεπτιδίων που είναι υπεύθυνα για τις αλλεργίες [27,28]. Με βάση τη βιβλιογραφία είναι εφικτή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αλλεργιογόνων διαφόρων τροφίμων όπως είναι αυτά των ξηρών καρπών π.χ. φουντουκιού, φιστικιού, αμυγδάλου, πεκάν κλπ. σε αρκετές μήτρες δηλαδή, σε πολλές βάσεις τροφίμων. Στο παρελθόν αντίστοιχες εφαρμογές της μεθόδου έχουν δείξει εξαιρετική ευαισθησία, καλή ανάκτηση και επαναληψιμότητα. Συνεπώς, μπορούμε να βασιστούμε σε αυτήν για αξιόπιστα και γρήγορα αποτελέσματα [23-25].

Η έρευνά που διενεργήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής βασίστηκε στην ανάπτυξη μίας LC-MS/MS μεθόδου για την ανίχνευση αλλεργιογόνων ξηρών καρπών που ευθύνονται για την πρόκληση αλλεργικών αντιδράσεων καθώς, και αλλεργιογόνων ξηρών καρπών που καταναλώνονται καθημερινώς από μεγάλη μερίδα Ελλήνων πολιτών, π.χ. τα φιστίκια, μιας και βρίσκονται σε διάφορα είδη τροφίμων και κυρίως σε σοκολάτες που βρίσκονται στο εμπόριο. Όπως έχει παρατηρηθεί σε αρκετές συσκευασίες τέτοιων προϊόντων τροφίμων, αναγράφεται η πρόταση «ενδέχεται να περιέχουν ίχνη ξηρών καρπών», γεγονός που καθιστά αυτά τα τρόφιμα επικίνδυνα για τους ευαίσθητους καταναλωτές. Ωστόσο, δεν γίνεται λόγος για την ποσότητα, για την βάσιμη και αποδεδειγμένη ύπαρξη αυτών των ξηρών καρπών αλλά, ούτε για το είδος του ξηρού καρπού που ενδέχεται να περιέχουν.

2.3 Πρόταση μεθόδου

APXH: ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών αλλεργιογόνων ξηρών καρπών, αμύγδαλου, αράπικου φιστικιού, καρυδιού, κάσιους, πεκάν, φιστικιού Αιγίνης και φουντουκιού σε τρόφιμα (σοκολάτες και δημητριακά) με LC-MS/MS μετά από τη διάσπαση των πρωτεϊνών και την απομόνωση των σχετικών πεπτιδίων.

Προκατεργασία δείγματος

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία για την ανίχνευση των αλλεργιογόνων των τροφίμων, είναι απαραίτητη η ύπαρξη συγκεκριμένων σταδίων στην πορεία της προκατεργασίας δείγματος. Πιο αναλυτικά, τα βασικά στάδια είναι τα παρακάτω:

1. Απομάκρυνση λίπους του τροφίμου- δείγματος.
2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από το τρόφιμο.
3. Μείωση της «δυναμικής περιοχής» των πρωτεϊνών και εμπλουτισμός των υπό εξέταση πρωτεϊνών ανάλογα με το υπόστρωμα
4. Διάλυση και αφαλάτωση για απομάκρυνση των ιονικών μορφών και των αλάτων εκτός των πρωτεϊνών.
5. Μετουσίωση, αναγωγή, αλκυλίωση και ενζυματική πέψη των πρωτεϊνών (ως ένζυμα συνήθως χρησιμοποιούνται ενδοπρωτεϊνάσες όπως είναι η θρυψίνη, χυμοθρυψίνη)
6. Εμπλουτισμός και καθαρισμός (SPE)
7. Ανάλυση στο LC-MS/MS

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Προκατεργασία Δείγματος - Αναλυτικές Τεχνικές - Πειραματικό Μέρος

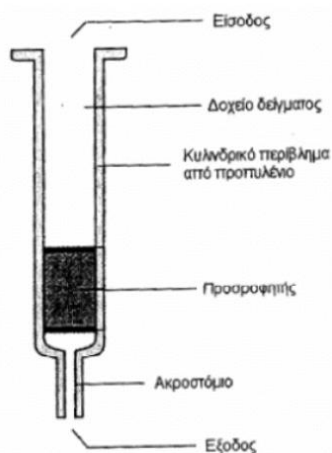
3.1 Προκατεργασία δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), είναι μια τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων έτσι ώστε να είναι σε θέση να αναλυθούν στη συνέχεια με LC-MS/MS, αλλά και άλλα είδη χρωματογραφίας. Περιλαμβάνει μια στατική φάση και μια υγρή φάση. Συγκεκριμένα, η στατική φάση αποτελείται από ένα ακινητοποιημένο υπόστρωμα σε μικρούς κυλινδρικούς σωλήνες με συγκεκριμένη χωρητικότητα που, είναι γνωστά ως φυσίγγια SPE. Αυτή η τεχνική προετοιμασίας των δειγμάτων, βασίζεται στην επιλεκτική προσρόφηση των ουσιών στην στατική φάση οι οποίες, στη συνέχεια επανακτώνται και συλλέγονται χάρη σε κατάλληλους διαλύτες. Η εκχύλιση στερεάς φάσης χαρακτηρίζεται από ευρεία χρήση μιας και βρίσκει εφαρμογή σε περιβαλλοντικές, κλινικές και φαρμακευτικές μελέτες με σκοπό την απομόνωση αναλυτών στα πολύπλοκα δείγματα.

Η SPE στοχεύει στην απόκτηση ενός κλάσματος δείγματος το οποίο θα είναι:

- Καθαρό, δηλαδή θα έχουν απομακρυνθεί οι παρεμποδίζουσες ουσίες που υπάρχουν στη μήτρα.
- Ακίνδυνο για τη χρωματογραφική στήλη. Ο λόγος που είναι απαραίτητο κάτι τέτοιο είναι γιατί, σε πολύπλοκα δείγματα ενδέχεται να υπάρχουν ουσίες, ικανές να υπερφορτώσουν τη στήλη με αποτέλεσμα, να μειώσουν τη διάρκεια ζωής της, καθώς, και να επηρεάσουν την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της εκάστοτε μεθόδου ανάλυσης.
- Συμβατό με τη μέθοδο ανάλυσης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί [39-40].

Σε κάποιες περιπτώσεις, οι αναλύτες βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ακόμα και σε ίχνη, κάτι που δυσκολεύει την ανάλυσή τους μιας και βρίσκονται εκτός γραμμικής περιοχής της χρωματογραφικής μεθόδου που χρησιμοποιείται. Έτσι, σε αυτές τις περιπτώσεις, για να γίνει εφικτή η ανάλυσή τους, είναι αναγκαίο να γίνει προσυγκέντρωση. Η προσυγκέντρωση, γίνεται εξίσου με κατάλληλο διαλύτη.



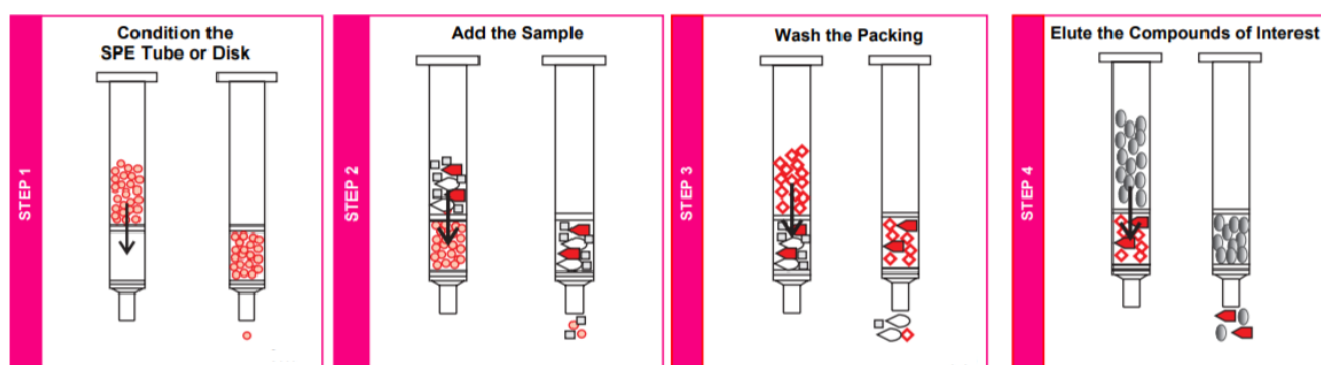
Σχήμα 3 Φυσίγγιο SPE [40].

Υπάρχουν δύο κατηγορίες εκχύλισης στερεάς φάσης: 1) η SPE κατακράτησης και 2) η SPE μη κατακράτησης. Επίσης, και οι δύο κατηγορίες εκχύλισης στερεάς φάσης ακολουθούν συγκεκριμένα στάδια κατά την πραγματοποίησή τους. Στη συνέχεια, παρατίθενται τα στάδια της SPE κατακράτησης.

Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης με κατακράτηση είναι [40]:

1. **Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού.** Συνήθως η ενεργοποίηση γίνεται με μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο αλλά, και με άλλους διαλύτες ενεργοποίησης ανάλογα με το τι θα υποδείξει ο κατασκευαστής. Το όφελος από αυτό το στάδιο είναι διπλής σημασίας μιας και από τη μία, απομακρύνονται οι επιμολύνσεις που, τυχόν να έχει το φυσίγγιο και από την άλλη, γίνεται επιδιαλύτωση του προσροφητικού υλικού. Η περίσσεια διαλύτη ενεργοποίησης απομακρύνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

2. **Προσθήκη δείγματος-Συγκράτηση.** Το δείγμα, που πρόκειται να εισέλθει από το φυσίγγιο, διαλυτοποιείται πρώτα με έναν ασθενή διαλύτη έκλουσης. Για την αντίστροφη φάση SPE, ο διαλύτης μπορεί να είναι νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα με οργανικό διαλύτη έως 10% και βοηθά στην ισχυρή κατακράτηση του αναλύτη. Το δείγμα φορτώνεται με σιφώνια, σύριγγα ή πιπέτες Pasteur και το μέγεθος του πρέπει να σχετίζεται με την χωρητικότητα του προσροφητικού υλικού. Τέλος, η ταχύτητα ροής δεν χρειάζεται να είναι επαναλήψιμη.
3. **Έκπλυση.** Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται έκπλυση της στατικής φάσης με κατάλληλο διαλύτη. Το στάδιο αυτό αποσκοπεί στην απομάκρυνση παρεμποδίζουσών ουσιών. Χρησιμοποιείται διαλύτης μέσης εκλουστικής ισχύος, συνήθως νερό με μέτρια προσθήκη οργανικού διαλύτη.
4. **Έκλυση του αναλύτη.** Αυτό το στάδιο στοχεύει στην ποσοτική παραλαβή του αναλύτη ή των αναλυτών και για αυτόν τον λόγο, χρησιμοποιείται ισχυρό εκλουστικό μέσο το οποίο, πρέπει να είναι συμβατό με τη μέθοδο ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί.



Σχήμα 4 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της εκχύλισης στερεάς φάσης με κατακράτηση [41].

Αντίστοιχα, η εκχύλιση στερεάς φάσης μη κατακράτησης αποτελείται από 3 στάδια:

- **Ενεργοποίηση προσροφητικού υλικού για επιδιάλυτωση και απομάκρυνση των επιμολύνσεων από το φυσίγγιο.**
- **Προσθήκη του δείγματος στο φυσίγγιο.**
- **Έκλυση του αναλύτη με ισχυρό εκλουστικό μέσο.**

Στην περίπτωση της μη κατακράτησης, οι παρεμποδίζουσες ουσίες παραμένουν στην στερεή στατική φάση.

Η κινητήρια δύναμη για να περάσει το δείγμα μέσα από τα φυσίγγια μπορεί να θεωρηθεί η βαρύτητα. Όμως η ροή είναι πολύ μικρή με αποτέλεσμα η εκχύλιση να γίνεται αρκετά αργά και καθίσταται ανεφάρμοστη. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιούνται συσκευές με εφαρμογή πίεσης ή κενού. Σήμερα χρησιμοποιούνται και αυτοματοποιημένες συσκευές, λόγω της αυξημένων απαιτήσεων για επαναληψιμότητα και ευαισθησία, σε περιβαλλοντικούς ελέγχους, στον τομέα των τροφίμων αλλά και στον τομέα της φαρμακοποιίας.



Σχήμα 5 Συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης με κενό (αριστερά) και αυτόματη συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης (δεξιά) [42-43].

Υλικά πλήρωσης: συνήθως, στην SPE χρησιμοποιούνται υλικά όπως είναι η πυριτία (silica, SiO_2), αλουμίνα (alumina, Al_2O_3), τα πυριτικά άλατα μαγνησίου (florisil), ο ενεργός άνθρακας (carbon) καθώς και υδρογονανθρακικές δομές χημικά συνδεδεμένες σε πυριτία (bonded silica).

Για μεγάλο διάστημα, ετών, το πιο διαδεδομένο πληρωτικό υλικό ήταν κυρίως οι υδρογονανθρακικές δομές που είναι χημικά συνδεδεμένες σε πυριτία (bonded silica). Αυτές οι δομές περιλαμβάνουν μεγάλη ποικιλία ειδών με πιο γνωστά είδη αυτό του C₈ και του C₁₈. Η χημικά συνδεδεμένη silica έχει την εικόνα «δάσους» σύμφωνα με την οποία οι αλειφατικές αλυσίδες περιπλέκονται έτσι ώστε να έχει μικρή επιφάνεια και μικρή δραστικότητα. Κατά το στάδιο της ενεργοποίησης, που αναφέρθηκε προηγουμένως, οι αλειφατικές αλυσίδες απελευθερώνονται με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιφάνεια και λόγω αυτού να συγκρατείται ο αναλύτης. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα πληρωτικά υλικά παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα. Πιο αναλυτικά, χαρακτηρίζονται από μικρό εύρος τιμών pH 2-9 καθώς, και από την ύπαρξη υπολειμμάτων από ομάδες σιλανόλης. Επιπρόσθετα, η χρήση τους επιτάσσει μεγάλη προσοχή διότι, δεν πρέπει να στεγνώσουν σε κάποιο ενδιάμεσο μετά την ενεργοποίησή τους. Σε περίπτωση που συμβεί κάτι τέτοιο, οι συνέπειες είναι σημαντικά αρνητικές μιας και, το υλικό πλήρωσης θα απενεργοποιηθεί, θα αλλάξουν σε μεγάλο βαθμό οι ιδιότητές του, θα μειωθεί η ανάκτηση του αναλύτη και θα επηρεαστεί η επαναληψιμότητα.

Μία άλλη κατηγορία υλικών πλήρωσης είναι τα υλικά που βασίζονται στα πολυμερή, όπως Oasis HLB και LiChrolut EN. Ο λόγος που έχουν εδραιωθεί πια σε χρήση έναντι των υλικών, που βασίζονται σε πυριτία, είναι τα σημαντικά τους πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα, τα πολυμερή αποδίδουν σε όλο το εύρος τιμών pH (1-14) και μπορούν να «αντέξουν» διαλύτες και ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία βλάπτουν ή καταστρέφουν τα υλικά πλήρωσης βασισμένα σε πυριτία. Επίσης είναι σφαιρικά (οι υδρογονανθρακικές δομές σε πυριτία οι οποίες είναι ευθύγραμμες) με αποτέλεσμα να έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής συνεπώς, χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη χωρητικότητα αναλύτη. Επίσης, μιας και παρουσιάζουν ταυτόχρονα υδρόφοβο και υδρόφιλο χαρακτήρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό βασικών, ουδέτερων και όξινων ουσιών. Τέλος, αφήνουν το περιθώριο να στεγνώσουν σε οποιοδήποτε από τα τέσσερα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης διότι, δεν παρουσιάζουν μεταβολές στις ιδιότητές τους και δεν επηρεάζουν την ανάκτηση του αναλύτη ούτε την επαναληψιμότητα [44].

3.2 Τεχνικές ανάλυσης και προσδιορισμού ενώσεων (χρωματογραφία)

Χρωματογραφία ονομάζεται η τεχνική η οποία, περιλαμβάνει πληθώρα μεθόδων βάσει των οποίων, γίνεται εφικτός ο διαχωρισμός ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα δείγματα. Συγκεκριμένα, στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα κινείται σε μια κινητή φάση (mobile phase) που, μπορεί να είναι αέριο (αεριοχρωματογραφία, gas chromatography, GC), υγρό (υγροχρωματογραφία, liquid chromatography, LC) ή υπερκρίσιμο ρευστό (χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού supercritical fluid chromatography, SFC). Η κινητή φάση διέρχεται μέσα σε μια στατικής φάσης (stationary phase), ακινητοποιημένη σε μια στήλη ή μια στερεά επιφάνεια. Η επιλογή των δύο αυτών φάσεων είναι αρκετά σημαντική καθώς, τα συστατικά του δείγματος πρέπει να κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων σε διαφορετικό βαθμό. Η κίνηση των συστατικών σχετίζεται με την κατακράτηση τους από τη στατική φάση. Πιο αναλυτικά, σε ισχυρή κατακράτηση, τα συστατικά κινούνται αργά, ενώ σε ασθενή κατακράτηση, τα συστατικά κινούνται πιο γρήγορα. Βάσει αυτής της διαφοράς στην ευκινησία μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος σε ζώνες όπου, κάθε ζώνη καταλαμβάνεται από ένα συστατικό. Εν συνεχεία, τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά [45].

3.2.1 Υγροχρωματογραφία (HPLC)

Ο όρος υγροχρωματογραφία αφορά όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού σε επίπεδη επιφάνεια ή στήλη όπου, η κινητή φάση είναι υγρό. Μια γνωστή τεχνική που οδηγεί στον διαχωρισμό και την ανάλυση χημικών μειγμάτων αυτής της κατηγορίας είναι η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Η HPLC χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ουσιών. Όπως αναφέρθηκε ήδη, η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση είναι στερεή ή

υγρή ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Η τεχνική αυτή βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στον προσδιορισμό πληθώρας ουσιών όπως, είναι τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, οι υδρογονάνθρακες, οι υδατάνθρακες, τα φυτοφάρμακα, τα αντιβιοτικά καθώς και άλλες κατηγορίες ενώσεων. Έτσι, τέτοιες αναλύσεις πραγματοποιούνται σε έρευνες συνθετικής χημείας, μεταβολικών μελετών, χημείας τροφίμων και ανάλυσης περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Ουσιαστικά στην HPLC ο διαχωρισμός ενός μίγματος ουσιών επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με την κινητή και τη στατική φάση με αποτέλεσμα, ο χρόνος έκλουσης της κάθε ουσίας από τη στήλη να είναι διαφορετικός. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με τις φάσεις έχουν να κάνουν με το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα. Ανάλογα με την κατηγορία των ενώσεων που, πρόκειται να διαχωριστούν, χρησιμοποιούνται και διαφορετικά είδη χρωματογραφίας. Αυτά τα είδη διαφέρουν μεταξύ τους στον μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και τις δύο φάσεις.

Η εκτίμηση της αποδοτικότητας ενός χρωματογραφικού συστήματος καθορίζεται από διάφορα ποσοτικά μεγέθη, τα πιο σημαντικά από αυτά είναι [45-47] :

- Ο **αριθμός των θεωρητικών πλακών**, N και το ύψος της θεωρητικής πλάκας, H .
- Η **διαχωριστική ικανότητα** της στήλης, R_s , αποτελεί ποσοτικό μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει δύο προσδιοριζόμενες ουσίες.

