
ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Τ.Ε.Ι ΔΥΤΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΛΩΡΙΝΑΣ, Σ.Τ.Ε.Γ, ΤΜΗΜΑ Ε.Π.Ε.Α.Π



Δρ. Ιωάννης Ν. Τσακίρης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	8
ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	8
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΣΤΙΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	8
ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ	8
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΓΙΑ ΘΕΜΑΤΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ	9
1.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	12
1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ	16
ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	16
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ	16
ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ	16
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ	17
2.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	19
2.2.1 ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	19

2.2.2	ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΤΑ	20
2.2.3	ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	21
2.3	ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΝΤΩΝ	22
2.4	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	25
2.4.1	ΧΡΗΣΙΜΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	25
2.4.1.1	ΑΡΧΕΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	25
2.4.2.2	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)	28
2.5	ΠΟΣΟΤΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ	30
2.6	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	32
2.7	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΓΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	34
2.8	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΤ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	36
	ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	36
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	39
	ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	39
	ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ	39

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ	39
3.1 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ 41
3.2 ΤΡΟΦΙΜΑ	Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ 43
3.2.1 ΤΡΟΦΙΜΑ	ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΑ 43
3.2.2 ΤΡΟΦΙΜΑ	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΑ 44
3.3 ΑΝΘΡΩΠΟΥ	ΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ Η ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ 45
3.4 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ	46
3.4.1 αφλατοξινών	Συνοπτική παρουσίαση 46
3.4.2 ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΟΣΕΙΣ	ΟΞΕΙΕΣ 48
3.4.3 ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΩΣΕΙΣ	ΧΡΟΝΙΕΣ 49
3.5 ΟΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ	50
3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ 51
3.6.1 ΑΝΟΣΟΔΙΑΓΝΩΣΗ	ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ 51
3.6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ 51

3.7 ΑΡΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ 52

**3.7.1 ΣΚΟΠΟΣ, ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΦΗΣ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΜΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ 52**

**3.7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΣΙΤΗΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ
ΣΙΤΗΡΩΝ 54**

**3.7.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΑ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ, ΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΒΡΕΦΗ
ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΒΡΕΦΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ,
ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΒΡΕΦΗ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΒΡΕΦΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ 55**

**3.7.4 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΣΕ ΣΗΜΕΙΑ ΛΙΑΝΙΚΗΣ
ΠΩΛΗΣΗΣ 57**

3.8 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΙ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ 58

3.8.1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ ΜΙ ΣΕ ΓΑΛΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISA 60

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ 60

**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ ΜΙ ΣΕ ΓΑΛΑ 60**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 60

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 60

ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ ΤΟΥ kit 61

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ kit 61

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ kit	61
4.1	ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΜΕΘΟΔΟΥ	62
4.1.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	62
Προετοιμασία <i>Washing Buffer</i>	62
Προετοιμασία Διαλύματος Ενζύμου Σύζευξης	62
Προετοιμασία δειγμάτων γάλακτος	63
4.1.2	ΥΛΟΠΟΙΗΣΗ
ΜΕΘΟΔΟΥ	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ	
ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	66
ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	66
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	
ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ	66
ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ	66
5.1	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	67
5.2	ΑΛΛΕΡΓΙΚΕΣ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ	67
5.3 ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑ	68
5.4	ΤΡΟΦΙΚΑ
ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ	69
5.5	ΠΕΠΤΙΚΗ
ΑΛΛΕΡΓΙΑ	72

5.6	ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΠΑΙΔΙΚΕΣ	
ΑΛΛΕΡΓΙΕΣ		73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ		
ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ		
ELISA		75

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ		75
---------------------------	--	-----------

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ		
ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ		75

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ		75
--	--	-----------

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ		75
-----------------------------------	--	-----------

ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ ΤΟΥ kit		76
---	--	-----------

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ kit		76
--	--	-----------

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ kit		76
------------------------	--	-----------

ΕΥΡΟΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ		77
------------------------	--	-----------

6.1	ΕΦΑΡΜΟΓΗ	
ΜΕΘΟΔΟΥ		77

6.1.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΚΑΙ	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ		77

Προετοιμασία δειγμάτων για έλεγχο υπολειμμάτων φιστικιών		78
---	--	-----------

6.1.2	ΥΛΟΠΟΙΗΣΗ	
ΜΕΘΟΔΟΥ		78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Οι στόχοι του συγκεκριμένου εργαστηρίου είναι οι ακόλουθοι

1. Αναγνώριση της ιδιαιτερότητας που έχουν οι έλεγχοι τροφίμων συγκριτικά με τις υπόλοιπες χημικές αναλύσεις
2. Αναγνώριση κρίσιμων παραμέτρων αξιολόγησης αναλυτικών μεθόδων

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΣΤΙΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

- ☒ Τι ιδιαιτερότητες εμφανίζουν τα τρόφιμα ως προς την ανάλυση τους
- ☒ Τι γνωρίζεται για τις SMRs και MRMs
- ☒ Ποια είναι τα βήματα που αναγνωρίζουμε σε μια αναλυτική μεθοδολογία προσδιορισμού τοξικών ουσιών σε τρόφιμα
- ☒ Ποιες είναι οι ποιοτικές παράμετροι αξιολόγησης των αναλυτικών μεθόδων

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

-  Κανονισμός (ΕΚ) 852/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την υγιεινή των τροφίμων
-  Κανονισμός (ΕΚ) 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την διεξαγωγή επίσημου ελέγχου τροφίμων

.... Δημιουργήσαμε ένα σύστημα πριν 100 χρόνια που λειτουργεί και υπηρετεί το σκοπό του εντός των συνόρων..... Δεν δημιουργήσαμε ένα σύστημα για την παγκοσμιοποιημένη αγορά.....»

EU Commisioner

I.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΓΙΑ ΘΕΜΑΤΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

Τα τελευταία χρόνια οι καταναλωτές έρχονται αντιμέτωποι με μια σειρά διατροφικών κρίσεων οι οποίες καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων και αναφέρονται σε μια πληθώρα διατροφικών κινδύνων και συνήθως ξεπερνούν τα στενά όρια μιας χώρας αλλά εξαπλώνονται μέσω της παγκοσμιοποιημένης αγοράς. Εκτός όμως από τις διατροφικές κρίσεις και νέα θέματα μας απασχολούν κυρίως στο επίπεδο της ασφάλειας των τροφίμων όπως η παρουσία αλλεργιογόνων ουσιών, τα πρόσθετα τροφίμων κ.α. Το σύνολο αυτών των παραγόντων κάνει επιτακτική τη δημιουργία μηχανισμών ελέγχου και αξιολόγησης της επικινδυνότητας των τροφίμων. Ενδεικτικά αναφέρουμε ορισμένα από τα θέματα ασφάλεια τροφίμων και δημόσιας υγείας που έχουν απασχολήσει τις αρχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε) :

- Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί – GMOs (Genetically Modified Organisms)
- Σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια – BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)
- Ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά (Antibiotic Resistance)
- Διοξίνες (Dioxins)

Παράλληλα και μικρότερης έκτασης ή χαμηλότερου προφίλ, όχι όμως σημασίας, θέματα μας έχουν απασχολήσει όπως για παράδειγμα :

- Μικροβιακής προέλευσης: Ζωνοόσοι (Σαλμονέλα, Λιστέρια)
- Χημικής προέλευσης: Περιβαλλοντικοί μολυντές (Βαρέα μέταλλα, υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ενώσεων, ραδιενεργές ουσίες κ.α.)

Τα θέματα που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων συνήθως είναι πολύπλοκα, και εκτείνονται από την πρωτογενή παραγωγή μέχρι τον καταναλωτή. Ο προσδιορισμός του ρίσκου που εγκυμονούν για τον καταναλωτή είτε είναι δύσκολος είτε γίνεται με σημαντική καθυστέρηση.

Η ανάλυση των τροφίμων για την παρουσία τοξικών ενώσεων διαφέρει αρκετά από τις απλές χημικές αναλύσεις. Οι ενώσεις με τις οποίες ασχολούμαστε στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι αυτές οι οποίες έχουν αρνητικές επιδράσεις στα ζώα και στον άνθρωπο. Στην περίπτωση της δηλητηρίασης από ένα τρόφιμο έχει ιδιαίτερη σημασία να ανιχνεύσουμε την παρουσία της συγκεκριμένης ένωσης στο υπό μελέτη υπόστρωμα. Για το λόγο αυτό δυο βασικές διαδικασίες εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια των οικείων εργαστηριακών αναλύσεων. Η μια αφορά την ανίχνευση της τοξικής ουσίας και η άλλη την ποσοτικοποίηση της.

Τα τρόφιμα αποτελούν ένα πολύπλοκο μίγμα χημικών ενώσεων το οποίο περιλαμβάνει ορισμένα βασικά συστατικά όπως λιπαρά, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ίνες, υγρασία, μέταλλα, και ορισμένα συστατικά που μπορούμε να τα αποκαλέσουμε δευτερεύοντα και τα οποία περιλαμβάνουν φυσικές χημικές ουσίες όπως αυτές που χρησιμοποιούνται για να επηρεάσουμε το άρωμα των τροφών, τη σταθερότητα τους, τη διάρκεια «ζωής» τους, τη μηχανική αντοχή και άλλες ιδιότητες των τροφίμων. Ορισμένα από αυτά τα στοιχεία προστίθενται στα τρόφιμα και για αυτό θα πρέπει να ελέγχονται νομοθετικά σε ότι αφορά το είδος των ενώσεων αλλά και τις ποσότητες που προστίθενται. Ο νομικός ορισμός του πρόσθετου τροφίμων περιλαμβάνει κάθε χημική ένωση που υπάρχει στο τρόφιμο, συνήθως σε ελάχιστες ποσότητες, σε οποιαδήποτε στιγμή, είτε εκούσια προκειμένου να προσδώσουμε μια λειτουργικότητα ή ένα τεχνικό αποτέλεσμα είτε ακούσια ως συνέπεια της παραγωγικής διαδικασίας, της επεξεργασίας, της αποθήκευσης ή της συσκευασίας του. Αυτός ο ορισμός περικλείει και κάθε μορφής ακτινοβολία καθώς και οποιαδήποτε ουσία (όπως υπολείμματα φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικά και πρόσθετα ζωοτροφών για ζώα που χρησιμοποιούνται ως τροφή) η οποία απομακρύνεται με οποιοδήποτε τρόπο και δεν εμφανίζεται ή δεν ανιχνεύεται στο τελικό προϊόν ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας.

Τα συνεχή κρούσματα των τελευταίων ετών που σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων και τα οποία ήταν αποτέλεσμα σκόπιμων ή μη ενεργειών είχαν ως αποτέλεσμα την έκθεση των καταναλωτών σε τοξικές ουσίες. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων (analytical tests), πολλές από τις οποίες καθορίζονται από

νομοθεσίες, οδηγίες ή κανονισμούς. Η επικύρωση των μεθόδων γίνεται από διάφορες αρχές όπως F.D.A (U.S Food and Drugs Administration), Association of Official Analytical Chemists (AOAC) κ.α. Για αρκετά από τα πρόσθετα τροφίμων, ακούσιας ή εκούσιας προσθήκης, οι αναλύσεις γίνονται σε επίπεδο ρουτίνας κατά τη διακίνηση φορτιών για εμπορικούς λόγους από κρατικούς και ιδιωτικούς φορείς.

Όλες οι αναλύσεις τροφίμων γίνονται με απώτερο σκοπό την προστασία του καταναλωτή. Παρόλα αυτά όμως υπάρχουν αρκετά πιο άμεσα αίτια που επιβάλλουν την πραγματοποίηση των ελέγχων και σχετίζονται τόσο με τη νομοθεσία όσο και με θέματα μάρκετινγκ. Οι μέθοδοι που επιλέγονται και χρησιμοποιούνται στηρίζονται στις καθορισμένες ανάγκες όσων εμπλέκονται στην παραγωγή και διακίνηση των τροφίμων και οι οποίες εντάσσονται στο γενικότερο πλαίσιο της προστασίας του καταναλωτή και της ποιότητας-ασφάλειας των τροφίμων.

Οι εταιρείες που ασχολούνται με την ανάπτυξη και εμπορία φυτοπροστατευτικών προϊόντων, φαρμάκων για ζώα και προσθέτων τροφίμων είναι υποχρεωμένες να αναπτύσσουν μεθόδους ικανές να προσδιορίζουν ποσοτικά και ποιοτικά τις ενώσεις σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς και γενικά σε προϊόντα που προορίζονται για διατροφή, καθώς και στο περιβάλλον. Η ανάπτυξη των μεθόδων είναι μια αρκετά δύσκολη διαδικασία καθώς απαιτεί τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης όχι μόνο της αρχικής ένωσης αλλά και όλων των τοξικών προϊόντων μεταβολισμού τόσο σε προϊόντα διατροφής όσο και στο περιβάλλον. Πολλοί από τους μεταβολίτες δεν είναι γνωστοί από την αρχή και η ανακάλυψή τους απαιτεί νέα προσαρμογή της αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού. Στα πειράματα που γίνονται για την ανίχνευση της ένωσης και των μεταβολιτών συνήθως γίνεται εφαρμογή ραδιοπροσδιορισμού. Αφού ολοκληρωθούν οι διαδικασίες ελέγχου και επικύρωσης της μεθόδου τότε ακολουθεί η δημοσίευση της σε έγκυρες πηγές πληροφόρησης όπως:

- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists : Πρόκειται για εγχειρίδιο που περιέχει πληροφορίες για την ανάλυση φαρμακευτικών ουσιών, φυτοφαρμάκων, μετάλλων, βιταμινών, προσθέτων τροφίμων, φυσικών δηλητηρίων, και άλλων χημικών και μικροβιακών προσθέτων που συναντώνται σε τροφές.
- Journal of the Association of Official Analytical Chemists : Ανήκει στην ίδια θεματική ενότητα με το προηγούμενο εγχειρίδιο αλλά περιλαμβάνει τα αποτελέσματα των

δοκιμών επικύρωσης καθώς και νέες μεθόδους που δεν έχουν ακόμη ενταχθεί στο προηγούμενο εγχειρίδιο.

- **Pesticide Analytical Manual** : Οι τόμοι II και III περιέχουν λεπτομερείς περιγραφές μεθόδων για όλα τα εγκεκριμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, για όλα τα προϊόντα-τρόφιμα που αναφέρονται στην ετικέτα του σκευάσματος. Ο τόμος I περιλαμβάνει πολύυπολειμματικές μεθόδους για αναλύσεις εξέτασης και ελέγχου εφαρμογής νομοθεσίας καθώς και γενικές οδηγίες για την εκχύλιση και καθαρισμό του δείγματος κατά την εφαρμογή αέριας (GC) ή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).
- **Journal of Agricultural and Food Chemistry** : Δημοσιεύεται από την American Chemical Society και περιλαμβάνει πρωτότυπα ερευνητικά άρθρα σε νέες μεθόδους ανίχνευσης των υπό μελέτη ενώσεων. Επίσης πολλά άρθρα στο συγκεκριμένο περιοδικό περιγράφουν τις οδούς διάσπασης των ενώσεων κατά την πορεία του μεταβολισμού τους καθώς και τις ενώσεις που θα πρέπει να προσδιορίζονται μαζί με την μητρική κατά την ανάλυση των δειγμάτων.

1.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Οι περισσότεροι οργανισμοί που διεξάγουν ελέγχους, είτε ιδιωτικοί είτε δημόσιοι, συνήθως κάνουν ελέγχους για ένα μεγάλο αριθμό τοξικών ουσιών σε ένα δείγμα και όχι για μια μόνο ουσία. Για αυτό το λόγο μέθοδοι που αφορούν την ανίχνευση μίας και μόνο ουσίας (SRMs, Single Residue Methods) δεν είναι κατάλληλες. Τις περισσότερες φορές γίνεται χρήση των πολυυπολειμματικών μεθόδων (MRMs, Multiresidue Methods) οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν περισσότερες από μια ουσίες σε διάφορα είδη τροφίμων και είναι κατάλληλες για ελέγχους ρουτίνας σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων και χαρακτηρίζονται από σύντομο χρόνο ανάλυσης.

Συνήθως οι SRMs μέθοδοι επιλέγονται όταν πρόκειται για γνωστό δείγμα ή υποπτευόμαστε την ύπαρξη μιας συγκεκριμένης ένωσης. Επίσης χρησιμοποιούνται όταν υπάρχει μια συγκεκριμένη ανάγκη για ανίχνευση κάποιων ουσιών σε ένα τρόφιμο, όπως για παράδειγμα η ανίχνευση του *aldicarb* στα πεπόνια κατά τη δεκαετία του '80. Οι πολυυπολειμματικές μέθοδοι εφαρμόζονται όταν έχουμε δείγμα με άγνωστο ιστορικό και καλούμαστε να απαντήσουμε στην ερώτηση «Υπάρχουν υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο εξεταζόμενο δείγμα και εάν ναι ποια είναι και σε τι

επίπεδα?» Οι πολυυπολειματικές μέθοδοι παρέχουν πληροφορίες για μεγαλύτερο εύρος χημικών ουσιών από ότι οι SMRs στο ίδιο χρονικό διάστημα και με μικρότερη κατανάλωση ενέργειας.

Ανεξάρτητα το είδος της μεθόδου που εφαρμόζεται σε κάθε περίπτωση η αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού των τοξικών ουσιών χαρακτηρίζεται από διακριτά στάδια ή διαδικασίες που απώτερο σκοπό έχουν τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των υπό μελέτη ουσιών σε ένα σύνθετο υπόστρωμα όπως αυτό του τροφίμου. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα μπορεί να περιέχει εκατοντάδες ή και χιλιάδες φυσικές ή συνθετικές ενώσεις προερχόμενες από ανθρώπινη δραστηριότητα οι οποίες αντιδρούν με την προς ανάλυση ουσία, και των οποίων οι συγκεντρώσεις πολλές φορές είναι σημαντικά μεγαλύτερες σε σύγκριση με του ουσία που προσπαθούμε να ανιχνεύσουμε. Για το λόγο αυτό οι μέθοδοι σχεδιάζονται έτσι ώστε να λαμβάνουν υπόψη τους τις συγκεκριμένες φυσικές ιδιότητες των υπό μελέτη ουσιών όπως, πολικότητα, πτητικότητα, οπτικές καθώς και χημικές ιδιότητες (αντίδραση, πολυπλοκότητα δομής, χαρακτηριστικά καύσης) οι οποίες τις επιτρέπουν να ξεχωρίσουν από τις υπόλοιπες ουσίες του υποστρώματος. Τα βήματα που συναντάμε σε μια αναλυτική διαδικασία είναι τα ακόλουθα:

- Εκχύλιση (Extraction) : Ουσιαστικά πρόκειται για την απομάκρυνση της υπό μελέτη ουσίας από το υπόστρωμα. Η διαδικασία αυτή συνήθως γίνεται με τη χρήση ενός οργανικού διαλύτη. Η αύξηση όμως της διαλυτότητας περιορίζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.
- Καθαρισμός (cleanup) : Η απομάκρυνση μη επιθυμητών προϊόντων εκχύλισης τα οποία επηρεάζουν την εφαρμογή της μεθόδου στη συνέχεια.
- Μετατροπή (modification) : Η μετατροπή της υπό μελέτη ουσίας σε παράγωγο το οποίο διαχωρίζεται, ανιχνεύεται ή ποσοτικοποιείται πιο γρήγορα σε σχέση με τη μητρική ένωση. Πρόκειται για ένα προαιρετικό στάδιο που μπορεί να εφαρμοστεί πριν ή μετά τον καθαρισμό, ή μετά το στάδιο του διαχωρισμού σε ορισμένες περιπτώσεις.
- Διαχωρισμός (Resolution) : Πρόκειται για το διαχωρισμό της προς ανίχνευση ουσίας από τις υπόλοιπες συνήθως με τη χρήση μεθόδων αέριας χρωματογραφίας, υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ή χρωματογραφία ιοντοαλλαγής.
- Ανίχνευση (Detection) : Η επίτευξη απόκρισης από το όργανο ελέγχου που σχετίζεται με την ποσότητα της προς ανίχνευση ουσίας.

- Μέτρηση (Measurement) : Συσχετισμός της απόκρισης του οργάνου με γνωστή απόκριση που προκύπτει από την μέτρηση συγκεκριμένης ποσότητας της προς μελέτη ουσίας.
- Επιβεβαίωση (Confirmation) : Η βεβαιότητα ότι τα αποτελέσματα είναι αξιόπιστα και ακριβή η οποία προκύπτει με τη σύγκριση των αποτελεσμάτων από μια δεύτερη ανεξάρτητη μέθοδο. Τα τελευταία χρόνια η συγκεκριμένη απαίτηση γίνεται όλο και πιο έντονη καθώς οι διαδικασίες διασφάλισης της ποιότητας λειτουργίας του εργαστηρίου δίνουν ιδιαίτερη έμφαση.

1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ

Υπάρχουν διάφορες παράμετροι οι οποίες μπορούν να κρίνουν την καταλληλότητα μιας μεθόδου. Η ακρίβεια ή η συμφωνία ανάμεσα στην μετρούμενη και την πραγματική τιμή συνήθως εκτιμάτε ελέγχοντας μια σειρά από «λευκά» (μη μολυσμένα ή καθαρά) δείγματα τα οποία μολύνουμε με γνωστές ποσότητες της προς ανάλυση ουσίας (ή ουσιών) και προσδιορίζοντας τη τιμή μέτρησης που λαμβάνουμε ως ποσοστό της αρχικής ποσότητας ($\text{Ποσότητα που ανακτήθηκε} \div \text{Ποσότητα που προστέθηκε} \times 100$). Η επαναληψιμότητα συνήθως εκτιμάται ελέγχοντας σειρές δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης της προς μελέτη ουσίας. Η σχετική τυπική απόκλιση ή κάποια άλλη στατιστική παράμετρος χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των προαναφερόμενων παραμέτρων.

Άλλη μια χρήσιμη παράμετρος είναι το Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) το οποίο ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση της προς μελέτη ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί σε ικανοποιητικό επίπεδο εμπιστοσύνης σε μια συγκεκριμένη μέθοδο. Ο προσδιορισμός του γίνεται με τη χρήση «λευκών» δειγμάτων. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantification, LOQ) χρησιμοποιείται ως η ελάχιστη τιμή συγκέντρωσης μια ένωσης που μπορεί να δώσει ένα εργαστήριο στα αποτελέσματα του και είναι συνήθως αρκετά μεγαλύτερο από το LOD.

Οι παράμετροι αξιολόγησης των μεθόδων έχουν ιδιαίτερη σημασία στην εκτίμηση του ρίσκου προκειμένου να ληφθούν νομοθετικές ή οικονομικές αποφάσεις που σχετίζονται με την οποιαδήποτε ουσία και την αλυσίδα διακίνησης ενός τροφίμου. Σημαντικό ρόλο επίσης έχει και η εφαρμογή της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής.

Η ανάγκη για περισσότερα και πιο αξιόπιστα αναλυτικά δεδομένα θα εξακολουθεί να δίνει ερεθίσματα για βελτίωση των υπάρχόντων αναλυτικών τεχνικών ή την δημιουργία νέων τουλάχιστο σε ότι αφορά τον τομέα των τροφίμων. Η βελτίωση παραμέτρων όπως το LOD δεν αποτελεί πια τον πρωταρχικό στόχο καθώς τα σημερινά όρια ανίχνευσης καλύπτουν επαρκώς τις ανάγκες για την εκτίμηση των πιθανών επιδράσεων των διαφόρων ουσιών που συναντάμε στα τρόφιμα στη δημόσια υγεία. Μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις τα όρια ανίχνευσης είναι πολύ χαμηλότερα από τις συγκεντρώσεις εκείνες που ενδέχεται να έχουν βιολογικά σημαντική επίδραση στον οργανισμό. Το πιο πιθανό είναι τα επόμενα χρόνια οι βελτιώσεις στις αναλυτικές μεθόδους θα αφορούν στην βελτίωση του κόστους εφαρμογής της μεθόδου ή στην ευελιξία εφαρμογής της μεθόδου (π.χ. εφαρμογή στον αγρό) καθώς και στον επίπεδο των γνώσεων που θα πρέπει να έχει το άτομο που την εφαρμόζει.

