



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη Τοξικών Μετάλλων και Μυκοτοξινών σε πρώτες ύλες

Παπασταμάτη Ιωάννα - Μαρία

Εξεταστική Επιτροπή : Γιδαράκος Ευάγγελος, Καθηγητής Πολυτεχνείου
Κρήτης(Επιβλέπων)

Ξεκουκουλωτάκης Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Πολυτεχνείου
Κρήτης

Βενιέρη Δανάη, Επίκουρη Καθηγήτρια Πολυτεχνείου Κρήτης

Περίληψη

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των τοξικών μετάλλων και των μυκοτοξινών σε δείγματα ζωοτροφών με δύο διαφορετικές μεθόδους : την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης και με την Φασματοσκοπία Μαζών.

Στο πρώτο μέρος γίνεται μια θεωρητική προσέγγιση στις έννοιες των τοξικών μετάλλων και των μυκοτοξινών καθώς και των ειδών που υπάρχουν στην φύση. Πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική έρευνα σχετικά με τις επιπτώσεις των τοξικών μετάλλων στην υγεία καθώς και τον ορίων των μυκοτοξινών που είναι επιτρεπτά στην νομοθεσία. Παρουσιάζονται οι αναλυτικές τεχνικές με τις οποίες έχει πραγματοποιηθεί η ανίχνευση των μυκοτοξινών σε δείγματα.

Στο δεύτερο μέρος πραγματοποιείται εκτενής αναφορά στον τρόπο της δειγματοληψίας και τον τρόπο επεξεργασίας των δειγμάτων πριν την ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS).Επίσης γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων και σχολιασμός τους.

Στο τρίτο μέρος εξάγονται συμπεράσματα από τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων και τεχνικών. Επίσης γίνονται προτάσεις σχετικά με την βελτίωση των μεθόδων για τον καλύτερο προσδιορισμό των υπό ανίχνευση τοξικών μετάλλων και μυκοτοξινών.

Summary

This thesis aims to the qualitative and quantitative determination of toxic metals and mycotoxins in samples of animal feed with two different methods: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Mass Phasmatoscopy.

In the first part, there is a theoretical approach to the concepts of toxic metals and mycotoxins, as well as the species that exist in nature. A bibliographic research was conducted on the effects of toxic metals in health and on the limits of mycotoxins that are permissible by law. The analytical techniques that are used for the detection of mycotoxins in the samples, are also presented.

In the second part, there is an extensive reference in the way of sampling and in the sample processing, before the analysis with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). In addition, there is a presentation and a commentary of the results.

In the third part, conclusions are drawn from the results of the experimental measurements and techniques. Moreover, suggestions are made on the improvement of methods for the best determination of the toxic metals and mycotoxins that are detected.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Γιδαράκο Ευάγγελο για την υπόδειξη του θέματος, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την παρούσα εργασία αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής. Επίσης , θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση στη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

Ευχαριστώ εκ βάθρων την υποψήφια διδάκτορα Φρατζέσκα Πελλέρα για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για την περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις και συμβουλές της, όπως και τη Δρ. Κωνσταντίνα Τυροβολά για το χρόνο και τις γνώσεις που μου προσέφερε τα οποία ήταν καθοριστικά στοιχεία για την περάτωση της εργασίας.

Ευχαριστώ ακόμα τους ΜΥΛΟΥΣ ΚΡΗΤΗΣ για τα δείγματα που μου επέτρεψαν να πάρω αλλά και για την ενημέρωση που μου έκαναν για αυτά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές και τις συμφοιτήτριες μου για τη όμορφη συνεργασία μας αλλά και τη βοήθειά τους πολλές φορές. Είχα την τύχη να είμαι μέλος των εισαχθέντων του 2008 , όπου όλοι ήταν επιμελής φοιτητές και με πάθος για το αντικείμενο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε και με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια με υπομονή και κατανόηση διότι χωρίς τη στήριξη αυτή δεν θα είχα καταφέρει τίποτα από όσα μέχρι σήμερα έχω επιτύχει.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Διαχείρισης Τοξικών και Επικίνδυνων Αποβλήτων του Πολυτεχνείου Κρήτης στην Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος.

Περιεχόμενα

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ	1
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1. Τοξικά Μέταλλα	10
1.1. Επίδραση Τοξικών Μετάλλων και Μέγιστες Επιτρεπτές Τιμές.....	11
1.2. Τοξικά Μέταλλα στις τροφές και η επίδραση στην υγεία	12
1.3. Στοιχεία.....	14
2. Μυκοτοξίνες	35
2.1 . Εισαγωγή	35
2.2. Είδη Μυκοτοξινών	37
2.3. Μυκοτοξίνες: Επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων.....	46
2.4. Νομοθεσία	50
2.5. Ανάλυση και προσδιορισμός μυκοτοξινών	52
2.6. Αναλυτικές Τεχνικές	54
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	59
1.1. Στόχος της εργασίας	59
1.2. Δειγματοληψία	59
1.3. Προετοιμασία δειγμάτων-Μέτρηση υγρασίας	59
1.4. Προσδιορισμός Μετάλλων.....	61
1.5. Προσδιορισμός Μυκοτοξινών	62
1.7. Σχολιασμός Αποτελεσμάτων	65
1.9. Σχολιασμός αποτελεσμάτων	67
Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I</u>	<u>82</u>
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II</u>	<u>84</u>
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III</u>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1 Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του Χαλκού (9)	15
Εικόνα 2 Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του Ψευδάργυρου(9).....	20
Εικόνα 3 Τριχοθυκένια(48)	37
Εικόνα 4 Ωχρατοξίνες(50)	39
Εικόνα 5 Ωχρατοξίνες	40
Εικόνα 6 Φουμονισίνες(51)	41
Εικόνα 7 Συσκευή ομογενοποίησης Pulverisette 19, Fritsch	60
Εικόνα 8 Φούρνος μικροκυμάτων MARS 6	61
Εικόνα 9 Τυπική διάταξη Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης.....	86
Εικόνα 10 Συσκευή.....	88
Εικόνα 11 Διάταξη τριπλού τετραπολικού φασματομέτρου μάζας που χρησιμοποιείται στην τεχνική MS-MS	91

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

<u>Διάγραμμα 1 Συγκεντρώσεις Τοξικών Μετάλλων στα Δείγματα.....</u>	<u>63</u>
<u>Διάγραμμα 2 Βαθμονόμηση Αφλατοξίνης B1</u>	<u>93</u>
<u>Διάγραμμα 3 Βαθμονόμηση Αφλατοξίνης B2</u>	<u>94</u>
<u>Διάγραμμα 4 Βαθμονόμηση Αφλατοξίνης G1.....</u>	<u>94</u>
<u>Διάγραμμα 5 Βαθμονόμηση Αφλατοξίνης G2.....</u>	<u>95</u>

Περιεχόμενα Πινάκων

<u>Πίνακας 1 Περιεκτικότητα Ζωοτροφών σε Τοξικά Μέταλλα.....</u>	<u>13</u>
<u>Πίνακας 2 Πίνακας Ανώτερων Επιπέδων πρόσληψης Χαλκού.....</u>	<u>17</u>
<u>Πίνακας 3 Κατηγορίες Μυκοτοξινών.....</u>	<u>34</u>
<u>Πίνακας 4 Ανώτερα όρια Μυκοτοξινών σύμφωνα με την Νομοθεσία.....</u>	<u>51</u>
<u>Πίνακας 5 Αποτελέσματα Μετρήσεων για τον υπολογισμό του ποσοστού Υγρασίας</u>	<u>59</u>
<u>Πίνακας 6 Χαρακτηριστικά Δοκιμών Εκχύλισης.....</u>	<u>61</u>
<u>Πίνακας 7 Περιεκτικότητα σε Αφλατοξίνες.....</u>	<u>65</u>
<u>Πίνακας 8 Πίνακας Περιεκτικότητας Πρότυπων Δειγμάτων σε Αφλατοξίνες.....</u>	<u>67</u>
<u>Πίνακας 9 Ποσοστό Εκχυλισιμότητας Αφλατοξινών</u>	<u>68</u>
<u>Πίνακας 10 Συνθήκες Τεχνικής Φασματοσκοπίας</u>	<u>93</u>
<u>Πίνακας 11 Ιόντα Αφλατοξινών</u>	<u>93</u>

Περιεχόμενα Σχημάτων

<u>Σχήμα 1 Βιολογικός ρόλος του χαλκού στους ζωντανούς οργανισμούς (170)</u>	<u>16</u>
<u>Σχήμα 2 Ο ρόλος του Ψευδαργύρου στο Κυτταρικό Επίπεδο (171)</u>	<u>22</u>
<u>Σχήμα 3 Τριχοθυκένια τύπου Α και Β(48)</u>	<u>38</u>
<u>Σχήμα 4 Φουμονισίνη Β1 (51).....</u>	<u>42</u>

Εισαγωγή

Στην σύγχρονη εποχή όπου ζούμε, με την περιβαλλοντική μόλυνση να αυξάνεται ραγδαία, είναι πολύ σημαντικό οι τροφές τις οποίες καταναλώνουμε να γνωρίζουμε ακριβώς τι περιέχουν. Για αυτό είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τι ακριβώς καταναλώνουν τα ζώα τα οποία αργότερα θα βρεθούν στο πιάτο μας.

Οι ζωοτροφές που παρασκευάζονται από μεγάλες βιομηχανίες είναι κατά κύριο λόγο οι τροφές που καταναλώνουν τα ζώα σε όλες τις μεγάλες κτηνοτροφικές μονάδες του κόσμου. Οι βιομηχανίες αυτές θα πρέπει να υπακούουν την νομοθεσία σχετικά με το τι ουσίες θα περιέχονται στις τροφές καθώς και στα όρια περιεκτικότητας τους.

Από τα σημαντικότερα συστατικά των ζωοτροφών που θα πρέπει να προσεχθούν είναι τα τοξικά μέταλλα και οι μυκοτοξίνες. Τα δύο αυτά συστατικά σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι επικίνδυνες τόσο για τα ζώα όσο και τον μετέπειτα καταναλωτή τους, τον άνθρωπο. Για αυτόν τον λόγο θεωρείται αναγκαίο ο ακριβής προσδιορισμός των τοξικών μετάλλων και μυκοτοξινών καθώς και οι ακριβείς συγκεντρώσεις τους.

Είναι πολύ σημαντικό λοιπόν να υπάρχουν εύκολες, γρήγορες, αποτελεσματικές και οικονομικές αναλυτικές τεχνικές που θα προσδιορίζουν την περιεκτικότητα των δειγμάτων ζωοτροφών σε τοξικά μέταλλα και μυκοτοξίνες.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Τοξικά Μέταλλα

Ως τοξικά μέταλλα χαρακτηρίζονται τα μέταλλα που έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη από 5.0 g/cm^3 (Fortner and Wittmann ,1983). Βρίσκονται τόσο στην αβιοτική ύλη (πχ ως συστατικά του φλοιού της Γης) όσο και σε όλους τους βιοτικούς οργανισμούς (1) (2). Στα βαρέα μέταλλα περιλαμβάνονται αφενός στοιχεία που είναι αβλαβή και απαραίτητα για την ανάπτυξη των έμβιων οργανισμών σε μικρές μόνο συγκεντρώσεις όπως το κοβάλτιο, ο χαλκός, το νικέλιο, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος και αφετέρου άλλα στοιχεία που δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως η μεταβολική τους αξία όπως το αρσενικό, ο κασσίτερος κ.α., ή είναι τοξικά ανεξαρτήτου συγκέντρωσης όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο, ο υδράργυρος, το αντιμόνιο κ.α. (3).

Τα βαρέα μέταλλα εμφανίζονται στο περιβάλλον είτε από φυσικές πηγές είτε από την έντονη ανθρώπινη δραστηριότητα. Οι φυσικές πηγές είναι η διάβρωση των ακτών από τα ποτάμια και τις θάλασσες, τα ιζήματα που απελευθερώνουν βαρέα μέταλλα με χημικές διεργασίες καθώς και η σκόνη που μεταφέρεται με τον άνεμο από τις ακτές και που περιέχει σε σωματιδιακή μορφή τα μέταλλα. Η έντονη βιομηχανική ανάπτυξη αλλά και τα αστικά απόβλητα δημιουργούν μια μεγάλη συσσώρευση των τοξικών μετάλλων στο περιβάλλον από ανθρωπογενείς παράγοντες (Ε.Σμαραγδάκη).

Τα βαρέα μέταλλα σε αντίθεση με τις περισσότερες τοξικές οργανικές ενώσεις δεν αποικοδομούνται συνήθως, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα (4) (2). Η χημική αυτή ρύπανση του περιβάλλοντος, πρέπει να επισημανθεί ότι οφείλεται τόσο σε φυσικές διεργασίες (έδαφος, ηφαίστεια, πυρκαγιές, βιολογικές δραστηριότητες κ.α.) όσο και σε ανθρώπινες δραστηριότητες (σκόπιμη χρήση χημικών προϊόντων – φυτοπροστατευτικών μέσων, λιπασμάτων, απορρυπαντικών, χρωμάτων, φαρμάκων κτλ – καύση απορριμμάτων και υγρών ή στερεών καυσίμων, γενικά τα προϊόντα της χημικής βιομηχανίας, μεταλλεία, ορυχεία κ.α. (5).

Τα βαρέα μέταλλα μεταφέρονται στον άνθρωπο μέσω δυο σημαντικών οδών : της αναπνευστικής και διαδερμικής οδού και μέσω της τροφικής αλυσίδας. Η αναπνευστική και η διαδερμική θεωρούνται σημαντικοί δίοδοι για την μεταφορά των τοξικών μετάλλων στον άνθρωπο, όταν εκτίθεται συνέχεια σε ρυπασμένο περιβάλλον, ενώ και η τροφική αλυσίδα, αποτελεί οδό μεταφοράς τοξικών μετάλλων αφού μέσω των τροφών συσσωρεύονται μεγάλες ποσότητες στους έμβιους οργανισμούς.

Τα βαρέα μέταλλα έχουν σημαντικές επιπτώσεις στον οργανισμό προκαλώντας την διάσπαση κυτταρικών ένζυμων, τα οποία δρουν ως καταλύτες των θρεπτικών μετάλλων όπως το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, και το σελήνιο. Τα τοξικά μέταλλα αντικαθιστούν τις θρεπτικές ουσίες και δεσμεύουν τους υποδοχείς των θρεπτικών ουσιών. Σχεδόν όλα τα συστήματα του οργανισμού επηρεάζονται από την τοξικότητα των τοξικών μετάλλων, με

κυρίαρχα το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα, το αιμοποιητικό, το νεφρικό και το καρδιαγγειακό.

1.1. Επίδραση Τοξικών Μετάλλων και Μέγιστες Επιτρεπτές Τιμές

Η τοξικότητα των τοξικών μετάλλων διακρίνεται σε οξείας μορφής, όταν γίνεται εισαγωγή μεγάλων ποσοτήτων σε μικρό χρονικό διάστημα, και χρόνιας μορφής που προκαλείται από την συνεχή συσσώρευση μικροποσοτήτων σε μεγάλο χρονικό διάστημα (6). Ανάλογα και οι επιπτώσεις τους μπορούν να διακριθούν σε :

- Ακαριαίες θανάσιμες επιπτώσεις (Acute lethal effects). Ειδικότερα όταν στο σημείο που παρουσιάστηκε διαρροή, προκαλούνται ακαριαίοι θάνατοι διαφόρων οργανισμών.
- Καθυστερημένες θανάσιμες επιπτώσεις (Delayed lethal effects) όταν συμβαίνουν θάνατοι οργανισμών μετά από μερικές ώρες ή και βδομάδες.

Πρέπει να τονιστεί ότι ο θάνατος παρόλο που είναι η πιο δυσμενής και ακραία επίπτωση δεν είναι η μόνη βέβαιη. Η τοξική δράση των τοξικών μετάλλων και άλλων τοξικών ουσιών περιλαμβάνουν πληθώρα γενικών και ειδικών συμπτωμάτων όπως : μεταβολές στο σωματικό βάρος ή το βάρος οργάνων και ιστού, μεταβολές στην κλινική χημεία, στην ανάλυση ούρων, στις αιματολογικές παραμέτρους, διαταραχές του νευρικού ή ενδοκρινικού ή ανοσοποιητικού συστήματος, διαταραχές διαφόρων οργάνων και ιστών εν γένει, των οποίων οι παθολογικές μεταβολές προκύπτουν από την μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέτασή τους κτλ.

Κατ' αυτόν τον τρόπο οι επιπτώσεις διακρίνονται (7)σε :

1. Υποθανατηφόρες επιπτώσεις (sublethal effects) όταν επιδρούν στις λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών.
2. Κυτταρικές αλλοιώσεις (καρκινογένεση) και βαθμιαίες μεταλλάξεις όταν επιδρούν στον κύκλο αναπαραγωγής.

Για την έκφραση της τοξικότητας χρησιμοποιούνται διάφοροι δείκτες τοξικότητας, μερικοί εκ των οποίων είναι :

- LC50 (Lethal Concentration): είναι εκείνη η μέση θανατηφόρα συγκέντρωση της τοξικής ουσίας που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού που εκτίθενται στην τοξική ουσία, εντός 24ωρών. Εκφράζεται σε μονάδες συγκέντρωσης (mg/lit ή mg/kg) της τοξικής ουσίας στο διαλύτη της. Όταν τα ζώα εκτίθενται σε χημικές ουσίες μέσω του αέρα που αναπνέουν ή του νερού που διαβιώνουν η δόση που λαμβάνουν δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί ως δόση από το στόμα ή συγκέντρωση στην τροφή. Επομένως η τοξικότητα εκφράζεται ως LC50: συγκέντρωση ουσίας στο νερό ή αέρα.
- LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level): είναι το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης της τοξικής ουσίας, στην οποία όταν εκτεθεί ο

οργανισμός παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του. Εκφράζεται σε mg τοξικής ουσίας/ kg σωματικού βάρους του πειραματόζωου.

- NOAEL (No Observed Adverse Effect Level): είναι το επίπεδο συγκέντρωσης της τοξικής ουσίας στην οποία όταν εκτεθεί ο οργανισμός δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του. Εκφράζεται σε mg τοξικής ουσίας/ kg σωματικού βάρους του πειραματόζωου.

Όσον αφορά την θεσμοθέτηση ορίων για τον άνθρωπο, διάφορα εθνικά/περιφερειακά ιδρύματα οργανισμοί και αρχές έχουν αναλάβει τις συστηματικές αξιολογήσεις του κινδύνου των θρεπτικών κυρίως ουσιών, σύμφωνα με πρωτόκολλα που έχουν αναπτύξει και δημοσιεύσει. Η αξιολόγηση του κινδύνου των θρεπτικών ουσιών (κυρίως μικροθρεπτικών) ακολουθεί τις γενικές αρχές αξιολόγησης κινδύνου με περιορισμό ότι το παραγόμενο Ανώτερο Ανεκτό Επίπεδο εισαγωγής (UL= Upper Level intake) που «θεωρείται απίθανο να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία όλων σχεδόν των ατόμων ενός γενικού πληθυσμού», δεν πρέπει να είναι χαμηλότερο από το επίπεδο Ημερήσιων Συνιστώμενων Προσλήψεων (RDA). Διευκρινίζεται ότι αφορούν άτομα όλων των ηλικιακών ομάδων, εξαιρουμένων εκείνων που λαμβάνουν μια θρεπτική ουσία υπό ιατρική επίβλεψη, που έχουν γενετική προδιάθεση ή ορισμένες άλλες ασθένειες. Αν τα NOAEL ή ελλείψει κατάλληλων στοιχείων τα LOAEL, στα οποία τα UL βασίζονται, προέρχονται από μελέτες σε ζώα και όχι σε ανθρώπους που είναι βέβαια το πιο επιθυμητό, τότε πρέπει να αξιολογείται η σχετικότητα των παρατηρημένων δυσμενών αποτελεσμάτων για τους ανθρώπους.

1.2. Τοξικά Μέταλλα στις τροφές και η επίδραση στην υγεία

Τα μέταλλα αυτά έχουν είτε γεωλογική προέλευση, αφού είναι φυσικά συστατικά του φλοιού της γης, τα οποία δεν μπορούν να υποβιβαστούν ή να καταστραφούν, είτε προέρχονται από τη βιομηχανική δραστηριότητα και την ατμοσφαιρική ρύπανση, απ' όπου εισέρχονται στο έδαφος και το νερό. Μεταξύ των ρυπογόνων πηγών περιλαμβάνονται οι βιομηχανίες τροφίμων, οι υφαντουργίες, οι βιομηχανίες φαρμακευτικών ειδών, παραγωγής μυκητοκτόνων και εντομοκτόνων, οι μονάδες αποτέφρωσης στερεών απορριμμάτων, οι καυστήρες κατοικιών κ.λπ. Οι τοξικοί αυτοί ρύποι καταλήγουν στο έδαφος, στα ύδατα, στην ατμόσφαιρα και κατ' επέκταση στους πνεύμονες, το πιάτο και το ποτήρι μας.

Δυστυχώς, αποτελούν σοβαρή απειλή για την υγεία μας, διότι δρουν συσσωρευτικά, ιδίως στον εγκέφαλο και στα νεφρά, τείνοντας να προκαλέσουν ορισμένες φορές πολύ σοβαρά προβλήματα. Μάλιστα, σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να οδηγήσουν άμεσα σε δηλητηρίαση. Η δηλητηρίαση αυτή μπορεί να προέλθει π.χ. από τη μόλυνση του πόσιμου νερού (σωλήνες, υψηλές συγκεντρώσεις αέρα από πηγές εκπομπής δηλητηριωδών αερίων, από βλαβερά τρόφιμα και από την όξινη βροχή). Εκτός αυτού, μερικά βαρέα μέταλλα, όπως το χρώμιο, μπορούν να έχουν, πιο μακροπρόθεσμα, και πιθανές καρκινογόνες επιδράσεις.

Τα ψάρια είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στους περιβαλλοντικούς ρύπους, διότι τα ύδατα μπορούν να μολυνθούν εύκολα από τα βιομηχανικά λύματα. Έτσι, μετά από διάφορες εκθέσεις των επιπέδων του υδραργύρου σε κάποια είδη ψαριών, όπως ο ξιφίας, οι ευρωπαϊκές αρχές εξέδωσαν προειδοποιήσεις ότι αυτά τα ψάρια θα πρέπει να αποφεύγονται στην εγκυμοσύνη και τον θηλασμό καθώς και στην παιδική ηλικία. Περιστασιακή κατανάλωση από άλλους καταναλωτές δεν είναι πιθανό να δημιουργήσει πρόβλημα, ωστόσο η πρόσληψη πρέπει να περιορίζεται το πολύ σε μία φορά την εβδομάδα.

Στην καθημερινότητά μας μπορούμε να βρούμε βαρέα μέταλλα και σε διάφορες άλλες πηγές. Ο μόλυβδος για παράδειγμα, βρίσκεται σε εντομοκτόνα σπρέι, σε μεταλλικά και πήλινα σκεύη. Αντίστοιχα, μπορούμε να συναντήσουμε τον υδράργυρο, εκτός από τα ψάρια που προέρχονται από μολυσμένα ύδατα, ακόμα και σε σφραγίσματα δοντιών – μάλιστα αυτό αποτελεί αντικείμενο διχογνωμίας, το αν δηλαδή με τη διάβρωση κραμάτων ελευθερώνονται ιόντα υδραργύρου.

Για τον μόλυβδο, ειδικά, πηγές μόλυνσης θεωρούνται οι βιομηχανίες κονσερβών, παραγωγής χρωμάτων κ.λπ. Στα ζώα, ο μόλυβδος συγκεντρώνεται κυρίως στα οστά, στο συκώτι, στους νεφρούς και δευτερευόντως στο κρέας. Όσοι καταναλώνουν κρέας από επιβαρυμένη περιοχή (π.χ. βιομηχανική) επιβαρύνονται με μόλυβδο και κάδμιο ακόμη και 50% περισσότερο από εκείνους που έχουν τη δυνατότητα να προμηθεύονται προϊόντα από «καθαρές» εκτροφές.

Η ρύπανση των εδαφών και του νερού από κάδμιο προέρχεται κυρίως από τις βιομηχανίες επεξεργασίας χαλκού, χρωμάτων, πλαστικών και μεταλλείων ψευδαργύρου. Ο άνθρωπος προσλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό καδμίου από τις τροφές και το υπόλοιπο από το νερό και το κάπνισμα, και σταδιακά συσσωρεύεται κυρίως στο ήπαρ, τους νεφρούς, το σπλήνα και το θυρεοειδή αδέν, όπου προκαλεί σοβαρές παθήσεις.

Πέρα από τους παραπάνω τρόπους επιμόλυνσης των τροφίμων, κάποιες φορές, η ίδια η συσκευασία μπορεί να γίνει πηγή αλλοίωσης του προϊόντος, λόγω μεταφοράς ορισμένων συστατικών της στο τρόφιμο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «μετανάστευση» και εμφανίζεται στα πλαστικά μέσα συσκευασίας, στα μεταλλικά, τα χάρτινα, ακόμα και στο γυαλί που θεωρείται χημικά αδρανές υλικό συσκευασίας αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό.

Έτσι, όσον αφορά στα βαρέα μέταλλα, φαίνεται να υπάρχει ιδιαίτερο πρόβλημα στα περισσότερα είδη συσκευασίας. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των κεραμικών (πήλινων) συσκευασιών έχει βρεθεί ότι περιέχουν μόλυβδο, αργίλιο και κάδμιο σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. Αντίστοιχα, οι χάρτινες συσκευασίες μπορεί να περιέχουν κάδμιο. Στις κονσέρβες, έχει εκφραστεί ανησυχία ως προς τον κασσίτερο, ότι μπορεί να μεταναστεύσει στα περιεχόμενα τρόφιμα, όμως στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα απαντάται μόνο στην ανόργανη μορφή του, της οποίας τα επίπεδα είναι γενικά αποδεκτά. Σε συσκευασίες όμως από PVC, όπως είναι τα πλαστικά μπουκάλια αναψυκτικών, όπου χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής σαν διβουτυλιούχος

κασσίτερος, είναι δυνατόν, υπό ορισμένες συνθήκες, να μεταναστεύσει στο τρόφιμο. Επίσης, σχετικά με τα αλουμινένια κουτιά, μπορεί το αλουμίνιο γενικότερα να θεωρείται ως πιο ασφαλές από τον FDA, αλλά στο αργίλιο που χρησιμοποιείται ως υλικό συσκευασίας, προστίθενται κι άλλα μέταλλα, όπως σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος ή/και χρώμιο για να του αυξήσουν τη μηχανική αντοχή, την ανθεκτικότητα στη διάβρωση και την ικανότητα μορφοποίησής του. Αυτά όμως τα μέταλλα μαζί με το αργίλιο, είναι δυνατόν να μεταναστεύσουν στο τρόφιμο, αν επέλθει διάβρωση. Τέλος, το γυαλί μπορεί να έχει πρόβλημα με το φθόριο, αλλά ο κίνδυνος επιμόλυνσης των τροφίμων από μετανάστευση μολύβδου και καδμίου στο γυαλί είναι εξαιρετικά μικρός, δεδομένου ότι αυτά τα δύο μέταλλα πολύ σπάνια υπάρχουν σε γυαλί που προορίζεται να έρθει σε επαφή με τρόφιμα. (8)

Οι μελέτες έχουν δείξει τα παρακάτω αποτελέσματα σε περιεκτικότητα τοξικών μετάλλων σε διάφορα είδη ζωοτροφών (9) :

Πίνακας 1 Περιεκτικότητα Ζωοτροφών σε Τοξικά Μέταλλα

mg/g	Ca	P	Mg	K	Na
Μίγμα συμπυκνωμένων χωρίς την προσθήκη μακροστοιχείων	0,137	0,356	0.325	0,750	0,144
Μίγμα συμπυκνωμένων με την προσθήκη μακροστοιχείων	1,014	0,388	0,679	0,709	0,775
Ενσίρωμα Καλαμποκιού	0,415	0,121	0,187	0,904	0,068
Βαμβακόπιτα	0,104	0,249	0,377	0,793	0,02
Πούλπα Σακχαρότευτλων	0,654	0,019	0,177	0,49	0,375
Σανός μηδικής	0,825	0,119	0,225	1,637	0,063
Πλακούντας Σόγιας	0,313	0,297	0,289	1,792	0,064
Χόρτο βοσκής	0,662	0,138	0,228	1,515	0,449

1.3. Στοιχεία

Τα σημαντικότερα στοιχεία των Τοξικών μετάλλων είναι τα ακόλουθα :

- **Χαλκός**

Η ονομασία Χαλκός (Cuprum) και το σύμβολο Cu προέρχονται από το λατινικό aes Cuprium. Τα κυριότερα από τα ορυκτά του είναι ο κουπρίτης ή κυπρίτης (Cu_2O), ο χαλκοσίτης ή χαλκοσίνης ή χαλκολαμπίτης (Cu_2S), ο χαλκοπυρίτης (CuFeS_2), ο ατακαμίτης ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$) και ο χαλκοίτης – (CuSO_4) ή θειικός χαλκός ή γαλαζόπετρα.

Όπως φανερώνει η εμπειρική ονομασία του είναι γαλάζιου χρώματος και το οφείλει στα πέντε μόρια νερού με τα οποία συνδέεται το μεταλλικό ιόν. Όταν το νερό απομακρυνθεί, ο άνυδρος θειικός χαλκός γίνεται λευκός.

Σχετική Ατομική Μάζα	Πυκνότητα (g/cm ³ σε 1 Atm ή 760 Torr στους 20°C)
63,546	8,92
Ηλεκτρονική διαμόρφωση	1^ο δυναμικό ιονισμού
[Ar]3d¹⁰4s¹	7,726
Σθένος (μεγαλύτερο =σταθερότερο) 2^{,1}	Θερμοκρασία τήξης (°C)
Φυσική κατάσταση	1083.4⁰C
Στερεή (S)	Αριθμός φυσικών ισοτόπων
Ατομικός αριθμός	2
29	

Εικόνα 1 Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του Χαλκού (9)

Ο χαλκός έχει τις ακόλουθες φυσικές ιδιότητες (Wikipedia) :

1. Από τα πιο γνωστά χαρακτηριστικά του χαλκού είναι το κοκκινωπό του χρώμα.
2. Είναι σχετικά μαλακό μέταλλο (βαθμός σκληρότητάς 2,5 –3 στην κλίμακα Mohs)
3. Είναι ιδιαίτερα ελατό και όλκιμο
4. Θεωρείται το μέταλλο με την μεγαλύτερη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα μετά τον άργυρο.

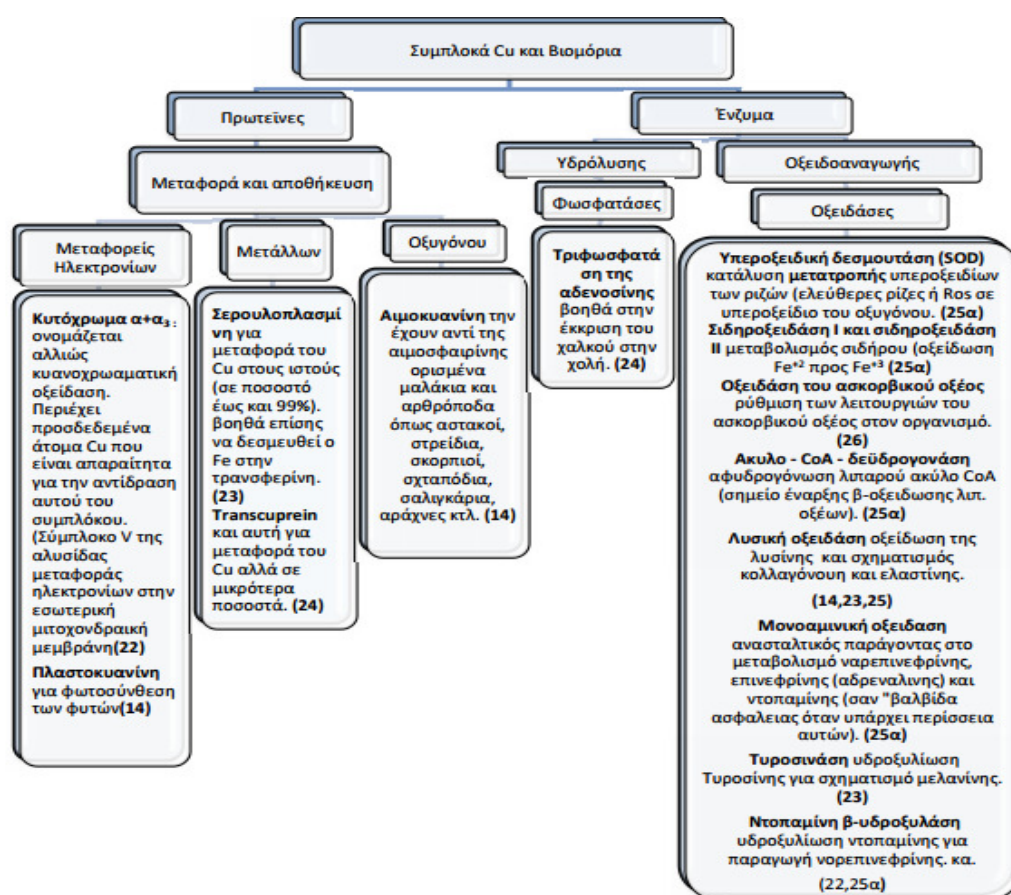
Οι χημικές ιδιότητες του στοιχείου του χαλκού είναι :

1. Ο χαλκός είναι το 29ο χημικό στοιχείο στον Περιοδικό Πίνακα και βρίσκεται στην 11^η (IB) ομάδα . Συμπεριλαμβάνεται στα μεταβατικά στοιχεία.
2. Ως μέταλλο δεν μετατρέπεται εύκολα σε ηλεκτροθετικό ιόν επειδή στην ηλεκτροχημική σειρά βρίσκεται κάτω από τον υδράργυρο, γι' αυτό δεν αντιδρά με το νερό και δεν ελευθερώνει υδρογόνο κατά την αντίδραση με τα οξέα.
3. Σταθερή οξειδωτική κατάσταση του Cu σε υδατικά διαλύματα είναι η Cu (II) λόγω της μεγαλύτερης θερμότητας εφυδάτωσης από την αντίστοιχη οξειδωτική κατάσταση του Cu(I)
4. Η προσβολή του χαλκού από διάφορα οξέα γίνεται με ποικίλους τρόπους. Διαλυτοποιείται ταχύτατα με το HNO₃, με το πυκνό θερμό H₂SO₄, ενώ όσον αφορά το υδροχλωρικό οξύ (HCl), πρακτικά ο χαλκός δεν διαλύεται (9) (10).
5. Μεταξύ των κυριότερων κραμάτων του συμπεριλαμβάνονται οι ορείχαλκοι, μπρούντζοι, νεάργυροι κτλ. (9)(1).