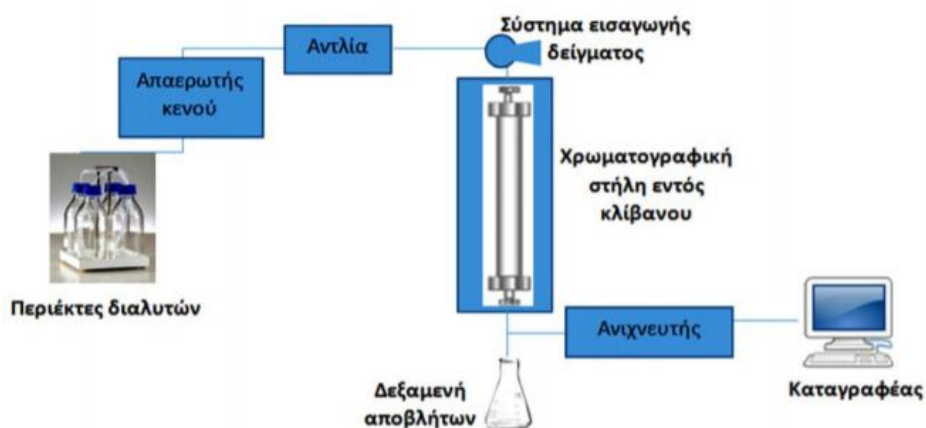
Πλήρη διαχωρισμό μεταξύ δύο ουσιών έχουμε όταν το R_s είναι ίσο με 1,5.

- Η **ασυμμετρία** των χρωματογραφικών κορυφών.

3.2.2 Οργανολογία της HPLC

Η οργανολογία της HPLC θεωρείται πιο πολύπλοκη και πιο δαπανηρή σε σχέση με την οργανολογία των υπόλοιπων ειδών χρωματογραφίας. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι οι υψηλές πιέσεις που απαιτούνται για να αναπτυχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής του υγρού έκλουσης.

- Η βασική διάταξη της υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελείται από συγκεκριμένα τμήματα και τα πιο σημαντικά παρατίθενται παρακάτω [45]:
- δοχεία κινητής φάσης και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών,
- συστήματα άντλησης,
- συστήματα έκχυσης δείγματος,
- στήλες υδροχρωματογραφίας
- ανιχνευτές



Σχήμα 6 Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγρής χρωματογραφίας HPLC [48].

Υδροχρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης

Η υδροχρωματογραφία κατανομής είναι ο πιο διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος υδροχρωματογραφίας και διακρίνεται σε δύο βασικές υποκατηγορίες βάσει της πολικότητας της κινητής και της στατικής φάσης:

1. Υγροχρωματογραφία κανονικής φάσης όπου, η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή και περιέχει ομάδες συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3 . Η κινητική φάση αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο και χλωροφόρμιο.

2. Υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed-Phase Liquid Chromatography, RP). Σε αυτή, η στατική φάση, είναι λιγότερο πολική της κινητής συνήθως από οξειδίο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά. Από την άλλη πλευρά, η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό [41].

Στατική φάση

Η στατική φάση αποτελείται συνήθως από αλυσίδες υδρογονανθράκων χημικά συνδεδεμένες πάνω σε ένα υλικό πλήρωσης το οποίο, αποτελείται συνήθως από σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου. Τα σωματίδια του διοξειδίου του πυριτίου συνδέονται μεταξύ του με γέφυρες οξυγόνου δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα πλέγμα στην επιφάνεια του οποίου, υπάρχουν ελεύθερες σιλανολικές ομάδες ($-\text{SiOH}$). Οι σιλανολικές ομάδες αντιδρούν με ένα οργανοχλωριωμένο σιλάνιο με αποτέλεσμα να προκύπτει μια χημικά συνδεδεμένη στατική φάση. Συνήθως η ομάδα R είναι το κανονικό δεκαοκτύλιο (C18), και οι μακριές αλυσίδες του υδρογονάνθρακα ευθυγραμμίζονται παράλληλα η μία προς την άλλη και κάθετα προς την επιφάνεια του σωματιδίου, δίνοντας δομή ψήκτρας[45].

Κινητή φάση

Οι πιο συνήθεις διαλύτες στην υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι πολικοί. Πιο αναλυτικά, η κινητή φάση συνήθως αποτελείται από μείγματα νερού ή ρυθμιστικά υδατικά διαλύματα με διάφορους οργανικούς διαλύτες αναμίξιμους με το νερό, όπως είναι η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το διμεθυλοφορμαμίδιο, το διοξάνιο και το τετραϋδροφουράνιο. Η σύσταση της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης καθορίζει την έκλυση. Συγκεκριμένα εάν η σύσταση διατηρείται σταθερή έχουμε ισοκρατική έκλυση ενώ, αν έχουμε μεταβαλλόμενη σύσταση έχουμε βαθμιδωτή έκλυση [45].

3.3 Φασματομετρία μαζών - τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου

Φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μαζών είναι η αναλυτική τεχνική η οποία παρέχει με πολύ μεγάλη ακρίβεια τη μάζα των μορίων που, περιέχονται, ακόμα και σε πολύ μικρές ποσότητες, στο δείγμα το οποίο, προορίζεται για ανάλυση. Επιπλέον, η δυνατότητά της να παρέχει την ακριβή σύσταση των μορίων, αυξάνει την ακρίβεια της ανάλυσης. Είναι μία τεχνική που βρίσκει εφαρμογή τόσο σε μικρά μόρια (δραστικές ουσίες φαρμάκων, περιβαλλοντολογικοί ρύποι κ.α.) δηλαδή, σε φαρμακευτικές και περιβαλλοντικές αναλύσεις καθώς, και σε μεγαλύτερα μόρια όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, DNA και άλλα βιολογικά μακρομόρια που, έχουν να κάνουν με αναλύσεις διατροφικών δειγμάτων κυρίως. Πιο αναλυτικά, η φασματομετρία μαζών ονομάζεται μια ευρύτερη οικογένεια τεχνικών ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων αλλά, και προσδιορισμού της δομής και η λειτουργία της βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων/μορίων ή στην ιοντική θραυσματοποίηση των μορίων και την καταγραφή της αντίστοιχης έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μαζών προς φορτίο (m/z) [41].

Η φασματομετρία μαζών παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια και απαντάται ολοένα και περισσότερο σε διάφορες χρήσεις και εφαρμογές. Συγκεκριμένα, παρέχει πληροφορίες σχετικά με [41]:

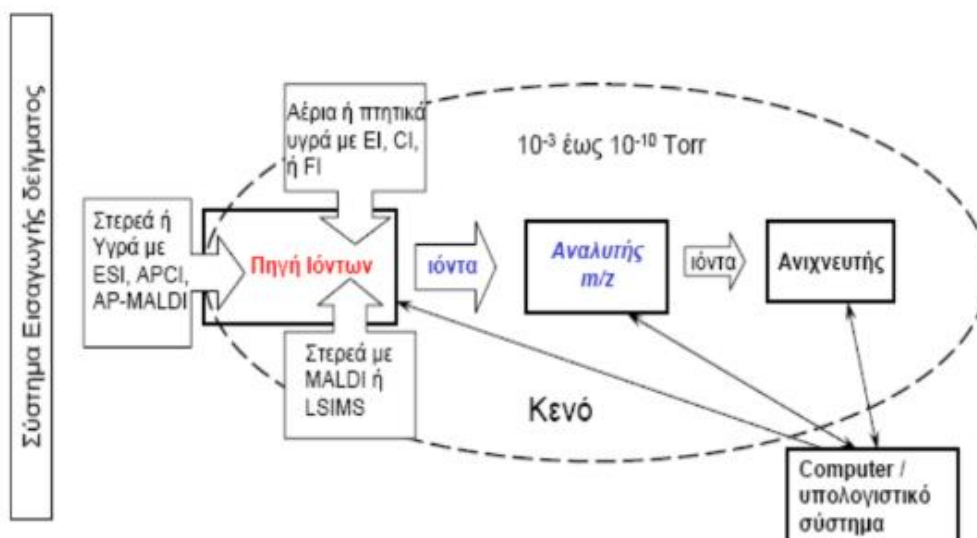
- Τη στοιχειακή σύσταση του δείγματος.
- Τις δομές ανόργανων, οργανικών, οργανομεταλλικών και βιολογικών μορίων.
- Την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων.
- Τη δομή και σύσταση επιφανειών.
- Την αναλογία ισοτόπων ατόμων στα δείγματα.

Οργανολογία και αρχή λειτουργίας φασματομέτρου μαζών

Η βασική δομή ενός φασματοφωτομέτρου μαζών είναι (Σχήμα 7):

- i. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- ii. Πηγή ιόντων
- iii. Αναλυτή μαζών
- iv. Σύστημα ανίχνευσης των ιόντων
- v. Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων

Επιπρόσθετα, στα φασματομέτρα μαζών υπάρχει και ένα πολύπλοκο σύστημα παραγωγής κενού που βοηθά στη διατήρηση της πίεσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλα τα τμήματά του.



Σχήμα 7 Σχηματική παρουσίαση λειτουργίας MS [41].

Στο πρώτο βήμα του ιοντισμού και της διάσπασης, μικροποσότητα δείγματος εισάγεται στην πηγή ιόντων μέσω του σημείου εισόδου. Εν συνεχεία, οι ενώσεις του δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα στην αέρια φάση έπειτα από τον βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, φωτόνια ή μόρια που υφίστανται. Έπειτα, ρεύμα θετικών ή αρνητικών ιόντων σε αέρια κατάσταση εξέρχεται και στη συνέχεια, επιταχύνεται προς τον αναλυτή μαζών. Ο διαχωρισμός των ιόντων αυτών επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών τιμών m/z . Η ύπαρξη του κενού είναι άκρως αναγκαία και σημαντική μιας και αποτρέπει την σύγκρουση των ιόντων με οποιαδήποτε άλλη μορφή της ύλης καθ' όλη τη διάρκεια του διαχωρισμού. Τέλος, τα ιόντα με το διαφορετικό που έχουν διαχωριστεί, ανιχνεύονται με τη δημιουργία του φάσματος μαζών [45, 41, 53].

3.4 Πηγές ιόντων

Ένα από τα πιο βασικά στάδια της φασματομετρίας μαζών είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αέριου αναλύτη μιας και η τεχνική παραγωγής ιόντων επηρεάζει τη μορφή του φάσματος μαζών. Οι πηγές ιόντων διακρίνονται σύμφωνα με τα παρακάτω.

Πηγές αέριας φάσης (το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται):

1) πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI)

2) χημικού ιοντισμού (CI)

Πηγές εκρόφησης (το δείγμα, σε υγρή ή στερεά κατάσταση μετατρέπεται σε αεριώδη ιόντα):

1) ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI)

2) βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB),

3) ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (API) (ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI))

Στη συγκεκριμένη μελέτη και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, η πηγή ιόντων που χρησιμοποιήθηκε είναι η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization, ESI). Το ESI ανήκει στις πηγές εκρόφησης και συγκεκριμένα στην

κατηγορία ιοντισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση και είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πηγή ιοντισμού στα LC-MS/MS.

3.4.1 Ηλεκτροψεκασμός (ESI)

Η μέθοδος του ηλεκτροψεκασμού είναι μία τεχνική ιοντισμού που βρίσκει εφαρμογή σε πληθώρα μορίων (πολικών, μετρίως πολικών και θερμικά ασταθών). Εφαρμόζεται συχνά διότι, χαρακτηρίζεται από πολλά πλεονεκτήματα αφού, δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό μοριακού βάρους χωρίς περιορισμό στη μάζα. Επίσης, έχει καλή ευαισθησία, εύκολη ποσοτικοποίηση και συνδυάζεται με τεχνικές όπως η υγροχρωματογραφία και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.

Ο ηλεκτροψεκασμός χρησιμοποιείται κυρίως σε μεθόδους σύζευξης της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών. Η τεχνική βασίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο, κατά τον ψεκασμό ενός υγρού σε ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα, αυτό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες. Επίσης, να σημειωθεί ότι ο ηλεκτροψεκασμός παρέχει καλές αποδόσεις που χαρακτηρίζονται από υψηλές ευαισθησίες [49,54-55].

Κατά τον ηλεκτροψεκασμό και με τη βοήθεια ενός τριχοειδούς σωλήνα, το υγρό ψεκάζεται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο πολλών Volts και μετατρέπεται σε πολλές φορτισμένες σταγόνες οι οποίες, δημιουργούν ένα νέφος. Έπειτα, οι φορτισμένες σταγόνες περνούν μέσα από ένα τριχοειδές, ο αναλύτης εξατμίζεται και τα περιεχόμενα μόρια του φορτίζονται. Για να επιτευχθεί όλη αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη η συμβολή ενός αερίου (auxiliary gas), συνήθως αζώτου που, περνά γύρω από το τριχοειδές και βοηθά στην εξατμηση του διαλύτη. Επίσης, σημαντικό είναι και το εκνεφωτικό αέριο (sheath gas) που και πάλι χρησιμοποιείται το άζωτο το οποίο, ελευθερώνεται υπό πίεση γύρω από την άκρη του τριχοειδούς διευκολύνοντας τη σχάση του κώνου [45].

Πιο αναλυτικά, το διάλυμα του δείγματος εισέρχεται σε μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα με ταχύτητα ροής της τάξης των $\mu\text{L}/\text{min}$ και ανάμεσα στο τριχοειδές και στο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 3-6 kV και με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ηλεκτρικό πεδίο που, χάρη σε αυτό αναπτύσσεται συσσώρευση φορτίου στην επιφάνεια του υγρού λόγω των ηλεκτραπωθητικών δυνάμεων. Το φορτίο θα είναι είτε θετικό είτε αρνητικό και εξαρτάται από τον τρόπο ιοντισμού. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται ο “κώνος του Taylor”. Με την αύξηση του δυναμικού, το διάλυμα που σχηματίζει τον κώνο του Taylor ξεπερνά το όριο Rayleigh, δηλαδή εκεί που, η πίεση από τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων εξισορροπείται από την επιφανειακή τάση του διαλύματος με συνέπεια ο κώνος να υφίστανται σχάση και να παράγονται φορτισμένα σταγονίδια. Επίσης, ενδέχεται, να υπάρξει σχάση και πριν από το όριο Rayleigh, δημιουργώντας ένα νέο κώνο Taylor από τον οποίο, απελευθερώνονται μικροσωματίδια.

Εκνέφωση έχουμε όταν σχηματίζονται σταγονίδια και εκδιώχνονται στην περιοχή της αποδιαλύτωσης. Η σταθερή και η αποτελεσματική εκνέφωση εξαρτάται από το μέγεθος της διαφοράς δυναμικού του συστήματος. Συγκεκριμένα, με την αύξηση του δυναμικού μειώνεται το μέγεθος των σταγονιδίων και αποκτούν οριζόντια κίνηση. Η ολοκλήρωση της αποδιαλύτωσης των ιόντων επιτυγχάνεται αφού, τα σταγονίδια συνεχίσουν να χάνουν μόρια διαλύτη και το ηλεκτρικό πεδίο στην επιφάνεια γίνει αρκετά μεγάλο. Η διάσπαση των συσσωματωμάτων βοηθούν στον αποτελεσματικότερο και αποδοτικότερο ιοντισμό. Σε αυτήν τη διάσπαση βοηθά η ύπαρξη αερίων γύρω από την άκρη του τριχοειδούς. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, υπάρχει άζωτο (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) για την εξάτμιση του διαλύτη και αέριο άζωτο υπό πίεση που απελευθερώνεται γύρω από την άκρη του τριχοειδούς (εκνεφωτικό αέριο, sheath gas) για τη σχάση του κώνου [56]. Παρά την ευρεία χρήση υπάρχει ένα βασικό και σημαντικό μειονέκτημα του ηλεκτροψεκασμού. Αυτό είναι η εξάρτησή του τις πειραματικές συνθήκες και το φαινόμενο της μήτρας. Επίσης, άλλοι παράγοντες όπως, αστάθεια ροής, θόρυβος υποστρώματος, σύσταση της κινητής φάσης και ουσίες του δείγματος επηρεάζουν το σήμα

στο ESI, άλλες φορές αναστέλλοντας το και άλλες φορές καταστέλλοντας το [57-58,63].

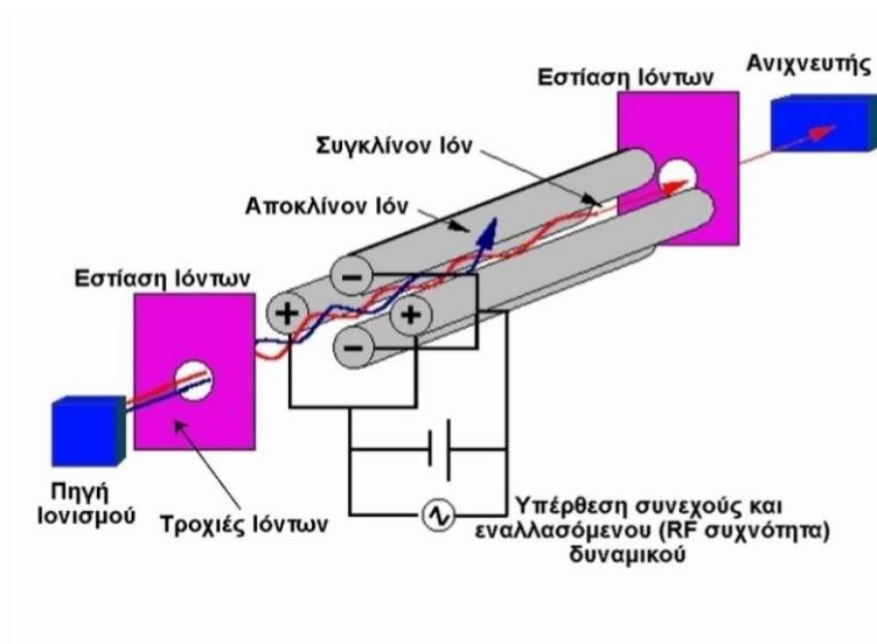
3.5 Αναλυτές Μαζών

Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Το ιοντικό ρεύμα που καταγράφεται οφείλεται σε ένα μόνο (m/z) κάθε στιγμή. Οι αναλυτές μαζών χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες: συνεχείς αναλυτές μαζών (τετραπολικός αναλυτής μαζών ή Quadrupole , αναλυτές μαγνητικού τομέος ή magnetic sector) και παλμικούς αναλυτές μαζών (τετραπολική παγίδα ιόντων ή IT, αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης ή TOF, αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με σχηματισμό Fourier ή FTICR) [49].

Κατά τον προσδιορισμό των αλλεργιογόνων των τροφίμων και συγκεκριμένα των ξηρών καρπών στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε τετραπολικός αναλυτής και πιο ειδικά, τριπλό τετράπολο.

