ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 50, No 1 (1999)

Development of a radioimmunoassay (RIA) method for the isolation, determination and quantification of stilbene residues (DES, DIEN, HEX) in tissues

A. E. TYRPENOU (Α.Ε.ΤΥΡΠΕΝΟΥ)

doi: 10.12681/jhvms.15699

Copyright © 2018, AE TYRPENOU

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

TYRPENOU (Α.Ε.ΤΥΡΠΕΝΟΥ) A. E. (2018). Development of a radioimmunoassay (RIA) method for the isolation, determination and quantification of stilbene residues (DES, DIEN, HEX) in tissues. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *50*(1), 59–71. https://doi.org/10.12681/jhvms.15699

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 19/12/2025 19:03:09

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1999, 50(1):59-71

Ανάπτυξη ραδιοανοσολογικής μεθόδου (RIA) για την απομόνωση, την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των καταλοίπων στιλβενίων (DES, DIEN, HEX) σε ιστούς.

Α. Ε. Τυρπένου[1]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Μία ακριβής, αξιόπιστη και επαναλήψιμη ραδιοανοσολογική μέθοδος αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των στιλβενίων (διαιθυλοστιλβεστρόλη, διενεστρόλη και εξεστρόλη) σε ιστούς. Περιγράφονται και διευκρινίζονται διεξοδικά η αρχή της ραδιοανοσομέτρησης, η παραγωγή αντιορού και ο έλεγχος για την ανεύρεση της άριστης αραίωσης για δέσμευση 50%, οι υπολογισμοί για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και της καμπύλης ελέγχου της διασταυρούμενης αντίδρασης, καθώς και άλλα εξειδικευμένα στάδια της ραδιοανοσομέτρησης. Ο αντιορός αντι-DES που παρήχθη με ανοσοποίηση κουνελιού στις συνθήκες της μεθόδου που τυποποιήθηκε για επίπεδο ευαισθησίας 10 pg/σωλήνα, έδωσε άριστη αραίωση (optimun dilution 50%) 1:4000. Ο αντι-DES ήταν εξαιρετικά ειδικός και με διασταυρωμένη αντίδραση προς την οιστραδιόλη <0.01% και προς την εξεστρόλη 9.6%. Τα προβλήματα που συνήθως προκύπτουν από τη μη ειδική προσρόφηση από τον άνθρακα (charcoal blank) κατά την εκτέλεση της δοκιμής RIA, με αποτέλεσμα τη μη επαναλήψιμη καμπύλη αναφοράς της διαιθυλοστιλβεστρόλης, ξεπεράσθηκαν με τη χρησιμοποίηση μεθανολικού ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος (MeOH:PBS) 20%. Η ανάκτηση του σταδίου της χρωματογραφίας στήλης ήταν >90%, ολόκληρης δε της μεθόδου 65-75%. Η μέθοδος αυτή τυποποιήθηκε σε μυϊκό ιστό μοσχαριών και κοτόπουλων για τον προσδιορισμό των καταλοίπων των στιλβενίων και προτείνεται να χρησιμοποιηθεί ως βασική διαδικασία στην τυποποίηση άλλων μεθόδων ραδιοανοσομέτρησης για τον προσδιορισμό των ορμονικών καταλοίπων στους ιστούς των παραγωγικών ζώων.

[1]*Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Αθηνών - Ι.Κ.Ε.Α. Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας - ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.*

[1]*Institute of Veterinary Research of Athens - I.V.R.A. National Agricultural Research Foundation - N.Ag.Re.F.*

Ημερομηνία υποβολής:30.07.98
Ημερομηνία εγκρίσεως:23.10.98

ABSTRACT. A.E. Tyrpenou[1]. Development of a radioimmunoassay (RIA) method for the isolation, determination and quantification of stilbene residues (DES, DIEN, HEX) in tissues. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 1999, 50(1):59-71.* **An accurate, reliable and reproducible radioimmunoassay (RIA) method was developed and evaluated for the isolation, determination and quantification of stilbenes (DEX, DIEN and HEX) in animal tissue. The radioimmunoassay principle, the production of the antiserum, the optimum dilution for binding at 50% and the cross reactivity determination are described. Also, the calculations for the construction of the standard calibration curve and several other specific steps of RIA are included. DES antiserum was raised in rabbits and under the assay conditions its optimum dilution was found to be 1:4000 and the sensitivity of the assay 10 pg/tube. The DES antiserum produced was very specific, with a crossreactivity for oestradiol <0,01% and for hoexestrol less than 9,6%. However, problems were encountered with regard to non-specific adsorption by charcoal (charcoal blank) during RIA and the reproducibility of the standard curves were overcome by having standards and the assay samples in 20% methanolic: phosphate buffered saline (MeOH:PBS 20%). The recovery of the cleanup step was more than 90% and the recovery of the method was ranged between 65 and 75%. This method has been developed for the analysis of stilbene residues in veal and chicken meat tissue and it is suggested as a basic procedure for the development of other RIA methods for hormone residue determination in food producing animals.**

Λέξεις ευρετηρίασης: RIA, στιλβένια, DES, DIEN, HEX, ιστοί, κρέας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ραδιοανοσομέτρηση (RIA) είναι μια ακριβής και εξειδικευμένη μέθοδος ανάλυσης, η οποία βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της προς μέτρηση ουσίας και μιας καθορισμένης ποσότητας της ίδιας ουσίας ραδιοσημασμένης, για την κατάληψη των ίδιων συνδετικών θέσεων του αντισώματος. Το αντίσωμα αυτό πρέπει να έχει παραχθεί ειδικά για την προς εξέταση ουσία και θα πρέπει να έχει ειδικές θέσεις ικανές να ενωθούν τόσο με τη ρα-

διοσημασμένη μορφή της (*hot substance*) όσο και με τη μη ραδιενεργό μορφή της (*cold substance*), η αντίδραση δε αυτή θα πρέπει να ακολουθεί το νόμο της δράσης της μάζας (mass action law)

$$2A + D + D^* \underset{k'}{\overset{k}{\Leftrightarrow}} AD + AD^*$$

όπου **A** = αντίσωμα

D = ουσία που εξετάζουμε στο δείγμα

D* = η ραδιοσημασμένη μορφή της ίδιας ουσίας

Η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης, ka = k/k' εκφράζει την ικανότητα του αντισώματος να ενωθεί με την προς εξέταση ουσία. Μετά την εξισορρόπηση, η ενωμένη με το αντίσωμα ουσία (υπερκείμενη φάση) διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση από τη μη συνδεδεμένη μορφή (ίζημα άνθρακα), η οποία απομακρύνεται με άνθρακα επικαλυμμένο με δεξτράνη και η ποσότητα ραδιενέργειας της δεσμευμένης από το αντίσωμα ουσίας, που παραμένει στο άλλο κλάσμα, μετριέται (εικόνα 1). Είναι μία μέθοδος "αντίστροφου προσδιορισμού" που σημαίνει ότι **το ποσοστό της ραδιοσημασμένης ουσίας που είναι ενωμένο με το αντίσωμα και μετριέται στο μετρητή β-ακτινοβολίας είναι αντιστρόφως ανάλογο προς το ποσοστό της ουσίας που πραγματικά περιέχεται στο δείγμα.** Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, ενώ, αντίθετα, μειονέκτημά της είναι ότι μέρα με την ημέρα παρατηρούνται διακυμάνσεις και γι' αυτό είναι απαραίτητο να γίνεται καμπύλη αναφοράς με κάθε σειρά δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν[1].

Τα περισσότερα εργαστήρια σε όλο τον κόσμο χρησιμοποιούν τη RIA για τον προσδιορισμό των στεροειδών, μία αναλυτική τεχνική, η ανάπτυξη της οποίας άρχισε στις αρχές της δεκαετίας του '50 στην Αμερική από τους Yalow και Berson (1959), συνεχίσθηκε από τον Ekins (1960) στην Αγγλία και τυποποιήθηκε για τον έλεγχο των στεροειδών από τον Abraham (1969), ο οποίος και κατόρθωσε να παραγάγει αντισώματα κατά της οιστραδιόλης-17β[2].