Οι εφαρμογές του χαλκού είναι αρκετές και σημαντικές. Χρονολογικά ο χαλκός χρησιμοποιήθηκε από τον άνθρωπο ύστερα από τον χρυσό, ακολουθώντας ως τρίτος στην σειρά ο σίδηρος λόγω της δύσκολης κατεργασίας του (9) (11).. Από άποψη χρησιμότητας και πάλι έρχεται δεύτερος μετά τον σίδηρο όμως αυτή την φορά. Στον Όμηρο, εμφανίζεται

πολύ συχνά και φαίνεται να είναι συνώνυμος με τα όπλα και τον θάνατο, εντούτοις είχε και άλλες χρήσεις. Από την εποχή εκείνη χρονολογείται η επένδυση των υφάλων των πλοίων με φύλλο χαλκού για την προστασία τους από το σάπισμα. Τα ύστερα χρόνια χρησιμοποιείται σε σκεύη μαγειρικής, στην ναυπηγική και στην πολεμική βιομηχανία. Οι νέες εφαρμογές αφορούν την χρησιμοποίησή του στην γεωργία, κτηνοτροφία, για τον έλεγχο ασθενειών των φυτών και ζώων καθώς και ως αυξητικός παράγοντας σαν πρόσθετο στην διατροφή των τελευταίων. Επίσης ως αντιμικροβιακός παράγοντας στο νερό και στις ενδονοσοκομειακές μολύνσεις, ως ενισχυτικό χρώματος και τέλος στην βιομηχανία για την παρασκευή κραμάτων για κατασκευή ηλεκτρικών μηχανών, συρμάτων, στη βιομηχανία αυτοκινήτων κτλ.

Σχήμα 1 Βιολογικός ρόλος του χαλκού στους ζωντανούς οργανισμούς (170)



Ο χαλκός έχει και σημαντική διατροφική αξία. Επίσημα είναι αναγνωρισμένος κανονικό συστατικό του αίματος και βρίσκεται σε ίχνη στους ζωντανούς οργανισμούς όπως όλα τα βιολογικού ενδιαφέροντος μεταβατικά στοιχεία (με εξαίρεση το σίδηρο).

Το ιχνοστοιχείο, λοιπόν αυτό πρέπει απαραίτητως να το προσλαμβάνουν οι ζωντανοί οργανισμοί από την τροφή τους, μιας και η έλλειψη του προκαλεί σοβαρότατες διαταραχές. Στα φυτά, η έλλειψη είναι συχνή γιατί προμηθεύονται την τροφή τους από το έδαφος που πολλές φορές δεν έχει την απαιτούμενη ποσότητα εξαιτίας του ότι η περιεκτικότητα του εδάφους σε χαλκό ποικίλει γεωγραφικά αλλά και κατά γενική ομολογία η περιεκτικότητα είναι μικρότερη από ότι ήταν στα μέσα του 20ου αιώνα (12). Στα ζώα και πολύ περισσότερο στον άνθρωπο, η ποικιλία και η πρόσληψη των τροφών τους είναι τέτοια που δεν πρέπει να αντιμετωπίζεται έλλειψη χαλκού.

Το ζήτημα ύπαρξης ή όχι της δυνατότητας πρόκλησης δηλητηρίασης με χαλκό απασχολεί επί έτη πολλούς ερευνητές, οδηγώντας σε πληθώρα πειραματισμών και ενίοτε σε αντιφατικές απόψεις. Παλαιότερα υπήρχε η πεποίθηση ότι προκαλείται δηλητηρίαση από την κατανάλωση, κυρίως τροφών που είχαν παρασκευαστεί σε ακασσιτέρωτα ή κακώς κασσιτερωμένα χάλκινα σκεύη είτε από την βρώση σταφυλιών που είχαν ψεκαστεί προηγουμένως καθώς και από την κατανάλωση τροφίμων νοθευμένων με άλατα του χαλκού. Υποστηριζόταν ακόμη ότι μπορούσε να προκληθεί λόγω της προσβολής του μετάλλου από τα οργανικά οξέα των μαγειρεμένων τροφίμων κατά την διατήρηση αυτών σε ατελώς κασσιτερωμένα χάλκινα σκεύη, είτε μέσω κατανάλωσης πόσιμου νερού από χάλκινες υδραυλικές εγκαταστάσεις. Σήμερα όμως επανεξετάζονται οι προαναφερόμενοι ισχυρισμοί, αφού περισσότερο βάσιμοι και αποδεκτοί φαίνεται να είναι αυτοί που υποστηρίζουν ότι δηλητηρίαση με ενώσεις του χαλκού δεν είναι δυνατή με οποιονδήποτε τρόπο.

- Οι ενώσεις του χαλκού έχουν έντονη τοπική ερεθιστική ενέργεια η οποία έχει ως συνέπεια την πρόκληση εμετού και συνεπώς την απομάκρυνση του δηλητηρίου.

- Ο οργανισμός των περισσότερων ανθρώπων είναι σε θέση να ελέγχει τα αυξημένα ποσά πρόσληψης χαλκού μέσω ομοιοστατικού μηχανισμού (μειωμένη απορρόφηση αυξημένη έκκριση).

- Από τα διαθέσιμα στοιχεία, όσον αφορά τις ανθρώπινες εκθέσεις σε χαλκό, ιδιαιτέρως στην Ευρώπη και Αμερική, πιο μεγάλος κίνδυνος υπάρχει από την ανεπαρκή πρόσληψη χαλκού απ' ότι από την υπερβολική πρόσληψή του.

Όταν όμως εμφανιστούν συμπτώματα τοξικότητας αυτά οφείλονται είτε σε τυχαία προκληθείσα δηλητηρίαση είτε λόγω επαγγελματικών συνθηκών ή μόλυνσης του περιβάλλοντος καθώς και σε διάφορες συγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού του χαλκού στον άνθρωπο. Δεδομένου ότι ο υπερβολικός χαλκός εκκρίνεται μέσω της χολής είναι πιθανή η εμφάνιση τοξικότητας από Cu σε ασθενείς με προβλήματα στην χολή ή στο ήπαρ, χωρίς όμως να σημαίνει αυτό ότι συνδέεται η τοξικότητα από χαλκό με αυξημένη θνησιμότητα από τις ασθένειες του ήπατος. Όπως επίσης η εκδήλωση βαρέως γαστρεντερικού συνδρόμου ή και θανάτου ακόμη, σε μικρά παιδιά ή σε ηλικιωμένα άτομα εξαντλημένα ή πάσχοντα από νοσήματα της καρδιάς και

των νεφρών, οφείλεται στην προκαλούμενη αφυδάτωση και των εξ αυτής διαταραχών των ηλεκτρολυτών.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι μερικοί ερευνητές θεωρούν ότι τα αυξημένα επίπεδα χαλκού σε συνδυασμό με χαμηλά επίπεδα ψευδάργυρου μπορούν να συμβάλλουν σε πολλές ιατρικές καταστάσεις όπως της υπέρτασης, της γεροντικής άνοιας, της επιλόχειας κατάθλιψης, του προεμμηνορρυσιακού συνδρόμου, της αϋπνίας, των πονοκεφάλων, του αυτισμού, σε ορισμένους τύπους καρκίνων κτλ. Συνεπώς η εμφάνιση και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων σχετίζεται με την ποσότητα της δόσης αλλά πολύ περισσότερο με την διάρκεια και την συχνότητα έκθεσης καθώς και στην εν γένει κατάσταση της υγείας και ευαισθησίας του κάθε ατόμου.

Τα ανώτερα επίπεδα πρόσληψης χαλκού για τον άνθρωπο και όπως αυτά έχουν προς το παρόν καθοριστεί από την SCF της Ευρωπαϊκής Ένωσης και από την EVM στο Ηνωμένο Βασίλειο παρουσιάζονται στον επόμενο συγκριτικό πίνακα:

Πίνακας 1 Πίνακας Ανώτερων Επιπέδων πρόσληψης Χαλκού

	EU: SCF (2003)	UK: EVM (2003)
ULs *	ULs: Ενήλικοι: 5 mg/ημέρα Παιδιά 1–3 χ: 1 mg/ ημέρα Παιδιά 4–6 χ: 2 mg/ ημέρα Παιδιά 7–10 χ: 3 mg/ ημέρα Παιδιά 11–14 χ: 4 mg/ ημέρα Παιδιά 15–17 χ: 4 mg/ ημέρα	SUL ** 0.16 mg/kg βάρους σώματος/ ημέρα (ισοδυναμεί με 10 mg/ ημέρα σε ενήλικα 60 kg)
Εισαγωγή -Εκτίμησης	Τροφή και συμπληρώματα διατροφής: (δημοσιευμένοι πίνακες): Μέσος όρος (3 μελέτες): - Αρσενικό: 1.5–1.6 mg/d - Θηλυκό: 1.2 mg/d - Οικογένειες: 1.4 mg/d 97.5 ^a εκατ θέση (3 μελέτες): - Αρσενικό: 3.1–3.5 mg/d - Θηλυκό: 2.7–2.8 mg/d - Οικογένειες: 2.8 mg/d Νερό: Διοχέτευση με σωλήνες χαλκού που χρησιμοποιούνται για τη διανομή ύδατος μπορεί να προσθέσει 0,1 mg/ημέρα στην εισαγωγή χαλκού όταν το νερό είναι σκληρό ενώ 10 φορές περισσότερο επί της ποσότητας αυτής όταν το νερό είναι όξινο και μαλακό. Τα τρέχοντα πρότυπα της ΕΕ είναι 2 mg/L για το μέγιστο συγκέντρωση του χαλκού μέσα πόσιμο νερό. Άλλες εκθέσεις: Εκπομπές από τα μεταλλεία, χυτήρια, καύση άνθρακα για παραγωγή ενέργειας από δημοτικούς αποτεφρωτήρες αποβλήτων	Τροφή: Μέσος όρος : 1.4 mg/ ημέρα 97.5 ^a εκ. θέση = 3.0 mg/ ημέρα (NDNS ^a , 1986/7) Συμπληρώματα: Μέχρι 2 mg/ημέρα (OTC 2001; στοιχεία πωλήσεων) Πόσιμο νερό: Μέχρι 6 mg/ημέρα (σε υποθετική κατανάλωση 2 L/ημέρα νερού με συγκέντρωση χαλκού 3 mg/L) Κατ' εκτίμηση μέγιστη καθημερινή εισαγωγή: 3.0 + 2 + 6 = 11 mg/d Καμία πιθανή υψηλή ομάδα εισαγωγής δεν έχει προσδιοριστεί
Συζήτηση	(σαν χαρακτηρισμό κινδύνου) Η 97,5 εκατοστιαία θέση της συνολικής πρόσληψης χαλκού για όλες τις ηλικιακές ομάδες είναι κοντά στο ULs, η οποία σύμφωνα με την άποψη της Επιτροπής δεν είναι θέμα ανησυχίας. Πρόσθετες εισαγωγές χαλκού από το πόσιμο νερό μπορεί να είναι αξιόλογες και μπορεί να χρειαστεί να ληφθεί υπόψη.	(σαν συζήτηση σχετικά με SUL) Τα άτομα στο UK θα μπορούσαν θεωρητικά να καταναλώσουν παραπάνω από 6 mg χαλκού/ημέρα από νερό μόνο εάν καταναλώνεται σε φυσιολογικά πλαίσια. Εντούτοις, στο UK τα επίπεδα χαλκού στο πόσιμο νερό είναι πολύ χαμηλότερα οπότε σε τόσο υψηλό επίπεδο έκθεσης είναι απίθανο να εμφανιστεί. Δεν υπάρχει κανένα στοιχείο στο UK σχετικά με τέτοια πρόσληψη χαλκού στο νερό που να παρουσιάζει οποιοδήποτε κίνδυνο για την υγεία.

EU: SCF =European Commission, Scientific Committee on Food/ UK: EVM = United Kingdom, Expert Group on Vitamins and Minerals, Food Standards Agency/ US/Can: IOM = United States of America and Canada, Institute of Medicine

*UL (Upper Level of intake) : ανώτερο επίπεδο εισαγωγής = το ανώτατο όριο της συνήθους της συνήθους πρόσληψης ενός μικροθρεπτικού συστατικού που θεωρείται απίθανο να οδηγήσει σε δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων. Αντιπροσωπεύει την ολική πρόσληψη από τρόφιμα, νερό και συμπληρώματα, εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά.

**SUL (Safe Upper Level for total daily consumption over a lifetime), α

NDNS = UK National Diet and Nutrition Survey,

EPA = US Environmental Protection Agency

• Υδράργυρος

Η χρόνια εισπνοή ενώσεων ανόργανου υδραργύρου μπορεί να προκαλέσει μείωση της λειτουργίας του αισθητήριου και του κινητικού νεύρου, κατάθλιψη, οπτικές και ακουστικές παραισθήσεις μυϊκό τρόμο, διαταραχές στον ύπνο, αλλαγές στην αυτόνομη λειτουργία (καρδιακός σφυγμός, πίεση αίματος, αντανakλαστικά), εξασθενημένο οπτικοκινητικό συντονισμό, διαταραχές στην ομιλία, άνοια, κώμα και θάνατο.

Οι ατμοί υδραργύρου του αμαλγάματος διαπερνούν εύκολα την κυτταρική μεμβράνη και δεσμεύουν τις θειικές (SH, sulphhydryl) ομάδες, με συνέπεια την αδρανοποίηση ενώσεων του θείου και τη "φραγή" ενζυμικών λειτουργιών, όπως για παράδειγμα με την κυστεΐνη και την διοξυγενάση, καταλήγοντας στην παραγωγή μεταβολιτών του θείου με ακραία τοξικότητα που ο οργανισμός δεν μπορεί να αποβάλλει.

Δηλητηρίαση από υδράργυρο έχει προξενήσει πάρα πολλά συμπτώματα τα τελευταία χρόνια στους ανθρώπους. Μεταξύ αυτών είναι : ALS, Parkinson, σωματονευρικές παθήσεις, σύνδρομο κοπώσεως. Τελευταία στη Αμερική απεδείχθη ότι ο υδράργυρος παίζει ένα σπουδαίο ρόλο στην ασθένεια του Αυτισμού. Πάνω από δύο εκατομμύρια έχουν επηρεασθεί από τον αυτισμό.

• Μόλυβδος

Ο μόλυβδος αποτελεί το 5^ο πιο κοινό χρησιμοποιούμενο μέταλλο. Η ανθρώπινη έκθεση στον μόλυβδο προκύπτει κυρίως από την κατάποση νερού, από μόρια που περιέχουν μόλυβδο τα οποία διακινούνται μέσα στην ατμόσφαιρα καθώς και από βαφές που περιέχουν μόλυβδο. Ο καπνός από τα τσιγάρα αποτελεί επίσης μια σημαντική πηγή έκθεσης στον μόλυβδο. Άτομα τα οποία καπνίζουν ή αναπνέουν καπνό από τσιγάρα είναι πιθανώς περισσότερο εκτεθειμένα σε μεγαλύτερα επίπεδα μολύβδου απ' ότι άτομα που δεν εκτίθενται στον καπνό. Υπάρχουν στοιχεία τα οποία υποδεικνύουν ότι ο μόλυβδος μπορεί να προκαλέσει οξυθυμία, κούραση, δυσκολία στην επεξεργασία πληροφοριών, προβλήματα μνήμης, μείωση των χρόνων αίσθησης και μηχανικής αντίδρασης, βλάβη στην διαδικασία λήψης αποφάσεων καθώς και μειωμένη ικανότητα συγκέντρωσης. Σε συγκεντρώσεις μολύβδου στο αίμα περί των 80-100 mcg/dL, προκύπτει ιδιαίτερα σοβαρή εγκεφαλοπάθεια.

Παρόμοια καταστροφικά αποτελέσματα μπορεί να προκαλέσει η μόλυνση από Αργίλιο, Αρσενικό και Ψευδάργυρο κ.α

- **Ψευδάργυρος**

Η ελληνική ονομασία του μετάλλου, ψευδάργυρος, υποδηλώνει κάποια ομοιότητα με τον άργυρο, χωρίς ωστόσο να έχουν πολλά κοινά σημεία. Στο σχήμα εμφανίζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες του στοιχείου του ψευδαργύρου.

Σχετική Ατομική Μάζα	Πυκνότητα (g/cm ³ σε 1 Atm ή 760 Torr στους 20°C)
65,39	7,14
Ηλεκτρονική διαμόρφωση	
[Ar]3d¹⁰4s²	
Σθένος (μεγαλύτερο =σταθερότερο) 2	1^ο δυναμικό ιονισμού
Φυσική κατάσταση	9,394
Στερεή	Θερμοκρασία τήξης (°C)
(S)	420⁰C
Ατομικός αριθμός	Αριθμός φυσικών ισοτόπων
30	5

Εικόνα 2 Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του Ψευδάργυρου(9)

Οι φυσικές ιδιότητες του Ψευδαργύρου είναι (9), (13) (14), (15) :

- Είναι ένα λαμπερό μέταλλο, λευκοκυανίζον ή κυανούν
- Είναι μαλακό μέταλλο (βαθμός σκληρότητας 2,5 στην κλίμακα Mohs).
- Είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού.
- Είναι διαμαγνητικό μέταλλο.
- Είναι επίσης πτητικό

Ο Ψευδάργυρος εμφανίζει σημαντικές χημικές ιδιότητες και οι οποίες είναι :

- Ο ψευδάργυρος είναι το 30^ο χημικό στοιχείο στον Περιοδικό Πίνακα και στην 12η (IIB) ομάδα που είναι και η τελευταία των μεταβατικών στοιχείων του d τομέα του Περιοδικού Πίνακα, παρόλο που όπως και η προηγούμενη ομάδα (IB) έχουν συμπληρωμένα τα d εσωτερικά τροχιακά τους (9) (16)
- Η μόνη σταθερή οξειδωτική κατάσταση του ψευδαργύρου είναι η Zn(II)
- Το ότι ο Zn και το Cd σχηματίζουν πιο εύκολα και σε μεγαλύτερο βαθμό ενώσεις καθώς και ότι υδρολύονται οι περισσότερες σχεδόν αμέσως και βίαια απ ότι του Hg που έχει μεγαλύτερη πολωτική ισχύ (δηλ. τάση για ομοιοπολικές ενώσεις),

οφείλεται στο ότι ο ιοντικός χαρακτήρας των πρώτων είναι μεγαλύτερος ακολουθώντας την εξής σειρά $Zn \geq Cd \geq Hg$.

- Ως δραστικό μέταλλο λοιπόν, διαλύεται σε όλα τα αραιά ισχυρά οξέα καθώς επίσης και στο οξικό οξύ με έκλυση υδρογόνου (H_2). Τέλος διαλύεται και σε οξειδωτικά οξέα όπως το πυκνό – θερμό θειικό οξύ (H_2SO_4) (17).

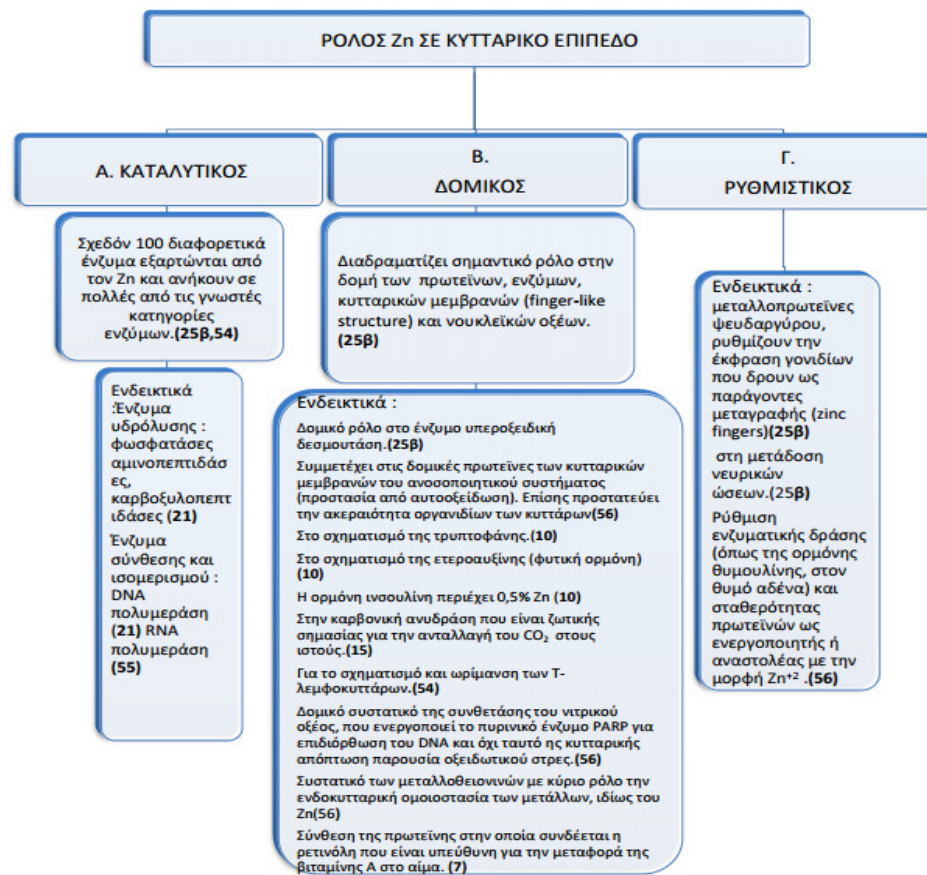
- Το πιο ενδιαφέρον σημείο που αφορά την ταχύτητα αντίδρασης με τα αραιά οξέα, είναι ότι σχετίζεται περισσότερο με την καθαρότητα του μετάλλου, παρά με την συγκέντρωση του οξέος. Έτσι, ο πολύ καθарός ψευδάργυρος αντιδρά εξαιρετικά αργά με αυτά όπως και με τον υγρό ατμοσφαιρικό αέρα.

- Διαλυτοποιείται επίσης εύκολα σε διαλύματα ισχυρών βάσεων όπως πχ το KOH , με έκλυση H_2 όπου σχηματίζεται λευκό, ζελατινώδες ίζημα $Zn(OH)_2$, το οποίο θεωρείται επαμφοτερίζον υδροξείδιο.

- Μεγάλες ποσότητες ψευδαργύρου χρησιμοποιούνται στην παρασκευή κραμάτων με χαλκό, αργίλιο, χρυσό, μόλυβδο, νικέλιο, σίδηρο κτλ

Η βιολογική σπουδαιότητα του ψευδαργύρου είναι σημαντική όντας απαραίτητο για τη διατήρηση κάθε μορφής ζωής. Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την διατήρηση και λειτουργία της όσφρησης, της γεύσης, καθώς και της όρασης (18). Μια άλλη αίσθηση που φαίνεται ότι ίσως επηρεάζεται η λειτουργία της από τον ψευδάργυρο, είναι αυτή της ακοής, αφού σύμφωνα με τους επιστήμονες αν και δεν είναι τόσο σαφής ο ρόλος του Zn στις εμβοές (δηλ. αν οφείλονται αυτές σε έλλειψη του ιχνοστοιχείου), εντούτοις εντοπίζεται και στα ακουστικά νεύρα.

Σχήμα 2 Ο ρόλος του Ψευδαργύρου στο Κυτταρικό Επίπεδο (171)



Τέλος λόγω της δράσης του στο DNA, που το καθιστά απαραίτητο σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενους ιστούς, όπως ο μυελός των οστών, ο θύμος αδένας καθώς και λόγω της συμμετοχής του σε αντιδράσεις σύνθεσης ή αποδόμησης σημαντικών μεταβολιτών (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη) δηλαδή στην παραγωγή ενέργειας, συμβάλλει στην φυσιολογική ανάπτυξη κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, στην παιδική και εφηβική ηλικία.

Ο ψευδάργυρος ήταν γνωστός ως απαραίτητο ιχνοστοιχείο από το 1869, όταν ο Raunlin παρατήρησε μη κανονική ανάπτυξη του *Aspergillus niger* σε μειωμένες συγκεντρώσεις Zn. Αντίστοιχα η κατανόηση της σημασίας και αξίας του ιχνοστοιχείου για τον άνθρωπο έγινε μόλις το 1962, όταν περιγράφηκαν για πρώτη φορά κλινικά συμπτώματα ανεπάρκειας ψευδαργύρου σε νεαρά παιδιά από το Ιράν και την Αίγυπτο. Ο ψευδάργυρος βρίσκεται σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Τα στρείδια περιέχουν τον περισσότερο ψευδάργυρο ανά μερίδα από οποιοδήποτε τρόφιμο. Μάλιστα αναφέρεται ότι ένα μόνο στρείδι αρκεί για να καλυφθεί το 70% σχεδόν των ημερήσιων αναγκών ενός ενήλικα (18) (19) (20).

Το ουσιαστικό αυτό ιχνοστοιχείο επίσης είναι όχι μόνο, φυσιολογικά παρόν ή προστιθέμενο σε φυσικά τρόφιμα αλλά διαθέσιμο και ως συμπλήρωμα διατροφής. Τα συμπληρώματα με δισκία ψευδαργύρου, περιέχουν διάφορες

μορφές του, συμπεριλαμβανομένου του γλυκονικού ψευδαργύρου καθώς και του θειικού ή του οξικού άλατος του ψευδαργύρου. Ερευνάται πάντως ακόμη αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μορφών που διατίθεται όσον αφορά την απορρόφηση, την βιοδιαθεσιμότητα ή την ανεκτικότητα τους από τον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι απαραίτητο να διευκρινισθεί ότι ακόμη και αν γίνει πρόσληψη αρκετών ποσοτήτων ψευδαργύρου, ενδέχεται να μην επαρκούν. Αυτό οφείλεται στο ότι διάφοροι διατροφικοί παράγοντες επηρεάζουν την απορρόφηση του. Ειδικότερα η αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα του από τις ζωικές τροφές, πιστεύεται ότι οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με διάφορα αμινοξέα, με κυριότερα την μεθειονίνη και κυστεΐνη (21). Επίσης η ενζυματική δράση της μαγιάς στο ψωμί, κάνει πιο βιοδιαθέσιμο, τον περιεχόμενο ψευδάργυρο, μιας και μειώνονται τα επίπεδα φυτικού οξέος που ως γνωστόν μειώνουν είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με το ασβέστιο την απορρόφηση του Zn. Άλλοι διατροφικοί παράγοντες που μειώνουν την απορρόφηση ή αυξάνουν την απέκκρισή του από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι το φολικό οξύ, η αιθανόλη και το κάδμιο. Όσον αφορά τον σίδηρο, έχει βρεθεί ότι εμποδίζει την απορρόφηση του ψευδαργύρου, μόνο όταν λαμβάνεται με την μορφή συμπληρωμάτων και με άδειο στομάχι, σε αντίθεση με αυτόν που περιέχεται φυσικώς στα τρόφιμα ή προστίθεται σε αυτά. Προσοχή πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι και η επεξεργασία των τροφίμων επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητα του ψευδαργύρου. Για παράδειγμα, η θέρμανση των τροφών προκαλεί την δημιουργία συμπλόκων που αντιστέκονται στην υδρόλυση και δυσκολεύουν την απορρόφηση του.

Οι δηλητηριάσεις με ψευδάργυρο είναι σπάνιες. Παλαιότερα οι περισσότερες οφείλονταν σε τυχαία λήψη αλάτων του ψευδαργύρου ή σε φαρμακευτικά λάθη, μετά από λήψη $ZnSO_4$ αντί $MgSO_4$ ή υψηλών δόσεων κατά τη θεραπευτική χρήση των ενώσεων του μετάλλου. Σήμερα οι δηλητηριάσεις με ψευδάργυρο είναι κυρίως χρόνιες επαγγελματικές, μολονότι και αυτές ακόμη αμφισβητούνται από ορισμένους ερευνητές, οι οποίοι τις αποδίδουν σε προσμίξεις άλλων μετάλλων και όχι στον ψευδάργυρο. Παρόλα αυτά δεν μπορεί κανείς να αρνηθεί την παρουσία ανεπιθύμητων ενεργειών από την τοξική δράση των αλάτων και ατμών του ψευδαργύρου. Συγκεκριμένα ασκούν έντονη τοπική ερεθιστική ενέργεια τόσο στο δέρμα όσο και στους βλεννογόνους. Με τη λήψη μάλιστα των αλάτων του από το στόμα η πρόκληση εμετού, ως αποτέλεσμα της τοπικής αυτής ερεθιστικής δράσης, περιορίζει αρκετά την τοξικότητα του μετάλλου, λόγω αποβολής του. Σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες δε, είναι δυνατό να προκληθούν αντανεκλαστικώς περιφερική κυκλοφορική ανεπάρκεια ή και θάνατος, εξαιτίας και πάλι της έντονης ερεθιστικής επενέργειας. Άλλα όργανα του σώματος στα οποία ασκεί τοξική επίδραση ο ψευδάργυρος, είναι στους νεφρούς, προκαλώντας οξεία σωληναριακή νέκρωση, στους πνεύμονες δημιουργώντας χημική πνευμονίτιδα εξαιτίας εισπνοής $ZnCl_2$ και τέλος στο πάγκρεας με αποτέλεσμα την αύξηση επιπέδων γλυκόζης και αμυλάσης καθώς και μείωση των συγκεντρώσεων του ασβεστίου. Στοιχεία τα οποία να αποδεικνύουν ότι ο

ψευδάργυρος ασκεί καρκινογόνο ή τερατογόνο δράση στον άνθρωπο δεν υπάρχουν. Αντιθέτως σε περίπτωση ανεπάρκειας του μετάλλου κυρίως στα πρώτα δύο τρίμηνα της κύησης, είναι πιθανόν να παρατηρηθεί τερατογένεση στο έμβρυο. Επισημαίνεται ότι αν και ο χρωμικός ψευδάργυρος θεωρείται πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο, εντούτοις αυτό οφείλεται στην τοξική δράση του εξασθενούς χρωμίου.

Γενικά πάντως οι επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου αρχίζουν σε επίπεδα πρόσληψης 10-15 φορές πάνω από το RDA δηλ. μεταξύ 100-250 mg/ημέρα. Ιατρικές εξετάσεις που να δείχνουν κατά πόσο ένα άτομο έχει εκτεθεί σε υψηλές δόσεις ψευδαργύρου γίνονται μέσω εργαστηριακών μετρήσεων στο αίμα, στα περιττώματα, στα ούρα, στο σάλιο και στις τρίχες. Μάλιστα το ποσό ψευδαργύρου που περιέχουν οι τρίχες αφορά την μακροπρόθεσμη έκθεση στο μέταλλο, χωρίς ωστόσο να είναι σαφής η σχέση ανάμεσα στα επίπεδα Zn στις τρίχες και του ποσού έκθεσης. Τέλος, είναι άξιο αναφοράς, το γεγονός ότι ο ίδιος ψευδάργυρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση άλλων ιόντων τοξικών μετάλλων, Cu (II), Pb (II), Bi (III), Cd (II), Hg (II), Co (II), Ag (I) και Ni (II), σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις (submicromolar).

- **Νικέλιο**

Το Νικέλιο είναι το 24^ο στοιχείο σε περιεκτικότητα στον φλοιό της γης. Είναι πολύ διαδεδομένο στο ανθρώπινο περιβάλλον. Εξάγεται σε μεταλλεύματα όπως τα θειούχα ορυκτά περτλανδίτης και σιδηρονικελίουχος πυρόλιθος. Το νικέλιο είναι συστατικό πολλών κραμάτων που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή μαγειρικών σκευών και αντικειμένων ανθεκτικών στην διάβρωση, στην κοπή νομισμάτων, στον εξοπλισμό χημικών βιομηχανιών, σε μαγνήτες, σε τμήματα και μηχανές αεροσκαφών κ.α..

Το νικέλιο περιέχεται στο έδαφος σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 5-5000 mg/kg. Η περιεκτικότητα του Ni στο έδαφος εξαρτάται από τη φύση του μητρικού υλικού. Εδάφη που περιέχουν σερπεντίνη είναι δυνατόν να περιέχουν Ni σε μεγάλες συγκεντρώσεις με αποτέλεσμα να μην αναπτύσσονται ικανοποιητικά τα φυτά.

Η μεγαλύτερη ανθρωπογενής πηγή του νικελίου είναι η καύση των καυσίμων και των υπολειμμάτων πετρελαίου. Οι συγκεντρώσεις από την καύση του πετρελαίου σε νικέλιο κυμαίνονται από 500 έως 1000 mg/L. Οι μεγαλύτερες φυσικές πηγές του Ni στην ατμόσφαιρα είναι η ηφαιστειακή δραστηριότητα, οι δασικές πυρκαγιές, η μετεωρική σκόνη και τα μόρια της θάλασσας. Οι φυσικές πηγές είναι σημαντικές για το νικέλιο, αλλά περισσότερο από το 80% των εκπομπών του νικελίου είναι ανθρωπογενούς προέλευσης.

Οι ενώσεις του νικελίου έχουν γενικά μικρή τοξικότητα στον άνθρωπο. Οι πιο συνηθισμένες αντιδράσεις στις ενώσεις του νικελίου είναι φαγούρα ή δερματίτιδα λόγο επαφής. Χρόνια έκθεση στο νικέλιο μπορεί να προκαλέσει καρκίνο στο αναπνευστικό σύστημα ή στους πνεύμονες. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν βρεθεί στον εγκέφαλο, στο ήπαρ και τα νεφρά (Stumm W., 1981).

- **Τιτάνιο**

Το χημικό στοιχείο τιτάνιο (titanium) είναι πολύ ανθεκτικό, αργυρόλευκο, όλκιμο μέταλλο μικρής πυκνότητας. Το τιτάνιο είναι το 9ο πιο άφθονο στοιχείο και αποτελεί περίπου το 0,6 % w/w του στερεού φλοιού της Γης. Βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα έμβια όντα, τα πετρώματα, τα υδατικά συστήματα και τα εδάφη. Στις ενώσεις του παρουσιάζεται με δύο κυρίως αριθμούς οξείδωσης, +4 και +3.

Το τιτάνιο ανακαλύφθηκε το 1791 σε ένα ορυκτό στην Κορνουάλη της Αγγλίας από τον πάστορα και ερασιτέχνη γεωλόγο Ουίλιαμ Γκρέγκορ (William Gregor, 1761 – 1817) που ήταν τότε εφημέριος της ενορίας του χωριού Κριντ (22).

Τα πρώτα προϊόντα που παράχθηκαν από τιτάνιο ήταν σύρματα, φύλλα και ράβδοι. Από τη δεκαετία του 1950, η πρώην Σοβιετική Ένωση βρήκε στρατιωτικές χρήσεις για το τιτάνιο, χρησιμοποιώντας το στην κατασκευή υποβρυχίων. Την ίδια εποχή, οι Η.Π.Α. διαπίστωσαν επίσης τη χρησιμότητα του μετάλλου ειδικά στην κατασκευή κινητήρων αεροσκαφών. Από τη δεκαετία του 1960 οι επιστήμονες βρήκαν πάρα πολλές χρήσεις του τιτανίου παρόλο που το καθαρό μέταλλο εξακολουθεί να χρησιμοποιείται κυρίως στην αεροναυπηγική (26).

Το τιτάνιο δε βρίσκεται με τη μεταλλική του μορφή (ελεύθερο) στη φύση αλλά πάντα συνδεδεμένο με άλλα στοιχεία και γιαυτό είναι απαραίτητο να εξαχθεί από τα ορυκτά του που είναι μεν διασπαρμένα σε όλη τη Γη αλλά σπανίως δημιουργούν κοιτάσματα μεγάλων συγκεντρώσεων (26). Είναι το 9ο αφθονότερο στοιχείο στο στερεό φλοιό της Γης (24) αλλά οι περισσότερες πηγές δε συμφωνούν μεταξύ τους ως προς τη μέση περιεκτικότητά του στη λιθόσφαιρα. Αναφέρονται συγκεντρώσεις κατά μέσο όρο περίπου 0,6 % w/w (27) ή 0,66 % w/w Ti αλλά και 0,44 % w/w¹, 0,56 % w/w ακόμα και 0,86 % w/w (28).