3.5.1 Τετραπολικός αναλυτής μαζών

Αποτελεί μία από τις νεώτερες και διαδεδομένες μεθόδους διαχωρισμού μαζών λόγω, του κόστους σε σχέση με αυτήν του μαγνητικού φίλτρου μαζών. Παρέχει απλά φάσματα ωστόσο, έχει χαμηλή διακριτική ικανότητα ($\sim 1\text{Da}$). Ο διαχωρισμός μαζών επιτυγχάνεται με την υπέρθεση ενός εναλλασσομένου ηλεκτρικού πεδίου έχοντας συχνότητα στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (RF, radio frequency) σε ένα συνεχές (DC) ηλεκτρικό πεδίο. Το DC-RF πεδίο εφαρμόζεται σε τέσσερις παράλληλες ράβδους [59-60].



Σχήμα 8 Τετραπολικός ανιχνευτής μαζών (quadrupole mass) [59].

Πλεονεκτήματα [49] :

- αξιοπιστία
- κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση
- κατάλληλος για χρωματογραφία
- μεγάλη ταχύτητα σάρωσης
- φθηνός
- μέτριες απαιτήσεις κενού
- δυνατότητα για MS/MS
- σύζευξη με πηγές ιονισμού AP

Μειονεκτήματα [49]:

- χαμηλή διακριτική ικανότητα
- περιορισμένο εύρος m/z
- χαμηλή ευαισθησία σε υψηλή διακριτική ικανότητα

3.5.2 Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (Tandem MS) με τεχνολογία τριπλού τετραπόλου

Οι λειτουργίες που πραγματοποιούνται κατά την τεχνική της Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (Tandem MS) είναι οι εξής:

- διαχωρισμός των μαζών των αναλυόμενων ενώσεων
- απομόνωση της μάζας της επιθυμητής ένωσης
- διάσπαση της σε θραύσματα
- σάρωση της μάζας των θραυσμάτων
- προσδιορισμός των μαζών των θραυσμάτων

Το τριπλό τετράπολο (QqQ) είναι συνδυασμός τριών τετραπόλων σε σειρά. Η συσκευή αποτελείται από τρία ζεύγη ράβδων τετραπόλου σε σειρά. Το δεύτερο ζεύγος ράβδων λειτουργεί σαν κυψελίδα συγκρούσεων και όχι σαν συσκευή διαχωρισμού μαζών όπως θα περιμέναμε. Τα θραύσματα των ιόντων εκπέμπονται από το πρώτο ζεύγος των τετραπολικών ράβδων και περνούν στη συνέχεια από το δεύτερο τετράπολο. Τέλος, μόνο συγκεκριμένα από τα παραγόμενα ιόντα θα διέλθουν από τα τρίτο τετράπολο. Αυτό ελέγχεται από την ρύθμιση της εκπομπής των ζευγών των ραβδών και έτσι περιορίζονται σε διέλευση συγκεκριμένων τιμών m/z [45,49].



Σχήμα 9 Διάταξη τριπλού τετραπόλου [49].

Στην περίπτωση όπου, το τριπλό τετράπολο δρα ως απλός αναλυτής, τα δύο πρώτα τετράπολα ρυθμίζονται έτσι ώστε να χρησιμεύουν μόνο στην εστίαση

της δέσμης των ιόντων με αποτέλεσμα, ο διαχωρισμός να πραγματοποιείται στον τρίτο τετράπολο. Ωστόσο, το βασικότερο είναι η θραυσματοποίηση με περίσσεια αδρανούς αερίου (Ar, He ή N₂) στο δεύτερο τετράπολο. Έπειτα, ο διαχωρισμός γίνεται στο τρίτο τετράπολο ενώ, ο ανιχνευτής συμβάλλει στην ανίχνευση [49].

Συνεπώς, στη διαδοχική φασματομετρία μαζών, το δεύτερο τετράπολο λειτουργεί σαν κυψελίδα συγκρούσεων (Collision Cell) σε λειτουργία "RF-only", όπου τα ιόντα συγκρούονται με περίσσεια αδρανούς αερίου παράγοντας προϊόντα ιόντα (products). Η θραυσματοποίηση των ιόντων γίνεται μέσω συγκρούσεων και περιγράφεται από τη θεωρία Collision Induced Dissociation (CID) ή Collision Activated Dissociation (CAD). Κατά τη CID, επιλεγμένα ιόντα συγκρούονται με αέρια ουδέτερα μόρια.

3.5.3 Σύζευξη της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές σε εργαστήρια αναλύσεων χάρη στη δυνατότητά της να προσδιορίζει μη-πτητικές ενώσεις, θερμοευαίσθητες ενώσεις (που δεν προσδιορίζονται με GC-MS) αλλά, και λόγω της καθαρότητας της χρωματογραφικής κορυφής ενώ, παρέχει και τη δυνατότητα της ταυτόχρονης ανάλυσης και ταυτοποίησης άγνωστων ενώσεων στο δείγμα.

Όπως γίνεται αντιληπτό, ο συνδυασμός των τεχνικών επιλέγεται λόγω, της μεγάλης εκλεκτικότητας σε δείγματα που χαρακτηρίζονται από περίπλοκες μήτρες μιας και, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ουσιών με βάση τον χρόνο ανάρτησης ενώ στη συνέχεια, ταυτοποιούνται με τα (m/z), καθώς αυτές εισέρχονται διαχωρισμένες στο MS [45,49].

3.6 Πειραματικό μέρος

Έπειτα, από βιβλιογραφική αναζήτηση πάνω στο θέμα των αλλεργιογόνων βρέθηκαν αρκετές εργασίες και δημοσιεύσεις που έχουν ασχοληθεί με τον προσδιορισμό των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών. Η παρούσα εργασία βασίστηκε στην εργασία των M. Planque, T. Arnould, M. Dieu, P. Delahaut , P. Renard, N. Gillard που αναφέρεται στα πλεονεκτήματα της ultra HPLC-MS/MS για τον προσδιορισμό ποικίλων τροφικών αλλεργιογόνων σε πολύπλοκα δείγματα τροφίμων και μητρών διότι, είναι εύκολη η εφαρμογή της βάσει του εξοπλισμού που παρέχει το εργαστήριο που πραγματοποιείται η ερευνητική μελέτη [28].

3.6.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Σύστημα υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών-Τριπλό Τετράπολο (LC-MS/MS, LC-QQQ)

Για την ανίχνευση των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών των ξηρών καρπών στους ξηρούς καρπούς και σε τρόφιμα χρησιμοποιήθηκε το Thermo UHPLC Accela με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμό (ESI). Το σύστημα και τα μέρη του απεικονίζονται στην παρακάτω φωτογραφία.

Αναλυτικά τα μέρη του συστήματος του LC-MS/MS:

1. Φασματόμετρο μαζών με τρία τετράπολα (triple stage quadrupole analyzer) TSQ Quantum Access
2. Αντλία υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης Accela Pump UHPLC, δύο εμβόλων και δυνατότητας βαθμιδωτής έκλυσης τεσσάρων διαλυτών
3. Αυτόματος δειγματολήπτης: Accela Auto sampler με ενσωματωμένο θερμοστάτη σιγλών

4. Γεννήτρια Αζώτου Peak Scientific
5. Φιάλη αερίου αργού
6. Λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων: Xcalibur Data System (2.0 SR2, TSQ14, SUR1, LCquan 2.5, XReport 1.0)

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη ZORBAX Eclipse Plus C18 600 bar (Agilent Technologies, USA) διαστάσεων 2.1 x 100 mm, 1.8 μm.

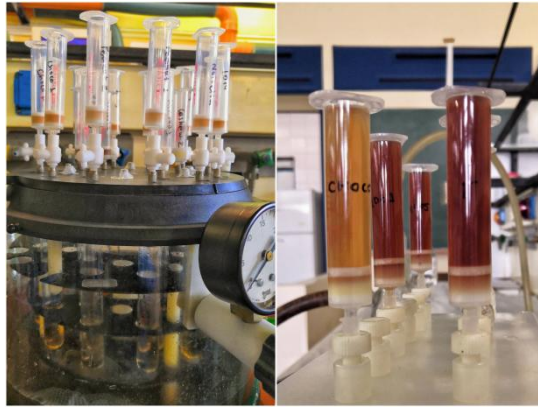


Σχήμα 10 Υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών με τριπλό τετράπολο (LC-MS/MS) της Thermo Scientific Quantum.

- Εργαστηριακός εξοπλισμός

Συσκευές:

1. Συσκευή παραγωγής υπερκάθολου νερού ειδικής αντίστασης 18.2 MΩ/cm (Millipore Direct-Q, UV)
2. Διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Santorius-Basic)
3. Συσκευή Ανάδευσης (Vortex mixer-Stuart)
4. Συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (Vac-Velp Scientifica)



Σχήμα 11 Συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης.

5. Πεχάμετρο (MQ30d, HACH)
6. Θερμαινόμενη πλάκα με υποδοχείς δοκιμαστικών σωλήνων για εξάτμιση (Bloblock, Scientific, BAIN A, SEC 86207)
7. Γεννήτρια αζώτου για εξάτμιση δειγμάτων (Alliance)

Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη:

- Φίλτρα για τη διήθηση των δειγμάτων, Millipore Glass fibre 0,7 μm
- Φίλτρα σύριγγας για τα ανασυσταμένα δείγματα, RC Membrane filters 0,22 μm

Τα γυαλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Ογκομετρικές φιάλες των 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000 mL
- Ποτήρια ζέσης των 50, 250 mL
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10, 25, 50, 100 mL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL
- Φίλτρα 0,20 μm (Macherey-Nagel, Germany)
- Vials των 1,5 mL (GRACEALLTECH) με προτρυπημένα καπάκια
- Inserts των 250 μL

Επιπλέον:

- Πλαστικοί αποστειρωμένοι ουροσυλλέκτες των 150 mL (Sterile A, Deltalab, Barcelona)
- Φυσίγγια εκχύλισης στερεάς φάσης Strata-X 33 µL Polymeric Reversed Phase 200 mg/ 6 mL (6 mL, PHENOMENEX U.S.)
- Πλαστικά erpendorf των 2 mL
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur
- Πλαστικές σύριγγες με έμβολο
- Πλαστικά tips για τις πιπέτες

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες μεταβλητού όγκου 10-100 µL, 20-200 µL (Gilson) 100-1000 MI για τον εμβολιασμό των δειγμάτων και την Παρασκευή των αντιδραστηριων.

3.6.2 Αντιδραστήρια-Διαλύτες

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, διθειοθρεϊτόλη, DL-Dithiothreitol $\geq 98\%$ (HPLC), $\geq 99,0\%$ (titration), το ιωδοακεταμίδιο, Iodoacetamide $\geq 99\%$ (NMR) crystalline $\geq 99\%$, η θρυψίνη, Trypsin from porcine pancreas lyophilized powder, Type II-S, 1,000-2,000 units/mg dry solid, η ουρία, Urea BioUltra, for molecular biology, $\geq 99\%$ (T) και tris(υδροξυμέθυλ)αμμινομεθάνιο (tris) ή Trizma base, Trizma® base, Primary Standard and Buffer, $\geq 99,9\%$ (titration), crystalline, αγοράστηκαν από τη Sigma- Aldrich.

Το ακετονιτρίλιο (acetonitrile, ACN) (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση στερεάς φάσης καθώς και, το ακετονιτρίλιο (acetonitrile, ACN) (LC-MS, υψηλού βαθμού καθαρότητας στον διαλύτη έκλουσης αγοράστηκαν από τη Merck. Το μυρμηκικό οξύ (formic acid, FA) HPLC 98% βαθμός καθαρότητας, αγοράστηκε από την Sigma Aldrich (Fluka, Germany) και η μεθανόλη (methanol, MeOH) LC-MS 99% βαθμός καθαρότητας, το δυμέθυσουλφοξείδιο (DMSO) analytical reagent grade από Fischer

Chemicals και το διπτανθρακικό αμμώνιο (ammonium bicarbonate, 99% for analysis) από την Acros Organics, και το εξάνιο, (n-Hexane) από Riedel-de Haën.

Το νερό (ultrapure H₂O) που χρησιμοποιήθηκε ήταν από συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού ειδικής αντίστασης 18,2 MΩ/cm.

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση με το τριπλό τετράπολο είναι υψηλού βαθμού καθαρότητας.

Να σημειωθεί στον σημείο αυτό πως, όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν με την πρέπουσα προσοχή και διαχείριση έτσι ώστε, να αποφευχθεί οποιαδήποτε αρνητική επίπτωση λόγω πιθανής αρνητικής επίδρασης τους. Σημαντική και απαραίτητη ήταν και η χρήση του απαγωγού όταν αυτός χρειαζόταν αλλά, ακολουθήθηκαν και όλοι οι κανόνες ορθής χρήσης και εργασίας του εργαστηρίου.

3.6.3 Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη δε χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες αλλά, ξηροί καρποί αράπικου φιστικιού, αμυγδάλου, καρυδιού, κάσιους, πεκάν, φιστικιού Αιγίνης και φουντουκιού που αγοράστηκαν από τοπικά μαγαζιά. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και Πιστοποιημένα Υλικά Αναφοράς (Certified Reference Material) CRM Almonds (RFM1010-), CRM Hazelnuts (RFM1015-), CRM Peanut (RFM1017-), CRM Walnuts (RFM1012) από την FOOD ALLERGENS LABORATORY (Cyprus). Τέλος, έγινε χρήση και προϊόντων σοκολατοποιίας όπως, κουβερτούρες, σοκολάτες υγείας και γάλακτος με αμύγδαλα (ION), σοκολάτες με φουντούκι (ION NOISETTA) και σοκολάτες με αράπικο φιστίκι (SNICKERS) που αγοράστηκαν από τοπικά μαγαζιά τροφίμων.

3.6.4 Παρασκευή αντιδραστηρίων

1. TRIZMA BASE

- 200 mM Tris(HCl) Base (trizma base) στα 100 mL H₂O
- $C = 0,2 \text{ M}$, $V = 0,1 \text{ L}$, $MW = 121,14 \text{ g/mol}$ $m = 2,4228 \text{ g}$
- 2 M Urea στα 100 mL H₂O
- $C = 2 \text{ M}$, $V = 0,1 \text{ L}$, $MW = 60,06 \text{ g/mol}$, $m = 12,012 \text{ g}$
 - Παρασκευή διαλύματος:
- Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL εισάγονται 2,4228 g Trizma Base και 12,012 g ουρίας, αραιώνονται σχεδόν μέχρι τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό και το pH ρυθμίζεται με προσθήκη διαλύματος HCl σε τιμή 9,2. Έπειτα, την επίτευξη του επιθυμητού pH το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τη χαραγή.

2. Ιωδοακεταμίδιο (IAA) 500 mM IAA

$C = 0,5 \text{ M}$, $V = 0,1 \text{ L}$, $MW = 184,96 \text{ g/mol}$, $m = 9,248 \text{ g}$

3. Διθειοθρεϊτόλη 200 mM DTT

$C = 0,2 \text{ M}$, $V = 0,1 \text{ L}$, $MW = 154,25 \text{ g/mol}$, $m = 3,085 \text{ g}$

4. Θρυψίνη στα 10 mL

0,01g θρυψίνης σε 10 mL H₂O + 30μL οξικού οξέος

5. Διπτανθρακικό Αμμώνιο (Ammonium Bicarbonate) 200 mM

$C = 0,2 \text{ M}$, $V = 0,1 \text{ L}$, $MW = 79,06 \text{ g/mol}$, $m = 9,248 \text{ g}$

3.7 Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αλλεργιογόνων αράπικου φιστικιού και ξηρών καρπών με LC-MS/MS.

3.7.1 Εισαγωγή

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας μεθόδου υγροχρωματογραφίας, με διαδοχική φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) τριπλού τετραπόλου με προγραμματισμένη παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (MRM), για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση αλλεργιογόνων 7 γνωστών και σημαντικών ξηρών καρπών και ουσιών που η κατανάλωσή τους είναι αρκετά διαδεδομένη στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης και ανίχνευσης αλλεργιογόνων πεπτιδίων από αμύγδαλα, αράπικα φιστίκια, καρυδιών, κάσιους, πεκάν, φιστικιών Αιγίνης και φουντουκιών. Όλες οι ουσίες προσδιορίστηκαν με θετικό ιοντισμό (+) ESI. Ωστόσο, στο πρώτο στάδιο η ανάπτυξη περιορίστηκε στο αράπικο φιστίκι μιας και είναι ο ξηρός καρπός με τη μεγαλύτερη ερευνητική εφαρμογή και βιβλιογραφία.

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου βελτιστοποιήθηκαν: η διαδικασία της προκατεργασίας των δειγμάτων (ποσότητες αντιδραστηρίων και χρόνοι), ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός (θερμοκρασία, αέρια κλπ).

Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τα παρακάτω χαρακτηριστικά ποιότητας: γραμμικότητα, πιστότητα, ανιχνευσιμότητα (όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)).

3.7.2 Προκατεργασία Δείγματος

Στο πρώτο στάδιο του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε καθαρό ξηρό καρπό με σκοπό να βρεθούν τα κατάλληλα ιόντα για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών και των αντίστοιχων πεπτιδίων τους, όπως επίσης και να σχεδιαστεί, να ελεγχθεί και να εξεταστεί η απόδοση και η εκλεκτικότητα της μεθόδου. Το πρωτόκολλο της προκατεργασίας χωρίζεται σε τέσσερα στάδια, εκχύλιση, πέψη, καθαρισμός με SPE και ανάλυση με uHPLC-MS/MS.

Στο σημείο αυτό αξίζει να επισημανθεί ότι τα πρώτα στάδια και η μέθοδος βασίστηκαν στον ξηρό καρπό του αράπικου φιστικιού. Ο λόγος που επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος ξηρός καρπός είναι ότι υπάρχει πληθώρα πληροφοριών σε αντίθεση με τους υπόλοιπους ξηρούς καρπούς, αρκετή βιβλιογραφία καθώς και, ποικιλία προϊόντων που το περιέχουν. Στη συνέχεια, η μέθοδος εφαρμόστηκε και σε ξηρούς καρπούς αμυγδάλου, καρυδιού, κάσιους, πεκάν, φιστικιού Αιγίνης και φουντουκιού.

- **Εκχύλιση πρωτεϊνών**

Συγκεκριμένα, ζυγίζονται 2 g από τον κάθε καλά αλεσμένο ξηρό καρπό ή το αλεσμένο τρόφιμο που επιθυμούμε να αναλύσουμε σε φυγοκεντρικό κύλινδρο των 50 mL. Όπου χρειάζεται, πραγματοποιείται θέρμανση του δείγματος για ομογενοποίηση. Έπειτα, γίνεται απομάκρυνση του λίπους με προσθήκη 3 mL εξαίνιου, φυγοκέντρωση στα 4000 rpm για 5 min και απόχυση του υπερκείμενου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 mL 200 mM Trizma Base (διάλυμα 1). Οι φυγοκεντρικοί αφήνονται να αναδευτούν στον αναδευτήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min. Έπειτα, οι φυγοκεντρικοί με το περιεχόμενό τους τοποθετούνται στους υπέρηχους για 15 min σε θερμοκρασία 4 °C με χρήση πάγου καθώς με αυτόν τον τρόπο αποτρέπεται η καρβαμιδομεθυλίωση με την ουρία ενώ, ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 10 min στη θερμοκρασία που έχουν αμέσως μετά τους υπέρηχους.