Η RIA, όπως και η EIA (Enzyme Immunoassay) είναι τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρύτατα από τα εργαστήρια της κλινικής χημείας για τον προσδιορισμό ουσιών με πολύ χαμηλό μοριακό βάρος στα βιολογικά υγρά του σώματος, ειδικά του πλάσματος και του ορού του αίματος, όπως διαφόρων στεροειδών αλλά και στιλβενίων[3]. Γενικά, δεν υπάρχει άλλη τεχνική που μπορεί να συναγωνισθεί και να συγκριθεί στην αξιοπιστία και στην ευαισθησία με την RIA, η οποία φθάνει μέχρι και τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεντρώσεων της τάξεως του fmol[4]. Αν και η μέθοδος αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στις αρχές του 1970, είχε ήδη χρησιμοποιηθεί για αρκετά χρόνια πριν στον προσδιορισμό των ορμονών[5]. Η χρήση των στιλβενίων έχει απαγορευθεί στη ζωϊκή παραγωγή και συμπεριλαμβάνονται στην Ομάδα Α του Παραρτήματος Ι της Οδηγίας 96/23/ΕΕ[6] (ουσίες με αναβολική δράση και μη επιτρεπόμενες ουσίες), ο δε εργαστηριακός έλεγχος για τον προσδιορισμό τους διενεργείται με RIA και διάφορες άλλες τεχνικές, όχι μόνο στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης αλλά και σε πολλά άλλα κράτη του κόσμου, όπως φαίνεται και από τα επίσημα προγράμματά τους που έχουν υποβληθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση[7,8,9,10,11,12,13]

Είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος, η οποία απαιτεί άριστη εκπαίδευση των τεχνικών ανάλυσης καθώς και υψηλή ακρίβεια, ταχύτητα και επαναληψιμότητα των χειρισμών, απαίτηση που κρίνει αποφασιστικά την έκβαση του σωστού αποτελέσματος. Αρκεί να αναφερθεί ότι ένας έμπειρος τεχνικός πρέπει να μπορεί με αυτόματη πιπέτα να πραγματοποιεί, με ακρίβεια και σταθερότητα, μεταφορές μικρών όγκων, 0,1 mL και 0,5 mL, σε τουλάχιστον 100 σωλήνες ραδιοανοσομέτρησης εντός 5 λεπτών της ώρας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

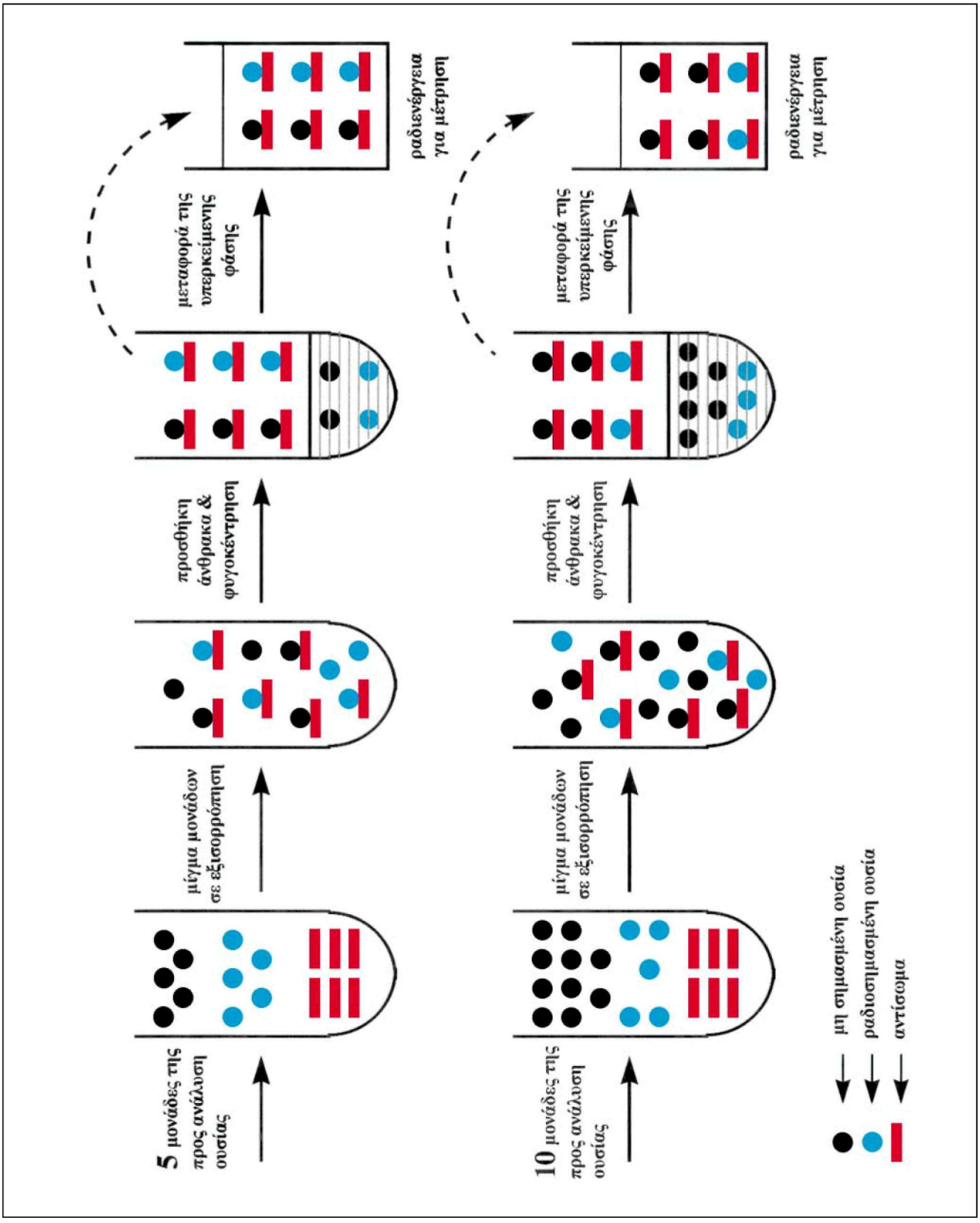
Α. Συσκευές

- Συσκευή λυοφιλίωσης
- Συσκευή κονιοποίησης ιστών (microdismembrator)
- Συσκευή συμπύκνωσης διαλυτών με θερμοκρασία και κενό
- Συσκευή παρασκευής τριμμένου πάγου
- Μηχανικός αναδευτήρας
- Μετρητής β-ακτινοβολίας
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος,
- Ζυγός ακριβείας
- Αυτόματες πιπέτες 10, 100, 200, 1000 μL
- Στήλες χρωματογραφίας γυάλινες 1,0 cm x 24 cm
- Φιάλη αερίου αζώτου
- Τριχοειδείς γυάλινες μικροπιπέτες μιας χρήσεως των 5 μL
- Φιαλίδια γυάλινα με βιδωτό πώμα RIA
- Φιαλίδια πλαστικά με βιδωτό πώμα RIA
- Γυάλινοι σωλήνες εκχύλισης
- Γυάλινοι σωλήνες RIA μιας χρήσεως (neutra1 glass)

➔ ***Οι γυάλινοι σωλήνες RIA πρέπει να είναι πολύ καθαροί και χωρίς ίχνη σκόνης, γι' αυτό πρέπει να ξεπλύνονται πάντα με αιθέρα και να στεγνώνονται πριν από τη χρησιμοποίησή τους.***

Β. Αντιδραστήρια

- [μονοαιθυλική-^{3}H]διαιθυλοστιλβεστρόλη, Amersham International plc, U.K. διατηρημένη σε άνυδρο τολουόλιο κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου στους -20°C. Η σταθερό-



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της αρχής της ραδιοανοσομέτρησης.
Figure 1. Schematic representation of the radioimmunoassay principle.

τητά της δεν είναι μόνιμη και η αποδόμησή της αρχίζει από τη στιγμή της πρώτης χρήσης. Αυτή ανέρχεται σε 1% ανά εβδομάδα κατά τον πρώτο μήνα και στη συνέχεια εντείνεται. Ακόμα η σημασμένη ουσία παρουσιάζει διαφορές από παρτίδα σε παρτίδα και έχει μικρή διάρκεια ζωής.

Κρίσιμο σημείο: το αρχικό πυκνό διάλυμα της σημασμένης ουσίας δεν πρέπει να στεγνώνεται μέχρι ξηρού για να αναγεννηθεί σε άλλο οργανικό διαλύτη, π.χ. μεθανόλη, γιατί η αποδόμησή της γίνεται ταχύτατα.

Ειδική ενέργεια (specific activity):

92 Curies/mmol, 3,40 TBq/mmol

336 mCi/mg, 12,4 GBq/mg

Μοριακό βάρος:

268 (μη σημασμένης ουσίας)

274 (σημασμένης με ^{3}H ουσίας)

Συγκέντρωση ραδιενέργειας:

1,0 mCi/mL, 37,0 MBq/mL

- διαιθυλοστιλβεστρόλη, Sigma D-4628
- n-εξάνιο p.a. Merck
- τολουόλιο p.a. Merck
- μεθανόλη HPLC, Merck
- μίγμα μεθανόλης: νερού 75:25
- αναισθητικός αιθέρας, Baker p.a. Προτιμάται αιθέρας σε συσκευασία των 500 mL για να μη αυξάνονται τα υπεροξείδια, τα οποία προκαλούν άνοδο στις τιμές μέτρησης των τυφλών δειγμάτων.

➔***Διατηρείται στους 4°C στο σκοτάδι, γιατί έτσι περιορίζεται σημαντικά ο αριθμός των σχηματιζόμενων υπεροξειδίων.***

- υγρό καθαρισμού γυάλινου υλικού ειδικό για την πλήρη απομάκρυνση όλων των ραδιενεργών καταλοίπων χρησιμοποιούμενο σε αναλογία από 2 - 5%, Lipsol Liquid concentrate, LIP equipment & services Ltd
- σπινθηριστικό υγρό (scintillation cocktail), INSTA-GEL® United Technologies, Packard Instruments, Η.Π.Α.
- γέλη πυριτίου 70-230 mesh, Merck 7734
- αζίδιο του Νατρίου, Sigma S-2002
- άνθρακας ενεργοποιημένος και πλυμένος με HCl (συντήρηση σε ξηραντήρα), Sigma C-4386
- δεξτράνη (διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου), Sigma D-1390
- ζελατίνη από δέρμα χοίρου, τύπος ΙΙ (διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου), Sigma G-2625
- NaH_2PO_4, Merck 6345
- Na_2HPO_4 άνυδρο, Merck 6580
- χλωριούχο νάτριο, BDH 15327
- νάτριο βόριο υδρύδιο (NaBH4), BDH 30114

Γ. Διαλύματα

- **Διάλυμα εργασίας ^{3}H-DES 7000 cpm/0,1 mL μεθανολικού ρυθμιστικού διαλύματος PBS pH 7,0 (TA-Total Activity).**

Κρίσιμο σημείο: πολύ μεγάλη σημασία έχει η προσεκτική προετοιμασία του διαλύματος εργασίας της σημασμένης ουσίας, για την ορθή εκτέλεση της δοκιμής, την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων καθ' όσον συχνά παρατηρούνται φαινόμενα διάσπασης της σημασμένης ουσίας και απουσία δέσμευσης από το αντίσωμα.