Το τιτάνιο είναι παρόν στα περισσότερα πυριγενή πετρώματα αλλά και στα ιζημάτα που προέρχονται από αυτά. Από τα 801 είδη πυριγενών πετρώματα που αναλύθηκαν από το Γεωλογικό Ινστιτούτο των Η.Π.Α, τα 784 περιείχαν Ti (29).

Βρίσκεται επίσης στα έμβια όντα και στα φυσικά νερά ενώ στο θαλασσινό νερό η συγκέντρωση είναι περίπου 0,6 - 1 μg/L. Στο καλλιεργήσιμο έδαφος η περιεκτικότητα κυμαίνεται από 0,3 έως 6 % ενώ υπάρχουν αυξημένες συγκεντρώσεις σε εδάφη στα οποία έχει προστεθεί οργανικό λίπασμα. Στην ατμόσφαιρα οι συγκεντρώσεις Ti είναι πάρα πολύ μικρές (27).

Πολλά φυτά περιέχουν τιτάνιο συνήθως σε περιεκτικότητα 1 ppm, παρόλο που μερικά όπως η τσουκνίδα και το κοντυλόχορτο (αλογοουρά) περιέχουν μέχρι και 80 ppm (22).

Το τιτάνιο δεν είναι τοξικό μέταλλο. Η ευρεία χρήση του σε ιατρικές εφαρμογές αλλά και πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι είναι αδρανές και βιοσυμβατό τόσο για τους ανθρώπους όσο και για τα ζώα. Έχει παρατηρηθεί

όμως ότι ορισμένες ενώσεις του αλλά και το ίδιο το μέταλλο, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις, μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό (27). Στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται στο αίμα σε κατά μέσο όρο περιεκτικότητα 0,054 mg/L, στο συκώτι 1,2 - 4,7 ppm, στους μύες 0,9 - 2,2 ppm. Ένας φυσιολογικός άνθρωπος 70 Kg περιέχει περίπου 20 mg τιτάνιο στο σώμα του (30).

- **Χρώμιο**

Το χρώμιο (Chromium) είναι χημικό στοιχείο με σύμβολο **Cr** και ατομικό αριθμό 24. Είναι αργυρόλευκο γυαλιστερό και σκληρό μέταλλο με υψηλό σημείο τήξης. Το όνομά του προέρχεται από την ελληνική λέξη «χρώμα», επειδή έχει πολλές έγχρωμες ενώσεις. Δεν απαντάται ελεύθερο στην φύση. Εξάγεται από τα ορυκτά του, κυριότερο από τα οποία είναι ο χρωμίτης (FeCr_2O_4).

Το χρώμιο είναι το 21ο πιο συνηθισμένο στοιχείο στην επιφάνεια της γης με μέση συγκέντρωση 100ppm. Ενώσεις του χρωμίου βρίσκονται στο περιβάλλον εξαιτίας του εμποτισμού πετρωμάτων με υδατικά διαλύματα αποβλήτων που περιέχουν χρώμιο. Η συγκέντρωση του στο χώμα είναι μεταξύ 1 και 3000 mg/kg, στο θαλασσινό νερό 5 με 800 $\mu\text{g/L}$ και στα ποτάμια και τις λίμνες 26 $\mu\text{g/L}$ με 5,2 mg/L. Η σχέση μεταξύ του Cr^{+3} και του Cr^{+6} εξαρτάται άμεσα από το pH και τα οξειδωτικά στοιχεία της περιοχής, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις το Cr^{+3} υπερισχύει, παρόλο που σε μερικές περιοχές τα υπόγεια ύδατα μπορούν να περιέχουν έως και 39 μg χρωμίου συνολικά και τα 30 μg από αυτά να είναι Cr^{+6} .

Το χρώμιο είναι λαμπερό, σκληρό μέταλλο που, όταν γυαλίζεται, δίνει μια όμορφη μεταλλική λάμψη. Γι' αυτό η βιομηχανία το χρησιμοποιεί για την παρασκευή εντυπωσιακών μεταλλικών αντικειμένων. Οι ενώσεις του είναι συνήθως τοξικές. Το χρώμιο ανακαλύφθηκε από τον Louis-Nicholas Vauquelin το 1797.

Το χρώμιο, επίσης, είναι αξιοσημείωτο για τις μαγνητικές του ιδιότητες: είναι το μόνο στερεό στοιχείο που μπορεί, όταν βρίσκεται στη φύση σαν στοιχείο και όχι σε ενώσεις, να μην έλκεται μαγνητικά σε θερμοκρασία δωματίου (ή χαμηλότερη). Πάνω από τους 38°C έρχεται σε παραμαγνητική κατάσταση

Το τρισθενές χρώμιο (Cr(III) ή Cr^{3+}) απαιτείται σε ελάχιστες ποσότητες για τη ζάχαρη και το μεταβολισμό των λιπιδίων στους ανθρώπους και η απώλειά του μπορεί να προκαλέσει αρρώστια ονομαζόμενη "απώλεια χρωμίου". Αντίθετα το εξασθενές χρώμιο (Cr(VI) ή Cr^{6+}) είναι πολύ τοξικό και μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις, όταν καταπίνεται. Το Cr(VI) δεν έχει αποδειχθεί ως καρκινογόνο σε διάλυμα, παρόλο που μπορεί να προκαλέσει δερματίτιδα εξαιτίας κάποιας αλλεργίας.

Η χρήση διατροφικών συμπληρωμάτων με χρώμιο είναι αμφιλεγόμενη εξαιτίας των περίπλοκων αποτελεσμάτων των συγκεκριμένων

συμπληρωμάτων. Κάποιες περίπλοκες οργανικές ενώσεις του χρωμίου προκαλούν ζημιά στα χρωμοσώματα των κυττάρων των χάμστερ. Στις Ηνωμένες Πολιτείες οι διατροφικές οδηγίες για την ημερήσια κατανάλωση χρωμίου μειώθηκαν από τα 50-200 μg για έναν ενήλικα στα 35 μg (για τους άντρες) και 25 μg (για τις γυναίκες).

Οι φυσικές πηγές του χρωμίου είναι το θυμάρι, το σιτάρι, η μαγιά μπύρας, τα λαχανικά, τα φρούτα, το κρέας, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα δημητριακά. (31)

- **Μαγγάνιο**

Το χημικό στοιχείο Μαγγάνιο (Manganum) είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 25 και ατομικό βάρος 54,9380. Μπορεί να βρεθεί σε ελεύθερη μορφή στη φύση (συνήθως σε συνδυασμό με το σίδηρο) και σε πολλά μεταλλεύματα. Ως ελεύθερο στοιχείο, το μαγγάνιο είναι μέταλλο και έχει σημαντική βιομηχανική χρήση, όταν είναι σε κράματα, ειδικά στο ανοξείδωτο ατσάλι. Το μαγγάνιο αποτελεί περίπου 1000 ppm (0,1%) της επιφάνειας της Γης, άρα είναι το δωδέκατο πιο συνηθισμένο στοιχείο στην επιφάνειά της. Το χώμα περιέχει 7 ως 9000 ppm μαγγανίου με μέσο όρο 440 ppm. Το θαλασσινό νερό περιέχει μόνο 10 ppm μαγγανίου και η ατμόσφαιρα περιέχει 0,01 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Κυριότερα ορυκτά του μαγγανίου είναι ο μαγγανίτης, ο ροδοχρωσίτης, ο πυρολουσίτης και ο κρυπτομέλας. Οι πιο συνηθισμένοι αριθμοί οξείδωσης του μαγγανίου είναι +2, +3, +4, +6 και +7, παρόλο που μπορούν να παρατηρηθούν όλοι οι αριθμοί οξείδωσης μεταξύ του 0 και του +7. Το Mn^{2+} συνήθως «συναγωνίζεται» το Mg^{2+} σε βιολογικά συστήματα. Οι ενώσεις του μαγγανίου με αριθμό οξείδωσης +7 πειορίζονται στο οξείδιο του μαγγανίου (VII) (Mn_2O_7) και ενώσεις του έντονα μωβ υπερμαγγανικού ανιόντος MnO_4^- . (32)

Το μαγγάνιο (Mn) αποτελεί ένα από τα ιχνοστοιχεία που βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στους ζωικούς ιστούς. Ένας υγιής ενήλικας γύρω στα 70kg περιέχει περίπου 10-20mg μαγγανίου. Το μαγγάνιο που βρίσκεται στο ανθρώπινο σώμα περιέχεται κυρίως σε ιστούς που έχουν πολλά μιτοχόνδρια. Είναι συστατικό πολλών ενζύμων και επομένως συμμετέχει σε πολλές μεταβολικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα συμμετέχει στις εξής λειτουργίες : στην ανάπτυξη και διατήρηση της υγείας των οστών, στη σύνθεση των μυκοπολυσακχαριτών που περιβάλλουν και προστατεύουν τα κύτταρα και λιπαίνουν τις αρθρώσεις, στην ανάπτυξη και λειτουργία των νεύρων, στη σύνθεση των ορμονών ανάπτυξης του φύλου, στη διέγερση του σχηματισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ, στην ενεργοποίηση των φυσικών φονικών κυττάρων. Το μαγγάνιο αποτελεί επίσης συστατικό ενός αντιοξειδωτικού ενζύμου, της υπεροξειδικής δισμουτάσης (S.O.D).

Η περιεκτικότητα των τροφών σε μαγγάνιο ποικίλλει. Οι πλουσιότερες πηγές σε αυτό το ιχνοστοιχείο είναι τα δημητριακά ολικής άλεσης, τα όσπρια και οι ξηροί καρποί. Το τσάι επίσης περιέχει μεγάλη ποσότητα μαγγανίου, αλλά δεν απορροφώνται σε μεγάλο βαθμό. Επίσης, τα φρούτα και τα

πράσινα φυλλώδη λαχανικά περιέχουν μαγγάνιο. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα θαλασσινά αποτελούν φτωχές πηγές μαγγανίου.

Η ημερήσια δόση του μαγγανίου κυμαίνεται από 2,5 έως 5 mg. Δεν έχουν αναφερθεί συμπτώματα τοξικότητας σε ανθρώπους που έχουν προσλάβει έως και 9mg μαγγανίου την ημέρα. Μεταλλωρύχοι που έχουν εισπνεύσει αέρια με υψηλή συγκέντρωση μαγγανίου εμφανίζουν συμπτώματα παρόμοια με αυτά του Πάρκινσον.

Η χρήση του μαγγανίου ως θεραπεία δεν συνηθίζεται, καθώς δεν έχει αναγνωριστεί ότι η έλλειψη αυτού του μετάλλου μπορεί να επέλθει υπό φυσιολογικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, μπορεί να ωφελήσει άτομα με προβλήματα στις αρθρώσεις και τα οστά καταστέλλοντας τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Το μαγγάνιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ασθένειες στις οποίες απαιτείται η διέγερση των φυσικών φονικών κυττάρων και παρόμοιες ανοσολογικές αντιδράσεις. Το μαγγάνιο δρα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τη σύνδεση των λευκών αιμοσφαιρίων με τα αντιγόνα. (33)

- **Σίδηρος**

Το χημικό στοιχείο Σίδηρος (αγγλ. *iron*, λατ. *ferrum*) είναι μέταλλο της 1^{ης} κύριας σειράς των στοιχείων μετάπτωσης με ατομικό αριθμό 26 και ατομικό βάρος 55,847. Είναι το πιο άφθονο χημικό στοιχείο κατά μάζα του πλανήτη Γη και το τέταρτο πιο άφθονο στοιχείο στον στερεό φλοιό της, μετά το Οξυγόνο (O), το Πυρίτιο (Si) και το Αργίλιο (Al). Ακόμη, ο σίδηρος είναι πολύ συνηθισμένος στους πετρώδεις πλανήτες, νάνους πλανήτες, δορυφόρους και αστεροειδείς του ηλιακού συστήματος κι αυτό χάρη στην άφθονη παραγωγή τους ως τελικό προϊόν πυρηνικής σύντηξης σε άστρα υψηλής μάζας.

Όπως και τα υπόλοιπα χημικά στοιχεία της 8^{ης} ομάδας, ο σίδηρος βρίσκεται σε σχετικά μεγάλο εύρος αριθμών οξειδωσης από -2 ως και +6, αν και οι αριθμοί οξειδωσης +2 και +3 είναι οι συνηθισμένοι του. Στοιχειακός σίδηρος βρίσκεται σε μετεωρίτες και άλλα χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και υγρασίας περιβάλλοντα. Είναι πολύ ευαίσθητο στην παρουσία οξυγόνου και νερού. Επιφάνειες νεοσχηματισμένου στοιχειακού σιδήρου φαίνονται ασημόγκριζα, αλλά οξειδώνονται στον κανονικό ατμοσφαιρικό αέρα, δίνοντας οξείδια του σιδήρου, γνωστά ως «σκουριά». Αντίθετα από πολλά άλλα μέταλλα, που σχηματίζουν μόνο ένα προστατευτικό στρώμα οξειδίου, το οξείδιο του σιδήρου καταλαμβάνει μεγαλύτερο όγκο σε σύγκριση με το κομμάτι μεταλλικού (δηλαδή στοιχειακού) σιδήρου από το οποίο προήλθε. Έτσι, κατά διαστήματα «σκάει», εκθέτοντας νέες επιφάνειες μεταλλικού σιδήρου για διάβρωση.

Ο σίδηρος ήταν γνωστός από την προϊστορική εποχή, συγκεκριμένα από την Εποχή του Σιδήρου. Όμως, επειδή κάποια κράματα χαλκού τήκονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, ήταν τα πρώτα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανθρώπινη ιστορία. Ο καθαρός μεταλλικός σίδηρος είναι μαλακός,

μαλακότερος και από το αλουμίνιο, αλλά είναι αδύνατο να εξαχθεί κατά τη διεργασία της ερυθροπύρωσης. Το υλικό σκληραίνει σημαντικά κατά διάρκεια της διεργασίας, απορροφώντας διάφορες προσμίξεις, όπως ο άνθρακας. Με συγκέντρωση άνθρακα μεταξύ 0,2% και 2,1% παράγεται χάλυβας (*steel* ή «ατσάλι» εκ του λατινικού *acciaio*), που μπορεί να είναι μέχρι και 1.000 φορές σκληρότερος από τον καθαρό μεταλλικό σίδηρο. Ο «ακατέργαστος σίδηρος» (*crude iron*) παράγεται σε υψικαμίνους, όπου σιδηρομετάλλευμα, συνήθως αιματίτης (Fe_2O_3) ανάγεται από κωκ (C και παραγόμενο CO) σε «επεξεργασμένο σίδηρο» (*pig iron*), που συμπεριέχει σχετικά μεγάλη συγκέντρωση άνθρακα. Με παραπέρα «εξευγενισμό» (*refinement*) με οξυγόνο ανάγεται το ανθρακούχο περιεχόμενο, ελαττώνοντας τη συγκέντρωση του άνθρακα στο κράμα στις προδιαγραφές του χάλυβα. Χάλυβες και διάφορα κράματα σιδήρου με σχετικά μικρή περιεκτικότητα σε άνθρακα που περιέχουν και κάποια άλλα μέταλλα ή και στοιχεία («κράματα χάλυβα» *alloy steels*) χρησιμοποιούνται πλέον πολύ ευρύτερα στη σύγχρονη βιομηχανική χρήση, εξαιτίας του μεγάλου εύρους επιθυμητών ιδιοτήτων, αλλά και της σχετικής αφθονίας του σιδήρου, που έχει να κάνει με το σχετικά χαμηλό κόστος παραγωγής (34).

Ο σίδηρος θεωρείται απαραίτητο ανόργανο στοιχείο για όλους τους οργανισμούς, καθώς έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και είναι απαραίτητα προσθετική ομάδα για εκατοντάδες ένζυμα και πρωτεΐνες, όπως οι πρωτεΐνες που μεταφέρουν οξυγόνο.¹ Στον ενήλικα άνθρωπο η φυσιολογική ποσότητα σιδήρου που βρίσκεται στον οργανισμό είναι περίπου 4 γραμμάρια, από τα οποία το 75% είναι δεσμευμένο στην αιμοσφαιρίνη. Ο σίδηρος που βρίσκεται στον οργανισμό ανακυκλώνεται, όμως μικρή ποσότητα αποβάλλεται με τα ούρα, τα κόπρανα, την έμμηνο ρύση στις γυναίκες και μέσω του δέρματος.

Οι κύριες πηγές διατροφικού σιδήρου είναι το κόκκινο κρέας, κυρίως το βοδινό, το ψάρι (πχ. τόνος και σολομός), τα στρείδια και το κρέας των πουλερικών και ιδίως το συκώτι. Ο σίδηρος από αυτές τις πηγές βρίσκεται ενωμένος με την ομάδα αίμης και σχεδόν το 25% του σιδηρού απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό. Άλλες διατροφικές πηγές σιδήρου είναι τα όσπρια, τα αποξηραμένα φρούτα, το σουσάμι, τα ενισχυμένα με σίδηρο δημητριακά και τα λαχανικά, όπως το σπανάκι. Επειδή ο σίδηρος που δεν είναι ζωικής προέλευσης δημιουργεί χυλικά σύμπλοκα με ενώσεις στον αυλό του εντέρου και δεν απορροφάται εξίσου καλά^[9], η ποσότητα που εντέλη θα απορροφηθεί από τον οργανισμό εξαρτάται από τις υπόλοιπες τροφές που καταναλώνονται στο ίδιο γεύμα. Τροφές που βελτιώνουν την απορρόφηση του σιδήρου είναι η βιταμίνη C και οι ζωικές πρωτεΐνες. Από την άλλη τροφές που περιέχουν ασβέστιο, τανίνες, πολυφαινόλες και οι φυτάτες μειώνουν την απορρόφηση του σιδήρου.

Παρ' όλο που ο σίδηρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για ένα υγιή οργανισμό, η υπερβολική ποσότητά του μπορεί να καταστεί επιζήμια. Ο άνθρωπος δεν διαθέτει μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί να απομακρύνει

σίδηρο από τον οργανισμό του Έχειδειχθεί ότι η υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο κυκλοφορικό σύστημα, στην καρδιά και εγκεφαλικά επεισόδια ενώ έχει βρεθεί ότι προκαλεί βλάβες και σε άλλα όργανα, όπως το ήπαρ, οι πνεύμονες, ο μυελός των οστών και ενδοκρινή όργανα, με κίνδυνο εκδήλωσης θανάσιμων ασθενειών, όπως η κίρρωση ήπατος και η καρδιακή ανεπάρκεια, εξαιτίας της οξειδωτικής του δράσης. Στον άνθρωπο μια συχνή αιτία υπερφόρτωσης σιδήρου, ή αλλιώς αιμοσιδήρωση, είναι οι πολλαπλές μεταγγίσεις αίματος για την θεραπεία της αναιμίας, αλλά υπάρχουν και γενετικά αίτια, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης. Σε αυτήν την περίπτωση η σίδηρος θα πρέπει να απομακρυνθεί από τον οργανισμό με αποσιδήρωση, καθώς ο άνθρωπος δεν έχει μηχανισμό μέσω του οποίου μπορεί να απεκκρίνει σίδηρο (37).

- **Κοβάλτιο**

Το χημικό στοιχείο Κοβάλτιο (Cobaltum) είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 27. ονομασία του φαίνεται ότι προήλθε από τη λέξη Kobold (πνεύμα του μεταλλείου) που χρησιμοποιούσαν πολύ παλιά για ένα ορυκτό από το οποίο δεν μπορούσαν να πάρουν μέταλλο. Το κοβάλτιο είναι σιδηρομαγνητικό μέταλλο. Δεν απαντάται ελεύθερο στη φύση, αλλά ενώσεις του κοβαλτίου είναι συνήθεις υπό μορφή ορυκτών. Μικρές ποσότητες κοβαλτίου μπορούν να βρεθούν στις πέτρες, το χώμα, τα φυτά και τα ζώα. Στη φύση συχνά σχετίζεται με το νικέλιο ενώ και τα δύο αυτά είναι χαρακτηριστικά συστατικά του μετεωρικού σιδήρου. Τα θηλαστικά απαιτούν μικρή ποσότητα κοβαλτίου που είναι η βάση για τη βιταμίνη B₁₂. Το ⁶⁰Co, ένα τεχνητά παραγόμενο ραδιενεργό ισότοπο του κοβαλτίου, αποτελεί σημαντικό ραδιενεργό «ανιχνευτή» και βοηθό στη θεραπεία του καρκίνου (βόμβα κοβαλτίου). Το κοβάλτιο σε μεταλλική μορφή εμφανίζεται σε δύο κρυσταλλογραφικές δομές: την hcp και την fcc. Η ιδανική θερμοκρασία μετάβασης μεταξύ των δομών hcp και fcc είναι οι 450 °C, αλλά σε πρακτικό επίπεδο η διαφορά ενέργειας είναι τόσο μικρή, ώστε η ενδοανάπτυξη των δύο είναι παρόμοια. Τα κράματα βασισμένα στο κοβάλτιο αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου κοβαλτίου. Η σταθερότητα θερμοκρασίας αυτών των κραμάτων τα καθιστά κατάλληλα για τη χρήση στις λεπίδες των τουρμπίνων στις μηχανές τουρμπίνων αερίων και αεριωθούμενων αεροσκαφών. Ειδικά κράματα κοβαλτίου-χρωμίου-μολυβδενίου χρησιμοποιούνται για κάποια προσθετικά μέρη όπως οι αντικαταστάσεις γοφών και γονάτων. Τα κράματα κοβαλτίου χρησιμοποιούνται επίσης σε προσθετικές στα δόντια, όπου είναι χρήσιμα για την αποφυγή αλλεργιών στο νικέλιο. Μερικά ατσάλινα κράματα που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη υψηλών ταχυτήτων χρησιμοποιούν επίσης το κοβάλτιο για να αυξήσουν τη θερμότητα και την αντοχή στη φθορά. Ειδικά κράματα του αλουμινίου, του νικελίου, του κοβαλτίου και του σιδήρου, γνωστά

ως Alnico, και άλλα του σαμαρίου με το κοβάλτιο (μαγνήτης σαμαρίου-κοβαλτίου) χρησιμοποιούνται στους μόνιμους μαγνήτες. Η ουσία LiCoO_2 χρησιμοποιείται ευρέως στα ηλεκτρόδια μπαταριών με ιόντα λιθίου (Li-ion). Οι επαναφορτιζόμενες μπαταρίες τύπου NiCd (νικελίου-καδμίου) και NiMH (μεταϋδριδίου του νικελίου) περιέχουν επίσης σημαντικές ποσότητες κοβαλτίου (38).

Το κοβάλτιο είναι απαραίτητο στον άνθρωπο ως αναπόσπαστο κομμάτι της βιταμίνης B12. Οι απαιτήσεις του ανθρώπου σε βιταμίνη B12 καλύπτονται από τη διαίτα. Το κοβάλτιο βρίσκεται στις περισσότερες τροφές και απορροφάται εύκολα από το γαστρεντερικό σωλήνα. Εκθεση σε κοβάλτιο ή εισπνοή σκόνης κοβαλτίου σε εργαζόμενους σε βιομηχανίες μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματίτιδα, άσθμα και συμπτώματα από τους πνεύμονες. Τοξικές επιδράσεις κοβαλτίου περιλαμβάνουν υπερπλασία θυρεοειδούς, μυξοίδημα, μυοκαρδιοπάθεια, πολυκυτταραιμία. Ραδιενεργό ^{60}Co χρησιμοποιείται σε θεραπεία καρκίνου.

- **Αρσενικό**

Το αρσενικό αναφέρεται στην ιστορία κυρίως από τις ενώσεις του και ιδιαίτερα τις θειούχες, για τις οποίες και γίνεται μνεία κατά τον 4ο αιώνα π.Χ.. Υπολογίζεται πως η περιεκτικότητα στο φλοιό της Γης φθάνει περίπου τα 5 γραμμάρια ανά τόνο ενώ η περιεκτικότητά του γενικά στη φύση φθάνει τα 4 άτομα ανά 1 εκατομμύριο ατόμων Πυριτίου. Πολύ μικρό ποσοστό του βρίσκεται σε καθαρή φυσική κατάσταση (αυτοφυές). Το μεγαλύτερο μέρος του είναι ενωμένο με διάφορα ορυκτά (πάνω από 150) κυρίως θειούχα, αρσενικούχα, η προσμίξεις και των δύο προηγούμενων, και τα λεγόμενα αρσενικά.

Το αρσενικό παράγεται κυρίως από τον αρσеноπυρίτη που όταν θερμανθεί περίπου στους 670°C , σε απουσία του αέρα σχηματίζει το μεταλλικό αρσενικό. Γενικά το αρσενικό τόσο στον αρσеноπυρίτη όσο και σε προσμίξεις του με άλλα ορυκτά, όταν θερμανθούν στον αέρα, ενώνεται εύκολα με το οξυγόνο δημιουργώντας το οξείδιο As_2O_3 γνωστό και ως "λευκό αρσενικό". Ο ατμός του οξειδίου συλλέγεται, και με διαδοχικούς θαλάμους συμπυκνώνεται, και στη συνέχεια καθαρίζεται με "επανεξάχνωση". Έτσι με την αναγωγή από άνθρακα της σκόνης του οξειδίου που συλλέγεται κατά το τρόπο αυτό παρασκευάζεται και το περισσότερο αρσενικό.

Σε παγκόσμια κλίμακα η κατανάλωση του μεταλλικού αρσενικού είναι σχετικά μικρή, περίπου 500 τόνοι ετησίως. Η μεγαλύτερη παραγωγή και κατανάλωση είναι από τη Σουηδία. Λόγω των ιδιοτήτων του χρησιμοποιείται σε κράμα 1% στη παραγωγή μολύβδινων σφαιρών, 3% σε μολύβδινους τριβείς καθώς και σε μπαταρίες και περικαλύμματα καλωδίων, ενώ σε υψηλότερη καθαρότητα χρησιμοποιείται μαζί με το πυρίτιο και το γερμάνιο σε κατασκευές ημιαγωγών, καθώς και σε μορφή αρσενικούχου γαλλίου σε διόδους για λέιζερ, και σε κρυσταλλοτριόδους (τρανζίστορς). Σε αντίθεση

όμως του περιορισμένου μεταλλικού αρσενικού, σε χιλιάδες τόνους, καταναλώνονται ετησίως σε μορφές πλείστων χημικών ενώσεων του, και ιδίως στη γεωργία, ως εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, ξηραντικά αλλά και απολυμαντικά προϊόντα. Επίσης κάποια εξ αυτών χρησιμοποιούνται και ως κύρια ύλη βεγγαλικών καθώς και στην υαλουργία για κατασκευή φακών και γι' αποχρωματισμό γυαλιών.

Το αρσενικό στην ελεύθερη κατάσταση είναι γκρίζο (χαλυβδόφαιο) στερεό, εύθραστο με χαμηλή θερμική και χημική αγωγιμότητα. Εξαχνώνεται στους 613 °C. Ο ατμός του αποτελείται από μόρια As_4 που διατηρούνται μέχρι τους 800 °C πέραν των οποίων αποσυντίθενται σε As_2 , η δε αποσύνθεσή του ολοκληρώνεται στους 1700 °C. Το αρσενικό ενώ στον ξερό αέρα παραμένει σταθερό, στον υγρό καλύπτεται από ένα μαύρο οξειδίο. Το ελεύθερο στοιχείο του δεν επηρεάζεται από το νερό ή τις βάσεις, πλην όμως μπορεί να οξειδωθεί από το νιτρικό οξύ. Τέλος στο αρσενικό επιδρούν τα αλογόνα, όπως το Θείο με συνέπεια να μπορεί να ενωθεί με πολλά άλλα μέταλλα σχηματίζοντας αρσενικούχες ενώσεις. (39)

- **Στρόντιο**

Το χημικό στοιχείο Στρόντιο είναι ένα μέταλλο με ατομικό αριθμό 38 και ατομικό βάρος 87,62. Οι ενώσεις στρόντιου που είναι αδιάλυτες στο νερό μπορούν να γίνουν υδατοδιαλυτές, ως αποτέλεσμα χημικών αντιδράσεων. Οι υδατοδιαλυτές ενώσεις αποτελούν μεγαλύτερη απειλή στην ανθρώπινη υγεία από τις αδιάλυτες στο νερό. Οι υδατοδιαλυτές μορφές στρόντιου μπορούν να μολύνουν το πόσιμο νερό, ευτυχώς όμως οι συγκεντρώσεις στο πόσιμο νερό είναι συνήθως αρκετά χαμηλές. (40)

Οι άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν σε μικρά επίπεδα (ραδιενεργού) στρόντιου με την αναπνοή του αέρα ή της σκόνης, καταναλώνοντας τρόφιμα, πόσιμο νερό, ή από την επαφή με το χώμα που περιέχει στρόντιο. Είναι πιο πιθανό να έρθει ο άνθρωπος σε επαφή με το στρόντιο μέσω της κατανάλωσης τροφίμων και νερού. Οι συγκεντρώσεις του στρόντιου στα τρόφιμα συμβάλλουν στις συγκεντρώσεις στρόντιου στο ανθρώπινο σώμα. Τα τρόφιμα που περιέχουν σημαντικά υψηλές συγκεντρώσεις στρόντιου είναι τα σιτηρά, τα φυλλώδη λαχανικά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Για τους περισσότερους ανθρώπους, η λήψη στρόντιου είναι μέτριου βαθμού. Η μόνη ένωση στρόντιου που θεωρείται επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία, ακόμη και σε μικρές ποσότητες, είναι το χρωμικό στρόντιο. Αυτό προκαλείται κυρίως από το τοξικό χρώμιο που περιέχεται. Το χρωμικό στρόντιο είναι γνωστό ότι προκαλεί καρκίνο των πνευμόνων, αλλά οι κίνδυνοι έκθεσης έχουν μειωθεί αρκετά από τις διαδικασίες ασφάλειας στις επιχειρήσεις, και έτσι δεν αποτελεί πλέον σημαντικό κίνδυνο για την υγεία. Η λήψη υψηλών συγκεντρώσεων στρόντιου δεν είναι γενικά γνωστή να αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Σε μια περίπτωση περιγράφεται ότι κάποιος υπέστη αλλεργική αντίδραση από το στρόντιο, αλλά δεν έχει περιγραφεί κάποια άλλη

παρόμοια περίπτωση από τότε. Για τα παιδιά η υπερβάλλουσα λήψη στρόντιου μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για την υγεία, δεδομένου ότι μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην ανάπτυξη των κοκκάλων. Τα άλατα στρόντιου δεν είναι γνωστό να προκαλούν δερματικό κνησμό ή άλλα δερματικά προβλήματα οποιουδήποτε είδους. Όταν η λήψη στρόντιου είναι εξαιρετικά υψηλή, μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες στην ανάπτυξη των κοκκάλων. Αλλά αυτή η επίδραση μπορεί μόνο να εμφανιστεί όταν η λήψη στρόντιου είναι στην κλίμακα των γρ./ κιλό σωματικού βάρους . Τα επίπεδα στρόντιου στα τρόφιμα και το πόσιμο νερό δεν είναι ποτέ αρκετά υψηλά ώστε να προκαλέσουν αυτά τα αποτελέσματα. (41)

- **Κάδμιο**

Το Κάδμιο είναι χημικό στοιχείο του περιοδικού πίνακα, με σύμβολο Cd και ατομικό αριθμό 48, ατομικό βάρος 112,41 με σημείο τήξης 320 °C περίπου. Είναι ένα σχετικά σπάνιο, μαλακό (σκληρότητα 2), ελαφρώς γαλάζιο, τοξικό μέταλλο. Ανακαλύφθηκε από τον Στρόμαγιερ το 1817 σε σκόνη ψευδαργύρου. Συναντάται ως θειούχο κάδμιο στη Γροιλανδία, τη Σκωτία και τη Πενσυλβάνια συνηθέστερα όμως απαντάται σε ορυκτά του ψευδαργύρου και σε αναλογία 1 προς 400 μέρη ψευδαργύρου από τα οποία λαμβάνεται με κλασματική απόσταξη, και μάλιστα ως πτητικό του ψευδαργύρου στα πρώτα κλάσματα της απόσταξης. Στη συνέχεια με χημική κατεργασία και τελική αναγωγή σχηματίζεται το οξειδίο του καδμίου (CdO). (42)

Η λήψη του καδμίου από τον άνθρωπο πραγματοποιείται κυρίως μέσω της τροφής. Τα τρόφιμα που είναι πλούσια σε κάδμιο μπορούν να αυξήσουν κατά πολύ τη συγκέντρωση καδμίου στο ανθρώπινο σώμα. Παραδείγματα τέτοιων τροφίμων είναι το συκώτι, τα μανιτάρια, τα οστρακοειδή, τα μύδια, η σκόνη κακάου και τα ξηρά φύκια. Έκθεση σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα καδμίου εμφανίζεται όταν τα άτομα καπνίζουν. Ο καπνός του τσιγάρου μεταφέρει το κάδμιο στους πνεύμονες. Το αίμα το μεταφέρει στο υπόλοιπο σώμα όπου μπορεί να έχει τα τοξικά αποτελέσματα.

Τα άτομα που ζουν κοντά σε περιοχές με επιβλαβή απόβλητα ή κοντά σε εργοστάσια που απελευθερώνουν κάδμιο στον αέρα μπορούν να υποστούν υψηλές εκθέσεις στο κάδμιο καθώς και τα άτομα που εργάζονται σε βιομηχανίες καθαρισμού μετάλλων. Όταν οι άνθρωποι αναπνέουν το κάδμιο μπορεί να προκύψει σοβαρή βλάβη των πνευμόνων. Αυτό μπορεί να προκαλέσει ακόμη και το θάνατο.

Το κάδμιο μεταφέρεται αρχικά στο συκώτι μέσω του αίματος. Εκεί, δεσμεύεται σε πρωτεΐνες για να διαμορφώσει τα σύμπλοκα που μεταφέρονται στα νεφρά. Το κάδμιο συσσωρεύεται στα νεφρά, όπου βλάπτει τους μηχανισμούς φιλτραρίσματος. Αυτό προκαλεί την έκκριση των απαραίτητων πρωτεϊνών και των σακχάρων από το σώμα και την περαιτέρω βλάβη των νεφρών. Χρειάζεται πολύς χρόνος έως ότου το κάδμιο που έχει συσσωρευθεί στα νεφρά, εκκριθεί από το ανθρώπινο σώμα.