- **Ενζυματική πέψη**

Εν συνεχεία, για την πραγματοποίηση της ενζυματικής πέψης λαμβάνονται 10 mL από το υπερκείμενο υγρό και μεταφέρονται σε καθαρό φυγοκεντρικό κύλινδρο των 50 mL και σε αυτόν προστίθενται άλλα 10 mL διπτανθρακικού αμμωνίου 200 mM (διάλυμα 5) καθώς, και 1 mL 200 mM DTT (διάλυμα 3). Τα δείγματα με τους φυγοκεντρικούς επωάζονται για 45 min σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 20 °C έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αναγωγή των πρωτεϊνών. Το επόμενο στάδιο της προκατεργασίας είναι αυτό της αλκυλίωσης των πρωτεϊνών με την προσθήκη 2 mL IAA 500 mM (διάλυμα 2) και επώαση των δειγμάτων για 45 min στους 20 °C στο σκοτάδι. Το τελευταίο στάδιο της ενζυματικής πέψης πραγματοποιείται με προσθήκη 1 mL θρυψίνης (διάλυμα 4) συγκέντρωσης 1 mg/mL σε 50 mM οξικού οξέως και επώαση για 16 ώρες στους 37 °C. Μετά το πέρας των 16 ωρών η αντίδραση των πρωτεϊνών με τη θρυψίνη διακόπτεται με προσθήκη 300 μ L 20% μυρμηκικού οξέως. Μετά την πέψη το μίγμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 5' για να είναι σε θέση να περάσουν από τη διαδικασία του καθαρισμού.

- **Καθαρισμός με SPE**

Τα πεπτιδία που έχουν προκύψει από την ενζυματική πέψη καθαρίζονται με φυσίγγια SPE Strata-X 33 μ m polymeric reversed phase 200 mg/ 6 mL. Η ενεργοποίηση της SPE επιτυγχάνεται αφού διοχετευτούν 18 mL ακετονιτριλίου και στη συνέχεια, για την εξισορρόπηση διοχετεύονται 18 mL μυρμηκικού οξέος 0,1%. Έπειτα, η φόρτιση πραγματοποιείται με 20 mL από το υπερκείμενο των δειγμάτων που προέκυψε από την ενζυματική πέψη. Ακολουθεί καθαρισμός με 18 mL μυρμηκικού οξέος και η έκλυση των πρωτεϊνών γίνεται αρχικά με 1,8 mL ακετονιτριλίου/ μυρμηκικού οξέος 0,1 % (30:70 v/v) και εν συνεχεία, με 3,6 mL ακετονιτριλίου/ μυρμηκικού οξέος 0,1 % (80:20 v/v).

- **Εξάτμιση και ανασύσταση τελικού διαλύματος**

Τα εκλούσματα τοποθετούνται σε ρεύμα αζώτου στους 40 °C έτσι ώστε να εξατμιστεί το εκλουστικό μέσο. Να σημειωθεί ότι, πριν την εισαγωγή του ρεύματος αζώτου στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν εκλουσμένες πρωτεΐνες με το εκλουστικό έχουν προστεθεί 30 μ L DMSO για να μην

πραγματοποιηθεί εξάτμιση έως ξηρού. Μετά την εξάτμιση, στα δείγματα γίνεται ανασύσταση σε 1 mL μυρμηκικού οξέος 0,01%.

- **Προσδιορισμός αλλεργιογόνων**

Μετά την ανασύσταση το διάλυμα που προκύπτει φιλτράρεται με φίλτρα Chromafil 15 mm και μέγεθος πόρων 0,20 μm και στη συνέχεια, αραιώνονται 1:1 (v/v) με μυρμηκικό οξύ 1% σε τελικό όγκο 1 mL στα vials, αναδεύονται και είναι έτοιμα να εισέλθουν στο υγροχρωματογραφικό σύστημα. Το χρωματογράφημα διαρκεί 24 λεπτά και ο όγκος της ένεσης είναι 10 μL. Ακολουθείτε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης. Η κινητή φάση είναι A: μυρμηκικό οξύ 0.1% και B: ακετονιτρίλιο οξινισμένο με 0,1% μυρμηκικό οξύ και ροή 200 μL/min. Τα στάδια της βαθμιδωτής έκλουσης και οι χρωματογραφικές συνθήκες φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6 Στάδια βαθμιδωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	Μυρμηκικό οξύ 0,1% (%)	Ακετονιτρίλιο οξινισμένο με 0,1% μυρμηκικό οξύ	μL/min
0,00	86,0	14,0	200,0
1,00	86,0	14,0	200,0
16,50	60,0	40,0	200,0
16,50	0,0	100,0	200,0
21,00	0,0	100,0	200,0
21,10	86,0	14,0	200,0
24,00	86,0	14,0	200,0

3.7.3 Εύρεση πρόδρομων και προϊόντων ιόντων αράπικου φιστικιού

Η εύρεση των κατάλληλων ιόντων πραγματοποιήθηκε με loop injection σε ροή κινητής φάσης, ώστε να ανιχνευθούν τα ιόντα, τα θραύσματά και οι συνθήκες του οργάνου για τους 7 ξηρούς καρπούς, όπως αναφέρθηκαν και παραπάνω. Η μετέπειτα ταυτοποίηση τους πραγματοποιήθηκε μέσω της βιβλιογραφίας και του προγράμματος SKYLINE που χρησιμοποιείται σε μελέτες πρωτεομικής (proteomics) όπως, αναλύονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων στη συνέχεια.

- ΜΗΤΡΙΚΑ ΙΟΝΤΑ ΚΑΙ ΘΡΑΥΣΜΑΤΑ

Για τη μελέτη των αλλεργιογόνων δεν υπάρχουν πρότυπες ουσίες, και για τον λόγο αυτόν, είναι αναγκαία η χρήση ενός προγράμματος, στην περίπτωση μας του SKYLINE, για την ταυτοποίηση της προέλευσης των ιόντων και των θραυσμάτων τους. Πιο αναλυτικά και σύμφωνα με τις οδηγίες του AOAC για κάθε ξηρό καρπό χρειάζονται δύο πρωτεΐνες και κάθε πρωτεΐνη θα ταυτοποιηθεί από δύο πεπτίδια της και το κάθε πεπτίδιο από τα δύο πιο άφθονα θραύσματά του. Το SKYLINE είναι μια εφαρμογή που βοηθά στην ανάπτυξη στοχευμένων πρωτεομικών μεθόδων (proteomics) καθώς, και στην ποσοτική ανάλυση δεδομένων [26]. Επιπλέον, το SKYLINE υποστηρίζει τη χρήση και τη δημιουργία βιβλιοθηκών φασμάτων MS / MS από μια μεγάλη ποικιλία πηγών για την επιλογή SRM και την επαλήθευση των αποτελεσμάτων με βάση προηγούμενα δεδομένα που αφορούν τα ιόντα. Η SKYLINE εξάγει τις λίστες των ιόντων και των θραυσμάτων που προέρχονται από τα γνωστά τριπλά τετράπολα της Agilent, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific και Waters, συνδέοντας άψογα το αποτέλεσμα του φασματομέτρου μαζών στο πειραματικό έγγραφο [49].

Έτσι, αφού έγινε η εύρεση των ιόντων των πεπτιδίων, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το SKYLINE, μέσω ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών πρωτεϊνών, και προκύψανε τα παρακάτω ιόντα και θραύσματα τους που ταυτοποιούν τις πρωτεΐνες όπως αναγράφονται στους Πίνακες 7-10 [50-52].

Πίνακας 7 Πρόδρομα ιόντα και τα προϊόντα του για το αράπικο φιστίκι όπως βρέθηκαν πειραματικά.

	Ξηρός Καρπός	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Tube Lens (V)	Προϊόν ιόν 1 (m/z) (Θ 1)	Προϊόν ιόν 2 (m/z) (Θ 2)	Χρόνος Ανάσχεσης Rt (s)
1	Αράπικο φιστίκι (Arachis hypogaea)	703,3	149	226,4	488,2	10 ±0,4
2		577,7	139	400,80	369,10	9,30±0,50
3		695,4	146	299,80	977,2	8,7±0,4
4		699	123	172,60	216,60	13±0,8
5		863,3	158	1049,9	660,5	8,6±0,4

Πίνακας 8 Τα ιόντα που επαληθεύτηκαν για το αράπικο φιστίκι μέσω SKYLINE

α/α	α/α	Ξηρός Καρπός	Πρωτεΐνη	Πεπτίδιο	Rt (s)	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Προϊόν ιόν(m/z)	Collision Energy (eV)
1		Αράπικο φιστίκι (Arachis hypogaea)	Glycinin O82580_ARAHY Gene: Ara h 3	R.NALFVAHYNTNA HSIYRL.L	10	703,3	226,4 I[y ³⁻]	29
							488,2 N[y ⁸]	24
2			Glycinin O82580_ARAHY Gene: Ara h 3	R.SPDIYNPQAGSLK .T	8,7	695,4	299,8 D[b ³]	32
							977,2 Y[y ⁹]	26
3			Conglutin-7 CONG7_ARAHY Gene: Ara h 2	R.CCNELNEFENNQ R.C	9,3	577,7	400,8 N[z ³]	33
		286,1 Q[z ²]					31	
4		Conglutin-7 CONG7_ARAHY Gene: Ara h 2	R.CCNELNEFENNQ R.C	8,6	863,3	1049,9 N[y ⁸]	20	
						660,3 E[y ⁵]	18	
5		Albumin seed storage protein P93198_JUGRE Gene: Jug r 1.0101	R.DLPNECGISSQR. C	4,1	688	476,68 S[y ⁴]	25	
						646,67 G[y ⁶]	30	

Πίνακας 9 Πρόδρομα ιόντα και τα προϊόντα του για όλους τους ξηρούς καρπούς όπως βρέθηκαν πειραματικά.

α/α	Ξηρός Καρπός	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Tube Lens (V)	Προϊόν ιόν 1 (m/z) (Θ 1)	Προϊόν ιόν 2 (m/z) (Θ 2)	Χρόνος Ανάσχεσης Rt (s)
1	Αράπικο φιστίκι (<i>Arachis hypogaea</i>)	703,3	149	226,4	488,2	10 ±0,4
2		577,7	139	400,80	369,10	9,30±0,50
3		695,4	146	299,80	977,2	8,7±0,4
4		699	123	172,60	216,60	13±0,8
5		863,3	158	1049,9	660,5	8,6±0,4
6	Αμύγδαλο (<i>Prunus dulcis</i>)	687,0	150	748,33	634,76	14,3±0,4
7		662	151	170,36	182,30	16,2±0,3
8		900	167	713,35	712,21	4,6±0,5
9		1124	190	1016,66	224,72	13,1±0,5
10		765	152	953,64	952,46	12,7±0,4
11	Καρύδι (<i>Juglans</i>)	688	144	476,68	646,67	4,1±0,4
12		698	145	476,68	281,27	4,2±0,4
13		727	109	646,99	211,71	14,7±0,3
14	Κάσιους (<i>Anacardium occidentale</i>)	609	116	614,33	226,89	4,4±0,3
15		846	115	339,19	611,14	12,5±0,2
16		905	97	339,19	611,14	12,5±0,2
17		654	147	772,65	901,96	9,0±0,2

18	Πεκάν (<i>Carya illinoensis</i>)	667	129	894,36	859,49	3,0±0,4
19		872	160	374,72	659,08	12,6±0,4
20		896	109	310,60	282,12	3,00±0,4
21	Φιστίκι Αιγίνης (<i>Pistachia vera</i>)	896	161	325,84	386,64	10,9±0,2
22		713	127	1010,67	182,63	13,7±0,4
23		775	95	1065	901,8	6,7±0,1
24		665,4	130,94	224,28	85	8,6±0,3
25	Φουντούκι (<i>Corylus avellana</i>)	720,9	86	1012,75	310,98	9,1±0,2
26		583	122	809,72	253,97	8,8±0,2
27		968	190	227,78	794,17	9,9±0,2
28		514	157	486,58	616,06	3±0,01

Πίνακας 10 Τα ιόντα που επαληθεύτηκαν για όλους τους ξηρούς καρπούς μέσω SKYLINE

α/α	Ξηρός Καρπός	Πρωτεΐνη	Πεπτιδίο	Rt(s)	Πρόδρομο ión (m/z)	Προϊόν ión(m/z)	Collision Energy (eV)
1	Αράπικο φιστίκι (Arachis hypogaea)	Glycinin O82580_ARAHY Gene: Ara h3	R.NALFVAHYNTNAHSIIYRL.L	10	703.3	226.4 I[y³⁻]	29
						488.2 N[y⁸]	24
2		Glycinin O82580_ARAHY Gene: Ara h3	R.SPDIYNPQAGSLK.T	8.7	695.4	299.8 D[b³]	32
						977.2 Y[y⁹]	26
3		Conglutin-7 CONG7_ARAHY Gene: Ara h 2	R.CCNELNEFENNQR.C	9,3	577,7	400,8 N[z³]	33
286,1 Q[z²]	31						
4	Conglutin-7 CONG7_ARAHY Gene: Ara h 2					R.CCNELNEFENNGR.C	8,6
		660,3 E[y⁵]	18				
5	Albumin seed storage protein P93198_JUGRE Gene: Jug r 1.0101	R.DLPNECGISSQR.C	4,1	688	476,68 S[y⁴]	25	
					646,67 G[y⁶]	30	

6	Καρύδι (Juglans)	Albumin seed storage protein P93198_JUGRE Gene: Jug r 1.0101	R.GEEMEEMVQSAR.D	4,2	698	186,85 E[b²] 281,27 V[y⁵]	35 42
7		Non-specific lipid transfer protein type 1 Jug r 3 Gene: Jug r 3.0101	R.AEVQVVDNFGQTVFDDEL.R.E	14,7	727	646,99 D[y⁵] 211,71 D[z⁵]	33 44
8		Vicilin-like protein B3STU4_CARIL Car i 2.0101 Gene: pec2a1a	R.NFLAGQNNIINQLER.E	12,6	872	374,72 N[b⁷] 659,08 N[y⁵]	32 25
9	Φιστίκι Αιγίνης (Pistachia vera)	Vicilin-like protein B3STU4_CARIL Car i 2.0101 Gene: pec2a1a	R.QLQEMDVLVNYAEIK.R	3,00	896	310,60 Y[y⁵]	50
10		Pis v 1 allergen 2S albumin B7P072_PISVE Pis v 1.0101	K.LQELYETASELPR.M	6,7	775	1065 Y[y⁹] 901,80 E[y⁸]	25 29

11	Φουντούκι (Corylus avellana)	Pis v 2.0101 allergen 11S globulin precursor B7P073_PISVE Pis v 2.0101	K.TNGLSQTSQLAGR.V	8,6	665,4	130,94 G[x²] 224,28 S[a⁵]	36 54
12		Pis v 5.0101 allergen 11S globulin precursor B7SLJ1_PISVE Pis v 5.0101	R.ITSLNSLNLPIK.W	13,7	713	1010,67 N[y⁹] 697,36 N[y⁶]	23 23
13		11S globulin-like protein Q8W1C2_CORAV Cor a 9.0101	R.INTVNSNTLPVLR.W	9,1	720,9	1012,75 N[y⁹] 310,98 L[b¹²]	24
14		11S globulin-like protein Q8W1C2_CORAV Cor a 9.0101	R.LNALEPTNR.I	3	514	486,58 P[y⁴] 616,06 E[y⁵]	17
15		11S globulin-like protein Q8W1C2_CORAV Cor a 9.0101	R.VQVDDNGNTVFDDEL.R.Q	9,9	968	227,78 Q[b²] 794,17 F[y⁶]	31

3.7.4 Βελτιστοποίηση παραμέτρων φασματομετρίας μαζών (MS/MS)

Ο ηλεκτροσπασμός είναι η τεχνική ιοντισμού που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό όλων των αλλεργιογόνων των ξηρών καρπών και εφαρμόστηκε θετικός ιοντισμός επίσης, για όλα τα αλλεργιογόνα. Παρόλα αυτά, για να καταλήξουμε στις καλύτερες συνθήκες, που οδηγούν σε κορυφές με μεγαλύτερη ένταση και πιο καθαρά χρωματογραφήματα, είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση των διαφόρων παραμέτρων στο φασματόμετρο μαζών καθώς και η εύρεση των μητρικών και θυγατρικών ιόντων. Η πηγή ιόντων, που επιλέχθηκε, μπορεί να παρέχει ιόντα των ενώσεων που επιθυμούμε να αναλύσουμε, στην υγρή φάση και μετέπειτα, να τα μετατρέψει σε ιόντα στην αέρια φάση, με εφαρμογή υψηλής τάσης κατάλληλης πολικότητας (θετικής ή αρνητικής).

Από την άλλη πλευρά, για τον προσδιορισμό των μητρικών και των θυγατρικών ιόντων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική SRM (selected Reaction Monitoring) τεχνική η οποία, αποτελεί βασική και χρήσιμη λειτουργία των συστημάτων LC-MS/MS για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Με βάση αυτήν την τεχνική, καθίσταται δυνατή η ταυτόχρονη παρακολούθηση της θραυσματοποίησης πολλαπλών (επιλεγμένων) μητρικών ιόντων και καταγραφής του σήματος των αντίστοιχων θυγατρικών ιόντων τους, χρησιμοποιώντας τους λόγους m/z κάθε ένωσης, για την ταυτοποίησή τους. Συγκεκριμένα, στο πρώτο τετράπολο επιλέγονται τα μητρικά ιόντα, στο δεύτερο τετράπολο αυτά τα μητρικά ιόντα θραυσματοποιούνται, στο τρίτο τετράπολο πραγματοποιείται η ανίχνευση των θραυσμάτων αυτών. Κάθε χημική ουσία χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο μητρικό και θυγατρικό ή θυγατρικά ιόντα αλλά και, από συγκεκριμένο χρόνο ανάσχεσης (t_R). Συνεπώς, ο συνδυασμός αυτών των πληροφοριών αρκεί για την ταυτοποίηση των ουσιών.

Για την διαδικασία επιλογής SRM έγιναν πειράματα απευθείας έγχυσης εκχυλισμάτων πεπτιδίων ξηρών καρπών που έχουν υποστεί την προκατεργασία που έχει αναφερθεί (loop injection), χωριστά για τον κάθε

ξηρό καρπό, στο φασματόμετρο μαζών, χρησιμοποιώντας μια συνδεδεμένη αντλία σύριγγας.

Στη συνέχεια η κάθε ένωση μελετήθηκε έτσι ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων για την πηγή ιοντισμού, τους ιοντικούς φακούς και τις παραμέτρους του τριπλού τετραπόλου.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

- η θέση του ακροσωλήνιου ιοντισμού (probe),
 - η τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού (spray voltage),
 - οι παροχές του αερίου εκνέφωσης (N₂) (sheath gas),
 - οι παροχές του αερίου ξήρανσης (N₂) (auxiliary gas)
- η θερμοκρασία του αγωγού μεταφοράς των ιόντων από τον κώνο εισόδου στο εσωτερικό του φασματομέτρου (Ion transfer capillary temperature)

Δύο χαρακτηριστικές μεταπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ένωση για την παρακολούθησή της. Η πλέον άφθονη μετάπτωση (πρόδρομο / προϊόν ιόν I) χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση και η δεύτερη μετάπτωση (πρόδρομο / προϊόν ιόν II) για την ταυτοποίηση.