Παρασκευή: από το πυκνό διάλυμα τη ^{3}H-DES σε τολουόλιο, λαμβάνονταν με τριχοειδές ακριβείας μιας χρήσεως των 5 μL , όγκος 5 μL και μεταφερόταν στον πυθμένα γυάλινου φιαλιδίου RIA. Εξατμιζόταν το τολουόλιο σε πολύ ασθενές ρεύμα αζώτου και σε θερμοκρασία 30°C, διαλυόταν σε 1,0 mL μεθανόλης HPLC και αναδεύονταν σε μηχανικό αναδευτήρα. Από το διάλυμα αυτό λαμβάνονταν με πιπέτα ακριβείας 20 μL και μεταφέρονταν σε άλλο καθαρό γυάλινο φιαλίδιο RIA, εξατμίζονταν η μεθανόλη σε ασθενές ρεύμα αζώτου και σε θερμοκρασία 30°C και προσθέτονταν 1,2 mL μεθανολικού ρυθμιστικού διαλύματος PBS pH 7,0 και10 mL σπινθηριστικού υγρού.

[Ο όγκος του 1,2 mL αντιστοιχεί στις συνθήκες της μεθόδου, δηλαδή 1,2 mL είναι ο συνολικός όγκος που χρησιμοποιείται στην TA της σειράς σωλήνων RIA (0,5 mL PBS + 0,1 mL σημασμένη + 0,1 mL αντιορός + 0,5 mL διάλυμα άνθρακα = 1,2 mL].

➔***Προσοχή: η σημασμένη DES διασπάται σε υψηλότερη θερμοκρασία.***

Στη συνέχεια μετρούνταν στο μετρητή β-ακτινοβολίας οι κρούσεις ανά δευτερόλεπτο (counts per minute - cpm) και με τους υπολογισμούς που ακολουθούν, καθοριζόταν ο όγκος που θα πρέπει να ληφθεί από το 1,0 mL του μεθανολικού διαλύματος της σημασμένης για την παρασκευή 10 mL διαλύματος εργασίας, **7000 cpm/0,1 mL.**

άρα, 50.985 cpm είχαμε στα 20 μL

για 10 mL διαλύματος με, 700.000 cpm x ; x = 280 μL

Λαμβάνονταν 280 μL από το διάλυμα της μεθανόλης (του 1 mL), στεγνώνονταν σε χαμηλό ρεύμα αζώτου και 30°C και προσθέτονταν 10 mL μεθανολικού ρυθμιστικού διαλύματος MeOH:PBS pH 7,0 (πρώτα 2 mL μεθανόλης και στη συνέχεια 8 mL PBS), αναδεύονταν στο μηχανικό αναδευτήρα για 5 λεπτά, παρέμεναν για 30 λεπτά της ώρας σε ηρεμία και στη συνέχεια χρησιμοποιούνταν στην ανάλυση RIA

➔***Συντήρηση για μια εβδομάδα στους 4°C***

- **Πρότυπα διαλύματα διαιθυλοστιλβεστρόλης (DES)**

Όλα τα διαλύματα, παρασκευάζονταν έτσι ώστε οι ποσότητες της ουσίας να αντιστοιχούν στο 0,5 mL, όγκο που

χρησιμοποιείται στη RIA. Παρασκευάζονταν κατ' αρχήν πυκνό διάλυμα DES 1 μg/mL σε μεθανόλη HPLC. Από το διάλυμα αυτό μεταφέρονταν 20 mL με πιπέτα ακριβείας σε φιαλίδιο RIA, εξατμίζονταν και προσθέτονταν 2 mL μεθανόλης και 8 mL PBS - 1000 pg/0,5 mL. Ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις με μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα 20% και παρασκευάζονταν τα παρακάτω διαλύματα της καμπύλης αναφοράς: 500 pg/0,5 mL, 250 pg/0,5 mL, 100 pg/0,5 mL, 50 pg/ 0,5 mL, 25 pg/0,5 mL και 10 pg/0,5 mL.

➔***Συντήρηση για μια εβδομάδα στους 4°C***

• **Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα - Phosphate Buffer Saline - PBS 0,1M με pH 7,0**

Το διάλυμα παρασκευαζόταν ως ακολούθως για ένα λίτρο, με τη χρησιμοποίηση υπερ-καθαρού νερού.

NaH_2PO_4	0,03M	NaCl	9,0 g	Ζελατίνη 1,0 g
Na_2HPO_4	0,07M	NaN_2	1,0 g	

➔***Συντήρηση για 15 ημέρες στους 4°C***

• **Μεθανολικό φωσφορικό διάλυμα 20%:** παρασκευαζόταν με μεθανόλη και φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M pH 7,0.

• **Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άνθρακα 2%:** από το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,0 και θερμοκρασίας 4°C, λαμβάνονταν 100 mL και τοποθετούνταν με μαγνητικό αναδευτήρα σε ποτήρι ζέσεως με 0,2 g δεξτράνης και σε ανάδευση για περισσότερο από μισή ώρα. Στη συνέχεια προσθέτονταν 2,0 g άνθρακα με συνεχή ανάδευση.

Κρίσιμο σημείο: επειδή το PBS τη στιγμή της χρήσης του βρίσκεται σε θερμοκρασία 4°C, επιβαλλόταν η ανάδευσή του μετά της δεξτράνης για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο της μισής ώρας πριν από την προσθήκη του άνθρακα, για να μπορέσει να διαλυθεί πλήρως η δεξτράνη, να επικαλύψει τους κόκκους του άνθρακα και να είναι έτσι σε θέση, η νέα αυτή μορφή του άνθρακα, να δεσμεύσει τα μη συνδεδεμένα με το αντίσωμα μόρια του αναλύτη.

➔***Συντήρηση στους 4°C για 1 εβδομάδα.***

• **Τίτλος αντιορού για δέσμευση 50%:** η διαδικασία αυτή γινόταν με την κατασκευή δύο καμπύλων ως ακολούθως: μετά την έξοδο του αντιορού από τους -35°C ακολουθούσε ρευστοποίησή του δια τριβής του δοκιμαστικού σωλήνα μεταξύ των χεριών, λαμβάνονταν με πιπέτα ακριβείας 50 μL πυκνού αντιορού και αραιώνονταν στα 5 mL PBS pH 7,0 δηλαδή αραίωση 1:100. Ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις 1:1.000, 1:2.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 και ραδιοανοσομέτρηση σε τριπλή σειρά σωλήνων.

• μία συγκεκριμένη ποσότητα σημασμένης DES, π.χ. 5000 cpm, αναμιγνύονταν με τις διαδοχικές αραιώσεις του αντιορού. Η αναλογία της σημασμένης ορμόνης που συνδεόταν στο αντίσωμα μειωνόταν αναλογικά με τη μείωση της συγκέντρωσης του αντιορού.

• ομοίως, όπως παραπάνω, αλλά προσθέτονταν και 50 pg μη σημασμένης DES σε κάθε σωλήνα. Η ποσότητα αυτή συναγωνιζόταν με τη σημασμένη DES για θέσεις σύνδεσης στο αντίσωμα, μειώνοντας την αναλογία της σημασμένης DES που θα συνδεόταν , για συγκεκριμένη συγκέντρωση του αντιορού.

• η αραίωση του αντιορού που αντιστοιχούσε στο μέγιστο της διαφοράς ανάμεσα στις δύο καμπύλες (x) παρείχε την άριστη ευαισθησία - αραίωση στο 50%. Η αραίωση αυτή (τίτλος) για τον αντιορό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, βρέθηκε να είναι 1:4000 (εικόνα 2).

