



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

**Μέθοδοι ανίχνευσης τοξικών ουσιών στα
τρόφιμα**

Πτυχιακή εργασία της φοιτήτριας Παπαδημητρίου Νεφέλης

Αριθμός μητρώου: 17079

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Χούχουλα

Δήμητρα

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Νεφέλη Παπαδημητρίου του Χαράλαμπου Παπαδημητρίου , με αριθμό μητρώου 71617079 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα



Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Χούχουλα Δήμητρα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	
Αντωνόπουλος Διονύσιος	ΕΔΙΠ	
Τριαντή Μυρτώ	Ακαδημαϊκή Υπότροφος	

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
Κεφάλαιο 1- Τοξικές ουσίες στα τρόφιμα	8
1.1 Ορισμός τοξικών ουσιών	8
1.2 Λόγοι παρουσίας και τύποι χημικών ουσιών	9
1.3 Φυσικά προερχόμενες τοξικές ουσίες	12
1.3.1 Μυκοτοξίνες	13
1.3.2 Λεκτίνες	20
1.3.3 Αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης	22
1.3.4 Φουρανοκουμαρίνες	24
1.3.5 Ακρυλαμίδιο	25
1.4 Περιβαλλοντικά προερχόμενες τοξικές ουσίες	27
1.4.1 Βαρέα μέταλλα	27
1.4.2 Γεωργικά φάρμακα	30

1.4.3	Μικροπλαστικά	30
	Κεφάλαιο 2 – Βασικές αρχές τεχνικών ανίχνευσης τοξικών ουσιών	33
2.1	Ανοσολογικές τεχνικές- ELISA	33
2.1.1	Βασικά στάδια και ευαισθησία της ELISA	34
2.1.2	Άμεση ELISA	37
2.1.3	Έμμεση ELISA.....	38
2.1.4	Sandwich ELISA	39
2.1.5	Ανταγωνιστική ELISA	41
2.1.6	Σύγκριση τύπων ELISA	42
2.2	Χρωματογραφικές τεχνικές	43
2.2.1	Χρωματογραφία χάρτου	44
2.2.2	Χρωματογραφία στήλης	45
2.2.3	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης ή Πίεσης.....	47
2.2.4	Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας	49
2.2.5	Αέρια Χρωματογραφία	50
2.3	Φασματοσκοπικές τεχνικές	51
2.3.1	Οπτική φασματοφωτομετρία	52
2.3.2	Φασματοσκοπία μάζας	53
2.3.3	Υγρή χρωματογραφία με φασματοσκοπία μάζας.....	56
2.3.4	Φασματοσκοπία NMR.....	58
2.4	Τεχνικές πρωτεωμικής	59
2.5	Βιοαισθητήρες	61
2.6	Βιοδοκιμές	62
	Κεφάλαιο 3 – Ανίχνευση τοξικών ουσιών σε τρόφιμα.....	63
3.1	Μυκοτοξίνες	63
3.1.1	Μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού μυκοτοξινών.....	63
3.1.2	Χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι	65
3.1.2	Ανοσολογικές μέθοδοι	71

3.1.2 Βιοαισθητήρες	72
3.1.2 Μοριακές τεχνικές	74
3.2 Βαρέα μέταλλα	75
3.2.1 Χημικές μέθοδοι	76
3.2.2 Φασματοσκοπικές μέθοδοι	76
3.3 Άλλες τοξικές ουσίες.....	78
3.4 Άλλες τοξικές ουσίες.....	79
Συμπεράσματα	80
Βιβλιογραφία.....	81

Περίληψη

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί ένα ζήτημα μείζονος σημασίας, όσον αφορά την σωστή σίτιση και επακόλουθη ευζωία του ανθρωπίνου πληθυσμού. Ωστόσο, εξαιτίας ορισμένων συνθηκών τα διάφορα τρόφιμα μπορεί να επιμολυνθούν από ουσίες, οι οποίες εμφανίζουν αυξημένη τοξικότητα, η ύπαρξη των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, ή ακόμα και στον θάνατο. Για τον λόγο αυτό είναι πολύ σημαντική η ανάπτυξη μεθόδων, οι οποίες θα τις ανιχνεύουν με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία. Οι διαφορετικές αυτές μέθοδοι μπορεί να είναι πολλών διαφορετικών τύπων, όπως χρωματογραφικές, φασματοσκοπικές, ανοσολογικές κλπ.

Λέξεις κλειδιά: Τοξίνες, τοξικές ουσίες, φασματοσκοπία, χρωματογραφία, βιοαισθητήρες, τρόφιμα, ασφάλεια

Abstract

Food safety is a major issue in terms of proper nutrition and consequent well-being of the human population. However, due to certain conditions various foods can be contaminated with substances, which show increased toxicity, the presence of which can lead to serious pathological conditions, or even death. For this reason, it is very important to develop methods that will detect them with great accuracy and sensitivity. These different methods can be of many different types, such as chromatographic, spectroscopic, immunological, etc.

Keywords: Toxins, toxic substances, spectroscopy, chromatography, biosensors, food, safety

Κεφάλαιο 1- Τοξικές ουσίες στα τρόφιμα

1.1 Ορισμός τοξικών ουσιών

Η τροφή αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες ευζωίας, καθώς η εξασφάλιση της λήψης επαρκούς ποσότητας και ποιότητας της διασφαλίζει τόσο την επαρκή σίτιση, όσο και την προαγωγή της υγείας των ατόμων αυτών.

Ωστόσο, ορισμένες φορές στα τρόφιμα μπορεί να βρεθούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις διαφορετικές ουσίες, οι οποίες δεν θα έπρεπε να βρίσκονται εκεί. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται επιμολυντές (contaminants στα αγγλικά) και η παρουσία τους ονομάζεται επιμόλυνση (contamination). Η κατανάλωση των επιμολυντών αυτών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες κυμαίνονται από ελαφριές, όπως για παράδειγμα γαστρεντερικές ή άλλες διαταραχές, έως και σοβαρότερες, έως και τον θάνατο. Η παραλλακτικότητα αυτή

οφείλεται τόσο στην φύση της επιμολυντικής ουσίας, όσο και στην ποσότητα, η οποία έχει καταναλωθεί από το προσβαλλόμενο άτομο.

Η παρουσία των διαφόρων τοξικών επιμολυντών στα τρόφιμα έχει αναφερθεί από τα αρχαία χρόνια της ιστορίας του ανθρώπου, έως και 8.000 χρόνια πριν. Ωστόσο, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια και εξαιτίας της εντατικοποίησης της γεωργικής βιομηχανίας και της παραγωγής τροφίμων, καθώς και της παγκοσμιοποίησης, η παρουσία τους στα τρόφιμα έχει αποτελέσει ένα ιδιαίτερα σημαντικό πεδίο συζήτησης και ανησυχίας (Rather, Koh, Paek, & Lim, 2017).

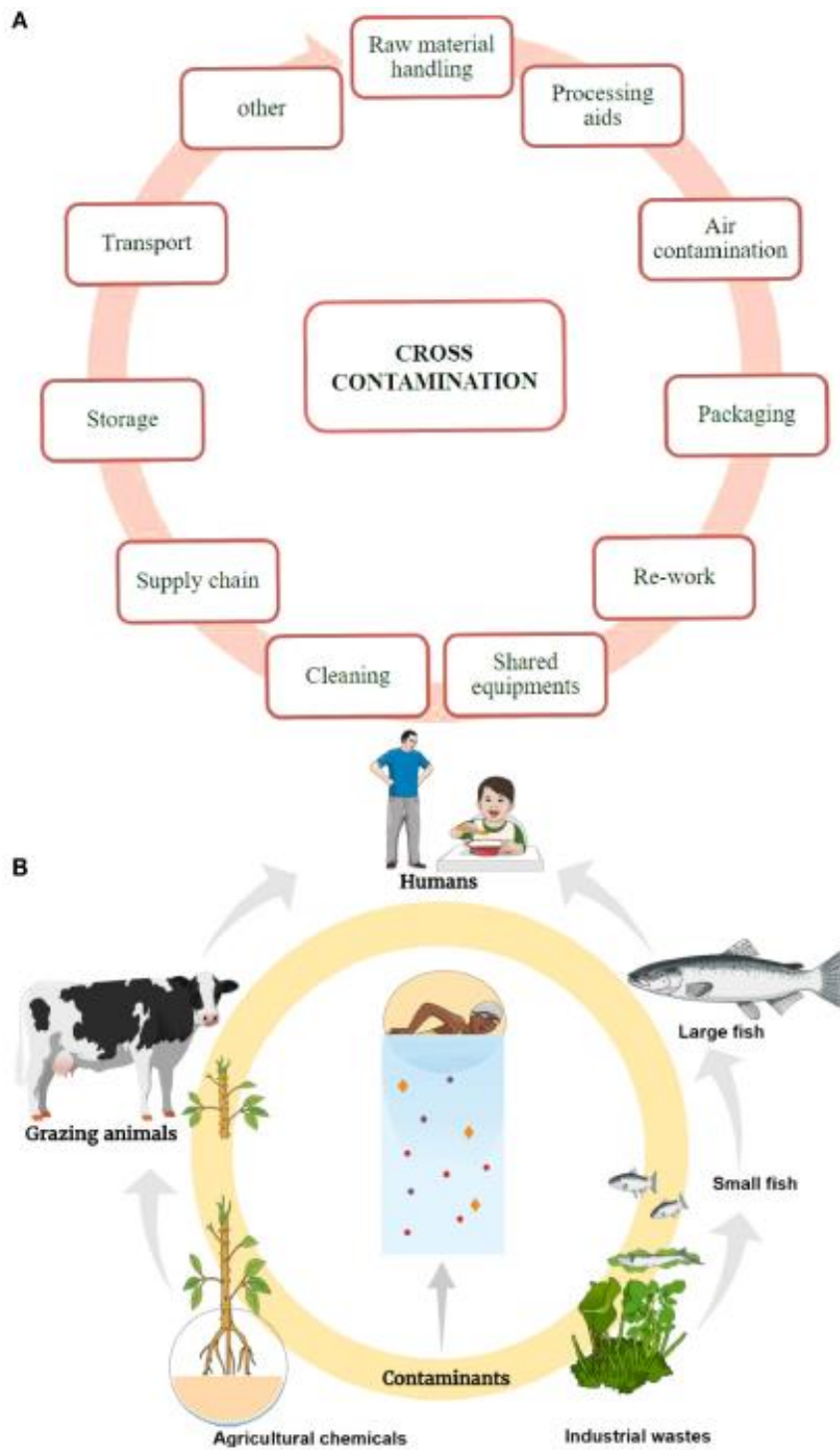
1.2 Λόγοι παρουσίας και τύποι χημικών ουσιών

Υπάρχουν διαφορετικοί λόγοι για τους οποίους τα τρόφιμα μπορεί να επιμολυνθούν από τοξικές ουσίες. Αυτοί είναι οι παρακάτω:

- Παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με την αλυσίδα παραγωγής και προετοιμασίας του τροφίμου, όπου κάθε στάδιο εμπεριέχει διαφορετικό κίνδυνο.
- Η μεταφορά του τροφίμου αυτού, ιδιαίτερα, όταν αυτή συμβαίνει υπό κακές ή ελλείψεις συνθήκες υγιεινής.
- Μεταφορά τοξικών ουσιών από την συσκευασία του τροφίμου, στο τρόφιμο.
- Χημικές ενώσεις, οι οποίες προστίθενται στα τρόφιμα για να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, όπως τον χρόνο ζωής στο ράφι, οι οποίες όμως είναι τοξικές.

- Φυσική είσοδος τους στην τροφική αλυσίδα εξαιτίας της επιμόλυνσης από διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση αυτή, ή ο ίδιος ο μικροοργανισμός, ή οι διάφορες ενώσεις που παράγει μπορεί να είναι τοξικοί.
- Περιβαλλοντική επιμόλυνση από διάφορους παράγοντες, όπως για παράδειγμα γεωργικά χημικά.

Ανάλογα με την προέλευση τους, οι διάφορες τοξικές ουσίες στα τρόφιμα μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στις φυσικά προερχόμενες και στις περιβαλλοντικά προερχόμενες.



Εικόνα 1: Επιμόλυνση τροφίμων εξαιτίας Α)διαφορετικών διεργασιών στην αλυσίδα παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων, Β) περιβαλλοντικές χημικές ουσίες (Rather et al., 2017)

1.3 Φυσικά προερχόμενες τοξικές ουσίες

Η φυσικά προερχόμενες τοξικές ουσίες ή αλλιώς τοξίνες, είναι ενώσεις, οι οποίες παράγονται από διάφορους οργανισμούς, ως μέρος του φυσιολογικού μεταβολισμού τους. Οι ουσίες αυτές δεν είναι τοξικές για τον ίδιο τον οργανισμό, ο οποίος τις παράγει, αλλά μπορεί να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα σε άλλους οργανισμούς, οι οποίοι θα τα καταναλώσουν ή θα έρθουν σε επαφή μαζί τους. Μεταξύ των οργανισμών αυτών βρίσκεται και ο άνθρωπος.

Μερικές από τις φυσικές αυτές τοξίνες, παράγονται από τα φυτά, ως ένας φυσικός μηχανισμός άμυνας, ως απόκριση εναντίον διαφορετικών θηρευτών, εντόμων ή μικροοργανισμών, τα οποία τα προσβάλλουν. Επιπλέον, μπορεί να παραχθούν από φυτά ή μικροοργανισμούς ως μέρος της φυσιολογικής τους απόκρισης σε διαφορετικές περιβαλλοντικές καταπονήσεις, όπως για παράδειγμα ξηρασία ή ακραία επίπεδα υγρασίας.

Επιπλέον, άλλες πηγές φυσικών τοξινών είναι τα διάφορα μικροσκοπικά είδη άλγης ή πλανγκτόν, τα οποία ζουν κυρίως στις θάλασσες και λιγότερο στις λίμνες. Οι τοξίνες αυτές συνήθως είναι τοξικές για τον άνθρωπο, αλλά όχι για τα διάφορα είδη ψαριών ή οστρακοειδών, τα οποία καταναλώνουν τους οργανισμούς αυτούς. Στην συνέχεια, καταναλώνονται από τον άνθρωπο, με αποτέλεσμα την πρόκληση διαφορετικών παθήσεων.

Οι φυσικές αυτές τοξίνες, μπορεί να προκαλέσουν ένα σύνολο από διαφορετικές ανεπιθύμητες επιδράσεις στον οργανισμό. Ανάλογα με τον χρόνο έκθεσης και την δόση, η οποία έχει καταναλωθεί, οι επιδράσεις αυτές μπορούν να χαρακτηριστούν οξείες (όπως για παράδειγμα μία αλλεργική αντίδραση) ή χρόνιες. Σε ακραίες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί και θάνατος (Dolan, Matulka, & Burdock, 2010).

Παρακάτω παρουσιάζονται μερικά από τα βασικότερα είδη φυσικά προερχόμενων τοξινών, οι οποίες απαντώνται στα τρόφιμα.

1.3.1 Μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες (mycotoxins στα αγγλικά) αποτελούν μία ευρεία ομάδα τοξικών ουσιών, οι οποίες παράγονται από διαφορετικά είδη μυκήτων, ως προϊόντα του δευτερογενούς τους μεταβολισμού.

Η παραγωγή της εκάστοτε μυκοτοξίνης καθορίζεται από την περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ τριών διαφορετικών παραγόντων:

- Του μύκητα, ο οποίος παράγει τη μυκοτοξίνη.
- Του υποστρώματος του μύκητα, το οποίοι συνήθως είναι κάποιο φυτό ή υπολείμματα αυτού ή διάφορα προϊόντα ζωικής προέλευσης.
- Του περιβάλλοντος, στο οποίο βρίσκονται ο μύκητας και το υπόστρωμα.

Η παραγωγή της εκάστοτε μυκοτοξίνης έχει ως βασική προϋπόθεση την αλληλεπίδραση των παραγόντων με συγκεκριμένο τρόπο. Για τον λόγο αυτό, το κατάλληλο υπόστρωμα μπορεί να έχει προσβληθεί από τον κατάλληλο μύκητα, αλλά να μην υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες παραγωγής της τοξίνης. Επιπλέον, ακόμα και αν απομακρυνθεί, μέσω διαφορετικών διαδικασιών απολύμανσης, οι τοξίνες του μπορεί να παραμείνουν στο υπόστρωμα τους, και κατά συνέπεια στο τελικό προϊόν.

Οι μύκητες, οι οποίοι παράγουν μυκοτοξίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ευρείες ομάδες, ανάλογα με την προέλευση τους.

Η πρώτη ομάδα προσβάλλει τα υποστρώματα πριν την συγκομιδή τους, για αυτό και ονομάζεται μύκητες αγρού (field fungi). Η κατηγορία αυτή μπορεί να χωριστεί σε 3 μικρότερες υποκατηγορίες:

- Φυτοπαθογόνοι μύκητες, όπως ο *Fusarium graminearum*.
- Μύκητες, οι οποίοι αναπτύσσονται σε νεκρωμένα ή καταπονημένα φυτά, όπως ο *Fusarium moniliforme* και μερικές φορές ο *Aspergillus flavus*.
- Μύκητες, οι οποίοι αποικίζουν το φυτό πριν την συγκομιδή, ωστόσο παράγουν την τοξίνη μετά την συγκομιδή. Παραδείγματα αυτών είναι οι *Penicillium verrucosum* και *A. flavus* (aflatoxin).

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει μύκητες, οι οποίοι βρίσκονται στα προϊόντα, αποκλειστικά μετά την συγκομιδή και ονομάζονται μύκητες αποθήκευσης (storage fungi). Οι μύκητες αυτοί μπορεί να μολύνουν τα προϊόντα σε οποιοδήποτε μετασυλλεκτικό στάδιο, όπως στην αποθήκευση, τη μεταφορά, τη διατήρηση, την αποθήκευση και την συσκευασία.

Οι ακριβείς συνθήκες, οι οποίες ευνοούν την παραγωγή των μυκοτοξινών δεν είναι απολύτως κατανοητές. Ωστόσο, φαίνεται πως αυτές σχετίζονται με τις κακές συνθήκες υγιεινής κατά την διάρκεια της μεταφορά και της αποθήκευσης. Επιπλέον, συνθήκες, όπως οι υψηλές θερμοκρασίες και το ποσοστό υγρασίας (τόσο στο περιβάλλον, όσο και στο ίδιο το προϊόν) φαίνεται πως συμβάλουν στην παραγωγή τους.

Η τοξική επίδραση της εκάστοτε μυκοτοξίνης καθορίζεται από πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες, όπως το είδος του μύκητα, την χημική φύση της τοξίνης, την ποσότητα της καθώς και παράγοντες που αφορούν τον οργανισμό ο οποίος τις καταναλώνει, όπως το είδος, το φύλο, το μέγεθος κλπ (Tola & Kebede, 2016).

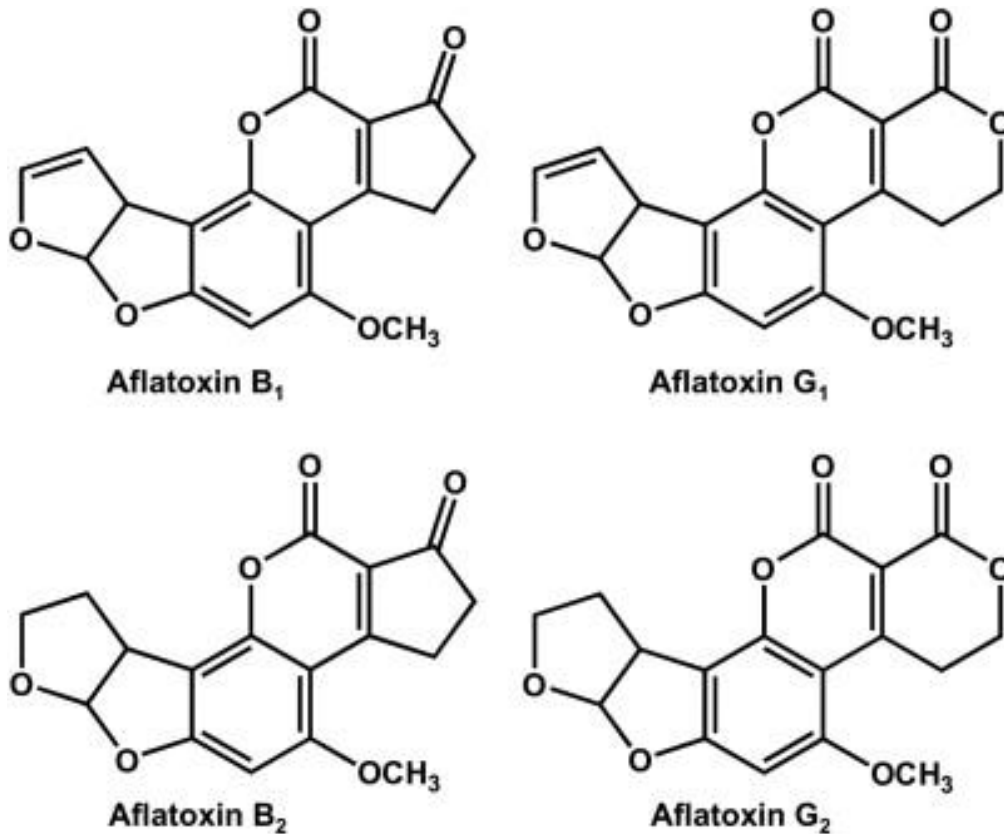
Συνολικά υπάρχουν 5 διαφορετικές κατηγορίες μυκοτοξινών, οι οποίες μπορεί να βρεθούν σε τρόφιμα. Αυτές είναι οι παρακάτω:

- Οι αφλατοξίνες
- Οι φουμονισίνες
- Η ωχρατοξίνη
- Η ζεαραλενόνη
- Η δεοξυनिβαλενόλη

Οι αφλατοξίνες αποτελούν κατά βάση δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των μυκήτων *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus*. Οι 4 κυριότερες αφλατοξίνες, οι οποίες απαντώνται στην φύση είναι οι Αφλατοξίνες B1 (ΑΦΒ1), B2 (ΑΦΒ2), G1 (ΑΦΓ1) και G2 (ΑΦΓ2). Παράλληλα μπορεί να βρεθούν και οι αφλατοξίνες M1 και M2, οι οποίες αποτελούν μεταβολίτες των B1 και B2 αντίστοιχα, οι οποίοι παρουσιάζουν μικρότερα επίπεδα τοξικότητας.