Η τοξικότητα καδμίου από τα τρόφιμα, εντούτοις, είναι πολύ σπάνια και εμφανίζεται μόνο μετά από μόλυνση του περιβάλλοντος ή χρόνια πρόσληψη τροφίμων υψηλών συγκεντρώσεων σε κάδμιο. (43)

- **Βάριο**

Το χημικό στοιχείο Βάριο είναι ένα μέταλλο με ατομικό αριθμό 56 και ατομικό βάρος 137,33. Αναφέρεται με το διεθνές σύμβολο Ba. Έχει θερμοκρασία τήξης 725 C° και θερμοκρασία βρασμού 1140 C°. Στην κατάσταση καθαρού μετάλλου, έχει το χρώμα του αργύρου, είναι κάπως σκληρότερο από τον μόλυβδο, ευήλατο και σφυρήλατο. Με σημείο τήξης 850 C° και σε υγρασία, καίγεται με φλόγα κιτρινοπράσινη πολύ λαμπερή. Δε συναντάται ελεύθερο στη φύση, αλλά μόνο στα άλατά του. Το βάριο είναι μέταλλο πολύ δραστικό. (44)

Τα φυσικά εμφανιζόμενα επίπεδα βαρίου στο περιβάλλον είναι πολύ χαμηλά. Μεγάλες ποσότητες βαρίου μπορούν να βρεθούν μόνο στο χώμα και σε τρόφιμα, όπως οι ξηροί καρποί, τα φύκια, τα ψάρια και σε ορισμένα φυτά. Η ποσότητα βαρίου που ανιχνεύεται στα τρόφιμα και στο νερό δεν είναι συνήθως αρκετά υψηλή για να θεωρηθεί ανησυχητική για την υγεία.

Οι άνθρωποι με το μέγιστο κίνδυνο στην έκθεση βαρίου με πρόσθετες επιπτώσεις στην υγεία είναι εκείνοι που εργάζονται στη βιομηχανία βαρίου. Οι περισσότεροι από τους κινδύνους υγείας στους οποίους μπορούν να υποβληθούν, προκαλούνται με την αναπνοή του αέρα που περιέχει θειικό άλας βαρίου ή ανθρακικό άλας βαρίου.

Πολλές περιοχές επιβλαβών αποβλήτων περιέχουν ορισμένες ποσότητες βαρίου. Οι άνθρωποι που ζουν κοντά σε αυτές τις περιοχές μπορούν να εκτίθενται στα επιβλαβή επίπεδα. Η έκθεση μπορεί να προκληθεί από την εισπνοή της σκόνης, την κατανάλωση χώματος ή φυτών, ή πόσιμο νερό που είναι μολυσμένο με βάριο. Μπορεί, επίσης, να προκληθεί από δερματική επαφή.

Οι επιπτώσεις του βαρίου στην υγεία εξαρτώνται από την υδατοδιαλυτότητα των ενώσεων. Οι ενώσεις βαρίου που διαλύονται στο νερό μπορεί να είναι επιβλαβείς στην ανθρώπινη υγεία. Η λήψη πολύ μεγάλων ποσοτήτων βαρίου που είναι υδατοδιαλυτό μπορεί να προκαλέσει παραλύσεις και σε μερικές περιπτώσεις ακόμη και το θάνατο.

Μικρή ποσότητα υδατοδιαλυτού βαρίου μπορεί να προκαλέσει σε κάποιο άτομο δυσκολίες στην αναπνοή, αυξημένη πίεση αίματος, αλλαγές στον καρδιακό ρυθμό, ενόχληση στο στομάχι, αδυναμία μυών, αλλαγές στα αντανεκαστικά των νεύρων, οίδημα στον εγκέφαλο και το συκώτι, βλάβες στα νεφρά και την καρδιά.

Το βάριο δεν φαίνεται να προκαλεί καρκίνο στους ανθρώπους. Δεν υπάρχει καμία απόδειξη ότι το βάριο μπορεί να προκαλέσει προβλήματα

στεριότητας ή προβλήματα στη γέννα. Τοξικότητα βαρίου από τα τρόφιμα, εντούτοις, δεν έχει καταγραφεί. (45)

2. Μυκοτοξίνες

2.1 . Εισαγωγή

Οι μυκοτοξίνες είναι ουσίες που παράγονται από τον μεταβολισμό νηματοειδών μυκήτων και είναι τοξικές τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το ζώο όταν καταναλώνονται μέσω της τροφής και των ζωοτροφών. Ο αριθμός των ειδών των μυκήτων έχει υπολογιστεί ότι είναι πάνω από 100.000 και ο γνωστός αριθμός τους ανέρχεται στις 60, ενώ τα είδη των μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές είναι σχετικά λίγα, περίπου 220. Οι πιο γνωστές μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, η T2 τοξίνη, η Diacetoxyscirpenol, η ζεαραλενόνη και η ωχρατοξίνη.

Πίνακας 2 Κατηγορίες Μυκοτοξινών (46)

<u>Μυκοτοξίνη</u>	<u>Μύκητες</u>
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Penicillium sp.</i>
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>
Στεριγματοκυστίνη	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
Ωχρατοξίνες	<i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>
Πατουλίνη	<i>Penicillium patulum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>
Κιτρινίνη	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium viridicatum</i>
Πενικιλικό οξύ	<i>Penicillium martensii</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>
Ρουμπατοξίνη	<i>Penicillium rubrum</i>
Αλκαλοειδή του ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
T-Z τοξίνη	<i>Fusarium tricinctum</i>
Τριχοθισίνες	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium roseum</i>

Οι μυκοτοξίνες είναι οργανικές χημικές ουσίες, αλειφατικές ή κυκλικές, απλής σχετικά δομής με σχετικά απλό αριθμό ατόμων άνθρακα και χαμηλού μοριακού βάρους με παρόμοιες μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Είναι παράγωγα ή συγγενείς ενώσεις με την κουμαρίνη, τα τερπενοειδή, ανθρακινόνες, μακρολίδια, στεροειδή, και τετρονικά οξέα. Έχουν διάφορες χημικές δομές και συνεπώς προκαλούν διάφορες δυσάρεστες βιολογικές επιπτώσεις τόσο στην υγεία των ανθρώπων όσων και των ζώων.

Είναι εξαιρετικά επικίνδυνες ενώσεις, που παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά την καταστροφή των μυκήτων από τους

οποίους προήλθαν. Επιπλέον, επειδή πολλές από αυτές είναι θερμοανθεκτικές, δεν καταστρέφονται σε συνήθεις συνθήκες θερμικής κατεργασίας τροφίμων.

Η δράση των μυκητοξινών στους οργανισμούς είναι ηπατοτοξική, νεφροτοξική, αιμοτοξική, νευροτοξική, δερματοξική και πολλές έχουν καρκινογόνες ή οιστρογόνες ιδιότητες. Μερικές φορές έχουν αντιβιοτική δράση κατά των μικροβίων και καταστρέφουν την μικροβιακή χλωρίδα λ.χ. η πενικιλίνη είναι η μυκοτοξίνη του μύκητα *Penicillium chrysogenum* (χλωραμφενικόλης).

Οι συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών οι οποίες είναι σημαντικές για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, μετριοούνται συνήθως σε $\mu\text{g}/\text{Kg}$ τροφής (ppb). Οι μυκοτοξίνες, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αναπτύξεως ορισμένων μυκήτων, είτε απεκκρίνονται μέσα στο υλικό που αναπτύσσεται ο μύκητας, είτε κατακρατούνται στο εσωτερικό του κυττάρου των μυκήτων και ελευθερώνονται μετά τη θραύση του μυκηλίου (47).

Οι παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη τους είναι η συγκομιδή προϊόντων με πολύ υψηλή υγρασία, ο κακός αερισμός με την υψηλή υγρασία αποθήκευσης, η υψηλή υγρασία, η σύσταση του προϊόντος (pH, σάκχαρα κ.α.)

Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικές ουσίες οι οποίες παράγονται από την ανάπτυξη μυκήτων σε τροφές και ζωοτροφές. Η παρουσία των μυκοτοξινών σε ζωοτροφές και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν είναι σπάνια, ενώ η ραγδαία ανάπτυξη του διεθνούς εμπορίου έχει συντελέσει στην εξάπλωσή τους σε παγκόσμια κλίμακα. Οι μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές αφενός επιφέρουν σημαντικές οικονομικές απώλειες στις γεωργοκτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις και αφετέρου προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία επειδή τα ζώα που καταναλώνουν μολυσμένες με μυκοτοξίνες τροφές αφήνουν κατάλοιπα αυτών των τοξινών στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα. Οι μύκητες προσβάλουν το φυτικό υπόστρωμα (ζωοτροφή). Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή μυκοτοξινών είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μύκητα, φυτικού υποστρώματος και περιβαλλοντικών συνθηκών (υψηλά ποσοστά σχετικής υγρασίας, μεγαλύτερα του 70%, ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων). Η παρουσία μύκητα σε μια ζωοτροφή δεν συνεπάγεται αυτομάτως και την παρουσία μυκοτοξινών, καθώς η ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή μυκοτοξινών είναι δυο διαφορετικές διεργασίες που ευνοούνται από διαφορετικές συνθήκες. Επίσης, μια ζωοτροφή η οποία δε φαίνεται προσβεβλημένη από μύκητα ή όταν έχει καταστραφεί ο μύκητας (εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών) δεν συνεπάγεται ότι είναι απαλλαγμένη από μυκοτοξίνες. Πιστεύεται ότι οι μύκητες παράγουν μυκοτοξίνες όταν βρίσκονται σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξής τους κάτω από συνθήκες στρες (απότομες αλλαγές θερμοκρασίας & υγρασίας), αλλά και για να αμυνθούν σε ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς. Η επιμόλυνση μιας ζωοτροφής με μυκοτοξίνες μπορεί να λάβει χώρα κατά την καλλιέργεια στο χωράφι, στην

συγκομιδή, τη μεταφορά, την αποθήκευση ή την επεξεργασία αυτής. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αφλατοξινών (είδος μυκοτοξίνης) ανευρίσκονται σε ζωτροφές που δεν έχουν συντηρηθεί σωστά.

2.2. Είδη Μυκοτοξινών

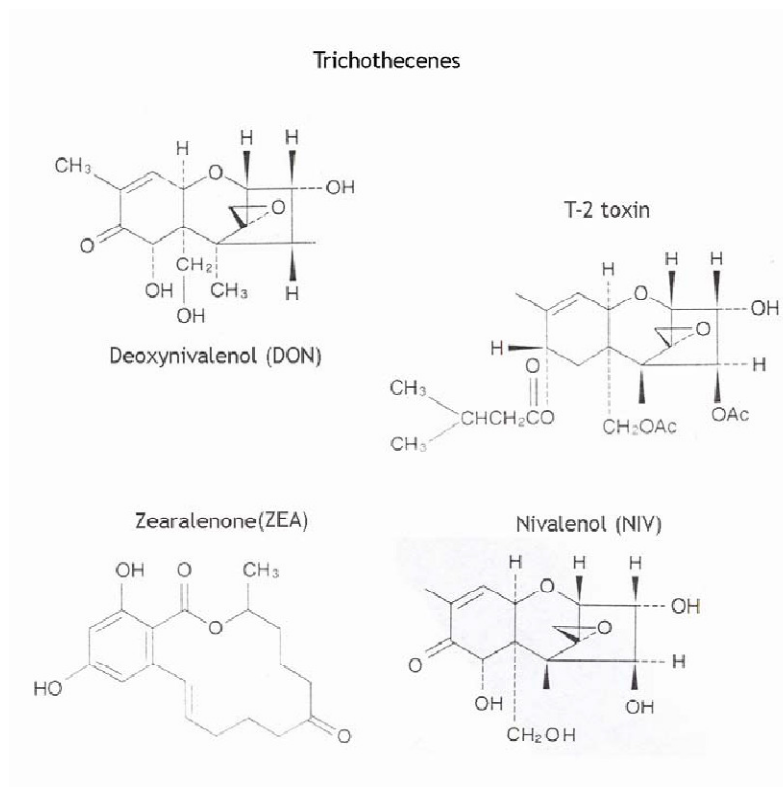
Οι Μυκοτοξίνες χωρίζονται σε διάφορα είδη. Τα σημαντικότερα είναι τα εξής :

- Τριχοθυκένια



Εικόνα 3 Τριχοθυκένια(48)

Τα Τριχοθυκένια (trichothecenes) αποτελούν ένα είδος μυκοτοξινών που παράγονται από την μούχλα που προκαλούν οι μύκητες του γένους *fusarium*. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφτεί περίπου 190. Χωρίζονται σε τέσσερις τύπους όπου ο κάθε ένας χαρακτηρίζεται από ένα ιδιαίτερο γνώρισμα που σχετίζεται με την δομή.



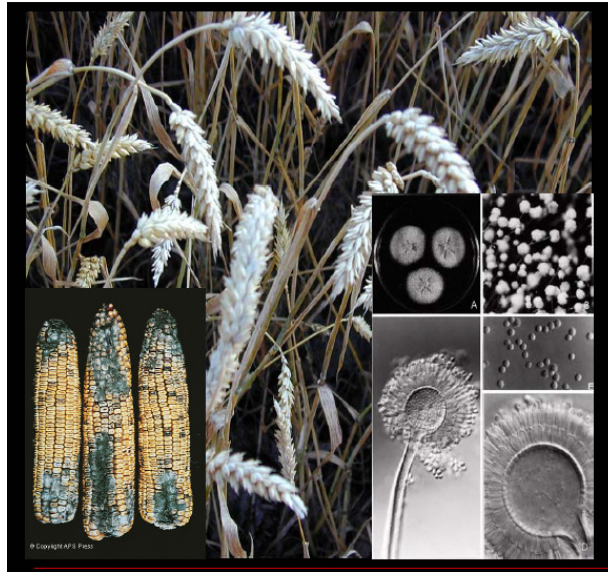
Σχήμα 3 Τριχοθυκένια τύπου A και B(48)

Τα Τριχοθυκένια εμφανίζονται συνήθως σε δημητριακά, όπως ρύζι, αλεύρι, κριθάρι, βρώμη και άλλα τα οποία και μολύνουν. Οι τύποι A (T2) και B (DON, ZEA, NIV) εμφανίζονται ευρύτατα σε πολλά προϊόντα σε αντίθεση με τους τύπους Γ και Δ τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερη τοξικότητα αλλά εμφανίζονται πιο σπάνια στα τρόφιμα (48).

Έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα νοσήματα έχουν άμεση σύνδεση με την έκθεση του ανθρώπου σε τριχοθυκένια ή και παράγωγα αυτών όπως σε δεοξυνιβαλενόλη (DON). Παρόλο που η ανθρώπινη έκθεση σε DON μπορεί να είναι μέσα στο εύρος των δόσεων που φαίνεται να προκαλούν ανοσοτοξίκωση στα τρωκτικά, οι πραγματικές συνέπειες που προκαλεί στον άνθρωπο δεν έχουν προσδιοριστεί και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη (49) .

- Ωχρατοξίνες

Οι Ωχρατοξίνες (ochratoxins, OT) παράγονται από διάφορα στελέχη μυκήτων των ειδών *penicillium* και *aspergillus* spp. (*AspergillusOchraeus* και *AspergillusCarbonarius*), τα οποία αναπτύσσονται σε διάφορες συνθήκες και για το λόγο αυτό λέγεται ότι είναι από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες τοξίνες στις διάφορες τροφές.



Εικόνα 4 Ωχρατοξίνες(50)

Η κύρια τοξίνη αυτής της κατηγορίας είναι η Ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), η οποία εμφανίζεται συνήθως στο σίτο, στο καλαμπόκι, στη βρώμη, στον καφέ, στα φυστίκια, στα δημητριακά, στα ξηρά φρούτα, στα σταφύλια, στο κακάο (50), καθώς επίσης και σε κρέας ή τυρί που έχει παραχθεί από ζώα που έχουν καταναλώσει μολυσμένες τροφές (51).

Η ΟΤΑ είναι μια τοξίνη που παράγεται φυσικά από διάφορα είδη *Aspergillus* και *Penicillium*. Αυτά τα είδη των στελεχών *Aspergillus* και *Penicillium* βρίσκονται σε διάφορες περιοχές και ευδοκιμούν σε διαφορετικά κλίματα και σε διάφορες εγκαταστάσεις αποθήκευσης τροφίμων και έτσι η μόλυνση των συγκομιδών τροφίμων με ΟΤΑ μπορεί να εμφανιστεί παγκοσμίως.

Η ΟΤΑ μπορεί να βρεθεί σε μία μεγάλη ποικιλία τροφίμων και ποτών όπως τα δημητριακά, η μπύρα, το κρασί, το κακάο, ο καφές, τα ξηρά φρούτα αμπέλων και τα καρυκεύματα, καθώς επίσης και σε μερικά προϊόντα κρέατος, ως αποτέλεσμα της μόλυνσης της ζωικής τροφής.

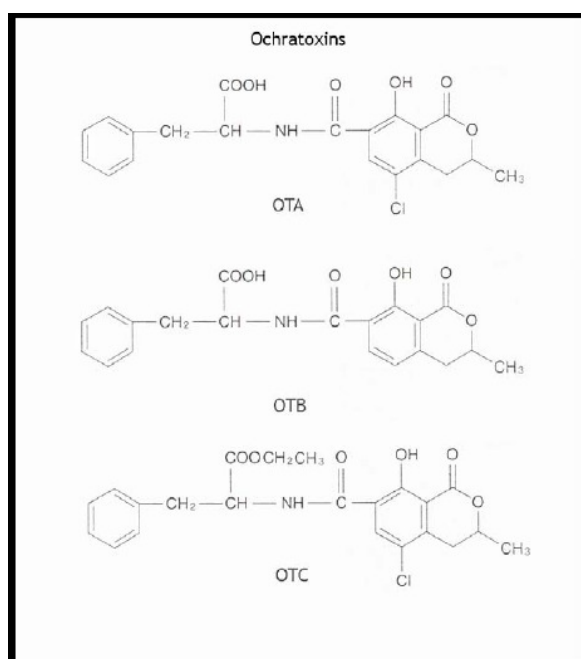
Η ΟΤΑ είναι τοξική στα ζώα, ενώ η κύρια επίδραση της είναι η πρόκληση νεφροτοξικότητας. Θεωρείται επίσης ανοσοτοξική, υπεύθυνη για τερατογενέσεις καθώς επίσης έχει ταξινομηθεί από τον IARC (International Agency for Research on Cancer, Διεθνής Οργανισμός για Έρευνα στον Καρκίνο) ως καρκινογόνο κατηγορίας 2B (class 2B carcinogen), πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο (52). Οι κίνδυνοι τοξικότητας της ΟΤΑ για την ανθρώπινη υγεία έχουν αξιολογηθεί σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο από την επιστημονική Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής των τροφίμων (SCF) και τη Μικτή FAO/WHO ειδική Επιτροπή των πρόσθετων ουσιών τροφίμων (JECFA), οι οποίες έχουν καθιερώσει τα ανεκτά όρια συγκέντρωσης της ΟΤΑ στα τρόφιμα(SCF, 1998 JECFA, 2001)..

Η Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (Scientific Committee for Food) έθεσε σαν ανώτατο όριο πρόσληψης (tolerable daily Intake, TDI) ΟΤΑ από

τον άνθρωπο 5 ng/kg bw/day (ανά κιλό βάρους την ημέρα) και ο πλέον επαρκής τρόπος ανάλυσης για την ΟΤΑ θεωρείται η χρωματογραφία υψηλής πίεσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC/MS) (53).

Αυτό που κάνει ιδιαίτερα μοναδική την Ωχρατοξίνη είναι η παρουσία του χλωρίου στη δομή της. Μελέτες έδειξαν ότι η ΟΤΑ παραμένει ιδιαίτερα σταθερή στην αύξηση της θερμοκρασίας, αλλά οξονόλυση της σε υδατικά της διαλύματα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη καταστροφή της.

Υπάρχουν τρία είδη ωχρατοξινών: Η Ωχρατοξίνη Α, Β, και C τα οποία παράγονται από διάφορα γένη των *Aspergillus* και *Penicillium* μυκήτων (και ιδιαίτερα του μύκητα *Aspergillus ochraceus*) που αναπτύσσονται σε ημιτροπικά και θερμά κλίματα (54). Οι Ωχρατοξίνες είναι σχετικά σταθερές στη θερμότητα.



Εικόνα 5 Ωχρατοξίνες

Χημικά, οι ωχρατοξίνες είναι ασθενή οργανικά οξέα που αποτελούνται από μια ομάδα διυδροϊσοκουμαρίνης (dihydroisocoumarin) που ενώνεται με πεπτιδικό δεσμό με μια L-Φαινυλαλανίνη. Δομικά, οι τρεις τοξίνες διαφέρουν ελαφρώς μεταξύ τους, εντούτοις, αυτές οι διαφορές έχουν μεγάλη σημασία στη τοξικότητα της κάθε μια από αυτές. Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), είναι και η πιο συχνά απαντόμενη, αλλά και η πιο τοξική από τις τρεις. Με αντικατάσταση του χλωρίου με ένα άτομο υδρογόνου μας δίνει την ωχρατοξίνη Β (ΟΤΒ), η οποία είναι κατά 10-20 φορές λιγότερο τοξική από την Α, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.

Περαιτέρω δομικές αλλαγές παράγουν την ωχρατοξίνη C (ΟΤC), η οποία δεν φαίνεται να έχει τοξική δράση. Εντούτοις, μια πρόσφατη δημοσίευση

υποστηρίζει ότι η OTC είναι πολύ πιο τοξική από την OTA ή την OTB στην κυτταρική σειρά THP-1 από ανθρώπινο μονοκύτταρο (μονοπύρηνο, φαγοκυτταρικό λευκοκύτταρο) (55).

- Φουμονισίνη

Αυτή η μυκοτοξίνη (fumonisins) παράγεται από τα παθογόνα στελέχη των μικροοργανισμών *Fusarium verticillioides* και *Fusarium proliferatum*, και σε πολύ μικρές ποσότητες, από τον μικροοργανισμό *Alternaria* στη ντομάτα, στο σπαράγγι και στο σκόρδο.



Εικόνα 6 Φουμονισίνες(51)

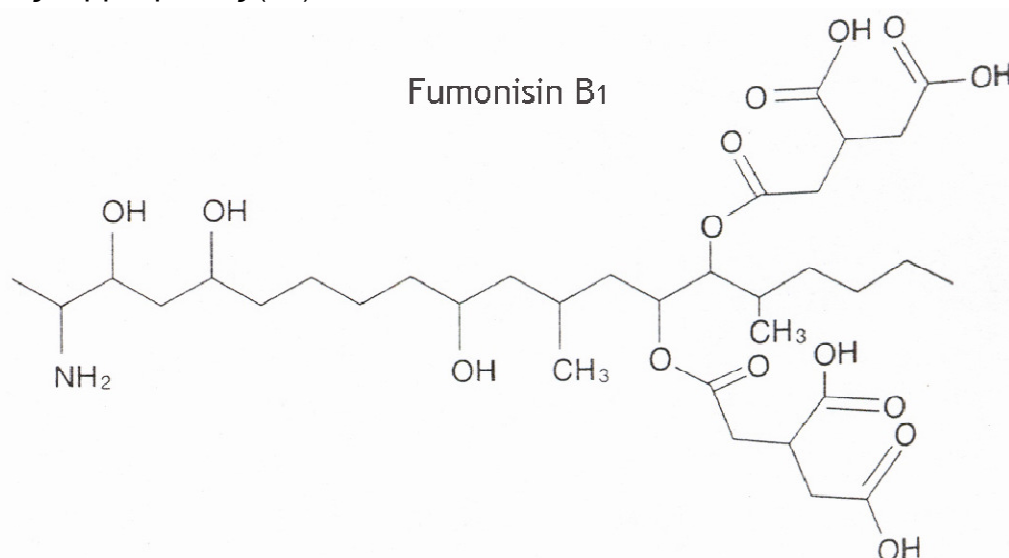
Φουμονισίνες είναι ιδιαίτερα υδατοδιαλυτές, πολικές ενώσεις που είναι διαλυτές στο νερό και τα διαλύματα ύδατος της μεθανόλης και του ακετονιτριλίου, αλλά δεν είναι διαλυτοί στους μη πολικούς διαλύτες και σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες. Δεν περιέχουν αρωματικό δακτύλιο ή χρωμοφόρες περιοχές, ώστε να είναι εύκολη η ανίχνευσή τους.

Οι Φουμονισίνες παρουσιάζονται ιδιαίτερα σταθερές σε ένα πλήθος χημικών διαδικασιών και αλλαγών στη θερμοκρασία (51) . Είναι φυσικοί μολυσματικοί παράγοντες των σιταριών και των δημητριακών παγκοσμίως και βρίσκονται συνήθως στο καλαμπόκι και τα προϊόντα που παράγονται από αυτό (56). Προκαλούν σοβαρές διαταραχές στα ζώα (57), ενώ μελέτες απέδειξαν πως ευθύνονται για ασθένειες όπως το πνευμονικό οίδημα στους χοίρους (58) καθώς επίσης και για τον καρκίνο του ήπατος και του οισοφάγου (59) (60).

Τρόφιμα που περιέχουν αραβόσιτο, είναι τα πιο πιθανά να περιέχουν τοξίνες αυτής της οικογένειας και έτσι σε αυτά στρέφουν τη προσοχή τους οι βιομηχανίες τροφίμων. Υψηλά ποσοστά περιεκτικότητας σε φουμονισίνες έχουν καταγραφεί σε μικρής έκτασης (οικιακές) καλλιέργειες καλαμποκιού τόσο στη Κίνα όσο και στη Νότια Αφρική.

Για τους λόγους αυτούς κρίθηκε αναγκαίο το FDA να θεσπίσει τα ανώτατα όρια του συνολικού περιεχομένου φουμονισίνων στο καλαμπόκι (2-4 ppm) και σε τροφές (5-100 ppm) που βασίζονται σε αυτό. Έτσι η Ευρωπαϊκή Επιτροπή πρότεινε μια μέγιστη ανεκτή συνολική εισαγωγή φουμονισίνων στον οργανισμό 2 g/kg σωματικού βάρους (61) (62).

Ειδικότερα ο τύπος Fumonisin B1 (FB1) προσελκύει την περισσότερη προσοχή δεδομένου ότι συναντάται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70% της συνολικής περιεκτικότητας σε φουμονισίνη *Fusarium* στα μολυσμένα δείγματα καλαμποκιού και εκθέτει τον άνθρωπο σε υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, προωθώντας τη δραστηριότητα όλων των φουμονισίνων. Το γεγονός αυτό συνδέθηκε με τον μεταβολισμό της μυκοτοξίνης κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των τροφίμων, που στηρίζεται κυρίως στη μερική ή πλήρη υδρόλυση της μίας ή και των δύο εστέρομάδων (63). Εκτός αυτού, η μερική υδρόλυση έχει παρατηρηθεί και παρουσία υγρασίας κάτω από τις υψηλές θερμοκρασίες (64).



Σχήμα 4 Φουμονισίνη B1 (51)

Αυτή η αλυσίδα γεγονότων έθεσε το στάδιο ώστε να πολλαπλασιαστούν τα ερευνητικά προγράμματα ανά τον κόσμο, έχοντας ως στόχο τα ακόλουθα:

- 1) Τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό των διαφόρων ειδών φουμονισίνων που μολύνουν τα τρόφιμα.
- 2) Τον καθορισμό των παραγόντων που ευνοούν τον σχηματισμό φουμονισίνων
- 3) Τον έλεγχο μόλυνσης των τροφίμων και τον προσδιορισμό των επιτρεπτών ορίων στα τρόφιμα
- 4) Την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων για φουμονισίνες
- 5) Την κατανόηση της βιολογικής δραστηριότητας των φουμονισίνων στα ζώα και στους ανθρώπους

- Αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες παράγονται από διάφορα είδη *Aspergillus* και πιο συγκεκριμένα από *aspergillus flavus* και *aspergillus parasiticus* τα οποία πληθαίνουν στις γεωργικές καλλιέργειες κυρίως στις περιοχές με θερμό και υγρό κλίμα. Ήταν οι πρώτες μυκοτοξίνες που προσδιορίστηκαν και θεωρήθηκαν ως πιθανός κίνδυνος για την υγεία των ανθρώπων και ζώων, αφού πέθαναν 100.000 γαλοπούλες από μια οξεία νέκρωση του συκωτιού τους μετά από κατανάλωση αραχίδων οι οποίες είχαν μολυνθεί από στελέχη *Aspergillus flavus* (65).

Μπορούν να μολύνουν πολλές σοδείες, συμπεριλαμβανομένων των φιστικιών, του καλαμποκιού, του βαμβακόσπορου, των καρυδιών της Βραζιλίας, των καρυκευμάτων κ.α.. Η μόλυνση 'ευδοκιμεί' στις ζεστές και υγρές περιοχές του κόσμου, όπως η Αφρική και μερικά μέρη της Κίνας.

Είναι από τις πιο καρκινογόνες τοξίνες και μετά την εισαγωγή τους στον οργανισμό μεταβολίζονται στο συκώτι (66). Αυτές οι μυκοτοξίνες απαντώνται σε διάφορες μορφές από τις οποίες οι πιο σημαντικές είναι οι: B1 (πιο καρκινογόνος από τις άλλες), B2, G1, G2, M1 και M2.

Η M1 μορφή είναι ο κυρίαρχος μεταβολίτης της Αφλατοξίνης B1 (AFB1) που βρίσκεται στο μητρικό γάλα που μεταβιβάζεται στο παιδί με το θηλασμό. Επίσης απαντάται και στα ζώα που καταναλώνουν AFB1-μολυσμένα τρόφιμα. Το "B" και "G" πρόθεμα αναφέρεται στο μπλε (blue) ή πράσινο (green) φθορισμό που παρατηρείται ύστερα από έκθεση της τοξίνης σε U.V. ακτινοβολία

Η Διεθνής Επιτροπή αντικαρκινικού αγώνα έχει ταξινομήσει την αφλατοξίνη B1 (AFB1) ως καρκινογόνο ουσία και τις αφλατοξίνες B2, G1 και G2 (AFB2, AFG1 και AFG2) ως πιθανές καρκινογόνες ουσίες στους ανθρώπους (67) (68). Στην πραγματικότητα, αποδείχθηκε ότι ανήκουν στις πιο ισχυρές νεφροτοξικές φυσικές ενώσεις και καρκινογόνες ουσίες που προσβάλλουν το συκώτι και συνεπώς, προσέκλυσε την ιδιαίτερη προσοχή προς μελέτη από την ανακάλυψή τους στις αρχές της δεκαετίας του '60 (69).

Λόγω της μεταφοράς τους στα τρόφιμα, και συνεπώς και στον οργανισμό μέσω της τροφικής αλυσίδας, θεωρούνται ότι μπορούν να επηρεάσουν σε μεγαλύτερο βαθμό από όλες τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες την ανθρώπινη υγεία.

Περιοχές με υψηλά ποσοστά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) σύμφωνα με μια έρευνα έχουν να κάνουν όχι μόνο με την ηπατίτιδα β αλλά και με ταυτόχρονη μόλυνση από AFB1, πράγμα που δείχνει ότι η AFB1 είναι ικανός παράγοντας για να προκαλέσει από μόνος του HCC στον άνθρωπο (51).

Πιο πρόσφατο παράδειγμα προσβολής πληθυσμού από αφλατοξίνη είναι αυτό στην ανατολική Κένυα, όπου το 2004 προσβλήθηκαν κάποιες εκατοντάδες πληθυσμού. Ο λόγος αυτού του ξαφνικού ξεσπάσματος ήταν η φτωχή συγκομιδή αραβοσίτου όπου είχε «χαλάσει» και ήταν ευάλωτη στη μούχλα λόγω της ξηρασίας. Επιπλέον οι άνθρωποι, για να φρουρήσουν τη

σοδειά τους ενάντια στην κλοπή, αποθήκευσαν τον αραβόσιτο στα σπίτια τους, τα οποία ήταν θερμότερα και πιο υγρά από τους σιτοβολώνες όπου αποθηκευόταν συνήθως. Από τον Ιανουάριο μέχρι τον Ιούνιο του 2004, 317 άνθρωποι εισήχθησαν σε νοσοκομεία για νοσοκομειακή περίθαλψη, με συμπτώματα ηπατικής ανεπάρκειας, εκ των οποίων 125 πέθαναν. Όταν εξετάστηκαν τα δείγματα αραβοσίτου βρέθηκαν συγκεντρώσεις αφλατοξίνης B1 υψηλότερες μέχρι και 4400 μέρη ανά δισεκατομμύριο (ppb), δηλαδή 220 φορές πάνω από το κενυατικό όριο για τα τρόφιμα (70).

Εκτός του καρκίνου του ήπατος, έκθεση σε μεγάλα ποσοστά αφλατοξίνης μπορεί να οδηγήσει σε οξεία ζημιά του συκωτιού, οίδημα, αλλαγή στην πέψη και στην απορρόφηση ή/και στο μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών. Κανένα ζωικό είδος δεν είναι άνοσο στα τοξικά αποτελέσματα των αφλατοξινών, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων, εντούτοις, οι άνθρωποι έχουν μια εξαιρετικά υψηλή ανοχή στην έκθεση αφλατοξίνης. Τα παιδιά, παρόλα αυτά, επηρεάζονται ιδιαίτερα από την αφλατοξίνη που οδηγεί σε καθυστέρηση στην ανάπτυξη και σε νοητική στέρηση. Ο μεταβολίτης M1 της αφλατοξίνης μπορεί να παρεμβληθεί στο DNA και να αλκυλοποιήσει τις βάσεις του, προκαλώντας καρκίνο του ήπατος. Ιατρικές έρευνες έχουν αποδείξει, ότι μια κανονική διατροφή συμπεριλαμβανομένων λαχανικών όπως τα καρότα, το σέλινο και ο μαϊντανός, μειώνει τα καρκινογόνα αποτελέσματα της αφλατοξίνης (71).

- Ζεαραλενόνη

Η Ζεαραλενόνη (zearalenone, ZON), ανήκει στην κατηγορία των μυκοοιστρογόνων, και έχει προκαλέσει την έντονη προσοχή της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της πιθανότητας να επηρεάζει τα περιβαλλοντικά οιστρογόνα, τα οποία μπορεί να έχουν τη δυνατότητα να αναστατώνουν τις λειτουργίες των στεροειδών ορμονών που καθορίζουν το φύλο. Πρόκειται για προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού. Τα είδη *Fusarium* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ZON και απαντώνται συχνότερα στις χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις είναι το *F.graminearum* και το *F.culmorum* και σπανιότερα, το *F.equiseti* και *F.cerealis* (72).

Η ζεαραλενόνη είναι μια λακτόνη του 6 (10-υδρόξυ-6-όξο-τρανς-1-εντενέκυλο)-β-ρεσορκυκλικού οξέος με μοριακό τύπο $C_{18}H_{22}O_5$ και μοριακό βάρος 318,36. Οι μεταβολίτες α-και β-ZEN είναι τα δύο ισομερή που σχηματίζονται με την αναγωγή της κετονο-ομάδας του άνθρακα στη θέση 6 του δακτυλίου της λακτόνης, σε υδροξυλ-ομάδα ($C=O > C-OH$) και έχουν μοριακό τύπο $C_{18}H_{24}O_5$, και μοριακό βάρος 320,36 (73).