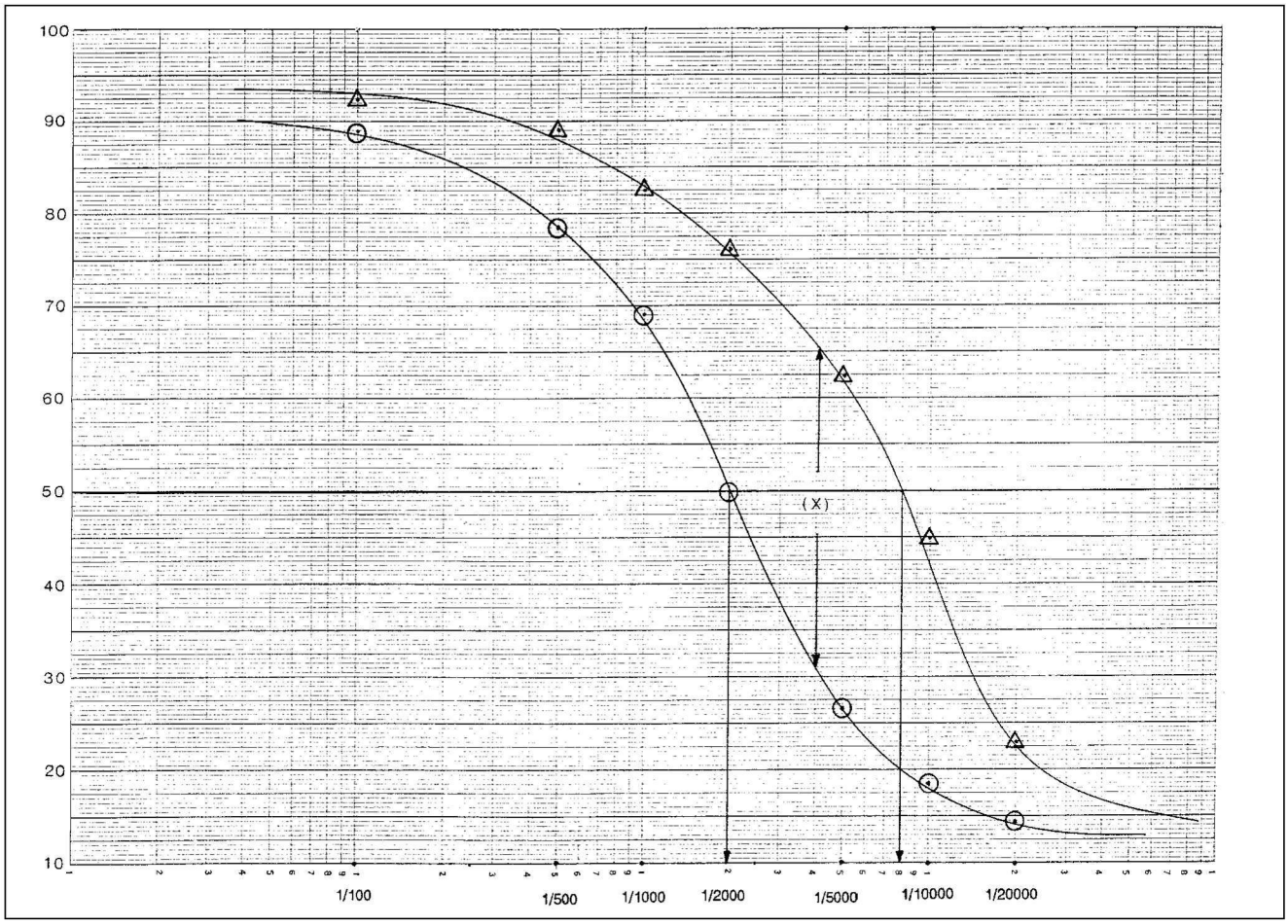
Δ. ΜΕΘΟΔΟΣ

• **Προετοιμασία του δείγματος πριν από την εκχύλιση**

Λαμβανόταν ποσότητα δείγματος καθαρού μυϊκού ιστού σε μικρά τεμάχια συνολικού βάρους 5 g ± 0,1 μέσα σε πλαστικά φιαλίδια από πολυαιθυλένιο. Σφραγίζονταν με φύλλο αλουμινίου, ανοίγονταν 2-3 οπές στο φύλλο αλουμινίου και τοποθετούνταν στους -60°C για χρονικό διάστημα μιας ημέρας. Στη συνέχεια ακολουθούσε λυοφιλίωση για 2-3 ημέρες, καταγραφόταν το ακριβές βάρος του λυοφιλοποιημένου ιστού και ακολουθούσε κονιοποίηση του δείγματος στον κονιοποιητή ιστών για 1-2 λεπτά. Το κονιοποιημένο δείγμα μεταφερόταν με σπάτουλα ξανά στα φιαλίδια τα οποία σφραγίζονταν κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και τοποθετούνταν στο ψυγείο μέχρι την ανάλυση. Η μέση απώλεια υγρασίας των δειγμάτων ήταν περίπου 3,800 g.

• **Εκχύλιση**

0,250 g περίπου κονιοποιημένου κρέατος που αντιστοιχούσε σε 1 g πλήρους κρέατος, λαμβάνονταν σε δοκιμαστικό σωλήνα εκχύλισης και προσθέτονταν 2,0 mL υπερκαθαρού νερού. Αναδεύονταν σε μηχανικό αναδευτήρα, προσθέτονταν 1000 cpm ^{3}H-DES ως εσωτερικό πρότυπο (IS) και εκχυλίζονταν με 2 x 5 mL αιθέρα. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 5 λεπτά και τα αιθερικά εκχυλίσματα μεταφέρονταν σε άλλο σωλήνα, συμπυκνώνονταν σε ρεύμα αζώτου και θερμοκρασία 40°C. Στο ξηρό υπόλειμμα προσθέτονταν 2,0 mL μίγματος μεθανόλης: νερού 75:25. Αναδεύονταν και πλύνονταν με 2 x 5 mL η-εξανίου και το εκχύλισμα συμπυκνωνόταν μέχρι ξηρού σε συσκευή συμπύκνωσης με θέρμανση και κενό. Προσθετόταν 1,0 mL νερού, αναδευόταν με μηχανικό αναδευτήρα και υπέρηχους και στη συνέχεια εκχυλιζόταν με 2 x 3 mL αιθέρα. Τα αιθερικά εκχυλίσματα μεταφέρονταν σε καθαρό γυάλινο φιαλίδιο RIA, συμπυκνωνόταν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια προσθέτονταν 0,2 mL τολουολίου με συνεχή ανάδευση και δράση υπερήχων.



Εικόνα 2. Προσδιορισμός της άριστης αραίωσης του αντιορού για δέσμευση στο 50%.
Figure 2. Determination of the antiserum optimum dilution at 50% binding.

• Χρωματογραφία στήλης

Κρίσιμο σημείο: Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την προετοιμασία της στήλης για έκλουση, γιατί η γέλη πυριτίου με την προσθήκη της μεθανόλης διογκώνεται και γίνεται λευκή, ενώ με την προσθήκη του τολουολίου συρρικνώνεται και γίνεται διαφανής (αυξομείωση του ύψους της στήλης).

Οι συνθήκες του σταδίου αυτού βασίσθηκαν στη μέθοδο του Harwood και συν, (1980)[14] με δικές μας τροποποιήσεις. Η στήλη γέλης πυριτίου, διαστάσεων 1,0 x 8,0 cm, διατηρούνταν μέχρι τη χρησιμοποίησή της σε μεθανόλη. Λίγο πριν από το χρωματογραφικό καθαρισμό του δείγματος, πλυνόταν με 10 mL τολουολίου και στη συνέχεια το τελικό εκχύλισμα (0,2 mL) τοποθετούνταν στην κορυφή της στήλης. Ακολουθούσε πλύσιμο με 5 mL μίγματος 98:2 και 9 mL μίγματος 95:5 τολουολίου: μεθανόλης. Η έκλουση για την παραλαβή των στιλβενίων γινόταν με 7 mL μίγματος 95:5 τολουολίου: μεθανόλης και χωρίς την εφαρμογή κενού. Το κλάσμα αυτό των 7 mL περιέχει >90% της DES (cis & trans μορφές). Εξατμιζόταν με θέρμανση και κενό και στο ξηρό υπόλειμμα προσθέτονταν 2,0 mL μεθανολικού ρυθμιστικού διαλύματος μεθανόλη: PBS pH 7,0 20%, πρώτα 0,4 mL μεθανόλης για την πλήρη παραλαβή της DES (προσρόφηση στο γυαλί) και στη συνέχεια 1,6 mL PBS pH 7,0.

Παρέμενε για 10 λεπτά σε ηρεμία, αναδευόταν ξανά και μετά χρησιμοποιούνταν για τη ραδιοανοσομέτρηση.

• Ραδιοανοσομέτρηση (RIA)

Κρίσιμα σημεία: (1) η ραδιοανοσομέτρηση πρέπει να εκτελείται στους 4°C γιατί με την άνοδο της θερμοκρασίας παρατηρείται αποδέσμευση της ουσίας από το αντίσωμα.

(2) με κάθε σειρά ανάλυσης δειγμάτων πρέπει να χρησιμοποιούνται και δείγματα ελέγχου αρνητικά και θετικά (quality controls samples) στην αρχή, τη μέση και το τέλος της σειράς των σωλήνων καθώς και νέα καμπύλη αναφοράς.

Υπόδειγμα πρότυπης καμπύλης της διαιθυλοστιλβεστρόλης (DES)						
1	2	3	4	5	6	7
Σήμανση	**x cpm**	**– CB**	**%B**	**Λογάριθμος**	**Pg/σωλήνα**	**x4 = pg/ mL**
TA	7780	6.9%				
CB	539	55.6%				
J(0pg)	4324	3785.00				
G(10pg)	3909.00	3370.00	89.035	2.094		
F(25pg)	3336.00	2797.00	73.896	1.040		
E(50pg)	2840.666	2301.66	60.810	0.439		
D(100pg)	2295.333	1756.33	46.402	-0.144		
C(250pg)	1507.333	968.33	25.583	-1.067		
B(500pg)	1236.833	697.833	18.437	-1.626		

Εικόνα 3. Υπολογισμοί της ραδιοανοσομέτρησης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προς ανίχνευση ουσίας.
Figure 3. Radioimmunoassay calculations for the quantitative determination of the substance of concern.