Από αυτές, η πιο τοξική και καρκινογόνος θεωρείται η αφλατοξίνη B₁. Η κατανάλωση της σχετίζεται με περιστατικά καρκινογένεσεων, καθώς και με ηπατοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα.

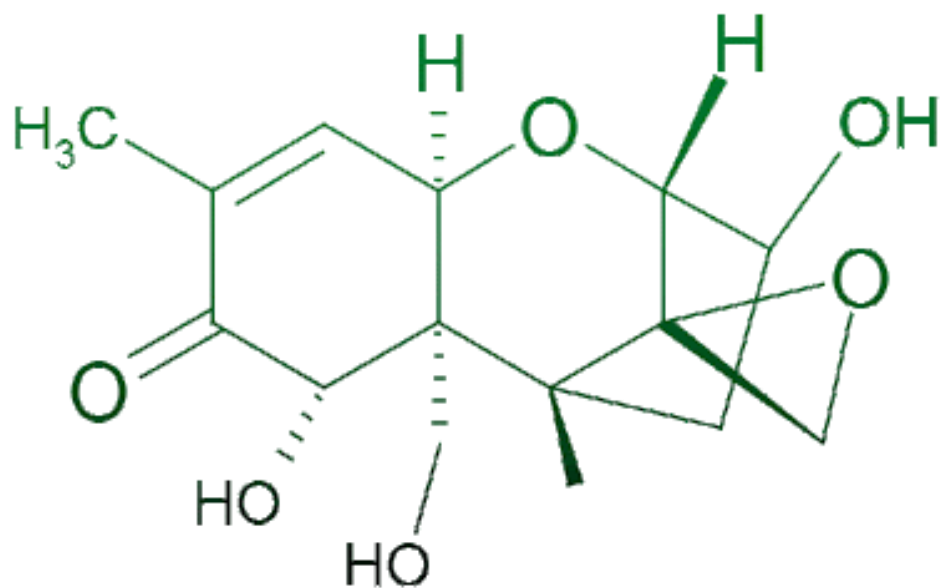
Υψηλά επίπεδα αφλατοξινών μπορούν να βρεθούν σε προϊόντα όπως ο αραβόσιτος, το φιστικάλευρα, το βαμβακάλευρο κλπ.



Εικόνα 2: Δομές των 4 κύριων αφλατοξινών

<https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/aflatoxin>

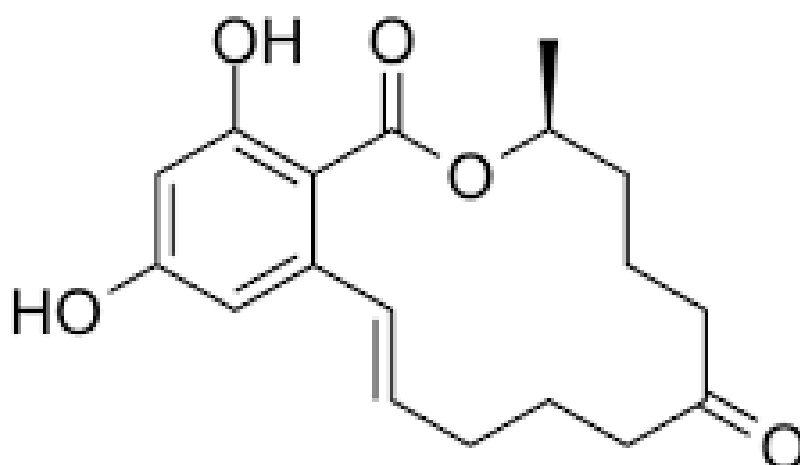
Η δεοξυनिβαλενόλη, η οποία είναι γνωστή και ως εμετοτοξίνη αποτελεί δευτερογενές προϊόν το μεταβολισμού του μύκητα *Fusarium graminearum* και του *F. culmorum*. Ανήκει στην οικογένεια των τριχοθικινών. Η τοξίνη αυτή απαντάται κυρίως σε δημητριακά, όπως το σιτάρι, το κριθάρι και το σόργο. Η κατανάλωση της μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στο γαστρεντερικό σύστημα, ενώ φαίνεται πως σχετίζεται και με περιστατικά εμφάνισης καρκίνου, ιδιαίτερα στον οισοφάγο.



Εικόνα 3: Δομή της δεοξυनिβαλενόλης

(<http://www.mycotoxins.info/en/mycotoxins/common-mycotoxins/deoxynivalenol/>)

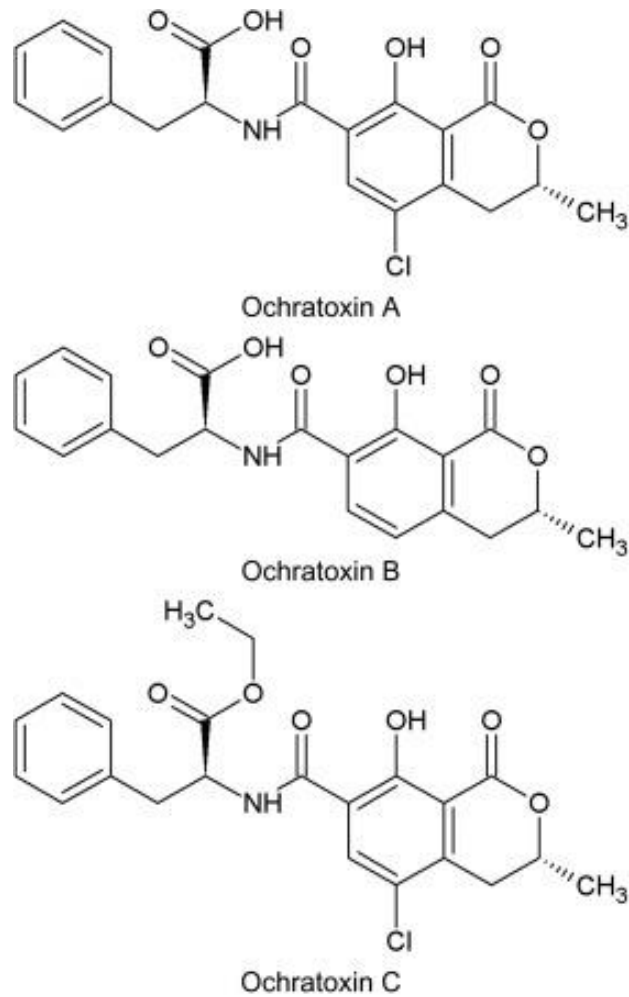
Η ζεαραλενόνη πρόκειται για μία μη στεροειδή οιστρογονική μυκοτοξίνη, η οποία παράγεται από μύκητες του γένους *Fusarium*, με κυριότερο τον *F. Graminearum*. Βρίσκεται κυρίως σε δημητριακά. Η παραγωγή της φαίνεται να είναι μικρή πριν την συλλογή των καρπών, ενώ αυξάνεται κατά το στάδιο της αποθήκευσης, ιδιαίτερα όταν τα ποσοστά υγρασίας είναι αυξημένα. Επιπλέον, απαντάται συχνά σε συνδιασμό με την δεοξυनिβαλενόλη. Η κατανάλωση της φαίνεται πως έχει οιστρογόνο δράση και επηρεάζει την φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος διαφορετικών ζώων.



Εικόνα 4: Δομή της ζεαραλενόνης

<https://www.medchemexpress.com/Zearalenone.html>

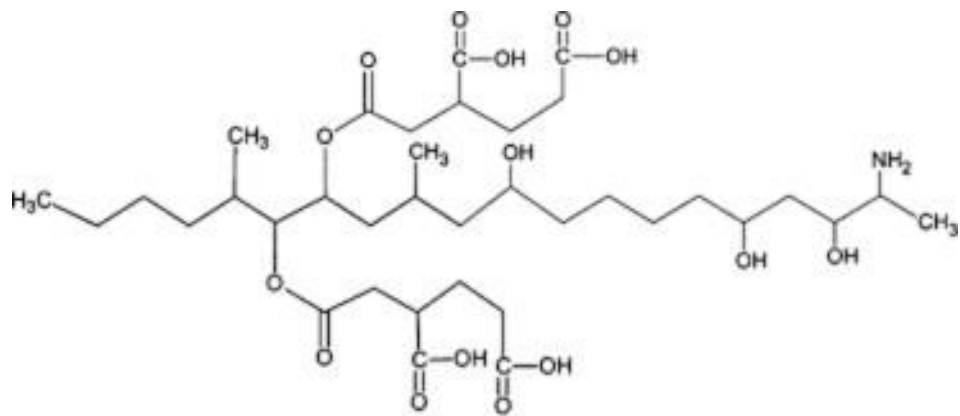
Στην οικογένεια των ωχρατοξινών βρίσκονται 3 διαφορετικές ενώσεις, η Α, η Β και η Γ. Από αυτές η Α θεωρείται η πιο τοξική. Παράγεται κυρίως από τους μήκυτες *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium viridictum*. Η ωχρατοξίνη Α έχει βρεθεί στον αραβόσιτο, το κριθάρι, το σιτάρι, και τη βρόμη. Παράλληλα, μπορεί να βρεθεί και σε προϊόντα όπως ο καφές ή το κρασί. Είναι ιδιαίτερα τοξική για τους νεφρούς, και μπορεί να προκαλέσει τερατογενέσεις σε διαφορετικούς ζωικούς οργανισμούς.



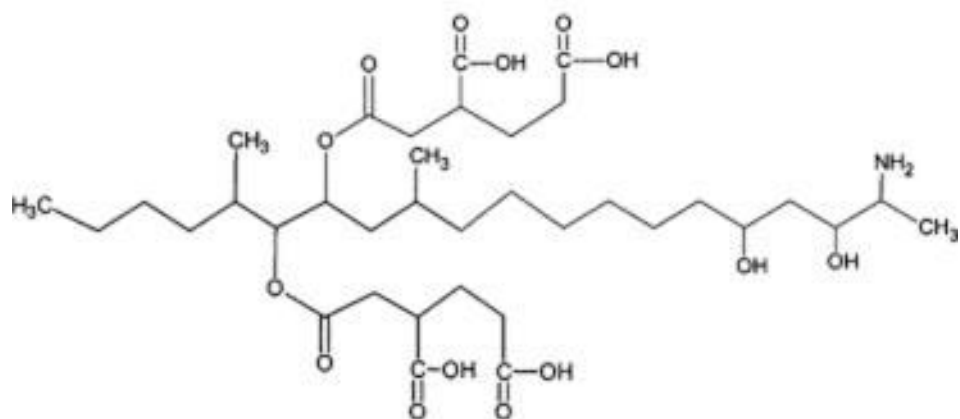
Εικόνα 5: Δομή των 3 κύριων ωχρατοξινών

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114100000726>)

Τέλος, υπάρχουν δύο κύριες φουμονισίνες, η Β1 και η Β2. Παράγονται κυρίως από τον μύκητα *Fusarium moniliforme* στον αραβόσιτο. Η κατανάλωση της φαίνεται να σχετίζεται με τοξικότητα στο ήπαρ, καθώς και με την ύπαρξη αναπνευστικών προβλημάτων σε διαφορετικά είδη ζώων.



Fumonisin B₁



Fumonisin B₂

Εικόνα 6: Δομές των 2 κύριων φουμονισίνων

https://www.researchgate.net/publication/228117515_Impact_of_mycotoxins_on_human_and_animals/figures?lo=1

1.3.2 Λεκτίνες

Οι λεκτίνες είναι μία κατηγορία γλυκοπρωτεϊνών (δηλαδή πρωτεϊνών οι οποίες είναι ενωμένες με μία υδατανθρακική υπομονάδα), οι οποίες μπορούν να συνδέονται αντιστρεπτά σε άλλους υδατάνθρακες, χωρίς να αλλάζουν τη δομή τους.

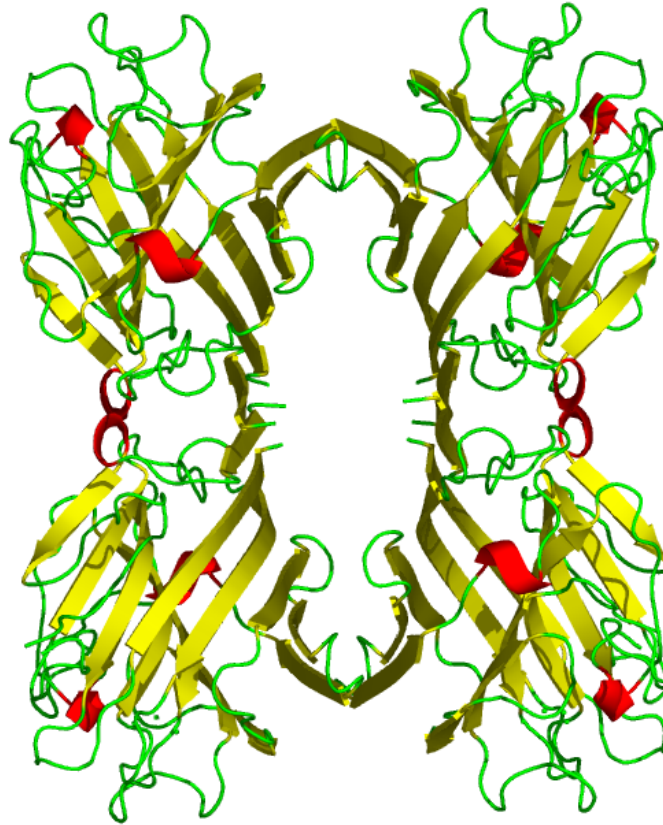
Βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα όσπρια, και κυρίως στα μαύρα φασόλια, τα φασόλια σόγιας, τις φακές, τα κόκκινα φασόλια κλπ. Επιπλέον, μπορεί να βρεθούν και σε διαφορετικά δημητριακά.

Οι λεκτίνες μπορούν να προκαλέσουν μία σειρά από διαφορετικές τοξικότητες στον οργανισμό.

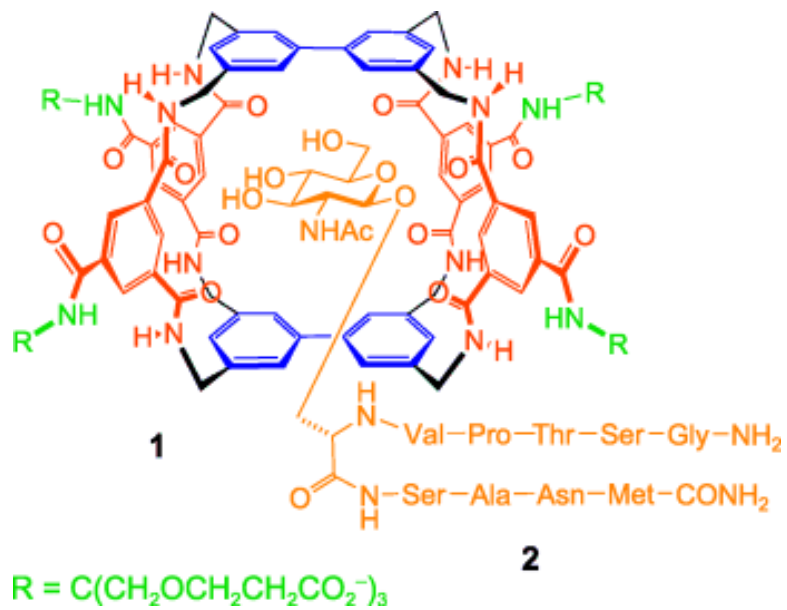
- Μπορούν να συνδεθούν με τα αντιγόνα των ομάδων αίματος του οργανισμού (τα οποία αποτελούνται από μεγάλες υδατανθρακικές ομάδες) και να προκαλέσουν συγκόλληση στο αίμα. Για τον λόγο αυτό εναλλακτικά καλούνται αιμοσυγκολλητίνες ή αιμογλουτινίνες.
- Μπορούν να συνδεθούν στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και να οδηγήσουν σε μείωση της απορρόφησης των διαφορετικών θρεπτικών συστατικών, δρώντας δηλαδή ως αντιθρεπτικοί παράγοντες.
- Επιπλέον, φαίνεται πως προκαλούν αλλαγές στην φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου.

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές λεκτίνες, οι οποίες μπορεί να εμφανίσουν τοξική δράση. Η κυριότερη από αυτές είναι η φυτοαιμοσυγκολλητίνη (Phytohaemagglutinin, PHA), η οποία βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες σε διαφορετικά όσπρια, όπως τα κόκκινα φασόλια και η φάβα. Τα κύρια συμπτώματα της τοξικότητας από PHA στους ανθρώπους είναι η εμφάνιση ναυτίας, εμετού, διάρροιας εντός 3 ωρών από την κατανάλωση τους. Τα συμπτώματα υποχωρούν περίπου 4 με 5 ώρες μετά την εμφάνιση τους.

Επιπλέον, φαίνεται πως οι λεκτίνες βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε ωμά όσπρια έναντι μαγειρεμένων (He, Simpson, Sun, Ngadi, & Ma, 2015).



Εικόνα 7: Δομή της φυτόαιμοσυγκολλητίνης
 (<https://sites.google.com/site/phytohaemagglutininpha/>)



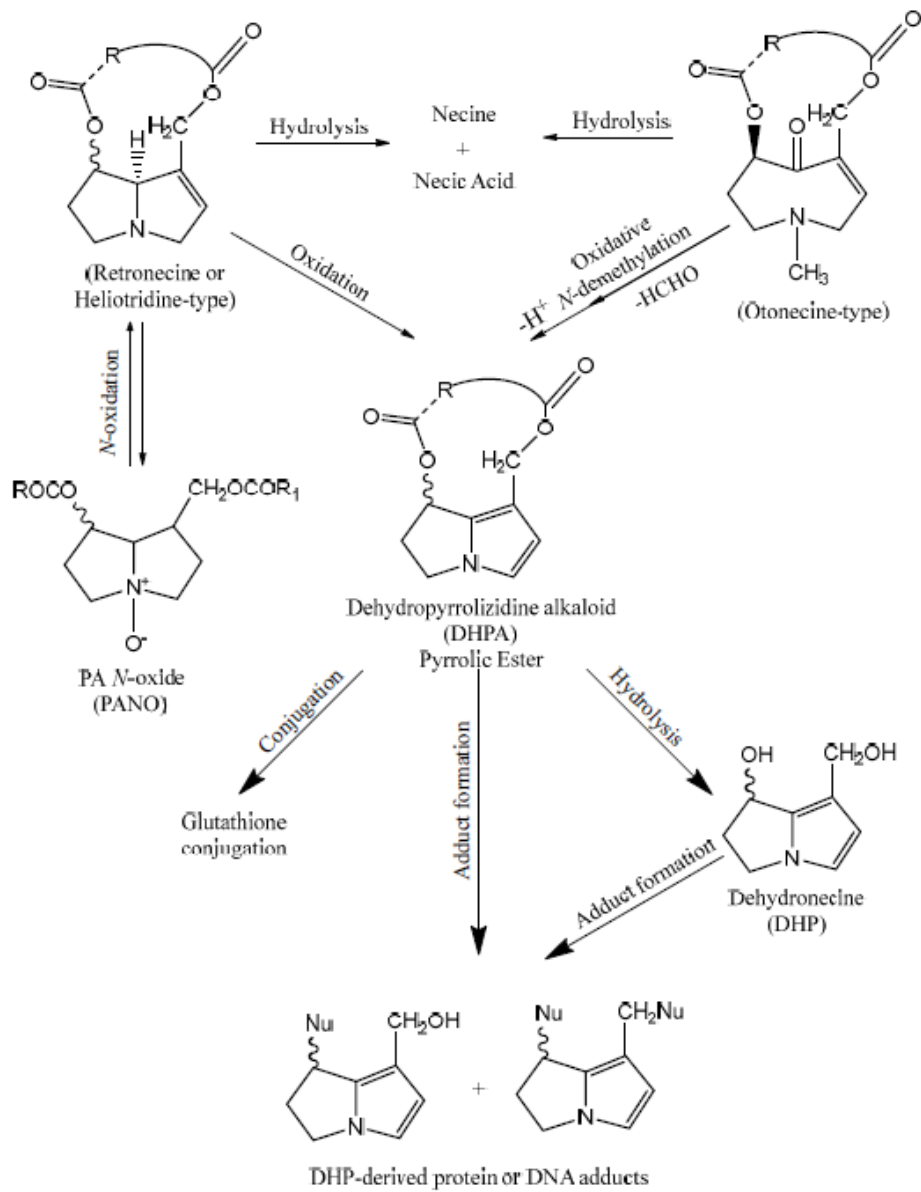
Εικόνα 8: Θέση πρόσδεσης σακχάρου στην φυτοαιμοσυγκολλητίνη
 (<https://sites.google.com/site/phytohaemagglutininpha/>)

1.3.3 Αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης

Τα αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης είναι μία κατηγορία ενώσεων, η οποία παράγεται από περισσότερα από 600 είδη φυτών. Μεταξύ αυτών των βρίσκονται φυτά τα οποία ανήκουν στις οικογένειες *Apocynaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Compositae*, *Fabaceae*, *Leguminosae*, *Ranunculaceae* και *Scrophulariaceae*.

Ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί στα αλκαλοειδή αυτά μέσω δύο διαφορετικών τρόπων. Ο πρώτος είναι μέσω της ακούσιας κατανάλωσης τροφίμων, τα οποία είναι επιμολυσμένα με φυτά, τα οποία παράγουν αλκαλοειδή. Ο δεύτερος είναι μέσω της ηθελμένης κατανάλωσης των τροφίμων αυτών ή διαφόρων παραδοσιακών φυτικών θεραπειών. Παράλληλα μπορεί να βρεθούν και σε προϊόντα, όπως το γάλα και το μέλι. Επιπροσθέτως, φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στις διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας των τροφίμων.

Η δομή τους βασίζεται στην ένωση 3 πενταμερών δακτυλίων, οι οποίοι μοιράζονται ένα άτομο αζώτου, σχηματίζοντας έτσι ένα τριτογενές αλκαλοειδές. Επιπλέον, οι δακτύλιοι αυτοί περιέχουν μία ομάδα υδροξυμεθυλενίου στον άνθρακα C-1 και μία υδροξυλική ομάδα στον άνθρακα C-7 σχηματίζοντας έτσι μία βάση νεκίνης. Διαφορετικά αλκαλοειδή με ακόρεστους δακτυλίους μπορεί να εμφανίσουν ηπατοτοξική, μεταλλαξιγόνο και τερατογενή ή καρκινογόνο δράση. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ενζυματικής μετατροπής των αλκαλοειδών σε πυρόλες, οι οποίες δρουν στο DNA ως αλκυλιωτικοί παράγοντες. Επιπλέον, οι πυρρόλες αυτές, αν και σχηματίζονται στο ήπαρ, μπορούν να μεταφερθούν στους πνεύμονες, όπου και προκαλούν πάχυνση της πνευμονικής κυκλοφορίας και πνευμονική υπέρταση (Moreira & Pereira, 2018).



Εικόνα 9: Μεταβολισμός των αλκαλοειδών πυρρολιζιδίνης (Moreira & Pereira, 2018)

1.3.4 Φουρανοκουμαρίνες

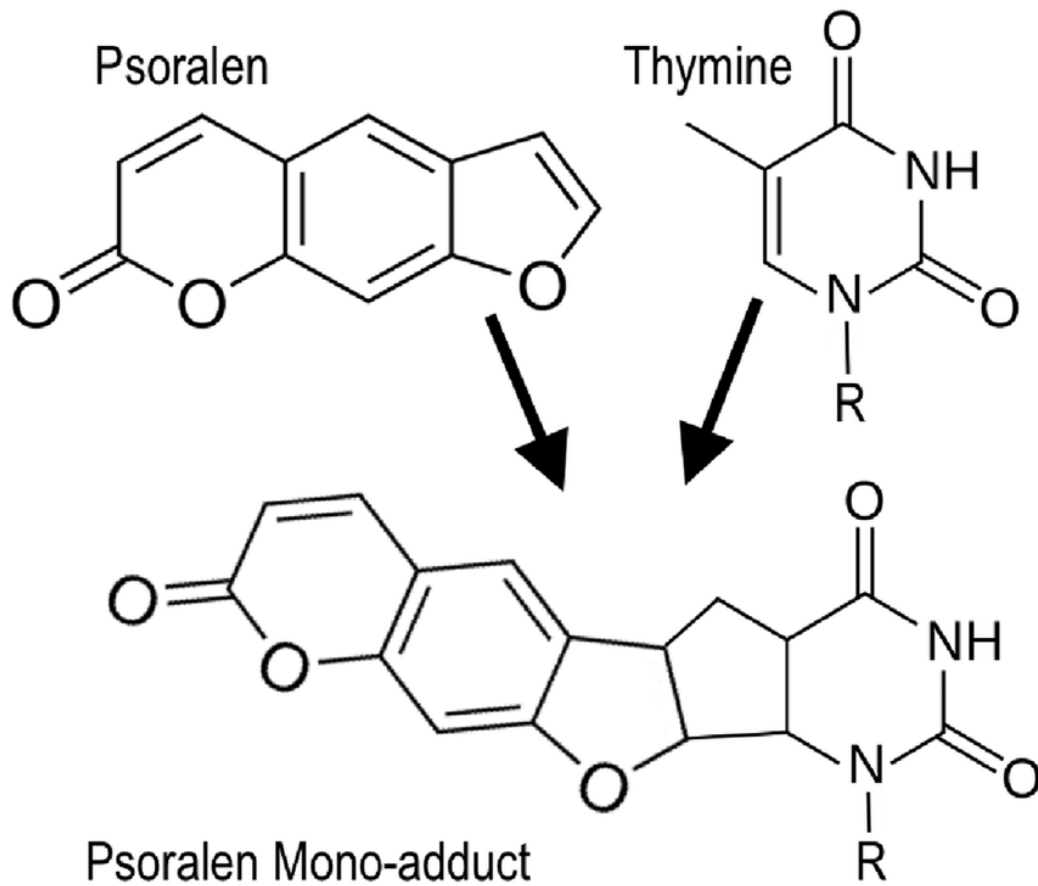
Οι φουρανοκουμαρίνες είναι μία κατηγορία οργανικών ενώσεων, οι οποίες παράγονται από πολλά είδη φυτών, ως απόκριση σε διαφορετικά είδη καταπονήσεων, όπως για παράδειγμα σε μηχανική βλάβη.

Επιπλέον, βοηθούν το φυτό να αναπτύξει την άμυνα του έναντι διαφορετικών παθογόνων παραγόντων, όπως ιών, βακτηρίων και μυκήτων, και για τον λόγο αυτό θεωρούνται ένα φυσικό "φυτοφάρμακο". Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις τους μπορεί να αυξηθούν μετά από έκθεση του φυτού σε υπεριώδη ακτινοβολία, αλλαγές στην θερμοκρασία, παρατεταμένη αποθήκευση, ή κατεργασία με διαφορετικούς χημικούς παράγοντες.

Παράγονται κυρίως από φυτά, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Rutaceae*, όπως για παράδειγμα τα εσπεριδοειδή, καθώς και στην οικογένεια *Umbelliferae*, όπως το παστινάκι, το καρότο, ο μαϊντανός και άλλα.

Οι 3 πιο βιολογικά ενεργές φουρανοκουμαρίνες είναι το ψωραλένιο (psoralen), το 5-μεθόξυψωραλένιο (5-methoxypsoralen, 5-MOP), και το 8-μεθόξυψωραλένιο (8-methoxypsoralen, 8-MOP).

Και οι 3 αυτές ενώσεις είναι φωτοτοξικές και προκαλούν φωτοδερματίτιδα. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία υπεριώδους φωτός (320–380 nm), και οι 3 δρουν ως προσθετικές ομάδες στο DNA οδηγώντας στη δημιουργία μεταλλάξεων. Οι συνέπειες αυτού είναι ο κυτταρικός θάνατος, οι μεταλλάξεις και οι αλλαγές στην δομή των χρωμοσωμάτων (Melough, Cho, & Chun, 2018).



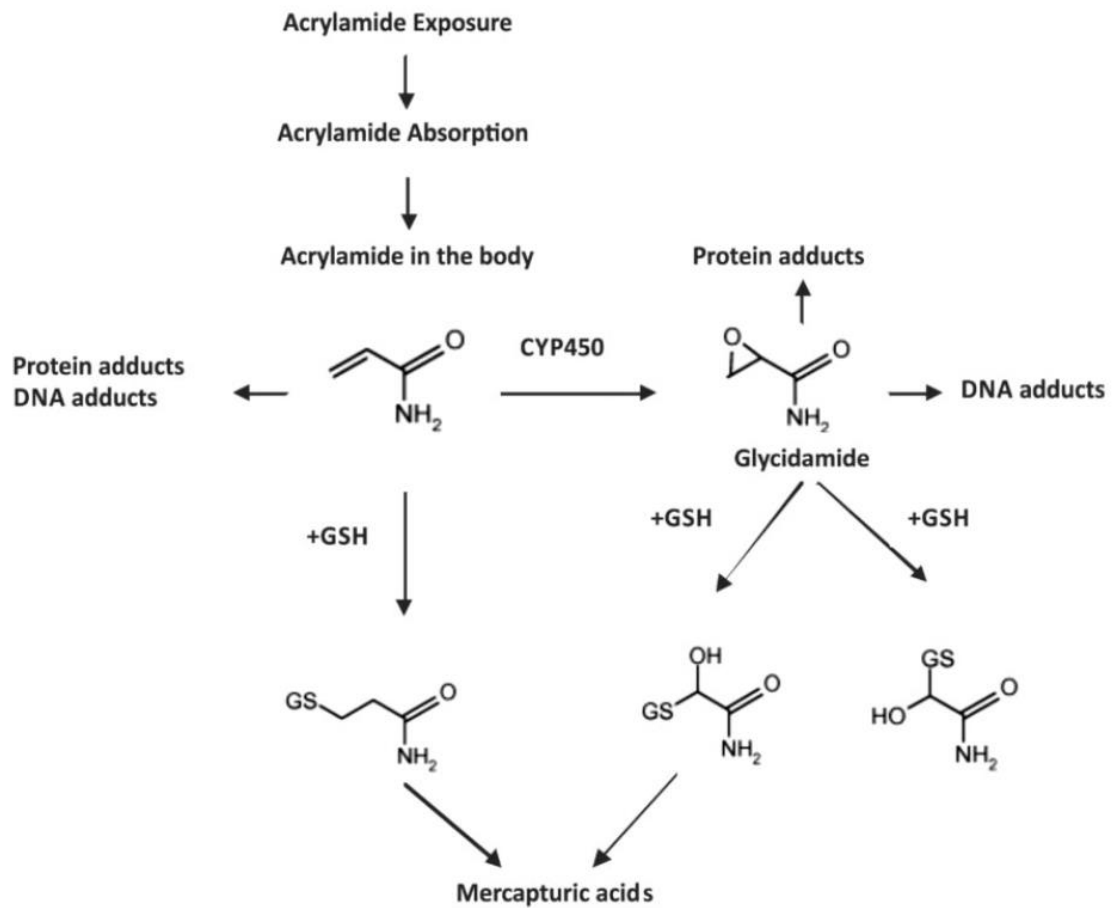
Εικόνα 10: Σύνδεση ψωραλενίου με την αζωτούχο βάση θυμίνη (Melough et al., 2018)

1.3.5 Ακρυλαμίδιο

Το ακρυλαμίδιο δημιουργείται σε αρκετά τρόφιμα τα οποία περιέχουν άμυλο, όταν αυτά μεγειρευτούν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 120 °C. Παράλληλα, μπορεί να βρεθεί σε προϊόντα, τα οποία έχουν ως βάση τους το κακάο, καθώς και σε καφέδες.

Σχηματίζεται μέσω των αντιδράσεων Maillard, οι οποίες πραγματοποιούνται μεταξύ της καρβονυλικής ομάδας ενός αναγωγικού σακχάρου και μίας πυρηνόφιλης ομάδας ενός αμινοξέος. Το αμινοξύ, το οποίο είναι απαραίτητο για τη δημιουργία του ακρυλαμιδίου είναι η ασπαραγίνη.

Το ακρυλαμίδιο είναι μία ένωση, η οποία είναι μεταλλαξιγόνα. Επιπλέον, φαίνεται να εμφανίζει νευροτοξική και καρκινογόνο δράση, ενώ φαίνεται να επηρεάζει και την ικανότητα αναπαραγωγής, μέσω του κύριου μεταβολίτη του, του γλυκιδαμιδίου. Και τα δύο δρουν ως ομάδες, οι οποίες προστίθενται στο DNA. (Rifai & Saleh, 2020).



Εικόνα 11: Μεταβολισμός του ακρυλαμιδίου στον οργανισμό (Rifai & Saleh, 2020)

1.4 Περιβαλλοντικά προερχόμενες τοξικές ουσίες

Ένας μεγάλος αριθμός από τοξικές ουσίες δεν εισέρχεται στα τρόφιμα εξαιτίας της παραγωγής τους από διάφορους οργανισμούς. Αντίθετα, μεταφέρεται εκεί από το περιβάλλον, στο οποίο βρίσκονται τα τρόφιμα αυτά.

Οι πηγές αυτών των ενώσεων μπορεί να είναι είτε απευθείας από το περιβάλλον, όπως για παράδειγμα εξαιτίας της διάβρωσης των διαφόρων ορυκτών ή από το έδαφος, είτε αποτέλεσμα της δραστηριότητας του ανθρώπου στο κοντινό περιβάλλον, όπως για παράδειγμα μέσω της γεωργίας ή της λειτουργίας διαφόρων βιομηχανιών.

1.4.1 Βαρέα μέταλλα

Τα βαρέα μέταλλα (heavy metals) αποτελούν μία ευρεία κατηγορία μετάλλων, τα οποία μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, όπως την σχετικά υψηλή του πυκνότητα, την υψηλή ατομική μάζα και τον υψηλό ατομικό αριθμό. Ορισμένα από τα βαρέα αυτά μέταλλα, όπως ο σίδηρος, ο χαλκός, το κοβάλτιο και ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ορθή θρέψη και λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Ορισμένα άλλα, όπως για παράδειγμα το ιώδιο ή ο άργυρος είναι αβλαβή σε μικρές ποσότητες αλλά τοξικά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Τέλος, άλλα είναι ιδιαίτερα τοξικά και πιθανά θανατηφόρα ακόμα και σε ιδιαίτερα μικρές ποσότητες.

Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν από τους κυριότερους ρυπαντές του εδάφους και των υδάτων, όπου στην συνέχεια εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα. Η ρύπανση αυτή μπορεί να οφείλεται σε δύο διαφορετικές πηγές. Η πρώτη είναι μέσω διαφόρων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, όπως για παράδειγμα από βιομηχανικά απόβλητα, εξορύξεις ορυκτών, διάφορα απόβλητα, βενζίνη, διάφορες βιομηχανίες, καθώς και ατμοσφαιρική κατακρήμνιση. Ο άλλος τρόπος είναι μέσω της φυσικής διάβρωσης

ορισμένων ορυκτών ή πετρωμάτων, τα οποία τα περιέχουν σε υψηλές ποσότητες (Nkwunonwo, Odika, & Onyia, 2020).

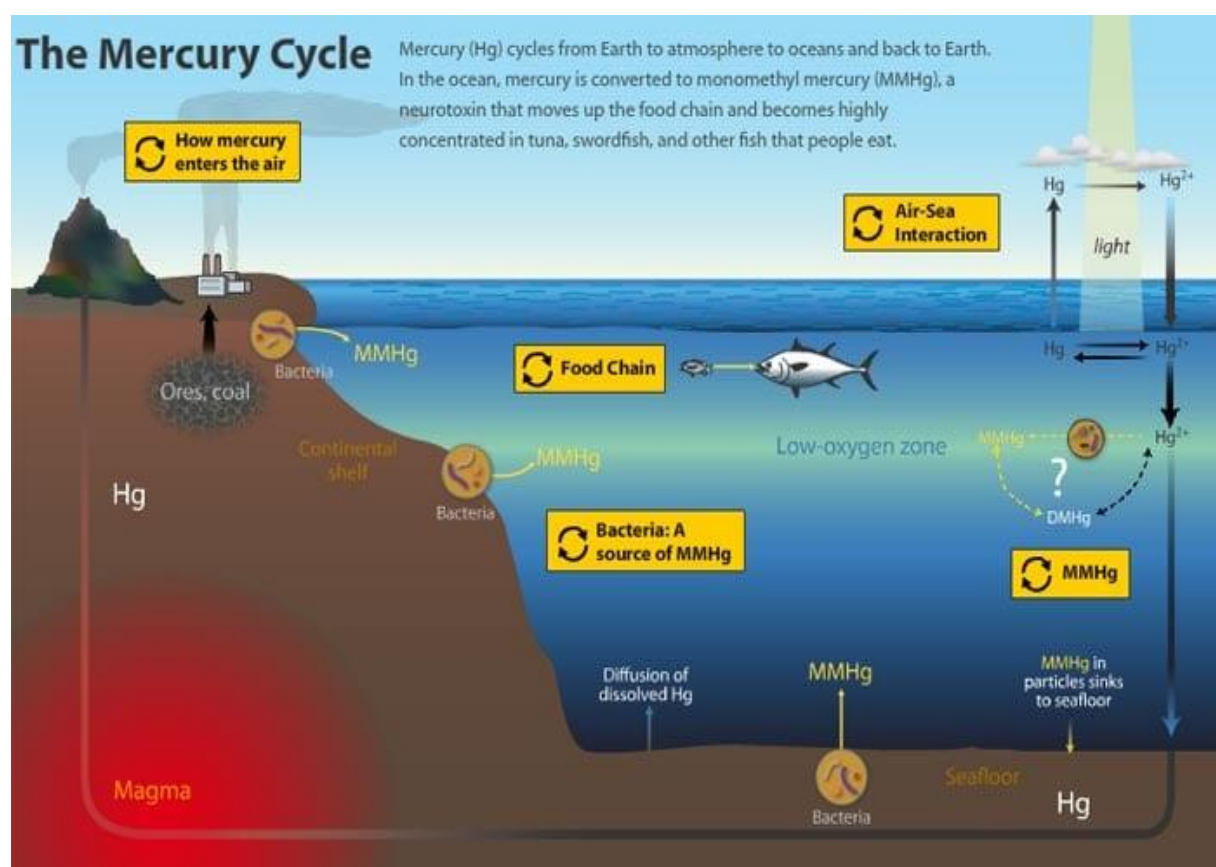
Τα κυριότερα βαρέα μέταλλα, τα οποία βρίσκονται στα τρόφιμα, καθώς και η τοξικότητα την οποία προκαλούν συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

ΒΑΡΥ ΜΕΤΑΛΛΟ	ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ
ΜΟΛΥΒΔΟΣ (PB)	Επιπλοκές στο νευρικό σύστημα και τα ερυθρά αιμοσφαίρια Μείωση στη νοητική και γνωστική ικανότητα Θάνατος ιδιαίτερα σε παιδιά
ΚΑΔΜΙΟ (CD)	Νεφρική δυσλειτουργία Αυξημένος κίνδυνος καρκίνου των πνευμόνων και του μαστού Οστεοπόρωση
ΑΡΣΕΝΙΚΟ (AS)	Δερματικά, αναπνευστικά, νευρικά προβλήματα Μεταλλαξιγόνος και καρκινογόνος δράση
ΝΙΚΕΛΙΟ (NI)	Δερματοτοξικότητα Μειωμένο σωματικό βάρος Τοξικότητα στο έμβρυο
ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΣ (HG)	Καρδιαγγειακή, αναπαραγωγική, αναπτυξιακή, νευρική, νεφρική, Ανοσολογική τοξικότητα Καρκινογόνος δράση

Πίνακας 1: Κύρια βαρέα μέταλλα στα τρόφιμα και τοξικές τους δράσεις (Thompson & Darwish, 2019)

Όσον αφορά τον υδράργυρο, αυτός δεν απορροφάται υπό την στοιχειακή του μορφή. Αντίθετα, η μορφή του, η οποία είναι ικανή να αποθηκευτεί στους οργανισμούς και να εμφανίσει τοξικότητα είναι ο μεθυλικός υδράργυρος.

Ο μεθυλικός υδράργυρος μπορεί να βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε διαφορετικά ψάρια και άλλα θαλάσσια προϊόντα. Αυτό συμβαίνει καθώς ενσωματώνεται στα κατώτερα στρώματα της τροφικής αλυσίδας και στην συνέχεια μετακινείται και συσσωρεύεται σε υψηλότερα επίπεδα, έως ότου καταλήξει στον άνθρωπο.



Εικόνα 12: Ο κύκλος του υδραργύρου στο περιβάλλον

<https://www.whoi.edu/oceanus/feature/how-does-toxic-mercury-get-into-fish/>

1.4.2 Γεωργικά φάρμακα

Ιδιαίτερα τα τελευταία 100 περίπου χρόνια, η συνεχόμενη αύξηση του ανθρωπίνου πληθυσμού, καθώς και η ανάγκη σίτισης του έχει οδηγήσει στην εντατικοποίηση της γεωργίας.

Η εντατικοποίηση αυτή χαρακτηρίζεται από την εκτεταμένη χρήση διαφόρων, συνήθως χημικών συνθετικών, γεωργικών φαρμάκων και λιπασμάτων, με σκοπό την αύξηση της παραγωγής. Τα γεωργικά αυτά φάρμακα μπορούν να χωριστούν σε διαφορετικές κατηγορίες. Μερικές από αυτές είναι τα ζιζανιοκτόνα, τα οποία καταπολεμούν τα ζιζάνια, δηλαδή ανεπιθύμητα φυτά που ανταγωνίζονται την καλλιέργεια, τα μυκητοκτόνα, τα οποία καταπολεμούν φυτοπαθογόνους μύκητες και τα εντομοκτόνα, τα οποία καταπολεμούν έντομα εχθρούς της καλλιέργειας.

Ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα προκύπτει όταν τα φάρμακα αυτά εμφανίζουν υψηλή υπολειμματική δράση, δηλαδή μπορούν να παραμείνουν για μεγάλες χρονικές περιόδους εντός του παραγόμενου προϊόντος. Αυτό συμβαίνει καθώς με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσληφθούν από τον καταναλωτή.

Τόσο η υπολειμματική διάρκεια, όσο και η τοξικότητα μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων. Γενικά, πλέον προτείνονται γεωργικά φάρμακα, τα οποία είναι αποτελεσματικά στην χρήση τους αλλά εμφανίζουν και μικρή τοξική και υπολειμματική δράση (Bajwa & Sandhu, 2014).

1.4.3 Μικροπλαστικά

Ένα ζήτημα, το οποίο αφορά την ασφάλεια των τροφίμων και έχει αναδυθεί τα τελευταία χρόνια ως πεδίο έντονης συζήτησης και ενδιαφέροντος είναι η παρουσία των διαφόρων μικροπλαστικών εντός της τροφικής αλυσίδας.

Ως μικροπλαστικά μπορούν να οριστούν ως τα διάφορα εκείνα σωματίδια, τα οποία είναι φτιαγμένα από πλαστικό υλικό και έχουν μέγεθος μικρότερο από 5mm. Τα σωματίδια αυτά μπορεί να έχουν το μέγεθος αυτό ηθελημένα εξαιτίας της

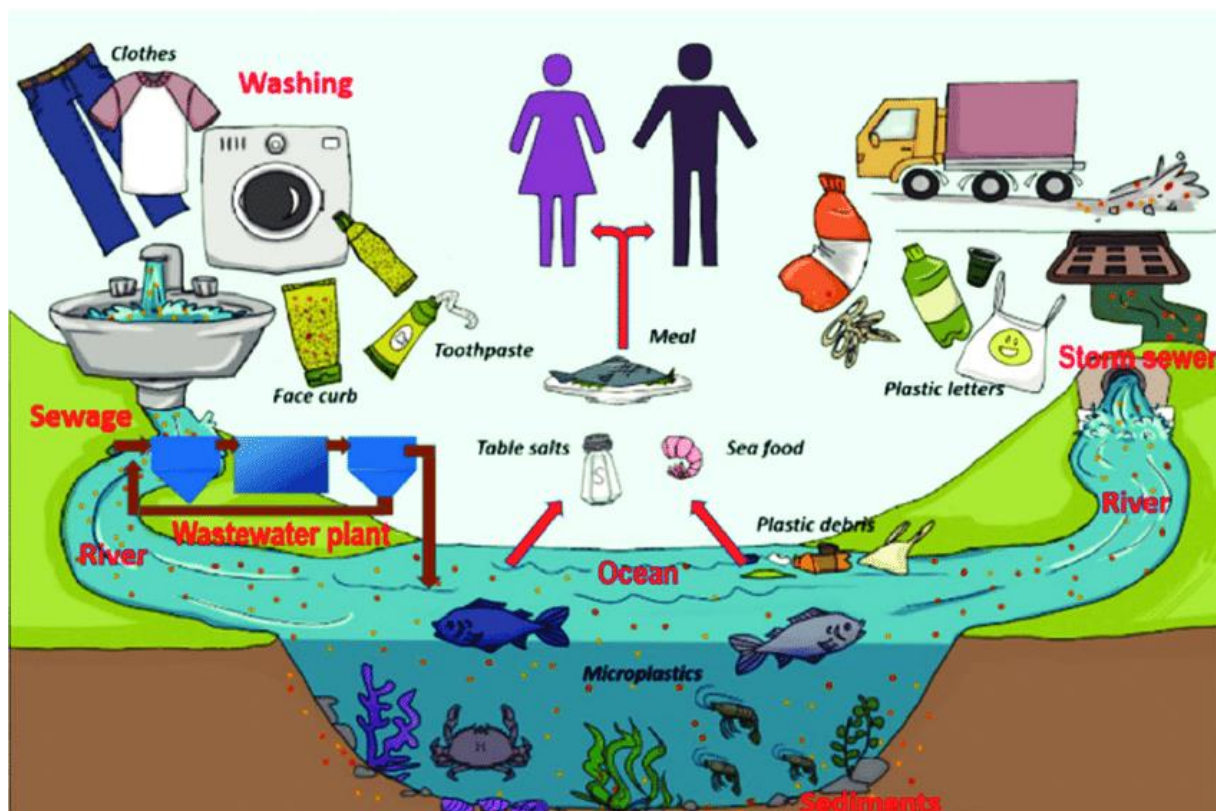
κατασκευής τους, οπότε και ονομάζονται πρωτογενή μικροπλαστικά (primary microplastics), ή μπορεί να αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης ή διάσπασης μεγαλύτερων σωμάτων πλαστικών, οπότε και ονομάζονται δευτερογενή μικροπλαστικά (secondary microplastics).

Τα μικροπλαστικά αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικό πεδίο ανησυχίας καθώς φαίνεται να βρίσκονται σε ολόένα και αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε διαφορετικά οικοσυστήματα. Ιδιαίτερα σοβαρό πρόβλημα φαίνεται να αντιμετωπίζουν τα υδάτινα οικοσυστήματα, ωστόσο μπορεί να βρεθούν και σε χερσαία. Στην συνέχεια αυτά μπορεί να βρεθούν τόσο εντός των ψαριών ή άλλων προϊόντων, όπως το θαλασσινό αλάτι, και από εκεί να καταναλωθούν από τον άνθρωπο.

Το αποτέλεσμα, το οποίο έχει η κατανάλωση των μικροπλαστικών φαίνεται να σχετίζεται με το μέγεθος των σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερου των 150μm δεν απορροφούνται από τον οργανισμό και προκαλούν τοπικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις, ενώ αντιθέτως σωματίδια με μικρότερο μέγεθος φαίνεται πως μπορεί να προκαλέσουν συστηματική έκθεση. Ακόμα μικρότερα σωματίδια, της τάξης των 1.5μm φαίνεται πως μπορεί να προκαλέσουν διατρήσεις στα όργανα του οργανισμού. Επιπλέον, φαίνεται πως και η χημική φύση του εκάστοτε πλαστικού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα που μπορεί να έχει στον εκάστοτε οργανισμό.

Όσον αφορά τις τοξικές επιδράσεις, τις οποίες εμφανίζουν τα μικροπλαστικά, αυτές δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα στον άνθρωπο, ωστόσο σε πρώτη φάση δεν φαίνεται να προκαλούν έντονη τοξικότητα.

Ωστόσο, φαίνεται πως προκαλούν ιδιαίτερα σοβαρά προβλήματα στους υδρόβιους οργανισμούς, είτε μέσω απόφραξης των γαστρεντερικών τους οδών, είτε μέσω μειωμένης πρόσληψης θρεπτικών ουσιών. Και οι δύο αυτές καταστάσεις μπορούν να οδηγήσουν στον θάνατο ή τη μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα, με αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού απόδοσης και παραγωγής των συγκεκριμένων ειδών (Rainieri & Barranco, 2019).



Εικόνα 13: Πηγές μικροπλαστικών και εισαγωγή τους σε υδρόβια οικοσυστήματα και από εκεί στον άνθρωπο

(https://www.researchgate.net/publication/323927301_Challenges_and_Treatment_of_Microplastics_in_Water)

Κεφάλαιο 2 – Βασικές αρχές τεχνικών ανίχνευσης τοξικών ουσιών

2.1 Ανοσολογικές τεχνικές- ELISA

Οι διάφορες ανοσολογικές τεχνικές, οι οποίες είναι γνωστές και ανοσολογικές δοκιμασίες (immunoassays), βασίζονται στην εξειδικευμένη αλληλεπίδραση, η οποία συμβαίνει μεταξύ ενός αντιγόνου και του αντισώματος, το οποίο το αναγνωρίζει.

Η πιο γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη ανοσολογική δοκιμασία, η οποία χρησιμοποιείται σε πολλά διαφορετικά εργαστήρια είναι η Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε το 1971 από τους Engvall και Perlmann, ως μία εναλλακτική των Ραδιοανοσολογικών τεχνικών, οι οποίες χρησιμοποιούνταν ως τότε και περιλάμβαναν την χρήση ραδιενεργά σημασμένων μορίων.

Η ELISA επικράτησε έναντι των υπόλοιπων ανοσολογικών τεχνικών καθώς εμφανίζει ορισμένα ιδιαίτερα σημαντικά πλεονεκτήματα. Αυτά είναι τα παρακάτω:

- Εμφανίζει υψηλή επαναληψιμότητα και ευαισθησία ανίχνευσης των μορίων στόχων, είτε αυτά είναι αντιγόνα είτε αντισώματα
- Δεν απαιτείται η χρήση επικίνδυνων ουσιών ή τεχνικών, όπως για παράδειγμα ραδιενέργειας
- Πρόκειται για μία ιδιαίτερα ευέλικτη μέθοδο, στην οποία μπορεί να χρησιμοποιηθούν πολλαπλά διαφορετικά αντιδραστήρια ή μέθοδοι ανίχνευσης. Αυτό βοηθάει στην προσαρμογή της στις ιδιαίτερες απαιτήσεις τις οποίες εμφανίζει η ανίχνευση του κάθε διαφορετικού αντιγόνου ή αντισώματος

2.1.1 Βασικά στάδια και ευαισθησία της ELISA

Ανεξαρτήτως της παραλλαγής της, σε κάθε τύπο της ELISA υπάρχουν 3 κοινά βασικά στάδια. Αυτά είναι τα παρακάτω:

- Πρόσδεση και ακινητοποίηση του αντιγόνου ή του αντισώματος σε μία στερεή επιφάνεια. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται ανοσοπροσρόφηση
- Χρήση αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο (enzyme-linked antibody)
- Χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν ένα διαλυτό έγχρωμο προϊόν (συνήθως χρώμα ή φθορίζον σήμα) επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος.

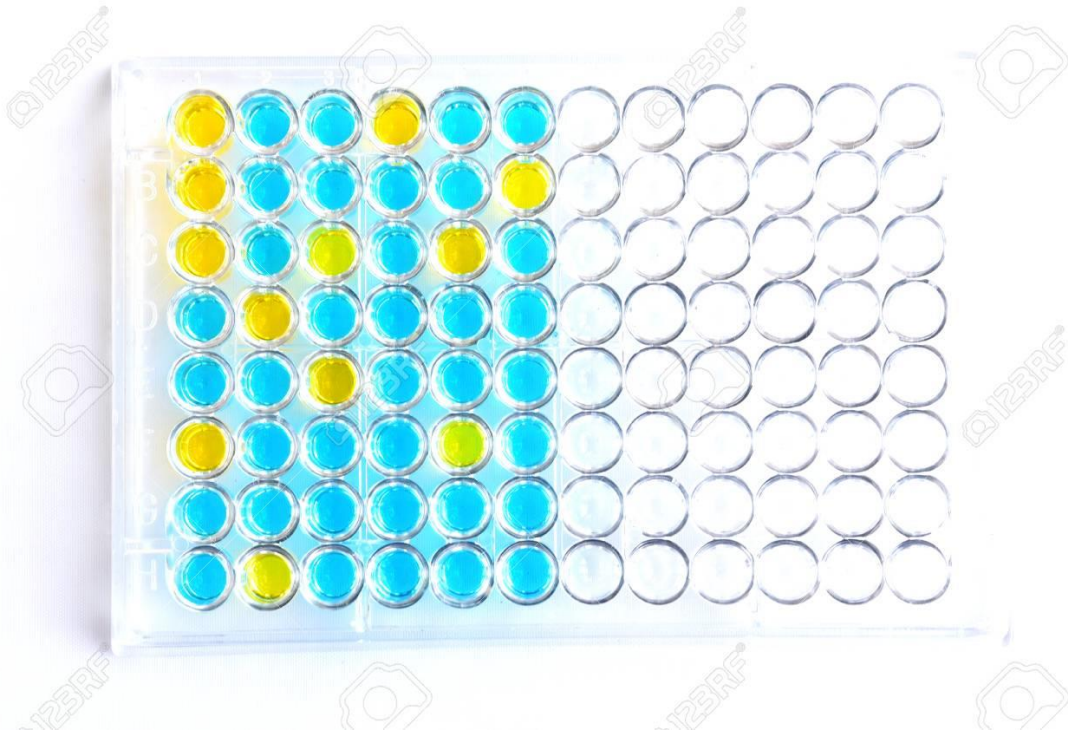
Κατά το στάδιο της ανοσοπροσρόφησης, το υπό εξέταση αντιγόνο ή αντίσωμα ακινητοποιείται σε στερεά επιφάνεια. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικούς τρόπους και κυρίως είτε μέσω χημικού δεσμού. Όπως για παράδειγμα στην προσκόλληση σε σφαιρίδια κυτταρίνης, αγαρόζης, πολυακρυλαμιδίου, είτε μέσω φυσικής προσρόφησης με υδρόφοβο δεσμό, όπως για παράδειγμα στην προσρόφηση σε πλαστική επιφάνεια.

Η επιλογή του κατάλληλου ενζύμου και αντίστοιχου υποστρώματος εξαρτάται από την τεχνική, την οποία θέλει να εφαρμόσει ο εκάστοτε ερευνητής. Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς διαφορετικά ένζυμα, όπως η ραφανική υπεροξειδάση (HRP), η αλκαλική φωσφατάση (AP) και η β-γαλακτοσιδάση (β-Gal).

Η επιλογή του ζεύγους ενζύμου-υποστρώματος της χρωμογόνου αντίδρασης είναι και αυτή που καθορίζει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Οι κύριες παράμετροι, οι οποίες συντελούν στην επιλογή του συστήματος ενζύμου-υποστρώματος και εξασφαλίζουν την υψηλότερη ευαισθησία της δοκιμασίας είναι:

- η ταχύτατη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος έτσι ώστε να παράγεται έγχρωμο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα

- το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης να μπορεί να ανιχνευθεί με μεγάλη ευαισθησία, συνήθως με μεθόδους φασματοφωτομετρίας
- η ενζυμική δραστηριότητα να μην επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που βρίσκονται εντός του εξεταζόμενου δείγματος.



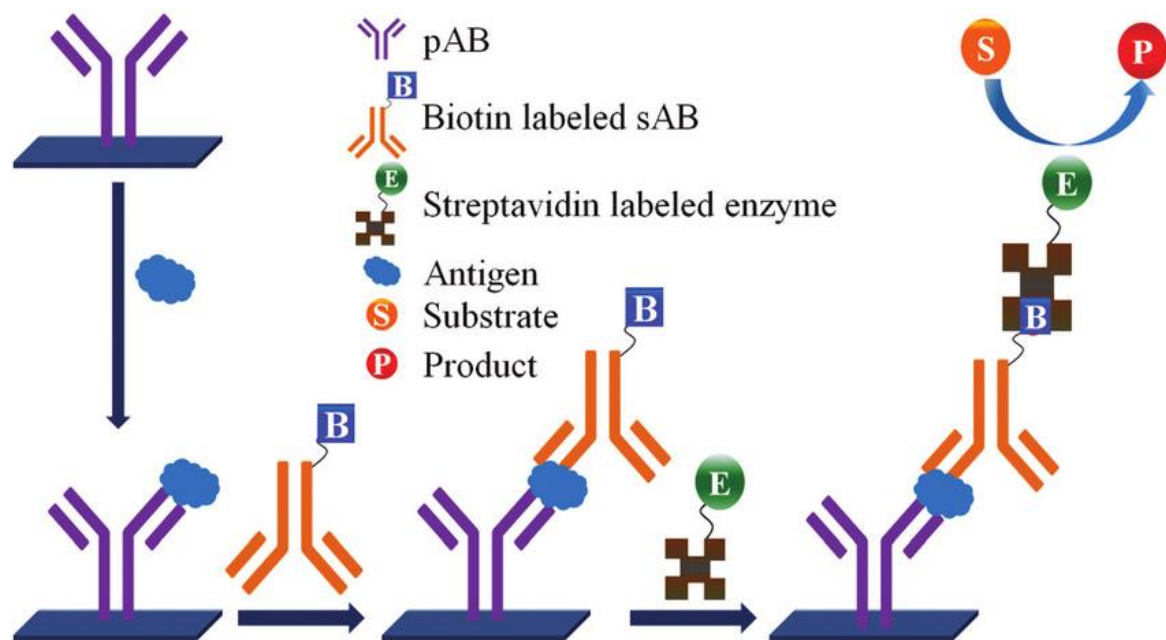
Εικόνα 14: Πλάκα ELISA, στην οποία διακρίνονται διαφορετικά χρώματα αντιδράσεων (https://www.123rf.com/photo_108058795_enzyme-linked-immunosorbent-assay-or-elisa-plate.html)

Η ευαισθησία της ELISA μπορεί να αυξηθεί αλλάζοντας διαφορετικές παραμέτρους της αντίδρασης, όπως το pH στο οποίο πραγματοποιείται η πρόσδεση του αντισώματος στη στερεά επιφάνεια, η χρήση αντισωμάτων με μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης στα πλακίδια, καθώς και αύξηση του χρόνου επώασης.

Ωστόσο, η αποτελεσματικότερη μέθοδος φαίνεται να είναι η επιλογή του κατάλληλου συστήματος ενζύμου με υπόστρωμα. Ένα από τα αποτελεσματικότερα τέτοια συστήματα, το οποίο έχει βρει εφαρμογή σε ευρεία κλίματα είναι το σύστημα

βιοτίνης-αβιδίνης (ή στρεπταβιδίνης). Η αβιδίνη είναι μία πρωτεΐνη, η οποία έχει απομονωθεί από διάφορα είδη πτηνών ή αμφιβίων και εμφανίζει ιδιαίτερη ικανότητα να προσδέεται στην βιοτίνη, η οποία είναι ένας συμπαράγοντας, ο οποίος διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε διαφορετικές βιοχημικές διεργασίες στους ευκαριωτικούς οργανισμούς. Ένα μόριο βιοτίνης μπορεί να προσδεθεί σε 4 διαφορετικά μόρια αβιδίνης, με πάρα πολύ μεγάλη συγγένια ($kD = 10^{-15}$).

Η στρατηγική, η οποία ακολουθείται είναι πως μετά την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει το αντιγόνο, γίνεται προσθήκη ενός δευτέρου αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με βιοτίνη, και αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη βιοτίνης, η οποία είναι συζευγμένη με το κατάλληλο ένζυμο και ανίχνευση του χρώματος. Με τον τρόπο αυτό, αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό ο αριθμός των μορίων ενζύμου τα οποία συμμετέχουν στην αντίδραση. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου κατά 10 με 100 φορές.



Εικόνα 15: Το σύστημα βιοτίνης με στρεπταβιδίνη

(https://www.researchgate.net/publication/283651847_Biomarker_Detection_Technologies_and_Future_Directions)

Οι κύριες παραλλαγές της ELISA είναι η άμεση, η έμμεση, η Sandwich και η ανταγωνιστική (Aydiñ, 2015).

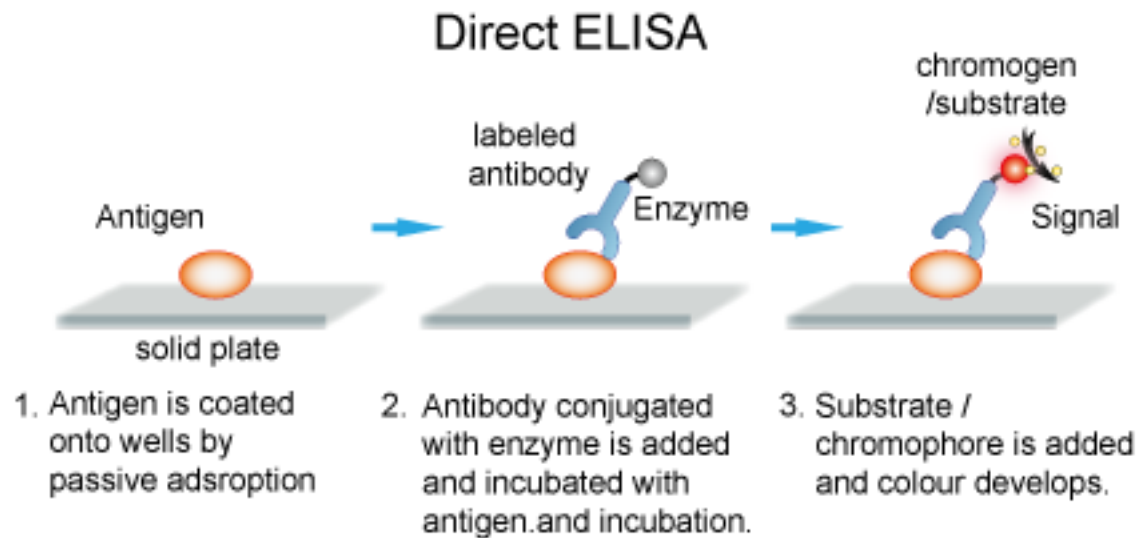
2.1.2 Άμεση ELISA

Η άμεση ELISA (direct ELISA) αποτελεί την πιο απλή εκδοχή της τεχνικής. Στην μέθοδο αυτή ένα αντιγόνο αντιστοιχεί σε ένα αντίσωμα.