Ενώ τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων, τα πρόσθετα τροφίμων και τα κτηνιατρικά φάρμακα αποτελούν τις βασικές κατηγορίες στις οποίες παρατηρείται βελτίωση των αναλυτικών μεθόδων κυρίως λόγω της συνεχούς ανάγκης για ελέγχους, υπάρχουν και νέες ομάδες χημικών που ενώ δεν θεωρούνται ως ενώσεις που προκύπτουν από την επεξεργασία των τροφίμων σχεδόν πάντα εμφανίζονται στα τρόφιμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η διφαινόλη Α (BPA) η οποία συναντάται στον νερό όταν εμφιαλώνεται σε πολυκαρβονικές φιάλες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Οι στόχοι του συγκεκριμένου εργαστηρίου είναι οι ακόλουθοι :

1. Η εξοικίωση με κρίσιμες παραμέτρους που αφορούν την ανάλυση τροφίμων για υπολείμματα φυτοφαρμάκων
2. Η δυνατότητα αξιολόγησης αναλυτικών αποτελεσμάτων που αφορούν έλεγχο τροφίμων για υπολείμματα φυτοφαρμάκων

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

- ☒ Ποιες είναι οι βασικές κατηγορίες φτπ
- ☒ Τι γνωρίζεται για τα Α.Ο.Κ
- ☒ Τι χαρακτηριστικά έχουν τα προστατευτικά και τι τα διασυστηματικά φτπ
- ☒ Αναφέρατε δύο από τα σημεία που καθορίζουν τη λήψη απόφασης για την καταλληλότητα η όχι μιας παρτίδας
- ☒ Ποια είναι τα βασικά τμήματα που απαρτίζουν έναν αέριο χρωματογράφο και μια υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- ☒ Ποια είναι η βασική αρχή που αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό των φτπ και υπό ποια προϋπόθεση ?
- ☒ Πως σχηματίζεται η καμπύλη αναφοράς και τι πληροφορίες μας δίνει? Με ποιους τρεις τρόπους μπορεί να σχηματιστεί?
- ☒ Τι γνωρίζεται για την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και την αξιοπιστία των αναλυτικών μετρήσεων για τον έλεγχο υπολειμμάτων φτπ

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

 Κανονισμός 396/2005/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23ης Φεβρουαρίου 2005 για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα και τις

ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου

☞Κανονισμός (ΕΚ) 299/2008 για τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 396/2005 για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα ή πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης, όσον αφορά τις εκτελεστικές αρμοδιότητες που ανατίθενται στην Επιτροπή

☞Οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων

☞Οδηγία 79/117/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί απαγορεύσεως της θέσεως σε κυκλοφορία και της χρησιμοποίησεως φυτοφαρμακευτικών προϊόντων που περιέχουν ορισμένες δραστικές ουσίες

☞Οδηγία 2002/63/ΕΚ της Επιτροπής, για την καθιέρωση κοινοτικών μεθόδων δειγματοληψίας για τον επίσημο έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων μέσα και πάνω σε προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης και την κατάργηση της οδηγίας 79/700/ΕΟΚ.

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των φυτών από τα φυτοπαράσιτα ονομάζονται φυτοπροστατευτικά προϊόντα (plant protection products) (φ.π) ή φυτοφάρμακα (pesticides). Συγκεκριμένα και με βάση τον ορισμό που περιγράφεται στην Οδηγία 91/414/ΕΟΚ ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα ορίζονται οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες, προσφέρονται με τη μορφή με την οποία παραδίδονται στον χρήστη και προορίζονται:

- να προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς ή να προλαμβάνουν τη δράση τους, εφόσον οι ουσίες ή τα σκευάσματα αυτά δεν ορίζονται διαφορετικά παρακάτω,
- να επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών, εκτός αν πρόκειται για θρεπτικές ουσίες (π.χ. ρυθμιστές αύξεσης),

- να διατηρούν τα φυτικά προϊόντα, εκτός εάν πρόκειται για ουσίες ή προϊόντα που υπόκεινται σε ειδικές διατάξεις του Συμβουλίου ή της Επιτροπής σχετικά με τα συντηρητικά,
- να καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα φυτά, ή
- να καταστρέφουν μέρη των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη των φυτών.

Συνεπώς τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ανάλογα με το είδος του φυτοπαράσιτου που επηρεάζουν ή τη δράση τους διακρίνονται σε:

Μυκητοκτόνα (fungicides), Βακτηριοκτόνα (bactericides), Εντομοκτόνα (insecticides), ΑΚαρεοκτόνα (acaricides), Νηματοδωκτόνα (nematicides), Ζιζανιοκτόνα (herbicides), Τρωκτικοκτόνα (rodenticides), Κοχλιολειμακοκτόνα (molluscicides), Απολυμαντικά (disinfectants) ή υποκαπνιστικά (fumigants) και Απωθητικά (repellents).

Επιπλέον στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα υπάγονται και οι φυτορρυθμιστικές ουσίες (plant growth regulators) ή φυτοορμόνες (plant hormones) που σε μικρές συγκεντρώσεις επηρεάζουν βασικές φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αύξησης και ανάπτυξης τους. Επίσης στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα υπάγονται και τα βιοφυτοφάρμακα (biopesticides) που έχουν ως δραστικό συστατικό κάποιο μικροοργανισμό (μύκητες, βακτήρια, ιοί) καθώς και παρασιτοειδή και αρπακτικά των ζωικών εχθρών.

Με βάση τον 721/77 ως υπόλειμμα γεωργικού φαρμάκου οριζόταν η μετά την εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου παραμένουσα επί ή εντός του φυτού φερόμενου προς κατανάλωση, ποσότητα δρώντος συστατικού ή και των επιβλαβών προϊόντων αποικοδόμησης του και γενικώς χημικής μετατροπής. Ο 721 περιόριζε τον ορισμό και αναφερόταν μόνο στα προϊόντα φυτικής προέλευσης που διατίθενται προς κατανάλωση. Σήμερα όμως είναι αποδεκτό ότι ποσότητες γεωργικών ενώσεων διαχέονται στο περιβάλλον κατά τη χρήση τους ή και αργότερα και προσλαμβάνονται από τους υπόλοιπους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς.

Με βάση λοιπόν κανονισμό 396/2005/EK και με όσα αναφέρονται στην Οδηγία 91/414/ΕΟΚ η οποία αντικατέστησε τον 721/77 ως κατάλοιπα φυτοφαρμάκων ορίζονται τα κατάλοιπα συμπεριλαμβανομένων των δραστικών ουσιών, των μεταβολιτών ή/και των προϊόντων αποδόμησης ή αντίδρασης δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ή έχουν

χρησιμοποιηθεί σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία υπάρχουν εντός ή επί των προϊόντων που περιλαμβάνονται στο παράρτημα Ι του οικείου κανονισμού, συμπεριλαμβανομένων ιδίως εκείνων τα οποία ενδέχεται να προκύψουν από τη χρήση τους για φυτοπροστασία, στην κτηνιατρική και ως βιοκτόνων.

Ως ανώτατο όριο κατάλοιπων ορίζεται το ανώτατο νόμιμο όριο συγκέντρωσης καταλοίπου φυτοφαρμάκου εντός ή επί τροφίμων ή ζωοτροφών το οποίο ορίζεται σύμφωνα με τον Κανονισμό 396/2005/ΕΚ και βασίζεται στην ΟΓΠ (Ορθή Γεωργική Πρακτική) και τη χαμηλότερη απαιτούμενη έκθεση του καταναλωτή για την προστασία των ευαίσθητων καταναλωτών. Στην συνέχεια θα αναπτυχθούν οι βασικές αρχές χημικού ελέγχου των γεωργικών φαρμάκων και ειδικότερα θα γίνει αναφορά σε χημικές μεθόδους που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό κυρίως σε υποστρώματα φυτικής προέλευσης.

2.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα θα πρέπει να πληρούν ένα αριθμό επιθυμητών ιδιοτήτων ως προς τη βιολογική δράση, την εφαρμογή, την τοξικολογία για το χρήστη και τον καταναλωτή και τους άλλους οργανισμούς μη στόχους, αλλά και για την κίνηση και συμπεριφορά στο περιβάλλον. Το φυτοφάρμακο πρέπει να επιτυγχάνει αποτελεσματική καταπολέμηση σε μικρές συγκεντρώσεις, να μην είναι φυτοτοξικό, να μην επηρεάζει τους άλλους οργανισμούς του οικοσυστήματος, να μη ρυπαίνει το περιβάλλον και να μην αποτελεί κίνδυνο για την υγεία και την ασφάλεια του ανθρώπου. Δύο από τις σημαντικότερες ιδιότητες ενός φυτοφαρμάκου από τις οποίες εξαρτάται η βιολογική και τοξικολογική συμπεριφορά του είναι η εκλεκτική τοξικότητα και η ικανότητα πρόσληψης και μετακίνησης στα φυτά.

2.2.1 ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η αναγνώριση ενώσεων που να είναι τοξικές σε ένα οργανισμό ή μια κατηγορία οργανισμών δεν είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Η δυσκολία είναι στην αναγνώριση της εκλεκτικής τοξικότητας, με την οποία θα επιτύχουμε θανάτωση ή παρεμπόδιση του παρασίτου με συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου που δεν θα έχει δυσμενείς επιδράσεις στο καλλιεργούμενο φυτό, ή σε άλλους οργανισμούς, που εκτεθούν στην επίδραση του. Η εκλεκτική τοξικότητα είναι επιθυμητή, όχι μόνο για να μειωθούν στο ελάχιστο οι κίνδυνοι

φυτοτοξικότητας, αλλά και να αποφευχθούν οι δυσμενείς επιδράσεις της εφαρμογής του φαρμάκου σε άλλες μορφές ζωής και η διατάραξη της βιολογικής ισορροπίας. Από την άποψη αυτή το ιδεώδες φάρμακο θα πρέπει να έχει πολύ μικρό φάσμα δράσης, να είναι δηλαδή τοξικό μόνο σε ένα μικρό αριθμό ειδών μιας κατηγορίας οργανισμών. Βεβαίως φάρμακα με πολύ μικρό φάσμα δράσης έχουν μικρότερο εμπορικό ενδιαφέρον, γιατί μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο σε ένα αριθμό περιπτώσεων και αφού προηγουμένως έχει γίνει ασφαλής προσδιορισμός του παράσιτου.

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούμε παρεμποδίζουν συστήματα, που υπάρχουν και έχουν σημασία και για το φυτοπαράσιτο και για τον ξενιστή, αλλά με επιλογή τέτοια ώστε ο παρεμποδιστής να έχει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια για το σύστημα του παρασίτου. Στην περίπτωση των ζιζανίων το καλλιεργούμενο είδος και το φυτοπαράσιτο είναι φυτικοί οργανισμοί και κατά συνέπεια είναι πολύ δύσκολο να έχουμε εκλεκτική τοξικότητα με δράση σε ένζυμα-στόχους που υπάρχουν στο ζιζάνιο αλλά δεν υπάρχουν στο καλλιεργούμενο φυτό. Η εκλεκτική καταπολέμηση των ζιζανίων στηρίζεται σε άλλους μηχανισμούς, όπως το κατάλληλο βάθος εφαρμογής, ο διαφορετικός τρόπος φυτρώματος, ο χρόνος εφαρμογής, η προστασία του καλλιεργούμενου φυτού με αντιφυτοτοξικούς παράγοντες, αλλά και οι βιοχημικές ή φυσιολογικές διαφορές μεταξύ ζιζανίου και καλλιέργειας.

Ο βαθμός εκλεκτικής τοξικότητας στο υποκυτταρικό επίπεδο συνδέεται άμεσα τόσο με την εκλεκτική τοξικότητα σε επίπεδο οργανισμού, όσο και με την αποτελεσματικότητα των χημικών ενώσεων. Κατά κανόνα μόρια με μικρή εκλεκτικότητα αντιδρούν με περισσότερα από ένα κυτταρικά συστατικά, όταν βρεθούν στο εσωτερικό του κυττάρου και παρεμποδίζουν περισσότερες από μια κυτταρικές διεργασίες. Τα φάρμακα μικρής εκλεκτικής τοξικότητας έχουν κατά κανόνα μικρή αποτελεσματικότητα αφού ο αριθμός των μορίων φαρμάκου που απαιτείται για αποτελεσματική δράση, σε ένα συγκεκριμένο ποσό πρωτοπλάσματος, είναι αντιστρόφως ανάλογος του βαθμού εκλεκτικότητας της ένωσης. Τα εκλεκτικά βέβαια απαιτούν προσοχή στη διαχείριση της ανθεκτικότητας.

2.2.2 ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΤΑ

Η ικανότητα κίνησης διαμέσου της επιδερμίδας των φύλλων είναι ο κύριος παράγοντας που προσδιορίζει την αποτελεσματικότητα των φυτοπροστατευτικών

προϊόντων στην περίπτωση που εφαρμόζονται με ψεκασμούς φυλλώματος. Οι κηροί που βρίσκονται εξωτερικό τμήμα της επιδερμίδας αποτελούν το σημαντικότερο φραγμό για την είσοδο των φυτοφαρμάκων στο εσωτερικό του φύλου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η είσοδος είναι πολύ μεγαλύτερη από την κάτω επιφάνεια των φύλλων, προφανώς λόγω του μεγαλύτερου αριθμού στοματίων. Κατά συνέπεια παράγοντες που ρυθμίζουν το άνοιγμα των στοματίων, όπως το φως, η σχετική υγρασία, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση CO₂ και η συσσώρευση φωτοσυνθετικών προϊόντων, επηρεάζουν και την είσοδο των φυτοφαρμάκων. Για το λόγο αυτό το καλοκαίρι οι ψεκασμοί δεν πρέπει να γίνονται τις μεσημεριανές ώρες που τα στομάτια των φύλλων είναι κλειστά. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες είναι η διαλυτότητα των φυτοφαρμάκων στο νερό και η μορφή τυποποίησης. Έχει αποδειχθεί ότι τα σκευάσματα σε μορφή γαλακτωματοποιήσιμου συμπυκνώματος και ελαιώδους αιωρήματος αυξάνουν κατά πολύ τη δια-επιδερμική κίνηση και έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην επιτυχία των διασυστηματικών, σε αντίθεση με τα προστατευτικά που τυποποιούνται περισσότερο ως βρέξιμη σκόνη.

2.2.3 ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα από την άποψη της ικανότητας κίνησης εντός των φυτών διακρίνονται σε προστατευτικά και διασυστηματικά. Προστατευτικά χαρακτηρίζονται εκείνα που δεν εισέρχονται και δεν κυκλοφορούν (τουλάχιστο σε σημαντικό βαθμό) στο εσωτερικό των φυτικών οργάνων και που προστατεύουν μόνο το μέρος του φυτικού σώματος επί του οποίου έχουν εναποτεθεί. Η πρόσληψη τους από τα φυτά είναι σχεδόν αμελητέα και χρησιμοποιούνται μόνο σε προληπτικές επεμβάσεις.

Η νέα βλάστηση είναι ευπρόσβλητη όσο καλά και εάν έχουν καλυφθεί τα παλαιότερα όργανα του φυτού. Κατά συνέπεια, ο καθορισμός του κατάλληλου χρόνου εφαρμογής τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός, γιατί εάν η επέμβαση γίνει πολύ μετά ή πολύ πριν την επαφή του φυτοπαράσιτου με τον ξενιστή έχουμε τον κίνδυνο να μην υπάρχει το φάρμακο σε συγκέντρωση ικανή για την προστασία του ξενιστή.

Τα διασυστηματικά, αντιθέτως, φυτοπροστατευτικά προϊόντα έχουν την ικανότητα να εισέρχονται και να κυκλοφορούν μέσα στους φυτικούς ιστούς και να μεταφέρονται σε άλλα όργανα του φυτού. Έτσι ένα φυτοφάρμακο για να είναι διασυστηματικό θα πρέπει: α) να παρουσιάζει κατάλληλη λιπόφιλη και υδρόφιλη ισορροπία, ώστε να μπορεί να εισέρχεται

(λιπόφιλες ιδιότητες) δια μέσου των λιπόφιλων στοιβάδων των ιστών (κηροί, εφυμενίδα) και να μετακινείται (υδρόφιλες ιδιότητες) εντός των φυτών β) να παρουσιάζει εκλεκτική τοξικότητα στο υποκυτταρικό επίπεδο, ώστε να μην προκαλεί φυτοτοξικότητα και γ) να μη διασπάται γρήγορα εντός των φυτικών ιστών, δηλαδή να έχει ικανοποιητική υπολειμματική διάρκεια.

2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΝΤΩΝ

Οι βασικοί κανόνες, οι αρχές και γενικότερα οι κατευθύνσεις που θα πρέπει να τηρηθούν κατά τη δειγματοληψία για έλεγχο υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων περιγράφονται στην Οδηγία 2002/63/ΕΚ. Βασικός στόχος όλων των διαδικασιών δειγματοληψίας είναι η λήψη ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από μια προς ανάλυση παρτίδα. Επίσης θα πρέπει να ληφθεί και επαρκής ποσότητα προκειμένου το δείγμα να είναι και αξιόπιστο.

Τα κοινοτικά ΑΟΚ βασίζονται σε στοιχεία της ορθής γεωργικής πρακτικής και τα ακατέργαστα προϊόντα, καθώς και τρόφιμα που προέρχονται από αυτά, τα οποία τηρούν ΑΟΚ ως τοξικολογικά αποδεκτά. Στα γαλακτοκομικά προϊόντα ή στα προϊόντα αυγών λαμβάνεται υπόψη το μέγιστο επίπεδο που αναμένεται να υπάρχει σε ένα σύνθετο δείγμα, το οποίο προέρχεται από πολλές μονάδες του επεξεργασμένου προϊόντος και νοείται ότι αντιπροσωπεύει το μέσο επίπεδο υπολειμμάτων σε μια παρτίδα. Στον καθορισμό ΑΟΥ για το κρέας και τα πουλερικά λαμβάνεται υπόψη το μέγιστο επίπεδο που αναμένεται να υπάρχει στους ιστούς μεμονωμένων ζώων ή πτηνών μετά από επεξεργασία τους. Κατά συνέπεια, τα ΑΟΥ για το κρέας και τα πουλερικά έχουν εφαρμογή σε συνολικό δείγμα προερχόμενο από ένα μεμονωμένο πρωταρχικό δείγμα, ενώ τα ΑΟΥ για τα φυτικά, γαλακτοκομικά και τα προϊόντα αυγών έχουν εφαρμογή σε σύνθετο συνολικό δείγμα προερχόμενο από ένα έως δέκα πρωταρχικά δείγματα.

Κρίσιμη παράμετρος σε κάθε περίπτωση για την σωστή οργάνωση της δειγματοληψίας είναι να γνωρίζουμε το σκοπό της ανάλυσης και ειδικά το ερώτημα στο οποίου καλούμαστε να απαντήσουμε. Ο πλέον συνηθής λόγος είναι ο έλεγχος υπολειμμάτων σε τρόφιμα προκειμένου να γνωρίζουμε τι ουσίες υπάρχουν σε ένα δείγμα και σε τι επίπεδα, έτσι ώστε να μπορούμε να αποφανθούμε για την καταλληλότητα του.

Στην προκειμένη περίπτωση η δειγματοληψία θα πρέπει να είναι τυχαιοποιημένη. Συγκεκριμένα θα λαμβάνουμε τυχαία ένα προκαθορισμένο αριθμό υποδειγμάτων από το σύνολο της ελεγχόμενης παρτίδας. Στη συνέχεια τα υποδείγματα τα ενώνουμε προκειμένου να συντεθεί το τελικό δείγμα που θα φτάσει στο εργαστήριο για ανάλυση.

Μια ορθή διαδικασία για έλεγχο ΑΟΚ περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Προφυλάξεις : Σε όλη τη διάρκεια της δειγματοληψίας θα πρέπει να παρεμποδίζεται η τυχόν μόλυνση ή φθορά των δειγμάτων καθώς μπορεί να επηρεαστούν τα αναλυτικά αποτελέσματα.
- Συγκέντρωση πρωταρχικών δειγμάτων: Με βάση την οικία οδηγία δειγματοληψίας θα πρέπει να γνωρίζουμε εκ των προτέρων των ελάχιστο αριθμό πρωταρχικών δειγμάτων που θα πρέπει να λαμβάνονται από μια προς έλεγχο παρτίδα. Η λήψη των δειγμάτων θα πρέπει να είναι τυχαία και η ποσότητα τους επαρκής
- Ετοιμασία του συνολικού δείγματος: Ανάλογα με τη φύση του δείγματος και όπου αυτό επιτρέπεται γίνεται ανάμιξη των πρωταρχικών δειγμάτων για το σχηματισμό του συνολικού δείγματος. Στις περιπτώσεις που κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό θα πρέπει να ακολουθούνται οι οδηγίες που περιγράφονται στον οικείο κανονισμό.
- Ετοιμασία εργαστηριακού δείγματος: Στις περιπτώσεις που το συνολικό δείγμα είναι μεγαλύτερο από τις απαιτήσεις του εργαστηριακού δείγματος τότε θα πρέπει να διαιρείται ώστε να λαμβάνεται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα. Αναλόγως την περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί όργανο δειγματοληψίας, να γίνει τεμαχισμός σε τέταρτα ή άλλη κατάλληλη μέθοδος μείωσης μεγέθους. Προσοχή θα πρέπει να δίνεται στις περιπτώσεις που δεν επιτρέπεται ο τεμαχισμός των δειγμάτων
- Πρωτόκολλο δειγματοληψίας: Σε κάθε περίπτωση ο υπεύθυνος της δειγματοληψίας θα πρέπει να καταγράφει το είδος και τη προέλευση της παρτίδας, τον κάτοχο, προμηθευτή ή φορέα, την ημερομηνία και τόπο δειγματοληψίας και κάθε άλλη σχετική πληροφορία. Σε περίπτωση που υπάρχει οποιαδήποτε απόκλιση από τα περιγραφόμενα στην οδηγία δειγματοληψίας αυτό θα πρέπει να περιγράφεται. Απαραίτητη είναι η λήψη επαναληπτικού δείγματος με τους ίδιους κανόνες. Σε κάθε περίπτωση αντίγραφο του πρωτόκολλου δειγματοληψίας θα πρέπει να δίνεται στους ελεγχόμενους

- Συσκευασία και διαβίβαση δείγματος: Τα δείγματα που αποστέλλονται στο εργαστήριο θα πρέπει να τοποθετούνται σε καθαρούς και αδρανείς περιέκτες οι οποίοι πρέπει να τα προστατεύουν από μολύνσεις, φθορές ή διαφυγές. Στη συνέχεια ακολουθεί το σφράγισμα του περιέκτη, η σήμανση και η επισύναψη του πρωτόκολλου δειγματοληψίας. Η παράδοση του δείγματος θα πρέπει να γίνεται το συντομότερο δυνατό, ενώ κατά τη μεταφορά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή τυχόν αλλοιώσεων.
- Παρασκευή αναλυτικού δείγματος: Από τη στιγμή που το δείγμα εισέρχεται στο εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει ένα κωδικό, μοναδικό για το κάθε ένα, που θα αφορά το εργαστήριο. Ο κωδικός αυτός θα συνοδεύει και το αναλυτικό δείγμα που θα προκύψει. Σε περίπτωση που υπάρχουν μέρη του δείγματος τα οποία δεν υποβάλλονται σε ανάλυση θα πρέπει να υπάρχει γίνεται καταγραφή του βάρους τους.
- Προετοιμασία και αποθήκευση αναλυτικής ποσότητας: Αφού γίνει η ομογενοποίηση του αρχικού δείγματος λαμβάνεται η αναλυτική ποσότητα το μέγεθος της οποίας καθορίζεται από την αναλυτική μέθοδο και την αποδοτικότητα της ομογενοποίησης. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να γίνεται έλεγχος για την επίδραση των διαφόρων συνθηκών στο εργαστήριο και όπου κρίνεται αναγκαίο να λαμβάνονται τα αναγκαία μέτρα.