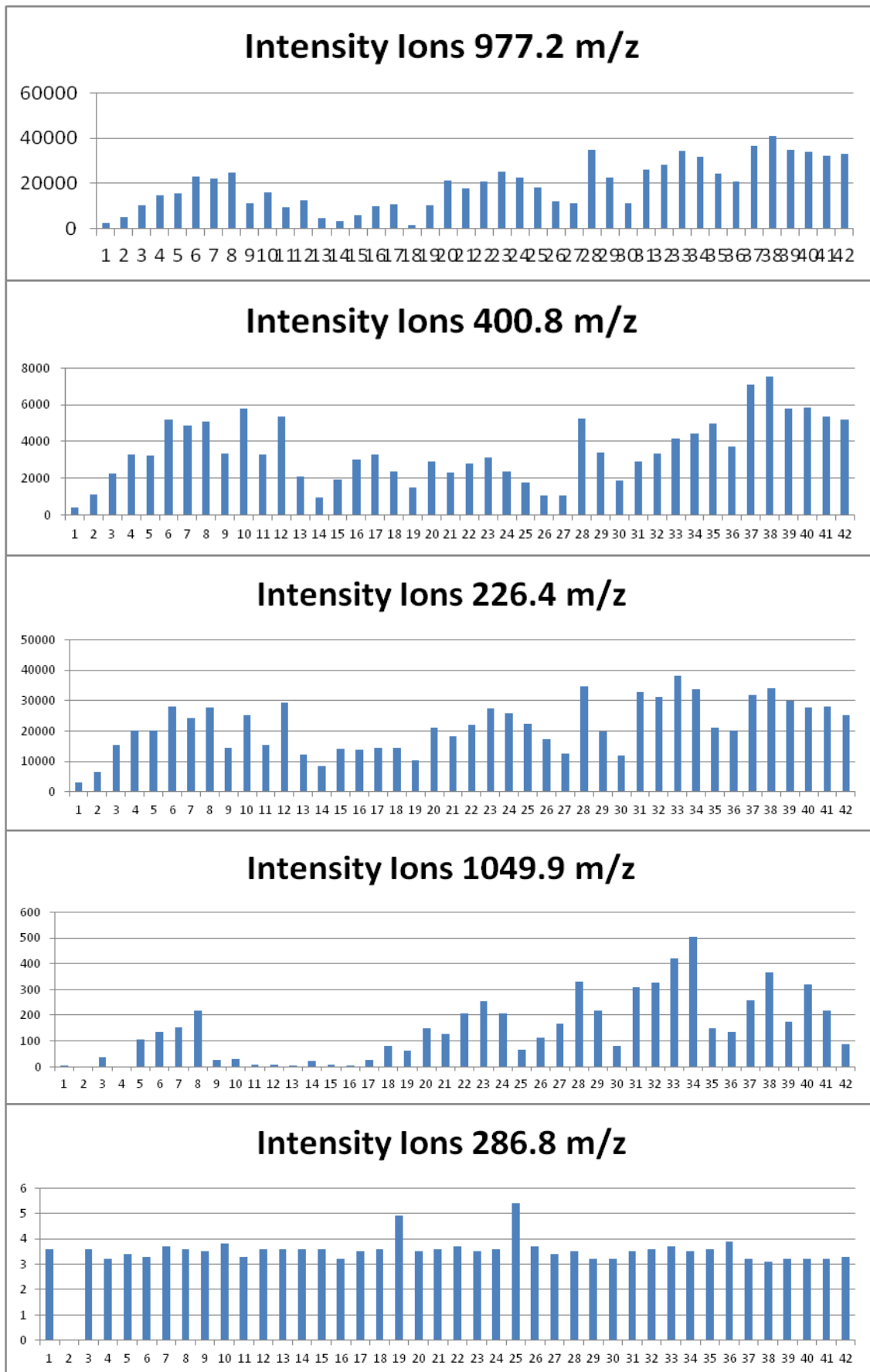
Όλες οι παράμετροι του MS/MS προσδιορίστηκαν και βελτιστοποιήθηκαν με πειράματα απευθείας έγχυσης (loop injection), των εκχυλισμάτων πεπτιδίων του αράπικου φιστικιού. Με την τεχνική loop injection βρέθηκαν τα μητρικά και θυγατρικά ιόντα. Επιλέχθηκαν τα δυο θραύσματα με το ισχυρότερο σήμα και χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο SRM. Όλοι οι ξηροί καρποί είχαν υποστεί την ίδια προκατεργασία και την ίδια αραιώση 1:1 με μυρμηκικό οξύ 0,1%. Στον Πίνακα 11 φαίνονται οι πληροφορίες των παραμέτρων που βελτιστοποιήθηκαν και στο Σχήμα 17 τα αποτελέσματα των εντάσεων με τη μορφή ραβδογραμάτων.

Πίνακας 11 Παράμετροι Βελτιστοποίησης MS/MS

INJECTION No	SPRAY Voltage (V)	N ₂ Sheath gas	Auxiliary gas	Transfer Capillary Temperature	Probe
1	2000	20	15	250	C
2	2000	40	15	250	C
3	2500	40	15	250	C
4	3000	40	15	250	C
5	3500	40	15	250	C
6	4000	40	15	250	C
7	4500	40	10	250	C
8	3500	40	10	250	C
9	3500	40	15	300	C
10	3500	40	15	300	C
11	3500	20	15	300	C
12	2500	40	15	350	C
13	2500	40	0	350	C
14	3000	40	15	300	C

15	3000	50	15	270	C
16	3000	40	15	250	C
17	3000	50	15	200	C
18	3000	60	15	200	C
19	3500	45	15	200	C
20	4000	43	15	200	C
21	4000	40	15	200	C
22	4500	40	15	200	C
23	5000	40	10	200	C
24	5000	40	5	200	C
25	5000	40	0	200	C
26	5000	40	10	200	C
27	5000	40	10	250	C
28	5000	32	10	250	C
29	4500	30	10	250	B
30	4500	40	10	250	B
31	4500	40	10	250	B

32	4000	40	10	250	B
33	4000	40	10	250	B
34	4500	60	10	250	B
35	4000	60	15	250	C
36	4500	40	15	250	C
37	4500	40	15	250	C
38	4000	40	15	250	C
39	4000	40	15	250	C
40	4000	40	15	250	C
42	3000	40	15	250	C



Σχήμα 12 Ραβδογράμματα έντασης κορυφής πιο άφθονων ιόντων ανά ένεση.

Μετά το loop injection και τη μελέτη των κορυφών, επιλέχτηκαν οι συνθήκες της ένεσης με τον αριθμό 7 δηλαδή,

Πίνακας 12 Επικρατέστερες συνθήκες MS

INJECTION No	VOLTAGE(V)	SHEATH GAS	AUXILIERY GAS	TEMPERATURE	POSITION
7	4500	40	10	250	C

Ωστόσο από τα ραβδογράμματα βλέπουμε και πιο ψηλές εντάσεις, ο λόγος που δεν επιλέχθηκαν είναι ότι εμφανιζόταν το φαινόμενο “thunder” στην πηγή ιοντισμού. Δηλαδή, στη μύτη του ιονιστή εμφανίζεται σπινθήρας που υποδηλώνει ότι η πηγή βρίσκεται σε συνθήκες ικανές να καταστρέψουν το δείγμα και τα ιόντα του.

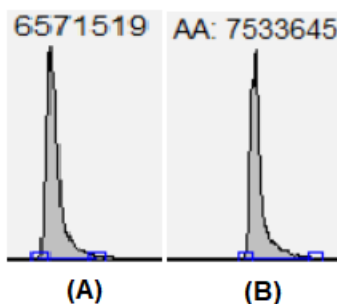
3.7.5 Βελτιστοποίηση παραμέτρων προκατεργασίας δειγμάτων

Σε αυτό το στάδιο των πειραμάτων η βελτιστοποίηση αφορά στην ποσότητα των αντιδραστηρίων IAA, DTT και θρυψίνης, στον διαλύτη απομάκρυνσης λίπους και τον χρόνο της ενζυματικής πέψης.

Αρχικά, για τις ποσότητες των αντιδραστηρίων πραγματοποιήθηκε η ίδια προκατεργασία που αναγράφεται προηγουμένως σε ξηρό καρπό αράπικου φιστικιού ωστόσο, οι ποσότητες των IAA, DTT, και θρυψίνης διαφοροποιήθηκαν. Για κάθε αντιδραστήριο που ελέγχθηκε, τα υπόλοιπα αντιδραστήρια παρέμειναν στην ίδια ποσότητα που αναγράφεται πάνω. Επιθυμία ήταν να εντοπιστούν διαφορές στο εμβαδόν των κορυφών που θα παίρναμε χρωματογραφικά.

Για το στάδιο της απομάκρυνσης λίπους: χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες, το εξάνιο και ο πετρελαϊκός αιθέρας σε δείγματα προϊόντος «Snickers» που

περιέχει αράπικο φιστίκι. Παρατίθενται τα χρωματογραφήματα από το πιο αφθονο και επαναλήψιμο ιόν του αράπικου φιστικιού (ιον με m/z 703,3)



Σχήμα 13 Εμβαδόν κορυφής του ιόντος με m/z 703,3 για το αράπικο φιστίκι με διαλύτη απομάκρυνσης λίπους Πετρελαϊκό αιθέρα (A) και εξάνιο (B).

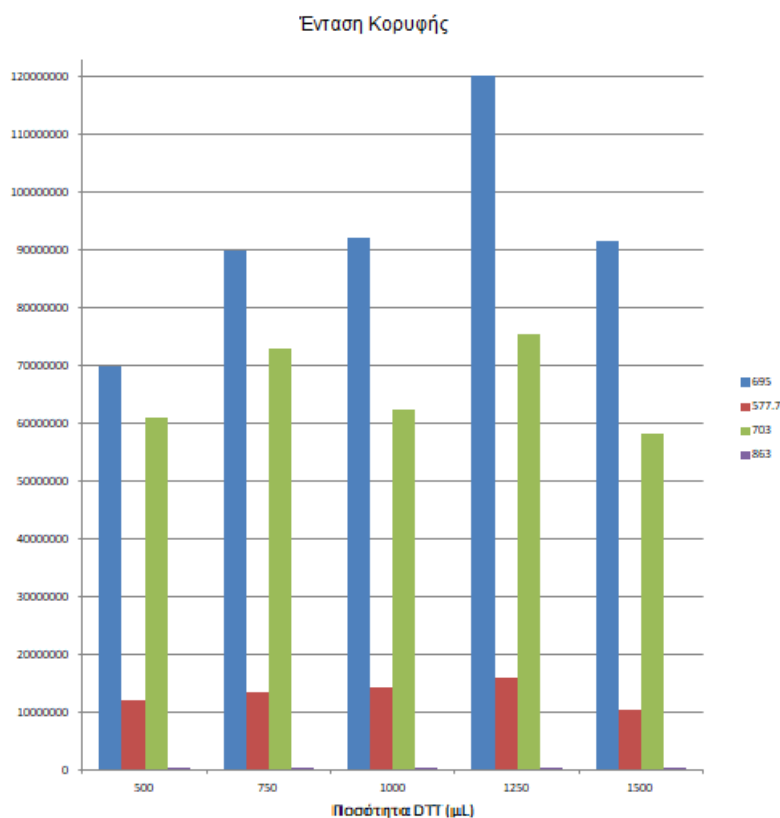
Όπως φαίνεται και από το παραπάνω σχήμα ο διαλύτης απομάκρυνσης λίπους δεν παίζει μεγάλο ρόλο στα τελικά αποτελέσματα που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους. Συνεπώς, επιλέγεται το εξάνιο μιας και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιβλιογραφία για την απομάκρυνση λίπους στις μεθόδους που αναφέρονται στον προσδιορισμό αλλεργιογόνων.

Παρακάτω παρατίθενται οι παράμετροι της προκατεργασίας του δείγματος που μελετήθηκαν σε ξηρό καρπό αράπικου φιστικιού και τα αποτελέσματά τους:

- **DTT:**

Ελέγχθηκαν τα επίπεδα των 500 μL , 750 μL , 1000 μL , 1250 μL , 1500 μL .

Στο Σχήμα 13 φαίνονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης.



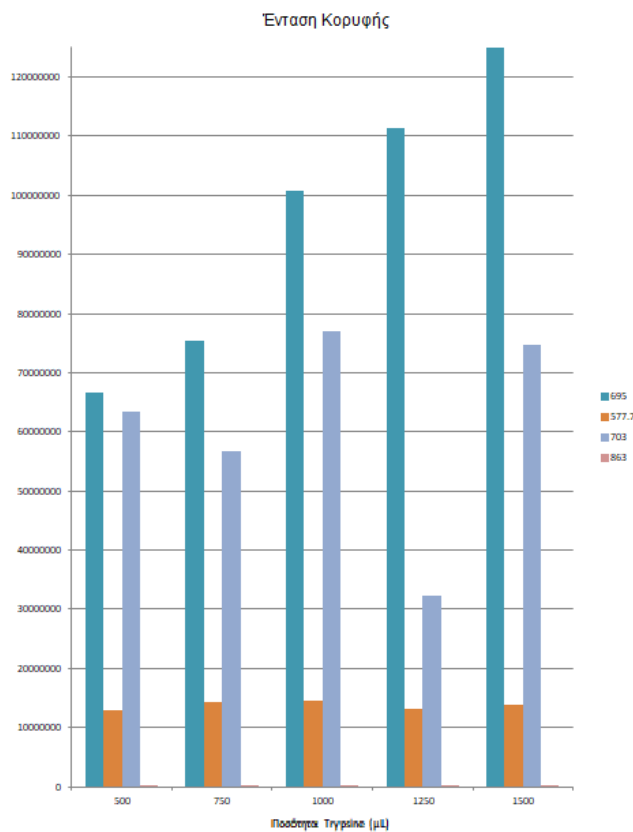
Σχήμα 14 Ένταση κορυφής ιόντων συναρτήσει της ποσότητας της διθειοθρεϊτόλης.

Αν και παρατηρείται μεγαλύτερο σήμα με 1250 μL διθειοθρεϊτόλης για τα 3 πιο άφθονα ιόντα, επιλέγονται τα 1000 μL αντιδραστηρίου διότι, παρατηρείται καλύτερη απόδοση ιόντων χαμηλής έντασης, άρα και καλύτερη αξιοπιστία στη ταυτοποίηση και ταυτόχρονα επιτυγχάνεται εξοικονόμηση στη ποσότητα για να έχουμε ικανοποιητικό σήμα .

- **Θρυψίνη**

Ελέγχθηκαν τα επίπεδα των 500 μL, 750 μL, 1000 μL, 1250 μL, 1500 μL.

Στο Σχήμα 14 φαίνονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης.



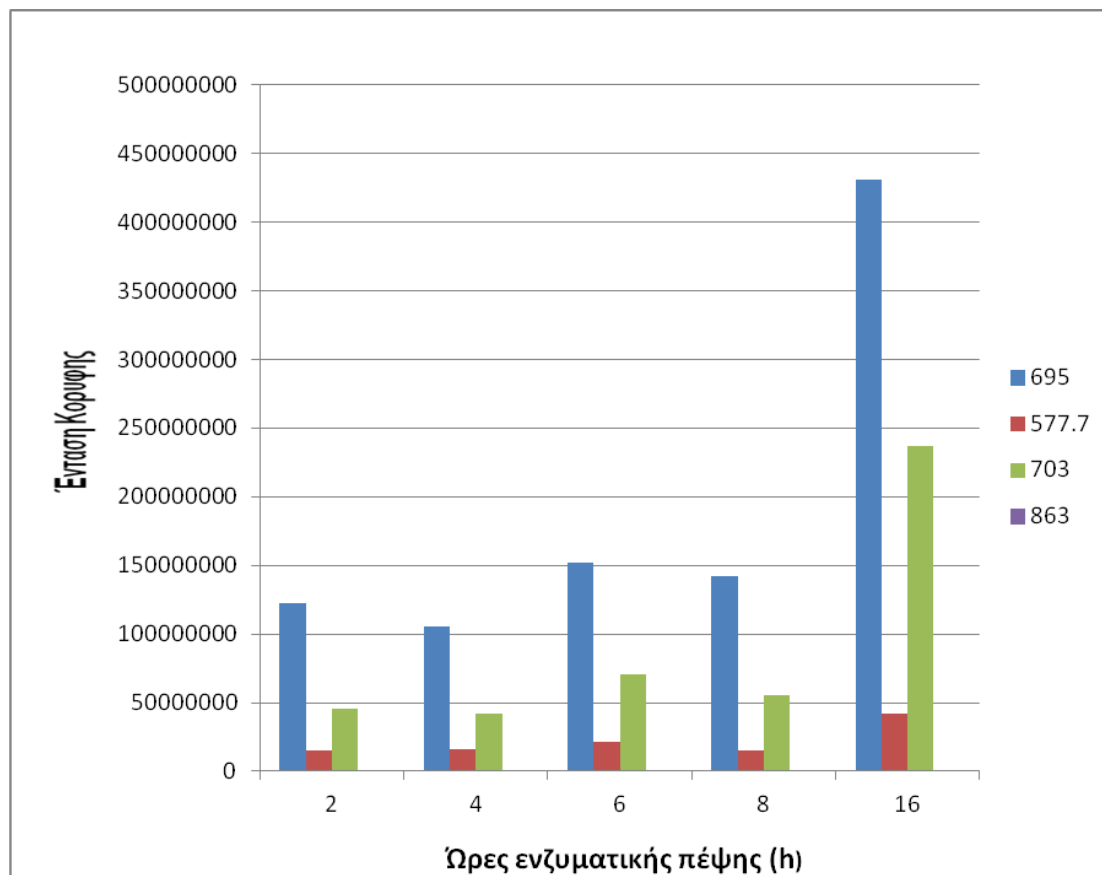
Σχήμα 15 Ένταση κορυφής συναρτήσει της ποσότητας της θρυψίνης.

Το ιόν 703,3 είναι το πιο σταθερό και εμφανίζει καλύτερο σήμα στα 1000 μL θρυψίνης και για αυτόν τον λόγο καταλήγουμε σε αυτήν την ποσότητα του συγκεκριμένου αντιδραστηρίου.

- **Ενζυματική πέψη**

Ελέχθηκαν οι 2 ώρες, 4 ώρες, 6 ώρες, 8 ώρες, 16 ώρες.

Στο Σχήμα 15 φαίνονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης.



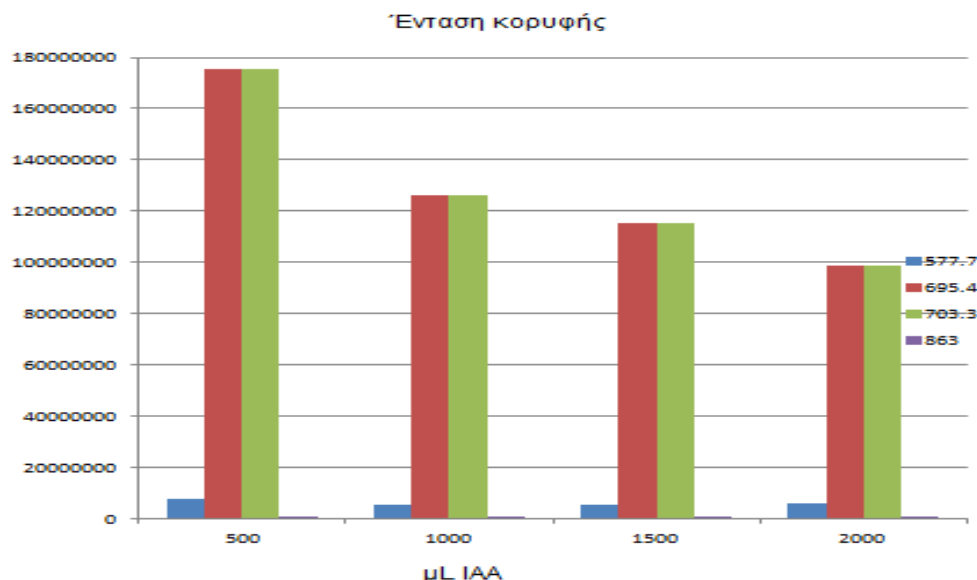
Σχήμα 16 Ένταση κορυφής συναρτήσει των ωρών της ενζυματικής πέψης.