Τα στάδια της άμεσης ELISA είναι τα παρακάτω:

- Το κατάλληλα επιλεγμένο αντιγόνο ή ένα μείγμα αντιγόνων (πχ από ένα βιολογικό δείγμα) επικολλάται στην επιφάνεια ενός πλακιδίου.
- Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη του κατάλληλου αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει το προς εξέταση αντιγόνο. Το αντίσωμα αυτό είναι συζευγμένο με το κατάλληλο ένζυμο
- Ακολούθως, γίνεται η προσθήκη του υποστρώματος και η ανίχνευση του χρωμοφόρου σήματος. Υψηλότερα επίπεδα πρόσδεσης σημαίνουν και υψηλότερα επίπεδα του χρωμοφόρου σήματος.

Η άμεση ELISA αποτελεί μία ιδιαίτερα εύκολη και γρήγορη τεχνική. Ωστόσο, εμφανίζει και ορισμένα ιδιαίτερα σημαντικά μειονεκτήματα, Πιο συγκεκριμένα, επειδή βασίζεται στην αναγνώριση ενός αποκλειστικού ζεύγους αντιγόνου-αντισώματος εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία συγκριτικά με τις άλλες παραλλαγές της τεχνικής. Ακόμα, η πρόσδεση του ενζύμου στο αντίσωμα μπορεί να μειώσει επιπλέον την ευαισθησία της μεθόδου. Επιπλέον, ιδιαίτερα αν υπάρχει μεγάλος αριθμός αντιγόνων στο αρχικό δείγμα, αυτά μπορεί να ανταγωνιστούν το υπό εξέταση αντιγόνο για την πρόσδεση τους στην επιφάνεια προσρόφησης, με αποτέλεσμα να δοθεί η εικόνα μειωμένης συγκέντρωσης του υπό εξέταση αντιγόνου στο δείγμα.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της άμεσης ELISA

(<https://www.creative-diagnostics.com/ELISA-guide.htm>)

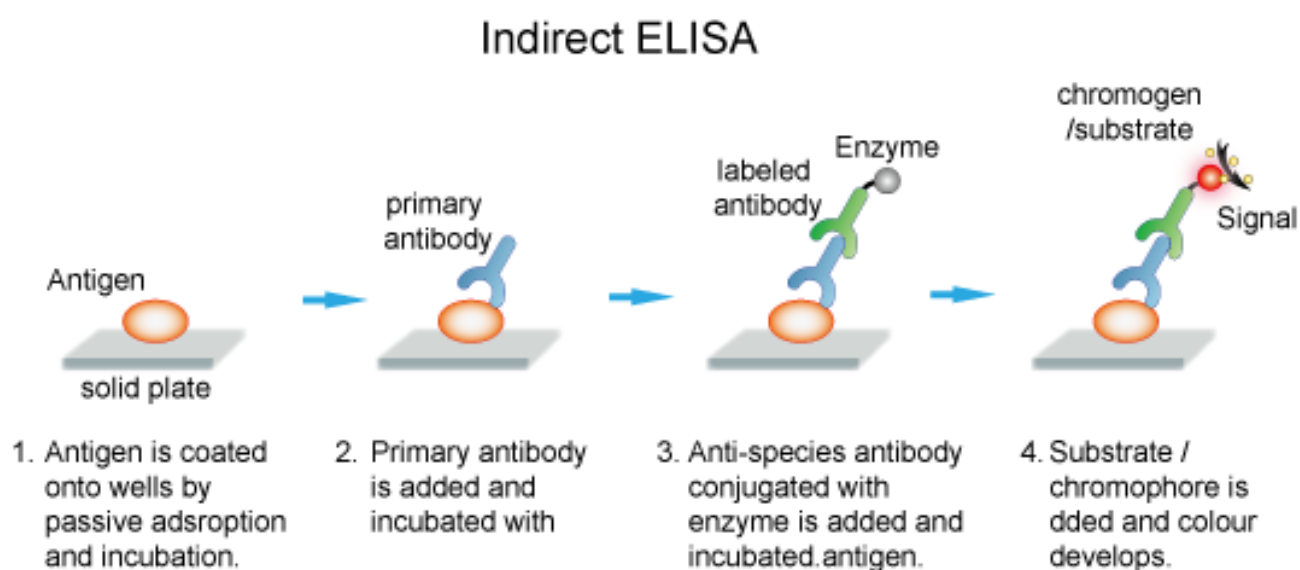
2.1.3 Έμμεση ELISA

Η έμμεση ELISA αναπτύχθηκε με σκοπό της εξάλειψης των διαφόρων μειονεκτημάτων της άμεσης ELISA. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την ανίχνευση αντισωμάτων εντός ενός δείγματος. Κατά την αντίδραση αυτή χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά αντισώματα

Η διαδικασία είναι η παρακάτω:

- Ένα αντιγόνο, το οποίο αναγνωρίζεται από το υπό μελέτη αντίσωμα, προσκολλάται σε μία επιφάνεια.
- Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη του διαλύματος, ή ορού, το οποίο περιέχει το αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντιγόνο. Το αντίσωμα αυτό ονομάζεται πρωτογενές αντίσωμα και δεν είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο.
- Ακολούθως γίνεται προσθήκη ενός δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αυτό αντίσωμα φέρει και το ένζυμο, ώστε να ακολουθήσει η ανίχνευση του σήματος.

Ουσιαστικά στην μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η έμμεση ανίχνευση του πρωτογενούς αντισώματος, μέσω της σύνδεσης του δευτερογενούς αντισώματος σε αυτό. Επιπροσθέτως, τα δευτερογενή αντισώματα, τα οποία χρησιμοποιούνται είναι πολυκλωνικά, άρα πολλαπλά διαφορετικά δευτερογενή μπορούν να συνδέονται στο ίδιο πρωτογενές αυξάνοντας ακόμα περισσότερο την ευαισθησία της μεθόδου. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι πως δεν υπάρχουν ειδικές μέθοδοι σύνδεσης του αντιγόνου στην πλάκα προσρόφησης.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της έμμεσης ELISA

<https://www.creative-diagnostics.com/ELISA-guide.htm>

2.1.4 Sandwich ELISA

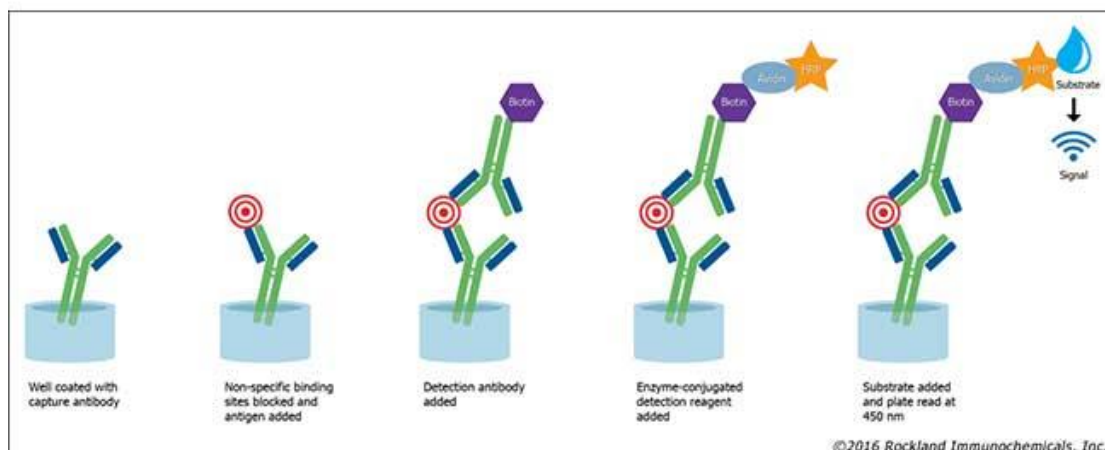
Η μέθοδος της sandwich ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Βασίζεται στην χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του ίδιου αντιγόνου.

Η διαδικασία είναι η παρακάτω:

- Ένα πρωτογενές αντίσωμα επικολλιέται στην επιφάνεια πραγματοποίησης της αντίδρασης. Το πρωτογενές αυτό αντίσωμα δεν είναι συνδεδεμένο με κάποιο ένζυμο.
- Ακολουθεί η προσθήκη του δείγματος, το οποίο φέρει το υπό εξέταση αντιγόνο.
- Ακολουθεί η προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο και είναι συζευγμένο με το κατάλληλο ένζυμο. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ιδίτυπο "sandwich" με τα δύο αντισώματα στις άκρες και το αντιγόνο μεταξύ τους. Από εκεί ακολουθεί η ανίχνευση του σήματος

Η ανίχνευση του σήματος είναι άμεση συνάρτηση της αρχικής σύνδεσης του αντιγόνου με το πρωτογενές αντίσωμα. Επιπλέον, η χρήση των δύο αυτών απόλυτα ειδικών αντισωμάτων έχει αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου, καθώς δεν απαιτούνται ειδικά στάδια καθαρισμού του αρχικού δείγματος. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, κυρίως σε πολύπλοκα ετερογενή δείγματα.

Sandwich ELISA



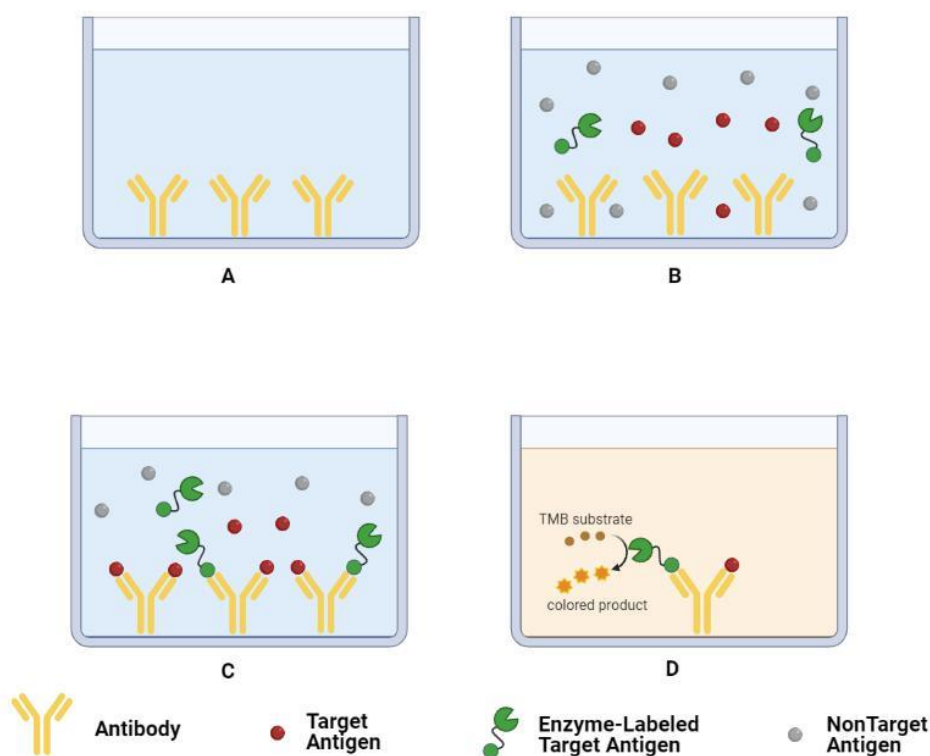
Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση της Sandwich ELISA

(<https://microbenotes.com/sandwich-elisa-steps-and-advantages/>)

2.1.5 Ανταγωνιστική ELISA

Τα αντιγόνα, τα οποία ανιχνεύονται με την ανταγωνιστική ELISA είναι μικρά σε μέγεθος και δεν φέρουν πολλαπλούς επίτοπους αναγνώρισης, οπότε και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι όπως η Sandwich ELISA.

Η βασική αρχή της μεθόδου αυτής είναι πως το αντιγόνο εντός του δείγματος, ανταγωνίζεται για την πρόσδεση στο προσκολλημένο αντίσωμα με ένα άλλο αντιγόνο, το οποίο όμως είναι σημασμένο με ένζυμο. Όσο μεγαλύτερη ποσότητα αντιγόνου υπάρχει στο υπό εξέταση δείγμα, τόσο μικρότερη θα είναι η σύνδεση του συμπλόκου αντιγόνου/ενζύμου οπότε τόσο μικρότερη ένταση σήματος θα ανιχνεύεται.



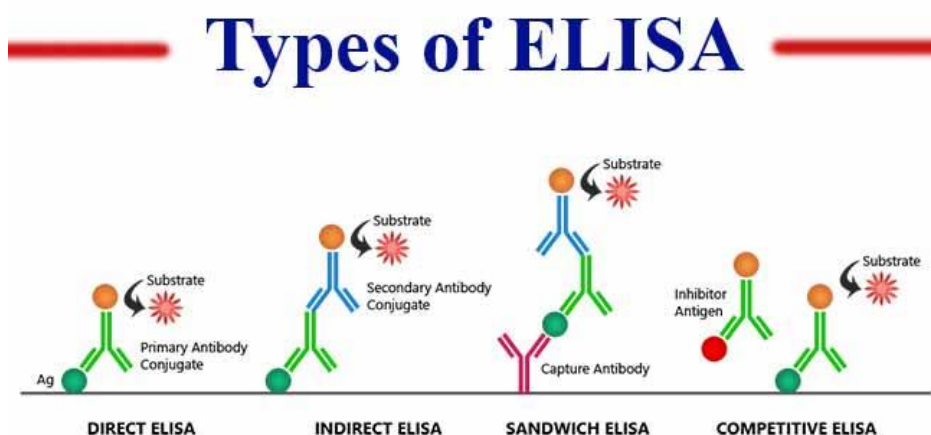
Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της ανταγωνιστικής ELISA (<https://www.creative-diagnostics.com/blog/index.php/competitive-elisa/>)

2.1.6 Σύγκριση τύπων ELISA

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται μία σύγκριση των κυρίων τύπων ELISA:

	ΆΜΕΣΗ	ΕΜΜΕΣΗ	SANDWICH	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ
ΜΕΣΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	Αντίσωμα	Αντιγόνο	Αντιγόνο	Αντίσωμα
ΣΗΜΑ	Αύξηση	Αύξηση	Αύξηση	Μείωση
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑ	Απλή	Υψηλή ευαισθησία	Πολύ υψηλή ευαισθησία	Υψηλή ευαισθησία Ανίχνευση μικρών αντιγόνων
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑ	Μικρή ευαισθησία	Μη ειδική πρόσδεση αντιγόνου στην επιφάνεια	Παρασκευή δύο αντισωμάτων	-

Πίνακας 2: Σύγκριση των διαφορετικών τύπων ELISA (Aydin, 2015)



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση των τύπων ELISA

(<https://microbenotes.com/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>)

2.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

Οι διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές, ή αλλιώς χρωματογραφίες είναι μερικές από τις πιο κοινές και ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανίχνευση διαφορετικών μορίων σε πολύπλοκα δείγματα. Ονομάστηκαν έτσι καθώς αρχικά είχαν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό διαφορετικών έγχρωμων ενώσεων.

Οι διάφορες χρωματογραφίες είναι μία σειρά διεργασιών φυσικού διαχωρισμού ουσιών τόσο από οργανικά, όσο και από ανόργανα μείγματα και διαλύματα ενώσεων.

Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται μέσω της διαφορετικής κατανομής, την οποία εμφανίζουν οι διαφορετικές ενώσεις μεταξύ δύο διαφορετικών φάσεων. Οι φάσεις αυτής είναι μία στατική και μία κινητή, οι οποίες βρίσκονται εντός της στήλης της χρωματογραφίας. Η διαφορετική αυτή κατανομή μεταξύ των δύο φάσεων οφείλεται στις διαφορετικές ιδιότητες, τις οποίες εμφανίζουν οι διαφορετικές ουσίες. Μερικές από τις ιδιότητες αυτές είναι οι παρακάτω:

- Σημείο ζέσεως (πτητικότητα)
- Πολικότητα
- Ηλεκτρικά φορτία (για ιοντικές ενώσεις)
- Μέγεθος μορίων
- Χημική συγγένεια με άλλες ενώσεις

Ανεξαρτήτως του τύπου χρωματογραφίας, η βασική αρχή λειτουργίας είναι η ίδια. Συγκεκριμένα, το υπό μελέτη δείγμα τοποθετείται στην μία άκρη ενός υλικού προσρόφησης, το οποίο και ονομάζεται ακίνητη ή στατική φάση. Στην συνέχεια αυτό εκλούεται από την κινητή φάση, η οποία είναι ένας διαλύτης ή ένα αέριο, η οποία κινείται προς την άλλη άκρη της ακίνητης φάσης. Όσες ουσίες είναι πολύ διαλυτές στην κινητή φάση και προσροφώνται λίγο από την ακίνητη φάση εμφανίζουν μεγαλύτερη μετακίνηση, ενώ όσες προσροφώνται ισχυρά εμφανίζουν μικρότερη. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός τους.

Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι χρωματογραφίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό ενώσεων (Coskun, 2016). Οι τεχνικές αυτές εμφανίζουν διαφορές ως προς πολλές παραμέτρους τους, όπως για παράδειγμα τα παρακάτω:

- Φύση κινητής φάσης
- Φύση και μορφή στατικής φάσης
- Μηχανισμός διαχωρισμού
- Τρόπος εισαγωγής δείγματος στη στατική φάση
- Τρόπος κίνησης συστατικών δείγματος στη στατική φάση

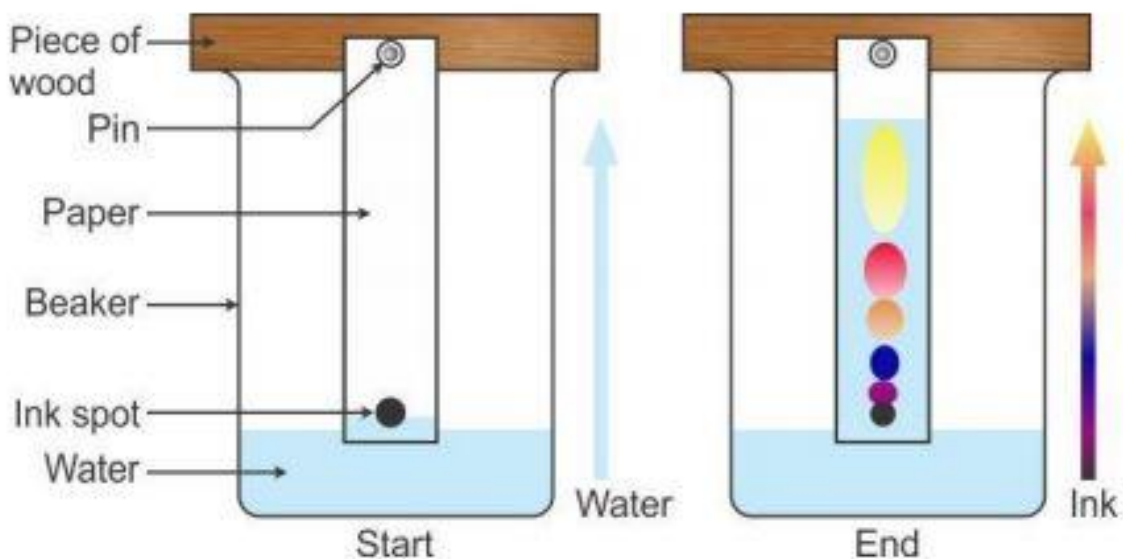
2.2.1 Χρωματογραφία χάρτου

Η χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography) αποτελεί τον πιο απλό τύπο χρωματογραφίας. Σε αυτόν τον τύπο χρωματογραφίας η στατική φάση είναι ένα κομμάτι χαρτί και η κινητή φάση είναι ένας κατάλληλος υγρός διαλύτης.

Τα υπό μελέτη δείγματα τοποθετούνται στην άκρη του χαρτιού, το οποίο στην συνέχεια εμβαπτίζεται στον διαλύτη, ο οποίος είναι τοποθετημένος σε ένα κατάλληλο δοχείο.

Στην συνέχεια, ο διαλύτης μετακινείται κατά μήκος του χαρτιού, διαποτίζοντας το. Η κίνηση αυτή του διαλύτη συμπαρασύρει και τις διαφορετικές ενώσεις του μίγματος, οι οποίες διανύουν διαφορετική απόσταση, η κάθε μία. Επιπροσθέτως, με την προσθήκη κατάλληλων αντιδραστηρίων, οι ενώσεις αυτές μπορούν να οπτικοποιηθούν.

Ο λόγος της απόστασης, την οποία έχει διανύσει η εκάστοτε ουσία, προς την απόσταση, την οποία έχει διανύσει ο διαλύτης επάνω στο χαρτί ονομάζεται συντελεστής συγκρατήσεως (R_f) και αποτελεί ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα για την κάθε ένωση, όταν εκλούεται με έναν συγκεκριμένο διαλύτη.