Τα αναλυτικά αποτελέσματα θα πρέπει να προέρχονται από ένα ή περισσότερα εργαστηριακά δείγματα ληφθέντα από τη παρτίδα και παραληφθέντα σε καλή κατάσταση για ανάλυση. Τα αποτελέσματα πρέπει να υποστηρίζονται από αποδεκτά δεδομένα ποιοτικού ελέγχου. Όταν κάποια υπολείμματα διαπιστώνεται ότι υπερβαίνουν ένα ΑΟΚ, θα πρέπει να επιβεβαιώνεται η ταυτότητα των υπολειμμάτων και η συγκέντρωσή τους να επαληθεύεται με ανάλυση μιας ή περισσότερων πρόσθετων αναλυτικών ποσοτήτων προερχόμενων από το αρχικό εργαστηριακό δείγμα ή δείγματα. Το ΑΟΚ έχει εφαρμογή στο συνολικό δείγμα. Η παρτίδα θεωρείται ότι συμμορφώνεται με το ΑΟΚ όταν το ή τα αναλυτικά αποτελέσματα δεν υπερβαίνουν το ΑΟΚ. Όταν τα αποτελέσματα για το συνολικό δείγμα υπερβαίνουν το ΑΟΥ, στην απόφαση σχετικά με τη μη συμμόρφωση της παρτίδας πρέπει να λαμβάνονται υπόψη:

ι) τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από ένα ή περισσότερα, αναλόγως, εργαστηριακά δείγματα, και

ii) η ορθότητα και ακρίβεια της ανάλυσης, όπως υποδεικνύεται από τα δεδομένα του υποστηρικτικού ποιοτικού ελέγχου

2.4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

2.4.1 ΧΡΗΣΙΜΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.4.1.1 ΑΡΧΕΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1952 από τους James και Martin και έκτοτε αποτελεί μια από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού στον κλάδο της αναλυτικής χημείας. Με την εξέλιξη της τεχνικής κατά τα τελευταία χρόνια καλύπτεται ένα ευρύτατο μέρος των αναλυτικών αναγκών όπως η ανίχνευση και ταυτοποίηση ουσιών, ο ποσοτικός προσδιορισμός σε επίπεδο ιχνοανάλυσης, ο προσδιορισμός μεγάλου αριθμού ουσιών σε δείγμα, ο διαχωρισμός ουσιών με μικρές διαφορές χημικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων κ.α.. Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται σήμερα για τον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ουσιών σε ποικιλία δειγμάτων που αφορούν το σύνολο των εφαρμοσμένων κλάδων της χημείας όπως τη χημεία τροφίμων.

Η αέρια χρωματογραφία βασίζεται στο διαχωρισμό των ουσιών μεταξύ μιας αέριας χημικά αδρανούς φάσης (φέρον αέριο) και μιας στατικής φάσης η οποία μπορεί να είναι στερεά (αέρια – στερεά χρωματογραφία) ή υγρή ακινητοποιημένη σε αδρανή φορέα (αέρια – υγρή χρωματογραφία). Η βασική απαίτηση της τεχνικής είναι η πτητικότητα και η θερμική σταθερότητα των προς προσδιορισμό ουσιών ή παραγώγων τους έτσι ώστε με κατάλληλη ρύθμιση της θερμοκρασίας να καθίστανται αέριες χωρίς να επέρχεται θερμική διάσπαση. Η θερμική σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ουσιών και του υλικού της στήλης αποτελούν το βασικό περιοριστικό παράγοντα της τεχνικής.

Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και ελεύθερο άλλων ουσιών. Η επιλογή του φέροντος αερίου βασίζεται κυρίως στο είδος του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή με τον οποίο πρέπει να είναι συμβατό καθώς επίσης και στη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η

στατική στερεά ή υγρή φάση είναι τοποθετημένη εντός της χρωματογραφικής στήλης. Η στήλη χαρακτηρίζεται ως η καρδιά ενός χρωματογράφου.

Για την ορθή εφαρμογή της μεθόδου χρήσιμο θα είναι να γνωρίζουμε στοιχεία όπως το είδος του δείγματος, τις προς προσδιορισμό ουσίες, την περιοχή εντός της οποίας αναμένεται η ποσότητα των ουσιών, πιθανές προσμίξεις κ.α.. Βάσει των στοιχείων αυτών θα πραγματοποιηθεί η επιλογή της στήλης, του φέροντος αερίου, του συστήματος εισαγωγής δείγματος, και του ανιχνευτή. Στη συνέχεια γίνεται επιλογή των χρωματογραφικών συνθηκών όπως η θερμοκρασία φούρνου, η ροή του φέροντος αερίου, η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή, ο εναίσιμος όγκος δείγματος κ.λ.π.. Η βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών αποσκοπεί στον ικανοποιητικό διαχωρισμό των ουσιών, τη λήψη συμμετρικών κορυφών, την επίτευξη ικανοποιητικών ορίων ανίχνευσης, τη μείωση του χρόνου ανάλυσης κ.α..

Κατά τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές και μέθοδοι που αποσκοπούν στη βελτίωση και επέκταση των δυνατοτήτων που παρέχονται από την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας π.χ. η σύζευξη τεχνικών όπως η αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματογραφία μάζας. Η κύρια λειτουργία ενός χρωματογράφου είναι να παρέχει τις απαιτούμενες από τη στήλη συνθήκες προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των ουσιών χωρίς να μειώνεται η απόδοση της στήλης.

Ένας τυπικός χρωματογράφος περιλαμβάνει :

- Σύστημα ρύθμισης ροής των απαιτούμενων αερίων
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος στο οποίο πραγματοποιείται η εξαέρωση του δείγματος και η ανάμιξη του με το φέρον αέριο πριν την εισαγωγή στη στήλη
- Θερμοστατούμενος φούρνος που παρέχει με ιδιαίτερη ακρίβεια τις απαιτούμενες από την περιεχόμενη στήλη θερμοκρασιακές συνθήκες
- Σε σειρά συνδεδεμένο ενισχυτή
- Σύστημα μετατροπής, καταγραφής και επεξεργασίας του εξαγόμενου από τον ανιχνευτή σήματος.

Συνδεδεμένες στο χρωματογράφο βρίσκονται οι φιάλες των αερίων. Τα αέρια πριν από την εισαγωγή τους στο σύστημα διέρχονται από σύστημα καθαρισμού για την απομάκρυνση της υγρασίας, μικρού μοριακού βάρους υδρογονανθράκων και του

οξυγόνου. Η παρουσία οξυγόνου στο φέρον αέριο συντελεί στη μείωση της διάρκειας ζωής των ανιχνευτών θερμικής αγωγιμότητας (TCD), στην εμφάνιση ασταθούς σήματος γραμμής στους ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων και στην οξείδωση της στατικής φάσης γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό προκειμένου για τριχοειδής στήλες όπου η ποσότητα της στατικής φάσης είναι πολύ μικρή. Επίσης πρέπει να διασφαλίζεται η απουσία υγρασίας διότι μπορεί να προκαλέσει απενεργοποίηση της στατικής φάσης κυρίως στην αέρια-στερεή χρωματογραφία. Ο ικανοποιητικός καθαρισμός των αερίων αποτελεί σε αρκετές περιπτώσεις πρόβλημα καθώς συστήματα καθαρισμού που χρησιμοποιούν πλαστικό στέλεχος και ελαστικούς συνδέσμους μπορεί να οδηγήσουν σε επιμολύνσεις των καθαρών αερίων λόγω της διαπερατότητας τους από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Για το λόγο αυτό είναι προτιμότερα τα συστήματα που διαθέτουν μεταλλικό ή υάλινο στέλεχος και μεταλλικούς συνδέσμους. Στην πράξη τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα αέρια είναι το ήλιο, το υδρογόνο, το άζωτο και το αργό. Το υδρογόνο μειονεκτεί στο ότι είναι εύφλεκτο και το ήλιο στο υψηλό του κόστος ενώ και τα δύο έχουν μεγάλο συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας και μικρή πυκνότητα γεγονός που επιτρέπει μεγάλες ταχύτητες ροής.

Η στήλη όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα ενός χρωματογράφου και από την ορθή επιλογή και χρήση της εξαρτάται και η επιτυχία του επιδιωκόμενου διαχωρισμού. Οι στήλες εκτός από το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένες ταξινομούνται και βάσει άλλων παραμέτρων όπως η εσωτερική τους διάμετρος, ο τρόπος ακινητοποίησης της στατικής φάσης και το είδος του υλικού πληρώσεως. Όσον αφορά την εσωτερική διάμετρο των στηλών αυτές διαχωρίζονται σε στήλες πληρώσεως και τριχοειδής στήλες. Σήμερα οι πλέον χρησιμοποιούμενες είναι οι τριχοειδείς που χαρακτηρίζονται από διάμετρο 0,18 ως και 0,53 mm και μήκος 10-100m. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των τριχοειδών στηλών έναντι των πληρώσεως είναι οι μικρότεροι χρόνοι κατακράτησης, η μεγάλη χημική αδράνεια, ο μεγάλος χρόνος ζωής λόγω μεγάλης σταθερότητας, η μεγαλύτερη αποδοτικότητα και η καλύτερη επαναληψιμότητα.

Οι βασικές προϋποθέσεις για τη συντήρηση της στήλης είναι οι εξής:

- Συνεχής ροή του φέροντος αερίου όταν η στήλη χρησιμοποιείται
- Αποφυγή απότομων αυξομειώσεων της θερμοκρασίας
- Χρησιμοποίηση προσθήκης (ιδίως όταν έχουμε ακάθαρτα δείγματα)
- Περιοδική μείωση του μήκους της στήλης

- Πωματισμός των άκρων της στήλης κατά τη φύλαξη της
- Συχνός καθαρισμός του τελικού τμήματος του εγχυτή
- Αποφυγή επιμόλυνσης από νερό ή οξυγόνο

Σε ότι αφορά τους ανιχνευτές οι κυριότεροι είναι οι εξής:

- Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)
- Θερμοϊονικός ανιχνευτής (TID) ή ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (NPD)
- Φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής (FPD)
- Ανιχνευτής ηλεκτρολυτικής αγωγιμότητας (ELCD)
- Ανιχνευτής φωτοϊονισμού (PID)
- Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID)
- Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD)

2.4.2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία εφαρμόζεται ευρέως όπως και η αέριος χρωματογραφία στις αναλύσεις των γεωργικών φαρμάκων και ειδικότερα στις περιπτώσεις μη πτητικών και θερμικά ασταθών μορίων για τα οποία δεν μπορεί να εφαρμοστεί αέριος χρωματογραφία. Ένα σύστημα HPLC περιλαμβάνει :

- Το σύστημα των διαλυτών με τα φίλτρα και μία ή περισσότερες αντλίες με τους ρυθμιστές ανάμιξης
- Τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος
- Τη στήλη και πιθανώς προστήλη
- Τον ανιχνευτή και
- Το καταγραφικό με τον επεξεργαστή των δεδομένων

Το δείγμα εισάγεται στη στήλη του υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης είτε απευθείας με μια μικροσύριγγα είτε με μια βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, σε όγκο 5-25μl. Το πλεονέκτημα της εισαγωγής δείγματος με τη βοήθεια βαλβίδας είναι ότι δεν διακόπτεται η ροή του εκλουστικού και η εισαγωγή γίνεται σε υψηλές πιέσεις.

Η κινητή φάση στην HPLC είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών που προωθείται στη στήλη με τη βοήθεια κατάλληλης αντλίας υπό πίεση, η οποία πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατό σταθερή. Οι διαλύτες τοποθετούνται μέσα σε γυάλινες φιάλες όπου απαερώνονται για αποφυγή της δημιουργίας φυσαλίδων και ασταθούς πίεσης στο κύκλωμα ροής και μπαίνουν στη στήλη αφού περάσουν από κατάλληλο σύστημα φίλτρων.

Συνήθως στην HPLC χρησιμοποιούνται ως υλικά πληρώσεως διάφορες μορφές «δεσμευμένου» διοξειδίου του πυριτίου (bonded phase silica). Πάνω στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου. Στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι λιγότερο πολικός από την στατική φάση έχουμε τη χρωματογραφία κανονικής φάσης (Normal Phase Chromatography). Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης τα λιγότερο πολικά συστατικά αλληλοεπιδρούν και έτσι εκλούνται αργότερα από τα πολικά συστατικά του δείγματος. Ως εκλουστικά συστήματα χρησιμοποιούνται διάφορα υδατικά συστήματα, νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και μίγματα τους.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν το διαχωρισμό και την πιστότητα μιας στήλης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι το μέγεθος των κόκκων και το πορώδες του υλικού πληρώσεως. Η διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης μπορεί να βελτιωθεί μεταβάλλοντας τη διάμετρο των κόκκων του υλικού πληρώσεως, το μήκος της στήλης και αυξάνοντας ή μειώνοντας την ταχύτητα της κινητής φάσης.

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός δείγματος εξαρτάται από την κατανομή ενός συστατικού μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Επομένως η πολικότητα της στατικής φάσης, της κινητής φάσης και του ίδιου του δείγματος πρέπει να συνδυαστούν και να επιλεγούν κατάλληλα ώστε το κάθε συστατικό να κατανέμεται αποτελεσματικά μεταξύ των δύο φάσεων.

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία είναι :

- Ανιχνευτής υπεριώδους
- Ανιχνευτής φθορισμού
- Φασματοφωτόμετρο παράταξης διόδων υπεριώδους ορατού καθώς και ο

- Φασματογράφος μάζας

Συχνά είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση μια προστήλης η οποία είναι μικρότερη από την κανονική στήλη και τοποθετείται πριν από την κυρία στήλη και μετά από τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος. Οι προστήλες συνήθως έχουν σκοπό να προφυλάξουν την κυρίως στήλη από πιθανά συστατικά που παρεμποδίζουν την ανάλυση και επιβαρύνουν την κυρίως στήλη. Μπορούν όμως σε αρκετές περιπτώσεις να χρησιμοποιηθούν για καθαρισμό του δείγματος.

2.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

Όταν η ανάλυση ενός δείγματος γίνεται με σκοπό να προσδιοριστεί η ποσότητα ενός γεωργικού φαρμάκου που περιέχεται στο δείγμα τότε υπακούει στις αρχές της ποσοτικής αναλυτικής χημείας. Η ποσοτική ανάλυση προϋποθέτει ότι θα γίνει μέτρηση μιας χημικής ή φυσικής ιδιότητας της ουσίας που πρόκειται να προσδιορισθεί και αυτή η ιδιότητα είναι ανάλογη της ποσότητας της ουσίας που προσδιορίζεται. Στην περίπτωση αυτή η μέτρηση συσχετίζεται με την ποσότητα της ουσίας η οποία μπορεί με κατάλληλους υπολογισμούς να βρεθεί. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι όλη η διαδικασία της κατεργασίας του δείγματος και οι αντιδράσεις που γίνονται καθώς και οι συνθήκες μετρήσεως να είναι ίδιες για όλες τις μετρήσεις. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο έλεγχος της αξιοπιστίας της μεθόδου ιδιαίτερα στην ενόργανη ανάλυση με πρότυπα διαλύματα, καμπύλες αναφοράς καθώς και πειράματα ανακτήσεως.

A. Καμπύλες αναφοράς

Κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό μια ουσίας σε ένα άγνωστο δείγμα, μετρείται μια φυσικοχημική ιδιότητα (π.χ. απορρόφηση φωτός) στο άγνωστο δείγμα καθώς και σε άλλα δείγματα που περιέχουν την ίδια ουσία σε διάφορες γνωστές συγκεντρώσεις. Τα δείγματα αυτά τα οποία παρασκευάζονται ώστε να περιέχουν γνωστές συγκεντρώσεις της προς προσδιορισμό ουσίας ονομάζονται πρότυπα διαλύματα (standard solutions). Στη συνέχεια γίνεται γραφική απεικόνιση του σήματος R του οργάνου ως προς τη συγκέντρωση C της

ουσίας στα πρότυπα διαλύματα και λαμβάνεται η καμπύλη αναφοράς ή πρότυπη καμπύλη (calibration curve, standard curve). Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της ουσίας στο άγνωστο δείγμα από τη μέτρηση R του δείγματος.

Η σχέση τιμής R από τη συγκέντρωση C συνήθως είναι γραμμική και μας αποδίδεται με εξίσωση ευθείας: $R=aC + b$

Όπου a και b είναι σταθερές. Η σταθερά a είναι η κλίση της ευθείας και καθορίζει την ευαισθησία της μεθόδου. Η τιμή της σταθεράς b εξαρτάται από το ίδιο το όργανο καθώς και από το χημικό σύστημα.

Η τιμή της σταθεράς b προσδιορίζεται με μετρήσεις δειγμάτων στα οποία η συγκέντρωση της ουσίας είναι μηδέν. Τα δείγματα που έχουν $C=0$ ονομάζονται δείγματα αναφοράς ή μάρτυρες (reference sample, blank). Στην πράξη οι μετρήσεις συχνά γίνονται έχοντας μηδενίσει το όργανο με δείγματα αναφοράς. Στην περίπτωση αυτή είναι $b=0$, η προηγούμενη σχέση γίνεται $R=aC$ και η ευθεία διέρχεται από την αρχή των αξόνων.

Τα πρότυπα διαλύματα θα πρέπει να παρασκευάζονται και να κατεργάζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως τα άγνωστα δείγματα πριν γίνουν οι μετρήσεις. Θα πρέπει δηλαδή η χημική σύσταση των προτύπων να πλησιάζει τη σύσταση των αγνώστων δειγμάτων ώστε να εξουδετερώνεται η επίδραση του χημικού συστήματος στην τελική μέτρηση για τον προσδιορισμό της ουσίας.

B. Καμπύλη αναφοράς με τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης

Είναι πιθανό κάποια άλλα συστατικά του ίδιου του δείγματος ή τα αντιδραστήρια να επηρεάζουν τη μέτρηση του οργάνου R. Επιπλέον συχνά δεν είναι εύκολο να γνωρίζουμε τη σύσταση του δείγματος που αναλύεται, περίπτωση που συχνά αντιμετωπίζεται στις αναλύσεις για προσδιορισμό υπολειμμάτων φ.π. σε διάφορα προϊόντα. Στις περιπτώσεις αυτές ο ποσοτικός προσδιορισμός μιας ουσίας μπορεί να γίνει με τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης. Στην μέθοδο αυτή το ίδιο δείγμα χρησιμοποιείται για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων. Προστίθενται γνωστές ποσότητες της ουσίας που προσδιορίζεται (τουλάχιστο τρεις διαφορετικές στο ίδιο δείγμα ή σε μάρτυρα (δείγμα που δεν περιέχει ουσία) Μετράται η ανταπόκριση R του οργάνου για το δείγμα και για τα φορτισμένα με την ουσία δείγματα. Κατασκευάζεται γραφική παράσταση της μέτρησης R ως προς τη

συγκέντρωση C. Η άγνωστη συγκέντρωση Cx υπολογίζεται από το σημείο που η προέκταση της καμπύλης αναφοράς τέμνει τον άξονα των τετμημένων (ΣΧΗΜΑ). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται εφόσον η τιμή της ιδιότητας R που μετριέται είναι γραμμική συνάρτηση της συγκεντρώσεως. Έχει το πλεονέκτημα ότι το υπόστρωμα του δείγματος είναι σταθερό σε όλα τα δείγματα.

Γ. Καμπύλη αναφοράς με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου

Συχνά μπορεί να υπάρχουν διακυμάνσεις στις παραμέτρους λειτουργίας του οργάνου κατά τη διάρκεια των μετρήσεων (π.χ. λειτουργία αέριου χρωματογράφου) με συνέπεια οι μετρήσεις των δειγμάτων και των προτύπων να μη γίνονται ακριβώς με τις ίδιες συνθήκες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σφάλματα στις μετρήσεις. Αυτού του τύπου τα σφάλματα μπορούν να εξουδετερωθούν λαμβάνοντας την καμπύλη αναφοράς με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου.

Στη μέθοδο αυτή προσθέτουμε ορισμένη σταθερή ποσότητα μιας ουσίας A που χαρακτηρίζεται ως εσωτερικό πρότυπο σε όλα τα διαλύματα της ουσίας που προσδιορίζεται, πρότυπα και άγνωστα. Κατόπιν σε κάθε δείγμα λαμβάνονται δυο μετρήσεις, μια για το εσωτερικό πρότυπο RA και μια για το άγνωστο RX ή για το πρότυπο R_{πρ}. Από τις μετρήσεις αυτές κατασκευάζεται γραφική παράσταση του λόγου R_{πρ} / RA ως προς τη συγκέντρωση της C_{ΠΡ} της ουσίας. Τέλος από την τιμή του λόγου R_x/RA με τη βοήθεια της καμπύλης υπολογίζεται η συγκέντρωση CX στο άγνωστο δείγμα.

2.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σε κάθε χημική ανάλυση ο σκοπός είναι να προσδιοριστεί η ακριβής ποσότητα του συστατικού που περιέχεται στο δείγμα. Η μέτρηση αυτή γίνεται πάντοτε σε σύγκριση με τη μέτρηση ενός προτύπου δείγματος.

Ακρίβεια είναι η απόκλιση της μέτρησης από τη πραγματική τιμή. Μπορεί να εκφραστεί με τον όρο του σφάλματος. Σφάλμα είναι η διαφορά μεταξύ πραγματικής και μετρούμενης τιμής.

Επαναληψιμότητα είναι η παραλλακτικότητα που εμφανίζουν οι τιμές των μετρήσεων του ίδιου δείγματος. Μεγάλη διαφορά στις τιμές διαδοχικών αναλύσεων του ίδιου δείγματος σημαίνει μικρή επαναληψιμότητα. Καλή επαναληψιμότητα σε μια ανάλυση δεν σημαίνει απαραίτητα και μεγάλη ακρίβεια καθώς είναι πιθανό να συμβαίνει ένα συστηματικό σφάλμα στην ανάλυση όλων των δειγμάτων. Η επαναληψιμότητα εκφράζεται από την τυπική απόκλιση SD. Ο συντελεστής παρέκκλισης CV ή σχετική τυπική απόκλιση εκφράζει τη διασπορά των μετρήσεων. Ο βαθμός αβεβαιότητας για παρέκκλιση από το μέσο των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων καθορίζεται από τα όρια εμπιστοσύνης. Από την επαναληψιμότητα μιας μεθόδου μπορούν να εντοπιστούν τυχαία σφάλματα. Τα σφάλματα αυτά οφείλονται συνήθως σε όχι καλή τεχνική εργασίας από τον αναλυτή ή και στα ίδια τα όργανα. Η ακρίβεια εκφράζει σφάλματα συστηματικά και σφάλματα χονδρά, τα οποία απέχουν πολύ από την πραγματική τιμή. Τα συστηματικά σφάλματα μπορεί να οφείλονται κακή ή βιαστική χρήση των οργάνων ή και σε κάποια συστηματική παράλειψη κατά την εκτέλεση της ανάλυσης. Στην περίπτωση αυτή μπορεί μάλιστα να υπάρχει επαναληψιμότητα των μετρήσεων οι οποίες απέχουν πολύ από την πραγματική τιμή.