Παρόλο που είχαμε καλά σήματα στις 6 ώρες είναι αισθητά μικρότερα από την ενζυματική πέψη των 16 ωρών. Επίσης, ήταν πιο πρακτικό και βολικό χρονικά να μείνουν 16 ώρες στο υδατόλουτρο.

- **IAA**

Ελέγχθηκαν τα επίπεδα των 500 µL, 1000 µL, 1500 µL, 2000 µL.

Στο Σχήμα 16 φαίνονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης.



Σχήμα 17 Ένταση κορυφής συναρτήσει της ποσότητας του ιωδοακεταμιδίου.

Όσο μικραίνει η ποσότητα του αντιδραστηρίου IAA τόσο μεγαλύτερο είναι το σήμα των πιο άφθονων ιόντων ωστόσο, αυτό δεν ίσχυε και στα λιγότερα άφθονα που είχαμε πολύ χαμηλό σήμα και μέγιστο σήμα παρατηρείται για τα 2000 µL. Επίσης, σε τρόφιμα όπου έχουμε περισσότερες πρωτεΐνες καλύτερο σήμα είχαμε στα 2000 µL και για αυτόν τον λόγο καταλήξαμε σε αυτήν την ποσότητα.

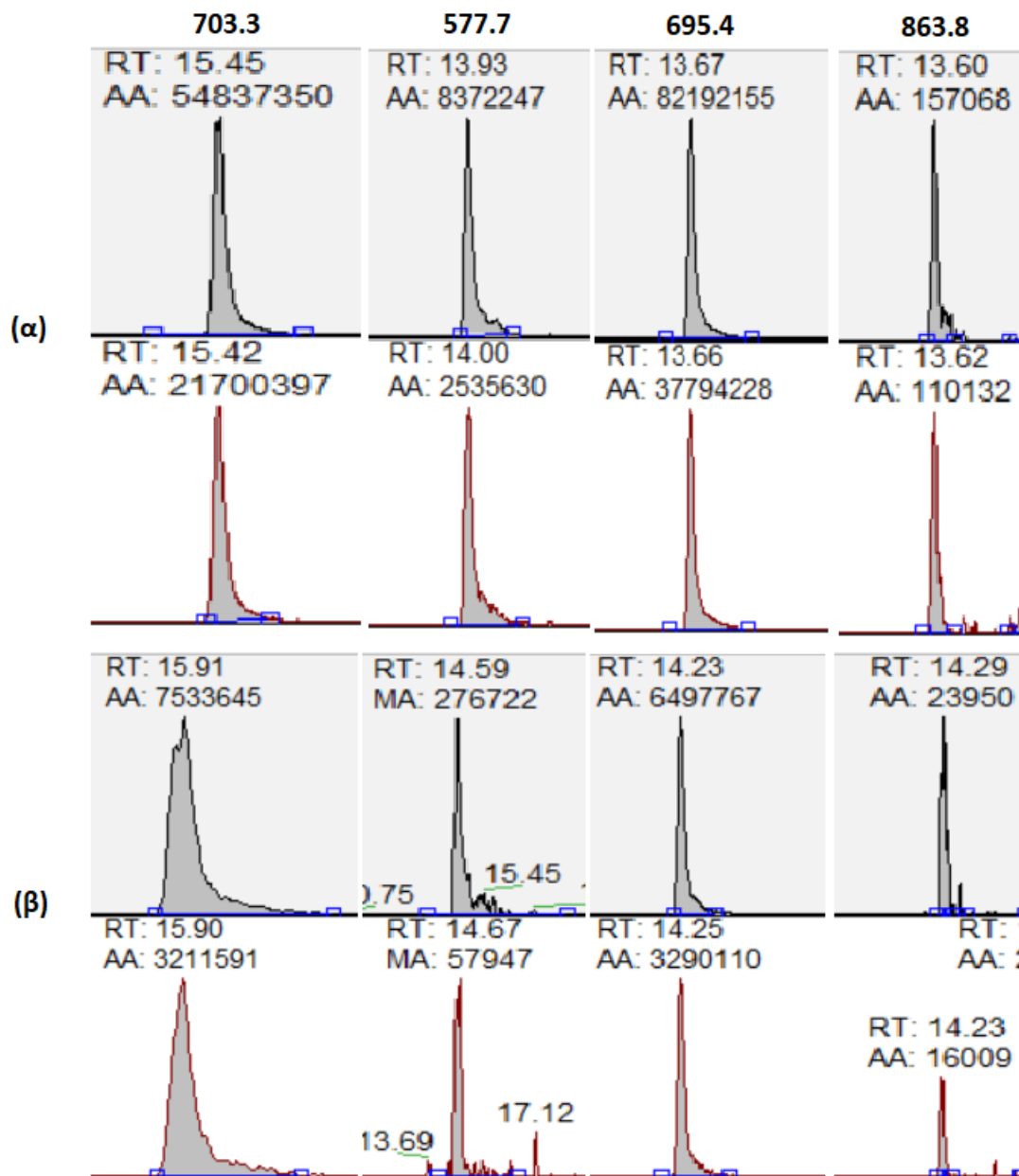
3.7.6 Επαλήθευση προκατεργασίας και ιόντων σε δείγματα που περιείχαν αράπικο φιστίκι

Ύστερα, από την ταυτοποίηση των ιόντων έγινε επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σε δείγματα σοκολατοποιίας που περιείχαν αράπικο φιστίκι. Συγκεκριμένα, αγοράστηκαν από τοπικά καταστήματα τροφίμων προϊόντα

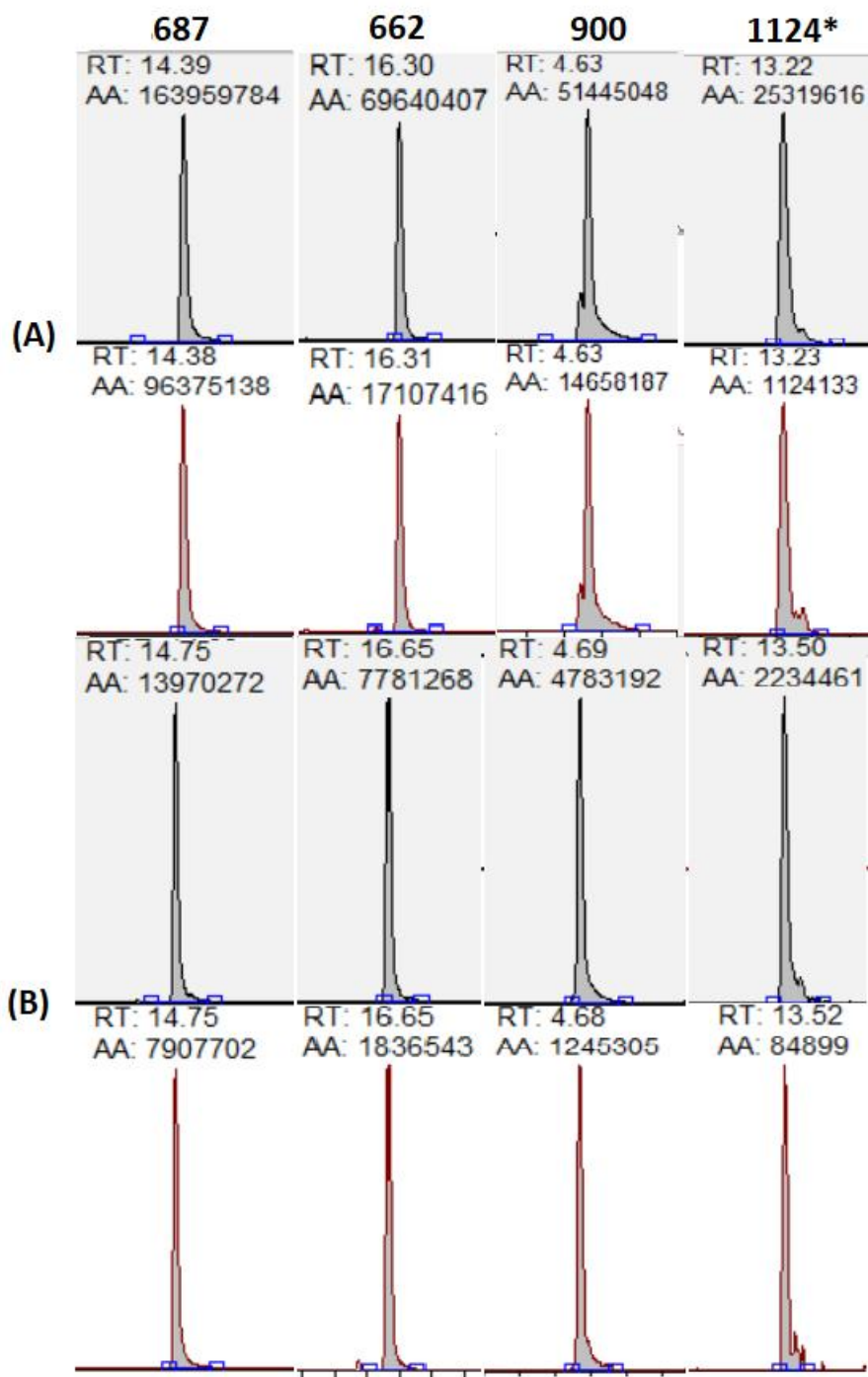
που ήταν γνωστό ότι περιέχουν αυτόν τον ξηρό καρπό. Επιλέχθηκαν προϊόντα της αγοράς που περιέχουν αράπικο φιστίκι, αμύγδαλο και φουντούκι σε σοκολάτα (για το αράπικο φιστίκι Snickers, για τον αμύγδαλο ION αμυγδάλου, για το φουντούκι Noisetta). Στόχος του σταδίου αυτού ήταν να μελετηθεί αν οι μήτρες της σοκολάτας αντιδρούν και διαχειρίζονται με τον ίδιο τρόπο όπως και οι ατόφιοι ξηροί καρποί ενώ, και η σύγκριση των χρωματογραφικών αποτελεσμάτων (χρόνοι, ιόντα, ένταση κορυφών) των ξηρών καρπών με αντίστοιχα προϊόντα της αγοράς που τα περιέχουν.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΓΝΩΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

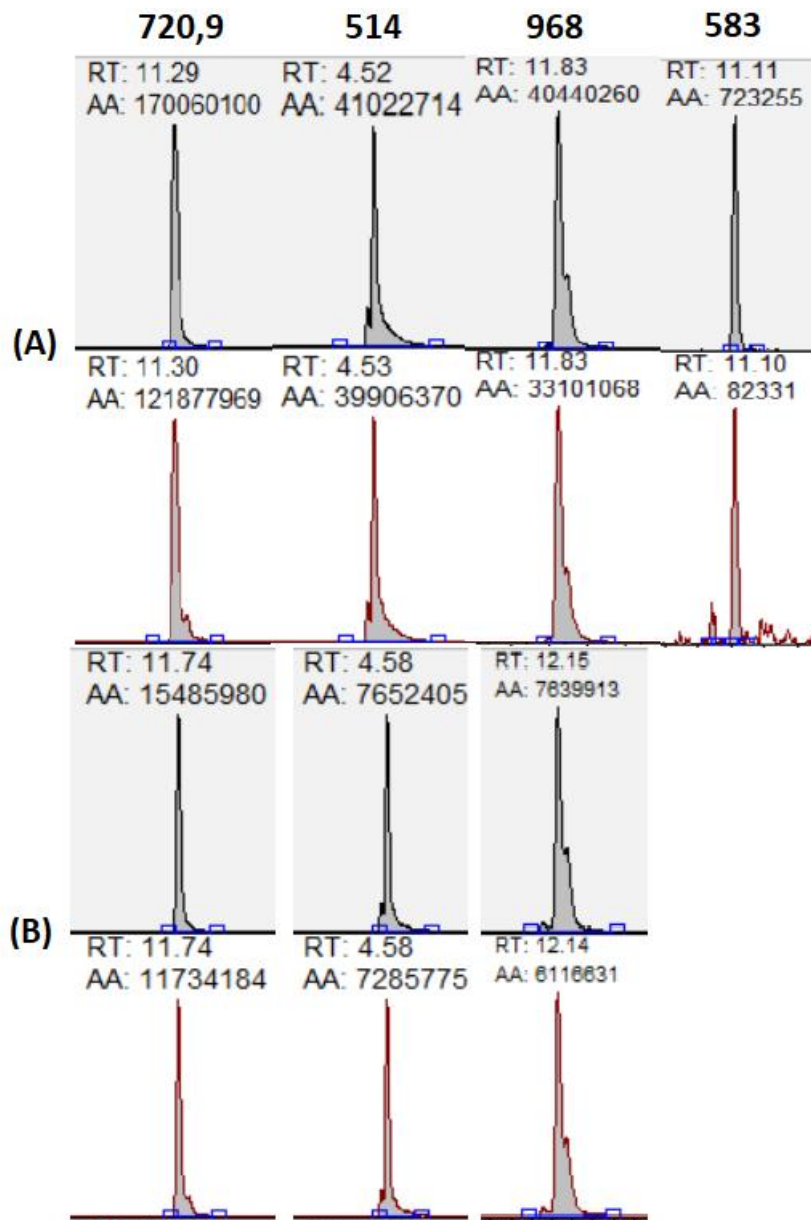
Όπως αναφέρεται στην πειραματική πορεία, η μέθοδος με την προκατεργασία και την ανάλυση εφαρμόστηκε σε δείγματα σοκολάτας που είναι γνωστό ότι περιέχουν συγκεκριμένους ξηρούς καρπούς. Ο λόγος αυτής της πειραματικής δοκιμής είναι να επαληθευτούν τα ιόντα που βρεθήκαν για κάθε ξηρό καρπό στο υπόστρωμα τροφίμου που θα μελετηθεί. Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν παρατίθενται στα σχήματα 18-20.



Σχήμα 18 Χρωματογραφήματα για τα 4 πιο άφθονα ιόντα του αράπικου φυστικιού σε ξηρό καρπό (α) και σε προϊόν του εμπορίου σοκολάτας (β).



Σχήμα 19 Χρωματογραφήματα για τα 4 πιο άφθονα ιόντα του αμυγδάλου σε ξηρό καρπό (α) και σε προϊόν του εμπορίου σοκολάτας (β) (Ιόν*: δεν έχει επαληθευτεί με Skyline).



Σχήμα 20 Χρωματογραφήματα για τα 4 πιο άφθονα ιόντα του φουντουκιού σε ξηρό καρπό (α) και σε προϊόν του εμπορίου σοκολάτας (β).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 18 και 19 έχουμε ταυτοποίηση των ιόντων για το αράπικο φιστίκι και το αμύγδαλο. Συγκεκριμένα, εμφανίζονται στα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα και τα τέσσερα πιο άφθονα ιόντα που έχουν βρεθεί για τον κάθε ξηρό καρπό και συν τοις άλλοις, βλέπουμε ότι εμφανίζονται και σε κοντινούς χρόνους. Παρόλα αυτά, όπως ήταν αναμενόμενο τα σήματα για τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα εμφανίζουν χαμηλότερο σήμα μιας και δεν είναι δείγματα καθαρού ξηρού καρπού αλλά, υπάρχουν σε υπόστρωμα σοκολάτας. Επίσης, οι ξηροί καρποί που χρησιμοποιούνται ως πρότυπα είναι πυκνά

διαλύματα. Ωστόσο, ενώ επιτυγχάνεται ταυτοποίηση με τα 3 πιο άφθονα ιόντα για το φουντούκι και παρατηρείται το ίδιο μοτίβο στα σήματα, δεν έχουμε σήμα, όπως φαίνεται στο σχήμα 20, για το τέταρτο και λιγότερο άφθονο ιόν του φουντουκιού που βρέθηκε με το loop injection.

3.7.7 Εφαρμογή μεθόδου σε δείγματα που εμβολιάστηκαν με χαμηλές συγκεντρώσεις – Τεχνικές δυσκολίες.

Σε αυτό το στάδιο έγινε προσπάθεια προσθήκης πολύ μικρής ποσότητας αλεσμένου αράπικου φιστικιού σε δείγματα, καθαρής από αράπικο φιστίκι, σοκολάτας. Οι μικρές ποσότητες του ξηρού καρπού αποσκοπούσαν στη δημιουργία δειγμάτων με πολύ χαμηλή συγκέντρωση ξηρού καρπού στη σοκολάτα και συγκεκριμένα 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg και 10 mg/kg. Για τη δημιουργία των δειγμάτων λήφθηκε υπόψη η γνωστή συγκέντρωση της πρωτεΐνης που περιέχεται στα 100g αράπικου φιστικιού που είναι 26g. Αυτό επιτεύχθηκε με προσθήκη 3,8 mg, 6,5 mg, 13,2 mg, 38,4 mg σε 100 g σοκολάτας για κάθε ποσότητα.

Παρότι, προστέθηκαν οι παραπάνω ποσότητες στα 100 g σοκολάτας και έγινε προσπάθεια ομογενοποίησης των δειγμάτων με λιώσιμο και ανατάραξη σε συσκευή ανάδευσης και ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία της προκατεργασίας δεν λήφθηκαν θετικά αποτελέσματα. Οι πιθανοί λόγοι που συνέβη κάτι τέτοιο είναι η πολύ μικρή ποσότητα που προστέθηκε σε μεγάλη ποσότητα δείγματος και η ανομοιογένεια του δείγματος μετά την προσθήκη του ξηρού καρπού

Η παραπάνω τεχνική δυσκολία αντιμετωπίστηκε και ξεπεράστηκε με τον εμβολιασμό εκχυλίσματος πρωτεϊνών και εκχυλίσματος πεπτιδίων του ξηρού καρπού σε δύο διαφορετικά στάδια της προκατεργασίας και όχι με ζύγιση αλεσμένου ξηρού καρπού. Οι εμβολιασμοί που πραγματοποιήθηκαν στα 2 στάδια αναπτύσσονται εκτενώς στο επόμενο υποκεφάλαιο της επικύρωσης μεθόδου.

3.7.8 Επικύρωση μεθόδου

Η επικύρωση μεθόδου σχετίζεται με την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης και την μελέτη της ανταπόκριση της μεθόδου για να επιβεβαιωθεί και να αξιολογηθεί για την καταλληλότητά της για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται [61]. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας που αξιολογήθηκαν είναι: η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης, η ανιχνευσιμότητα (LOD και LOQ), η επαναληψιμότητα της μεθόδου και η ορθότητα (με ανακτήσεις).