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της χρωματογραφίας χάρτου
 (<https://noteshippo.com/paper-chromatography-definition-principle-instrumentation-procedure-and-applications/>)

2.2.2 Χρωματογραφία στήλης

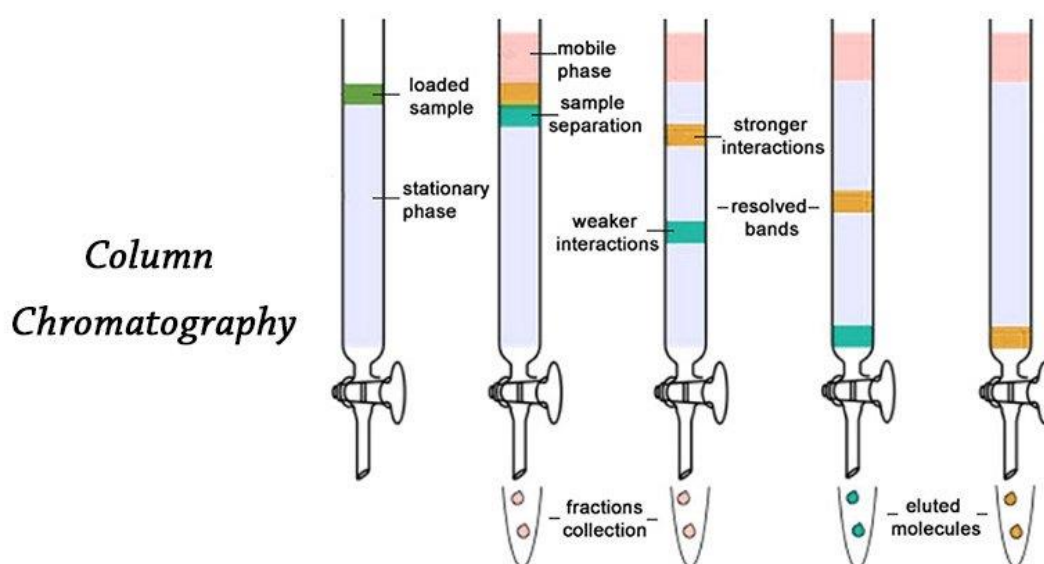
Στην χρωματογραφία στήλης (column chromatography) η στατική φάση είναι ένα μία κάθετα τοποθετημένη στήλη, η οποία περιέχει ένα κατάλληλο προσροφητικό υλικό και η κινητή φάση είναι ένας κατάλληλος υγρός διαλύτης.

Τα υπό μελέτη δείγματα τοποθετούνται στο πάνω μέρος της στήλης και κατά συνέπεια και της στήλης. Στην συνέχεια ο διαλύτης, τοποθετείται και αυτός στην κορυφή της στήλης και τα διάφορα υλικά περνάνε διαμέσου αυτής. Ανάλογα με την ύπαρξη ή μη αλληλεπίδρασης των ενώσεων με τα υλικά της στήλης, καθώς και με τον βαθμό αυτής της αλληλεπίδρασης, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ενώσεων. Οι ενώσεις, οι οποίες δεν αλληλοεπιδρούν έντονα μετακινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα διαμέσου της στήλης, άρα και παραλαμβάνονται γρηγορότερα. Αντίθετα ενώσεις, οι οποίες αλληλοεπιδρούν έντονα με την στήλη μετακινούνται πιο αργά. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι είτε έγχρωμες, οπότε και διακρίνονται με άμεσο

τρόπο, ή άχρωμες οπότε και πρέπει να διακριθούν με την βοήθεια έμμεσων μεθόδων ή αναλυτών.

Ανάλογα με την φυσική ιδιότητα, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των υπό μελέτη ενώσεων, η χρωματογραφία στήλης (καθώς και άλλες μέθοδοι οι οποίες αποτελούν εξέλιξη αυτής) μπορεί να χωριστεί στους παρακάτω τύπους:

- Η χρωματογραφία προσρόφησης, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων
- Η χρωματογραφία κατανομής, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ενώσεων
- Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων
- Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενώσεων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000
- Η χρωματογραφία συγγένειας, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενώσεων, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή χημική συγγένεια με κάποια συγκεκριμένη χημική ομάδα



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση χρωματογραφία στήλης

(<https://microbenotes.com/column-chromatography/>)

2.2.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης ή Πίεσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ή πίεσης (High Performance or Pressure Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί μία εξέλιξη της χρωματογραφίας στήλης, στην οποία ωστόσο χρησιμοποιείται μηχανολογικός εξοπλισμός.

Στην HPLC η κινητή φάση είναι ένας κατάλληλος υγρός διαλύτης και η στερεά φάση ένα λεπτό αδρανές υλικό. Ο διαχωρισμός των διαφορετικών ενώσεων, οι οποίες βρίσκονται εντός του μείγματος βασίζεται στις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κάθε συστατικού, της κινητής φάσης και της στατικής φάσης. Για τον λόγο αυτό απαιτείται διαφορετικός χρόνος για την έκλουση κάθε ουσίας από τη στήλη. Αυτή η αλληλεπίδραση σχετίζεται με διαφορετικές φυσικές και χημικές παραμέτρους, όπως το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα.

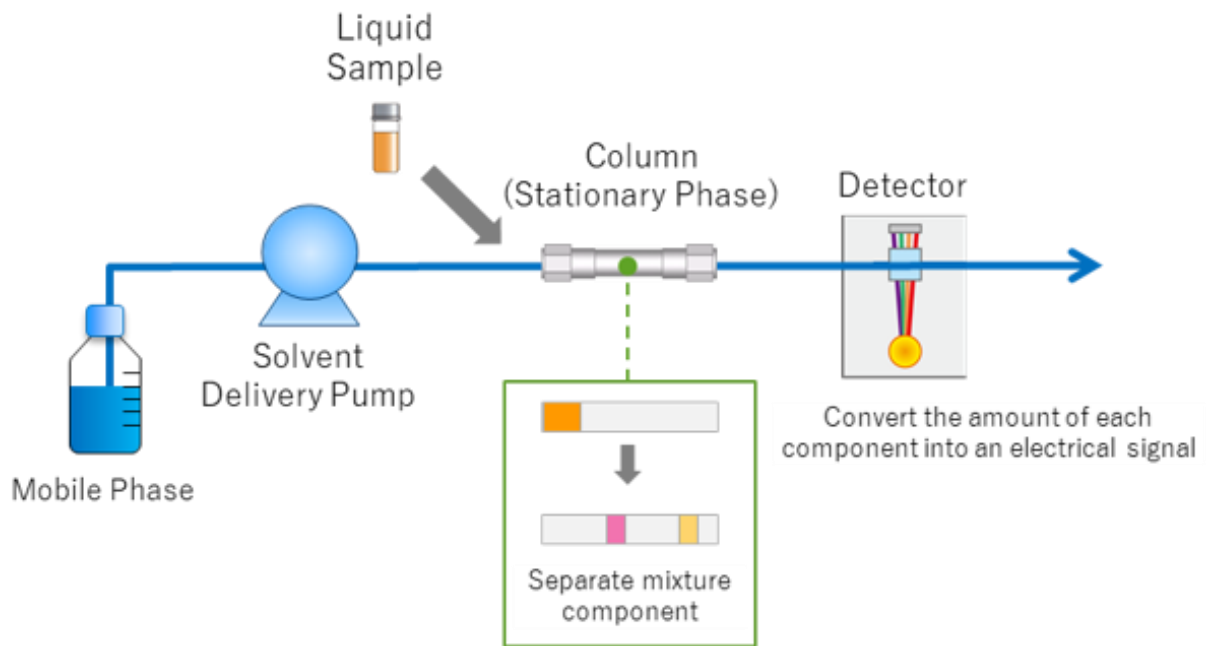
Η στατική φάση στην HPLC βρίσκεται υπό την μορφή πολύ λεπτών κόκκων, για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εφαρμογή πίεσης από μία αντλία, έτσι ώστε να μπορέσει να διέλθει το μείγμα μέσω αυτών.

Πιο συγκεκριμένα, μία αντλία πιέζει τον διαλύτη προς την στήλη με υψηλή πίεση της τάξεως των μερικών χιλιάδων PSI. Ακολούθως, το έκλουσμα περνά μέσα από έναν ανιχνευτή, ο οποίος μετρά διαφορετικές παραμέτρους με συνεχή τρόπο ο οποίος έπειτα παρέχει ένα σήμα σε ένα καταγραφικό. Το καταγραφικό στην συνέχεια καταγράφει το σήμα, είτε με απευθείας τρόπο είτε μέσω υπολογιστή.

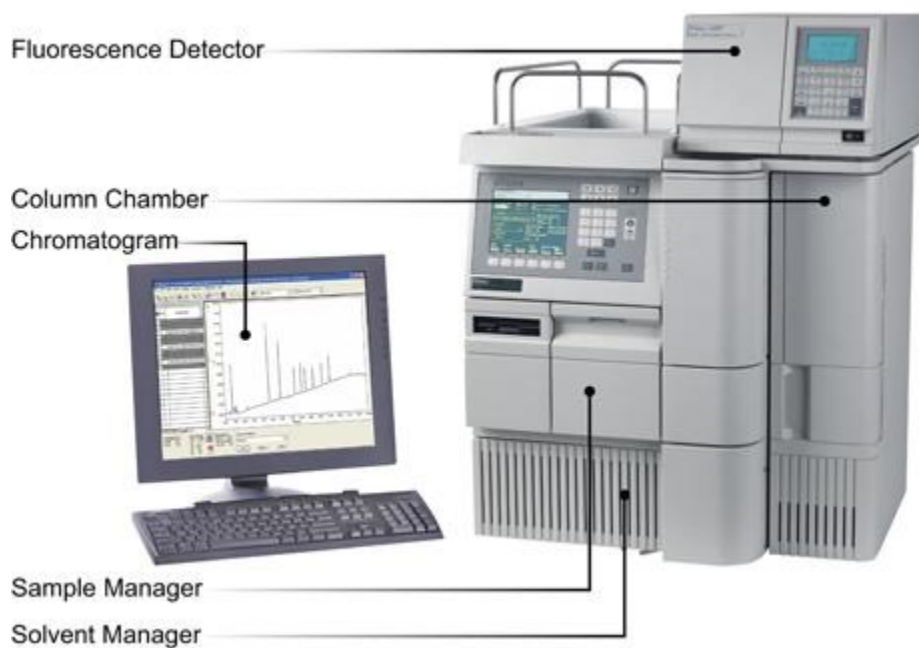
Οι παράμετροι αυτοί που μετρούνται να είναι οι παρακάτω:

- ο δείκτης διαθλάσεως του υγρού
- η ειδική απορρόφηση, με την χρήση φασματοφωτόμετρου
- άλλες μετρήσεις μέσω ειδικών διατάξεων, όπως φθορισμόμετρο, φασματοφωτόμετρο μάζας, αγωγιμόμετρο κλπ

Ακριβώς λόγω της υψηλής πίεσεως, η HPLC είναι μία ταχύτατη τεχνική, καθώς παρέχει αποτέλεσμα σε μερικά λεπτά της ώρας. Επιπλέον, επειδή χρησιμοποιούνται λεπτόκοκκα υλικά προσρόφησης εμφανίζει μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού.



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της HPLC (https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html)

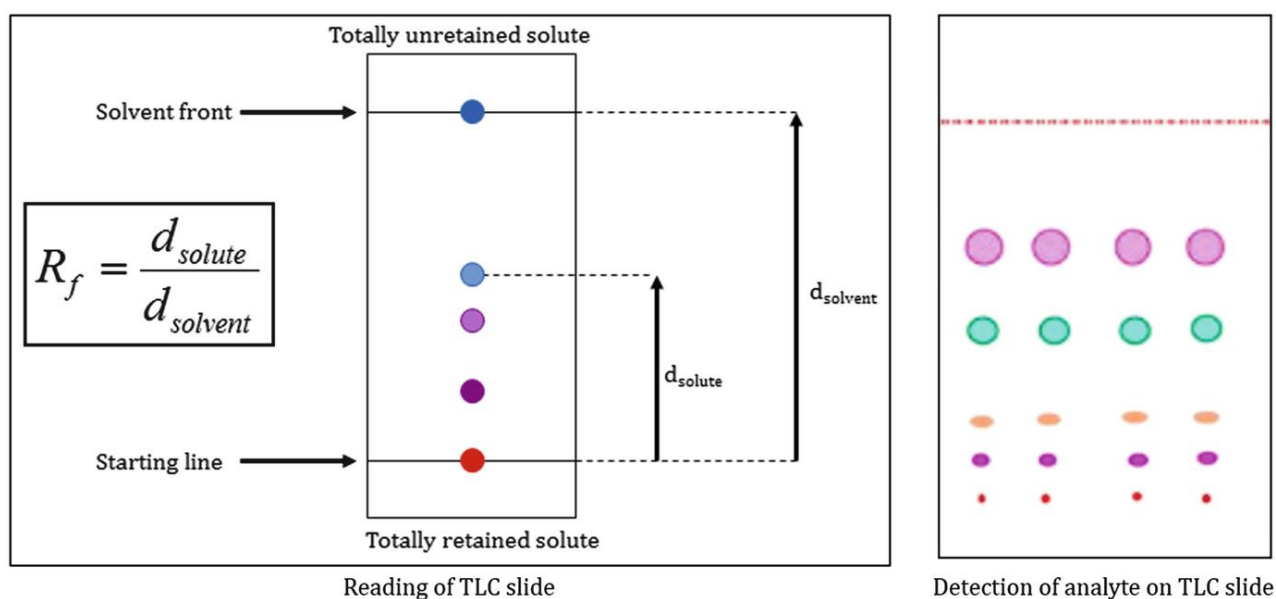


Εικόνα 24: Συσκευή HLPC (https://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10049055)

2.2.4 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) αποτελεί μία ανάλογη μέθοδο της χρωματογραφίας χάρτου. Ωστόσο σε αυτήν, η κινητή φάση αντί για χαρτί είναι μία λεπτή μεμβράνη (συνήθως ένα πλαστικό φύλλο), η οποία στηρίζεται πάνω σε μία λεία επιφάνεια. Μία από τις πιο κοινές διατάξεις είναι οξείδιο του πυριτίου ή αλουμίνα πάνω σε γυάλινη πλάκα.

Η βασική αρχή, καθώς και η διάταξη της μεθόδου είναι ίδια με αυτή της χρωματογραφίας χάρτου. Ωστόσο, ως μέθοδος διαθέτει πολύ καλύτερη ικανότητα διαχωρισμού από την χρωματογραφία χάρτου. Επιπλέον, επιτρέπει την οπτικοποίηση των διαφόρων άχρωμων ουσιών με πολύ πιο έντονα μέσα, τα οποία θα κατέστρεφαν το χαρτί.



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση της TLC

(https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-1547-7_12)

2.2.5 Αέρια Χρωματογραφία

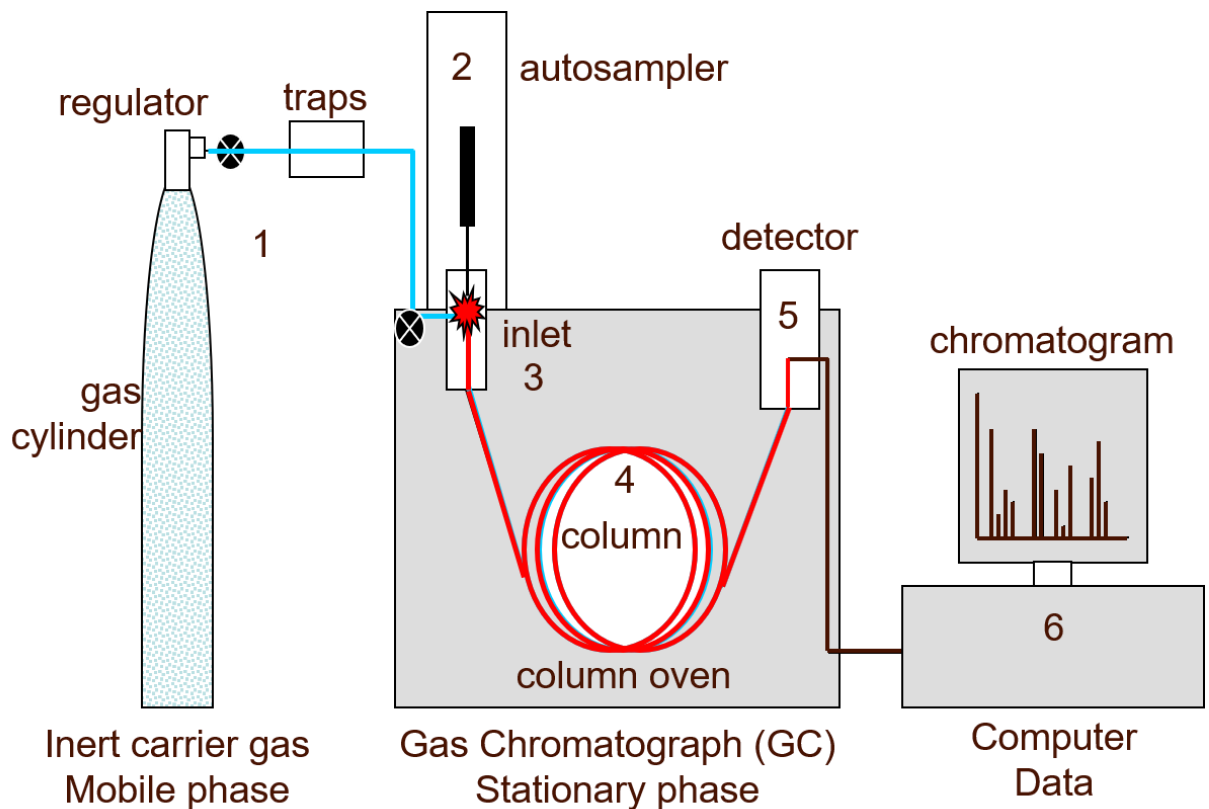
Στην αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GS) τα διαφορετικά συστατικά του υπό μελέτη δείγματος, διαχωρίζονται εξαιτίας της κατανομής τους μεταξύ μιας κινητής αέριας φάσης και μιας στατικής φάσης και στην συνέχεια ανιχνεύονται από ένα κατάλληλο ανιχνευτή.

Όσον αφορά την διαδικασία, το δείγμα αρχικά εξατμίζεται μέσω ενός εισαγωγέα και στην συνέχεια εισάγεται στην χρωματογραφική στήλη με την βοήθεια της ροής ενός αδρανούς αερίου, το οποίο ονομάζεται φέρον αέριο, και είναι συνήθως αέριο άζωτο, υδρογόνο, ήλιο ή αργό και αποτελεί την κινητή φάση.

Ακολούθως, αέριο πλέον δείγμα μεταφέρεται μέσα από μια στήλη που περιέχει ένα προσροφητικό υλικό, οπότε και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Έπειτα από την άλλη άκρη της στήλης εξέρχονται με τη σειρά τα διαχωρισθέντα συστατικά. Από εκεί οδηγούνται στον ανιχνευτή, ο οποίος στέλνει ένα σήμα σε ένα καταγραφικό ανάλογα με την ένταση ανίχνευσης των διαφόρων ουσιών.

Ως τεχνική η αέρια χρωματογραφία επιτυγχάνει πάρα πολύ αποτελεσματικούς διαχωρισμούς, ενώ η ικανότητα ανίχνευσης των αναλυόμενων συστατικών είναι πολύ μεγάλη, καθώς φτάνει και μερικά τρισεκατομμυριοστά του γραμμαρίου (pg) σε κάποιες περιπτώσεις, αν και συνήθως κυμαίνεται σε μερικά δισεκατομμυριοστά (ng) του γραμμαρίου.

Ωστόσο, ως μέθοδος διαθέτει περιορισμένο εύρος ουσιών, οι οποίες μπορούν να αναλυθούν, καθώς όσες ενώσεις δεν μπορούν να μετατραπούν σε αέρια, δεν υπάρχει η δυνατότητα να διαχωριστούν με την τεχνική αυτή.



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση συσκευής αέρια χρωματογραφίας

(<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-qcxc-335168>)

2.3 Φασματοσκοπικές τεχνικές

Ως φασματοσκοπία ή φασματομετρία (spectrometry) καλείται ένα σύνολο τεχνικών, οι οποίες έχουν ως αντικείμενο τους έχουν την μελέτη του ηλεκτομαγνητικού φάσματος μίας φωτεινής πηγής.

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές τεχνικές φασματοσκοπίας, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη των διαφόρων βιολογικών δειγμάτων.

2.3.1 Οπτική φασματοφωτομετρία

Η οπτική φασματοφωτομετρία ή σκέτο φασματοφωτομετρία (spectrometry) αποτελεί μία ιδιαίτερα διαδεδομένη αναλυτική τεχνική, η οποία επιτυγχάνει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός μεγάλου εύρους οργανικών και ανόργανων ενώσεων.