Η ευαισθησία μιας μεθόδου στον προσδιορισμό μια ουσίας ορίζεται από τη σχέση : $S = dR/dC$ όπου dR η μεταβολή της τιμής R που παρατηρείται όταν η συγκέντρωση C μεταβάλλεται κατά dC. Όσο μεγαλύτερη τιμή S τόσο μεγαλύτερη η ευαισθησία της μεθόδου. Με την ίδια σχέση εκφράζεται και η ευαισθησία ενός οργάνου ή ενός ανιχνευτή. Η ευαισθησία μιας μεθόδου εξαρτάται από το όργανο με το οποίο γίνονται οι μετρήσεις και από το χημικό σύστημα (δείγμα) στο οποίο γίνονται οι μετρήσεις.

Σε ένα ποσοτικό προσδιορισμό και ειδικότερα όταν πρόκειται για μικρές συγκεντρώσεις, είναι σημαντικό να καθορισθεί η μικρότερη ποσότητα της ουσίας η οποία μπορεί να προσδιορισθεί με τη μέθοδο. Ως όριο ανίχνευσης (Limit of Detection) ορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση μιας ουσίας σ' ένα δείγμα η οποία μπορεί να ανιχνευθεί ποιοτικά, αλλά όχι και να προσδιορισθεί ποσοτικά, υπό ορισμένες αναλυτικές συνθήκες της μεθόδου. Ποσότητες μιας ουσίας σε ένα δείγμα μικρότερες από το όριο ανίχνευσης δεν μπορούν να αναφερθούν με βεβαιότητα. Για παράδειγμα εάν είναι $LOD = 1 \mu g/Kg$ το αποτέλεσμα εκφράζεται ως «μη ανιχνεύσιμο στο όριο ανίχνευσης του $1 \mu g/Kg$ »

Το όριο ανίχνευσης μιας μεθόδου εξαρτάται από το δείγμα και από το όργανο στο οποίο γίνονται οι μετρήσεις καθώς σχετίζεται με το υπόβαθρο σήματος και με το θόρυβο σήματος. Υπόβαθρο σήματος ενός οργάνου είναι οι ενδείξεις του οργάνου όταν γίνονται μετρήσεις σε δείγματα αναφοράς και οφείλονται στα διάφορα συστατικά του δείγματος. Ο θόρυβος σήματος ενός οργάνου οφείλεται στα ηλεκτρονικά σήματα του οργάνου και είναι

οι απότομες μεταβολές των ενδείξεων. Στην πράξη το όριο ανίχνευσης θεωρείται η μικρότερη ποσότητα που δίνει ένδειξη R μεγαλύτερη ή ίση από το τριπλάσιο του θορύβου.

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of quantitation, LOQ), είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μιας ουσίας σε ένα δείγμα η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και βεβαιότητα. Στην πράξη το όριο ποσοτικού προσδιορισμού θεωρείται ότι είναι η μικρότερη ποσότητα που δίνει ένδειξη R μεγαλύτερη ή ίση από το δεκαπλάσιο του θορύβου

Στις αναλύσεις υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων το όριο ποσοτικού προσδιορισμού είναι η μικρότερη τιμή συγκέντρωσης του γεωργικού φαρμάκου που στο αναλυτικό δείγμα η οποία πληροί τις εξής 3 απαιτήσεις:

$$LOQ \geq 10 \cdot LOD$$

$$S \geq 0.70 \text{ (} S = \text{ευαισθησία ή ανάκτηση)}$$

$$CV < 0.2 \text{ (} CV = \text{συντελεστής παρέκλισης)}$$

Εάν σε κάποιο δείγμα η μέτρηση είναι μικρότερη από το LOQ αλλά μεγαλύτερη από το LOD τότε αναφέρεται ότι το γεωργικό φάρμακο δεν ανιχνεύεται. Ένα αποτέλεσμα το οποίο αναφέρεται δεν ανιχνεύεται πρέπει οπωσδήποτε να συνοδεύεται και από την τιμή LOD της αναλυτικής μεθόδου.

2.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Για τον προσδιορισμό των γεωργικών φαρμάκων με τη βοήθεια μιας από τις μεθόδους ανάλυσης είναι απαραίτητο καταρχήν να παραληφθεί όλη η ποσότητα του γεωργικού φαρμάκου, από το δείγμα μέσα στον κατάλληλο διαλύτη, αποφεύγοντας κάθε επιβάρυνση ή επιμόλυνση του δείγματος. Αυτό γίνεται εφικτό με την ομογενοποίηση του δείγματος παρουσία κατάλληλου διαλύτη (τεμαχισμός και σχηματισμός πολύ μικρών τεμαχιδίων) ώστε να δημιουργηθεί μεγάλη επιφάνεια που θα διευκολύνει τη διάλυση και τη παραλαβή του γεωργικού φαρμάκου από το διαλύτη. Στη συνέχεια τα στερεά υλικά απομακρύνονται με διήθηση υπο κενό και παραλαμβάνεται το εκχύλισμα το οποίο περιέχει το γεωργικό φάρμακο διαλυμένο στο διαλύτη και διάφορες άλλες ουσίες οι οποίες εκχυλίστηκαν ταυτόχρονα. Η εφαρμογή στη συνέχεια κάποια χρωματογραφικής μεθόδου

για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γεωργικού φαρμάκου απαιτεί το δείγμα να μην περιέχει άλλες ουσίες οι οποίες έχουν συνεκχυλισθεί από το αρχικό προϊόν και παρεμπόδιζαν τον τελικό προσδιορισμό. Για το λόγο αυτό απαιτείται να προηγηθεί ένα στάδιο καθαρισμού του δείγματος πριν από την ανάλυση. Η μέθοδος καθαρισμού που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από τη συγκέντρωση, τον αριθμό και τη χημική δομή των γεωργικών φαρμάκων στο δείγμα, από την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα της τελικής μεθόδου ανίχνευσης που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς και από το είδος του δείγματος-υποστρώματος που αναλύεται.

Μια μέθοδος και διαδικασία καθαρισμού ικανοποιητική για μια τάξη γεωργικών φαρμάκων δεν είναι οπωσδήποτε κατάλληλη για άλλες τάξεις ενώσεων. Για το λόγο αυτό κάθε μέθοδος καθαρισμού που εφαρμόζεται ελέγχεται με τη βοήθεια προτύπων διαλυμάτων για την ικανότητα ανάκτησης των γεωργικών φαρμάκων που ενδιαφέρουν για τον προσδιορισμό.

Η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για τον τελικό προσδιορισμό των γεωργικών φαρμάκων και ο ανιχνευτής που περιλαμβάνεται σ αυτήν καθορίζει επίσης τη μέθοδο καθαρισμού, καθώς η χρησιμοποίηση εκλεκτικών ανιχνευτών ειδικών για συγκεκριμένες τάξεις ενώσεων δεν απαιτούν επίπονες διαδικασίες καθαρισμού. Τα δείγματα στα οποία γίνεται συνήθως ανάλυση με σκοπό τον προσδιορισμό γεωργικών φαρμάκων ποικίλουν από πολύ απλής σύστασης όπως είναι τα δείγματα νερού ή αέρα έως περισσότερο σύνθετα όπως είναι δείγματα φρούτων, λαχανικών και τέλος δείγματα προϊόντων ζωικής προέλευσης με υψηλή περιεκτικότητα λιπών. Ανάλογα λοιπόν με το είδος του δείγματος ποικίλει και η διαδικασία καθαρισμού που απαιτείται πριν από τον τελικό προσδιορισμό των γεωργικών φαρμάκων. Σε δείγματα απλά όπως το νερό συνήθως μπορεί να γίνει κατ' ευθείαν μετά από το στάδιο της εκχύλισης ο προσδιορισμός των γεωργικών φαρμάκων. Αντίθετα σε δείγματα φυτικής ή ζωικής προέλευσης ακολουθούνται διαδικασίες καθαρισμού που χρησιμοποιούν κατάλληλα διάφορες διαχωριστικές τεχνικές ώστε να επιτύχουν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Βεβαία είναι προφανές ότι μια μέθοδος καθαρισμού κατάλληλη για ένα γεωργικό φάρμακο ή για μια τάξη γεωργικών φαρμάκων σε ένα είδος δείγματος δεν είναι απαραίτητα κατάλληλη να εφαρμοστεί για την ίδια τάξη γεωργικών φαρμάκων σε διαφορετικό είδος δείγματος.

Γενικά όποια μέθοδος καθαρισμού επιλεγεί, για να εφαρμοσθεί σε μια διαδικασία ανάλυσης θα πρέπει να ελεγχθεί εάν μετά την εφαρμογή της επιτυγχάνεται η ανάκτηση όλων των δραστικών ουσιών οι οποίες ενδιαφέρουν το σκοπό της ανάλυσης. Ο έλεγχος

αυτός θα γίνει με την εκτέλεση ανάλογων πειραμάτων ανάκτησης με τη βοήθεια πρότυπων ουσιών.

Στις αναλύσεις για τον προσδιορισμό γεωργικών φαρμάκων σε δείγματα διαφορετικής σύστασης τις περισσότερες φορές στόχος είναι να προσδιοριστεί ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών φαρμάκων με μία ανάλυση. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες μέθοδοι, γνωστές ως πολυυπολειμματικές. Στις μεθόδους αυτές συνήθως περιλαμβάνονται τρία κύρια στάδια καθαρισμού του δείγματος:

- Εκχύλιση των γεωργικών φαρμάκων από το δείγμα
- Κατανομή των γεωργικών φαρμάκων από το διαλύτη εκχύλισης σε ένα δεύτερο διαλύτη
- Καθαρισμός – απομάκρυνση των συνκχυλισθέντων συστατικών με έκλουση από στήλη χρωματογραφία και παραλαβή των γεωργικών φαρμάτων στο διαλύτη έκλουσης

2.8 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΤ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Το συγκεκριμένο kit έχει τη δυνατότητα γρήγορης ανίχνευσης οργανοφωσφορικών, θειοφωσφορικών και καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών ενώσεων στον αέρα, στο νερό, στο έδαφος και σε τρόφιμα.

ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα δείγματα με έντονο χρώμα ενδέχεται να δυσκολέψουν τη διαδικασία ανάγνωσης των θετικών αποτελεσμάτων.

Δείγματα με pH μεγαλύτερο του 8 ή χαμηλότερο του 3 μπορεί να δώσουν ψευδές αρνητικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα σε pH μεγαλύτερο το 8 τα φυτοφάρμακα διασπώνται ενώ σε pH χαμηλότερο του 3 το test δεν είναι ενεργό.

Κατά τη διάρκεια του test η θερμοκρασία των δεικτών χαρτιού θα πρέπει να κυμαίνεται από 33 μέχρι 37 °C . Το kit λειτουργεί και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αλλά η ευαισθησία μειώνεται.

Η χρήση του ethyl acetate ως διαλύτη εκχύλισης απαιτεί τη μετακίνηση του δισκίου αντίδρασης από τον αισθητήρα ανίχνευσης καθώς αναμένεται να αντιδράσει με τα πλαστικά μέρη.

Η χρήση της αμπούλας ενεργοποίησης είναι απαραίτητη ειδικά στη περίπτωση της ανίχνευσης των θειοφωσφορικών ενώσεων.

Ο υάλινος εξοπλισμός θα πρέπει να καθαρίζεται σχολαστικά πριν την επαναχρησιμοποίηση του για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΓΡΗΓΟΡΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΕΡΟΥ

- Τοποθετούμε 20 mL σε ένα ποτήρι ζέσεως των 50 mL που παρέχεται μαζί με το kit.
- Αδειάζουμε το περιεχόμενο της αμπούλας ενεργοποίησης και αφήνουμε να αντιδράσει για 3 λεπτά
- Τοποθετούμε το λευκό δισκίο εντός του διαλύματος και αφήνουμε να αντιδράσει για 1 λεπτό
- Στη συνέχεια φέρνουμε το δεύτερο δισκίο σε επαφή με το λευκό και τα διατηρούμε για σε επαφή για 3 λεπτά
- Η παραμονή λευκού χρώματος δείχνει την ύπαρξη φυτοφαρμάκου. Αλλαγή σε μπλέ χρώμα σημαίνει ότι δεν ανιχνεύονται υπολείμματα φυτοφαρμάκου με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

ΓΡΗΓΟΡΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

- Ομογενοποιούμε το δείγμα και παίρνουμε ποσότητα περίπου 20 γρ.
- Ζυγίζουμε ποσότητα νερού ίση με το βάρος του δείγματος και τα αναμιγνύουμε
- Περνάμε το μίγμα από ηθμό και παίρνουμε 20ml από το διήθημα

- Ρίχνουμε στο διήθημα την αμπούλα ενεργοποίησης και αφήνουμε να αντιδράσει για 3 λεπτά
- Τοποθετούμε το λευκό δισκίο εντός του διαλύματος και αφήνουμε να αντιδράσει για 1 λεπτό
- Στη συνέχεια φέρνουμε το δεύτερο δισκίο σε επαφή με το λευκό και τα διατηρούμε για σε επαφή για 3 λεπτά
- Η παραμονή λευκού χρώματος δείχνει την ύπαρξη φυτοφαρμάκου. Αλλαγή σε μπλέ χρώμα σημαίνει ότι δεν ανιχνεύονται υπολείμματα φυτοφαρμάκου με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Οι στόχοι του συγκεκριμένου εργαστηρίου είναι οι ακόλουθοι

3. Αναγνώριση κρίσιμης νομοθεσίας που σχετίζεται με τις μυκοτοξίνες
4. Κατανόηση της διαδικασίας δειγματοληψίας για εργαστηριακό έλεγχο μυκοτοξινών
5. Αγνώριση κρίσιμων παραμέτρων που αφορούν τις εργαστηριακές αναλύσεις για έλεγχο μυκοτοξικών
6. Εξοικίωση με την εφαρμογή μεθόδων ανίχνευση και ποσοτικού προσδιορισμού των μυκοτοξινών και ιδιαίτερα με την τεχνική της Ενζυματικής Ανοσοδιάγνωσης (ELISA)

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ

ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

- ☒ Σε ποιά στάδια παραγωγής ενός τροφίμου μπορούν να αναπτυχθούν οι μυκοτοξίνες και ποιοί παράγοντες επηρεάζουν την παραγωγή τους
- ☒ Ποιά τρία επίπεδα περιλαμβάνει η προστασία των καταναλωτών από τις μυκοτοξίνες
- ☒ Ποιός ο μηχανισμός δράσης των αφλατοξινών
- ☒ Τι προφυλάξεις πρέπει να λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, της προετοιμασίας, και της αποστολής των δειγμάτων για έλεγχο επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα
- ☒ Ποιά είναι τα κριτήρια για την αποδοχή ή την απόρριψη μιας παρτίδας μετά από έλεγχο επιπέδων μυκοτοξινών

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

 ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 401/2006 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 23ης Φεβρουαρίου 2006 για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα

☞ ΑΠΟΦΑΣΗ 2006/54 ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 12ης Ιουλίου 2006 σχετικά με τους ειδικούς όρους για ορισμένα τρόφιμα εισαγωγής από ορισμένες τρίτες χώρες λόγω του κινδύνου μόλυνσής τους από αφλατοξίνες

☞ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 19ης Δεκεμβρίου 2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα

☞ ΣΥΣΤΑΣΗ 2006/583/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 17ης Αυγούστου 2006 για την πρόληψη και τη μείωση των τοξινών από μύκητες του γένους *Fusarium* στα δημητριακά και τα προϊόντα δημητριακών

☞ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 629/2008 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 2ας Ιουλίου 2008 για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα

☞ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 882/2004 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 29ης Απριλίου 2004 για τη διενέργεια επισήμων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφόρων μυκήτων που ανήκουν κυρίως στα γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium* [Berry, 1988]. Οι μύκητες αυτοί μπορεί να είναι παθογόνοι ή απλά σαπροφυτικοί και συναντώνται σε διάφορα τρόφιμα (όπως καλαμπόκι, σιτηρά, δημητριακά, καφέ) και χυμούς φρούτων. Η ανάπτυξη των μυκήτων στις τροφές μπορεί να γίνει κατά το στάδιο της παραγωγής, της επεξεργασίας, της μεταφοράς ή της αποθήκευσης της τροφής. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα αλλά και την παραγωγή μυκοτοξινών είναι κυρίως η υγρασία, η θερμοκρασία, το pH της τροφής και η ανταγωνιστική δράση του μύκητα έναντι άλλων μικροβίων, βακτηριδίων, μυκήτων και γενικά έναντι άλλων μικροοργανισμών.

Οι αφλατοξίνες παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* [Berry, 1988]. Οι τριχοθηκίνες, μια άλλη κατηγορία μυκοτοξινών, παράγονται από είδη του μύκητα *Fusarium*. Η ζεαραλενόνη παράγεται κυρίως από το είδος *F. graminearum* ενώ οι οχρατοξίνες από το μύκητα *Aspergillus ochraceus* και είδη του *Penicillium*. Είδη του *Aspergillus* και του *Penicillium* μπορούν να παράγουν και άλλες μυκοτοξίνες όπως σιπρινίνη, η σιπρεοβριδίνη και το κυκλοπιαζονικό οξύ. Η ομάδα μυκοτοξινών που είναι γνωστές με το όνομα τρεμοργενείς μυκοτοξίνες, παράγονται από τους μύκητες *Penicillium*, *Aspergillus*, *Claviceps* και *Acremonium* [Selala, 1991].

Οι μυκοτοξίνες απαντώνται επίσης σε προϊόντα που παράγονται από ζώα τα οποία έχουν εκτραφεί με μολυσμένες από τις παραπάνω μυκοτοξίνες ζωοτροφές όπως τα αυγά, το γάλα και το κρέας. Η οικονομική ζημιά που προκαλούν είναι τεράστια, τόσο σε καταστροφή μεγάλων ποσοτήτων παραγόμενων προϊόντων όσο και σε απώλειες ζώων. Οι μυκοτοξίνες μπορούν να επιφέρουν πληθώρα χρόνιων ασθενειών, να επιδεινώσουν ήδη υπάρχουσες από τις οποίες υποφέρουν κυρίως τα ζώα ή ακόμα και να προκαλέσουν το θάνατο σε άνθρωπο και ζώα. Συγκεκριμένα οι αφλατοξίνες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε ζωτικά όργανα όπως είναι το ήπαρ, να προκαλέσουν μείωση της παραγωγής γάλατος στα θηλαστικά, μείωση της παραγωγής αυγών στα πτηνά τερατογεννήσεις, καρκίνο και θάνατο [Miller, 1981; Pasteiner, 1994]. Τα νεαρά ζώα είναι και τα πιο ευάλωτα στις τοξίνες αυτές, με κύριες επιπτώσεις τον αργό ρυθμό ανάπτυξης και την μεγάλη τους ευαισθησία στις διάφορες ασθένειες λόγω του εξασθενημένου ανοσοποιητικού τους συστήματος. Οι τριχοθηκίνες μπορούν να προκαλέσουν τοπικές νεκρώσεις, αιμορραγίες στον οισοφάγο και αλλοιώσεις στα αναπαραγωγικά όργανα. Ενδείξεις δηλητηρίασης στα

ζώα είναι συνήθως η απώλεια βάρους, η ανορεξία, η διάρροια, ο έμετος και τελικά ο θάνατος [Wyatt, 1975]. Οι οχρατοξίνες και κυρίως η οχρατοξίνη Α, προκαλούν βλάβες στα νεφρά ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις επιδρούν στο ήπαρ με φαινόμενα αιμορραγίας και τοπικών νεκρώσεων. Η ζεαραλενόνη είναι μια μυκοτοξίνη που σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να παρουσιάσει παρεμβολές στην αντίληψη των ζώων, αποβολές και μείωση της βιωσιμότητας των νεογνών [Sundlof, 1986; Richard, 1989]. Τερατογεννήσεις έχουν αναφερθεί για τις αφλατοξίνες, τις οχρατοξίνες, τη ζεαραλενόνη και τις τριχοθηκίνες. Οι τρεμοργενείς μυκοτοξίνες επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα με συμπτώματα όπως τρόμο, αστάθεια κινήσεων, αδυναμία στο βάδισμα, τα οποία μπορεί να συνοδεύονται από αιμορραγίες, διάρροια, άρνηση τροφής [Arg, 1981; Hocking, 1988].

Οι μυκοτοξικώσεις στον άνθρωπο είναι άμεσα συνδεδεμένες με μερικές από τις παραπάνω μυκοτοξίνες. Οι αφλατοξίνες είναι δυνητικά καρκινογόνες και στον άνθρωπο σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε πληθυσμούς της Αφρικής και της Ασίας. Πολλές από τις μελέτες αυτές αναφέρονται στο ρόλο των αφλατοξινών ή στη σχέση αφλατοξινών και ηπατίτιδας Β στην πρόκληση καρκίνου του ήπατος. Εξάλλου η αφλατοξίνη Β1 είναι η μόνη μυκοτοξίνη που έχει συμπεριληφθεί στην λίστα του IARC (International Agency for Research on Cancer) ως ουσία με καρκινογόνο δράση στον άνθρωπο.

Το κόστος ανίχνευσης και αντιμετώπισης των βλαβερών συνεπειών των μυκοτοξινών είναι μεγάλο. Έχουν εφαρμοστεί διάφοροι μέθοδοι αντιμετώπισης του προβλήματος άλλοτε με μικρότερη και άλλοτε με μεγαλύτερη επιτυχία. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν το φυσικό διαχωρισμό των μυκοτοξινών (απομόνωση), τη θερμική διάσπαση αυτών, τη αδρανοποίηση τους με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας ή χημικών μέσων, τη χρήση προσροφητικών και συντηρητικών ουσιών σαν πρόσθετα στις τροφές. Ο σχεδιασμός της προστασίας των καταναλωτών από την τοξική δράση των μυκοτοξινών περιλαμβάνει τρία επίπεδα. Το πρώτο επίπεδο αφορά στρατηγικές πρόληψης της πρωτογενούς μόλυνσης των τροφών, δηλαδή στον τόπο παραγωγής τους. Το δεύτερο επίπεδο περιλαμβάνει τεχνικές ανίχνευσης των αφλατοξινών στα διάφορα γεωργικά και κτηνοτροφικά προϊόντα, πριν αλλά και μετά την προώθηση των προϊόντων αυτών στο εμπόριο. Στο τελευταίο επίπεδο το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην αντιμετώπιση των μυκοτοξινών με ουσίες που είτε αναστέλλουν την ανάπτυξη των μυκήτων είτε παρεμβαίνουν στο μεταβολισμό των μυκήτων και εμποδίζουν την παραγωγή των μυκοτοξινών.

3.2 Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

3.2.1 ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Η μόλυνση στα ακατέργαστα τρόφιμα μπορεί να προέλθει κατά την παραγωγή και την ωρίμανση των προϊόντων στους αγρούς, πριν ή μετά την συγκομιδή τους, κατά τη συλλογή και την αποθήκευση των προϊόντων. Μεγάλη παραγωγή τοξινών έχει παρατηρηθεί όταν η αποθήκευση των τροφίμων γίνεται σε ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του μύκητα χωρίς αναγκαστικά να υπάρχει μόλυνση πριν από αυτή την περίοδο. Οι ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του μύκητα είναι υψηλή θερμοκρασία, υψηλό ποσοστό υγρασίας και ελλιπής αερισμός των χώρων αποθήκευσης. Για το λόγο αυτό η αποθήκευση των τροφών πρέπει να γίνεται σε χώρους ξηρούς, με καλό αερισμό και σχετικά χαμηλή θερμοκρασία.