Η Ζεαραλενόνη είναι ένα άσπρο κρυσταλλικό στερεό με το σημείο τήξης της να κυμαίνεται από 159-165 °C, ενώ το μοριακό της βάρος είναι 318,36. Η διαλυτότητα της στο νερό είναι 0,002g/100ml. Είναι λιγότερο διαλυτή στο εξάνιο και παρουσιάζει σταδιακή αύξηση στο βενζόλιο, το ακετονιτρίλιο, τη

μεθανόλη, την αιθανόλη και την ακετόνη. Είναι επίσης διαλυτή στα υδάτινα αλκαλικά διαλύματα.

Η μελέτη κι η εκτίμηση των πειραματικών δεδομένων οδήγησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στον καθορισμό ενός προσωρινού ορίου ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης ZON ίσο με 0,5 μg/kg Σ.Β. Η απόφαση αυτή βασίστηκε στο NOEL (No-Observed-Effect Level, επίπεδο μη παρατηρούμενης δράσης) των 40 μg/kg Σ.Β, ανά ημέρα, για χρονικό διάστημα 15 ημερών σε χοίρους. Στην ίδια μελέτη η επιτροπή έλαβε υπ' όψιν το LOAEL (Lowest-Observed-Adverse-Effect Level, επίπεδο 29 χαμηλότερης παρατηρούμενης δυσμενούς δράσης) των 200 μg/kg Σ.Β., ανά ημέρα και πρότεινε όπως η πρόσληψη της ZON συμπεριλαμβανομένων και των μεταβολιτών της να μη υπερβαίνει τα 0,5 μg/kg Σ.Β.

Η ζεαραλενόνη απαντάται (παγκοσμίως) στους δημητριακούς καρπούς (σιτάρι, κριθάρι, σόγια, βρώμη, καλαμπόκι, κ.λπ.), όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας κατά την αποθήκευσή τους ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων. Οι μύκητες του γένους *Fusarium* παράγουν τα υψηλότερα ποσοστά ZON σε σχετική υγρασία 45% και θερμοκρασία 20-25°C (74). Έχουν αναφερθεί σε συνθήκες φυσικής μόλυνσης των ζωοτροφών συγκεντρώσεις 500 έως 600 ppm, στη Minnesota των Ηνωμένων Πολιτειών, 135 ppm, στη Φινλανδία (75), 100 ppm, στην Ουγγαρία (76), 64 ppm, στην Indiana των Ηνωμένων Πολιτειών (77), μεγαλύτερες των 803 μg/kg, στη νοτιοδυτική Γερμανία και των 120 μg/kg, στη Βουλγαρία. Σε ερευνητική εργασία κατά την οποία συλλέχθηκαν 500 δείγματα από 19 διαφορετικές χώρες διαπιστώθηκε ότι το 44% από αυτά περιείχαν ζεαραλενόνη και η μέση συγκέντρωσή της ήταν 45 ppm (78) .

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η μόλυνση των τροφίμων από τους μύκητες οφείλεται στο σύνολο τριών κυρίως παραγόντων (79):

- Στην μόλυνση των εγκαταστάσεων με έναν μυκητιακό εμβόλιο
- Στην αύξηση εκείνων των μυκήτων
- Στην ενδεχόμενη παραγωγή της μυκοτοξίνης.

Οι κύριοι μηχανισμοί της μόλυνσης περιλαμβάνουν τη διασπορά του μολυσματικού υλικού από το χώμα και τη βροχή κατά τη διάρκεια της άνθησης (σίτος και κριθάρι) ή (αραβόσιτος), μαζί με τη μεταφορά του μολυσματικού υλικού από τον αέρα. Έτσι εμποδίζεται να αναπτυχθεί η συγκομιδή αραβόσιτου. Επιπλέον η μεταφορά του μολυσματικού υλικού στον αραβόσιτο μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από τα πουλιά είτε από τα έντομα, γεγονός που οδηγεί στη μετάδοση των μυκήτων του γένους *graminearum* F.

Στο εργαστήριο, στελέχη του γένους *Fusarium*, αναπτύσσονται και παράγουν μυκοτοξίνες όταν η ενεργότητα του νερού είναι της τάξεως 0,98 (80) γεγονός που ισοδυναμεί με την περιεκτικότητα υγρασίας στο σιτάρι να ξεπερνάει το 25% σε 25 °C. Βάση αυτής δεδομένης προϋπόθεσης, σχετικά με το ποσοστό υγρασίας που εμπεριέχεται στο σιτάρι, η μεγαλύτερη δραστηριότητα των στελεχών του γένους *Fusarium* πραγματοποιείται σε

ορισμένες χρονικές περιόδους κυρίως κατά την διάρκεια ανάπτυξης των πυρήνων του σιταριού.

Επιπρόσθετα μελέτες στις μυκοτοξίνες (81) έχουν δείξει ότι αν και η μόλυνση των καλλιεργειών από DON εμφανίζεται σχετικά νωρίτερα πριν την ανάπτυξη των πυρήνων τόσο στο σιτάρι[48] όσο και στο καλαμπόκι (82) εντούτοις, η παραγωγή της ζεαραλενόνης στον αραβόσιτο εμφανίζεται αργότερα (83).

Ο μεταβολισμός της Ζεαραλενόνης έχει ιδιαίτερη σημασία και αποτελεί αντικείμενο μελέτης περισσότερο από οποιαδήποτε άλλης μυκοτοξίνης, δεδομένου ότι μερικοί από τους μεταβολίτες υπερβαίνουν αρκετά τις επιδράσεις που προκαλεί η ZON. Μάλιστα κάποιοι από αυτούς έχουν υιοθετηθεί ευρέως σαν τονωτικό από το 1969 προκειμένου να επιτευχθεί η βελτίωση των ποσοστών αύξησης βάρους των βοοειδών. Λόγω των ανησυχιών για τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία τόσο των ζώων όσο και στους ανθρώπους, η χρήση τους καθώς επίσης και η παρουσία τους στα τρόφιμα έχουν απαγορευθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 1985 (84).

2.3. Μυκοτοξίνες: Επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) στο 25% των δημητριακών καρπών που παράγονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, καταγράφεται μόλυνση από μυκοτοξίνες (CAST 1989). Οι δημητριακοί καρποί αποτελούν σημαντικό μέρος τόσο του ανθρώπινου διατροφολογίου, όσο και εκείνου των αγροτικών ζώων και χρησιμοποιούνται συστηματικά από τη βιομηχανία ζωοτροφών. Ο άνθρωπος μολύνεται άμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων φυτικής προέλευσης ή έμμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων ζωικής προέλευσης (85) (86). Η παγκόσμια εξάπλωση του προβλήματος των μυκοτοξικώνσεων, η επικινδυνότητα για τη υγεία του ανθρώπου και των ζώων και οι οικονομικές απώλειες της κτηνοτροφικής παραγωγής καθιστούν την έρευνα για τις μυκοτοξίνες επίκαιρη και αναγκαία.

Ο όρος μυκοτοξίνη επινοήθηκε το 1962 μετά από μια επιδημία που εκδηλώθηκε κοντά στο Λονδίνο και οδήγησε στο θάνατο 100.000 γαλοπούλες, περίπου (87) (88). Η επιδημία αποδόθηκε σε δευτερογενείς μεταβολίτες του μύκητα *Aspergillus Flavus* (αφλατοξίνες) και ευαισθητοποίησε την επιστημονική κοινότητα να στραφεί στη διερεύνηση των μυκοτοξινών. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 300 έως 400 μυκοτοξίνες, ενώ τουλάχιστον 300 έχουν ήδη παραχθεί εργαστηριακά από καλλιέργειες μυκήτων (89). Τα κυριότερα γένη μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες είναι τα *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* και *Claviceps* (90). Τα είδη *Aspergillus flavus* και *parasiticus* παράγουν τις αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2, P1, Q1, B2a και G2a. Σημαντικότερη από αυτές θεωρείται η αφλατοξίνη B1 με ηπατοτοξικές και καρκινογόνες ιδιότητες για τον άνθρωπο και τα ζώα (91).

Μετά την κατανάλωσή της με την τροφή μεταβολίζεται και ανιχνεύεται στο γάλα ως αφλατοξίνη M1 (92). Ο μύκητας *Penicillium citrinum* και μερικά είδη *Aspergillus* (*A. terreus* και *A. niveus*) παράγουν τη μυκοτοξίνη κιτρινίνη (citrinin) η οποία είναι νεφροτοξική. (93)

Η ωχρατοξίνη A (OTA) ανακαλύφθηκε το 1965 ως μεταβολίτης του μύκητα *Aspergillus ochraceus* (94). Παράγεται κυρίως από είδη *Aspergillus* (*A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. niger*) αλλά εμπλέκονται στην παραγωγή της και είδη *Penicillium* (*P. verrucosum*) (95). Η ωχρατοξίνη A θεωρείται ηπατοτοξική, τερατογόνος και καρκινογόνος (96) , αλλά τα κύρια όργανα που προσβάλλει είναι οι νεφροί. Η ευρεία χρήση του *Aspergillus niger* για την παρασκευή κιτρικού οξέος και ενζύμων για ανθρώπινη κατανάλωση καθιστά πολύ σημαντικό τον έλεγχο για πιθανή παραγωγή ωχρατοξίνης A (97).

Από είδη του μύκητα *Claviceps* παράγεται η μυκοτοξίνη εργοτίνη που έχει συσχετιστεί με γάγγραινα και προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος στον άνθρωπο και στα ζώα (98) (99). Οι φουμονισίνες αποτελούν μια οικογένεια μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες των γενών *Fusarium* και *Alternaria*, με κυριότερο μέλος τη φουμονισίνη B1 (100). Η τοξικότητα των φουμονισινών οφείλεται στο ότι επηρεάζουν το μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων (101) (102). Έχουν ηπατοτοξική και καρκινογόνο δράση και στον άνθρωπο σχετίζονται με την εκδήλωση καρκίνου του οισοφάγου (103) .

Μύκητες των γενών *Fusarium*, *Mycothecium*, *Phomopsis*, *Trichoderma*, *Trichothecium* και άλλων, παράγουν μια ομάδα μυκοτοξινών που αριθμεί περισσότερα από 60 είδη και καλούνται τριχοθεσίνες. Από αυτά η δεοξυνιβαλενόλη (DON), η διακετοξυσκιρπενόλη (DAS) και η T-2, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο, παράγονται από το γένος *Fusarium* και προκαλούν αιμορραγία, διάρροια, εμετό, ανορεξία, καθυστέρηση της ανάπτυξης, νευρομυϊκή διεγερσιμότητα και δερματίτιδες μετά τη μόλυνση (104).

Η ζεαραλενόνη (ZON) είναι μια μη στεροειδής μυκοτοξίνη με οιστρογονική δράση. Παράγεται από ορισμένα είδη μυκήτων του γένους *Fusarium*, ανιχνεύεται συχνά στις μολυσμένες από μύκητες ζωοτροφές και έχει παγκόσμια εξάπλωση (105). Έχει την ιδιότητα να συνδέεται με τους υποδοχείς οιστρογόνων στους διάφορους ιστούς και να προκαλεί διαταραχές της αναπαραγωγικής δραστηριότητας στα παραγωγικά ζώα (106). Στον άνθρωπο η παρουσία της ZON συνδέθηκε σε αδenoκαρκίνωμα και υπερπλασία του ενδομητρίου (107).

Η ZON μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ, είναι ηπατοτοξική και προκαλεί καρκίνο του ήπατος. Οι αυξημένες πιθανότητες μόλυνσης του ανθρώπου από μυκοτοξίνες μέσω της τροφής του, και οι ακόλουθοι κίνδυνοι για την υγεία του, έχουν κινητοποιήσει την επιστημονική κοινότητα στη μελέτη των μυκοτοξινών.

Ιδιαίτερα επιβαρυντική για τον άνθρωπο είναι η αφλατοξίκωση (κυρίως η χρόνια έκθεση σε αφλατοξίνες), η οποία συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου

του ήπατος και νεφροπάθειες. Ως τοξίνες με πιθανή καρκινογόνο δράση έχουν θεωρηθεί η ωχρατοξίνη Α (νεοπλασίες του ουροποιητικού συστήματος), οι φουμονισίνες (καρκίνος του οισοφάγου) και η ZON (νεοπλασίες του ενδομητρίου) (108).

Τα αλκαλοειδή εργοτίνης (ergot alkaloids) προκαλούν οίδημα των άκρων, γάγγραινα και θάνατο (109) ή προσβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και προκαλούν παραισθήσεις και παράλυση (110). Η υγεία και η παραγωγικότητα των ζώων επηρεάζεται από τις μυκοτοξίνες σε διαφορετικό βαθμό, ανάλογα με το είδος τους. Τα μηρυκαστικά είναι πιο ανθεκτικά στην επίδραση των μυκοτοξινών σε σύγκριση με άλλα είδη ζώων (χοίροι, πτηνά) διότι η μικροβιακή χλωρίδα της μεγάλης κοιλίας έχει την ικανότητα να μειώνει την τοξικότητά τους (111). Το πρόβατο θεωρείται ανθεκτικότερο της αγελάδας.

Στην τελευταία, η κατανάλωση αφλατοξίνης B1 έχει ως επακόλουθο την απέκκρισή της με το γάλα ως M1, σε ποσοστό 0,5 έως 3% της συγκέντρωσής της στις ζωοτροφές. Το γεγονός ότι το γάλα είναι ένα προϊόν που απευθύνεται στο ευρύ καταναλωτικό κοινό (στο οποίο περιλαμβάνονται και ευπαθείς ομάδες), σε συνδυασμό με τις καρκινογόνες ιδιότητες των αφλατοξινών, καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικό τον έλεγχο των αφλατοξινών B1 και M1 στα μηρυκαστικά. Η δεοξυνιβαλενόλη σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς συνδέεται με μείωση της γαλακτοπαραγωγής στα βοοειδή, παρότι υπάρχουν και αντίθετες απόψεις (112). Τέλος, η T-2 αναφέρθηκε ότι στα μεγάλα μηρυκαστικά προκαλεί αποβολές (προς το τέλος της κύησης), αιμορραγικό σύνδρομο και ανοσοκαταστολή μέσω της μείωσης της συγκέντρωσης των IgM, IgG και IgA στον ορό του αίματος (113) (114).

Στα ιπποειδή ο μεγαλύτερος κίνδυνος μόλυνσης προέρχεται από τη φουμονισίνη B1 η οποία είναι νευροτοξική και προκαλεί εκφυλιστική εγκεφαλοπάθεια (leukoencephalomalacia) με συμπτώματα όπως πάρεση, ευερεθιστότητα, αταξία και αλλοιώσεις της λευκής ουσίας και του φλοιού του εγκεφάλου (115). Επίσης η αφλατοξίκωση B1 εκδηλώνεται με ανορεξία, νωθρότητα, χλωρότητα ή ακόμη και θάνατο (116).

Οι μυκοτοξινώσεις αναφέρονται εδώ και πολλά χρόνια ως αιτιολογικοί παράγοντες απωλειών στην πτηνοτροφία. Τα πτηνά είναι ευαίσθητα στη μόλυνση κυρίως u945 από τις αφλατοξίνες, την OTA καθώς και τις τριχοθεσίνες T-2 και την DAS. Η αφλατοξίνη B1, μόνη της ή σε συνδυασμό με την OTA, διαταράσσει την ανάπτυξη και αυξάνει τη θνησιμότητα των εμβρύων στις όρνιθες (117). Επιπλέον, προκαλεί απώλεια βάρους, καθυστέρηση της ανάπτυξης των ορνιθίων, διαταράσσει τη δραστηριότητα των ηπατικών ενζύμων, προκαλεί αύξηση του βάρους του ήπατος και των νεφρών, αιμορραγίες και νεκρώσεις ιστών (118).

Η ανίχνευση B1, OTA και τριχοθεσινών στο σιτηρέσιο των πτηνών συνδυάζεται με αυξημένα περιστατικά σαλμονέλλωσης και κοκκιδίωσης λόγω ανοσοκαταστολής. Η κατανάλωση τροφής μολυσμένης με T-2 και DAS

προκαλεί στα νεαρά πτηνά ανορεξία, απώλεια βάρους καθώς και έλκη στις παρειές και στη στοματική κοιλότητα (119).

Ο χοίρος και ιδιαίτερα οι σύες συγκαταλέγονται μεταξύ των πλέον ευπαθών ζώων στη μόλυνση από μυκοτοξίνες. Παχυνόμενοι χοίροι που κατανάλωσαν σιτηρέσιο με αφλατοξίνες (κυρίως B1 και ίχνη G1, G2 και B2) σε συγκεντρώσεις από 0,02 έως 1,48 mg/kg τροφής παρουσίασαν μείωση της ημερήσιας αύξησης βάρους και βλάβες στα ηπατικά κύτταρα (120). Ο Huff και οι συνεργάτες του (121) διαπίστωσαν μείωση της ημερήσιας αύξησης βάρους των παχυνόμενων χοίρων των οποίων το σιτηρέσιο ήταν μολυσμένο με αφλατοξίνη ή/και OTA (2 mg/kg τροφής). Μάλιστα η μείωση του ρυθμού αύξησης του σωματικού βάρους ήταν μεγαλύτερη όταν συνυπήρχαν και οι δύο τοξίνες, γεγονός που επιβεβαιώνει την αθροιστική δράση τους. Στις σύες, η ωχρατοξίκωση προκαλεί διαταραχές της νεφρικής λειτουργίας, πολυδιψία, πολυουρία, ανορεξία αδυναμία και κινητική δυσλειτουργία. Η μυκοτοξίκωση από φουμονισίνη B1 χαρακτηρίζεται από ηπάτωση και οξύ πνευμονικό οίδημα που εκδηλώνεται με δύσπνοια, κυάνωση και τελικά, θάνατο. Από τις τριχοθεσίνες η DON προκαλεί άρνηση λήψης τροφής από τους χοίρους, καθυστέρηση στο ρυθμό αύξησης του σωματικού βάρους και σε μεγάλες συγκεντρώσεις εμετό, ενώ η T-2, προκαλεί δερματίτιδα και αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις (122).

Η ζεαραλενόνη συνδέεται άμεσα με διαταραχές της λειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος των συών (κυρίως των νεαρών άνηβων). Η μυκοτοξίνη αυτή και οι μεταβολίτες της (α-και β-ZEN) λόγω της χημικής ομοιότητάς τους με την οιστραδιόλη 17-β, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων (123). Μάλιστα, η α-ZEN έχει 10 έως 20 φορές μεγαλύτερη ικανότητα σύνδεσης με τους υποδοχείς της οιστραδιόλης 17-β από τη ZON και περίπου, 100 φορές μεγαλύτερη από τη β-ZEN .

Σύμφωνα με άλλους συγγραφείς η α-ZEN έχει 3 έως 4 φορές μεγαλύτερη οιστρογονική δράση από τη ZON (124). Γενικά η υδροξυλίωση της ZON σε α-ZEN αποτελεί διαδικασία ενεργοποίησης της τοξικότητας, ενώ η παραγωγή της β-ZEN καταλήγει σε απενεργοποίηση της τοξικότητας.

Πειράματα σε επίμυες έδειξαν ότι τα «cis-ισομερή» της ZON είναι πιο δραστικά από τα «trans-ισομερή» σε ό,τι αφορά στην οιστρογονική δράση τους, ενώ στην περίπτωση της α-ZEN δεν παρατηρήθηκε ανάλογη διαφορά (125). Στις σύες η κλινική εικόνα προσβολής από ZON περιλαμβάνει συμπτώματα υπεροιστρογονισμού όπως εξοίδηση των χειλέων του αιδοίου, οίδημα των μαστών, επιστροφές σε οίστρο σε σύντομα μεσοδιαστήματα, αναφροδισία, αποβολή, καθώς και γέννηση χοιριδίων με απαγωγή των οπισθίων άκρων (splay-leg) που αδυνατούν να θηλάσουν (126). Σε νεαρές άνηβες σύες, η μικρότερη δόση ZON που οδήγησε σε συμπτώματα υπεροιστρογονισμού ήταν 1 mg, PO, για 8 ημέρες (127). Σε ενήλικες σύες η χορήγηση 50-100 μg ZON/g τροφής προκάλεσε αιδοιοκολπίτιδα, πρόπτωση κόλπου, καθυστέρηση εκδήλωσης οίστρου, αγωνιμότητα, ψευδοκύηση ή/και αποβολή. Στον κάπρο τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση

της ζεαραλενόνης είναι ανεπαρκή. Νεαροί κάπροι που λάμβαναν με την τροφή, 500-600 ppm ζεαραλενόνης, για τρεις μήνες, παρουσίασαν μείωση του βάρους των όρχεων κατά 30%, σε σύγκριση με μάρτυρες (128). Νεαροί κάπροι που λάμβαναν 40 ppm ζεαραλενόνης, ανά ημέρα, για τέσσερις εβδομάδες, παρουσίασαν μείωση της γενετήσιας ορμής και της συγκέντρωσης της τεστοστερόνης στο πλάσμα του αίματος (129). Ανάλογα προβλήματα παρατηρήθηκαν σε ενήλικες κάπρους που έλαβαν 200 ppm ζεαραλενόνης, ανά ημέρα, για χρονικό διάστημα οκτώ εβδομάδων (130). Σε αντίθεση με την τελευταία αναφορά, ο Osweiler αναφέρει ότι η λήψη 200 ppm ζεαραλενόνης προκάλεσε μείωση της γενετήσιας ορμής σε νεαρούς κάπρους, αλλά στους ενήλικες δεν παρατηρήθηκε κανένα σύμπτωμα μυκοτοξίκωσης.

2.4. Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσει τις μυκοτοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Καν. 1881/2006)]. Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των διαφόρων μυκήτων και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατό να απαλειφθούν πλήρως οι μυκοτοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Συνιστάται επομένως να περιορίζεται η παρουσία τους στο κατώτατο εφικτό επίπεδο. Η μείωση της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτού του είδους τις τοξικές ουσίες αποτελεί μέγιστη προτεραιότητα με ταυτόχρονη μείωση των ορίων (131).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραπάνω επιπτώσεις στον άνθρωπο θεωρείται σκόπιμο να περιοριστεί τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες στα τρόφιμα, όσο και η περιεκτικότητα σε κάποιες συγκεκριμένες τοξίνες (αφλατοξίνη B1). Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αφλατοξίνη M1 θεωρείται ως γονοτοξική καρκινογόνος ουσία ίση (132) ή λιγότερο επικίνδυνη από ότι η αφλατοξίνη B1 (131), είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η περιεκτικότητά της στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από ανθρώπους και ιδίως από μικρά παιδιά. Αναμφίβολα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού και κυρίως τα βρέφη.

Η θέσπιση των μέγιστων ορίων για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστων συγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και εκτίμηση πολλών παραγόντων όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Παράλληλα πρέπει να υπάρχει σύνδεση των παραπάνω με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές. Σήμερα δεν είναι γνωστό κάποιο όριο κάτω από το οποίο να μην παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή από τις μυκοτοξίνες, συνεπώς δεν μπορεί να οριστεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (131). Συνεπώς, η Ε.Ε. έχει θεσπίσει νομοθετικά όρια στα υλικά που προορίζονται για χρήση ως τρόφιμα ή ως ζωοτροφές (133). Για τη θέσπιση των μέγιστων ορίων λαμβάνονται υπ' όψιν

πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και άλλα σώματα, τα οποία συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη διαδικασία. Μία περίληψη για την τοξικολογική εκτίμηση των μυκοτοξινών με αναφορά στην επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον πραγματοποιείται με τη συνεργασία μεταξύ των ακόλουθων οργανισμών:

- Διεθνές Πρόγραμμα για την Χημική Ασφάλεια
- Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου
- Κοινή Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές των Τροφίμων

Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα (134). Επιπρόσθετα αρκετές ομάδες εργασίας και ειδικές επιτροπές με εξουσιοδότηση από όλα τα κράτη μέλη προετοιμάζουν τις προτάσεις. Η μέγιστη τιμή που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση πχ. για κελυφωτά φιστίκια που προορίζονται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα είναι 2,0 µg/kg (ppb) για την αφλατοξίνη B1 και 4,0 µg/kg (ppb) για το άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2 (131) (135). Για την αφλατοξίνη B1 έχει θεσπιστεί ξεχωριστό όριο (133) (135). Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζει ότι οι μέθοδοι διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες επιτρέπουν να μειωθεί η περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως: στα αράπικα φιστίκια, στους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, στα ξηρά φρούτα και στον αραβόσιτο. Έτσι, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες περιεκτικότητες από τις προαναφερόμενες σε μυκοτοξίνες για τα εν λόγω προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων.

Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις μυκοτοξίνες έχουν καθοριστεί λαμβανομένης υπόψη της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που ακολουθούνται και ειδικά για τα κελυφωτά φιστίκια είναι 5,0 µg/kg (ppb) για την B1 και 10,0 µg/kg (ppb) για το άθροισμα των B1, B2, G1 και G2 (131). Στις παρτίδες που ανιχνεύθηκαν μυκοτοξίνες μέσα στα όρια που προορίζονται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία θα πρέπει να υπάρχει και η ανάλογη σήμανση. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης των τροφίμων με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και απαγορεύεται η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων. Επιπλέον, απαγορεύεται να αναμειγνύονται με καθαρά από μυκοτοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για την απομάκρυνσή τους.

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο συντείνουν στο ότι η παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Αυτό έχει οδηγήσει τόσο σε εντατικούς ελέγχους όσον αφορά την παρουσία τους στα διάφορα τρόφιμα όσο και στην καθιέρωση ορίων, όπως και στην Ε.Ε. Νομοθετικοί κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως (135) (136).

Εντούτοις, αν και η θέσπιση των ανώτερων ορίων είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών φορέων παρατηρούνται διαφορετικά όρια ανάμεσα στα διάφορα κράτη (136). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στις Η.Π.Α. το μέγιστο επιτρεπτό όριο για την παρουσία αφλατοξινών ανέρχεται στα 20 ppb για τρόφιμα και ζωοτροφές, ενώ για τα κελυφωτά φιστίκια στα κράτη της Ε.Ε. στα 2 ppb για την AFB 1 και 4 ppb για το άθροισμα των αφλατοξινών, όπως προαναφέρθηκε. Αυτό σημαίνει ότι στην ΕΕ τα όρια είναι 5 φορές χαμηλότερα απ'ότι στις Η.Π.Α. (136). Παράλληλα ο αρμόδιος αμερικανικός φορέας έχει θέσει ως όριο για την AFM 1 στο γάλα και τα συναφή προϊόντα την τιμή 0.5 µg/Lt, ενώ στην Ε.Ε. η αντίστοιχη τιμή είναι 0.05 µg/Lt. Στην πράξη, τα διαφορετικά όρια, που έχουν θεσπιστεί στις διάφορες χώρες του κόσμου προκαλούν ενδεχόμενα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο, εις βάρος συνήθως των λιγότερο αναπτυγμένων χωρών.

Πίνακας 3 Ανώτερα όρια Μυκοτοξινών σύμφωνα με την Νομοθεσία

Mycotoxins	ΕΥ	USA
Aflatoxins B1,B2, G1, G2	2 ppb B1 4 ppb B1,B2, G1, G2 20 ppb ζωοτροφές	20 ppb για τροφές 100-300 ppb ζωοτροφές
Aflatoxin M1	0,5 ppb για γάλα	0,5 ppb για γάλα
Ochratoxin A (OTA)	10 µg/kg σταφίδες, σταφύλια 2 µg/l κρασί και χυμούς σταφ. 5 µg/kg σπόρους δημητριακών 3 µg/kg προϊόντα σιτηρών 0,5 µg/kg παιδικές τροφές	No regulation in the USA
Fumonisin	4 mg/kg FB1 στα σιτηρά 1 mg/kg τρόφιμα με σιτηρά 0,2 mg/kg για παιδικές τροφές με βάση σιτηρά 5-100 ppm ζωοτροφές	2-4 ppm για τροφές 5-100 ppm για ζωοτροφές
Zearalenone (ZEA)	100 µg/kg για σιτηρά εκτός καλαμπόκι 350 µg/kg για καλαμπόκι 75 µg/kg για άλευρα εκτός καλαμπόκι 20 µg/kg για βρεφικές τροφές	No regulation in the USA 1 ppm (προτείνεται)
Deoxynivalenon (DON/F2)	400-500 ppb for human and animal	1ppm για δημητριακά 5-10 ppm για δημητριακά για ζωοτροφές
Patulin	50 ppb χυμό μήλων 25 ppb νωπά φρούτα 10 ppb παιδικές τροφές	No regulation in the USA
Other mycotoxins		No regulation in the USA

2.5. Ανάλυση και προσδιορισμός μυκοτοξινών

Η ανίχνευση των μυκοτοξινών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον λαμβάνοντας υπόψη τις συνέπειες που επιφέρουν στην υγεία ανθρώπων και ζώων η ύπαρξή τους στα τρόφιμα ή τις ζωοτροφές. Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια είναι ζωτικής σημασίας το τελικό

αναλυτικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή ώστε οι μέθοδοι ανάλυσης να είναι ακριβείς, αξιόπιστες και επικυρωμένες (136).

Εάν δεν επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο είναι δυνατό πολλά προϊόντα να απορρίπτονται χωρίς λόγο ή αντίστροφα, προβληματικές παρτίδες να γίνονται αποδεκτές δημιουργώντας κινδύνους στην υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών, καθώς επίσης και σοβαρές επιπτώσεις στην οικονομία και το παγκόσμιο εμπόριο. Νομοθετικά (Καν. 882/2004 Παρ.3), στις γενικές απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων αναφέρεται ότι οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια: α) ορθότητα, β) ευκολία εφαρμογής, γ) όριο ανίχνευσης, δ) όριο προσδιορισμού, ε) ακρίβεια (λαμβάνεται από διεργαστηριακή δοκιμή), στ) επαναληψιμότητα, ζ) αναπαραγωγιμότητα, η) ανάκτηση, θ) επιλεκτικότητα, ι) ευαισθησία, ια) γραμμικότητα, ιβ) αβεβαιότητα.

Για την ανάλυση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα υπάρχουν διαθέσιμες στη βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι, καθώς και οι επίσημες μέθοδοι του AOAC (Association of Analytical Communities) (137) (138) (139) (140). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό των μυκοτοξινών λαμβάνοντας υπ'όψιν τα θεσμοθετημένα όρια.

Είναι επίσης αναγκαίο τα εργαστήρια να χρησιμοποιούν μεθόδους με ποσοστά απόδοσης όπως απαιτούνται από τη νομοθεσία (Καν 401/2006) (141). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα προσδιορισμού, η χρήση των οποίων εξαρτάται από την υλικοτεχνική υποδομή που έχουν τα διάφορα εργαστήρια, τις οικονομικές τους δυνατότητες, τον χρόνο της ανάλυσης και την ευαισθησία της (142). Πριν από την ανάλυση των τροφίμων για τον έλεγχο της ύπαρξης μυκοτοξινών προηγούνται μία σειρά πολλών και σύνθετων λειτουργιών, στις οποίες περιλαμβάνονται: η δειγματοληψία (135), η προετοιμασία του δείγματος, η εκχύλιση των μυκοτοξινών από το δείγμα, ο καθαρισμός του δείγματος και τέλος ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός (142) (143) (144) (145), με διάφορες μεθόδους.

Το σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης, για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (RASFF) είναι ένα σημαντικό μέσο της ΕΕ, στις προσπάθειές της να εγγυηθεί την ασφάλεια των τροφίμων, τα τελευταία 30 χρόνια. Το RASFF δίνει τη δυνατότητα ταχείας και αποτελεσματικής ανταλλαγής πληροφοριών, μεταξύ των κρατών - μελών της ΕΕ και της Επιτροπής. Όλα τα μέλη του RASFF (27 κράτη μέλη, Επιτροπή, Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων, Νορβηγία, Λιχτενστάιν, Ισλανδία και Ελβετία) διαθέτουν μια υπηρεσία, που λειτουργεί, σε εικοσιτετράωρη βάση και εξασφαλίζει την αποστολή, παραλαβή και διεκπεραίωση των επείγουσών κοινοποιήσεων, σε όσο το δυνατόν πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Χάρη στο RASFF, αποφεύχθηκαν πολλοί κίνδυνοι, σχετικοί με την ασφάλεια των τροφίμων, προτού υπάρξει βλάβη για τους καταναλωτές. Το RASFF είναι μία από τις επιτυχίες της ενιαίας

προσέγγισης της ΕΕ, στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων και χρησιμοποιεί, στον ανώτατο βαθμό, τις δυνατότητες της επικοινωνίας και της συνεργασίας. Το σύστημα RASFF είναι χρήσιμο, για να μπορούν οι καταναλωτές να πληροφορούνται, για τους κινδύνους, για τα τρόφιμα, που εμφανίζονται, στην Ευρώπη.

2.6. Αναλυτικές Τεχνικές

Διάφορες μέθοδοι για την ανάλυση μυκοτοξινών σε διάφορα τρόφιμα είναι διαθέσιμες και αναφέρονται στη βιβλιογραφία (144) (TLC, HPLC, RIA, ELISA, SPR). Η τεχνική ανάλυσης με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC-Thin Layer Chromatography) χρησιμοποιούνταν εκτενέστατα για ανάλυση μυκοτοξίνης και είχε προταθεί ως επίσημη μέθοδος ανάλυσης αφλατοξινών για κελυφωτά φιστίκια από τον AOAC7. Αργότερα, σημειώθηκε μία σημαντική αύξηση στη χρήση της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), η οποία έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης-HPLC μ (143) (144). Πλέον, η σύγχρονη τάση είναι να χρησιμοποιείται η HPLC για την ανάλυση αφλατοξίνης (146), αλλά και άλλων, λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με την TLC και της σταθερότητας των αποτελεσμάτων σε σχέση με την μέθοδο της ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent). Οι τεχνικές ανοσοδιαγνωστικής όπως η ELISA και η RIA επιδεικνύουν ταχύτητα και αξιοπιστία αποτελεσμάτων, εντούτοις η χρήση τους μπορεί να χαρακτηριστεί ως συμπληρωματική. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση της HPLC έχει αυξηθεί με αποτέλεσμα να έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες για την εφαρμογή της στην ανάλυση αφλατοξινών, αλλά και έχει γίνει αποδεκτή από τις επίσημες μεθόδους ανάλυσης AOAC για μυκοτοξίνες (147). Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου ανάλυσης με HPLC φαίνεται να είναι η δυνατότητα αυτοματοποίησης όπως επίσης η ταχύτητα και η υψηλή ανάλυση.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η υπεροχή και επικράτηση της HPLC ως μεθόδου για την ανάλυση μυκοτοξινών σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους και ιδιαίτερα τις ανοσοχημικές είναι ο υψηλός βαθμός εκλεκτικότητας και ακρίβειάς της. Η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει εφαρμοστεί σε μια σειρά υποστρωμάτων και τροφίμων για τον έλεγχο της παρουσίας σε αφλατοξίνες όπως σιτηρά, μυκηλιακά εκχυλίσματα, βαμβακόσπορο, κρασί, αραβόσιτο, ξηροί καρποί, μπαχαρικά κ.α. Παρ'όλα αυτά η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει κόστος και απαιτεί πιο εξειδικευμένο και έμπειρο εργαστηριακό προσωπικό (148).