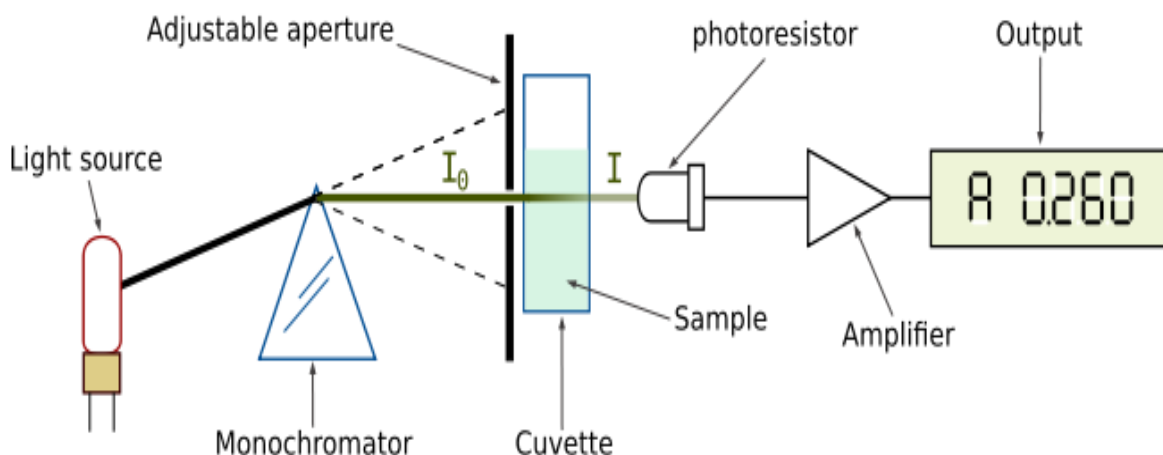
Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός πως, αν μέσα σε ένα υγρό διάλυμα ριχθεί φως ορισμένων μηκών κύματος, ορισμένα αυτά θα συγκρατηθούν (ή αλλιώς απορροφήσουν) από τις διαφορετικές ενώσεις του δείγματος. Στην συνέχεια, η απορρόφηση αυτή μπορεί να μεταφραστεί σε συγκέντρωση της ένωσης αυτής στο διάλυμα. Η μετατροπή αυτή πραγματοποιείται μέσω του νόμου των Lambert/Beer, η εξίσωση του οποίου είναι η παρακάτω:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \text{ όπου}$$

- ϵ η μοριακή απορρόφηση (απορρόφηση που θα είχε διάλυμα 1M της ουσίας)
- l το μήκος του δείγματος (πάχος κυψελίδας σε cm)
- c η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (σε mole/l)
- A ο λογάριθμος του λόγου της εντάσεως του προσπιπτομένου φωτός προς το φως που περνάει από το διάλυμα

Η συσκευή, η οποία χρησιμοποιείται στην φασματοφωτομετρία ονομάζεται φασματοφωτόμετρο και αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

- Μία φωτεινή πηγή, η οποία εκπέμπει φως διαφορετικών μηκών κύματος, ανάλογα με την υπό εξέταση ένωση
- Ένας μονοχρωμάτορας, ο οποίος διαχωρίζει το φως σε διαφορετικά μήκη κύματος
- Ένα τμήμα στο οποίο εισέρχεται το δείγμα, συνήθως τοποθετημένο σε μία πλαστική ή γυάλινη κυψελίδα
- Έναν ενισχυτή σήματος
- Έναν ανιχνευτή



Εικόνα 27: Απεικόνιση φασματοφωτόμετρου ορατού φωτός

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A6%CE%B1%CF%83%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%86%CF%89%CF%84%CF%8C%CE%BC%CE%B5%CF%84%CF%81%CE%BF>

2.3.2 Φασματοσκοπία μάζας

Η φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry) αποτελεί μία από τις πιο κοινές και διαδεδομένες τεχνικές ανίχνευσης και μελέτες πολλών διαφορετικών ουσιών. Στην φασματοσκοπία μάζας, τα διάφορα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα, τα οποία στην συνέχεια διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z).

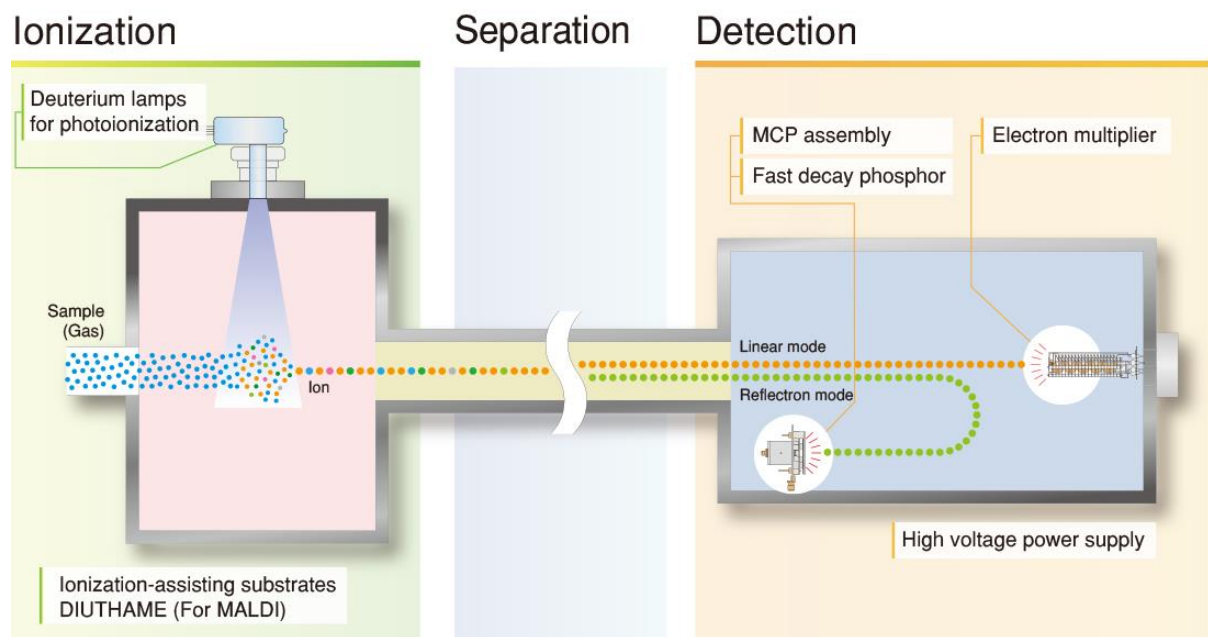
Η επικράτηση της φασματομετρίας μαζών στη ανάλυση βιολογικών δειγμάτων θα μπορούσε να αποδοθεί σε έναν αριθμό σημαντικών πλεονεκτημάτων, τα οποία διαθέτει. Αυτά είναι τα παρακάτω:

- μεγάλη εκλεκτικότητα, η οποία επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις
- Πολύ υψηλή ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} mol

- Μπορεί θεωρητικά να δράσει σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector) και να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ένωσης, ανεξαρτήτως των χημικών της ιδιοτήτων
- Δυνατότητα εύρεσης δομής αγνώστων ενώσεων, γεγονός το οποίο έχει βρει μεγάλη εφαρμογή στις τεχνολογίες omics, όπως στην πρωτεωμική.

Η συσκευή, η οποία χρησιμοποιείται στην φασματοσκοπία μαζών ονομάζεται φασματογράφος μαζών και αποτελείται από τα παρακάτω στοιχεία:

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, το οποίο συνήθως είναι σε αέρια ή υγρή μορφή
- Την πηγή ιόντων, όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα. Το σύστημα εισαγωγής και η πηγή ιόντων είναι συνήθως ενωμένα
- Τον αναλυτή μαζών, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το m/z τους
- Τον ανιχνευτή που συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα
- Το σύστημα κενού. Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού
- Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό ανίχνευσης, ποσοτικοποίησης και οπτικοποίησης



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση φασματοσκοπίας μάζας

(<https://www.hamamatsu.com/jp/en/applications/analytical-equipment/mass-spectrometry/index.html>)

Ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχία της φασματοσκοπίας μάζας είναι η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής ιοντισμού των ενώσεων. Αυτό συμβαίνει καθώς για την ίδια ένωση, το φάσμα, το οποίο λαμβάνεται μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό με την εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιοντισμού.

Ένας βασικός διαχωρισμός των διαφόρων τεχνικών ιοντισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί σε "μαλακές" και "σκληρές" τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές ιοντισμού χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια, με το γεγονός αυτό να προκαλεί διάσπαση της ένωσης σε θυγατρικά ιόντα (θραύση). Αντίθετα, στις μαλακές τεχνικές ο ιοντισμός επιτυγχάνεται σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση (Buchberger, DeLaney, Johnson, & Li, 2018).

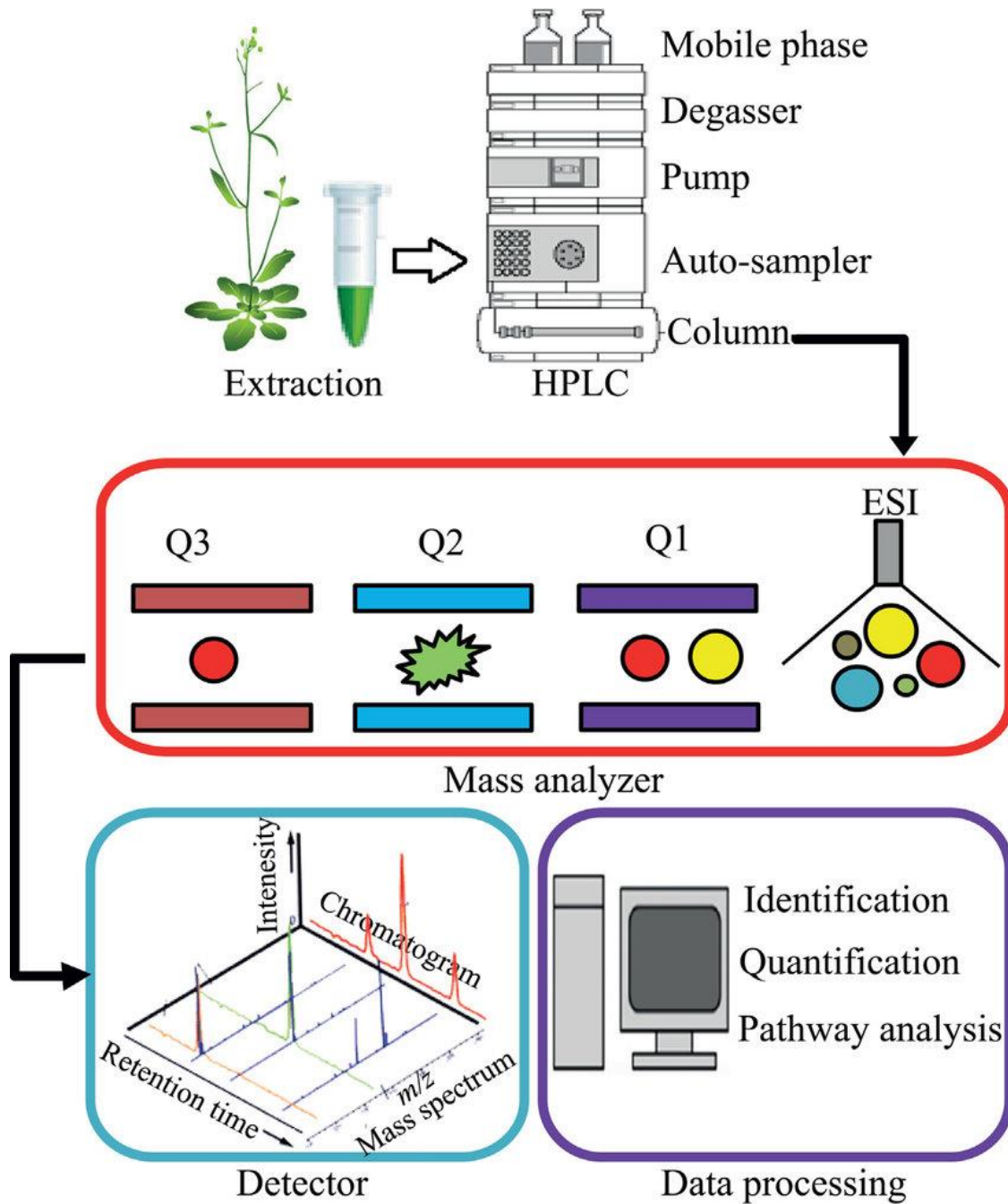
2.3.3 Υγρή χρωματογραφία με φασματοσκοπία μάζας

Η υγρή χρωματογραφία με φασματοσκοπία μάζας (LC-MS/MS) αποτελεί έναν συνδυασμό μεταξύ της υγρής χρωματογραφίας και την φασματοσκοπίας μάζας πολλαπλών τετραπόλων.

Αρχικά, το χρωματογραφικό τμήμα διαχωρίζει τα διάφορα συστατικά του υπό μελέτη διαλύματος, συγκεντρώνοντας την ποσότητα κάθε μεμονωμένου συστατικού, η οποία ακολούθως φθάνει στο φασματόμετρο μάζας.

Εκεί περνάνε από συνολικά τρία διαφορετικά τετράπολα, σε μία διαμόρφωση η οποία ονομάζεται τριπλό τετράπολο. Το πρώτο τετράπολο της διαμόρφωσης ιονίζει τα μόρια του αναλύτη. Τα επιλεγμένα μοριακά ιόντα στη συνέχεια τεμαχίζονται στη δεύτερη τετραπόλη και απομονώνονται επιλεκτικά από το τρίτο και τελευταίο τετραπόλιο. Από εκεί ακολουθεί η μέτρηση από έναν ανιχνευτή.

Αυτή η ευθυγράμμιση των σταδίων διαχωρισμού, ιονισμού και επιλεκτικού κατακερματισμού οδηγεί σε μία εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση, η οποία μπορεί να φτάσει και τα μέρη ανά δισεκατομμύριο (ppb), ενώ είναι σταθερά στο τμήμα ανά εκατομμύριο (ppm) (Wong et al., 2018).



Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής LC-MS/MS

(<https://www.researchgate.net/publication/317986685> *The use of metabolomic quantitative trait locus mapping and osmotic adjustment traits for the improvement of crop yields under environmental stresses/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic*)

2.3.4 Φασματοσκοπία NMR

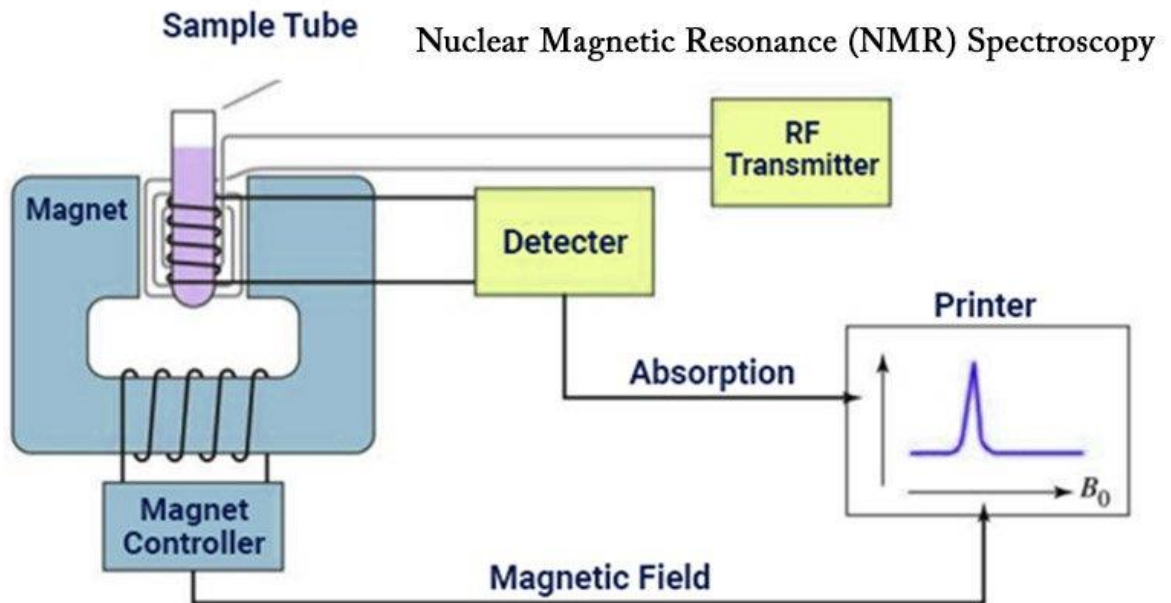
Η Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) αποτελεί μία φασματοσκοπική τεχνική, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση διαφόρων τοπικών μαγνητικών πεδίων, τα οποία υπάρχουν γύρω από τους πυρήνες διαφορετικών ατόμων.

Ως τεχνική βασίζεται στο φυσικό φαινόμενο του Πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, κατά το οποίο οι πυρήνες, οι οποίοι βρίσκονται μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Πρόκειται για μια πολύ ισχυρή τεχνική, η οποία μπορεί να δώσει πλήρης και λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την τοπολογία, την δυναμική και την τρισδιάστατη δομή των μορίων, τόσο σε διάλυμα, όσο και σε στερεή κατάσταση (Darbeau, 2006).

Ως τεχνική, η NMR βασίζεται στα παρακάτω στάδια:

- Τη στοίχιση (πόλωση) των πυρηνικών μαγνητικών περιστροφών (σπιν) σε ένα εφαρμοζόμενο, σταθερό μαγνητικό πεδίο
- Τη διαταραχή αυτής της στοίχισης των πυρηνικών σπιν χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτρομαγνητικό παλμό. Η απαιτούμενη συχνότητα για την πραγματοποίηση της διαταραχής εξαρτάται από το στατικό μαγνητικό πεδίο και τους πυρήνες της παρατήρησης
- Την ανίχνευση του ηλεκτρομαγνητικού σήματος, η οποία είναι αποτέλεσμα της διαταραχής αυτής.

Οι κύριοι πυρήνες, οι οποίοι μελετώνται είναι αυτοί του άνθρακα και του υδρογόνου. Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρακτικά οποιοσδήποτε πυρήνας διαθέτει σπιν.



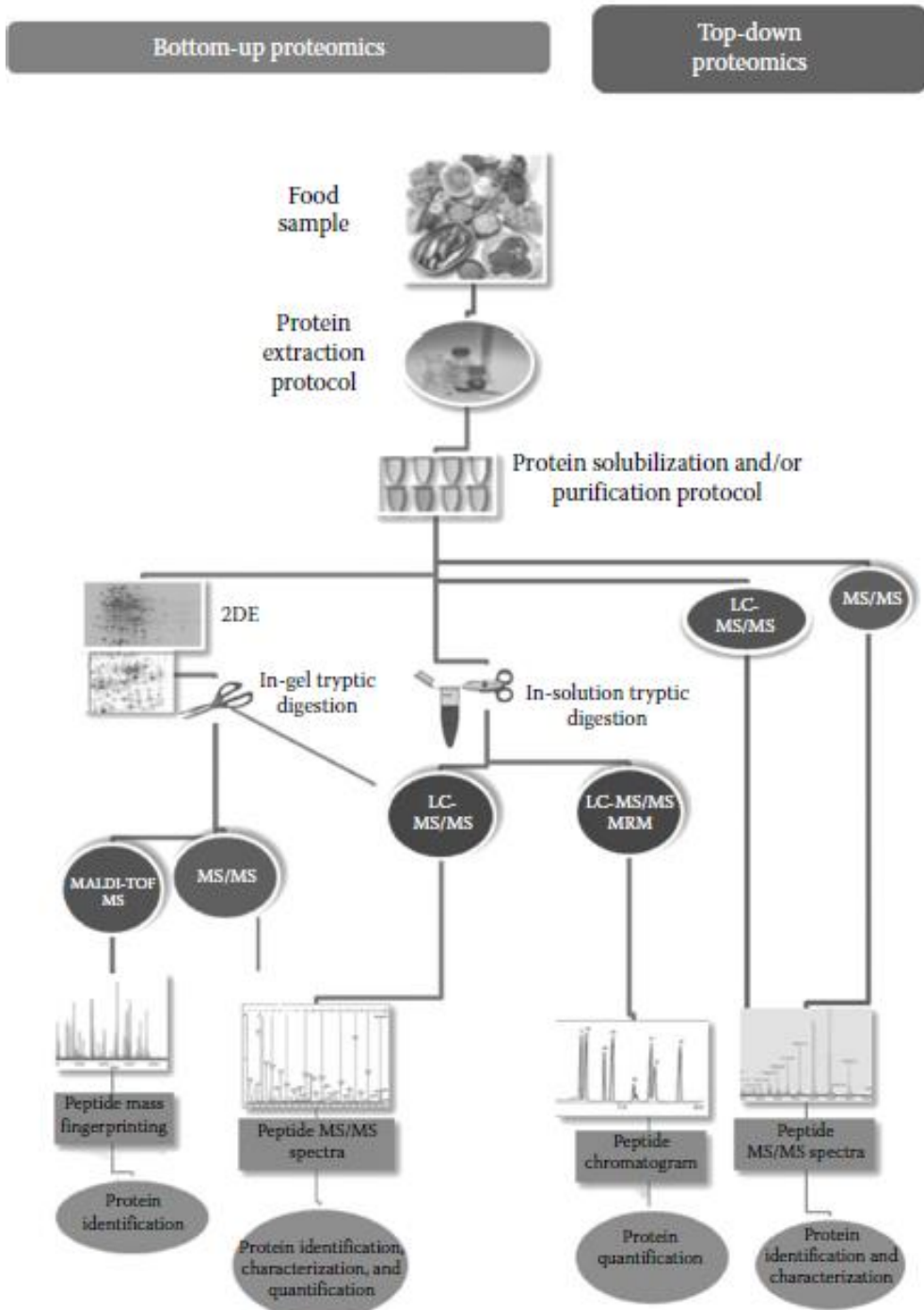
Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση της φασματοσκοπίας NMR
(<https://microbenotes.com/nuclear-magnetic-resonance-nmr-spectroscopy/>)

2.4 Τεχνικές πρωτεωμικής

Ως πρωτεωμική (proteomics) μπορεί να χαρακτηριστεί η μεγάλης κλίμακας μελέτη της δομής, της λειτουργίας, των τροποποιήσεων και των αλληλεπιδράσεων των διαφορετικών πρωτεϊνών ενός βιολογικού δείγματος.