Πίνακας 3.1: Τρόφες στις οποίες συχνότερα απαντώνται οι μυκοτοξίνες

Τοξίνη	Τρόφιμα
Αφλατοξίνες	Καλαμπόκι, σιτηρά, ρύζι, καρύδια, γάλα, αυγά, τυρί, φιστίκια
Σιτρινίνη	Κριθάρι, Βρώμη, Καλαμπόκι
Οχρατοξίνες	Κριθάρι, Βρώμη, Καλαμπόκι, Καφές, Ξηρά φασόλια, φυστίκια
Πατουλίνη	Μήλα
Ζεαραλενόνη	Καλαμπόκι, Κριθάρι

Συγκεκριμένα οι αφλατοξίνες βρέθηκε ότι σε μερικές περιπτώσεις μολύνουν τους καρπούς σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις με κυρίως ύποπτα τρόφιμα το καλαμπόκι, φιστίκια, καρύδια κ.α. Μόλυνση από αφλατοξίνες είναι γνωστό ότι απαντάται και σε πολλά άλλα τρόφιμα, αλλά με λιγότερο κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων λόγω της μικρής και περιστασιακής κατανάλωσης αυτών, όπως για παράδειγμα τα σύκα, τα αμύγδαλα, οι σταφίδες, τα μπαχαρικά. Σόγια, φασόλια, βρώμη, ρύζι, σιτάρι είναι από τα προϊόντα που δείχνουν να “αντιστέκονται” και να μην μολύνονται συχνά από αφλατοξίνες

στους αγρούς [Berg 1995]. Φυσικά πρέπει να γίνεται πάντα ο έλεγχος και για τις άλλες μυκοτοξίνες εκτός από τις αφλατοξίνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό του 1983 στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής όπου εξετάστηκαν 27 δείγματα καλαμποκιού. Από αυτά 17 δείγματα (ποσοστό 63%) ήταν θετικά σε ζεαραλενόνη με επίπεδα από 12 έως 1373 ng/kg. Το 1984, 4 στα 53 δείγματα (7.5%) καλαμποκιού βρέθηκαν να περιέχουν οχρατοξίνη Α σε συγκεντρώσεις 10-25 ng/kg [Richard, 1989]. Η δεοξυνιβαλενόλη (deoxynivalenol) βρέθηκε σε επίπεδα μεγαλύτερα από 1000 ng/kg σε δείγματα καλαμποκιού και σιταριού που προέρχονταν από τις Ηνωμένες Πολιτείες και από τον Καναδά ειδικά όταν αυτά προέρχονταν από περιοχές με υγρό κλίμα ή από περιοχές όπου στην περίοδο συγκομιδής η θερμοκρασία ήταν αρκετά υψηλή. Μικρότερες ποσότητες δεοξυνιβαλενόλης βρέθηκαν στο ρύζι και στο κριθάρι. Η σιτρινίνη παράγεται από είδη του *Aspergillus* και *Penicillium* συχνά μαζί με τις αφλατοξίνες και έχει αναφερθεί ότι μολύνει φιστίκια, τομάτες, καλαμπόκι, κριθάρι και άλλα δημητριακά [Richard, 1989].

3.2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Οι περισσότερες πληροφορίες που υπάρχουν για μυκοτοξίνες σε επεξεργασμένα τρόφιμα αναφέρονται κυρίως στις αφλατοξίνες ενώ για τις άλλες κατηγορίες μυκοτοξινών τα δεδομένα είναι περιορισμένα. Φυσικά υπάρχουν γεωγραφικές ζώνες όπου το πρόβλημα με τις άλλες κατηγορίες μυκοτοξινών είναι πιο διαδεδομένο. Έτσι για παράδειγμα στις ευρωπαϊκές και κυρίως στις βαλκανικές χώρες η μόλυνση των τροφών με οχρατοξίνες είναι πολύ πιο διαδεδομένη από ότι με αφλατοξίνες. Καθότι έχει παρατηρηθεί μεγάλη μόλυνση από μυκοτοξίνες σε κάποια ακατέργαστα προϊόντα όπως καλαμπόκι, φιστίκια και γάλα είναι φυσικό να δίνεται μεγαλύτερη προσοχή στα επεξεργασμένα παράγωγα αυτών. Η δεοξυνιβαλενόλη μολύνει το σιτάρι πριν την συγκομιδή, έτσι επεξεργασμένα προϊόντα του σιταριού όπως ψωμί, παιδικές τροφές, δημητριακά για πρωινό, ζυμαρικά, κ.α. έχουν βρεθεί να είναι μολυσμένα από την τοξίνη αυτή. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με την σιτρινίνη, τις αφλατοξίνες ή τις οχρατοξίνες [Jelinek, 1989].

Όσο αφορά τα φρούτα και τα λαχανικά έχει κυρίως παρατηρηθεί μόλυνση από μυκοτοξίνες στα μήλα, στις τομάτες και στα παράγωγα επεξεργασμένα προϊόντα αυτών (π.χ. χυμοί). Η αφλατοξίνη M1, η οποία είναι βιομεταβολίτης της αφλατοξίνης B1, μπορεί να μολύνει προϊόντα όπως γάλα, γάλα σε σκόνη, τυρί, γιαούρτι [Berg 1995]. Στο κρέας οι μυκοτοξίνες μπορεί να βρεθούν είτε λόγω της μολυσμένης τροφής με την οποία

εκτρέφονται τα ζώα είτε σαν αποτέλεσμα ανάπτυξης μύκητα και παραγωγής μυκοτοξινών σε ήδη επεξεργασμένα προϊόντα όπως τα αλλαντικά. Η οχρατοξίνη Α είναι τοξίνη που εμφανίζεται συχνά σε χοιρινά και βοοειδή κρέατα. Οι αφλατοξίνες έχουν απομονωθεί σε ιστούς και ζωτικά όργανα ανθρώπων που τρέφονταν με μολυσμένη τροφή [Siraj, 1981]. Φυσικά η εμφάνιση μυκοτοξινών στις επεξεργασμένες τροφές εξαρτάται και από την διαδικασία επεξεργασίας των συγκεκριμένων τροφών που ακολουθείται. Οι συνθήκες επεξεργασίας μπορούν να επιδράσουν στην παραγωγή μυκοτοξινών αλλά και στην σταθερότητα αυτών σαν χημικές ενώσεις. Για παράδειγμα οι αφλατοξίνες είναι ασταθείς σε διαδικασίες επεξεργασίας που περιλαμβάνουν αλκαλικά ή όξινα στάδια. Η δεοξυνιβαλενόλη είναι σταθερή στην διαδικασία ψησίματος του ψωμιού (δηλ. σε υψηλές θερμοκρασίες), μια διαδικασία όμως που πιθανώς καταστρέφει σε κάποιο ποσοστό τις αφλατοξίνες. Η οχρατοξίνη Α δείχνει σταθερή στις περισσότερες ήπιες διαδικασίες επεξεργασίας προϊόντων [Doyle, 1982].

3.3 ΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ Η ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Ο άνθρωπος μπορεί να επιβαρυνθεί με μυκοτοξίνες από μολυσμένη με μύκητες τροφή με αποτελέσματα που μπορεί να είναι οξεία τοξίκωση ή χρόνιες ασθένειες. Οι πιο επιβλαβείς επιδράσεις είναι καρκίνος στο ήπαρ μετά από μακρόχρονη κατανάλωση αφλατοξινών σε μικρές δόσεις ή θάνατος ως αποτέλεσμα οξείας δηλητηρίασης. Από τις αρχαιότερες αναφερθείσες παθολογικές καταστάσεις του ανθρώπου είναι ο εργοτισμός που οφείλεται στην επίδραση ergot alkaloids μυκοτοξινών που παράγονται από τους μύκητες *C. purpurea*, *C. Paspali* και *C. fusiformis*. Η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από νευρικές διαταραχές, αδυναμία, πυρετό, ναυτία, έμετο, διάρροια, παράλυση των άκρων και τελικά γάγγραινα. Οι μύκητες *C. purpurea*, *C. Paspali* και *C. fusiformis* εμφανίζονται πολύ συχνά στην σίκαλη και στο κριθάρι. Ο εργοτισμός ευθύνεται για τον θάνατο χιλιάδων ατόμων την περίοδο του Μεσαίωνα, ενώ μπορεί να εκδηλωθεί και στα ζώα με γάγγραινα ή νευρικά συμπτώματα [Χριστοδούλου, 1975]. Επεισόδια γάγγραινας έχουν περιγραφεί με συμπτώματα όπως πρησμένα άκρα με φαινόμενα ερεθισμού και νεκρώσεις των άκρων που συχνά οδηγούν σε ακρωτηριασμούς. Φυσικά υπάρχει μεγάλος κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία αφού οι τροφές που μολύνονται περισσότερο τυγχάνουν ευρείας κατανάλωσης από τον άνθρωπο. Στην Αφρική έχουν αναφερθεί 93 κρούσματα της

ασθένειας σε περίπτωση όπου καταναλώθηκε μολυσμένη τροφή από τον μύκητα *C. purpurea* και 78 κρούσματα στην Ινδία σε περίπτωση μόλυνσης των τροφών από το μύκητα *C. fusiformis* [Demeke, 1979; Krishnamachari, 1976]. Τα ζώα που τρέφονται με μολυσμένη τροφή από τις ίδιες μυκοτοξίνες εμφανίστηκαν συμπτώματα χωλότητας και νέκρωσης της ουράς, των ποδιών και των αυτιών. Επίσης παρατηρήθηκαν νευρικά συμπτώματα, αταξία, παράλυση κ.α. Άλλες επιπτώσεις της ασθένειας αυτής ήταν η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης στα ζώα, μείωση παραγωγής γάλατος μέχρι και πλήρης αγαλακτία.

Μια άλλη παθολογική κατάσταση που εμφανίστηκε στην Ασία είναι γνωστή με το όνομα *beri-beri* και προέρχεται από κατανάλωση μολυσμένου ρυζιού. Η σιτρεοβιριδίνη είναι η μυκοτοξίνη που σχετίζεται με την ασθένεια αυτή. Η σιτρεοβιριδίνη μπορεί επίσης να προκαλέσει δύσπνοια, παράλυση και τύφλωση.

Στον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, η αλευκία, μια ασθένεια που προέρχεται από τον μύκητα *Fusarium* στοίχισε την ζωή σε πολλούς ανθρώπους (τροφική τοξική αλευκία) και ζώα (σταχυοβοτριοτοξίκωση των ιπποειδών) [Χριστοδούλου, 1975]. Στην πρώην Σοβιετική Ένωση, κατά την διάρκεια του Β' Παγκοσμίου πολέμου ο θερισμός των σπαρτών άργησε να γίνει με αποτέλεσμα ο συνδυασμός του υγρού κλίματος και της υψηλής θερμοκρασίας να ευνοήσουν την ανάπτυξη του μύκητα *F. sporotrichoides* και την παραγωγή μυκοτοξινών.

Η Βαλκανική νεφροπάθεια μια ασθένεια που εμφανίζεται στους ανθρώπους που ζουν κοντά σε ποτάμια στην Γιουγκοσλαβία, στην Βουλγαρία και στην Ρουμανία φαίνεται να έχει άμεση σχέση με την οχρατοξίνη Α. Επίσης έχει βρεθεί άμεση σχέση των μυκοτοξινών με καρκίνο του ήπατος μετά από μελέτες που έγιναν κυρίως σε χώρες όπως η Αφρική, η Α. Ασία, οι Ινδίες και οι Φιλιππίνες όπου το πρόβλημα είναι πιο διαδεδομένο.

3.4 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

3.4.1 Συνοπτική παρουσίαση αφλατοξινών

Οι αφλατοξίνες (aflatoxins) αποτελούν μια ομάδα από τις πιο τοξικές ουσίες που βρίσκονται στη φύση. Οι ισχυρότατα τοξικές και καρκινογόνες αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες (μούχλα), που αναπτύσσονται κυρίως σε ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα στα αράπικα φυστίκια και αμύγδαλα), μπαχαρικά, σιτηρά και σε τυριά, όταν υπάρξουν

κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Επίσης μπορεί να εμφανισθούν στο γάλα ζώων που έχουν τραφεί με ζωοτροφές (καλαμπόκι κ.λπ.), στα οποία είχαν αναπτυχθεί μύκητες (ευρωτίαση, μούχλα). Έκθεση του ανθρώπου και των ζώων σε μύκητες (ευρώτας, μούχλα) μπορεί να οδηγήσει σε μυκοτοξίκωση (mycotoxicosis), μια παθολογική κατάσταση που μπορεί να εκδηλωθεί με μια μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων.

Η μεγάλη ποικιλία των συμπτωμάτων καθιστά δύσκολη τη διάγνωση της μυκοτοξίκωσης, τα αίτια της οποίας είναι μια ομάδα εξαιρετικά τοξικών ουσιών που είναι γνωστές ως μυκοτοξίνες (mycotoxins). Πολλά γεωργικά προϊόντα σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας προσβάλλονται εύκολα από ομάδες μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες. Οι αφλατοξίνες είναι οι πιο κοινές μυκοτοξίνες, που βρίσκονται συχνά σε γεωργικά προϊόντα. Η μυκοτοξίκωση που οφείλεται ειδικά στις αφλατοξίνες αναφέρεται συνήθως ως αφλατοξίκωση (aflatoxicosis).

Οι αφλατοξίνες παράγονται από τους μύκητες *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* και *Aspergillus nomius*, οι οποίοι αναπτύσσονται κυρίως σε ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα τα αράπικα φυστίκια, αμύγδαλα), μπαχαρικά, σιτηρά και σε τυριά κάτω από κατάλληλες συνθήκες υγρασίας (πάνω από 7-10%) και θερμοκρασίας. Επίσης, εμφανίζονται στο γάλα ζώων που έχουν τραφεί με ζωοτροφές (καλαμπόκι κ.λπ.) που είχαν μύκητες.

Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά τοξικές, καρκινογόνοι, μεταλλαξιγόνοι και ανοσοκατασταλτικές ουσίες. Η αφλατοξίνη B1 θεωρείται ως το ισχυρότερο γνωστό καρκινογόνο του ήπατος με αποδεδειγμένη γονοτοξικότητα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η καρκινογόνος δράση του είναι περίπου 1000 φορές ισχυρότερη του βενζοπυρενίου, ενός πολυκυρηνικού υδρογονάνθρακα που αποτελεί το δραστικότερο μεταλλαξιγόνο συστατικό του καπνού των τσιγάρων.

Το πρόβλημα των αφλατοξινών αναγνωρίσθηκε ως σημαντικό διατροφικό πρόβλημα όταν το 1960 προκλήθηκε σοβαρή ασθένεια (νέκρωση του ήπατος) στα πουλερικά και κυρίως στις γαλοπούλες (turkeys) στη Μ. Βρετανία, από την οποία πέθαναν περίπου 100.000 πτηνά. Αρχικά, τα αίτια αυτής της περίεργης ασθένειας ήταν άγνωστα και έτσι η ασθένεια ονομάστηκε "Turkey 'X' disease". Αργότερα διαπιστώθηκε ότι η αιτία ήταν η ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus flavus* στις πτηνοτροφές, από τον οποίο πήραν και το όνομα οι αφλατοξίνες (A. fla. toxin). Από τότε, το πρόβλημα της παρουσίας των αφλατοξινών στα τρόφιμα και σε ζωοτροφές θεωρείται πολύ σημαντικό και έχουν καθιερωθεί συστηματικοί έλεγχοι και ανώτατα όρια στα διάφορα τρόφιμα.

Οι αφλατοξίνες προκαλούν σημαντική ετήσια ζημιά στη γεωργική παραγωγή ορισμένων προϊόντων. Σύμφωνα με τον FAO (Food Agricultural Organization) το 25% (σε παγκόσμια κλίμακα) των φυτικών γεωργικών προϊόντων παρουσιάζουν μολύνσεις από μυκοτοξίνες. Στις ΗΠΑ, οι μολύνσεις των γεωργικών προϊόντων με αφλατοξίνες κοστίζουν ετησίως στους παραγωγούς περίπου 100 εκατομμύρια δολάρια, ενώ μόνο από τις αφλατοξίνες στα αράπικα φυστίκια, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις ΗΠΑ για την παρασκευή φυστικοβούτυρου (peanut butter), το ετήσιο κόστος είναι περίπου 26 εκατομμύρια δολάρια.

Συνοπτικά, ο μηχανισμός της τοξικής δράσης των αφλατοξινών έχει ως εξής: Οι αφλατοξίνες στον οργανισμό με την επίδραση των ενζύμων της ομάδας του κυτοχρώματος P450 μεταβολίζονται στο ήπαρ προς διάφορα προϊόντα μεταξύ των οποίων βρίσκεται και μια εποξειδική ένωση. Ο μεταβολίτης αυτός σχηματίζει ένωση προσθήκης (adduct) με τη γουανίνη (G) του DNA και του RNA, γεγονός που οδηγεί σε αποπουρίνωση και θραύση της αλυσίδας των νουκλεϊνικών οξέων με αποτέλεσμα να διακοπεί η σύνθεση απαραίτητων πρωτεϊνών και DNA σε ιστούς ζωτικών οργάνων, όπως στο ήπαρ, στα έντερα και στον μυελό των οστών. Η επικινδυνότητα των αφλατοξινών αυξάνεται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από ηπατικές νόσους. Έρευνες έδειξαν ότι κατά τη μόλυνση με τον ιό ηπατίτιδας (Hepatitis B virus, HBV), η έκθεση σε αφλατοξίνες αυξάνει τον κίνδυνο για ηπατοκυτταρικό καρκίνο (hepatocellular carcinoma, HCC)

3.4.2 ΟΞΕΙΕΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΟΣΕΙΣ

Περιστατικά οξείας αφλατοξίκωσης στον άνθρωπο έχουν αναφερθεί στο παρελθόν σε διάφορες χώρες όπως η Ταϊβάν και η Ουγκάντα. Χαρακτηριστικά συμπτώματα ήταν έμετος, πνευμονικό οίδημα, λιπώδης διήθηση και νέκρωση του ήπατος. Ένα άλλο περιστατικό που καταγράφηκε στην Ινδία το 1974 σε περιόδους ξηρασίας και έλλειψης τροφής και μετά από κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων είχε σαν αποτέλεσμα ευρεία οξεία τοξίκωση σε περιοχή που περιελάμβανε 200 χωριά. Μεγάλος αριθμός ασθενών (994 ασθενείς) εξετάστηκαν και 97 περιπτώσεις ήταν θανατηφόρες με κύρια συμπτώματα εσωτερικές αιμορραγίες (γαστρορραγίες) [Pasteiner, 1994].

Στην Ταϊλάνδη μια ασθένεια παιδιών εμφανίστηκε στο παρελθόν (1971) με συμπτώματα παρόμοια με αυτά του συνδρόμου Reye και συνδέθηκε με αφλατοξίκωση

[Shank, 1971]. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από έμετο, κώμα, λιπώδες ήπαρ, νεφρά και καρδιά, σπασμούς και τελικά θάνατο, συνέπεια εγκεφαλικού οιδήματος. Η αιτία της ασθένειας αποδόθηκε σε αφλατοξίνες επειδή το σύνδρομο του Reye στον άνθρωπο έχει συμπτώματα όμοια με αυτά που προκαλούν οι αφλατοξίνες σε πειραματόζωα (πίθηκους) στο εργαστήριο. Μια περίπτωση κατανάλωσης μολυσμένου ρυζιού στην Ταϊβάν κατέληξε σε θανατηφόρο επεισόδιο με συμπτώματα όμοια με αυτά του συνδρόμου Reye και συνδέθηκε με την παρουσία μυκοτοξινών. Μετά από εξέταση του ύποπτου δείγματος ρυζιού βρέθηκε ότι είχε μολυνθεί από το μύκητα *Aspergillus clavatus*.

3.4.3 ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΩΣΕΙΣ

Επειδή οι αφλατοξίνες και ειδικά η αφλατοξίνη B1, είναι ισχυρά καρκινογόνες, υπάρχει ενδιαφέρον για τις επιπτώσεις που επιφέρουν μετά από μακροχρόνια χρήση σε χαμηλές συγκεντρώσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Μόνο η αφλατοξίνη B1 και η στεριγματοκυστίνη θεωρούνται προς το παρόν από το IARC (International Agency for Research on Cancer) ότι έχουν καρκινογόνες επιδράσεις στα ζώα και μόνο η αφλατοξίνη B1 έχει καταταγεί σαν ένας πιθανός παράγοντας καρκινογένεσης στον άνθρωπο. Οι αφλατοξίνες είναι από τις λίγες μυκοτοξίνες που έχουν μελετηθεί ευρέως με συμπεράσματα για τις επιδράσεις τους στον άνθρωπο.

Αν και οι αφλατοξίνες έχουν καταταγεί στα δυνητικά καρκινογόνα για τον άνθρωπο (καρκινογένεση του ήπατος (LCC)) υπάρχουν ακόμα ερωτήματα για την περαιτέρω δράση και τις επιπτώσεις τους. Τα ερωτήματα θα πρέπει να απαντηθούν με πειράματα αξιολόγησης σε πειραματόζωα και από δεδομένα διαφόρων τυχαίων περιστατικών δηλητηριάσεων με ανθρώπινα θύματα. Επιπλέον η έκθεση σε αφλατοξίνες έχει διαφορετικές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, τις διατροφικές συνήθειες, την βιολογική κατάσταση του οργανισμού κ.α. Σε μελέτες με πειραματόζωα έχει διαπιστωθεί ότι οι πίθηκοι είναι πιο ανθεκτικοί στις καρκινογόνες επιπτώσεις των αφλατοξινών σε σχέση με τους αρουραίους. Ίσως κάτι ανάλογο να συμβαίνει και με τον άνθρωπο.

Ο καρκίνος του ήπατος είναι ένας από τους κύριους παράγοντες θνησιμότητας στην Ασία και στην Αφρική. Για παράδειγμα στην Κίνα καταγράφονται περίπου 100.000 θάνατοι ανά χρόνο και είναι ο τρίτος παράγοντας θνησιμότητας από καρκίνο [Armstrong, 1980]. Τα

ποσοστά του καρκίνου του ήπατος στον ανθρώπινο πληθυσμό ποικίλουν από χώρα σε χώρα με υψηλότερα ποσοστά στα μέρη όπου οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων στις τροφές και κατά συνέπεια την παραγωγή αφλατοξινών. Πολλές επιδημιολογικές μελέτες είναι σε εξέλιξη για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με την σχέση αφλατοξινών και καρκίνου του ήπατος.

Οι παραπάνω πληροφορίες δίνουν μια ώθηση για παραπέρα έρευνα πάνω στη σχέση αφλατοξίνης και LCC. Επίσης η πιθανή συνέργια αφλατοξινών και ηπατίτιδας Β (HBV) στην εκδήλωση καρκίνου του ήπατος θα πρέπει να ελεγχθεί. Πολλά ερωτήματα είναι ακόμα αναπάντητα. Στην περιοχή της Μονζαβίκης όπου τα επίπεδα των αφλατοξινών στα τρόφιμα είναι πολύ υψηλά μόνο μια μικρή ομάδα πληθυσμού έχουν υψηλό ποσοστό σε LCC. Στην Ταϊβάν, ασθένειες και υψηλή θνησιμότητα από αφλατοξίνες έχουν καταγραφεί και έχουν συσχετιστεί με υψηλές, σχεδόν θανατηφόρες δόσεις αφλατοξινών. Αντίθετα στους Εσκιμώους από χωριά της Αλάσκας έχουμε υψηλά ποσοστά καρκίνου του ήπατος παρόλο που τα επίπεδα αφλατοξίνης στη τροφή τους είναι πολύ χαμηλά (το ψυχρό περιβάλλον δεν ευνοεί την ανάπτυξη μυκήτων). Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ καρκίνου του ήπατος και ηπατίτιδας στον παραπάνω πληθυσμό [Stoloff, 1983].