Επίσης, υπάρχουν και οι κλασικές αναλυτικές τεχνικές. Ο όρος κλασική τεχνική συνήθως αναφέρεται σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς οι οποίοι είναι συνδυασμένοι με τον κατάλληλο ανιχνευτή. Οι ποσοτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών σε τρόφιμα περιλαμβάνουν ανοσοχημικές στήλες, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) ή Αέρια Χρωματογραφία (G.C) σε συνδυασμό με μια

μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών όπως ανιχνευτές φθορισμού(FLD), ιονισμού φλόγας (FID), συλλήψεως ηλεκτρονίων (ECD), ανιχνευτές υπεριώδους(UV) ή ακόμα και φασματοσκοπία μάζας(MS) (149) (150) (151) (136) .

- Υγρή Χρωματογραφία/Φασματοσκοπία Μάζας (LC/MS) NP-HPLC & RP-HPLC

Τα πρώτα χρόνια εφαρμογής της μεθόδου χρησιμοποιούνταν η HPLC κανονικής φάσης με σύστημα ανίχνευσης για απορρόφηση στο UV. Γρήγορα αποδείχθηκε ότι δεν ήταν ικανοποιητική για τον προσδιορισμό αφλατοξίνης σε επίπεδα νανογραμμαρίων (ng). Λόγω του ότι οι αφλατοξίνες φθορίζουν, ένα σύστημα φθορισμομετρικής ανίχνευσης θεωρήθηκε καταλληλότερο, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου. Ένα όμως από τα πιο σημαντικά προβλήματα είναι η εξάρτηση της ικανότητας φθορισμού των κυρίων αφλατοξινών (B1, B2, G1, G2) από τη σύνθεση του διαλύτη. Η NP-HPLC από την δεκαετία του '70 σταμάτησε να χρησιμοποιείται μετά την ανάπτυξη της χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης, λόγω μειωμένης επαναληψιμότητας των χρόνων συγκράτησης όταν το νερό ή οργανικοί διαλύτες μεταβάλλουν την υγρασία του χρωματογραφικού μέσου (silica ή αλουμίνα). Σήμερα, η HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και πολλές φορές αναφέρεται απλά ως HPLC χωρίς να επεξηγεται ιδιαίτερα. Η RP-HPLC αποτελείται από μία μη-πολική στατική φάση (συνήθως silica στο οποίο έχει εφαρμοστεί RMe_2SiCl , όπου R είναι αλκύλιο όπως $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ή C_8H_{17}) και μία υδατική μέτρια πολική κινητή φάση. Το σύστημα RP-HPLC αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο λόγω της ευκολίας στο χειρισμό και της μικρότερης τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση.

- LC/MS

Την τελευταία δεκαετία η LC/MS αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την ποιοτική ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών. Παρόλα αυτά η σημαντική αυτή εξέλιξη δε συνέβη μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990. Συγκρινόμενη με τις κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους ανίχνευσης όπως UV, η φασματοσκοπία μάζας μπορεί να προσφέρει αυξημένη ευαισθησία και επιλεκτικότητα (αν και ο ανιχνευτής φθορισμού μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητος για τις αφλατοξίνες). Επιπροσθέτως είναι δυνατό να διερευνήσει τη μοριακή δομή μεταβολιτών (κρυμμένες μυκοτοξίνες-masked mycotoxins) και να παρακάμψει τελείως τα στάδια της παραγοντοποίησης και του καθαρισμού που είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και ελλοχεύουν κινδύνους για εργαστηριακά λάθη. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μικρή ποσότητα του αρχικού προπαρασκευαστικού δείγματος. Υπάρχει κίνδυνος μείωσης της ακρίβειας

της μεθόδου εξαιτίας της τελείως απρόβλεπτης επίδρασης των συστατικών που συνυπάρχουν στο αρχικό δείγμα με την αναλυόμενη ουσία. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός μεθόδων που έχουν σαν βάση την LC/MS (152) (153).

- Μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μυκοτοξινών

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη μεθόδων που αφορούν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας LC-MS/MS. Αυτή η τάση ήταν αποτέλεσμα της ανακάλυψης ότι πολλές μυκοτοξίνες μπορούσαν να συνυπάρχουν σε ένα υπόστρωμα καθώς επίσης και ότι παρουσίαζαν συνεργιστική δράση με αποτέλεσμα να θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου (154) (155). Επιπροσθέτως ήταν εξαιρετικά επιθυμητή η ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα επέτρεπε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων σχεδόν των μυκοτοξινών πραγματοποιώντας μια και μόνο ανάλυση. Αυτό θα μείωνε εξαιρετικά το κόστος αλλά και τον χρόνο της ανάλυσης. Αν και η φασματοσκοπία μάζας συχνά προσφέρει επαρκή επιλεκτικότητα και ευαισθησία, η εφαρμογή της στην ταυτόχρονη ανάλυση πολλών μυκοτοξινών, παρεμποδίστηκε μόνο από την διαφορετικότητα που παρουσιάζουν στις χημικές ιδιότητες τους οι τοξίνες όπως (οξύτητα, βασικότητα, πολικότητα). Για αυτό τον λόγο έπρεπε να υπάρξουν συμβιβασμοί ως προς την επιλογή της κινητής φάσης, του μέσου εκχύλισης αλλά και για τις πειραματικές συνθήκες (θερμοκρασία).

Το αρχικό ερέθισμα για την ταυτόχρονη ανάλυση μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας LC/MS προήλθε από τον τομέα της μυκητολογίας. Εκεί η φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιήθηκε για να αναγνωρίσει συγκεκριμένα είδη χρησιμοποιώντας τους μεταβολίτες τους (156). Η τεράστια ανάπτυξη των βάσεων δεδομένων για την ποιοτική ανίχνευση μυκοτοξινών στην LC/MS (157), οδήγησε στην ανάπτυξη και ποσοτικών μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τοξινών σε υλικά κατασκευής κτηρίων αλλά και σε είδη διατροφής (158) (159).

Ενώ η προηγούμενη μέθοδος είχε το μειονέκτημα της μικρής ανάκτησης για κάποιες αναλυόμενες ουσίες, η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσίασε εξαιρετική ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην επεξεργασία που υφίσταται η πρώτη ύλη, αλλά και στην δημιουργία μιας καμπύλης βαθμονόμησης με το υπόστρωμα, έχοντας σαν σκοπό την αντιστάθμιση των επιδράσεων που οφείλονται σε αυτό. Μερικά χρόνια αργότερα η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε με μεγάλη επιτυχία στον ταυτόχρονο προσδιορισμό αφλατοξινών, ωχρατοξίνης Α, μετά από μια πολύ μικρή τροποποίηση του διαλύτη εκχύλισης (160).

Μετά από αυτή την αρχική φάση οι επιστήμονες στόχευσαν στην ανάλυση τοξινών που προέρχονταν από τον *Fusarium*. Ο Royer και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ταυτόχρονη ποσοτική ανάλυση ζεαραλενόνη, φουμοσίνη Β1, δεοξυνιβαλενόλη σε καλαμπόκι. Το όριο ανίχνευσης ήταν

πολύ κατώτερο από αυτό που πρότεινε η Ευρωπαϊκή Ένωση. Υπήρχε όμως το πρόβλημα της χαμηλής ανάκτησης της ζεαραλενόνης (161).

Όλες οι προαναφερθείσες μέθοδοι εξαρτώνται άμεσα από τον τρόπο καθαρισμού αλλά και από το μέσο εκχύλισης. Υπάρχουν όμως κάποιες κατηγορίες τοξινών που δεν είναι συμβατές με τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (πχ οι φουμοσίνες δεν προσδιορίζονται από τις μεθόδους των Tanaka και Ren (162) (163). Συγκεκριμένα στις συγκεκριμένες εργασίες δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν ούτε αλκαλοειδή εργοτίνης ούτε κρυμμένες μυκοτοξίνες. Για να ξεπεράσουν αυτό το εμπόδιο, κάποιες από τις υπάρχουσες μεθόδους παρακάμπτουν το στάδιο του καθαρισμού και εισάγουν στο LC/MS ακατέργαστο εκχύλισμα. Αυτό προφανώς αυξάνει τις απαιτήσεις για την επιλεκτικότητα του ανιχνευτή καθώς επίσης και την ανάγκη για έρευνα των επιδράσεων του υποστρώματος, κυρίως όταν αναλύονται τρόφιμα. Ο Spanjer και οι συνεργάτες του (164) προσδιόρισαν 22 μυκοτοξίνες σε διαφορετικά υποστρώματα τροφίμων. Τα δείγματα εκχειλίστηκαν χρησιμοποιώντας ένα μίγμα ακετονιτρίλιο/νερό και στη συνέχεια αραιώθηκαν με νερό λίγο πριν την εισαγωγή τους στο LC/MS. Επίσης πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένος έλεγχος για κάθε συνδυασμό αναλυόμενης ουσίας/υποστρώματος. Με αυτό τον τρόπο συγκεντρώθηκαν επαρκή στοιχεία που υπέδειξαν ότι η συγκεκριμένη ανάλυση είναι πράγματι εφικτή και ταυτόχρονα αρκετά ευαίσθητη για τον προσδιορισμό της ποσότητας των περισσοτέρων μυκοτοξινών που προβλέπεται από την νομοθεσία.

- Ανοσοχημικές Τεχνικές

Ταχείς μέθοδοι οι οποίες βασίζονται σε ανοσοχημικές τεχνικές έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν στάδια καθαρισμού ή στάδια εμπλουτισμού της αναλυόμενης ουσίας. Η ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για το γρήγορο έλεγχο των περισσότερων μυκοτοξινών, ειδικά για τον έλεγχο των πρώτων υλών. Αν και οι δοκιμές ELISA εμφανίζουν υψηλή εξάρτηση από το υπόστρωμα, τα πλεονεκτήματα της είναι η μεγάλη ταχύτητα, η ευκολία της λειτουργίας της και η ευαισθησία. Οι δοκιμές ELISA είναι διαθέσιμες στο εμπόριο για τις περισσότερες από τις σημαντικότερες μυκοτοξίνες. (165) (166)

- Άλλες Τεχνικές

Οπτικές μέθοδοι, όπως η φασματοσκοπία FT-Raman αποτελεί μία αρκετά αποτελεσματική τεχνική όσον αφορά την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων κρυσταλλικών μορφών [156]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι απαιτεί πολύ μικρή προετοιμασία δείγματος, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα εμφάνισης μετασχηματισμών στερεής κατάστασης των μετασταθών κρυσταλλικών μορφών, καθώς το σχήμα και το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος έχουν πολύ μικρή επίδραση (167). Οι

συγκεκριμένες τεχνικές παρουσιάζονται να είναι πολύ υποσχόμενες για την γρήγορη και μη καταστροφική ανάλυση μυκοτοξινών σε σιτηρά. Οι συγκεκριμένες προσεγγίσεις επιτρέπουν την ελαχιστοποίηση του δείγματος εισαγωγής.

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Στόχος της εργασίας

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα ζωοτροφών ως προς την περιεκτικότητά τους σε τοξικά μέταλλα και σε μυκητοξίνες . Ο στόχος είναι με τις μεθόδους του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος και της φασματομετρίας μάζας αντίστοιχα να προσδιοριστούν οι περιεκτικότητες στα συστατικά τα οποία είναι επικίνδυνα για την τροφική αλυσίδα.

Τα δείγματα που λήφθηκαν συμφωνούσαν με 2 σημαντικά κριτήρια : ήταν όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερα στην ανάπτυξη της ζωικής παραγωγής και είχαν ευρεία χρήση και κατανάλωση.

1.2. Δειγματοληψία

Στην προσπάθεια για μεγαλύτερη αντιπροσωπευτικότητα στα δείγματα , έγινε επιλογή από δύο πηγές δειγμάτων. Η μία πηγή ήταν η εταιρεία ΜΥΛΟΙ ΚΡΗΤΗΣ , η οποία παράγει φυτικές πρώτες ύλες μη μεταλλαγμένες και χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικών , και η άλλη ήταν έμπορος ζωοτροφών και πρώτων υλών που εισάγονται από χώρες εκτός της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τα δείγματα που πάρθηκαν από τους ΜΥΛΟΥΣ ΚΡΗΤΗΣ ήταν αιγοπροβατοτροφή , πτηνοτροφή και κουνελοτροφή. Από την δεύτερη πηγή (έμπορο) έγινε λήψη πέντε δειγμάτων : 1.Μίγμα για κότες (εκτός Ε.Ε.) 2. Μίγμα για πρόβατα (εκτός Ε.Ε.) 3. Καλαμπόκι(εκτός Ε.Ε.) 4. Κριθάρι (εκτός Ε.Ε.) 5.Βρώμη(εκτός Ε.Ε.).

1.3. Προετοιμασία δειγμάτων-Μέτρηση υγρασίας

Τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν με τη χρήση συσκευής ομογενοποίησης στερεών δειγμάτων (Pulverisette 19, Fritsch), η οποία ήταν συνδεδεμένη με κυκλώνα (Nabertherm). Στη συσκευή ομογενοποίησης είχε τοποθετηθεί σχάρα με ανοίγματα 0,5 mm. Το κάθε δείγμα εισήχθη ξεχωριστά στη συσκευή. Προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση των δειγμάτων μεταξύ τους, τα διάφορα αποσπώμενα εξαρτήματα πλένονταν με σαπουνόνερο και αποιονισμένο νερό μετά την επεξεργασία κάθε δείγματος. Επιπλέον, πριν την κονιορτοποίηση κάθε δείγματος ετίθετο η συσκευή σε λειτουργία για λίγα δευτερόλεπτα χωρίς δείγμα, ώστε να καθαριστεί το εσωτερικό του. Στη συνέχεια εισαγόταν ένα μικρό μέρος του δείγματος, ώστε να «καθαρίσει» τη συσκευή από υπολείμματα του προηγούμενου δείγματος, χωρίς να συλλεχθεί το προϊόν της κονιορτοποίησης.



Εικόνα 7 Συσκευή ομογενοποίησης Pulverisette 19, Fritsch

Στην συνέχεια ζυγίζονται τα δείγματα για τον υπολογισμό της υγρασίας που περιλαμβάνεται σε αυτά. Η ζύγιση έγινε σε κομμάτια αλουμινόχαρτου.

Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο φούρνο στους 60 °C για 24 ώρες μαζί με το αλουμινόχαρτο. Στην θερμοκρασία αυτή απομακρύνθηκε η όποια υγρασία υπήρχε στα δείγματα. Αφού εξήλθαν από τον φούρνο τα δείγματα αφέθηκαν σε ξηραντήρα για κάποιο χρονικό διάστημα ώστε να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην συνέχεια επαναζυγίζονται τα δείγματα για τον υπολογισμό του ποσοστού υγρασίας. Το ποσοστό Υγρασίας υπολογίζεται από τον τύπο : $\text{Υγρασία \%} = [(W-B)/W] \cdot 100$

όπου W: μεικτή μάζα Δείγματος και B: ξηρή μάζα Δείγματος

Πίνακας 4 Αποτελέσματα Μετρήσεων για τον υπολογισμό του ποσοστού Υγρασίας

	Ποσοστό Υγρασίας(%)
Πτηνοτροφή(ΜΥΛΟΙ ΚΡΗΤΗΣ)	9.1
Αιγοπροβατοτροφή (ΜΥΛΟΙ ΚΡΗΤΗΣ)	8.5
Κουνελοτροφή (ΜΥΛΟΙ ΚΡΗΤΗΣ)	8.0
Μίγμα για κότες (εκτός Ε.Ε.)	7.6
Μίγμα για πρόβατα (εκτός Ε.Ε.)	7.0
Καλαμπόκι(εκτός Ε.Ε.)	10.6
Κριθάρι (εκτός Ε.Ε.)	7.5
Βρώμη(εκτός Ε.Ε.)	6.8

Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν ένα μέσο όρο ποσοστού υγρασίας 8.8% με απόκλιση $\pm 1.8\%$.

1.4. Προσδιορισμός Μετάλλων

Το επόμενο βήμα του πειράματος ήταν η χώνευση των δειγμάτων με ισχυρά οξέα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων τύπου MARS 6 Microwave Reaction System της εταιρείας CEM Corporation. Η συσκευή αυτή χρησιμοποιεί την τεχνολογία PowerMAX, η οποία βοηθάει στον αυτόματο έλεγχο της ισχύος, ώστε να επιτευχθεί πλήρης χώνευση, ανεξάρτητα από τον αριθμό των δειγμάτων και το μέγεθός τους, αλλά και να αποφευχθούν οι εξώθερμες αντιδράσεις. Επιπλέον, ο φούρνος μικροκυμάτων MARS 6 χρησιμοποιώντας το δείγμα με την μεγαλύτερη αντιδραστικότητα ως δείγμα αναφοράς, ελέγχει τη θερμοκρασία χώνευσης για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της διεργασίας και την αποφυγή δυσλειτουργιών.



Εικόνα 8 Φούρνος μικροκυμάτων MARS 6

Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν τα δείγματα και τοποθετήθηκαν σε δοχεία χώνευσης προσθέτοντας 10ml HNO_3 και 2mL HCl σε κάθε ένα απ' αυτά. Ο φούρνος μπορεί να δεχτεί μέχρι δώδεκα δείγματα ταυτόχρονα, οπότε τα δείγματα χωνεύτηκαν ταυτόχρονα. Τα δείγματα αφέθηκαν για χρόνο 15

λεπτά και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στις θέσεις των δοχείων του φούρνου μικροκυμάτων σύμφωνα με το σχεδιάγραμμα της συσκευής. Στο δοχείο control τοποθετήθηκε αισθητήρας πίεσης και οπτική ίνα για τη δυνατότητα του οργάνου να μετρά τη θερμοκρασία. Εντός 20 λεπτών η θερμοκρασία φτάνει τους 200 °C και σ' αυτή την θερμοκρασία διατηρείται για 15 λεπτά. Έπειτα αρχίζει η θερμοκρασία να κατεβαίνει . Μετά τη χώνευση, ακολούθησε διήθηση του κάθε δείγματος με φίλτρα Whatman 0,45 μm ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα που είχαν παραμείνει. Εν συνεχεία, τα δείγματα εισήχθησαν σε ειδικά δοχεία (vials) τύπου Orange, στα οποία συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό ώστε το δείγμα να αραιωθεί μέχρι τα 45 ml (μέγιστος όγκος χωρητικότητας των vials). Ακολουθείται η μέθοδος ICP-MS για μελετήσουμε την ποσότητα των τοξικών μετάλλων (Ti , Cr, Mn ,Fe, Co, Cu, Ni ,Zn, As, Sr, Mo,Cd , Ba , Hg, Pb) που υπάρχουν στα δείγματά μας.

1.5. Προσδιορισμός Μυκοτοξινών

Η πρώτη διεργασία που λαμβάνει μέρος είναι η διαδικασία της εκχύλισης. Σε φιαλίδια εισάγονται 5 g δείγματος και στην συνέχεια προστίθενται 50 mL διαλύματος μεθανόλης/νερού 80/20 %v/v. Μια δεύτερη σειρά δειγμάτων παρασκευάστηκε με διάλυμα μεθανόλης/νερού 70/30 % v/v. Για κάθε δείγμα παρασκευάστηκαν τρία όμοια φιαλίδια για επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Επίσης δοκιμάστηκε και διαφορετικός χρόνος ανάδευσης 5 και 10 λεπτά. Έτσι δημιουργήθηκαν 9 δείγματα (Α,Β,Γ,Δ,Ε,Ζ,Η,Θ,Ι) στα οποία ακολουθήθηκε διαφορετική μέθοδος εκχύλισης ως προς το διαλύτη και τον χρόνο ανάδευσης προκειμένου να βρεθεί η αποτελεσματικότερη.

Πίνακας 5 Χαρακτηριστικά Δοκιμών Εκχύλισης

Καλαμπόκι 1 (Α)	5min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	80% v/v Μεθανόλη
Καλαμπόκι 1' (Β)	5min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	80% v/v Μεθανόλη
Καλαμπόκι 1'' (Γ)	5min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	80% v/v Μεθανόλη
Καλαμπόκι 2 (Δ)	5min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	70% v/v Μεθανόλη
Καλαμπόκι 2' (Ε)	5min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	70% v/v Μεθανόλη
Καλαμπόκι 2'' (Ζ)	5min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	70% v/v Μεθανόλη
Καλαμπόκι 3 (Η)	10 min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	80% v/v Μεθανόλη
Καλαμπόκι 3' (Θ)	10 min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	80% v/v Μεθανόλη
Καλαμπόκι 3'' (Ι)	10 min Vortex	30 min Τράπεζα ανάδευσης	80% v/v Μεθανόλη

Στην συνέχεια πραγματοποιείται η φυγοκέντρωση των δειγμάτων. Η συσκευή ρυθμίζεται στις 3800 στροφές ανά λεπτό. Η διαδικασία διαρκεί για 15 λεπτά. Τα δείγματα (Α,Β,Γ,Δ,Ε,Ζ,Η,Θ,Ι,) τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20 °C έως την ανάλυση τους με την μέθοδο HPLC και ICP MS .

Τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μετρήσεις βγήκαν όλα μηδενικά. Έτσι, επιλέχθηκε η μέθοδος 3 (διαλύτη μεθανόλη/νερό 80/20 % v/v, 10 min Vortex και 30 min Τράπεζα ανάδευσης) για όλα τα δείγματα εις διπλούν. Δηλαδή , δημιουργήθηκαν 16 δείγματα ,τα οποία ήταν 2 όμοια φυαλίδια (5g δείγματος/50 mL διαλύτη) για κάθε ένα από τα κριθάρι, βρώμη, καλαμπόκι, μίγμα για κότες, αιγοπροβατοτροφία , κουνελοτροφία , πτηνοτροφία, μίγμα για πρόβατα. Τα αποτελέσματα από τις μεθόδους HPLC και ICP MS ήταν και πάλι μηδενικά. Επομένως ακολουθείται έλεγχος της μεθόδου.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

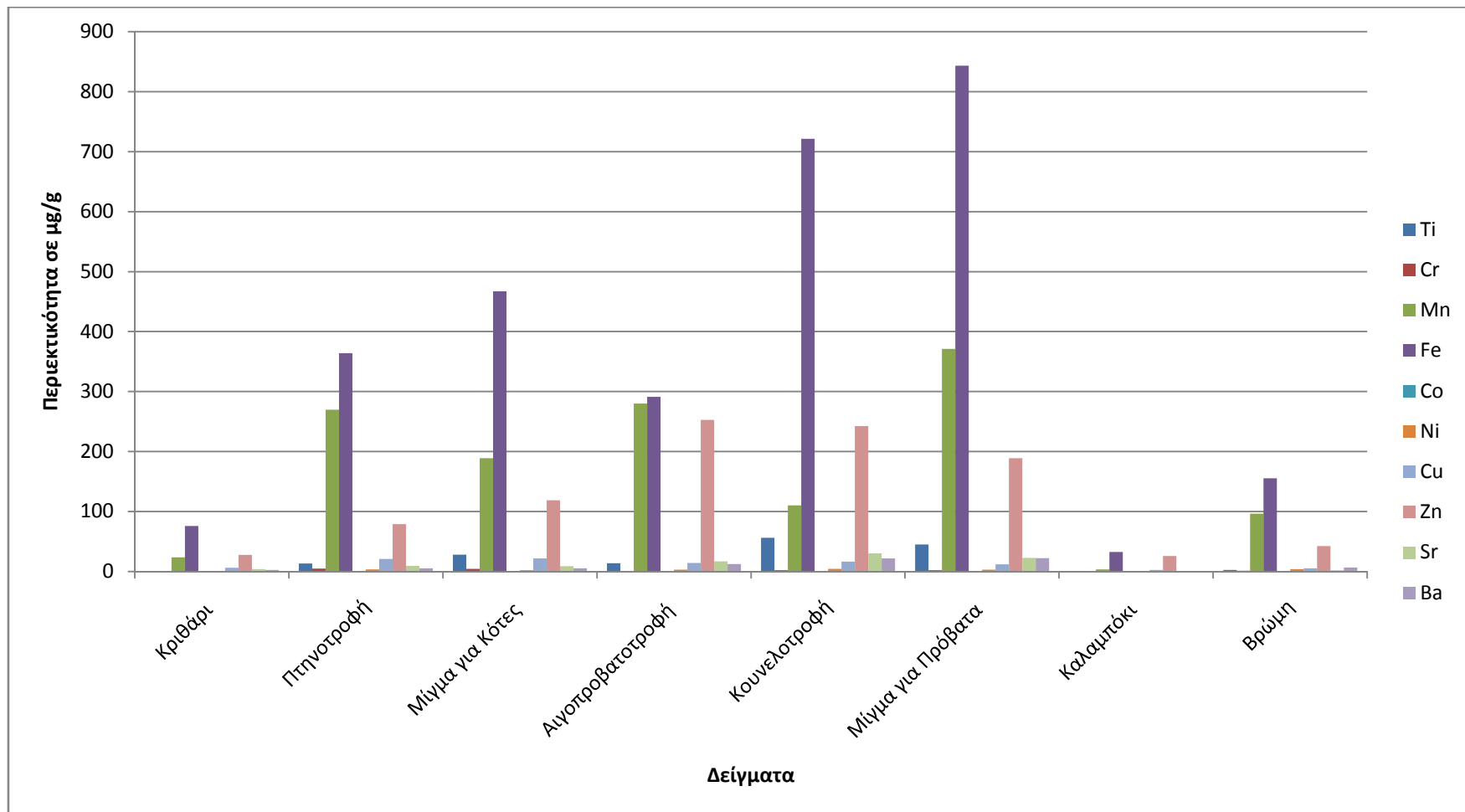
Για τον έλεγχο της μεθόδου που ακολουθήθηκε ποτίστηκαν έξι δείγματα και ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Αρχικά , φτιάχτηκαν τρία διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις αμπούλες του 1ml Aflatoxin Mix Kit της εταιρείας SUPELCO . Κάθε αμπούλα είχε τις ακόλουθες συγκεντρώσεις στις αφλατοξίνες: 0,3μg/ml G₂ , 1μg/ml G₁ , 0,3μg/ml B₂ , 1μg/ml B₁ και αραιώθηκε σε απιονισμένο νερό και μεθανόλη. Το διάλυμα Α των 100 ml συγκέντρωσης 1% v/v aflatoxin mix σε απιονισμένο νερό, το διάλυμα Β των 100ml συγκέντρωσης 1% v/v σε μεθανόλη και το διάλυμα Γ των 100ml συγκέντρωσης 0,2% v/v σε απιονισμένο νερό. Ακόμα δύο δείγματα ζωοτροφών τα οποία ήταν μίγμα για κότες (1) και καλαμπόκι (2). Έτσι, ποτίστηκαν τα δύο δείγματα με τα τρία διαλύματα και φτιάχτηκαν τα δείγματα Α1,Α2,Β1,Β2,Γ1,Γ2. Για την εκχύλιση των δειγμάτων αυτών επιλέχθηκε η συγκέντρωση 80% v/v Μεθανόλης. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι 100 g/L.

Στην συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της ανάδευσης, της φυγοκέντρωσης και της ανάλυσης με συνδυασμένη τεχνική φασματοσκοπίας μαζών MS-MS. Οι συνθήκες της τεχνικής περιγράφονται στο Παράρτημα ΙΙΙ.

1.6 Αποτελέσματα

Αποτελέσματα Μετρήσεων Τοξικών Μετάλλων

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε τοξικά μέταλλα των δειγμάτων. Αρκετά μέταλλα εμφάνισαν συγκεντρώσεις μικρότερες από αυτές που ανιχνεύει η μέθοδος.



Διάγραμμα 1 Συγκεντρώσεις Τοξικών Μετάλλων στα Δείγματα

1.7. Σχολιασμός Αποτελεσμάτων

Τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό σε υγρασία ήταν το καλαμπόκι και η πτηνοτροφή. Το χαμηλότερο ήταν στα δείγματα Βρώμης και στο Μίγμα για Πρόβατα.

Τα δείγματα εμφάνισαν διαφορετικές συγκεντρώσεις στα διάφορα Τοξικά Μέταλλα. Ο Σίδηρος εμφάνισε πολύ υψηλές τιμές στα δείγματα των ζωοτροφών ενώ και το Μαγγάνιο με τον Ψευδάργυρο εμφάνισαν σημαντικά ποσοστά σε περιεκτικότητα στα δείγματα. Τις μικρότερες συγκεντρώσεις εμφάνισαν το Κοβάλτιο, το Νικέλιο και το Χρώμιο.

Στο δείγμα του κριθαριού τα τοξικά μέταλλα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ήταν ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος και το μαγγάνιο. Σε μικρότερες περιεκτικότητες εμφανίζονται ο χαλκός, το στρόντιο, το βάριο, το χρώμιο και το νικέλιο. Τα υπόλοιπα μέταλλα δεν ανιχνεύτηκαν στο δείγμα. Στο δείγμα της πτηνοτροφής, τα μέταλλα του σιδήρου και του μαγγανίου περιέχονται σε μεγαλύτερο ποσοστό ενώ ακολουθούν ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το τιτάνιο, το στρόντιο, το βάριο, το χρώμιο και το νικέλιο.

Στο δείγμα του μίγματος για κότες, τρία μέταλλα εμφανίζουν υψηλές τιμές περιεκτικότητας. Ο σίδηρος, το μαγγάνιο και ο ψευδάργυρος. Ακολουθούν το τιτάνιο, ο χαλκός, το στρόντιο, το βάριο, το χρώμιο, το νικέλιο και το κοβάλτιο. Στο δείγμα της αιγοπροβατοτροφής κύρια συστατικά είναι ο σίδηρος, το μαγγάνιο και ο ψευδάργυρος. Επίσης υπάρχουν το στρόντιο, ο χαλκός, το τιτάνιο, το βάριο, το νικέλιο και το χρώμιο.

Στο δείγμα της κουνελοτροφής ο σίδηρος είναι το βασικό συστατικό και ακολουθούν ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο, το τιτάνιο, το στρόντιο, το βάριο, ο χαλκός, το νικέλιο, το χρώμιο και το κοβάλτιο. Στο μίγμα για τα πρόβατα βασικά μέταλλα είναι ο σίδηρος, το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος και το τιτάνιο. Ακολουθούν το στρόντιο, το βάριο, ο χαλκός, το νικέλιο και το χρώμιο.

Στο δείγμα του καλαμποκιού κύρια στοιχεία είναι ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο, ο χαλκός, το χρώμιο, το στρόντιο, το βάριο και το νικέλιο. Στο δείγμα της βρώμης πρώτο μέταλλο σε περιεκτικότητα είναι ο σίδηρος και ακολουθούν το μαγγάνιο και ο ψευδάργυρος. Το βάριο, ο χαλκός, το νικέλιο, το τιτάνιο, το στρόντιο και το χρώμιο έπονται.

Συνοψίζοντας, όλα τα αποτελέσματα των τοξικών μετάλλων στα δείγματα των ζωοτροφών εξάγεται εύκολα το συμπέρασμα ότι είναι πλούσια σε περιεκτικότητα σε σίδηρο κυρίως, ενώ έχουν υψηλές συγκεντρώσεις σε ψευδάργυρο και μαγγάνιο. Επίσης, τα δείγματα των ζωοτροφών είτε δεν εμφάνιζαν περιεκτικότητες σε όλα τα μέταλλα είτε τα οι συγκεντρώσεις τους ήταν μικρότερες από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου.

Σημαντικό θεωρείται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα δείγματα που προέρχονται από πηγές εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης και από πηγές εκτός της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τα δείγματα δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα των τοξικών μετάλλων.

1.8. Αποτελέσματα Προσδιορισμού Μυκοτοξινών

Για να υπολογιστεί η περιεκτικότητα των δειγμάτων στις αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2 χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μέθοδος :

Για την B1 που βρίσκεται στο ιόν με $m/z=313,4$ (B1) η περιεκτικότητα σε ppb δίνεται από την εξίσωση : $ppb = 0.0021 \cdot Area + 0.4292$.

Για την B2 που βρίσκεται στο ιόν με $m/z=315,3$ (B2) η περιεκτικότητα σε ppb δίνεται από την εξίσωση : $ppb = 0.0229 \cdot Area + 1.3566$.

Για την G1 που βρίσκεται στο ιόν με $m/z=329,3$ (G1) η περιεκτικότητα σε ppb δίνεται από την εξίσωση : $ppb = 0.0029 \cdot Area + 0.1703$.

Για την G2 που βρίσκεται στο ιόν με $m/z=331,4$ (G2) η περιεκτικότητα σε ppb δίνεται από την εξίσωση : $ppb = 0.0645 \cdot Area + 0.8523$.

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών (σε $\mu g/g$) στα δείγματα που ποτίστηκαν για τον έλεγχο της μεθόδου παρατίθενται στον πίνακα :

Πίνακας 6 Περιεκτικότητα σε Αφλατοξίνες

		m/z	Area	$\mu g/g$	Αφλατοξίνη
Δείγμα A1	G2	331.4	0	0	G2
	G1	329.3	151.3	0.00061	G1
	B2	315.3	0	0	B2
	B1	313.4	230.9	0.00091	B1
Δείγμα A2	G2	331.4	0	0	G2
	G1	329.3	302.1	0.00105	G1
	B2	315.3	75.6	0.00309	B2
	B1	313.4	485.3	0.00145	B1
Δείγμα B1	G2	331.4	0	0	G2
	G1	329.3	91.5	0.00044	G1
	B2	315.3	0	0.00136	B2
	B1	313.4	206.2	0.00086	B1
Δείγμα B2	G2	331.4	0	0	G2
	G1	329.3	114.1	0.00050	G1
	B2	315.3	0	0.00136	B2
	B1	313.4	244.9	0.00094	B1
Δείγμα Γ1	G2	331.4	0	0	G2
	G1	329.3	0	0	G1
	B2	315.3	0	0	B2

	B1	313.4	55.9	0.00055	B1
Δείγμα Γ2	G2	331.4	0	0	G2
	G1	329.3	0	0	G1
	B2	315.3	0	0	B2
	B1	313.4	69.7	0.00058	B1

Παρατηρούμε ότι τα δείγματα δεν εμφανίζουν καθόλου περιεκτικότητα ή περιεκτικότητα μικρότερη από τα όρια ανίχνευσης στην αφλατοξίνη G2. Τις υψηλότερες περιεκτικότητες εμφανίζουν σε αφλατοξίνη B2 τα δείγματα A2, B1 και B2.

1.9. Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Στην μελέτη για τον έλεγχο της μεθόδου για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών μελετήθηκαν δύο δείγματα σε τρία διαφορετικά διαλύματα : το μίγμα για τις κότες και το καλαμπόκι. Τα αποτελέσματα από το πρώτο διάλυμα έδειξε ότι το μίγμα για κότες περιέχει τις αφλατοξίνες G1 και B1, στο δεύτερο διάλυμα το μίγμα για τις κότες περιείχε την αφλατοξίνη G1, την αφλατοξίνη B2 και την αφλατοξίνη B1. Στο τρίτο διάλυμα το μίγμα για κότες περιέχει μόνο την αφλατοξίνη B1. Στο δεύτερο δείγμα του καλαμποκιού και στο πρώτο διάλυμα τα αποτελέσματα εμφάνισαν περιεκτικότητες στις αφλατοξίνες G1, B2 και την B1. Στο δεύτερο διάλυμα το δείγμα καλαμποκιού εμφάνισε τις αφλατοξίνες G1, B2 και την B1 ενώ στο τρίτο διάλυμα το δείγμα εμφάνισε μόνο την αφλατοξίνη B1.