Διαδικασία ραδιοανοσομέτρησης

Η εκτέλεση της δοκιμής γινόταν στους 4°C (σε παγόλουτρο).

1. από τα 2 mL του εκχυλίσματος σε μεθανόλη: PBS 20%, παίρνονταν 0,5 mL σε διπλή σειρά σωλήνων ραδιοανοσομέτρησης (UU).

2. ταυτόχρονα παίρνονταν 0,5 mL από τα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς (10, 25, 50, 100, 250, 500 pg DES/σωλήνα) και από τα δείγματα ελέγχου σε διπλή σειρά σωλήνων (UU) εκτός από το 0, την ολική ενέργεια (TA) και το τυφλό του άνθρακα (CB) που ήταν σε τριπλή σειρά σωλήνων (UUU) και στα οποία μεταφέρονταν 0,5 mL μεθανολικού ρυθμιστικού διαλύματος 20%.

3. ακολουθούσε η προσθήκη σε όλους ανεξαιρέτως τους σωλήνες 0,1 mL διαλύματος σημασμένης ουσίας - αναδευόταν ελαφρά σε μηχανικό αναδευτήρα.

4. προσθετόταν 0,1 mL διαλύματος αντιορού 1:4.000 σε όλους τους σωλήνες εκτός από τους TA και CB, στους οποίους προσθετόταν 0,1 mL μεθανολικού ρυθμιστικού διαλύματος PBS pH 7,0.

5. αναδεύονταν και επωάζονταν στους 4°C μέχρι την επομένη ή κατά ελάχιστο για 4 ώρες και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε παγόλουτρο (παρεμπόδιση της αποδέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος).

6. προσθέτονταν 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος άνθρακα 4°C σε όλους τους σωλήνες εκτός από την TA, όπου προσθέτονταν 0,5 mL μεθανολικού φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 20%. Αναδεύονταν όλοι οι σωλήνες κατά ζεύγη και παρέμεναν σε ηρεμία για 10 λεπτά ακριβώς.

7. ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Επισημαίνεται ότι η φυγόκεντρος θα πρέπει να έχει ήδη τη θερμοκρασία των 4°C πριν από την έναρξη της φυγοκέντρησης.

8. το υπερκείμενο υγρό μεταφερόταν σε φιαλίδιο σπινθηρισμού που περιείχε 10 mL σπινθηριστικό υγρό, αναδευόταν ελαφρά με το χέρι και παρέμενε στο μετρητή β-ακτινοβολίας στο σκοτάδι για μισή έως μία ώρα. Στη συνέχεια ακολουθούσαν δύο διαδοχικές μετρήσεις.

Προσοχή, στο στάδιο μετά τη φυγοκέντρηση γιατί πιθανόν να επιπλέουν κόκκοι άνθρακα στην επιφάνεια του υπερκείμενου υγρού, οι οποίοι δεν πρέπει να μεταφερθούν στο φιαλίδιο της μέτρησης ακτινοβολίας (τα δείγματα αυτά σημειώνονται για να ληφθούν υπόψη κατά τους υπολογισμούς).

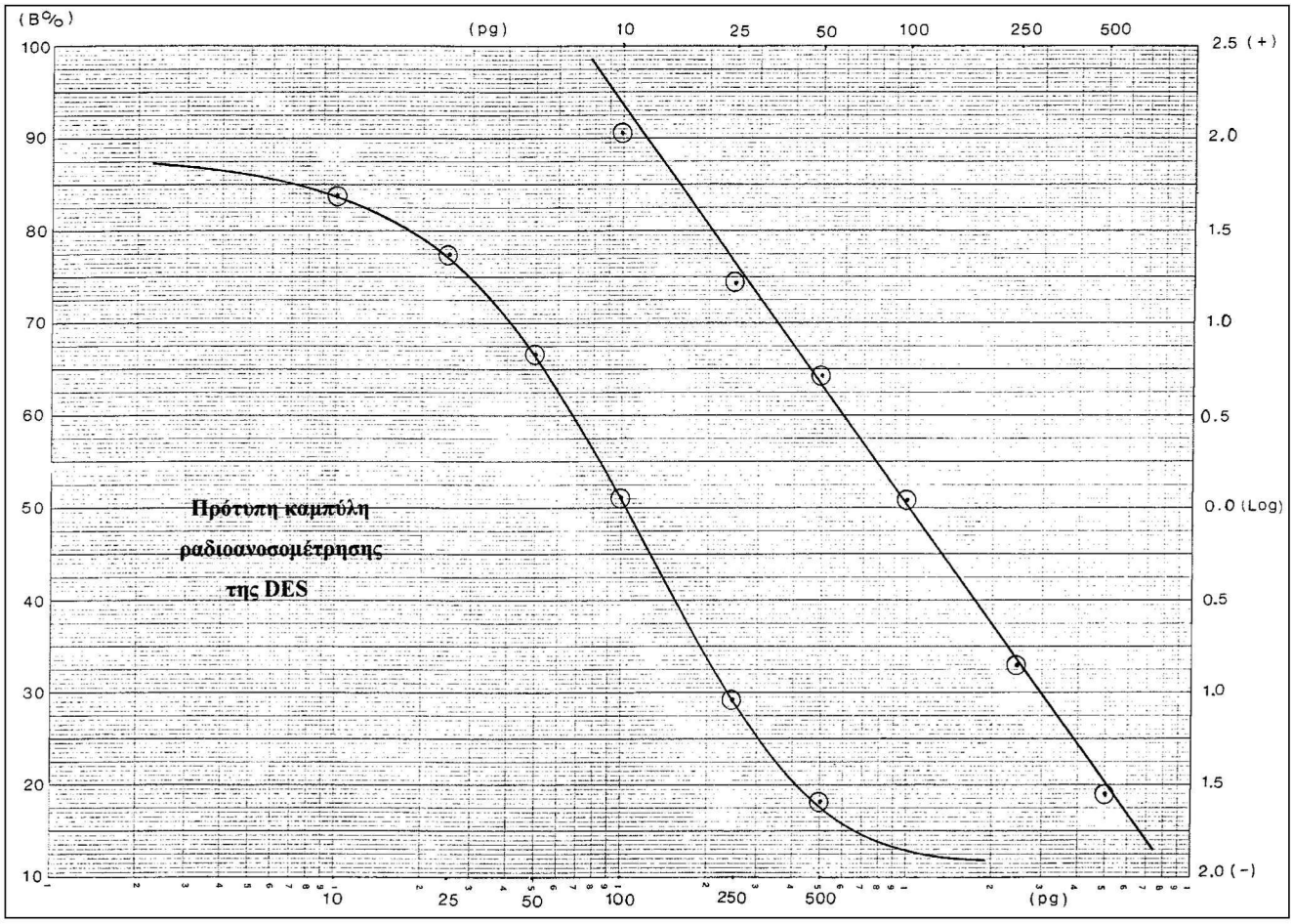
• Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Πριν από τον οποιοδήποτε υπολογισμό πρέπει το τυφλό του άνθρακα (CB = Charcoal Blank) να μας δώσει κρούσεις στο λεπτό (cpm) λιγότερες από 10% της ολικής ενέργειας

(TA = Total Activity) και το μηδέν (J) να είναι χαμηλότερο του 50% της TA. Διαφορετικά η καμπύλη μας δεν είναι σωστή και τα αποτελέσματα ανακριβή. Οι υπολογισμοί των αποτελεσμάτων γίνονται σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα (εικόνα 3):

• όλες οι τιμές που παραθέτονται (στήλη 2) αποτελούν το μέσο όρο των κρούσεων ανά λεπτό (cpm) των διπλών και των τριπλών σωλήνων που προαναφέρθηκαν στη διαδικασία της ραδιοανοσομέτρησης.

• αφαιρείται η τιμή του CB από όλες τις μετρήσεις και οι νέες τιμές που προκύπτουν (στήλη 3) διαιρούνται με την τιμή που μας έδωσε το μηδέν (J) πολλαπλασιαζόμενες ε-



Εικόνα 4. Σιγμοειδής καμπύλη αναφοράς της DES σε λογαριθμικό χαρτί και η μετατροπή της σε ευθεία.
Figure 4. Sigmoid DES standard curve on a logit paper and its transformation to a linear curve.

πί το 100%.

• έτσι τα ποσοστά (στήλη 4) που αποτελούν το ποσοστό δέσμευσης της ουσίας (percentage binding-%B) χρησιμοποιούνται για τη χάραξη της **σιγμοειδούς καμπύλης αναφοράς** της ραδιοανοσομέτρησης στο λογαριθμικό χαρτί.

• από τους λογαριθμικούς πίνακες (logits and antilogits) βρίσκονται οι αντίστοιχοι λογάριθμοι (στήλη 5) και μετατρέπεται η σιγμοειδής καμπύλη σε ευθεία (εικόνα 4).

• οι υπολογισμοί για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς είναι οι ακόλουθοι:

pg/σωλήνα από τον άξονα y της καμπύλης

1,397	1,040
1,698	0,439
2,000	-0,144
2,397	-1,067
2,698	-1,626

Μέσος όρος (x) **x** = 2,038 ± 0,522 **y** = - 0,271 ± 1,084.