3.5 ΟΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ

Οι οχρατοξίνες ανακαλύφθηκαν στην Νότια Αφρική από επιστήμονες που ερευνούσαν για τοξινογενείς μύκητες. Αρχικά απομονώθηκε η οχρατοξίνη Α (σχήμα II.9) που παράγεται από τον μύκητα *A. ochraceus* και ακολούθησε η απομόνωση και η ταυτοποίηση της οχρατοξίνης Β και της οχρατοξίνης C με τους μεθυλ και αιθυλ εστέρες τους (σχήμα II.9 και II.10). Οι οχρατοξίνες Α και Β είναι και οι κυριότερες εκπρόσωποι της συγκεκριμένης ομάδας με πιο τοξική και επικίνδυνη την πρώτη. Χημικά οι οχρατοξίνες είναι ενώσεις ενός τμήματος 3,4-διυδρο-3-μεθυλισοκουμαρίνης μέσω μιας 7- καρβόξυ ομάδας σε μια L-b-φαινυλαλανίνη με ένα αμινοδεσμό [Cole, 1981].

Οι οχρατοξίνες παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium viridicatum* αλλά και από τους μύκητες *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. ostianus*, *A. alliaceus*, *P. cyclopium*, *P. commune*, *P. variable*, *P. palitans* και *P. purpureus*. Οι παραπάνω μύκητες μπορούν να δίνουν και άλλες μυκοτοξίνες όπως

π.χ. σιτρινίνη και πενισιλλικό οξύ με πιθανή συνέργια αυτών με τις οχρατοξίνες που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τοξικότητας τους [Cole, 1981].

Οι οχρατοξίνες παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium viridicatum* αλλά και από τους μύκητες *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. ostianus*, *A. alliaceus*, *P. cyclospium*, *P. commune*, *P. variable*, *P. palitans* και *P. purpurescens*. Οι παραπάνω μύκητες μπορούν να δίνουν και άλλες μυκοτοξίνες όπως π.χ. σιτρινίνη και πενισιλλικό οξύ με πιθανή συνέργια αυτών με τις οχρατοξίνες που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τοξικότητας τους [Cole, 1981].

3.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

3.6.1 ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΟΣΟΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η ενζυματική ανοσοδιάγνωση που μερικές φορές ονομάζεται και enzyme linked immunoassay ή ELISA, συνδυάζει την εξειδίκευση και την ευαισθησία στις μετρήσεις. Η αρχή λειτουργίας της ELISA είναι βασισμένη σε μια αρκετά ευαίσθητη αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος.

Η χρήση της ELISA για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών είναι πολύ διαδεδομένη. Χρησιμοποιείται συνήθως για τον μέτρηση των αφλατοξινών και κυρίως για την αφλατοξίνη B1. Είναι μια αρκετά γρήγορη, ευαίσθητη, και εύκολη στην χρήση τεχνική, ειδική για γρήγορο και αξιόπιστο έλεγχο των δειγμάτων (τροφών και ειδικότερα ζωοτροφών) και αυτό γιατί σε κάθε διαδικασία μπορεί να ελεγχθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων.

Η μέτρηση γίνεται συνήθως στα 450 nm. Η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να φτάσει μέχρι τα 0.055 ng/ml (ppb) σε διάλυμα και 0.5 ng/kg (ppt) σε τροφές για την αφλατοξίνη B1. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των τοξινών γίνεται προσθετικά. Επίσης σε αρκετές περιπτώσεις δίνει ψευδώς θετικές αντιδράσεις που οφείλονται σε συστατικά των τροφίμων, όπως στην περίπτωση του καφέ και μερικών αποξηραμένων φρούτων.

3.6.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ποικίλες χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό, τον καθαρισμό και την ανίχνευση των μυκοτοξινών [Betina, 1989]. Από την δεκαετία του '60, οι πρώτες χρωματογραφικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η χρωματογραφία στήλης (LCC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), οι οποίες εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται, άλλες με λιγότερη και άλλες με περισσότερη επιτυχία μέχρι σήμερα, ενώ η αέριος χρωματογραφία (GC) και περισσότερο η αέριος χρωματογραφία σε συνδυασμό με χρωματογραφία μάζας (GC/MS) έγινε περισσότερο γνωστή στο πεδίο των μυκοτοξινών στις αρχές της δεκαετίας του '80. Σήμερα για καλύτερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα στην ανίχνευση, στον ποσοτικό προσδιορισμό αλλά και την εξακρίβωση της χημικής δομής των μυκοτοξινών χρησιμοποιείται συνδυασμός των παραπάνω τεχνικών.

3.7 ΑΡΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Σε κάθε περίπτωση κατά τη διαδικασία δειγματοληψίας και έλεγχου ανίχνευσης μυκοτοξινών ισχύουν οι αρχές που αναφέρονται στις διατάξεις του κανονισμού ΕΚ αριθ. 882/2004.

3.7.1 ΣΚΟΠΟΣ, ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΦΗΣ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΜΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Τα δείγματα που προορίζονται για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των μυκοτοξινών στα τρόφιμα λαμβάνονται σύμφωνα με τις μεθόδους που καθορίζονται στη συνέχεια. Τα συνολικά δείγματα που λαμβάνονται κατ' αυτόν τον τρόπο θεωρούνται ως αντιπροσωπευτικά των παρτίδων. Η συμμόρφωση όσον αφορά τα ανώτατα όρια που καθορίζονται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 466/2001 προσδιορίζεται βάσει των επιπέδων που διαπιστώνονται στα εργαστηριακά δείγματα.

Οι ακόλουθοι ορισμοί θα μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε τη συγκεκριμένη διαδικασία δειγματοληψίας :

- «παρτίδα»: η εκάστοτε παραδιδόμενη προσδιορίσιμη ποσότητα τροφίμου, για την οποία ο αρμόδιος υπάλληλος έχει διαπιστώσει ότι παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά, όπως είναι η προέλευση, η ποικιλία, το είδος συσκευασίας, ο συσκευαστής, ο αποστολέας ή η σήμανση.
- «υποπαρτίδα»: καθορισμένο τμήμα μεγάλης παρτίδας, στο οποίο θα εφαρμοστεί η μέθοδος δειγματοληψίας· κάθε υποπαρτίδα πρέπει να διαχωρίζεται με φυσικό τρόπο και να είναι αναγνωρίσιμη.
- «στοιχειώδες δείγμα»: ποσότητα υλικού που λαμβάνεται από ένα μόνο σημείο της παρτίδας ή της υποπαρτίδας.
- «συνολικό δείγμα»: το συνδυασμένο σύνολο όλων των στοιχειωδών δειγμάτων που έχουν ληφθεί από την παρτίδα ή την υποπαρτίδα.
- «εργαστηριακό δείγμα»: δείγμα που προορίζεται για το εργαστήριο.

Σε κάθε περίπτωση η δειγματοληψία πρέπει να πραγματοποιείται από εξουσιοδοτημένο πρόσωπο. Κάθε παρτίδα που πρόκειται να εξεταστεί αποτελεί αντικείμενο ξεχωριστής δειγματοληψίας. Σύμφωνα με τις ειδικές διατάξεις δειγματοληψίας για τις διάφορες μυκοτοξίνες, οι μεγάλες παρτίδες πρέπει να υποδιαιρούνται σε υποπαρτίδες, οι οποίες υφίστανται δειγματοληψία ξεχωριστά.

Στη διάρκεια της δειγματοληψίας και της προετοιμασίας των δειγμάτων, πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις ώστε να αποφεύγονται αλλαγές, οι οποίες:

- επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες, επιδρούν αρνητικά στον αναλυτικό προσδιορισμό, ή καθιστούν μη αντιπροσωπευτικά τα στοιχειώδη δείγματα.
- επηρεάζουν την ασφάλεια τροφίμων των παρτίδων που πρόκειται να υποστούν δειγματοληψία.
- ταυτόχρονα πρέπει να λαμβάνονται όλα τα μέτρα που είναι αναγκαία για να εξασφαλίζεται η ασφάλεια των προσώπων που λαμβάνουν τα δείγματα.

Στο μέτρο του δυνατού, πρέπει να λαμβάνονται στοιχειώδη δείγματα σε διαφορετικά σημεία της παρτίδας ή της υποπαρτίδας. Τυχόν παρέκκλιση από τη διαδικασία αυτή πρέπει να καταγράφεται σε κατάλληλο αρχείο. Στη συνέχεια το συνολικό δείγμα λαμβάνεται με τη συνένωση των στοιχειωδών δειγμάτων. Από το ομογενοποιημένο συνολικό δείγμα λαμβάνονται πανομοιότυπα δείγματα για σκοπούς εφαρμογής εκτελεστικών μέτρων,

εμπορίου (υπεράσπισης) και διαιτησίας (διαιτητή), υπό τον όρο ότι η διαδικασία αυτή δεν αντιβαίνει στους κανόνες που ισχύουν σχετικά με τα δικαιώματα των υπευθύνων επιχειρήσεων τροφίμων.

Στη συνέχεια κάθε δείγμα τοποθετείται σε έναν καθαρό περιέκτη από αδρανή ύλη, ο οποίος παρέχει την κατάλληλη προστασία από μόλυνση και από οιαδήποτε βλάβη που μπορεί να προκύψει κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Πρέπει να λαμβάνονται επίσης όλες οι αναγκαίες προφυλάξεις για να αποτραπεί κάθε αλλοίωση της σύνθεσης του δείγματος, η οποία μπορεί να επέλθει κατά τη διάρκεια της μεταφοράς ή της αποθήκευσης. Κάθε δείγμα που λαμβάνεται για επίσημη χρήση σφραγίζεται στον τόπο της δειγματοληψίας και ταυτοποιείται σύμφωνα με τους κανόνες που ισχύουν στο κράτος μέλος. Για κάθε δειγματοληψία πρέπει να τηρείται αρχείο, το οποίο να επιτρέπει την αναμφισβήτητη αναγνώριση της εκάστοτε παρτίδας και στο οποίο να αναγράφεται η ημερομηνία και ο τόπος δειγματοληψίας, καθώς και κάθε άλλη συμπληρωματική πληροφορία που ενδέχεται να αποβεί χρήσιμη για τον παρασκευαστή.

3.7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΣΙΤΗΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΣΙΤΗΡΩΝ

Αυτή η μέθοδος δειγματοληψίας εφαρμόζεται κατά τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων επιπέδων που έχουν καθιερωθεί για την αφλατοξίνη B1, τις συνολικές αφλατοξίνες, την ωχρατοξίνη A και τις τοξίνες *Fusarium* στα σιτηρά και τα προϊόντα σιτηρών

Βάρος του στοιχειώδους δείγματος

Το βάρος του στοιχειώδους δείγματος πρέπει να είναι περίπου 100 γραμμάρια, εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά σε οικείο κανονισμό. Σε περίπτωση παρτίδων σε συσκευασίες λιανικής πώλησης, το βάρος του στοιχειώδους δείγματος εξαρτάται από το βάρος του συσκευασμένου προϊόντος λιανικής πώλησης.

Ως εκ τούτου, σε περίπτωση συσκευασμένου προϊόντος λιανικής πώλησης που ζυγίζει περισσότερα από 100 γραμμάρια, τα συνολικά δείγματα ζυγίζουν περισσότερο από 10 kg. Εάν το βάρος ενός μεμονωμένου συσκευασμένου προϊόντος λιανικής πώλησης είναι πολύ μεγαλύτερο από 100 γραμμάρια, τότε λαμβάνονται 100 γραμμάρια στοιχειώδους δείγματος από κάθε τέτοιο μεμονωμένο συσκευασμένο προϊόν. Αυτό μπορεί να γίνει είτε όταν λαμβάνεται το δείγμα είτε στο εργαστήριο. Ωστόσο, σε περιπτώσεις κατά

τις οποίες αυτή η μέθοδος δειγματοληψίας θα οδηγούσε σε απαράδεκτες εμπορικές επιπτώσεις που θα προέκυπταν από ζημίες στην παρτίδα (λόγω της μορφής της συσκευασίας, του μέσου μεταφοράς κ.λπ.), μπορεί να εφαρμοστεί εναλλακτική μέθοδος δειγματοληψίας. Για παράδειγμα, σε περίπτωση που ένα προϊόν υψηλής αξίας διατίθεται στην αγορά σε συσκευασίες λιανικής των 500 γραμμαρίων ή του 1 kg, το συνολικό δείγμα μπορεί να ληφθεί με τη συνάθροιση ορισμένων στοιχειωδών δειγμάτων, ο αριθμός των οποίων είναι μικρότερος από τον αριθμό που αναφέρεται στους πίνακες της οικίας νομοθεσίας, υπό την προϋπόθεση ότι το βάρος του συνολικού δείγματος ισούται με το απαιτούμενο βάρος του συνολικού δείγματος που αναφέρεται στους συγκεκριμένους πίνακες.

Όταν η λιανική συσκευασία ζυγίζει λιγότερο από 100 γραμμάρια και εάν η διαφορά δεν είναι πολύ μεγάλη, μια τέτοια επιμέρους συσκευασία εκλαμβάνεται ως ένα στοιχειώδες δείγμα, έτσι ώστε το συνολικό δείγμα να ζυγίζει λιγότερο από 10 kg. Εάν το βάρος της λιανικής συσκευασίας είναι πολύ μικρότερο των 100 γραμμαρίων, ένα στοιχειώδες δείγμα αποτελείται από δύο ή περισσότερες λιανικές συσκευασίες, έτσι ώστε τα 100 γραμμάρια να προσεγγίζονται όσο το δυνατόν περισσότερο.

Ο αριθμός των στοιχειωδών δειγμάτων και του συνολικού δείγματος περιγράφονται κατά περίπτωση στον Κανονισμό 401/2006 (παράρτημα Ι).

Σε κάθε περίπτωση η αποδοχή ή απόρριψη μιας παρτίδας γίνεται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

- αποδοχή εφόσον το εργαστηριακό δείγμα είναι σύμφωνο προς το μέγιστο όριο, λαμβανομένης υπόψη της διόρθωσης για ανάκτηση και της αβεβαιότητας της μέτρησης·
- απόρριψη εφόσον το εργαστηριακό δείγμα υπερβαίνει το μέγιστο όριο πέραν κάθε λογικής αμφιβολίας, λαμβανομένης υπόψη της διόρθωσης για ανάκτηση και της αβεβαιότητας της μέτρησης.

3.7.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ, ΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΒΡΕΦΗ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΒΡΕΦΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΒΡΕΦΗ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΒΡΕΦΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

Αυτή η μέθοδος δειγματοληψίας εφαρμόζεται κατά τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων επιπέδων που έχουν καθιερωθεί για την αφλατοξίνη M1 στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, στα παρασκευάσματα για βρέφη και τα παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένων του βρεφικού γάλακτος, του γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας και των διαιτητικών τροφίμων (γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα) για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη.

Το συνολικό δείγμα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 kg ή 1 λίτρο, εκτός εάν δεν είναι δυνατόν, π.χ. στην περίπτωση που έχει ληφθεί για δειγματοληψία μία μόνο φιάλη.

Ο ελάχιστος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να λαμβάνονται από την παρτίδα πρέπει να είναι αυτός που αναφέρεται στον πίνακα 3.2. Ο καθορισμένος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων εξαρτάται από τη συνήθη μορφή με την οποία τα συγκεκριμένα προϊόντα διατίθενται στο εμπόριο. Στην περίπτωση μη συσκευασμένων υγρών προϊόντων, η παρτίδα πρέπει να αναμειγνύεται όσο το δυνατόν επιμελέστερα και στο βαθμό που αυτό δεν επηρεάζει την ποιότητα του προϊόντος, είτε με χειρωνακτικά είτε με μηχανικά μέσα αμέσως πριν από τη δειγματοληψία. Στην περίπτωση αυτή, μπορεί να θεωρηθεί ότι η κατανομή αφλατοξίνης M1 σε μία δεδομένη παρτίδα είναι ομοιογενής. Αρκεί επομένως να λαμβάνονται τρία στοιχειώδη δείγματα από μία παρτίδα για το σχηματισμό του συνολικού δείγματος.

Τα στοιχειώδη δείγματα, τα οποία συχνά μπορεί να συνίστανται σε φιάλη ή σε συσκευασμένο προϊόν, πρέπει να είναι ισοβαρή. Το βάρος ενός στοιχειώδους δείγματος πρέπει να είναι τουλάχιστον 100 γραμμάρια, έτσι ώστε να συγκεντρώνεται συνολικό δείγμα περίπου 1 kg ή 1 λίτρου τουλάχιστον. Τυχόν παρέκκλιση από τη μέθοδο αυτή πρέπει να καταγράφεται.

Πίνακας 3.2. Ελάχιστος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να λαμβάνονται από κάθε παρτίδα

Μορφή κυκλοφορίας στο εμπόριο	Όγκος ή βάρος της παρτίδας (σε λίτρα ή kg)	Ελάχιστος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να λαμβάνονται	Ελάχιστος όγκος ή βάρος του συνολικού δείγματος (σε λίτρα ή kg)
Χύμα	-	3-5	1

Μορφή κυκλοφορίας στο εμπόριο	Όγκος ή βάρος της παρτίδας (σε λίτρα ή kg)	Ελάχιστος αριθμός στοιχειω- δών δειγμάτων που πρέπει να λαμβάνονται	Ελάχιστος όγκος ή βάρος του συνολικού δείγματος (σε λίτρα ή kg)
Φιάλες/ συσκευασμένα πακέτα	≤ 50	3	1
Φιάλες/ συσκευασμένα πακέτα	50 έως 500	5	1
Φιάλες/ συσκευασμένα πακέτα	> 500	10	1

3.7.4 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΣΕ ΣΗΜΕΙΑ ΛΙΑΝΙΚΗΣ ΠΩΛΗΣΗΣ

Η δειγματοληψία τροφίμων στο στάδιο της λιανικής πώλησης πρέπει να γίνεται, εφόσον είναι δυνατόν, σύμφωνα με τις διατάξεις που ορίζονται στον οικείο κανονισμό. Όταν αυτό δεν είναι δυνατόν, μπορεί να εφαρμοστεί εναλλακτική μέθοδος δειγματοληψίας στο στάδιο της λιανικής πώλησης, υπό τον όρο ότι εξασφαλίζεται επαρκώς η αντιπροσωπευτικότητα του συνολικού δείγματος σε σχέση με την παρτίδα από την οποία ελήφθη και ότι η μέθοδος αυτή περιγράφεται και τεκμηριώνεται πλήρως.

Σε κάθε περίπτωση η αποδοχή ή η απόρριψη της παρτίδας γίνεται ως εξής:

- Αποδοχή εφόσον το εργαστηριακό δείγμα είναι σύμφωνο προς το μέγιστο όριο, λαμβανομένης υπόψη της διόρθωσης για ανάκτηση και της αβεβαιότητας της μέτρησης ,
- Απόρριψη εφόσον το εργαστηριακό δείγμα υπερβαίνει το μέγιστο όριο πέραν κάθε λογικής αμφιβολίας, λαμβανομένης υπόψη της διόρθωσης για ανάκτηση και της αβεβαιότητας της μέτρησης.

3.8 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΙ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

3.8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Δεδομένου ότι οι μυκοτοξίνες είναι γενικά ανομοιογενείς, τα δείγματα πρέπει να προετοιμάζονται και ιδιαίτερα να ομογενοποιούνται με ιδιαίτερη επιμέλεια. Το πλήρες δείγμα όπως λαμβάνεται από το εργαστήριο πρέπει να ομογενοποιείται, στην περίπτωση που η ομογενοποίηση γίνεται από το εργαστήριο. Για την ανάλυση των αφλατοξινών, πρέπει να αποφεύγεται κατά το μέτρο του δυνατού το φως της ημέρας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, δεδομένου ότι η αφλατοξίνη αποσυντίθεται προοδευτικά υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας.

Τα όρια που καθορίζονται για τις αφλατοξίνες στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 466/2001 εφαρμόζονται στο εδώδιμο τμήμα του καρπού. Το επίπεδο των αφλατοξινών στο εδώδιμο τμήμα μπορεί να προσδιοριστεί ως εξής:

- στα δείγματα καρπών με το κέλυφός τους, μπορεί να αφαιρεθεί το κέλυφος και η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες αναλύεται στο εδώδιμο τμήμα,
- οι καρποί με το κέλυφός τους μπορούν να ληφθούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος. Η μέθοδος δειγματοληψίας και ανάλυσης πρέπει να αξιολογεί το βάρος του πυρήνα του καρπού στο συνολικό δείγμα. Το βάρος του πυρήνα του καρπού στο συνολικό δείγμα εκτιμάται αφού οριστεί ένας κατάλληλος συντελεστής για την αναλογία μεταξύ κελύφους και πυρήνα στους ολόκληρους καρπούς. Η αναλογία αυτή χρησιμεύει στον προσδιορισμό της ποσότητας πυρήνα στο χύμα δείγμα που λαμβάνεται μέσω της διαδικασίας προετοιμασίας και ανάλυσης του δείγματος,

Για το σκοπό αυτό λαμβάνονται με τυχαία επιλογή 100 περίπου ολόκληροι καρποί με κέλυφος από την παρτίδα ή διαχωρίζονται από κάθε συνολικό δείγμα. Για κάθε εργαστηριακό δείγμα, η αναλογία μπορεί να επιτευχθεί με τη ζύγιση ολόκληρων των καρπών, την αφαίρεση του κελύφους τους και την εκ νέου ζύγιση αφενός των πυρήνων και αφετέρου των κελυφών.

Ωστόσο, η αναλογία του κελύφους προς τον πυρήνα μπορεί να προσδιοριστεί από το εργαστήριο με βάση περισσότερα του ενός δείγματα κι έτσι η αναλογία αυτή μπορεί να

θεωρηθεί ως έγκυρη για τις μελλοντικές εργασίες ανάλυσης. Εάν όμως βρεθεί ότι ένα συγκεκριμένο εργαστηριακό δείγμα υπερβαίνει οποιοδήποτε όριο, η αναλογία για το εν λόγω δείγμα πρέπει να προσδιοριστεί με τη χρήση των 100 περίπου καρπών που είχαν διαχωριστεί από το συνολικό δείγμα για το σκοπό αυτόν.

Κάθε εργαστηριακό δείγμα πρέπει να αλέθεται σε λεπτά σωματίδια και να αναμειγνύεται επιμελώς μέσω διαδικασίας που έχει αποδειχθεί ότι επιτυγχάνει πλήρη ομογενοποίηση. Στην περίπτωση που το μέγιστο επίπεδο ισχύει για την ξηρή ύλη, η περιεκτικότητα του προϊόντος σε ξηρή ύλη πρέπει να καθορίζεται σε μέρος του ομογενοποιημένου δείγματος, με τη χρήση μεθόδου για την οποία έχει αποδειχθεί ότι επιτυγχάνει τον ακριβή προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ξηρή ύλη.