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της πειραματικής διαδικασίας, στη μέθοδο παρουσιάστηκαν κάποια προβλήματα και εμπόδια που δε συνηθίζονται σε μεθόδους ανάλυσης. Ο λόγος ύπαρξης των προβλημάτων αυτών είναι το αντικείμενο της μελέτης και συγκεκριμένα ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε σχετίζεται και αφορά σε πρωτεΐνες τροφίμων. Πιο αναλυτικά, η μέθοδος αναφέρεται σε ξηρούς καρπούς και στα αλλεργιογόνα τους που προκύπτουν από τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες τους. Παρόλο που είναι γνωστός ο στόχος ανάλυσης, η ύπαρξη του στόχου δεν υπάρχει σε πρότυπα διαλύματα ή πρότυπες ουσίες. Επίσης, στο τελικό στάδιο της ανάλυσης αυτό που ανιχνεύεται δεν είναι η πρωτεΐνη αλλά, τα πεπτίδια που παράγονται από την ενζυματική πέψη και αυτά με τη σειρά τους ποικίλουν ανάλογα με τον πως θα γίνει η πέψη πειραματικά. Επιπλέον, ένα άλλο πρόβλημα που αναφέρθηκε ήταν αυτό του εμβολιασμού. Συγκεκριμένα, η παρασκευή διαλυμάτων γνωστής, χαμηλής και επιθυμητής συγκέντρωσης ήταν ανέφικτη μιας και έπρεπε να ζυγιστούν μικρές ποσότητες ξηρού καρπού σε αναλογικά μεγάλες ποσότητες δείγματος, δεν επιτυγχανόταν κατάλληλη ομοιογένεια και υπήρχε και ο παράγοντας της δειγματοληψίας. Για τον λόγο αυτό, βασιστήκαμε στη βιβλιογραφία και στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε τέτοιες περιπτώσεις. Πιο ειδικά, σε αυτές τις περιπτώσεις ο εμβολιασμός δε γίνεται με ζύγιση καθαρού και αλεσμένου ξηρού καρπού στο αρχικό δείγμα σοκολάτας αλλά, προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα εκχυλίσματος της πρωτεΐνης του ξηρού καρπού. Δηλαδή, για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο πρέπει πρώτα ο ξηρός καρπός να υποστεί την πειραματική διαδικασία έτσι ώστε να φτάσει στο στάδιο της προκατεργασίας που έχουν εκχυλιστεί οι πρωτεΐνες του. Από αυτό

το εκχύλισμα, θα συλλεχτεί η ποσότητα που θα προστεθεί στο καθαρό δείγμα. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη πέρα από αυτό το στάδιο, έγινε εμβολιασμός και σε δεύτερο στάδιο. Το δεύτερο στάδιο αποτελεί το στάδιο όπου έχει γίνει η ενζυματική πέψη και τα δείγματα πρόκειται να περάσουν από SPE. Τέλος, έγιναν και δείγματα προσαρμοσμένα στη μήτρα με εκχύλισμα πεπτιδίων αράπικου φιστικιού μετά το στάδιο της SPE, της εξάτμισης και της ανασύστασης. Δηλαδή, πριν την ανάλυση με το LC-MS/MS.

Λαμβάνεται υπόψιν ότι τα 100g αράπικου φιστικιού περιέχουν 26g πρωτεΐνης επομένως, στα 2 g ξηρού καρπού που ξεκινάει η προκατεργασία, περιέχονται 520 mg πρωτεΐνης. Βάσει αυτής της πληροφορίας υπολογίστηκαν οι ποσότητες των εμβολιασμών ανάλογα με τη συγκέντρωση που έπρεπε να παρασκευαστεί.

1^ο στάδιο: Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων με πρωτεΐνες αράπικου φιστικιού συγκέντρωσης 2,5, 5, 15, 25 mg/kg πρωτεΐνης με προσθήκη αντίστοιχα 20, 40, 120, 200 μ L αραιωμένου εκχυλίσματος πρωτεΐνης 1:100.

2^ο στάδιο: Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων με πρωτεΐνες αράπικου φιστικιού συγκέντρωσης 1,25, 2,5, 7,5, 12,5 mg/kg πρωτεΐνης με προσθήκη αντίστοιχα 23, 46, 138, 230 μ L αραιωμένου εκχυλίσματος πρωτεΐνης 1:100.

Για την επαναληψιμότητα και την ενδιάμεση πιστότητα παρασκευάστηκαν και υπέστησαν την προκατεργασία της μεθόδου που αναπτύχθηκε, 6 δείγματα CRM, πιστοποιημένων υλικών αναφοράς, αράπικου φιστικιού σε δημητριακά, συγκέντρωσης 5 mg/kg και μετρήθηκαν τρεις φορές σε τρεις διαφορετικές μέρες.

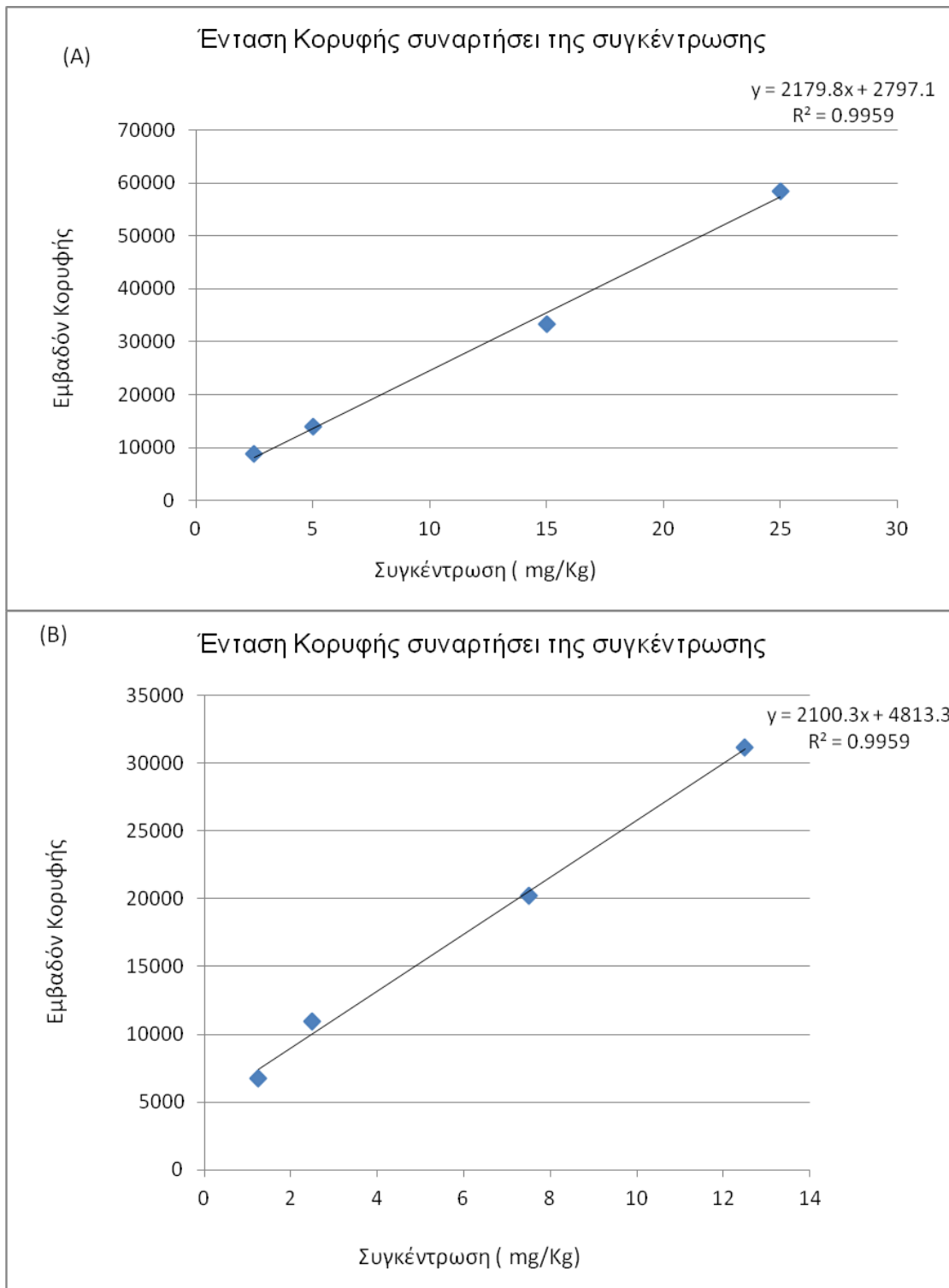
- **Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης**

Η γραμμικότητα αξιολογείται από τη μελέτη του διαγράμματος που αφορά το αναλυτικό σήμα συναρτήσει της συγκέντρωσης. Η αξιολόγηση επιτυγχάνεται με στατιστικές μεθόδους (μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων) και υπολογίζεται η εξίσωσή της [61].

Για την επίτευξη του προσδιορισμού της γραμμικής περιοχής παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα δείγματος σοκολάτας εμβολιασμένα με εκχύλισμα ξηρού καρπού αράπικου φιστικιού, σύμφωνα με τη γνωστή μέθοδο προκατεργασίας, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 2,5 mg/kg έως 25 mg/kg (κάθε ένα μετρήθηκε εις διπλούν).

Ο συντελεστής προσδιορισμού συσχέτισης R^2 αποτελεί μέτρο της γραμμικότητας και για να γίνει αποδεκτός πρέπει να έχει τιμή μεγαλύτερη από 0,997 [61].

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο γνωστής προσθήκης έγινε, για το αράπικο φιστίκι, η καμπύλη αναφοράς, με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων και προσδιορίστηκε η ευθεία παλινδρόμησης καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης R^2 . Ο συντελεστής συσχέτισης όπως φαίνεται παίρνει τιμή 0,99. Αυτό υποδηλώνει την πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ της μετρούμενης παραμέτρου (εμβαδόν κορυφής, Peak area) και της συγκέντρωσης των εμβολιασμένων διαλυμάτων στο 1^ο και το 2^ο στάδιο της προκατεργασίας δηλαδή, εμβολιασμός με εκχύλισμα πρωτεϊνών πριν την πέψη και εμβολιασμός με εκχύλισμα πεπτιδίων πριν τον καθαρισμό με SPE.



Σχήμα 21 Διάγραμμα γραμμικότητας (A) πρώτου σταδίου και (B) δεύτερου σταδίου για το ιόν 703,3.

Πίνακας 13 Εξίσωση γραμμικότητας 1^{ου} και 2^{ου} σταδίου.

Ένωση	Στάδιο	Εξίσωση	R ²
Αράπικο Φιστίκι	1 ^ο	$y = (218,0 \pm 9,8)10^2 x + (2,7 \pm 1,4)10^3$	0,9959
	2 ^ο	$y = (210,0 \pm 9,6)10^2 x + (48,1 \pm 7,1)10^2$	0,9959

- **Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) μεθόδου**

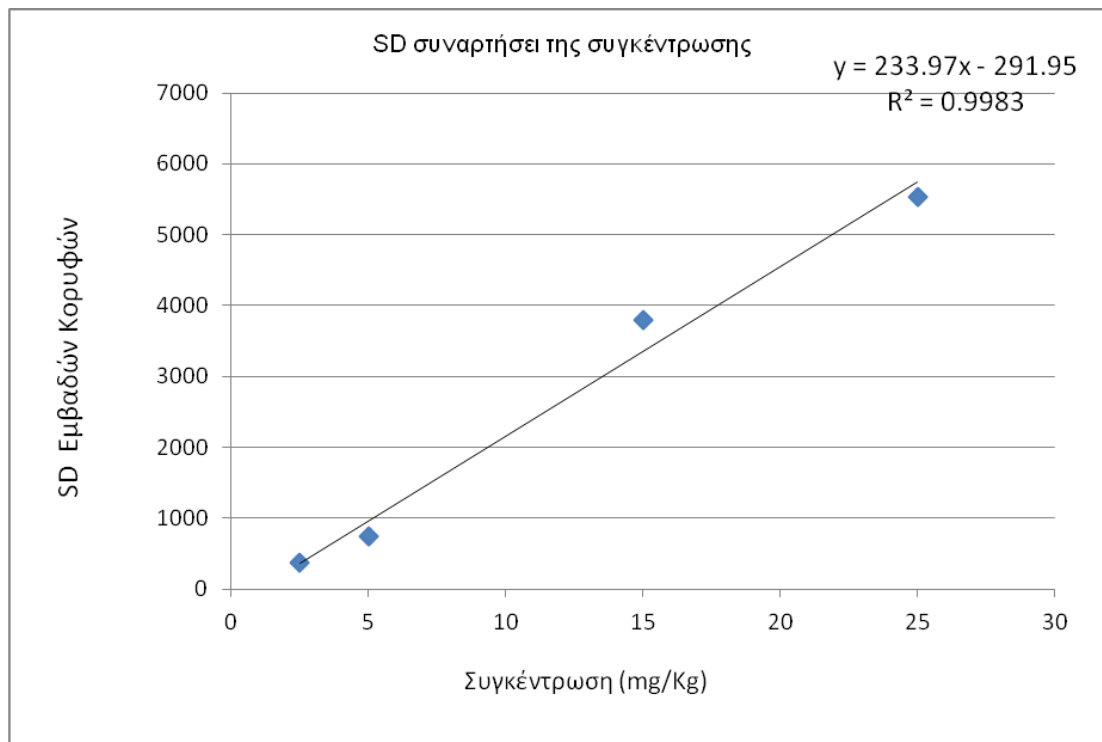
Η ανιχνευσιμότητα εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Η ικανότητα αυτή εκφράζεται με δύο όρια: το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ). Όριο ανίχνευσης ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί με καθορισμένη στάθμη (ή επίπεδο) εμπιστοσύνης, ενώ όριο ποσοτικοποίησης είναι η ελάχιστη συγκέντρωση αναλύτη που μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια. Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα σφάλματα πρώτου και δεύτερου είδους [61].

Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης μπορούν να υπολογιστούν με πολλούς τρόπους. Ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης έγινε στην παρούσα εργασία με καμπύλη ανακρίβειας (imprecision curve) με ανάλυση σειράς 4^{ων} επιπέδων συγκέντρωσης σε δείγματα σοκολάτας εμβολιασμένα με πρωτεΐνες αράπικου φιστικιού σε συγκεντρώσεις 2,5, 5, 15, 25 mg/kg μετρημένα έξι φορές το καθένα, κατασκευή του διαγράμματος SD ως προς συγκέντρωση και υπολογισμός της τομής (SD μηδενικού προτύπου) με προέκταση.

Όπου,

- b: η κλίση από το εμβολιασμένο δείγμα

SD: η τυπική απόκλιση από την ανάλυση έξι φορές των δειγμάτων σε 2,5, 5, 15, 25 mg/kg ξηρού καρπού σε σοκολάτα.



Σχήμα 22 SD εμβασδών κορυφών συναρτήσσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (mg/kg).

Η εξίσωση της καμπύλης είναι: $y = (23,4 \pm 1,3)10^2 x - (291,95 \pm 9,0)10^1$

Για την εύρεση του ορίου ανίχνευση λύνουμε την εξίσωση $y = 233.97x - 291.95$ για $Y=0$ και έτσι βρίσκουμε ότι όριο ανίχνευση είναι: $C = 1,2 \text{ mg/Kg}$.

- **Πιστότητα**

Η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανομένων αποτελεσμάτων της μεθόδου. Η πιστότητα εκφράζει τη διασπορά των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η πιστότητα αποτελείται από δύο επιμέρους όρους, την επαναληψιμότητα και την ενδιάμεση πιστότητα. Η πιστότητα συχνά ορίζεται ως η τυπική απόκλιση (SD) ή ως η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) μιας σειράς μετρήσεων [61].

Η επαναληψιμότητα των αναλυτικών αποτελεσμάτων εκφράζει τον βαθμό συμφωνίας μεταξύ των δεδομένων τα οποία λαμβάνονται με τον ίδιο τρόπο, κάτω από τις ίδιες συνθήκες (ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλύτης, ίδια

συσκευή, ίδιο εργαστήριο). Η επαναληψιμότητα αποτελεί το μέτρο του τυχαίου ή απροσδιόριστου σφάλματος της ανάλυσης και περιγράφεται από την μέση τιμή, την τυπική απόκλιση (SD) και την επί της εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

- **Ενδιάμεση Πιστότητα μεθόδου**

Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα είναι το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο δείγμα και στο ίδιο εργαστήριο, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, όπως σε διαφορετική μέρα, σε διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, σε διαφορετικούς χρόνους, διαφορετικό αναλυτή [61].

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, αναλύθηκαν 6 πιστοποιημένα υλικά αναφοράς αράπικου φιστικιού σε δημητριακά σε συγκέντρωση 5 mg/kg, τα οποία αναλύθηκαν σε διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου. Η ενδιάμεση πιστότητα ελέγχθηκε με βάση της %RSD.

Η ανάκτηση του κάθε υποδείγματος υπολογίστηκε με βάση το ιόν ποσοτικοποίησης της κάθε ουσίας, εν συνεχεία υπολογίστηκαν η μέση ανάκτηση, η τυπική απόκλιση και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Παρακάτω, αναγράφονται τα πειραματικά αποτελέσματα που σχετίζονται με την επαναληψιμότητα και την ενδιάμεση πιστότητα.

Συγκεκριμένα, για την εύρεση της επαναληψιμότητας και της ενδιάμεσης πιστότητας έγιναν μετρήσεις όπως, προαναφέρθηκε σε έξι CRM αράπικου φιστικιού των 5 mg/kg τρεις διαφορετικές εργαστηριακές μέρες.

Πίνακας 14 Αποτελέσματα επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης πιστότητας

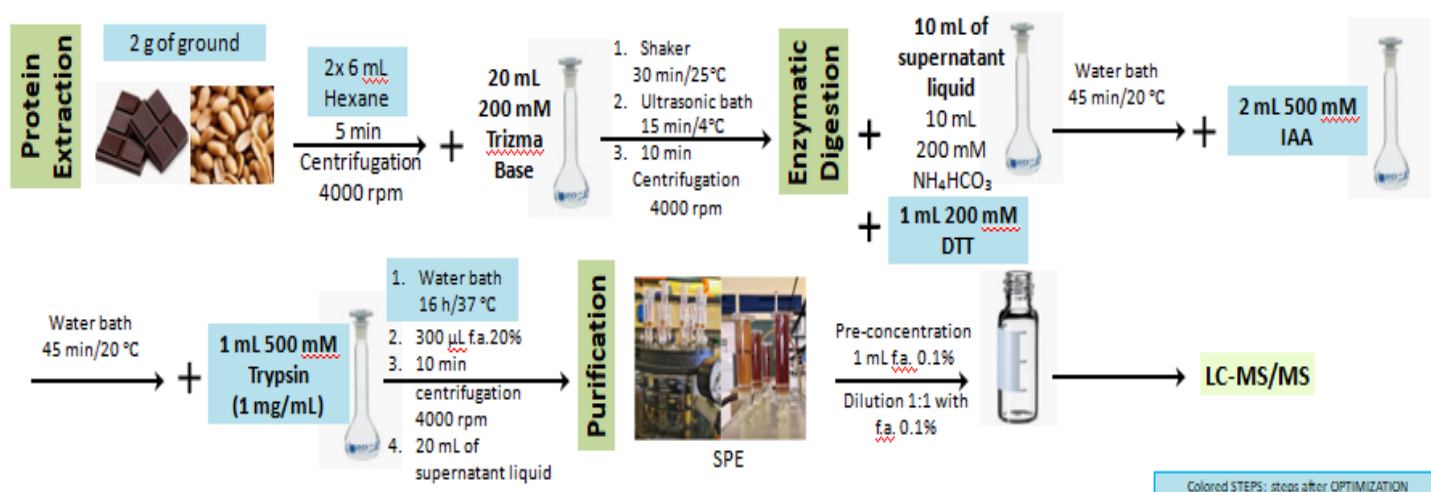
Ουσία	Ημέρα	Ιόν	Συγκέντρωση (mg/Kg)	%RSD
Αράπικο Φιστίκι	2 ^η	703,3	5	6,5
	Ενδιάμεση πιστότητα	703,3	5	7,9

3.8 Συμπεράσματα - Συζήτηση

Έπειτα από τις πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, αναπτύχθηκε μέθοδος που περιλαμβάνει την προκατεργασία του δείγματος, τα πρόδρομα και προϊόντα ιόντα για κάθε ξηρό καρπό, τις συνθήκες του MS καθώς και την επικύρωση της μεθόδου.