Συγκεντρωτικά λοιπόν οι αναλύσεις για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών με τρία διαφορετικά διαλύματα στα μίγματα δεν έδωσαν ξεκάθαρο αποτέλεσμα για το μίγμα για τις κότες πέρα από ότι περιέχει την αφλατοξίνη B1. Το ίδιο παρουσιάστηκε στο δείγμα καλαμποκιού.

Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα ζωοτροφών μελετήθηκαν και αναλύθηκαν με τις μεθόδους της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης και με την Φασματοσκοπία Μαζών . Οι αναλύσεις έδειξαν ότι οι περιεκτικότητες σε τοξικά μέταλλα είναι αμελητέες σε αρκετές περιπτώσεις ενώ στα μέταλλα που η περιεκτικότητα είναι σημαντική, βρίσκεται εντός των επιτρεπτών ορίων που προβλέπει η νομοθεσία.

Στα δείγματα βρέθηκαν υψηλές ποσότητες Σιδήρου οι οποίες διαμορφώνουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό και είναι απαραίτητα προσθετική ομάδα για εκατοντάδες ένζυμα και πρωτείνες. Τα μέταλλα Μαγγανίου και Ψευδαργύρου βρέθηκαν σε σημαντικές ποσότητες στα δείγματα. Το μαγγάνιο είναι συστατικό πολλών ενζύμων και συμμετέχει σε πολλές μεταβολικές διεργασίες ενώ ο ψευδάργυρος συμβάλλει στην διατήρηση της λειτουργίας της όσφρησης, της γεύσης, της όρασης και της ακοής. Τέλος σε μικρές αλλά αξιόλογες ποσότητες βρέθηκε το Τιτάνιο και ο Χαλκός σε μερικά δείγματα. Το τιτάνιο είναι αδρανές και βιοσυμβατό με τόσο για τους ανθρώπους και τα ζώα ενώ ο χαλκός βρίσκεται σε ίχνη σε όλα τους ζωντανούς οργανισμούς και προέρχεται από την διατροφή καθώς έχει έντονη αντιμικροβιακή δράση.

Κατά τον έλεγχο της μεθόδου ανάλυσης των ζωοτροφών για αφλατοξίνες υπολογίσαμε τα προβλεπόμενα αποτελέσματα, σύμφωνα με τις αραιώσεις που κάναμε σε κάθε διάλυμα αλλά και την εκχύλιση που ακολούθησε .Οι περιεκτικότητες στα δείγματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 7 Πίνακας Περιεκτικότητας Πρότυπων Δειγμάτων σε Αφλατοξίνες

	μg/g	Αφλατοξίνη
Δείγμα A1	0.0015	G2
	0.005	G1
	0.0015	B2
	0.005	B1
Δείγμα A2	0.0015	G2
	0.005	G1
	0.0015	B2
	0.005	B1
Δείγμα B1	0.0015	G2
	0.005	G1
	0.0015	B2
	0.005	B1
Δείγμα B2	0.0015	G2
	0.005	G1
	0.0015	B2
	0.005	B1
Δείγμα Γ1	0.003	G2

	0.010	G1
	0.003	B2
	0.010	B1
Δείγμα Γ2	0.003	G2
	0.010	G1
	0.003	B2
	0.010	B1

Εάν συγκρίνουμε τους πίνακες 7 και 8 με τα πρότυπα δείγματα και με τα δείγματα ζωοτροφών διαπιστώνουμε την απόκλιση που υπάρχουν στα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των αφλατοξινών. Σπουδαιότερη είναι η μη μετρήσιμη περιεκτικότητα σε αρκετά δείγματα. Επίσης από τους πίνακες εξάγεται το ποσοστό εκχυλισιμότητας ανά δείγμα και αναφέρεται αναλυτικά στον πίνακα 9.

Πίνακας 8 Ποσοστό Εκχυλισιμότητας Αφλατοξινών

	Αφλατοξίνη	Ποσοστό Εκχυλισιμότητας (%)
Δείγμα Α1	G2	0
	G1	12.2
	B2	0
	B1	18.2
Δείγμα Α2	G2	0
	G1	21
	B2	20.6
	B1	29
Δείγμα Β1	G2	0
	G1	8.8
	B2	90.67
	B1	17.2
Δείγμα Β2	G2	0
	G1	10
	B2	90.67
	B1	18.8
Δείγμα Γ1	G2	0
	G1	0
	B2	0
	B1	5.5
Δείγμα Γ2	G2	0
	G1	0
	B2	0
	B1	5.8

Στην ανίχνευση των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2 η ανάλυση εμφάνισε την χαμηλή περιεκτικότητα η οποία δεν ήταν καν μετρήσιμη με την μέθοδο της Φασματοσκοπίας Μαζών σε αφλατοξίνη G2. Επίσης εμφάνισε μικρές περιεκτικότητες αλλά υπολογίσιμες στις υπόλοιπες αφλατοξίνες . Την υψηλότερη τιμή στα δείγματα εμφάνισε η αφλατοξίνη B2. Ακόμα, παρατηρούμε πως τα δείγματα A2 και B2 που περιέχουν καλαμπόκι είχαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα A1 και B1 που περιέχουν μίγμα για κότες. Αυτό δείχνει πως το καλαμπόκι έχει μεγαλύτερη απορροφητικότητα σε αφλατοξίνες σε σχέση με το μίγμα για κότες. Όσων αφορά την αραίωση της αμπούλας με μεθανόλη και νερό τα αποτελέσματα δε μας φανερώνουν αν διαδραμάτισε κάποιο ρόλο η επιλογή αυτή.

Η βελτίωση των μεθόδων της φασματοσκοπίας μαζών για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών θεωρείται αναγκαία στο μέλλον καθώς αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο εύκολη, γρήγορη και αποτελεσματική και θεωρείται από τις σημαντικότερες στο είδος τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Μ., Κιρλάππου.** Οι επιπτώσεις της ρύπανσης του περιβάλλοντος στην τροφική αλυσίδα. Η περίπτωση των παραμενόντων οργανικών ρύπων και των βαρέων μετάλλων. Αθήνα : Πτυχιακή εργασία. Τμήμα Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 2004.
2. **Κουϊμτζής Θ., Φυτιάνος Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ.** *Χημεία Περιβάλλοντος*. Θεσσαλονίκη : UNIVERSITY STUDIO PRESS, 1998.
3. **Βαλαβανίδης, Αθ.** *Οικοτοξικολογία και Περιβαλλοντική Τοξικολογία. Ερευνητική μεθοδολογία για την εκτίμηση οικολογικού κινδύνου από επικίνδυνες χημικές ουσίες*. Αθήνα : Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2007.
4. **Μ., Κίρλαππου.** Οι επιπτώσεις της ρύπανσης του περιβάλλοντος στην τροφική αλυσίδα. Η περίπτωση των παραμενόντων οργανικών ρύπων και των Βαρέων Μετάλλων. Αθήνα : Πτυχιακή εργασία. Τμήμα Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 2004.
5. *Επίδραση της χημικής ρύπανσης του περιβάλλοντος στην ποιότητα των τροφίμων.* **Μπλέκας Γ., Μπόσκου Δ.** Θεσσαλονίκη : s.n., 2000.
6. **Παπαναστασίου, Δ.** *Τεχνολογία και Ποιοτικός έλεγχος αλιευμάτων*. Αθήνα : Εκδόσεις "ΙΩΝ" , Τόμος Β.
7. **Σαμπατακάκης, Η.Δ.** *Ρύπανση του περιβάλλοντος από χημικές ουσίες*. Πειραιάς : Παπασωτηρίου.
8. **Τσακμάκη Εύα.** Βαρέα μέταλλα στα τρόφιμα. *Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή*. Απρίλη 03, 2012.
9. **Χ. Καρατζιάς, Ν. Ρουμπιές, Γ. Χριστοδουλόπουλος, Ν. Πανούσης, Αχ. Παπαστεριάδης.** Μελέτη της δράσης του ιδιοσκευάσματος Kalzoral στην πρόληψη υποτροπής της επιλόχειας υποασβεστιαϊμικής παράλυσης των γαλακτιπαραγωγών αγελάδων. *Δελτίο Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας* . 1997, 48(1): 24-31.
10. **Καραγιαννίδης, Π.** *Ειδική Ανόργανη Χημεία*. Θεσσαλονίκη : Ζητη, 2002.
11. [Online] www.chem.uoa.gr/quali/quali_CO2_Cu_html.
12. **Βάρβογλης, Αν.** *Πορτρέτα των χημικών στοιχείων*. Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2001.
13. Copper: Description, Function, Deficiency symptoms, Toxicity symptoms, Cooking-Storage-Processing, Factors that affect function, Nutrient Interaction, Health conditions, Supplements, Food Sources. [Online] www.whfoods.com.

14. **A., Κουτσελίνης.** *Τοξικολογία*. Αθήνα : Γρ.Παρισιάνοζ' Μαρία Γρ.Παρισιάνου, Τόμος Α, 1997.
15. [Online] www.wikipedia.org/wiki/en2el/zinc.
16. [Online] www.Live-Pedia.gr.
17. **Χαριστός Δημ., Γιούρη-Τσοχατζή Αικ., Μανουσάκης Γ.** *Γενική και Ανόργανη Χημεία Γεωλόγων*. Θεσσαλονίκη : Ζητη, 1998.
18. [Online] www.chem.uoa.gr/quali_CO3_Zn.htm.
19. [Online] www.mednutrition.gr/content/view/1131/170/.
20. [Online] www.eufic.org/article/e1/nutrition/vitamins-minerals-.
21. [Online] <http://ods.od.nih.gov/factsheets/zinc.asp>.
22. [Online] www.mednutrition.gr/content/view/1131/170/.
23. **Emsley, John.** *Nature's building blocks : an A-Z guide to the elements*. Νέα Υόρκη : Oxford University Press,, 2003,.
24. **Weeks, Mary Elvira.** *The discovery of the elements*. s.l. : Kessinger Pub., 2003.
25. **Krebs, Robert E.** *The history and use of our earth's chemical elements : a reference guide*. Westport : Conn. : Greenwood Press, 2006.
26. **van Arkel, A. E.** "Preparation of pure titanium, zirconium, hafnium, and thorium metal". *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* 148. 1925, pp. 345 – 350.
27. **Roza, Greg.** *Titanium*. New York : Rosen Central, 2008.
28. **Nordberg, Gunnar.** *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam : Boston,Academic Press, 2007.
29. **Force, Eric R.** *Geology of titanium-mineral deposits*. s.l. : Boulder, Colo. : Geological Society of America, 1991.
30. **Barksdale, Jelks.** "Titanium", *The Encyclopedia of the Chemical Elements*. New York: Reinhold Book Corporation. s.l. : in Clifford A. Hampel , 1968. pp. 732–738.
31. **Housecroft, Catherine E and Sharpe, A G.** *Inorganic chemistry*. s.l. : Upper Saddle River, N.J. : Pearson Prentice Hall, 2005.
32. [Online] <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A7%CF%81%CF%8E%CE%BC%CE%B9%CE%BF>.
33. [Online]
<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%B1%CE%B3%CE%B3%CE%AC%CE%BD%CE%B9%CE%BF>.
34. [Online] http://vitamines-metalla.blogspot.gr/2012/08/blog-post_1105.html.

35. [Online]
<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A3%CE%AF%CE%B4%CE%B7%CF%81%CE%BF%CF%82>.
36. **A., Pietrangelo.** Haemochromatosis. *Gut.* . May 2003.
37. [Online]
<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CE%BF%CE%B2%CE%AC%CE%BB%CF%84%CE%B9%CE%BF>.
38. [Online]
http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CF%81%CF%83%CE%B5%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CF%8C_%28%CF%87%CE%B7%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CF%8C_%CF%83%CF%84%CE%BF%CE%B9%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%BF%29.
39. [Online]
<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A3%CF%84%CF%81%CF%8C%CE%BD%CF%84%CE%B9%CE%BF>.
40. [Online] <http://www.food-info.net/gr/metal/strontium.htm>.
41. [Online]
<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CE%AC%CE%B4%CE%BC%CE%B9%CE%BF>.
42. [Online] <http://www.food-info.net/gr/metal/cadmium.htm>.
43. [Online] <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%AC%CF%81%CE%B9%CE%BF>.
44. [Online] <http://www.food-info.net/gr/metal/barium.htm>.
45. **Κ.Πετρωτός.** *Ανάπτυξη Ταχείας Μεθόδου Ανάλυσης Επικίνδυνων Μυκοτοξινών σε Ξηρούς Καρπούς.* Λάρισα : s.n., 2010.
46. <http://diagnovet.blogspot.com/2010/05/1.html>.
47. **Ueno, Y.** Trichothecenes. *Chemical, Biological and Toxicological Aspects*, Elsevier, New York, USA. 1983.
48. **J.D. Miller, H.L. Trenholm (Eds.).** , Mycotoxins in Grain. . *Compounds Other Than Aflatoxins*, second ed., Eagan Press, St. Paul, MN, USA. 1997.
49. **Bruxelles, CS/CNTM/MYC/14 final Annex II to Document XXIV/2210/98 European Commission.** *Scientific Committee on Food: opinion on ochratoxin A.* Bruxelles : s.n., 1998.
50. **Patricia A. Murphy, Ph.D., Suzanne Hendrich, PH.D., Cindy Landgren, Ph.D.**
Understanding Mycotoxins. *Foodtechnology06*. 2006.
51. **S.M. Romeroa, R.M. Comerioa, G. Larumbea, A. Ritienib, G. Vaamondea, V. Fernándeza, P. Pintoa.** Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 104. 2005, pp. 43–49.

52. **P.A.Murphy, S.Hendrich, C.Landgren, and C.M.Bryant.** Food Mycotoxins: An Update. *ScientificStatusSummary, The Institute of Food Technologists,*. 2006.
53. **Krogh, P.** Mycotoxins in Food. *Academic Press, London, UK.* 1987.
54. **G.A.Lombaert, P.Pellaers, V.Roscoe, M.Mankotia, R.Neil, P.M.Scott.** Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives & Contaminants: Part A,* . May 01, 2003.
55. **G.S. Shephard, G. Thiel, S. Stockenstrom, E.W. Sydenham.** J. AOAC Int.79 . 1996, p. 671.
56. **L.H. Harrison, B.M. Colvin, J.T. Greene, L.E. Newman, J.R. Cole, J.** Vet. Diagn. Invest. 2. 1990, p. 217.
57. **W.C.A. Gelderblom, N.P.J. Kriek, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel.** Carcinogenesis 12. 1991, p. 1247.
58. **J.P. Rheeder, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, G.S. Shephard, D.J. Schalkwyk.** Phytopathologia 82. 1992, p. 353.
59. **Administration, U.S. Food and Drug.** Background Paper in Support of Fumonisin Levels in Corn and Corn Products Intended for Human Consumption. 2001.
60. **Food, European Commission: Scientific Committee on.** Updated opinion of the Scientific Committee, Fumonisin B1, B2 and B3. 2003.
61. **Administration, U.S. Food and Drug.** Background Paper in Support of Fumonisin Levels in Animal Feed: Executive Summary of this Scientific Support Document. 2001.
62. **R.A. Thakur, J.S. Smith.** J. Agric. Food Chem. 44. 1996, p. 1047.
63. **L.S. Jackson, J.J. Hlywka, K.R. Senthil, L.B. Bullerman, S.M. Musser.** J. Agric. Food Chem. 44. 1996, p. 906.
64. **T.Asao, G.Buchi, M.M.Abdel-Kader, S.B.Chang, E.L.Wick, G.N.Wogan.** J. Am. Chem. Soc. 85. 1963, p. 1706.
65. <http://en.wikipedia.org/wiki/mycotoxins> . [Online]
66. **Humans, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to.** Some natural occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic aromatic Amines and Mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer, Lyon.* 1993, p. 489.
67. **Commission Regulation (EC) No. 1525/98, amending Regulation (EC) No 184/97 setting maximum residue levels for certain contaminants in foodstuffs, Official J. Eur. Commun. L 201/43.** 1998, p. 43.
68. **E.O'Brien, D.R.Dietrich.** Ochratoxin A: The Continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 35. 2005, pp. 33–60.

69. **N.Belli, S.Marin, V.Sanchis, A.J.Ramos.** Ochratoxin A (OTA) in Wines, Musts and Grape Juices: Occurrence, Regulations and Methods of Analysis. *FoodScienceandTechnologyInternational*;8. 2002, p. 325.
70. <http://en.wikipedia.org/wiki/mycotoxins> . [Online]
71. **P.Zollner, D.Berner, J.Jodlbauer, W.Lindne.** *J. Chromatogr. B* 738. 2000, p. 233.
72. **M.Palyusik, B.Harrach, C.J.Mirocha, S.V.Pathre.** Transmission of zearalenone and zearalenol into porcine milk. . *Acta Vet Acad. Scient. Hungar.* 1980, pp. 217-222.
73. **P.R.Cheeke.** Natural toxicants in feeds forages and poisonous plants. *2nd Edition. Interstate Publishers Inc, Danville.* 1998, pp. 87-136.
74. **C.J.Mirocha, B. Schauerhamer, C.M.Christensen, M.L.Niku-Paavola, M.Nummi.** Incidence of zearalenol (Fusarium mycotoxin) in animal feed. *Appl Environ Microbiol.* 38. 1979, pp. 749-750.
75. **Palyusik, M.** Effect of zearalenone Fusarium toxin on the prostate gland. . *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*24. 1977, p. 104.
76. **G.G.Long, M.Diekman, J.F.Tuite, G.M.Shannon, R.F.Vesonder.** Effect of Fusarium roseum corn culture containing zearalenone on early pregnancy in swine. . *Am J Vet Res.* 43. 1982, pp. 1599-1603.
77. **T.Tanaka, S.Yamamoto, A.Hasegawa, N.Aoki, J.R.Besling, Y.Sugiura, Y.Ueno.** A survey of the natural occurrence of Fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, in cereals harvested in the Netherlands. . *Mycopathologia* 110. 1990, pp. 19-22.
78. **A.J.Aldrick.** Reducing the risk of mycotoxin contamination through the application of HACCP and other quality management techniques. *Aspects Appl.Biol.*, 68. 2003, pp. 139-146.
79. **B.Cahagnier, D.Melcion, M.D.Richard.** Growth of Fusarium moniliforme and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities,. *Lett.Ampl.Microbiol.*, 20. 1995, pp. 247-251.
80. **J.D.Miller.** Fungi and mycotoxins in grain. *J.StoredProductsRes.*, 31. 1995, pp. 1-16.
81. **J.C.Young, J.D.Miller.** Appearance of fungus, ergosterol and Fusarium mycotoxins in the husk, axial stem and stalk after ear inoculation of field corn. *Can.J.PlantSci.*, 65. 1985, pp. 47-53.
82. **D.R.Lauren, and M.E.Di Menna.** Fusaria and Fusarium mycotoxins in leaves and ears of maize plants 2. A time course study made in the Waikato region, New Zealand, in 1997. *N.Z.J.CropHortic.Sci.*, 27. 1999, pp. 215-223.
83. **85/649/EEC, Council Directive.** 1985.
84. **H.K.Frank.** Food contamination by ochratoxin A in Germany. *IARC Sci Publ.*115. 1991, pp. 77-81.

85. **T.Kuiper-Goodman, P.M.Scott, H.Watanabe.** Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. . *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7. 1987, pp. 253-306.
86. **W.P.Blout.** Turkey "X" Disease. . *Turkeys* 9. 1961, pp. 55-58.
87. **J.Forgacs.** Mycotoxicoses-the neglected diseases. . *Feedstuffs* 34. 1962, pp. 124-134.
88. **J.W.Bennett, M.Klich.** Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 16. 2003, pp. 497-516.
89. **P.S.Steyn.** Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol Lett.* 82-83. 1995, pp. 843-851.
90. **R.A.Scuire.** Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* 214. 1981, pp. 877-880.
91. **Egmond, H.P.Van.** Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. In HP Van Egmond (Ed.) Mycotoxins in dairy products. . *Elsevier Applied Science, London.* 1989, pp. 11-55.
92. **M.Manabe.** Fermented foods and mycotoxins. . *Mycotoxins.* 51. 2001, pp. 25-28 .
93. **K.J.Van de Merwe, P.S.Steyne, L.F.Fourie, D.B.Scott, J.J.Theron.** Ochratoxin A, a toxin metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. . *Wilh. Nature.* 205. 1965, pp. 1112-1113.
94. **M.L.Abarca, M.R.Bragulat, G.Castella, F.J.Cabanes.** Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl Environ Microbiol.* 60. 1994, pp. 2650-2652.
95. **T.Kuiper-Goodman, P.M.Scott.** Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: . 1989, pp. 179-248.
96. **J.Teren, J.Varga, Z.Hamari, E.Rinyu, F.Kevei.** Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia.* 134. 1996, pp. 171-176.
97. **K.Lorenz.** Ergot on cereal grains. . *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 11. 1979, pp. 311-354.
98. **J.W.Bennett, R.Bentley.** Pride and prejudice: The story of ergot. . *Perspect. Biol. Med.* 42:. 1999, pp. 333-355.
99. **W.C.Gelderblom, K.Jaskiewicz, W.F.Marasas, P.G.Thiel, R.M.Horak, R.Vleggaar, N.P.Kriek.** Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol.* 54. 1988, pp. 1806-1811.
100. **E.Wang, W.P.Norred, C.W.Bacon, R.T.Riley, A.H.Merrill.** Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. . *J Biol Chem.* 266:. 1991, pp. 14486-14490.
101. **W.F.Marasas.** Fumonisin: their implications for human and animal health. *Nat Toxins.* 3:. 1995, pp. 193-198.
102. **E.W.Sydenham, G.S.Shephard, P.G.Thiel, W.F.O.MarasaS, S.Stockenstrom.** Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. . *J Agric.Food Chem.* 39. 1991, pp. 2014-2018.

103. **V.R.Beasley.** In: Tricothecene mycotoxicosis: pathophysiologic effects vol. I. . *CRC Press, Boca Raton Fla. USA.* 1989.
104. **M.A.Diekman, M.L.Green.** Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J Anim Sci.* 70. 1992, pp. 1615-1627.
105. **G.D.Oswailer.** Occurrence and clinical manifestations of tricothecene toxicoses and zearalenone toxicoses. In: *Richars JL, Thurston JR (Eds.) Diagnosis of Mycotoxicoses, 1st Edition. Martins Nijhoff, Dordrecht.* 1986, pp. 31-50.
106. **J.Tomaszewski, R.Miturski, A.Semczuk, J.Kotarski, J.Jakowicki.** Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. . *Ginekol Pol.* 69(5). 1998, pp. 363-366.
107. **J.Fink-Gremmels.** Mycotoxins: their implications for human and animal health. . *Vet. Q.* 21, . 1999, pp. 115-120.
108. **B.King.** An outbreak of ergotism in Wollo, Ethiopia. *Lancet* 1. 1979, p. 1411.
109. **M.Peraica, B.Radic, A.Lucic, M.Pavlovic.** Toxic effects of mycotoxins in humans. . *Bull World Health Organ.* 77. 1999, pp. 754-766.
110. —. Toxic effects of mycotoxins in humans. . *Bull World Health Organ.* 77. 1999, pp. 754-766.
111. **92. E.Charmley, H.L.Trenholm, B.K.Thompson, D.Vudathala, J.W.Nicholson, D.B.Prelusky, L.L.Charmley.** Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *J Dairy Sci.* 76:. 1993, pp. 3580-3587.
112. **I.C.Hsu, E.B.Smalley, F.M.Strong, W.E.Ribelin.** Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. . *Appl Microbiol.* 24:. 1972, pp. 684-690.
113. **D.D.Mann, G.M.Buening, B.Hook, G.D.Oswailer.** Effects of T-2 mycotoxin on bovine serum proteins. . *Am J Vet Res.* 44. 1983, pp. 1757-1759.
114. **C.M.Placida, J.P.F.D'Mello, A.M.C.Macdonald.** A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. 1999, pp. 21-37.
115. **R.L.Asquith, G.T.Edds.** Investigations in equine aflatoxicosis. . *Proc. Am. Assoc.Equine Pract.* 26. 1981, p. 193.
116. **T.S.Edrington, R.B.Harvey, L.F.Kubena.** Toxic effects of aflatoxin B1 and ochratoxin A, alone and in combination, on chicken embryos. *Bull Environ Contam Toxicol.* 54. 1995, pp. 331-336.
117. **E.E.Smith, L.F.Kubena, C.E.Braithwaite, R.B.Harvey, T.D.Phillips, A.H.Reine.** Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult Sci.* 71. 1992, pp. 1136-1144.

118. **F.J.Hoerr, W.W.Carlton, B.Yagen.** Mycotoxicosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens. *Vet Pathol.* 18. 1981, pp. 652-664.
119. **L.L.Southern, A.J.Clawson.** Effects of aflatoxins on finishing swine. *J Anim Sci.* 49. 1979, pp. 1006-1011.
120. **W.E.Huff, L.F.Kubena, R.B.Harvey, J.A.Doerr.** Mycotoxin interactions in poultry and swine. *J Anim Sci.* 66. 1988, pp. 2351-2355.
121. **G.D.Oswailer.** Mycotoxins. In: *Diseases of Swine. Leman BE, Straw WL, Mengeling SD, Taylor DJ (Eds.) 7th Edition. London, Wolfe Publishing.* 1992, pp. 735-743.
122. **R.N.Hurd.** Structure activity relationships in zearalenone. . In *Mycotoxins in Human and Animal Health. Pathotox, Illinois* . 1977, pp. 379-392 .
123. **M.Olsen, K.H.Kiessling.** Species differences in zearalenone-reducing activity in subcellular fractions of liver from female domestic animals. 2. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 5. 1983, pp. 287-291.
124. **C.J.Mirocha, S.V.Pathre, J.Behrens, B.Schauerhamer.** Uterotropic activity of cis and trans isomers of zearalenone and zearalenol. *Appl Environ Microbiol.* 35. 1978, pp. 986-987.
125. **V.Beasley.** Veterinary Toxicology. *International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA.* 1999.
126. **W.Haschek, J.C.Haliburton.** Fusarium moniliforme and zearalenone toxicoses in domestic animals: a review. *Richars JL, Thurston JR (Eds.) Diagnosis of Mycotoxicoses, 1st Edition. Martins Nijhoff, Dordrecht.* 1986.
127. **C.M.Christensen, C.J.Mirocha, G.H.Nelson, J.F.Quast.** Effect of young swine on consumption of rations containing corn invaded by Fusarium roseum. *Appl Microbiol.* 23. 1972, p. 202.
128. **T.Berger, K.L.Esbenshade, M.A.Diekman, T.Hoagland, J.Tuite.** Influence of prepubertal consumption of zearalenone on sexual development of boars. *J Anim Sci.* 53. 1981, pp. 1559-1564.
129. **L.P.Ruhr, G.D.Oswailer, C.W.Foley.** Effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on reproductive potential in the boar. . *Am J Vet Res.* 44. 1983, pp. 483-485.
130. **1881/2006, Κανονισμός αριθ.** «Για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα». s.l. : Επιτροπή Ε.Κ., 19 Δεκεμβρίου 2006.
131. **J.Jaimez, C.A.Fente, B.I.Vazquez, C.M.Franco, A.Cepeda, G.Mahuzier, P.Prognon.** «Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis». *Journal of Chromatography A*, 882 . 2000, pp. 1-10.

132. **A.Maroto, R.Boque, J.Riu, It.Ruisanchez, M.Odena.** «Uncertainty in aflatoxin B1 analysis using information from proficiency tests». *Anal. Bioanal Chem* 382. 2005, pp. 1562-1566.
133. [Online] http://europa.eu.int/comm/food/fs/cs/csf/index_en.html .
134. **T.B.Whitaker, A.B.Slate, A.S.Johansson.** «Sampling feeds for mycotoxin analysis». *The mycotoxin Blue Book, Nottingham University Press, Ed. Duarte Diaz Chapter 1* . 2005, pp. 1-21.
135. **J.Gilbert, E.Anklam.** «Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs». *Trends in analytical chemistry*, 21. 2002, pp. 468-486.
136. 119. AOAC Official Method 999.07 Aflatoxin B 1 and Total Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder–Immunoaffinity Column Liquid Chromatography with Post-Column Derivitization, First Action, 49.2.29. 1999.
137. 120. AOAC Official Method 2005.08 «Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts and Peanut Butter», Liquid Chromatography with Post-Column Photochemical Derivitization, First Action 2005, 49.2.18A. 2005.
138. 121. AOAC Official Method 991.31 «Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts and Peanut Butter-Immunoaffinity Column (Aflatest) Method», First Action 1991 Final Action 1994, 49.2.18. 1991.
139. **122. AOAC Official Method 971.22 «Standards for Aflatoxins-Thin LayerChromatographic Methods», M 1 -First Action 1981 Final Action 1988, 49.2.03.** 1988.
140. **Επιτροπής, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της.** Για καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Φεβρουαρίου 23, 2006.
141. **K.A.Scudamore.** «Principles and applications of mycotoxin analysis». *Mycotoxins, Taplow, Maidenhead, Berkshire UK,Chapter 7* . pp. 157-178 .
142. **Γεωργιάδη, Μ.** *Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φυστίκια.* Αθήνα : Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία, 2009.
143. **A.Sheibani, H.S.Ghaziaskar.** «Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B 1 and B 2 from pistachio», *Food Control* 20 . 2008, pp. 124-128.
144. **A.Maroto, R.Boque, J.Riu, It.Ruisanchez, M.Odena.** «Uncertainty in aflatoxin B1 analysis using information from proficiency tests». *Anal. Bioanal Chem* 382. 2005, pp. 1562-1566.
145. **B.Haghighi, C.Thorpe, A.E.pohland, R.Barnett.** «Development of a sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection of aflatoxins in pistachio nuts». *Journal of Chromatography*, 206 . 1981, pp. 101-108.

146. **S.M.Pearson, A.A.G.Candlish, K.E.Aidoo & J.E.Smith.** «Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection». *Biotechnology Techniques* 13. 1999, pp. 97-99.
147. **J.Gilbert, E.Anklam.** Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in analytical chemistry*, 21. 2002, pp. 468-486.
148. **R.Krska, R.Josephs.** The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 369. 2001, pp. 469-476.
149. **R.Krska, S.Baumgartner, R.Josephs,.** The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 371. 2001, pp. 285-299.
150. **R.Krska, E.Welzig, F.Berthiller, A.Molinelli, B.Mizaikoff.** Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants* 22. 2005, pp. 345-353.
151. **P.Z Ilner, B.Mayer-Helm.** Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136. 2006, pp. 123-169.
152. **S.Sforza, C.Dall'Asta, R.Marchelli.** Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25. 2006, pp. 54-76.
153. **E.E.Creppy, P.Chiarappa, I.Baudrimont, P.Boracci, S.Moukha, M.R. Carratu.** Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: Are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?. *Toxicology* 201. 2004, pp. 115-123.
154. **G.J.H.Speijers, M.H.M Speijers.** Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters* 153. 2004, p. 98.
155. **J.Smedsgaard, J.C.Frisvad.** Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. *Journal of Microbiological Methods* 25. 1996, pp. 5-17.
156. **K.F.Nielsen, J.Smedsgaard.** Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A* 1002. 2003, pp. 111-136.
157. **T.Tuomi, T.Johnsson, E.L.Hintikka, K.Reijula.** Detection of aflatoxins (G1-2, B1-2), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes. *Analyst* 126. 2001, pp. 1545-1550.
158. **T.Rundberget, A.L.Wilkins.** Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 964. 2002, pp. 189-197.

159. **M.Kokkonen, M.Jestoi, A.Rizzo.** Determination of selected mycotoxins in moulded cheeses with liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 22. 2005, pp. 449-456.
160. **D.Royer, H.U.Humpf, P.A.Guy.** Quantitative analysis of Fusarium mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 21. 2004, pp. 678-684.
161. **H.Tanaka, M.Takino, Y.Sugita-Konishi, T.Tanaka, .** Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, pp. 1422-1428.
162. **Y.Ren, Y.Zhang, S.Shao, Z.Cai, L.Feng, H.Pan, Z.Wang.** Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1143. 2007, pp. 48-64.
163. **M.Spanjer, P.Rensen, J.Scholten.** Multimycotoxin analysis by LC-MS/MS in a single extract. Book of abstracts. *The World Mycotoxin Forum-The Third Conference, , Noordwijk aan Zee, The Netherlands , Presentation.* November 10, 2005.
164. **J.Gilbert, E.Anklam.** Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry* 21. 2002, pp. 468-486.
165. **J.M.Fremy, E.Usleber.** Policy on characterization of antibodies used in immunochemical methods of analysis for mycotoxins and phytochemicals. *Journal of AOAC International* 86. 2003, pp. 868-871.
166. **H.Pettersson, L.Aberg.** Near-infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control* 14 . 2003, pp. 229-232.
167. **M. C. Santos, J. A. Nóbrega και S. Cadore.** «Determination of Cd, Cr, Hg and Pb in plastics from waste electrical and electronic equipment by inductively coupled plasma mass spectrometry with collision-reaction interface technology». *Journal of Hazardous Materials* 19, . 2011, pp. 833-839.
168. **Χατζηιωάννου, Θ.Π και Κουμπάρης, Μ.Α.** *Ενόργανη ανάλυση.* Αθήνα : s.n., 2003.
169. **Ι. Στράτης, Γ. Ζαχαριάδης, Δ. Γ. Θεμελής, Α. Ν. Ανθεμίδης και Α. Σ. Οικονόμου.** «Ενόργανη Χημική Ανάλυση II», Κεφ. 3., Θεσσαλονίκη : Εκδόσεις Ζήτη, 2004.
170. **Ι.Παπαδογιάννης, Β.Σαμανίδου.** *Ενόργανη Χημική Ανάλυση.* Θεσσαλονίκη : s.n., 2001.
171. **Chile, Sociedad de Biología de.** *Biological research.* s.l. : Santiago : Society of Biology of Chile.
172. **Mims MP1, Prchal JT.** Divalent metal transporter 1. *Hematology.* 2005.

173. [Online]

<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A7%CE%B1%CE%BB%CE%BA%CF%8C%CF%82>.

174. [Online] www.Live-Pedia.gr.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Ανάλυση δειγμάτων με το ICP-MS

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τοξικών μετάλλων έγινε με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively coupled plasma mass spectrometry ICP-MS) με τη χρήση ICP-MS 7500cx και Autosampler ASX-500 της εταιρείας Agilent Technologies . Η μέθοδος ICP-MS είναι πολύ αποτελεσματική χάρη στα πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, στα αξιοσημείωτης απλότητας φάσματα, και στη δυνατότητα ταχείας πολυστοιχειακής ανάλυσης και μέτρησης ατομικών ισοτοπικών λόγων. Τα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι οι ισοβαρείς παρεμποδίσεις και το υψηλό κόστος λειτουργίας (M. C. Santos, 2011).