Από το ομογενοποιημένο υλικό λαμβάνονται πανομοιότυπα δείγματα για σκοπούς εφαρμογής εκτελεστικών μέτρων, εμπορίου (υπεράσπισης) και διαιτησίας (διαιτητή), υπό τον όρο ότι η διαδικασία αυτή δεν αντιβαίνει στους κανόνες που ισχύουν στο κράτος μέλος σχετικά με τα δικαιώματα των υπευθύνων επιχειρήσεων τροφίμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΕ ΓΑΛΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISA

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Οι στόχοι του συγκεκριμένου εργαστηρίου είναι οι ακόλουθοι

1. Αγνώριση κρίσιμων παραμέτρων που αφορούν τις εργαστηριακές αναλύσεις για έλεγχο μυκοτοξικών
2. Εξοικίωση με την εφαρμογή μεθόδων ανίχνευση και ποσοτικού προσδιορισμού των μυκοτοξινών και ιδιαίτερα με την τεχνική της Ενζυματικής Ανοσοδιάγνωσης (ELISA)

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΕ ΓΑΛΑ

- ☒ Για ποίο λόγο τα standard διαλύματα απαιτούν προσεκτικό χειρισμό?
- ☒ Τι περιορισμοί ισχύουν για τη διατήρηση και το χειρισμό του kit
- ☒ Υπολογισμός ποσοτήτων washing buffer solution
- ☒ Τι απαιτούν τα δείγματα γάλακτος πριν τη λήψη της αναλυτικής ποσότητας και γιατί.
- ☒ Τι ελέγχουμε κατά την τοποθέτηση των δειγμάτων γάλακτος στη φυγόκεντρο

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

Θα χρησιμοποιηθούν τα ακόλουθα kit Ενζυματικής Ανοσοδιάγνωσης

- Γρήγορης ανίχνευσης αφλάτοξίνης M1 σε γάλα

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

Βλέπε βασικό κεφάλαιο μυκοτοξινών

ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ ΤΟΥ kit

Τα κρίσιμα σημεία προστασίας κατά το χειρισμό του kit είναι τα ακόλουθα:

- Προσοχή απαιτείται κατά τον χειρισμό των standard διαλυμάτων καθώς περιέχουν αφλατοξίνη Μ1. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να έρθουν σε επαφή με το δέρμα
- Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τη χρήση του περιεχομένου των μπουκαλίων καθώς η τυχόν πτώση τους και το άδειασμα του περιεχομένου αχρηστεύει το kit
- Απαραίτητη είναι η χρήση γαντιών και εργαστηριακής ποδιάς κατά την εφαρμογή της μεθόδου
- Αναγκαία η χρήση προστατευτικού εξοπλισμού για τα μάτια

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ kit

Σε ότι αφορά τον χειρισμό του kit τα κρίσιμα σημεία είναι τα ακόλουθα:

- Η αποθήκευση του kit γίνεται στους 2-8 οC
- Οι αφλατοξίνες είναι φωτοευαίσθητες και για αυτό πρέπει να αποφεύγεται η έκθεση στο φως
- Ομοίως και για το διάλυμα χρωμογόνου-υποστρώματος
- Αποτελέσματα μετά την ημερομηνία λήξης του kit δεν θεωρούνται αξιόπιστα
- Δεν πρέπει να αναμιγνύονται αντιδραστήρια kit με διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ kit

Σε κάθε kit υπάρχουν:

- 12 strip των 8 θέσεων-κυψελίδες καλυμμένα με αντισώματα
- 6 standard διαλύματα 1,3ml το καθένα (0,5,10,20,40,80 ppt)
- Ένα φιαλίδιο με κόκκινο καπάκι που περιέχει το ένζυμο σύζευξης(1,3 ml)
- Ένα φιαλίδιο με καφέ καπάκι που περιέχει το υπόστρωμα – χρωμογόνο (10ml)
- Ένα φιαλίδιο με κίτρινο καπάκι που περιέχει το διάλυμα stop(14ml)

- Μια φιάλη που περιέχει το buffer 1 διάλυμα 20ml
- Ένα φιαλίδιο με λευκό καπάκι που περιέχει το διάλυμα buffer 2
- Διάλυμα washing buffer

Σε κάθε περίπτωση τόσο κατά το αρχικό άνοιγμα, όσο και στα επόμενα, ελέγχουμε την καλή κατάσταση του περιεχομένου. Οποιοδήποτε πρόβλημα αναφέρεται και καταγράφεται. Παράλληλα ελέγχεται η επίδραση του στην ορθή εφαρμογή της μεθόδου και εάν απαιτείται το kit καταστρέφεται.

4.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

4.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Όλα τα αντιδραστήρια πριν το χειρισμό τους θα πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ παράλληλα η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί στου 20-25 οC. Η φυγόκεντρος πρέπει να έρθει σε θερμοκρασία 10 οC.

Προετοιμασία **Washing Buffer**

Απο τη φιάλη στην οποία βρίσκεται το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος, και το οποίο έχει διάρκεια ζωής 8 με 12 εβδομάδες, διαλύουμε ένα μέρος με εννιά μέρη απεσταγμένο νερό. Για τις 8 θέσεις-κυψελίδες ενός strip απαιτούνται 12 ml. ($250 \mu\text{l} * 8 = 2.000 \mu\text{l}$, για τις τρεις πλύσεις συνολικά απαιτούνται $2.000 \mu\text{l} * 3 = 6.000 \mu\text{l}$, επιπλέον άλλα 6.000 μl απαιτούνται για το τελικό στάδιο, Συνολικά 12.000 μl ή 12 ml)

Προετοιμασία Διαλύματος Ενζύμου Σύζευξης

Για κάθε ένα strip 8 θέσεων αναμιγνύουμε (αφού αναταράξουμε προσεκτικά) 100 μl ενζύμου σύζευξης (κόκκινο πώμα) με 1ml από το buffer 2 (λευκό πώμα).

Προετοιμασία δειγμάτων γάλακτος

Πρίν την εφαρμογή της μεθόδου φτιάχνουμε τη λίστα των κωδικών για τα δείγματα που πρόκειται να χειριστούμε και συμπληρώνουμε το έντυπο αντιστοιχίας δειγμάτων σε κάθε strip με βάση την αρίθμηση που υπάρχει στην πλακέτα. Στη συνέχεια ανακατεύουμε το κάθε δείγμα πριν τη δειγματοληψία προκειμένου να εξασφαλίσουμε την ομοιόμορφη κατανομή των συστατικών του.

Για τη λήψη κάθε δείγματος γίνεται χρήση ξεχωριστής πιπέτας. Προσοχή ο αριθμός των φιαλιδίων προς φυγοκέντριση θα είναι πάντα ζυγός. Για τον έλεγχο της σωστής τοποθέτησης μετράμε τις κενές τρύπες μεταξύ των δειγμάτων στη κεφαλή της φυγόκεντρου. Θα πρέπει να είναι ίδιες και από τις δύο πλευρές.

4.1.2 ΥΛΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η υλοποίηση της μεθόδου γίνεται με βάση τα ακόλουθα βήματα:

- Σε κατάλληλο φιαλίδιο, στο οποίο υπάρχει ο κωδικός του δείγματος, τοποθετούμε το γάλα προκειμένου να το φυγοκεντρίσουμε
- Αφού τοποθετηθούν σωστά τα δείγματα στη φυγόκεντρο φυγοκεντρούμε το γάλα στις ακόλουθες συνθήκες : 10min//3500 g/ 10 οC
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, σε κάθε φιαλίδιο, αφαιρούμε το ανώτερο στρώμα της κρέμας (συμπαγές τμήμα) με τη χρήση πιπέτας
- Στη συνέχεια από τη τρύπα που έχει γίνει προσεκτικά με μια βελόνα χωρίς να γδάρουμε τα τοιχώματα παίρνουμε το υγρό (αποβουτυρωμένο γάλα) και το τοποθετούμε σε ξεχωριστό φιαλίδιο (με γραμμένο τον κωδικό του δείγματος)
- Τοποθετούμε στην πλακέτα τον αριθμό των strip που θέλουμε. Σε κάθε περίπτωση υπολογίζουμε ότι οι πρώτες 6 θέσεις ΜΟΝΟ στο πρώτο strip καταλαμβάνονται από τα standard διαλύματα
- Βάζουμε στις πρώτες θέσεις-κυψελίδες του πρώτου strip από το 1 μέχρι το 6 τα standard διαλύματα με αύξουσα συγκέντρωση (ποσότητα 100 µl σε κάθε θέση)

- Από το νέο φιαλίδιο με τη χρήση μικροπιπέτας παίρνουμε 100 μl και τα τοποθετούμε στην αντίστοιχη θέση στο strip. (οι θέσεις έχουν από πριν συμπληρωθεί στο έντυπο ώστε να γνωρίζουμε που βρίσκεται το κάθε δείγμα)
- Αφού έχουμε τοποθετήσει όλα τα δείγματα αναμιγνύουμε απαλά με προσοχή και τοποθετούμε την πλακέτα με τα strip στο σκοτάδι για 30 λεπτά (θερμοκρασία 20-25 oC)
- Βγάζουμε την πλακέτα από το σκοτάδι και την τοποθετούμε στο ειδικό μηχάνημα για πλύσεις και αναρρόφηση
- Επιλέγουμε το πρόγραμμα 9
- Κάνουμε την πρώτη αναρρόφηση βγάζουμε την πλακέτα και την χτυπάμε ελαφρά σε απορροφητικό χαρτί προκειμένου να φύγει όλη η υγρασία
- Τοποθετούμε σε κάθε κυψελίδα 250μl από το washing buffer solution
- Βάζουμε ξανά την πλακέτα στο μηχάνημα πλύσης-αναρρόφησης και επιλέγουμε ξανά το πρόγραμμα 9
- Μετά το άδειασμα του υγρού χτυπάμε ξανά απαλά τρεις φορές την πλακέτα σε απορροφητικό χαρτί
- Επαναλαμβάνουμε 2 φορές ακόμη τη διαδικασία του πλυσίματος
- Τοποθετούμε 100 μl από το μείγμα ενζύμου σύζευξης και buffer 1 σε κάθε κυψελίδα και μετά ανακατεύουμε απαλά.
- Τοποθετούμε στο σκοτάδι για 15 λεπτά (θερμοκρασία 20-25 oC)
- Ακολουθούν τρία πλυσίματα με το washing buffer solution με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως
- Τοποθετούμε 100μl από το χρωμογόνο (καφέ μπουκαλάκι) σε κάθε κυψελίδα
- Αναμιγνύουμε απαλά
- Τοποθετούμε στο σκοτάδι για άλλα 15 λεπτά (θερμοκρασία 20-25 oC)
- Τοποθετούμε 100μl από το stop solution (κίτρινο μπουκάλι) σε κάθε κυψελίδα στο strip και ακολουθεί η μέτρηση.

- ΠΡΟΣΟΧΗ η μέτρηση πρέπει να γίνει άμεσα. Μετά από 15 λεπτά τα αποτελέσματα δεν θεωρούνται αξιόπιστα.
- Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε $\mu\text{g/Kg}$ (ppt)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΩΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Οι στόχοι του συγκεκριμένου εργαστηρίου είναι οι ακόλουθοι

1. Αναγνώριση κρίσιμης νομοθεσίας που σχετίζεται με την ανίχνευση αλλεργιογόνων ουσιών στα τρόφιμα
2. Εξικοίωση με την εφαρμογή μεθόδων ανίχνευση και ποσοτικού προσδιορισμού των αλλεργιογόνων ουσιών στα τρόφιμα και ιδιαίτερα με την τεχνική της Ενζυματικής Ανοσοδιάγνωσης (ELISA)

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΩΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

- ☒ Ποιοί είναι οι 4 τύποι αλλεργικών αντιδράσεων στα τρόφιμα
- ☒ Ποιά είναι τα χαρακτηριστικά των αλλεργιογόνων τροφίμων και ποιές αλλαγές στο μόριο τους μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια της αλλεργιογόνου δράσης

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

🗎 ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 401/2006 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 23ης Φεβρουαρίου 2006 για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα

🗎 ΑΠΟΦΑΣΗ 2006/54 ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 12ης Ιουλίου 2006 σχετικά με τους ειδικούς όρους για ορισμένα τρόφιμα εισαγωγής από ορισμένες τρίτες χώρες λόγω του κινδύνου μόλυνσής τους από αφλατοξίνες

🗎 ΟΔΗΓΙΑ 2003/89/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 10ης Νοεμβρίου 2003 για την τροποποίηση της οδηγίας 2000/13/ΕΚ όσον αφορά την αναγραφή των συστατικών των τροφίμων

🗎 ΟΔΗΓΙΑ 2005/26/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 21ης Μαρτίου 2005 για την κατάρτιση καταλόγου των συστατικών τροφίμων ή των ουσιών που αφαιρούνται προσωρινά από το παράρτημα ΙΙα της οδηγίας 2000/13/ΕΚ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τρόφιμα όταν αλλοιωθούν προκαλούν βλάβες στον άνθρωπο, είναι δηλαδή τοξικά. • Υπάρχουν όμως περιπτώσεις που τρόφιμα, αν και δεν είναι τοξικά εν τούτοις προκαλούν βλάβες -τις αλλεργίες (allergies)- σε ορισμένους μόνο ανθρώπους, τους αλλεργικούς. • Οι αλλεργίες αποτελούν σήμερα μια σύγχρονη πραγματικότητα και είναι πολύ διαδεδομένες τόσο στις προηγμένες τεχνολογικά χώρες της Ευρώπης όσο και της Αμερικής.

Ένας από τους λόγους που ευνοούν την κατάσταση αυτή, είναι ότι στην εποχή μας τα “παραδοσιακά” τρόφιμα παραχωρούν τη θέση τους σε συσκευασμένα προϊόντα εμπλουτισμένα με χημικές ουσίες (πρόσθετα) όπως συντηρητικά, χρώματα, αρώματα, αντιβιοτικά, ορμόνες κλπ. Τα προϊόντα αυτά, εκτός των άλλων, είναι δυνατό να προκαλούν ή να υποβοηθούν διάφορες αλλεργικές καταστάσεις. Τα τροφικά αλλεργιογόνα (food allergens) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα ουσιών ζωϊκής, φυτικής και ανόργανης προέλευσης.

5.2 ΑΛΛΕΡΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Επειδή τα αλλεργικά φαινόμενα οφείλονται σε διάφορες αιτίες και προκαλούνται με διάφορους μηχανισμούς, ή ταξινόμησή τους είναι πάντα δύσκολη. Από το 1969 επικράτησε η ταξινόμηση των Goombs και Gell σύμφωνα με την οποία οι αλλεργικές αντιδράσεις κατατάσσονται σε 4 τύπους με βάση τα προκαλούμενα φυσιοπαθολογικά φαινόμενα :

Τύπος I ή υπερευαισθησία άμεσου τύπου: Στην αλλεργική αντίδραση του τύπου αυτού, που λέγεται και άμεση γιατί εμφανίζεται αμέσως μετά τον αντιγονικό ερεθισμό (όπως θα δούμε στη συνέχεια), υπάγονται όλες σχεδόν οι παιδικές αλλεργικές παθήσεις και οι πιο συνηθισμένες μορφές αλλεργίας.

Τύπος II ή υπερευαισθησία κυτταροτοξικού τύπου: Αυτή παρουσιάζεται συνήθως εντοπισμένη στα ερυθροκύτταρα και μπορεί να προέρχεται από μικροβιακή μεμβράνη ή απτίνη (ατελές αντίσωμα) σταθεροποιημένη σε μια μεμβράνη.

Έτσι συνήθως γίνεται λύση του κυττάρου που όταν αφορά τα ερυθροκύτταρα, εξελίσσεται σε αιμόλυση και δίνει συμπτωματολογία αιμολυτικής αναιμίας.

Τύπος III ή υπερευαισθησία από συμπλέγματα αντιγόνου - αντισώματος ή ημιβραδεία αντίδραση: Η τελευταία ονομασία της οφείλεται στο ότι παρατηρείται 6-12 ώρες μετά τον αντιγονικό ερεθισμό. Η αλλεργία αυτή προκαλείται από την εναπόθεση του ανοσοσυμπλέγματος (συμπλόκου αντιγόνου- αντισώματος) στα εξωτερικά τοιχώματα των μικρών αγγείων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής, θρόμβωση, εκφυλισμό του εσωτερικού αγγειακού τοιχώματος και εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων.

Τύπος IV ή κυτταρική υπερευαισθησία ή υπερευαισθησία επιβραδυνόμενου τύπου: Λέγεται και επιβραδυνόμενη αντίδραση, αφού παρατηρείται 48-72 ώρες μετά τον αντιγονικό ερεθισμό. Κατά την αλλεργική αυτή αντίδραση το αντιγόνο δεν κυκλοφορεί στο αίμα αλλά απορροφάται από ορισμένους ιστούς (κυρίως δέρμα), όπου παραμένει και συνδέεται με το αντίσωμα το οποίο επίσης δε μετακινείται με τον ορό του αίματος.

Η αλλεργία θεωρείται κληρονομική ασθένεια, αλλά το περιβάλλον παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Έχουν παρατηρηθεί επαγγελματικές αλλεργίες, κυρίως δερματικές, που προκαλούνται από διάφορες ουσίες : Διάφορα φάρμακα για το νοσηλευτικό προσωπικό και τους εργαζόμενους στις φαρμακοβιομηχανίες, βαφές μαλλιών, αρώματα, υγρά αποχρωματισμού κ.ά για τους κομμωτές, ανιλίνη, φορμόλη, χρώμιο, νικέλιο, βαφές για τους βιομηχανικούς εργάτες, φυτοφάρμακα για τους γεωργούς.

5.3 ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑ

Από παλιά είναι γνωστό ότι υπάρχει σχέση μεταξύ αλλεργίας και διατροφής, ότι δηλαδή η εμφάνιση της αλλεργίας επηρεάζεται από τις συνθήκες διατροφής. Οι Σκανδιναβοί που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες ψαριού είναι ευαισθητοποιημένοι στα ψάρια και εμφανίζουν αλλεργικές αντιδράσεις σ' αυτά συχνότερα απ' ότι οι κάτοικοι άλλων χωρών. • Οι Ιταλοί στα ζυμαρικά, οι αγρότες στα δημητριακά κ.λπ. Στις τροφικές αλλεργίες όμως σημαντικό ρόλο παίζει όχι τόσο η ποσότητα και η συχνότητα λήψης του τροφίμου, όσο η αλλεργική του ισχύ. Οι κάτοικοι του Τέξας, π.χ. δεν έχουν ευαισθητοποιηθεί στο βοδινό κρέας αν και καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες από αυτό.

Είναι σπάνιες οι περιπτώσεις που η ευαισθητοποίηση στα τρόφιμα (ο αρχικός σχηματισμός αντισωμάτων) γίνεται στο έμβρυο στη διάρκεια της κύησης, όταν κάποια αντιγονική ουσία περάσει στο κυκλοφορικό σύστημα του εμβρύου. Συνήθως θεωρείται ότι η ευαισθητοποίηση γίνεται αργότερα, στους πρώτους μήνες της ζωής του βρέφους, όταν μικρές ποσότητες τροφίμου περνούν άθικτες από το φράγμα του βλεννογόνου ιστού στο αίμα. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι το γαστρεντερικό σύστημα του βρέφους, μέχρι 3 ή 6 μηνών, είναι σχετικά διαπερατό από μικρά ποσά άπεπτης-άθικτης τροφής.

Πάντως για να αποφύγει κανείς και τις λίγες περιπτώσεις αλλεργίας από την ενδομήτρια ζωή θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη σωστή διατροφή της μητέρας στη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η κατανάλωση τροφικών αλλεργιογόνων, η μονότονη διατροφή κλπ, αυξάνουν τις πιθανότητες να ευαισθητοποιηθεί το έμβρυο. Είναι φανερό ότι, από την άποψη της Χημείας Τροφίμων, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η εξέταση των τροφίμων που προκαλούν αλλεργία (τροφικά αλλεργιογόνα) και η αλλεργία που προκαλούν (τροφική αλλεργία) καθώς και η πεπτική αλλεργία που, μπορεί να προκαλείται τόσο από την τροφή όσο και από άλλους λόγους.

Στην τροφική αλλεργία (food allergy) οι αλλεργικές αντιδράσεις μπορεί να είναι εντοπισμένες στο πεπτικό σύστημα (πεπτική αλλεργία) ή να εκδηλώνονται σαν έκζεμα, κνιδώσεις, άσθμα, κεφαλαλγία, άλλες δευτερεύουσες αλλεργικές αντιδράσεις ή ακόμα και ισχυρό αλλεργικό σοκ και θάνατο. Πολλά άτομα παρουσιάζουν διαφορετικές αλλεργικές αντιδράσεις από το ίδιο τρόφιμο, αλλά το ίδιο άτομο παρουσιάζει πάντα την αυτή αλλεργική αντίδραση από το ίδιο τρόφιμο, αφού η ευαισθητοποίηση είναι εξειδικευμένη. • Πρόσφατα, έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στις τροφικές αλλεργίες που δεν προκαλούνται από ασυνήθιστα τρόφιμα, αλλά από τα κυριότερα τρόφιμα της καθημερινής διατροφής και έχουν μελετηθεί διάφοροι τρόποι θεραπευτικής αγωγής, όπως αναφέρεται στη συνέχεια.

5.4 ΤΡΟΦΙΚΑ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ

Τα κυριότερα αλλεργιογόνα τρόφιμα είναι πρωτεϊνούχα και μάλιστα, για την πρόκληση Ig E αλλεργίας πιο δραστικές είναι πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μικρότερο από 70.000 και κάποιο φορτίο (θετικό ή αρνητικό). Αλλαγές στο μόριο των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών όπως υδρόλυση ή μετουσίωση με θέρμανση, έχει σαν αποτέλεσμα να χάνουν τις αλλεργικές τους ιδιότητες. Για το λόγο αυτό άλλωστε το ωμό και το παστεριωμένο γάλα

είναι περισσότερο αλλεργιογόνα από το βρασμένο, που πολλές φορές δεν παρουσιάζει καμμία διαταραχή στα ευαισθητοποιημένα στο γάλα άτομα. Σήμερα γίνεται πολλή ερευνητική δουλειά προς την κατεύθυνση της μελέτης της δομής των πρωτεϊνών που προκαλούν αλλεργικά φαινόμενα, με σύνθεση πολυπεπτιδίων. Πολλοί πιστεύουν ότι ο Ν-γλυκοζιτικός δεσμός αποτελεί χαρακτηριστικό των αλλεργιογόνων ουσιών. Επίσης τρόφιμα που περιέχουν τις ίδιες χημικές ουσίες προκαλούν τα ίδια συμπτώματα σε ευαισθητοποιημένα άτομα έτσι όταν πχ. ένα άτομο είναι ευαισθητοποιημένο στο κρεμμύδι, είναι και στο σκόρδο που και αυτό έχει το διαλλυλοδισουλφίδιο σα δραστικό συστατικό.

Τρόφιμα με μεγάλη καθαρότητα, όπως η ζάχαρη και τα φυτικά λάδια, συνήθως δεν είναι αλλεργιογόνα. Άλλα τρόφιμα που είναι σπάνια ή καθόλου αλλεργιογόνα είναι το ρύζι, τα καρότα, το σουσάμι, τα μήλα, τα ροδάκινα, τα αχλάδια, το μαρούλι, η αγκινάρα, τα ζελέ και το κρέας του προβάτου. Αναλυτικά τα τροφικά αλλεργιογόνα είναι τα ακόλουθα:

Ζωϊκής προέλευσης

Γάλα : Είναι από τα πιο συνηθισμένα αλλεργιογόνα για τα παιδιά και η βασική θα μπορούσαμε να πούμε αιτία πεπτικής αλλεργίας στα βρέφη. Ακόμα μπορεί να προκαλεί και άλλες αλλεργικές διαταραχές όπως έκζεμα, οιδήματα, κνιδώσεις, κεφαλαλγία κλπ. Τα συστατικά του γάλακτος που δρουν σαν αντιγόνα είναι κυρίως η β-λακτοσφαιρίνη και λιγότερο η καζεΐνη.

Αυγό : Η αλλεργία που πολύ συχνά προκαλείται από τα αυγά είναι πεπτική ή δερματική. • Η πρωτεΐνη που προκαλεί την αντιγονικότητα πιστεύεται ότι είναι μία από τις πρωτεΐνες που βρίσκονται κυρίως στο ασπράδι. Επίσης έχει παρατηρηθεί διασταυρούμενη ευαισθητοποίηση πχ. πρόκληση αλλεργικών φαινομένων από το αυγό και το κρέας ενός πουλιού ή ακόμα από αυγά πουλιών διαφορετικού είδους.