<u>Για την εξίσωση y = ax + β</u>

α = -2,074 β=3,958 r=-0,999

<u>Για τη χάραξη της καμπύλης</u>

ποσότητα 10 pg: y = 1,883 ποσότητα 100 g: y = - 0,191

• στη συνέχεια από την τιμή λογαρίθμου του κάθε δείγματος φέρουμε ευθεία προς την καμπύλη και από εκεί κάθετο στον άξονα x από όπου βρίσκουμε την ποσότητα της ουσίας σε pg που περιέχεται σε κάθε σωλήνα (στήλη 6).

• πολλαπλασιάζοντας επί 4 βρίσκουμε την ποσότητα σε pg/mL ή g (στήλη 7) και, τέλος,

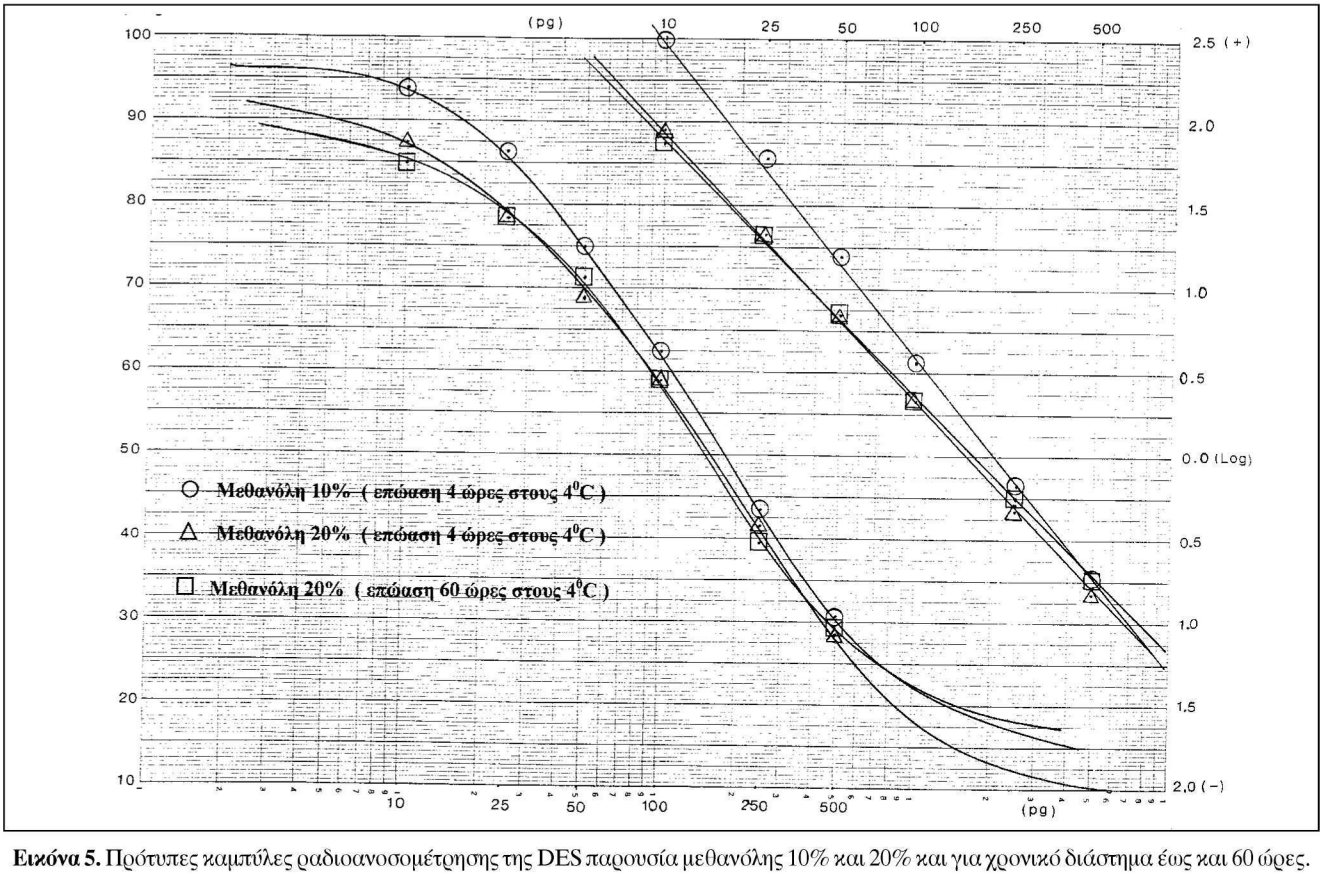
• πολλαπλασιάζοντας επί το ποσοστό ανάκτησης βρίσκουμε την πραγματική συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα.

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

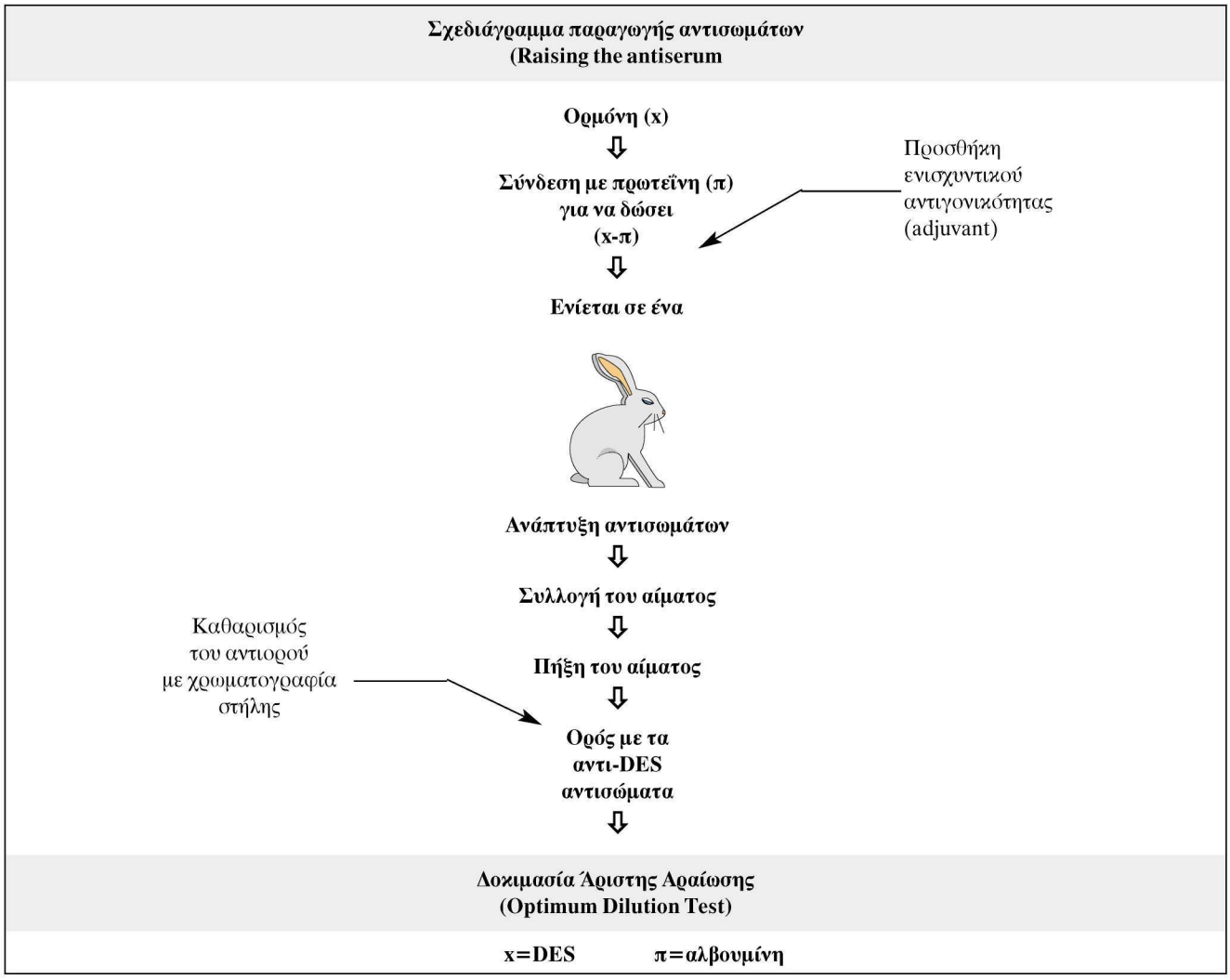
Η ραδιοανοσομέτρηση, μια τεχνική που εμπλέκει τη χημεία και την ανοσολογία, πρέπει να πληροί όλες τις προ-

ϋποθέσεις που είναι απόλυτα απαραίτητες στον προσδιορισμό μιας τόσο μεγάλης ποικιλίας ενδογενών και εξωγενών ουσιών σε βιολογικά υλικά και σε επίπεδα της τάξεως του τρισεκατομμυριοστού του γραμμαρίου ($pg.ml^{-1}$). Επειδή στη διαδικασία της ανάλυσης συμπεριλαμβάνονται και τα στάδια της εκχύλισης και του καθαρισμού του δείγματος, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών που πρόκειται να προσδιορισθούν αλλά και οι ιδιαιτερότητες, τόσο των ουσιών όσο και του είδους του δείγματος, θα πρέπει να ληφθούν επίσης υπόψη. Ειδικά κατά τη βελτιστοποίηση μιας τεχνικής ραδιοανοσομέτρησης οι παράγοντες προσρόφηση, αντιορός, ειδικότητα, καθαρισμός και ευαισθησία, θα πρέπει να πληρούν όλες τις απαραίτητες προϋποθέσεις, πρωτίστως δε θα πρέπει να εξασφαλισθεί η απουσία της μη ειδικής παρεμβολής κατά την αντίδραση αντιγόνου - αντισώματος.