• Προκατεργασία Δείγματος

Η τελική προκατεργασία με τα πιο βασικά της στάδια απεικονίζεται σχηματικά στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 23 Σχηματική απεικόνιση προκατεργασίας δείγματος

Τα ιόντα που βρέθηκαν και χρησιμοποιούνται αναγράφονται εκτενώς στο κεφάλαιο 3 με το πειραματικό μέρος της έρευνας καθώς και όλες οι βελτιστοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Τέλος, η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τα χαρακτηριστικά ποιότητας της γραμμικότητας, της ανιχνευσιμότητας και της πιστότητας.

Συνοπτικά τα χρήσιμα αποτελέσματα που αφορούν την επικύρωση μεθόδου φαίνονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15 Συνοπτικά αποτελέσματα επικύρωσης μεθόδου

Χαρακτηριστικά Ποιότητας	Αποτελέσματα
Γραμμικότητα 1 ^{ου} σταδίου	0,9959
Επαναληψιμότητα 2 ^{ης} μέρας	6,5
Ενδιάμεση Πιστότητα	7,9
Όριο ανίχνευσης	1,2 mg/kg

3.9 Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη όπως αποδεικνύεται μέσω των πειραμάτων αναπτύχθηκε μία μέθοδος για τον προσδιορισμό του αράπικου φιστικιού σε σοκολάτες αλλά, και μεγάλο μέρος και για τους υπόλοιπους ξηρούς καρπούς δηλαδή, το αμύγδαλο, το κάσιους, το καρύδι, το πεκάν, το φιστίκι και το φουντούκι. Η καινοτομία της μελέτης αυτής σχετίζεται στην τεχνική που βασίστηκε η ανάλυση μιας και μέχρι τώρα χρησιμοποιείται ευρέως η ELISA για τα αλλεργιογόνα και ειδικά για τους ξηρούς καρπούς. Ωστόσο, η ELISA είναι μια σχετικά πιο ακριβή μέθοδος προσδιορισμού αφού, βασίζεται στα kits συνεπώς, κάθε δείγμα και κάθε υπόστρωμα χρειάζεται το δικό του kit. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει και στην LC-MS/MS διότι, σε όλα τα δείγματα εφαρμόζεται η ίδια προκατεργασία. Επίσης, για κάθε αλλεργιογόνο η ELISA έχει ειδικό kit, ενώ με τη μέθοδο αυτήν υπάρχει η δυνατότητα να προσδιορισθούν ταυτόχρονα όλα τα αλλεργιογόνα.

Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία του AOAC (AOAC INTERNATIONAL Standard Method Performance Requirement (SMPR) 2016.002) το όριο ανίχνευσης που πέτυχε η μέθοδος καθώς και η %RSD πληρούν τα κριτήρια και είναι εντός αποδεκτών ορίων ενώ, έχει πετύχει και καλύτερα όρια ανίχνευσης σε σχέση με τις μελέτες που υπάρχουν έως το 2018 [26].

Πίνακας 16 Σύγκριση LOD, % RSD μεθόδου με βιβλιογραφία και αποδεκτά κριτήρια[26]

Παράμετροι	Ανεπτυγμένη μέθοδος LC-MS/MS σε σοκολάτα	AOAC (2018) σε σοκολάτα	Αποδεκτά όρια
LOD (mg/kg)	1,18	1,5	1,65
%RSD	4,7-9,2	1,2-10,3	≤20

Τα μελλοντικά βήματα για επέκταση της μελέτης: η εφαρμογή της μεθόδου σε διαφορετικές και πολύπλοκες μήτρες και η μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών υποστρωμάτων στην εφαρμοζόμενη μέθοδο. Επιπρόσθετα, μελλοντικά θα ήταν απαραίτητη και η ανάπτυξη της ίδιας μεθόδου και για τα υπόλοιπα αλλεργιογόνα τρόφιμα που περιλαμβάνονται στο παράρτημα της οδηγίας 2003/89/EK. Επιπλέον, στόχος είναι η επικύρωση της μεθόδου για όλα τα αλλεργιογόνα και για όσο τον δυνατόν περισσότερα μητρικά υλικά. Τέλος, ο πιο βασικός στόχος είναι η εφαρμογή της μεθόδου για τη μελέτη και τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων σε ελληνικά και παραδοσιακά προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 17: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
ELISA Kit	Διαγνωστικό πακέτο ELISA
Dot blot	Μέθοδος αποτύπωσης κηλίδας
Real time PCR	Μέθοδος PCR σε πραγματικό χρόνο
Injection	Ένεση
Spray Voltage	Δυναμικό (V)
Sheath Gas	Αέριο εκνέφωσης
Auxiliary Gas	Αέριο ξήρανσης
Transfer Capillary temperature	Θερμοκρασία αγωγού μεταφοράς των ιόντων από τον κώνο εισόδου στο εσωτερικό του φασματόμετρου
Probe	Θέση ακροσωληνίου ιοντισμού
Infusion	Έγχυση
Collision Energy	Ενέργεια Σύγκρουσης Ιόντων
Collision Pressure	Πίεση Αερίου Σύγκρουσης Ιόντων
Tube lens	Φακός Εστίασης Ιόντων

ΣΥΝΤΜΉΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΌΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΎΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

Πίνακας 18 Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
MS	Mass Spectrometry
PCR	Polymerase Chain Reaction
RIE	Reactive-Ion Etching
LFD	Lateral Flow Devices
DNA	Deoxyribonucleic Acid
CRM	Certified Reference Materials
IgE	Immunoglobulin E
SPE	Solid Phase Extraction
ΕΚΠΑ	Εθνικό Και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
GC	Gas Chromatography
SFC	Supercritical fluid chromatography
CE	Capillary electrophoresis
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
PVDF	Polyvinylidene fluoride or polyvinylidene difluoride
LC-MS/MS	Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry
SD	Standard deviation
%RSD	% Relative standard deviation
TFA	Trifluoroacetic acid
DMSO	Dimethylsulfoxide

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. R. A. Goldsby, T. Kindt, B. Osborne, J. Kuby. *Immunology* (5th ed.). New York: W.H. Freeman, 2003, pp. 19-20.
2. L. Soller L, M. Ben-Shoshan, DW Harrington, J. Fragapane, L. Joseph , Y. St Pierre, SB. Godefroy, La Vieille S, SJ Elliott, AE Clarke, *Overall Prevalence of Self-reported Food Allergy in Canada*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012, pp. 986-988.
3. Bublin M., Radauer C., Wilson IBH., Kraft D., Scheiner O., Breiteneder H., Hoffmann-Sommergruber K., *Cross-reactive N-glycans of Api g 5, a high molecular weight glycoprotein allergen from celery, are required for immunoglobulin E binding and activation of effector cells from allergic patients*, FASEB Journal, 2007, pp. 17.
4. www.fda.gov (τελευταία επίσκεψη 10/08/2018)
5. <https://www.allergyhome.org/handbook/table-of-contents/recognize-and-treat-allergic-reactions/signs-and-symptoms/> (τελευταία προβολή 16/06/2019).
6. http://www.ixek.gr/images/articles/396_%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%B9%CE%BA%CE%B5%CF%82_%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%B5%CF%81%CE%B3%CE%B9%CE%B5%CF%82.pdf.
(τελευταία προβολή 16/06/2019)
7. Sher T. *Ανοσολογία και Αλλεργία*. Στο: Behrman E.R. & Kliegman M.R. Nelson, Βασική Παιδιατρική, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1996, pp. 329-341.
8. Clark S. and Camargo AC., *Emergency management of food allergy: systems perspective*, *Curr Opin Allergy Immunol*, 2005, pp. 293-98.
9. https://www.iatrikionline.gr/deltio_50d/04.htm (τελευταία προβολή 16/06/2019).

10. Sicherer SH, Munoz FA, Burks AW., *Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey*, Allergy Clin Immunol 1999, pp. 559-562.
11. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology website*. Διαθέσιμο στο: <https://www.aaaai.org/conditions-and-treatments/library/allergy-library/oit> (τελευταία προβολή 16/06/2019).
12. Brendan MacLean, Daniela M. Tomazela, Nicholas Shulman, Matthew Chambers, Gregory L. Finney, Barbara Frewen, Randall Kern, David L. Tabb, Daniel C. Liebler, Michael J., MacCoss. *Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments*, *Bioinformatics*, 2010, pp. 966–968.
13. Ayuso R, Lehrer SB, Tanaka L, Ibanez MD, Pascual C, Burks AW, Sussman GL, Goldberg B, López M, Reese, *IgE antibody response to vertebrate meat proteins including tropomyosin*, *Ann Allergy Asthma Immunol* 83, 1999, pp. 399-405.
14. Besler M. *Determination of Allergens in Foods*. *Trends Anal Chem*, 2001, pp. 662-672.
15. Besler M, Steinhart H, Paschke A., *Stability of food allergens and allergenicity of processed foods*, *J Chromatogr B Biomed Sci App*, 2001, pp. 207-228.
16. Poms RE, Klein CL and Anklam E, *Methods for allergen analysis in food: a review*. *Food Additives and Contaminants*, 2004, pp. 1-31.
17. Poms RE and Anklam E., *Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens*, *Journal of AOAC International* 87, 2004, pp. 1466-1474.
18. Schubert-Ullrich P, Rudolf J, Ansari P, Galler B, Führer M, Molinelli A and Baumgartner S., *Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, pp. 69-81.
19. Careri M, Elviri L, Mangia A and Mucchino C., *ICP-MS as a novel detection system for quantitative element-tagged immunoassay of*

- hidden peanut allergens in foods*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, pp. 1851-1854.
20. Van Hengel AJ, Capelletti C, Brohee M and Anklam E., *Validation of two commercial lateral flow devices for the detection of peanut proteins in cookies: interlaboratory study*, Journal of AOAC International, 2006, pp. 462-468.
 21. Pastorello EA., Trambaioli C., *Isolation of food allergens*, Journal of Chromatography, Biomedical Sciences and Applications, 2001, pp. 71-84.
 22. Κανονισμός 304/ 18, *Official Journal of the European Union*, 2011.
 23. T. Zhang, Y. Zhang, D. Horn, Z. Hao and G. Jiang, *Milk Allergen Identification and Quantitation in Wine with LC-MS/MS Approaches*, Thermo Fisher Scientific, 2011, pp. 426-428.
 24. Ahmed Gomaa, Joyce Boye, *Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)*, Food Chemistry, 2014, pp. 585-592.
 25. Linda Monaci, Angelo Visconti. *Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 5, 2009, pp. 581- 591.
 26. Lee Sun New, Andre Schreiber, Jianru Stahl-Zeng, Hua-Fen Liu, *Simultaneous Analysis of Multiple Allergens in Food Products by LC-MS/MS*, Journal Of Aoac International Vol. 101, No. 1, 2018, pp. 132-145.
 27. Chelsea C. Boo, Christine H. Parker, Lauren S. Jackson, *A Targeted LC-MS/MS Method For The Simultaneous Detection And Quantitation Of Egg, Milk, And Peanut Allergens In Sugar Cookies*, Journal Of Aoac International Vol. 101, No. 1, 2018, pp. 108-117.
 28. M. Planque, T. Arnould, M. Dieu, P. Delahaut, P. Renard, N. Gillard *Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food*

- allergens in complex and processed foodstuffs*, Journal of Chromatography A, 2016, pp. 115–123.
29. Clara Esteve, Alfonsina D'Amato, Maria Luisa Marina, Maria Concepcion Garcia, Pier Giorgio Righetti, *Identification of avocado (Persea americana) pulp proteins by nano-LC-MS/MS via combinatorial peptide ligand libraries*, Electrophoresis, 2012, pp. 2799–2805.
 30. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, Smurthwaite, *The biology of IGE and the basis of allergic disease*, Annu Rev Immunol, Vol. 21, 2003, pp. 579–628.
 31. Muller, U., Luttkopf, D., Hoffmann, A., Petersen, A., Becker, W.M., Schocker F., *Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistics Division, Rome, Italy, FAOSTAT, 2018*.
 32. Niggemann, B., Altmann, F., Kolarich, D., Haustein, D., Vieths, S., *Allergens in raw and roasted hazelnuts (Corylus avellana) and their cross-reactivity to pollen*, Eur. Food Res. Technol, 2000, pp. 212, 2–12.
 33. Downs, M.L., Simpson, A., Custovic, A., Semic-Jusufagic, A., Bartra, J., Fernandez-Rivas, M., Taylor, S.L., Baumert, J.L., Mills, E.N.C. *Insoluble and soluble roasted walnut proteins retain antibody reactivity*, Food Chem, Vol. 194, 2016, pp. 1013–1021.
 34. Hansen, K.S., Ballmer-Weber, B.K., Lüttkopf, D., Skov, P.S., Wüthrich, B., BindslevJensen, C., Vieths, S., Poulsen, L.K., *Roasted hazelnuts-allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge*, Allergy Vol. 58, 2003, pp. 132–138.
 35. Sabine Geiselhart, Karin Hoffmann-Sommergruber, Merima Bublin, *Tree nut allergens*, Molecular Immunology, Vol. 100, 201, pp. 71–81.
 36. Datema, M.R., Zuidmeer-Jongejan, L., Asero, R., Barreales, L., Belohlavkova, S., De Blay, F., Bures, P., Clausen, M., Dubakiene, R., Gislason, D., Jedrzejczak-Czechowicz, M., Kowalski, M.L., Knulst, A.C., Kralimarkova, T., Le, T.M., Lovegrove, A., Marsh, J., Papadopoulos, N.G., Popov, T., Del Prado, N., Purohit, A., Reese, G., Reig, I., Seneviratne, S.L., Sinaniotis, A., Versteeg, S.A., Vieths, S., Zwinderman,

- A.H., Mills, C., Lidholm, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Fernández-Rivas, M., Ballmer-Weber, B., Van Ree, R., *Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: a EuroPrevall outpatient clinic survey*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 136, pp. 382–391.
37. Burney, P.G.J., Potts, J., Kummeling, I., Mills, E.N.C., Clausen, M., Dubakiene, R., Barreales, L., Fernandez-Perez, C., Fernandez-Rivas, M., Le, T.M., Knulst, A.C., Kowalski, M.L., Lidholm, J., Ballmer-Weber, B.K., Braun-Fahlander, C., Mustakov, T., Kralimarkova, T., Popov, T., Sakellariou, A., Papadopoulos, N.G., Versteeg, S.A., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J.H., Hoffmann-Sommergruber, K., van Ree, *The prevalence and distribution of food sensitization in European adults*, *Allergy* Vol. 69, 2014, pp. 365–371.
38. Datema, M.R., Zuidmeer-Jongejan, L., Asero, R., Barreales, L., Belohlavkova, S., De Blay, F., Bures, P., Clausen, M., Dubakiene, R., Gislason, D., Jedrzejczak-Czechowicz, M., Kowalski, M.L., Knulst, A.C., Kralimarkova, T., Le, T.M., Lovegrove, A., Marsh, J., Papadopoulos, N.G., Popov, T., Del Prado, N., Purohit, A., Reese, G., Reig, I., Seneviratne, S.L., Sinaniotis, A., Versteeg, S.A., Vieths, S., Zwinderman, A.H., Mills, C., Lidholm, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Fernández-Rivas, M., Ballmer-Weber, B., Van Ree, *Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: a EuroPrevall outpatient clinic survey*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 137, 2014, pp. 391-393.
39. Snyder R., D.W.J., *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear -Solvent -Strenght Model: Wiley*, Interscience, 2007, pp. 206.
40. Αρχοντάκη, Ε., *Προκατεργασία Υγρών μειγμάτων (Σημειώσεις για το μάθημα Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές)*, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2007.
41. <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> (τελευταία επίσκεψη 16/06/2019).
42. <https://www.indiamart.com/proddetail/spe-vacuum-manifold-system-14688829830.html> (τελευταία επίσκεψη 16/06/2019).

43. <https://www.krssltd.com/files/downloads/AutoSPE.pdf> (τελευταία επίσκεψη 16/06/2019).
44. Majors R.E., *The Role of Polymers in Solid-Phase Extraction and Sample Preparation, LC-GC*, 2008, p 22.
45. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*, Μτφ: Μ. Ι. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007.
46. Ε. Αρχοντάκη, *(Σημειώσεις για το Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Χημική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας) Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης*, 2006.
47. Π. Α. Σίσκος, Δ. Π. Νικολέλης. *(Σημειώσεις για το μάθημα Τεχνικές Διαχωρισμού) Αναλυτικές μέθοδοι διαχωρισμού*, Ε.Κ.Π.Α., Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, 1991, pp. 122-174.
48. https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5388/3/02_chapter_08.pdf (τελευταία επίσκεψη 16/06/2019).
49. Ν. Θωμαΐδης. *(Σημειώσεις για το μάθημα Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές) Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές*, Ε.Κ.Π.Α., Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, 2008.
50. <https://www.uniprot.org/> (τελευταία προβολή 16/06/2019).
51. <https://www.bmh.manchester.ac.uk/> (τελευταία προβολή 16/06/2019).
52. <https://skyline.ms/> (τελευταία προβολή 16/06/2019).
53. W. M. A. Niessen. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Taylorand Francis Group, Third Edition, 2006, pp. 3-4.
54. E. Hoffmann, V. Stroobant. *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Third Edition, WILEY, 2007, pp. 167.
55. J. T. Watson, O. D. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry, Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, fourth edition, WILEY, 2007, pp. 10-13.
56. P. J. Sjöberg, C. Bylunda, D. Bookman, K. Markides, *Factors influencing the determination of analyte ion surface partitioning coefficients in*

- electrosprayed droplets*, Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2001, pp. 1002-1010.
57. A. Kot-Wasik, J. Debska, J. Namiesnik, *Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products Trac*, Trends in Analytical Chemistry, 2007, pp. 557-568.
58. R. Dams, A.M. Huestis, W.E. Lambert, C.M. Murphy, *Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003, pp. 1290-1294.
59. Π. Παπαγιαννακόπουλος, Γ. Γ. Λαζάρου, *Φασματοσκοπία Μάζας*, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο φωτοχημείας και κινητικής.
60. R. E. Ardrey, *Liquid chromatography-Mass spectrometry: An introduction* John Wiley and Sons, UK, 2003, pp. 5.
61. Μ. Κουππάρης, Ν. Θωμαΐδης, (2007), *Συστήματα Διασφάλισης Ποιότητας* (Σημειώσεις παραδόσεων), Ε.Κ.Π.Α.
62. Siragakis G., Kizis D. *Food allergen testing: Molecular, immunochemical and chromatographic techniques*, 2014, pp. 49-65.