Κρέας : Δεν παρατηρούνται συχνά αλλεργίες από κρέας. Πάντως περισσότερο αλλεργιογόνο είναι το χοιρινό και τα διάφορα υποπροϊόντα του όπως ζαμπόν, σαλάμια, λουκάνικα κλπ. Ακολουθεί το κρέας αλόγου, μόσχου και λιγότερο αλλεργιογόνο από όλα τα κρέατα είναι το αρνίσιο.

Ψάρια και θαλασσινά : Τα ψάρια κακώς θεωρούνται σαν ισχυρά αλλεργιογόνα τρόφιμα. • Στην πραγματικότητα δεν είναι περισσότερο δραστικά από τα άλλα συνηθισμένα τρόφιμα όπως αλεύρι, αυγά, γάλα, σοκολάτα, ντομάτα κ.λπ. Πιο συχνά προκαλούν αλλεργικές διαταραχές τα θαλασσινά όπως μύδια, στρείδια, γαρίδες, καλαμάρια κ.λπ. Τα συμπτώματα που προκαλούνται από αλλεργίες ψαριών και θαλασσινών είναι αναφυλαξίες,

γαστρεντερικές διαταραχές, κνιδώσεις και λιγότερο συχνά άσθμα και κόρυζα. Πολύ συνηθισμένη είναι η ευαισθητοποίηση ενός ατόμου σε ομάδες θαλάσσιων οργανισμών. Αν δηλαδή ένα άτομο ευαισθητοποιηθεί σε ένα είδος φυλογενετικής ομάδας, τότε είναι πιθανό να έχει ευαισθητοποιηθεί σε όλα τα μέλη της ομάδας αυτής. Ευαισθητοποίηση σε όλα τα είδη των ψαριών είναι πολύ σπάνια. • Έχει όμως παρατηρηθεί ευαισθητοποίηση σε όλα τα τρόφιμα από τη θάλασσα (ψάρια και θαλασσινά). Τα θαλασσινά φαίνεται να ανήκουν σε μια δική τους κατηγορία. Τέλος, πολύ συχνά παρατηρείται αλλεργία από ψάρια και σε τρόφιμα που περιέχουν ίχνη από ψάρια και κυρίως πρωτεΐνες από το δέρμα ψαριών, όπως πχ. υποκατάστατο της κρέμας γάλακτος που ανάμεσα στα άλλα περιέχει και λάδι από ρέγγα.

Φυτικής προέλευσης

Τα φυτικής προέλευσης αλλεργιογόνα προκαλούν άσθμα, πυρετό, επιπεφυκίτιδα και άλλα συμπτώματα καθώς και πεπτική αλλεργία. Οι εποχιακές αλλεργικές παθήσεις δεν είναι τόσο επικίνδυνες όσο οι μη εποχιακές που είναι πραγματικά επικίνδυνες. Οι πιο σημαντικές κατηγορίες είναι οι ακόλουθες:

Δημητριακά : Είναι τα περισσότερα αλλεργιογόνα φυτικά τρόφιμα με πρώτο εκπρόσωπο το σιτάρι που είναι το κυριότερο αλλεργιογόνο της σειράς του, ίσως γιατί έχει μεγάλη κατανάλωση. Τα δημητριακά δρουν • είτε σαν τροφικά αλλεργιογόνα (ψωμί, ζυμαρικά κ.λπ) με κύρια αντιγονική πρωτεΐνη την α- γλοιαδίνη, είτε προκαλούν αλλεργικά φαινόμενα με τη γύρη τους ή τη σκόνη και τις φαρίνες τους. Στην τελευταία μάλιστα περίπτωση οι αλλεργίες που προκαλούνται αναφέρονται και σαν επαγγελματικές, γιατί παρουσιάζονται στο μυλωνά, στον αγρότη, στο φούρναρη. Πολλές φορές εμφανίζονται αλλεργίες είτε μόνο από τη διατροφή με δημητριακά είτε • μόνο από την επαφή ή την εισπνοή δημητριακών τροφικά αλλεργιογόνα

Διάφορα δέντρα : Στην Ελλάδα την πρώτη θέση κατέχει η ελιά, ακολουθούν ο πλάτανος, το πεύκο κ.λ.π. Η γύρη των φυτών αυτών, στην εποχή της ανθοφορίας προκαλεί τις αλλεργικές ρινίτιδες που εκδηλώνονται με φταρνίσματα, ρινική έκκριση, απόφραξη, πυρετό καθώς και επιπεφυκίτιδα, άσθμα κ.λ.π.

Άλλα φυτικής προέλευσης αλλεργιογόνα τρόφιμα: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ντομάτες, οι πατάτες, τα βερούκοκα, οι ξηροί καρποί, η σοκολάτα, το τσάϊ, ο καφές, οι μπανάνες, τα φασολάκια, το σπανάκι, οι μελιτζάνες, το σέλινο, το αγγούρι, οι φράουλες, τα εσπεριδοειδή κ.λ.π.

Άλλης προέλευσης

Πρόσθετα τροφίμων : Διάφορα πρόσθετα των τροφίμων, όπως ήδη αναφέρθηκε παρουσιάζουν αλλεργικές δράσεις ή υποβοηθούν αλλεργικές καταστάσεις όπως για παράδειγμα το νικοτινικό νάτριο, που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση του χρώματος του κρέατος ή των προϊόντων του, προκαλεί κνησμό κ.λ.π..

5.5 ΠΕΠΤΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑ

Τη Χημεία Τροφίμων ενδιαφέρει ιδιαίτερα μια συγκεκριμένη μορφή αλλεργίας, η πεπτική αλλεργία, που μπορεί να εκδηλωθεί :

- Σα μέρος γενικευμένης αλλεργικής διαταραχής (αλλεργικό σοκ)
- Ταυτόχρονα με κάποια άλλη αλλεργική κρίση, όπως γαστρεντερίτιδα με ημικρανία (αλλεργία νευρικού συστήματος)
- Σε συγκεκριμένο όργανο του πεπτικού συστήματος, π.χ. αλλεργική γαστρίτιδα, και
- Σε δύο ή περισσότερα τμήματα του πεπτικού σωλήνα.

Τα αίτια που προκαλούν την πεπτική αλλεργία είναι :

- Η συνεχής διατροφή με το ίδιο είδος τροφίμου, οπότε προκαλείται ευαισθητοποίηση. Αυτό μπορεί να οφείλεται ή σε τοπικές συνήθειες διατροφής ή και σε κάποια (αναγκαστική) δίαιτα για πολλούς μήνες.
- Η μυρωδιά μιας τροφής.

- Ο ερεθισμός του βλεννογόνου του γαστρεντερικού συστήματος από υπερβολική κατανάλωση τροφής ή από φάρμακα κ.ά.
- Το άτακτο ωράριο γευμάτων.
- Άλλες αιτίες, όπως διάφορες χημικές ουσίες, μικρόβια, παράσιτα, και τέλος • Σωματική κούραση και στρες.

5.6 ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΠΑΙΔΙΚΕΣ ΑΛΛΕΡΓΙΕΣ

Σήμερα δίνεται ιδιαίτερη σημασία στην πεπτική αλλεργία από τους παιδίατρους. Από την αρχή της ανθρώπινης ζωής, ο ιστός που επηρεάζεται περισσότερο από τις αλλεργίες, είναι ο πεπτικός βλεννογόνος. Σαν αλλεργιογόνα δρουν το γάλα και τα δημητριακά, που αποτελούν αποκλειστική σχεδόν τροφή των νηπίων. Αργότερα, η υπερευαισθησία εξασθενεί, ίσως γιατί βελτιώνεται η πεπτική λειτουργία και έτσι μετά τα 6 χρόνια υποχωρούν συνήθως οι συχνές πεπτικές αλλεργίες που παρουσιάζονται στα παιδιά.

Αν και σπάνια έχουν αναφερθεί αλλεργίες από το μητρικό γάλα, θα πρέπει να τονισθεί η μεγάλη σημασία του μητρικού γάλακτος, όχι μόνο για την περίοδο του θηλασμού αλλά και για τη μετέπειτα περίοδο της ζωής του ανθρώπου. Όσο θηλάζει το παιδί, οι ανοσοσφαιρίνες που υπάρχουν στο γάλα εμποδίζουν αλλεργικές διαταραχές (παθητική ανοσία). Αλλεργικές διαταραχές συνήθως παρουσιάζονται μετά το σταμάτημα του θηλασμού ή όταν μαζί με το θηλασμό παρέχεται και ξένο γάλα.

Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες, τα παιδιά που θηλάζουν έχουν 3-4 φορές λιγότερες πιθανότητες να πάθουν άσθμα, έκζεμα και πεπτικές αλλεργίες στη μετέπειτα ζωή τους. Τα κύρια τρόφιμα που δημιουργούν προβλήματα στα νήπια και τα μικρά παιδιά, είναι το γάλα, τα δημητριακά, τα αυγά και τα εσπεριδοειδή. Οι κυριότερες αλλεργιογόνες ουσίες του γάλακτος, οι γαλακτοαλβουμίνες και οι γαλακτογλουβουλίνες, είναι διαφορετικές για τα διάφορα είδη γάλακτος. Γι' αυτό όταν παρουσιάζονται προβλήματα σε βρέφη που δε θηλάζουν, τότε μπορούν να δοκιμασθούν σαν αναπληρώματα του μητρικού γάλακτος εκτός από το αγελαδινό και άλλα είδη γάλακτος π.χ. από κατσίκια κλπ. Ακόμα μπορεί να δοθεί στο βρέφος καλά βρασμένο γάλα, οπότε οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες είναι πιθανό να μην είναι δραστικές. Επίσης κυκλοφορούν πολλά μη αλλεργιογόνα υποκατάστατα του

γάλακτος, όπως από σόγια, που περιέχει σχεδόν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα στις πρωτεΐνες του και ακόμα πολύ λίπος, υδατάνθρακες, βιταμίνες και άλατα, ή υποκατάστατα γάλακτος από κρέας που έχει παρόμοια σύσταση με το μητρικό, είναι εύγεστο και εύληπτο από τα νεογνά. Τελευταία, προτείνεται η αποφυγή του αγελαδινού γάλακτος μέχρι τους 6-7 μήνες. Η πρώτη στερεή τροφή που θα δοθεί στο βρέφος, καλό είναι να μην περιέχει σιτάλευρο αλλά ριζάλευρο, που είναι ελάχιστα αλλεργιογόνο. Στη συνέχεια μπορεί να δοθεί αλεύρι από βρώμη, κριθάρι και μετά τους 6 μήνες σιτάλευρο.

Για το αυγό, οι απόψεις που επικρατούν είναι • ότι ο κρόκος είναι λίγο αλλεργιογόνος και μετά από καλό βράσιμο γίνεται τελείως ακίνδυνος για βρέφη μεγαλύτερα από 6 μηνών, ενώ το ασπράδι να δίνεται μετά τους 10 μήνες. Το Αγγλοσαξωνικό πάντως πρότυπο, προτείνει αποφυγή αυγού και φαρινών μέχρι το δωδέκατο μήνα. Τέλος, θα πρέπει να δίνεται προσοχή και στο χυμό των εσπεριδοειδών για τη διατροφή των βρεφών. Οι συχνές αλλεργίες που παρουσιάζονται, δεν οφείλονται σε αντιγονικότητα του ίδιου του χυμού, αλλά στα έλαια από τη φλούδα ή τις πρωτεΐνες από τους τυχόν σπασμένους σπόρους. Σήμερα όμως πιστεύεται ότι στο όλο φαινόμενο συμμετέχει και κάποιος χημικός ερεθισμός από τα συστατικά του χυμού. Σημαντικότερο είναι και το θέμα των βρεφικών κολικών, που τόσο πολύ ταλαιπωρούν τα βρέφη (αλλά και τους γονείς), για 3 ή 6 μήνες. Σήμερα πιστεύεται ότι είναι αλλεργικής αιτιολογίας και το πρόβλημα αυτό θα λυθεί μέσα από τις πεπτικές αλλεργίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISA

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Οι στόχοι του συγκεκριμένου εργαστηρίου είναι οι ακόλουθοι

1. Αγνώριση κρίσιμων παραμέτρων που αφορούν τις εργαστηριακές αναλύσεις για έλεγχο αλλεργιογόνων ουσιών στα τρόφιμα
2. Εξοικίωση με την εφαρμογή μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των υπολειμμάτων φιστικιού σε τρόφιμα και ιδιαίτερα με την τεχνική της Ενζυματικής Ανοσοδιάγνωσης (ELISA)

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ

- ☒ Για ποίο λόγο το stop solution απαιτεί προσεκτικό χειρισμό?
- ☒ Τι περιορισμοί ισχύουν για τη διατήρηση και το χειρισμό του kit
- ☒ Υπολογισμός ποσοτήτων washing buffer solution
- ☒ Σε ποιές δυο περιπτώσεις διακόπτουμε τη χρήση του kit

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

Θα χρησιμοποιηθούν τα ακόλουθα kit Ενζυματικής Ανοσοδιάγνωσης

- Γρήγορης ανίχνευσης υπολειμμάτων φιστικιού σε τρόφιμα

ΚΡΙΣΙΜΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

Βλέπε βασικό κεφάλαιο αλλεργιογόνων

ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ ΤΟΥ kit

Τα κρίσιμα σημεία προστασίας κατά το χειρισμό του kit είναι τα ακόλουθα:

- Προσοχή απαιτεί το stop solution καθώς περιέχει Θειικό Οξύ
- Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τη χρήση του περιεχομένου των μπουκαλίων καθώς η τυχόν πτώση τους και το άδειασμα του περιεχομένου αχρηστεύει το kit
- Απαραίτητη είναι η χρήση γαντιών και εργαστηριακής ποδιάς κατά την εφαρμογή της μεθόδου
- Αναγκαία η χρήση προστατευτικού εξοπλισμού για τα μάτια

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ kit

Σε ότι αφορά τον χειρισμό του kit τα κρίσιμα σημεία είναι τα ακόλουθα:

- Η αποθήκευση του kit γίνεται στους 2-8 °C
- Ορισμένα από τα αντιδραστήρια του kit είναι φωτοευαίσθητα και για αυτό πρέπει να αποφεύγεται η έκθεση στο φως
- Αποτελέσματα μετά την ημερομηνία λήξης του kit δεν θεωρούνται αξιόπιστα
- Δεν πρέπει να αναμιγνύονται αντιδραστήρια kit με διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας
- Εμφάνιση μπλέ χρώματος στο περιεχόμενο του φιαλιδίου με το κόκκινο χρώμα (κανονικό χρώμα κόκκινο) αποτελεί ένδειξη για προβλήματος. Το kit θεωρείται άχρηστο
- Τιμή απορρόφησης μικρότερη από 0.8 μονάδες απορρόφησης στο standard 5 αποτελεί ένδειξη ότι το kit θεωρείται άχρηστο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ kit

Σε κάθε kit υπάρχουν:

- 12 strip των 8 θέσεων-κυψελίδες καλυμμένα με αντισώματα
- 5 standard διαλύματα 1,3ml το καθένα (0,2.5,5,10,20, ppm)
- Ένα φιαλίδιο με κόκκινο καπάκι που περιέχει το ένζυμο σύζευξης(1,3 ml)

- Ένα φιαλίδιο με καφέ καπάκι που περιέχει το υπόστρωμα – χρωμογόνο (10ml)
- Ένα φιαλίδιο με κίτρινο καπάκι που περιέχει το διάλυμα stop(14ml)
- Ένα φιαλίδιο με λευκό καπάκι που περιέχει το διάλυμα extraction buffer
- Διάλυμα washing buffer φιαλίδιο με καφέ καπάκι

Σε κάθε περίπτωση τόσο κατά το αρχικό άνοιγμα, όσο και στα επόμενα, ελέγχουμε την καλή κατάσταση του περιεχομένου. Οποιοδήποτε πρόβλημα αναφέρεται και καταγράφεται. Παράλληλα ελέγχεται η επίδραση του στην ορθή εφαρμογή της μεθόδου και εάν απαιτείται το kit καταστρέφεται.

ΕΥΡΟΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

LOD: 1.5 ppm

LOQ: 2.5 ppm

6.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

6.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Όλα τα αντιδραστήρια πριν το χειρισμό τους θα πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ παράλληλα η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί στους 20-25 οC. Απαραίτητο είναι το άριστο πλύσιμο του εξοπλισμού για αποφυγή επιμολύνσεων.

Η φυγόκεντρος πρέπει να έρθει σε θερμοκρασία 4 οC.

Προετοιμασία Extraction Buffer

Πριν τη αραιώση του buffer διαλύουμε τους κρυστάλους σε υδατόλουτρο στους 37 C πλήρως και ανακατεύουμε καλά. Στη συνέχεια αναμιγνύουμε ένα μέρος με 19 μέρη απεσταγμένο νερό (1+19). Το συγκεκριμένο διάλυμα είναι σταθερό για 12 εβδομάδες. Για ένα strip 8 θέσεων απαιτούνται 160 ml (μείγμα απεσταγμένου νερού και buffer)

Προετοιμασία Washing Buffer

Πριν τη αραίωση του buffer διαλύουμε τους κρυστάλλους σε υδατόλουτρο στους 37 C πλήρως και ανακατεύουμε καλά. Απο τη φιάλη στην οποία βρίσκεται το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος, διαλύουμε ένα μέρος με εννιά μέρη απεσταγμένο νερό (1+9). Το διάλυμα αυτό είναι σταθερό για 4εβδομάδες. Για τις 8 θέσεις-κυψελίδες ενός strip απαιτούνται 12 ml. ($250 \mu\text{l} * 8 = 2.000 \mu\text{l}$, για τις τρεις πλύσεις συνολικά απαιτούνται $2.000 \mu\text{l} * 3 = 6.000 \mu\text{l}$, επιπλέον άλλα 6.000 μl απαιτούνται για το τελικό στάδιο, Συνολικά 12.000 μl ή 12 ml)

Προετοιμασία δειγμάτων για έλεγχο υπολειμμάτων φιστικιών

Πρίν την εφαρμογή της μεθόδου φτιάχνουμε τη λίστα των κωδικών για τα δείγματα που πρόκειται να χειριστούμε και συμπληρώνουμε το έντυπο αντιστοιχίας δειγμάτων σε κάθε strip με βάση την αρίθμηση που υπάρχει στην πλακέτα. Στη συνέχεια ανακατεύουμε το κάθε δείγμα πριν τη δειγματοληψία προκειμένου να εξασφαλίσουμε την ομοιόμορφη κατανομή των συστατικών του.

Για τη λήψη κάθε δείγματος γίνεται χρήση ξεχωριστής πιπέτας. Προσοχή ο αριθμός των φιαλιδίων προς φυγοκέντριση θα είναι πάντα ζυγός. Για τον έλεγχο της σωστής τοποθέτησης μετράμε τις κενές τρύπες μεταξύ των δειγμάτων στη κεφαλή της φυγόκεντρου. Θα πρέπει να είναι ίδιες και από τις δύο πλευρές.

6.1.2 ΥΛΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η υλοποίηση της μεθόδου γίνεται με βάση τα ακόλουθα βήματα:

Εκχύλιση

- 5 g. απο το δείγμα ομογενοποιούνται πλήρως

- Παίρνουμε 1 g και προσθέτουμε 20 ml extraction buffer το οποίο έχουμε ήδη θερμάνει στους 60 C
- Ανακατεύουμε έντονα και αφήνουμε να προχωρήσει η διαδικασία της εκχύλισης για τα επόμενα 10 λεπτά. Περιοδικά ανακινούμε το φιαλίδιο
- Αφού τοποθετηθούν σωστά τα δείγματα στη φυγόκεντρο φυγοκεντρούμε στις ακόλουθες συνθήκες : 10min//2500 g/ 4 oC (σε κάθε φιαλίδιο θα πρέπει να υπάρχει ο κωδικός του δείγματος)
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης ακολουθεί φιλτράρισμά ή εναλλακτικά φυγοκέντρωση ποσότητας 2 ml σε μικροφυγόκεντρο για 10 λεπτά σε πολύ υψηλή ταχύτητα
- Πέρνουμε 100 μl απο το διήθημα ή το υπερκείμενο υγρό
- Το εκχύλισμα μπορεί να διατηρηθεί στους 2-8 oC για 5 μέρες ή στους -20 oC για αρκετούς μήνες.

Διαδικασία Μέτρησης

- Φέρνουμε τα αποθηκευμένα φιαλίδια με το προϊόν της εκχύλισης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Δεν πρέπει κατά τη διάρκεια της διαδικασίας να στεγνώσουν οι κυψελίδες. Επίσης δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιήσουμε περισσότερα απο 3 strip για μία μέτρηση.
- Τοποθετούμε στην πλακέτα τον αριθμό των strip που θέλουμε. Σε κάθε περίπτωση υπολογίζουμε ότι οι πρώτες 5 θέσεις ΜΟΝΟ στο πρώτο strip καταλαμβάνονται από τα standard διαλύματα
- Βάζουμε στις πρώτες θέσεις-κυψελίδες του πρώτου strip από το 1 μέχρι το 5 τα standard διαλύματα με αύξουσα συγκέντρωση (ποσότητα 100 μl σε κάθε θέση)
- Παίρνουμε τα 100 μl και τα τοποθετούμε στην αντίστοιχη θέση στο strip. (οι θέσεις έχουν από πριν συμπληρωθεί στο έντυπο ώστε να γνωρίζουμε που βρίσκεται το κάθε δείγμα)

- Αφού έχουμε τοποθετήσει όλα τα δείγματα αναμιγνύουμε απαλά με προσοχή και τοποθετούμε την πλακέτα με τα strip στο σκοτάδι για 10 λεπτά (θερμοκρασία 20-25 oC)
- Βγάζουμε την πλακέτα από το σκοτάδι και την τοποθετούμε στο ειδικό μηχάνημα για πλύσεις και αναρρόφηση
- Επιλέγουμε το πρόγραμμα 9
- Κάνουμε την πρώτη αναρρόφηση βγάζουμε την πλακέτα και την χτυπάμε ελαφρά σε απορροφητικό χαρτί προκειμένου να φύγει όλη η υγρασία
- Τοποθετούμε σε κάθε κυψελίδα 250μl από το washing buffer solution
- Βάζουμε ξανά την πλακέτα στο μηχάνημα πλύσης-αναρρόφησης και επιλέγουμε ξανά το πρόγραμμα 9
- Μετά το άδειασμα του υγρού χτυπάμε ξανά απαλά τρεις φορές την πλακέτα σε απορροφητικό χαρτί
- Επαναλαμβάνουμε 2 φορές ακόμη τη διαδικασία του πλυσίματος
- Τοποθετούμε 100 μl από το ενζύμο σύζευξης (κόκκινο πώμα) σε κάθε κυψελίδα και μετά ανακατεύουμε απαλά.
- Τοποθετούμε στο σκοτάδι για 10 λεπτά (θερμοκρασία 20-25 oC)
- Ακολουθούν τρία πλυσίματα με το washing buffer solution με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως
- Τοποθετούμε 100μl από το χρωμογόνο (καφέ πώμα) σε κάθε κυψελίδα
- Αναμιγνύουμε απαλά
- Τοποθετούμε στο σκοτάδι για άλλα 10 λεπτά (θερμοκρασία 20-25 oC)
- Τοποθετούμε 100μl από το stop solution (κίτρινο πώμα) σε κάθε κυψελίδα στο strip και ακολουθεί η μέτρηση.
- ΠΡΟΣΟΧΗ η μέτρηση πρέπει να γίνει άμεσα. Μετά από 10 λεπτά τα αποτελέσματα δεν θεωρούνται αξιόπιστα.
- Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg/Kg (ppt)