• **Προσρόφηση:** από το δεύτερο ισομερές του α,β-διφαινυλαιθυλενίου (το στιλβένιο), προέρχονται η διαιθυλοστιλβεστρόλη (DES), η εξεστρόλη (HEX) και η διενεστρόλη (DIEN). Ειδικά για τη διαιθυλοστιλβεστρόλη, που φέρει ένα διπλό δεσμό και υφίσταται σε δύο ισομερείς μορφές (cis & trans), έχει διαπιστωθεί ότι το cis ισομερές συνεχώς τείνει να μετατραπεί στο δραστικό trans ισομερές το οποίο παραμένει σταθερό με μια διακύμανση ±10%[15]. Αυτή η σταθερή trans μορφή της DES με το διπλό δεσμό στο μόριό της, διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζει φαινόμενα προσρόφησης στο γυαλί και άλλα υλικά (αστάθεια στη δέσμευση με το αντίσωμα), όταν βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα την έλλειψη επαναληψιμότητας και την απότομη πτώση της καμπύλης αναφοράς. Η ιδιότητα αυτή της διαιθυλοστιλβεστρόλης μας οδήγησε να επιχειρήσουμε την αναγωγή αυτού του διπλού δεσμού με Νάτριο. Βόριο Υδρύδιο ($NaBH_4$) και να παραγάγουμε αντιορό κατά της νέας μορφής της DES. Όμως η ειδικότητα του αντιορού που παράχθηκε, δεν ήταν ικανοποιητική παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες που έγιναν. Τα προβλήματα προσρόφησης τελικά ξεπεράσθηκαν με την προσθήκη μεθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα, η οποία απομάκρυνε την διαιθυλοστιλβεστρόλη από το γυαλί. Οι δοκιμές έγιναν με αναλογίες μεθανόλης:ρυθμιστικού διαλύματος 10% και 20%, ελέγχοντας ταυτόχρονα τη σταθερότητα του αντιορού στη μεθανόλη και για διάφορα χρονικά διαστήματα επώασης στους 4°C. Διαπιστώθηκε ότι η μεθανόλη σε ποσοστό 20% στο ρυθμιστικό διάλυμα δεν επηρέασε το αντίσωμα μέχρι και για 60 ώρες στους 4°C (εικόνα 5). Τροποποιήθηκε στη συνέχεια το στάδιο της παραλαβής του ξηρού υπο-



Εικόνα 5. Πρότυπες καμπύλες ραδιοανοσομέτρησης της DES παρουσία μεθανόλης 10% και 20% και για χρονικό διάστημα έως και 60 ώρες.
Figure 5. Standard radioimmunoassay curves of DES in the presence of 10% and 20% methanol until 60 hours.



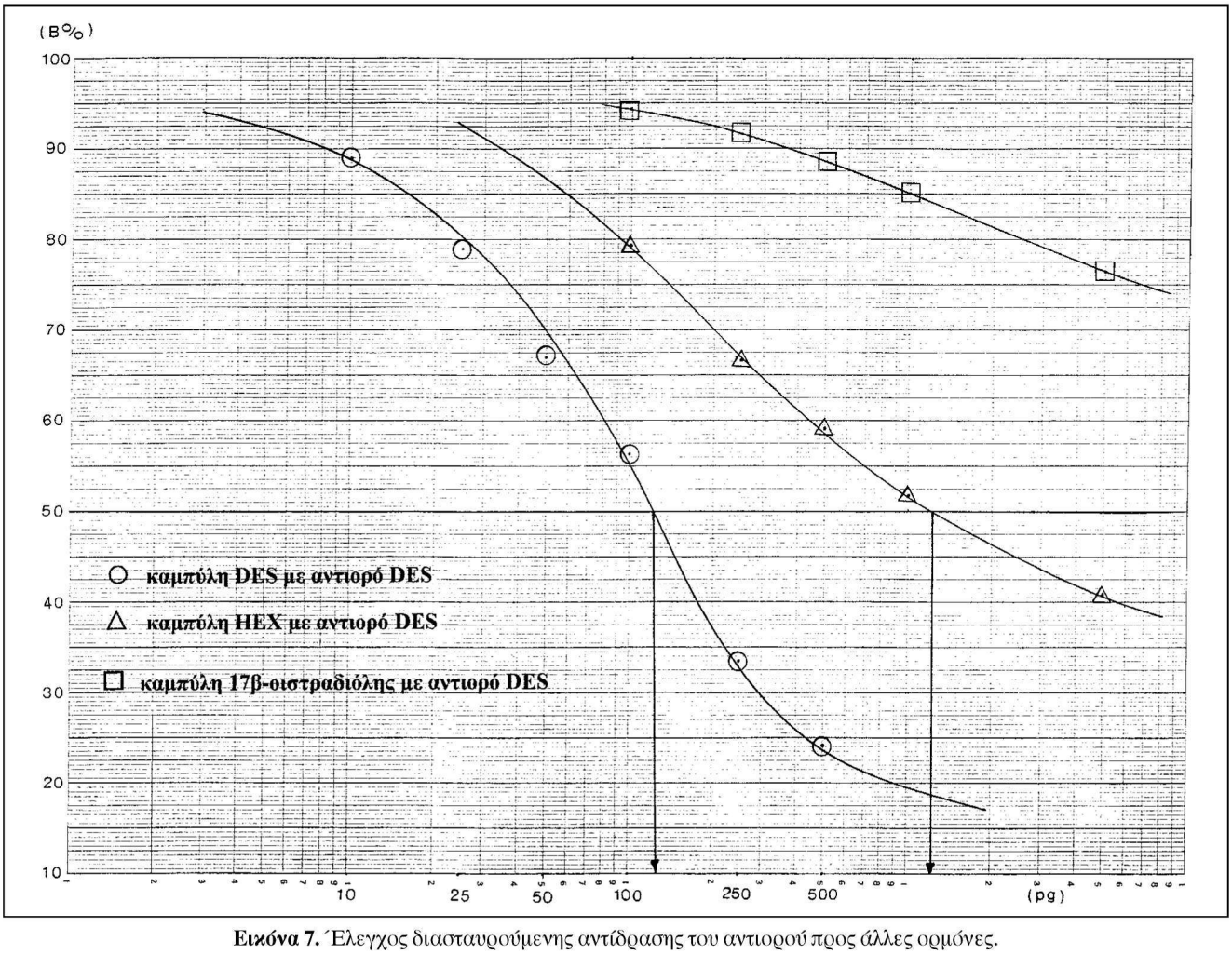
Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση της παραγωγής αντισωμάτων.
Figure 6. Schematic representation of the raising of the antiserum.

λείμματος (ίδε στάδιο χρωματογραφίας στήλης), με την προσθήκη πρώτα της μεθανόλης και στη συνέχεια του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος.

• **Αντιορός:** επειδή τα μικρά μόρια χημικών ουσιών, όπως είναι και οι ορμόνες, δεν έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν την παραγωγή αντισωμάτων (μικρό μοριακό βάρος), πρέπει να συνδεθούν με πρωτεϊνικά μόρια (συνήθως με τη βόειο ή ανθρώπινη αλβουμίνη), για να γίνουν αντιγονικά[5]. Ο αντιορός που χρησιμοποιήθηκε για την τυποποίηση της μεθόδου παρήχθη με ανοσοποίηση κουνελιού ύστερα από έγχυση της DES συνδεδεμένης με βόειο αλβουμίνη και με ταυτόχρονη χορήγηση ενισχυτικού της αντιγονικής διαδικασίας (adjuvant) για 1 έως 2 μήνες. Ακολουθούσε συλλογή ποσότητας αίματος από τη φλέβα του αυτιού, παραλαβή του ορού του αίματος, καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης και έλεγχος της ειδικότητάς του με ραδιοανσομέτρηση (εικόνα 6).

• **Ειδικότητα:** η ειδικότητα του αντισώματος προσδιορίσθηκε με δοκιμές ραδιοανοσομέτρησης για τον έλεγχο της διασταυρούμενης αντίδρασης προς τη 17β-οιστραδιόλη και την εξεστρόλη, που ήταν <0,01% και <9,6% αντίστοιχα. Ο υπολογισμός γίνεται ως εξής: π.χ. για την εξεστρόλη (120 pg : 1250 pg) x 100 = 9,6% (εικόνα 7).