Η φασματομετρία εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα χρησιμοποιεί ως μέσο διέγερσης του δείγματος πλάσμα αργού, το οποίο έχει εξαιρετική σταθερότητα, σε αντίθεση με τις παλαιότερες φασματοσκοπικές τεχνικές εκπομπής (τόξου και εκκενώσεως). Είναι η πλέον ευαίσθητη τεχνική πολυστοιχειακής ανάλυσης με την οποία είναι δυνατός ο σύγχρονος προσδιορισμός μέχρι και 60 στοιχείων, με υψηλή ευαισθησία και ασυνήθιστα μεγάλη γραμμική αναλυτική περιοχή. Το πλάσμα σχηματίζεται με τη δίοδο υψηλής καθαρότητας αργού μεταξύ του μεσαίου και εσωτερικού σωλήνα ενός συστήματος τριών ομόκεντρων σωλήνων από χαλαζία. Το αέριο ionίζεται, καθώς διέρχεται από ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο, που δημιουργείται από ένα επαγωγικό πηνίο ραδιοκυμάτων (27MHz), και το δημιουργούμενο πλάσμα έχει θερμοκρασία 6000-10000° K. Επιπλέον το αέριο εμπλουτίζεται με ηλεκτρόνια με τη βοήθεια ενός σπινθήρα. Τα ηλεκτρόνια επιταχυνόμενα ionίζουν τα άτομα αργού συντηρώντας έτσι το πλάσμα. Ένα δεύτερο ψυκτικό ρεύμα αργού διέρχεται ελικοειδώς μεταξύ του μεσαίου και εξωτερικού σωλήνα για να ψύξει το μεσαίο σωλήνα και να τον προφυλάξει από το πλάσμα υψηλής θερμοκρασίας που περιέχει. Τα προς ανάλυση υγρά δείγματα εισάγονται με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας στον εκνεφωτή με σταθερή ροή, όπου μετατρέπεται σε αερόλυμα με πολύ μικρές σταγόνες (aerosol). Τα κύρια μέρη ενός οργάνου ICP-MS είναι το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, το σύστημα ατομοποίησης του ICP, το σύστημα εισαγωγής των ιόντων, ο αναλυτής μάζας, ο ανιχνευτής ιόντων, το σύστημα καταγραφής και η έξοδος των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. (Χατζηιωάννου, 2003)

Κατά την ανάλυση των μετάλλων με το ICP-MS αξιοποιήθηκε η δυνατότητα του οργάνου να λειτουργεί σε collision (He) mode, με στόχο την παραγωγή ακόμα πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων λόγω του περιορισμού των ισοβαρών παρεμποδίσεων. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης (5 τουλάχιστον επίπεδα συγκέντρωσης, με συντελεστή συσχέτισης (r) της τάξης του 0,99) χρησιμοποιώντας πρότυπες ενώσεις κατάλληλης καθαρότητας (Merck). Τα όρια ανίχνευσης προέκυψαν από τις καμπύλες βαθμονόμησης με κατάλληλους μαθηματικούς υπολογισμούς (Chemstation Software by Agilent).

Τα κύρια τμήματα ενός οργάνου ICP-MS είναι (Ι. Στράτης, 2004):

1. Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος : Το υγρό δείγμα εισάγεται με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας στον εκνεφωτή με σταθερή ροή, όπου μετατρέπεται σε αερόλυμα με πολύ μικρές σταγόνες (aerosol).

2. Το σύστημα ατομοποίησης του ICP : Εξ' ορισμού το πλάσμα είναι ένα αέριο (αργό, Ar) σε πολύ υψηλή θερμοκρασία, τα άτομα ή μόρια του οποίου είναι ιονισμένα. Με την εφαρμογή ραδιοσυχνότητας το αέριο αργό (Ar) θερμαίνεται επαγωγικά σε υψηλή θερμοκρασία (6000-10000 K). Επιπλέον, το αέριο εμπλουτίζεται με ηλεκτρόνια, με τη βοήθεια ενός σπινθήρα. Τα ηλεκτρόνια επιταχυνόμενα ιονίζουν τα άτομα του αργού, που με τη σειρά τους συγκρούονται και ιονίζουν άλλα άτομα αργού (συντηρώντας έτσι το πλάσμα). Τέλος, οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στην περιοχή του πλάσματος και αφορούν στο δείγμα είναι:

- Απομάκρυνση του διαλύτη από το δείγμα
- Διάσπαση των συστατικών του δείγματος
- Ατομοποίηση των στοιχείων
- Διέγερση και ιοντισμός (λόγω της σύγκρουσης με τα ιόντα του αργού)

3. Το σύστημα εισαγωγής των ιόντων : Τα ιόντα που δημιουργούνται στην περιοχή του πλάσματος, οδηγούνται στον αναλυτή μάζας, ως δέσμη ιόντων μέσω δυο κώνων με πολύ μικρή οπή, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων που λειτουργούν ως φακοί ιόντων (ion lenses) στην είσοδο του αναλυτή μάζας.

4. Ο αναλυτής μάζας : Ο αναλυτής μάζας διαχωρίζει και ταξινομεί τα ιόντα με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο m/z , και έτσι προκύπτει τελικά ένα φάσμα μάζας που ουσιαστικά είναι η καταγραφή του πλήθους των ιόντων που αντιστοιχούν σε κάθε τιμή m/z .

5. Ο ανιχνευτής ιόντων: Πρόκειται για ένα πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων που ανιχνεύει εντάσεις ρεύματος μικρότερες από 10-15 A. Το σήμα αυτό με μια σειρά από διαδικασίες πολλαπλασιάζεται ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή του.

6. Το σύστημα καταγραφής και η έξοδος των αποτελεσμάτων σε H/Y.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Γενικά για HPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια διαχωριστική τεχνική με πολλές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια, καθώς θεωρείται η πλέον κατάλληλη για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος χημικών ενώσεων, τόσο οργανικών όσο και ανόργανων.

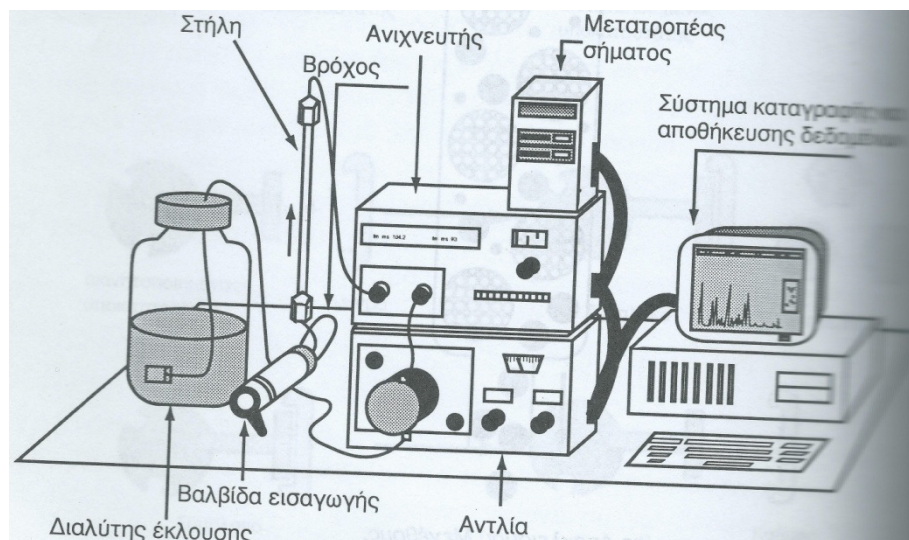
Η τεχνική της HPLC αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης και οφείλει την ανάπτυξη της στην πρόοδο της τεχνολογίας, καθώς άρχισαν να κατασκευάζονται χαλύβδινες στήλες ανθεκτικές στις μεγάλες πιέσεις και αντλίες υψηλής πίεσης, σταθερής παροχής. Επίσης, αναπτύχθηκαν διάφοροι τύποι ανιχνευτών, όπως ανιχνευτές υπεριώδους ορατού, αγωγιμομετρικοί και φθορισμομετρικοί ανιχνευτές, ανιχνευτές δείκτου διάθλασης κτλ. Σε σχέση με την κλασική χρωματογραφία διαφέρει καθώς χρησιμοποιεί μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης και εφαρμόζονται μεγάλες πιέσεις. Υπερτερεί δε της χρωματογραφίας στήλης επιτυγχάνοντας ταχύτερους και μεγαλύτερης απόδοσης διαχωρισμούς μιγμάτων.

Η HPLC ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητικής φάσης. Στην HPLC το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με την βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με την μορφή ζωνών και τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Τέλος, είναι δυνατή η χρησιμοποίηση αναλυτικών στηλών σε σειρά, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος. Ο χρόνος ανάλυσης με την τεχνική της HPLC είναι συνήθως μικρός της τάξης των μερικών λεπτών, ενώ η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της είναι πολύ καλές. Γενικά, η HPLC είναι μια ευαίσθητη ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική που υπερέχει σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό πολλών χημικών ενώσεων.

Οργανολογία HPLC

Ένα σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης περιλαμβάνει :

1. Φιάλες αποθήκευσης Διαλυτών
2. Αντλία
3. Μονάδα εισαγωγής δείγματος
4. Χρωματογραφική στήλη
5. Σύστημα συλλογής και καταγραφής των αποτελεσμάτων



Εικόνα 9 Τυπική διάταξη Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης

Διαλύτες κινητής φάσης

Η κινητή φάση στην HPLC είναι συνήθως μίγμα διαφόρων αναλογιών κατόγκο, ενός ή περισσότερων οργανικών διαλυτών και νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος στην κατάλληλη τιμή pH, στην περίπτωση της HPLC αντίστροφης φάσης, ή μίγμα μη πολικών διαλυτών στην περίπτωση της HPLC κανονικής φάσης.

Για να μπορεί ένας οργανικός διαλύτης να χρησιμοποιηθεί στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις :

1. Να είναι υψηλής καθαρότητας και ειδικός για χρωματογραφία
2. Να είναι σχετικά φθηνός
3. Να έχει χαμηλή τοξικότητα
4. Να μην απορροφάει στο UV
5. Να είναι δραστήσιος σε χαμηλές συγκεντρώσεις
6. Να μην καταστρέφει το δείγμα
7. Να μην αποσυντίθεται εύκολα
8. Να μην είναι πτητικός
9. Να έχει χαμηλό ιξώδες, χαμηλή πίεση επαναφοράς και μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού

Ο οργανικός διαλύτης που συνήθως προτιμάται είναι η μεθανόλη η οποία είναι οικονομικότερη σε σχέση με το ακετονιτρίλιο και έχει μικρότερο ιξώδες από την αιθανόλη.

Αντλίες Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Ο ρόλος των αντλιών υψηλής πίεσης που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία είναι η άντληση της κινητής φάσης από το δοχείο της και η διαβίβαση της κάτω από μεγάλη πίεση στη στήλη. Οι αντλίες αυτές πρέπει να είναι ικανές να λαμβάνουν ακριβή όγκο διαλύτη, χωρίς παλμούς και με επαναλήψιμο σταθερή ταχύτητα ροής και πίεσης. Οι ταχύτητες ροής που μπορούν να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας τέτοιου είδους αντλίες είναι 0.05-5 mL/min ενώ μπορούν να λειτουργήσουν σε πιέσεις 5-40 MPa.

Οι αντλίες HPLC που διατίθενται στο εμπόριο είναι συνήθως δύο τύπων :

1. Αντλίες σταθερής ροής (constant flow pumps), οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλες τις εφαρμογές HPLC και
2. Αντλίες σταθερής πίεσης (constant pressure pumps) οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την πλήρωση των χρωματογραφικών στηλών με τη στατική φάση.

Οι αντλίες σταθερής ροής διακρίνονται σε α) αντλίες παλινδρόμησης (reciprocating pumps) β) αντλίες τύπου σύριγγας (syringe type pumps) και γ) αντλίες διαφράγματος (diaphragm pumps). Το βασικό τους πλεονέκτημα είναι ότι εξασφαλίζουν επαναλήψιμο όγκο έκλουσης και επαναλήψιμο εμβαδό κορυφής, ανεξάρτητα από τις μεταβολές στο ιξώδες της κινητής φάσης ή από τυχόν μπλοκάρισμα της αναλυτικής στήλης.

Οι αντλίες σταθερής πίεσης ή αντλίες πεπιεσμένου αέρα (pneumatic pump) χρησιμοποιούν ένα κύλινδρο με πεπιεσμένο αέριο για την εκδίωξη του διαλύτη από το μεταλλικό σπείραμα. Το πρωταρχικό πλεονέκτημα των αντλιών αυτών είναι η απλότητα στην κατασκευή και απουσία παλμών γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του θορύβου της βασικής γραμμής. Επιπλέον έχουν χαμηλό κόστος και χαρακτηρίζονται από την ευκολία στην χρήση και την συντήρηση. Ωστόσο παρουσιάζουν και αρκετά προβλήματα. Το σημαντικότερο είναι η διακύμανση της ταχύτητας ροής, η οποία οφείλεται κυρίως σε μεταβολές στο ιξώδες, λόγω μεταβολών της θερμοκρασίας ή της σύστασης της κινητής φάσης. Οι μεταβολές της ταχύτητας ροής έχουν αρνητική επίδραση τόσο στον ποσοτικό όσο και στον ποιοτικό προσδιορισμό, εξαιτίας των διακυμάνσεων που παρατηρούνται στο εμβαδό των κορυφών και στο χρόνο συγκράτησης αντίστοιχα. Οι αντλίες αυτές είναι σχετικά φθηνές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναλύσεις ρουτίνας.

Εισαγωγή Δείγματος

Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει με δύο τρόπους : 1) με μικροσύριγγα, 2) με ειδική βαλβίδα εισαγωγής δείγματος και 3) με αυτόματο

δειγματολήπτη. Η μονάδα εισαγωγής σε ένα σύστημα HPLC παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης.

Στήλες HPLC

Οι στήλες της HPLC ανάλογα με τις διαστάσεις τους κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες :

1. Προστήλες
2. Αναλυτικές στήλες
3. Ημι-παρασκευαστικές
4. Παρασκευαστικές

Η συσκευή η οποία χρησιμοποιήθηκε ήταν η Waters 2695 η οποία έχει τα εξής χαρακτηριστικά :

Στο επίκεντρο του συστήματος HPLC Waters Alliance 2695 είναι η Μονάδα Διαχωρισμού με ενσωματωμένο διαλύτη και λειτουργίες διαχείρισης του δείγματος, τα οποία εξασφαλίζουν σταθερή απόδοση του συστήματος και υψηλή επαναληψιμότητα. Το σύστημα απαερώνει και αναμιγνύει έως τέσσερις χρωματογραφικούς διαλύτες σε προγραμματιζόμενο ρυθμό εύρου ροής που καλύπτει από 0,2 έως 2 ml ανά λεπτό. Ο αυτόματος δειγματολήπτης έχει 5 καρουζέλ που μπορεί να χειριστεί 120 φιαλίδια. Το σύστημα μπορεί να χειριστεί όγκους έγχυσης από 1 έως 100 ml.



Εικόνα 10 Συσκευή

Φασματοσκοπία Μαζών (MS)

Στη φασματοσκοπία μαζών διαχωρίζονται φορτισμένα μόρια-ιόντα που βρίσκονται σε αέρια κατάσταση, ανάλογα με τη μάζα τους. Παρά το γεγονός ότι η τεχνική δεν έχει σχέση με την οπτική φασματοσκοπία, δόθηκε η ονομασία φασματόμετρο/φασματογράφος μαζών, επειδή τα πρώτα όργανα παρήγαγαν παρόμοια μορφή με τα οπτικά φάσματα.

Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται από :

- i. Σύστημα εισαγωγής όπου επιτυγχάνεται η εξάτμιση των ενώσεων.
- ii. Πηγή ιόντων ή σύστημα ιονισμού δείγματος, όπου παράγονται ιόντα από ουδέτερα μόρια στην αέρια φάση.
- iii. Αναλυτή μάζας, όπου διαχωρίζονται τα ιόντα ανάλογα με το λόγο μάζας/φορτίο.
- iv. Ανιχνευτή και καταγραφικό, όπου ανιχνεύονται και καταγράφονται τα διαχωρισμένα ιόντα

Τα τέσσερα βασικά στάδια λειτουργίας ενός φασματόμετρου μάζας είναι :

- A. Ο ιονισμός του δείγματος
- B. Η επιτάχυνση των ιόντων από ηλεκτρικό πεδίο
- C. Η διασπορά των ιόντων σύμφωνα με την αναλογία μάζα/φορτίο
- D. Η ανίχνευση των ιόντων που παράγουν το αντίστοιχο ηλεκτρικό σήμα

Όλα τα τμήματα του φασματομέτρου μαζών βρίσκονται σε κενό, η πίεση είναι περίπου 10^{-3} Pa.

Τεχνικές Ιονισμού δείγματος

Οι τεχνικές ιονισμού στη φασματοσκοπία μαζών διακρίνονται σε δύο κατηγορίες :

1. Τεχνικές ιονισμού στην αέρια φάση, όπου ο ιονισμός γίνεται μετά από εξάτμιση του δείγματος πριν τη πηγή ιόντων, δηλαδή στην αέρια φάση. Στην κατηγορία αυτή ανήκει ο ιονισμός επίδρασης ηλεκτρονίων, ο ιονισμός πεδίου και ο χημικός ιονισμός.
2. Τεχνικές εκρόφησης, π.χ. εκρόφηση πεδίου, εκρόφηση ^{252}Cf , εκρόφηση laser, βομβαρδισμό ατόμων (fast atom bombardment) και βομβαρδισμό ιόντων (ion bombardment) όπου ο ιονισμός γίνεται στη συμπυκνωμένη φάση μέσα στην πηγή ιόντων.

Οι πηγές ιόντων έχουν δύο στόχους : α) την παραγωγή ιόντων χωρίς διάκριση μάζας και β) την επιτάχυνση τους προς τον αναλυτή μάζας.

Αναλυτές μάζας

Ο ρόλος του αναλυτή μάζας είναι ο διαχωρισμός των ιόντων που παράγονται στην πηγή ιόντων σύμφωνα με την αναλογία μάζα/φορτίο.

Με την έξοδο τους από την πηγή ιόντων τα ιόντα επιτυγχάνονται από διάφορα είδη ηλεκτροστατικών σχισμών και εισέρχονται στον ειδικό αναλυτή, η διακριτική ικανότητα του οποίου ποικίλλει ανάλογα με τον επιθυμητό στόχο της ανάλυσης.

Οι αναλυτές μάζας μπορούν να είναι απλής ή διπλής εστίασης. Οι πρώτοι εστιάζουν ιόντα διαφορετικών λόγων μάζας/φορτίου σε διάφορες διευθύνσεις διάσπαρτες στο επίπεδο σχισμής εξόδου και έχουν μικρή διακριτική ικανότητα. Σ'αυτούς ανήκουν οι αναλυτές μαγνητικής εκτροπής και οι αναλυτές τομέα.

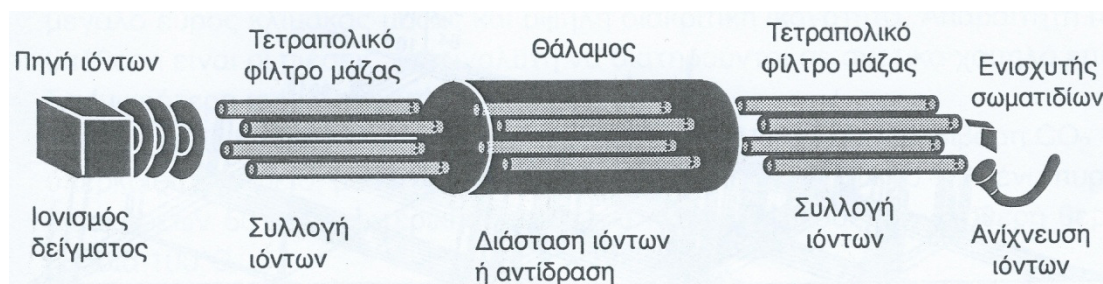
Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι αναλυτές μαγνητικού/ηλεκτροστατικού τομέα που χρησιμοποιούν μαγνητικά και ηλεκτρικά πεδία για διασπορά των ιόντων. Το ηλεκτροστατικό πεδίο εκτροπής τοποθετείται ανάμεσα στην πηγή ιόντων και τον αναλυτή μάζας. Τα ιόντα επιτυγχάνονται εκτός πηγής και ενώνονται σε στενή δέσμη με τη βοήθεια ζεύγους σχισμών. Καθώς τα ιόντα διέρχονται από τον ηλεκτροστατικό τομέα διαχωρίζονται ανάλογα με την ενέργεια μετασχηματισμού τους. Ενώ ένας μαγνητικός τομέας τα διαχωρίζει ανάλογα με τη μαγνητική τους ροπή (momentum).

Το φάσμα μαζών λαμβάνεται με σάρωση της ισχύος του μαγνητικού πεδίου, ώστε τα ιόντα με διαφορετικές αναλογίες m/z να εστιάζονται διαδοχικά προς τον ανιχνευτή.

Μια άλλη κατηγορία αναλυτών μάζας είναι οι τετραπολικοί αναλυτές που καλούνται επίσης και τετραπολικά φίλτρα μάζας. Ένας τετραπολικός αναλυτής μάζας αποτελείται από τέσσερις μεταλλικές ράβδους τοποθετημένες παράλληλα, ώστε η δέσμη ιόντων να περνάει από το κέντρο της διάταξης.

Συνδυασμένη τεχνική φασματοσκοπίας μαζών (MS-MS)

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται αναλυτές μάζας τόσο για διαχωρισμό όσο και για ανίχνευση, σε μια διάταξη. Συγκεκριμένα παράγονται διάφορα ιοντικά είδη από ένα δείγμα και τα ιόντα συγκεκριμένης μάζας επιλέγονται για διάσπαση, τα προϊόντα της οποίας αναλύονται ως προς τη μάζα τους. Το φασματόμετρο μπορεί να είναι μαγνητικού τομέα ή τετραπολικό.



Εικόνα 11 Διάταξη τριπλού τετραπολικού φασματομέτρου μάζας που χρησιμοποιείται στην τεχνική MS-MS

Η διάταξη αποτελείται από διπλή πηγή ιονισμού : χημικός ιονισμός/ιονισμός ηλεκτρονίων, ένα τετραπολικό φίλτρο μάζας, ένα τετράπολο ραδιοσυχνοτήτων, ένα δεύτερο τετραπολικό φίλτρο μάζας και ένα πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων. Η διάσπαση των ιόντων επιτυγχάνεται με την τεχνική CID (Collision-induced dissociation) κατά την οποία αποσυντίθενται με συγκρούσεις με ουδέτερα μόρια.

Το μήκος της διαδρομής από την πηγή στον ανιχνευτή είναι περίπου 70 cm.

Τα δείγματα εισάγονται με τη βοήθεια θερμαινόμενου υάλινου συστήματος εισαγωγής. Οι επίπεδοι φακοί στα δύο άκρα εστιάζουν τη δέσμη των ιόντων. Η ενέργεια των ιόντων στα τρία τετράπολα κυμαίνεται από -100 έως 100 V.

Οι πιέσεις στους τρεις ξεχωριστούς θαλάμους είναι : $2 \cdot 10^{-7}$ torr για τον ιονισμό ηλεκτρονίων, $6 \cdot 10^{-4}$ torr για χημικό ιονισμό και $2 \cdot 10^{-6}$ torr στους άλλους δύο θαλάμους. Τα στοιχεία που λαμβάνονται επεξεργάζονται με μικροϋπολογιστή.

Η διακριτική ικανότητα είναι της τάξης του 1 amu και η εκλεκτικότητα μέχρι 1000 amu. Ενώ το όριο ανίχνευσης είναι της τάξης 10^{-15} mole.

Η τεχνική αυτή καθώς παρέχει αυξημένη εκλεκτικότητα και μεγάλη ευαισθησία, βρίσκει εφαρμογή στη διευκρίνιση δομής και στην ανάλυση μιγμάτων, και για ποσοτικούς προσδιορισμούς.

Στη διευκρίνιση δομής τα κλάσματα-ιόντα οποιασδήποτε μάζας που εμφανίζονται στο κανονικό φάσμα μαζών επιλέγονται από τον πρώτο αναλυτή μάζας. Τα μητρικά ιόντα στη συνέχεια διασπώνται και το φάσμα μαζών των θυγατρικών ιόντων λαμβάνεται με σάρωση του δεύτερου αναλυτή μάζας, οπότε λαμβάνεται πλήρης χάρτης διάσπασης, καταγράφοντας το φάσμα μαζών κάθε ιόντος της ένωσης.

Για την ανάλυση μιγμάτων, τα μοριακά ιόντα κάθε συστατικού παράγονται με χημικό ιονισμό και διαχωρίζονται από τον πρώτο αναλυτή μάζας.

Έτσι τα μοριακά ιόντα που επιλέγονται για συγκεκριμένο συστατικό διασπώνται και το φάσμα διάσπασης λαμβάνεται με σάρωση του δεύτερου αναλυτή. (170)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Οι συνθήκες της τεχνικής φασματοσκοπίας μαζών MS-MS περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί :

Πίνακας 9 Συνθήκες Τεχνικής Φασματοσκοπίας

Capillary (kV) = 3.50
Cone (V) = 40
Extractor (V) = 3
RF Lens (V) = 0.5
Source Temperature (°C) =130
Desolvation Temperature = 450
Gas Flow
Desolvation (L/hr) = 800.0
Cone (L/hr) = 50.0

Οι μάζες των ιόντων για τις αφλατοξίνες B1,B2,G1 και G2 εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 10 Ιόντα Αφλατοξινών

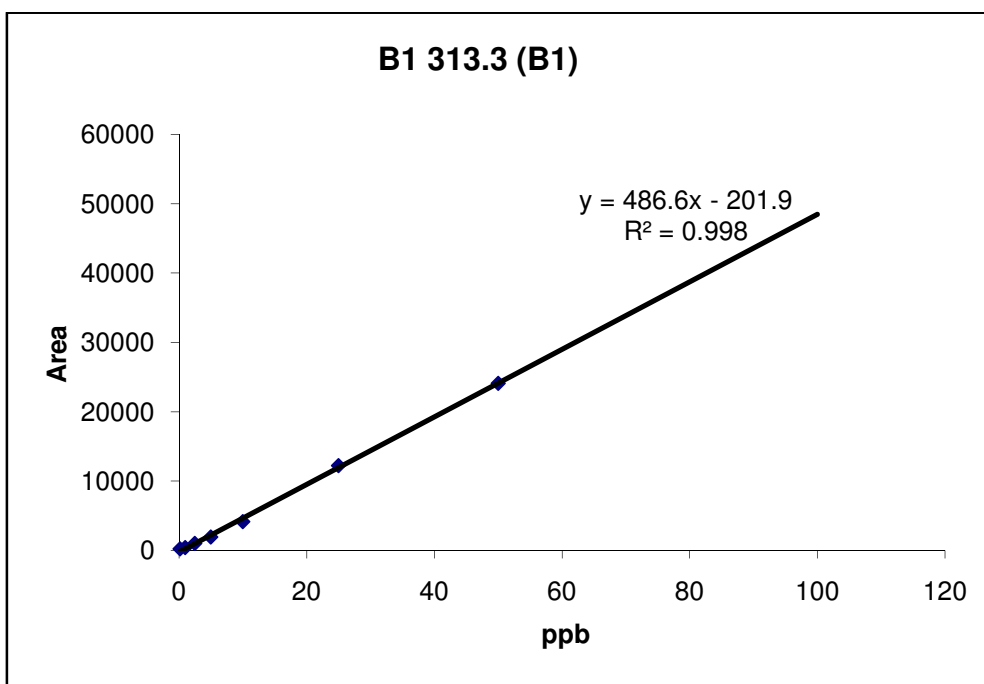
	Parent Ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Dwell (sec)	Cone (V)	Cell Energy (ev)
G2	331.4	257.2	0.1	40	36
G1	329.3	200.1	0.1	40	40
B2	315.3	259.1	0.1	40	35
B1	313.4	269.2	0.1	40	30

Οι συνθήκες στην HPLC ήταν : Οι διαλύτες ήταν μίγμα οξικού αμμωνίου και μεθανόλης σε αναλογία 50 %- 50 %.Η ροή των διαλυτών στην στήλη Luna C18 ήταν 1ml ανά 1 λεπτό για 12 λεπτά. Ο όγκος του δείγματος ήταν 100 μ L

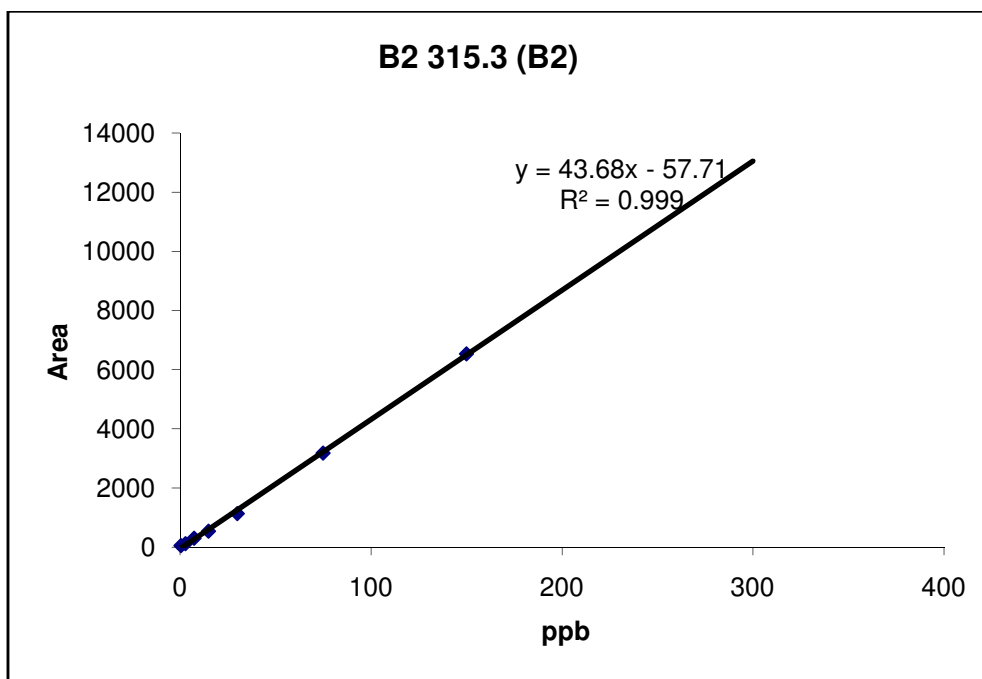
και η θερμοκρασία της στήλης 25 °C. Η στήλη είναι Luna 0 5u C18 100 A με μέγεθος 250 * 4.60 mm της εταιρείας phenomenex. Τα όρια της ανίχνευσης είναι :

B1	0.2 ρpb έως 100 ρpb
B2	0.6 ρpb έως 300 ρpb
G1	0.2 ρpb έως 100 ρpb
G2	0.6 ρpb έως 300 ρpb

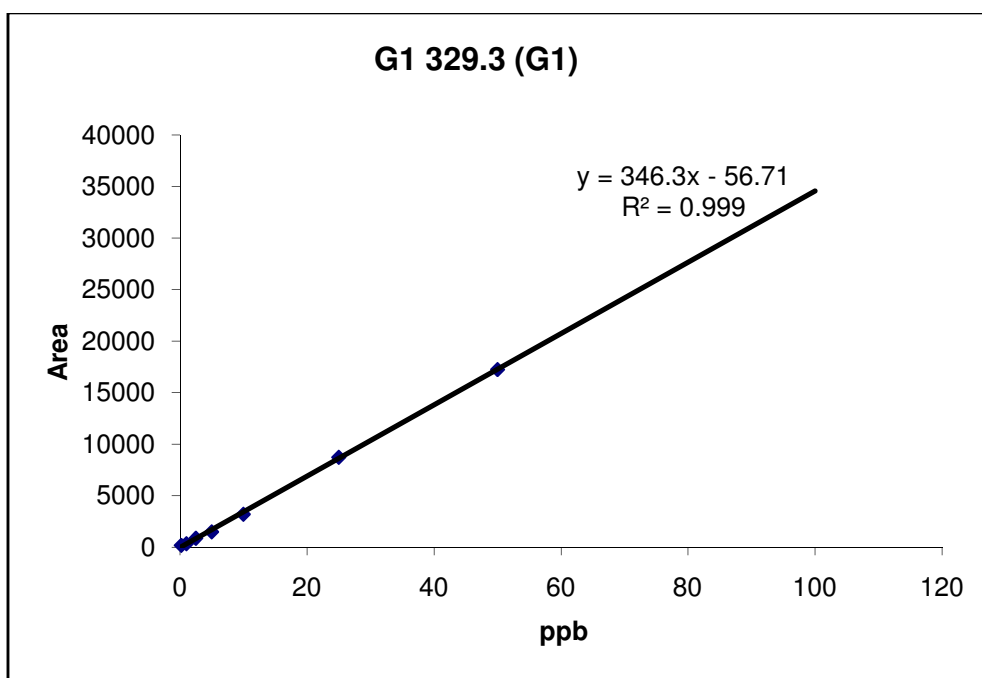
Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε αφλατοξίνες προηγήθηκε η βαθμονόμηση της μεθόδου με τα ακόλουθα δείγματα όπως παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



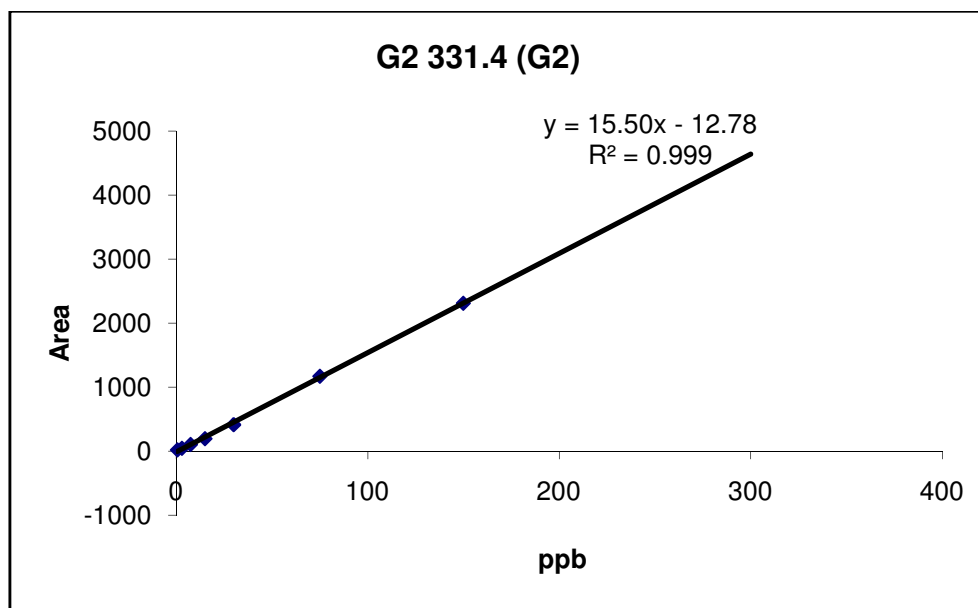
Διάγραμμα 2 Βαθμονόμηση Αφλατοξίνης B1



Διάγραμμα 3 Βαθμονόμηση Αφλατοξίνης B2



Διάγραμμα 4 Βαθμονόμηση Αφλατοξίνης G1



Διάγραμμα 5 Βαθμονόμηση Αφλατοξίνης G2