• **Καθαρισμός:** στη διαδικασία της μεθόδου περιλαμβανόταν και ο καθαρισμός του δείγματος με χρωματογραφία στήλης σε γέλη πυριτίου για την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη απομάκρυνση του λίπους. Ο έλεγχος της στήλης καθαρισμού έγινε με τη χρησιμοποίηση προτύπου διαλύματος ^{3}H-DES και την καταμέτρηση της ραδιενέργειας σε κάθε κυβικό εκατοστό εκλούσματος, από την τοποθέτηση του δείγματος μέχρι το τέλος της έκλουσης (συνολι-



Εικόνα 7. Έλεγχος διασταυρούμενης αντίδρασης του αντιορού προς άλλες ορμόνες.
Figure 7. Cross-reactivity of the raised antiserum to other hormones.

κά 27 mL). Διαπιστώθηκε ότι η DES (cis & trans) εκλούεται από τη στήλη μεταξύ 14 και 22 mL και σε ποσοστό >90%. Η ανάκτηση ολόκληρης της μεθόδου υπολογίσθηκε σε 65-75% με την προσθήκη ^{3}H-DES 1000 cpm σε κάθε δείγμα (εικόνα 8).

• **Ευαισθησία - Όριο προσδιορισμού:** η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίσθηκε με επαναληπτικές μετρήσεις αρνητικών δειγμάτων ελέγχου (quality controls - 0 pg/mL), η μέση τιμή των οποίων αφαιρείται από την τιμή μέτρησης των αγνώστων δειγμάτων. Το όριο προσδιορισμού της μεθόδου (ευαισθησία) καθορίσθηκε σε 10 pg διαιθυλοστιλβεστρόλης ανά σωλήνα ραδιοανοσομέτρησης.

• **Αξιοπιστία της μεθόδου:** η αξιοπιστία της μεθόδου που αναπτύχθηκε τεκμηριώθηκε (validation) σε διάστημα έξι ημερών (n=6). Ο μέσος όρος των κρούσεων κατά τη διαδικασία της ραδιοανοσομέτρησης, η τυπική απόκλιση, η μέση τιμή του ποσοστού δέσμευσης στο αντίσωμα και οι αντίστοιχοι συντελεστές παραλλακτικότητας, φαίνονται στην εικόνα 9.

Αν και η χρησιμοποίηση των στιλβενίων στη ζωϊκή παραγωγή έχει απαγορευθεί, εν τούτοις ο έλεγχος για την παρουσία των καταλοίπων τους στους εδώδιμους ιστούς των παραγωγικών ζώων συνεχίζεται και περιλαμβάνεται στα προγράμματα όχι μόνο των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης αλλά και των τρίτων χωρών. Ιδιαίτερης όμως σημασίας είναι τα κατάλοιπα που απαντούν στα σημεία της παράνομης χορήγησης (ενέσεις) και τούτο γιατί τα σημεία αυτά είναι εκείνα που μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στον καταναλωτή, ιδιαίτερα όταν τα τεμάχια αυτά φθάσουν στην επεξεργασία για τυποποίηση. Μία τέτοια περιοχή κρέατος είναι αρκετή για να ρυπάνει μια ολόκληρη παρτίδα, π.χ. παιδικής τροφής, η οποία εάν καταναλωθεί για αρκετές ημέρες θα πρέπει να αναμένονται διάφορα βιολογικά προβλήματα[16].

Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε σκοπό έχει αφ' ενός μεν την εφαρμογή της στον προσδιορισμό των καταλοίπων

				00.0 2.5 5.0 7.5 10.0 E 3
				+----------+---------- +----------+---------- +--
ISOT 1 (*)				
POS	% 1	% 2	RATIO	
001	.10	.00	.00	I*
002	.11	.00	.00	I*
003	.08	.00	.00	I*
004	.06	.00	.00	I*
005	.12	.00	.00	I*
006	.12	.00	.00	I*
007	.13	.00	.00	I*
008	.21	.00	.00	I*
009	.16	.00	.00	I*
010	.13	.00	.00	I*
011	.19	.00	.00	I*
012	.21	.00	.00	I*
013	.24	.00	.00	I*
014	.18	.00	.00	I*
015	1.52	.00	.00	I*
016	10.68	.00	.00	I *
017	12.01	.00	.00	I * Περιοχή έκλουσης της DES
018	9.40	.00	.00	I * (cis & trans)
019	4.98	.00	.00	I *
020	2.56	.00	.00	I *
021	1.14	.00	.00	I *
022	.27	.00	.00	I*
023	.49	00	.00	I*
024	.30	.00	.00	I*
025	.39	00	.00	I*
026	.25	.00	.00	I*
027	.80	00	.00	I*

Εικόνα 8. Υπολογιστική παρουσίαση της έκλουσης ανά 1 mL της ^{3}H-DES από τη στήλη της γέλης πυριτίου.
Figure 8. Computerized representation of the elution profile per 1 mL of ^{3}H-DES from the Silica gel column.

	CPM $\bar{x} \pm$ SD	%B $\bar{x} \pm$ SD	Συντελεστής παραλλακτικότητας CV (RSD) %
TA	7499 ± 282		3.76
C	483 ± 78		16.1
J(0pg)	3931± 445		11.3
G(10pg)	3611± 442	90.65 ± 2.36	2.6
F(25pg)	3 178 ± 348	78.24 ± 3 . I Z	3.9
E(50pg)	2742 ± 277	65.68 ± 3.25	4.9
D(100pg)	2226 ± 211	50.73 ± 3.02	5.9
C(250pg)	1498 ± 207	29.47 ± 3.73	12.6
B(500pg)	1138 ± 200	18.85 ± 2.71	14.3
(n=6)			

Εικόνα 9. Έλεγχος της αξιοπιστίας της ραδιοανοσοβιολογικής μεθόδου που αναπτύχθηκε.
Figure 9. Validated day-to-day parameters of the developed radioimmunoassay procedure.

των στιλβενίων στο κρέας, αφ' ετέρου δε τη χρησιμοποίησή της ως οδηγό για την ανάπτυξη ανάλογων διερευνητικών (screening) τεχνικών υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας στον αγώνα για την ανίχνευση των παράνομων ορμονικών καταλοίπων στα τρόφιμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chapman DI. Radioimmunoassay. Chemistry in Britain 1979, 15:439-447.
2. Exley D. Steroid determination - then and now. Reprinted from: TIBS. Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1979.
3. Reuvers Th, Rerogordo E, Jimenez R. Rapid screening method for the determination of diethylstilbestrol in edible animal tissue by column liquid chromatography with eletrochemical detection. Journal of Chromatography 1991, 564:477-484.
4. Hoffmann B, Blietz C. Application of redioimmunoassay (RIA) for the determination of residues of anabolic sex hormones. Journal of Animal Science 1983, 57:239-246.
5. Boison JO, MacNeil JD. New Test Kit Technology. In:Oka H, Nakazawa H, Harada K, Macneil JD (eds), Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture. AOAC International, USA, 1995:77-119.
6. ΟΔΗΓΙΑ 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 1996, "περί λήψεως μέτρων ελέγχου για ορισμένες ουσίες και τα κατάλοιπά τους σε ζώντα ζώα και στα προϊόντα τους και καταργήσεως των οδηγιών 85/358/ΕΟΚ και 86/469/ΕΟΚ και των αποφάσεων 89/187/ΕΟΚ και 91/664/ΕΟΚ. Επίσημη Εφημερίδα των Ενρωπαϊκών Κοινοτήτων, L125/10.
7. Jansen EHJM, Stephany RW. Effective control for diethylstilbestrol in cattle in the Netherlands. The veterinary Quarterly 1985, 7:35-38.
8. Jansen EHJM, van de Berg RH, van Blitterswijk H, Both-Miedema R, Stephany RW. A high specific detection method for diethylstilbestrol in bovine urine by radioimmunoassay following high performance liquid chromatography. Food Additives and Contaminants 1985, 2:271-281.
9. Aerts CJM, van Baak MJ. Residue levels of natural steroid hormones in edible tissues of veal calves implanted with IMPLIX BF and the effect on removal of the implant prior to slaughtering. In: Proseedings of the EuroResidue Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food. Noordwijkerhout, The Netherlands, 1990:105-109
10. Commission of the European Communities. Plan for the examination for residues in live animals and fresh meat. Bundesministerium für Gesundheit, Sport und Konsumentenschutz, Austria GZ 39.186/5-III/A/3/1994
11. Commission of the European Communities. Plan for the examination for residues in live animals and fresh meat. Servicio Nacional de Sanidad Animal, Plan Anual '94 para el Examen de Residuos en Carnes Frescas, Argentina 1994
12. Commission of the European Communities. Plan for the examination for residues in live animals and fresh meat. National Veterinary and Food Research Institute, Finland 1994.
13. Commission of the European Communities. Plan for the examination for residues in live animals and fresh meat. EC Directorate-Veterinary Services, Albert Town Marsa, Malta 1993
14. Harwood DJ, Heitzman RJ, Jouquey A. A radioimmunoassay for the measurment of residues of anabolic agent, hexoestrol, in tissues of cattle and sheep. J. vet. Pharmacol. Therap., 1980, 3:245-254
15. Tirpenou AE, Kilikidis SD, Kamarianos AP. Modified method for electron capture gas-liquid chromatographic determination of diethylstilbestrol residues in urine of fattened bulls. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1983, 66:1230-1233
16. Hoffman B. Problems of residues and health risks of anabolic agents with sex hormone-like activities. Proceedings of the Scientific Conference on Growth Promotion in Meat Production. Albert Borschette Conference Centre, Brussels, 1995: 271-296