Η πιο συχνή προσέγγιση στην πρωτεωμική ανάλυση είναι η λεγόμενη “bottoms up”. Στην προσέγγιση αυτή, οι διαφορετικές πρωτεΐνες ενδιαφέροντος υδρολύονται πρώτα σε μικρότερα πεπτίδια ή αμινοξέα, από πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η τρυψίνη, τα οποία στην συνέχεια αναλύονται με διαφορετικές μεθόδους, όπως η φασματοσκοπία μάζας κλπ.

Η μελέτη ολόκληρων πρωτεϊνών, χωρίς να έχει προηγηθεί υδρολυτική τους διάσπαση ονομάζεται “top-down” (Piñeiro, Carrera, Cañas, Lekube, & Martinez, 2015).



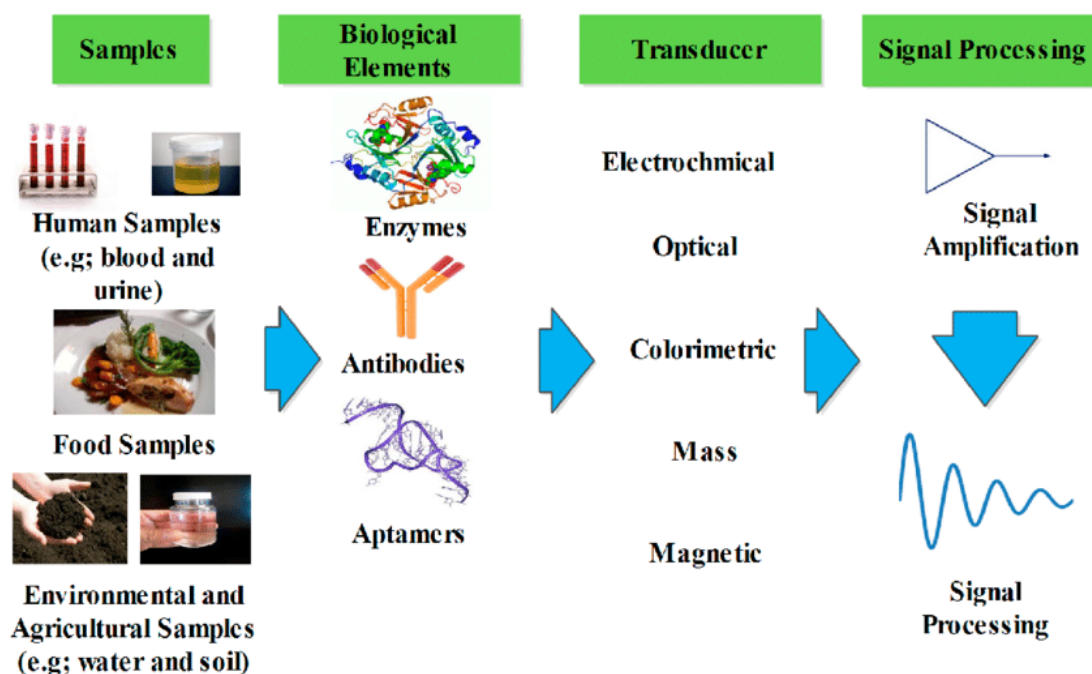
Εικόνα 31: Ροή εργασίας των διαφορετικών προσεγγίσεων της πρωτεωμικής (Ριñeiro et al., 2015)

2.5 Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες (biosensors) αποτελούν συστήματα ανάλυσης, τα οποία συνδιάζουν δύο διαφορετικά τμήματα. Το ένα τμήμα είναι βιολογικό και το άλλο είναι ένας φυσικοχημικός αισθητήρας/ανιχνευτής.

Γενικά ένας τυπικό βιοαισθητήρας αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα (Luka, Ahmadi, Najjaran, Alocilja, & Derosa, 2015):

- Έναν βιοϋποδοχέα (bioreceptor), ο οποίος μπορεί να είναι ένα ένζυμο, ένα αντίσωμα, ένα ολόκληρο κύτταρο, νουκλεϊκά οξέα, απταμερή ή ακόμα και τμήματα ιστού. Η λειτουργία του είναι η αναγνώριση της υπό εξέταση ουσίας
- Ένα σύστημα μετάδοσης του σήματος, το οποίο μπορεί να είναι ένας ημιαγωγός ή ένα νανοϋλικό
- Ένα ηλεκτρονικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει έναν ενισχυτή σήματος, έναν επεξεργαστή και μία οθόνη οπτικοποίησης



Εικόνα 32: Μέρη ενός τυπικού βιοαισθητήρα (Luka et al., 2015)

2.6 Βιοδοκιμές

Οι διάφορες βιοδοκιμές (bioassays) αποτελούν μία σειρά από in-vivo τεχνικές, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση διαφόρων τοξικών ενώσεων, καθώς και για την μέτρηση της τοξικότητας τους.

Οι διαφορετικές βιοδοκιμές πραγματοποιούνται απευθείας σε ζωντανά κύτταρα ή οργανισμούς. Συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους ανάλυσης, οι βιοδοκιμές δίνουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο, τον οποίο εμφανίζει μία τοξική ένωση, καθώς περιλαμβάνει και την αλληλεπίδραση, την οποία μπορεί να εμφανίζει μία τοξική ένωση, με άλλες ουσίες, οι οποίες μπορεί να βρίσκονται στο υπό μελέτη δείγμα. Επιπλέον, δίνει σημαντικές πληροφορίες και για τον μηχανισμό με τον οποίο εμφανίζει την τοξικότητα της.

Αποτελούν μία ιδιαίτερα ετερογενή ομάδα τεχνικών, καθώς περιλαμβάνουν διαφορετικές πρακτικές, προετοιμασία δείγματος, συνθήκες πραγματοποίησης και οργανισμό ή κύτταρο που χρησιμοποιείται (Severin, Souton, Dahbi, & Chagnon, 2017).

Κεφάλαιο 3 – Ανίχνευση τοξικών ουσιών σε τρόφιμα

Η πλειοψηφία των διαφορετικών τεχνικών, οι οποίες αναλύθηκαν παραπάνω, δεν αποτελούν εξειδικευμένες τεχνικές για την ανίχνευση τοξικών ουσιών στα τρόφιμα. Αντίθετα χρησιμοποιούνται στην μελέτη και ανίχνευση διαφόρων ουσιών σε ποικίλα υποστρώματα, όσο και σε διαφορετικούς ερευνητικούς σκοπούς.

Ωστόσο, η ευελιξία και ακρίβεια στην ανίχνευση των διαφόρων ενώσεων, τις έχουν αναδείξει ως ένα ιδιαίτερα πρόσφορο πεδίο μελέτης για την ανάπτυξη μεθόδων για την ανίχνευση ποικίλων τοξικών ουσιών στα τρόφιμα.

3.1 Μυκοτοξίνες

Εξαιτίας της σημασίας τους στην ασφάλεια των διαφορετικών τροφίμων, οι μυκοτοξίνες αποτελούν έναν από τον πιο σημαντικό στόχο για την ανάπτυξη διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης.

3.1.1 Μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού μυκοτοξινών

Ένα από τα σημαντικότερα στάδια στην μελέτη των διαφορετικών μυκοτοξινών είναι η επιλογή των κατάλληλων μεθόδων απομόνωσης και καθαρισμού τους, από τα διάφορα βιολογικά δείγματα, από τα οποία προέρχονται.

Σπουδαίο ρόλο σε αυτό διαδραματίζει η επιλογή των κατάλληλων διαλυτών. Η επιλογή αυτή βασίζεται στην χημική φύση της μυκοτοξίνης, η οποία θα αναλυθεί. Οι διάφοροι διαλύτες και μέθοδοι, οι οποίοι χρησιμοποιούνται θα πρέπει να είναι αποτελεσματικοί, να μην εμφανίζουν τοξικότητα και να δίνουν γρήγορα αποτελέσματα. Επιπλέον, θα πρέπει να αφαιρούν μόνο την μυκοτοξίνη, η οποία μελετάται, από το δείγμα με την μεγαλύτερη δυνατή απόδοση και αποτελεσματικότητα. Ακόμα, θα πρέπει να είναι οικονομικά προσιτοί.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύγκριση των κυριότερων διαφορετικών μεθόδων, οι οποίες χρησιμοποιούνται στην απομόνωση των μυκοτοξινών:

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
QUECHERS	Μείγματα οργανικών διαλυτών (CH ₃ CN, MeOH, MeOH/CH ₃ CN)	Οικονομική γρήγορη απλή, ανίχνευση ποσοτήτων σε επίπεδα ppb, επαναληψιμότητα και ακρίβεια	Ανάγκη για τροποποιήσεις, απαραίτητο ένα επίπεδο εμπλουτισμού
LLE	Οργανικοί διαλύτες (εξάνιο, κυκλοεξάνιο) με διαλυμένα οξέα ή νερό	Αποτελεσματική για εφαρμογές σε μικρή κλίμακα	Ιδιαίτερα χρονοβόρα, πιθανή απώλεια δείγματος
SLE	Οργανικοί διαλύτες με διαλυμένα οξέα ή νερό	Μικρός όγκος διαλυτών	Επίδραση του αρχικού υλικού (matrix effect)
ASE Ή PLE	Μείγματα οργανικών διαλυτών (MeOH/CH ₃ CN, CH ₃ CN/νερό)	Πλήρως αυτοματοποιημένη, γρήγορη, ελάχιστη ποσότητα διαλυτών, μεγάλη αποτελεσματικότητα και απόδοση απομόνωσης	Ακριβώς εξοπλισμός, πιθανή απομόνωση επιπλέον ενώσεων από το αρχικό υλικό

SFE	Υπερκρίσιμα υγρά, MeOH, αιθανόλη, ακετόνη	Γρήγορη, μικρός όγκος διαλυτών, απομόνωση θερμοευαίσθητων ενώσεων	Ακριβώς εξοπλισμός, όχι κατάλληλο για αναλύσεις ρουτίνας
MAE	Υδατικά διαλύματα	Γρήγορη τεχνική, χαμηλή ποσότητα διαλυτών	Ακριβώς εξοπλισμός, μόνο για μη θερμοευαίσθητες ενώσεις
VALDS-ME	Μείγμα οργανικών διαλυτών και νερού	Απλή, γρήγορη, αποτελεσματική, διαλύτες χαμηλής πυκνότητας	Βελτιωστοποίηση μετά από έλεγχο διαφορετικών παραμέτρων

Πίνακας 3: Διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης μυκοτοξινών (Agriouroulou, Stamatelououlou, & Varzakas, 2020)

Μετά την απομόνωση της μυκοτοξίνης ακολουθείται ένα ή περισσότερα στάδια καθαρισμού τους. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η εκλεκτικότητα και απομακρύνονται ενώσεις, οι οποίες μπορεί να έχουν απομονωθεί μαζί με την μυκοτοξίνη ενδιαφέροντες και η παρουσία τους μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας της επακόλουθης ανάλυσης.

3.1.2 Χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι

Διαφορετικές τεχνικές, οι οποίες βασίζονται στην μέθοδο της χρωματογραφίας, έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους για την ανίχνευση των διαφόρων μυκοτοξινών είναι ο συνδυασμός των χρωματογραφικών με τις φασματοσκοπικές μεθόδους. Κατά τις μεθόδους αυτές, οι διάφορες ενώσεις αρχικά διαχωρίζονται με κάποια χρωματογραφική μέθοδο και στην συνέχεια αναλύονται με την βοήθεια φασματοσκοπίας.

Σε γενικές γραμμές, ο τύπος της χρωματομετρικής μεθόδου, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μίας μυκοτοξίνης σχετίζεται άμεσα με την χημική φύση της.

Κατά κύριο λόγο, η αέρια χρωματογραφία δεν χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των μυκοτοξινών. Αυτό συμβαίνει καθώς οι ενώσεις αυτές είναι μη πτητικές και πολικές ενώ είναι απαραίτητη και η μετατροπή τους σε ένα παράγωγο τους. Η μετατροπή αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές μεθόδους όπως σιλυλίωση ή ακυλίωση (Agrioroulou et al., 2020).

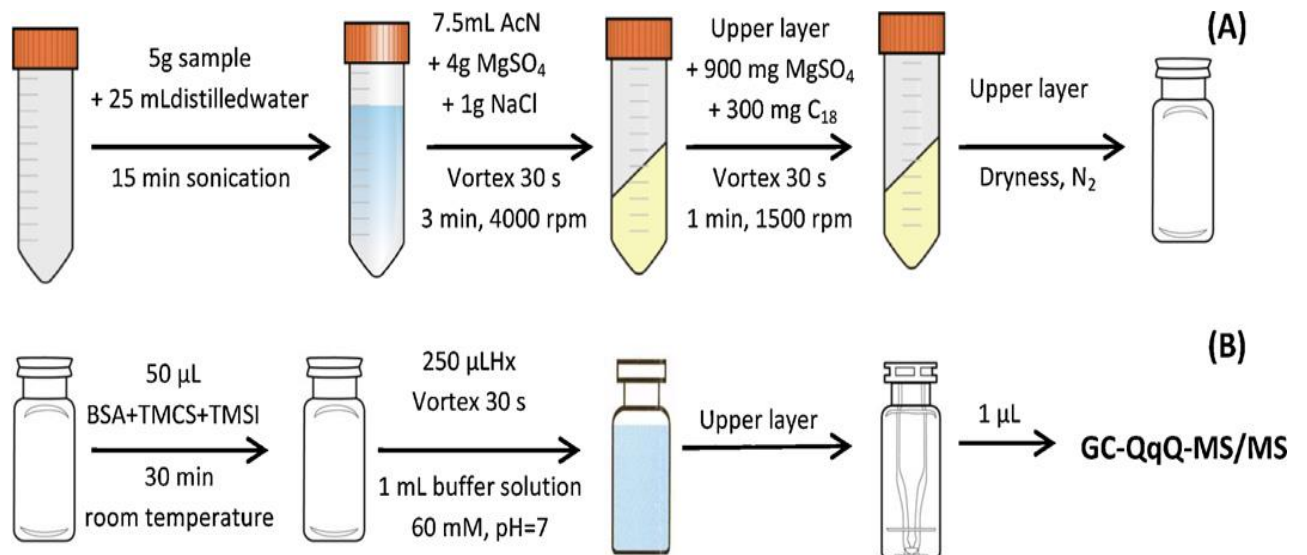
Το 2012, η ερευνητική ομάδα των Rodriguez-Carrasco et al, ανέπτυξε μία μέθοδο για την ανίχνευση 10 διαφορετικών μυκοτοξινών σε σιμιγδάλι σίτου. Η μέθοδος αυτή βασιζόταν στην απομόνωση τους με ακετονιτρίλιο και μετέπειτα ανάλυση τους με συνδιασμό αέρια χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας μάζας.

Τα όρια ποσοτικοποίησης (Limits of Quantification, LOQ) για όλες τις μυκοτοξίνες ήταν μικρότερα των 19μg/kg, αναδεικνύοντας την ακρίβεια της μεθόδου αυτής στην ανίχνευση των συγκεκριμένων ενώσεων. Οι 10 μυκοτοξίνες, τις οποίες ανέλυσαν ήταν οι παρακάτω (Rodríguez-Carrasco, Berrada, Font, & Manes, 2012):

Πατουλίνη

Ζεαραλενόνη

Οκτώ διαφορετικά τριχοθενέκια



Εικόνα 33: Πειραματική πορεία από την εργασία των Rodriguez-Carrasco et al

Μεταξύ των διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών, η πρώτη που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μυκοτοξινών ήταν η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Η μέθοδος αυτή αν και αρκετά απλή, οικονομική και γρήγορη δεν είναι ιδιαίτερα ακριβής και ευαίσθητη στον διαχωρισμό διαφορετικών ενώσεων. Για τον λόγο αυτό, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πλέον ιδιαίτερα σπάνια.

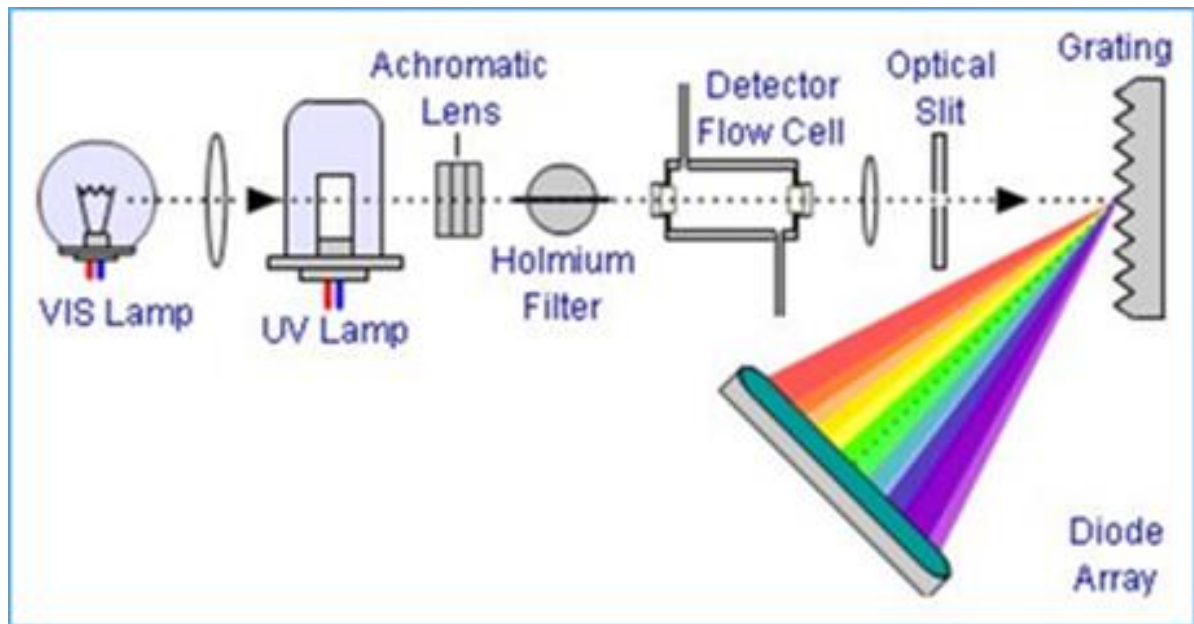
Μία τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται αρκετά στην ανίχνευση μυκοτοξινών, στα τρόφιμα είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται καθώς συνδυάζει σε μεγάλο βαθμό την πλήρη αυτοματοποίηση της διαδικασίας ανίχνευσης μαζί με την υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια ανίχνευσης. Επιπλέον, η HPLC μπορεί να συνδυαστεί με διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης, όπως φασματοσκοπία μάζας, ανίχνευση φθορισμού ή άλλων μεθόδων.

Μάλιστα, ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον στοιχείο είναι πως η σύζευξη της HPLC με την ανίχνευση φθορισμού αποτελεί την κυρία μέθοδο για την ανίχνευση της ωχρατοξίνης Α. Η τεχνική αυτή φέρει ιδιαίτερα σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς εμφανίζει υψηλή επαναληψιμότητα και ευαισθησία. Επιπλέον, η ωχρατοξίνη Α, από την χημική της φύση φέρει στο μόριο της φυσικό φθορισμό, με αποτέλεσμα να μην χρειάζεται η προσθήκη εξωγενών φθοροφόρων ενώσεων.

Η αξιοπιστία της μεθόδου αυτής φάνηκε σε μία μελέτη, η οποία δημοσιεύτηκε το 2015 στην Κίνα, από την ερευνητική ομάδα των Lai et al. Στην μελέτη αυτή οι ερευνητές εξέτασαν 370 διαφορετικά δείγματα ρυζιού, από 6 διαφορετικές επαρχίες της Κίνας, για την παρουσία αφλατοξινών και ωχρατοξίνης Α. Για να το πραγματοποιήσουν αυτό χρησιμοποίησαν την τεχνική της HPLC με παράλληλη ανίχνευση φθορισμού, ενώ η τεχνική απομόνωσης ήταν η SLE με μερικές τροποποιήσεις (DLLME-HPL). Τα όρια ανίχνευσης (limits of detection, LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) ήταν 0,009, 0,006, 0,08 mg/kg και 0,03, 0,02, 0,3 mg/kg για τις AFB1, AFB2 και OTA, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους, οι διαφορετικές μυκοτοξίνες βρίσκονταν εντός των επιτρεπτών ορίων, τα οποία έχουν θεσπιστεί (Lai, Liu, Ruan, Zhang, & Liu, 2015).

Μία ακόμα τεχνική ανίχνευσης, η οποία μπορεί να συνδυαστεί με την HPLC είναι η δοκιμασία ανίχνευσης με σειρά φωτοδιόδου (photodiode array, PDA), κατά την οποία μία σειρά ευαίσθητων ανιχνευτών παρουσιάζει το φάσμα απορρόφησης κάθε εξερχόμενου συστατικού από την χρωματογραφική στήλη.

Η ερευνητική ομάδα των Myresiotis et al, το 2015 ανέδειξε την χρησιμότητα της μεθόδου αυτής στην ανίχνευση τοξινών από τον μύκητα *Alternaria* σε καρπούς και χυμούς από ρόδι. Τα διαφορετικά είδη του μύκητα αυτού παράγουν πολλαπλές τοξίνες, οι οποίες εμφανίζουν διαφορετικές τοξικές δράσεις, μεταξύ των οποίων και καρκινογενέσεις. Στην μελέτη τους αξιολόγησαν τις 3 κυριότερες τοξίνες του μύκητα *Alternaria*, οι οποίες είναι η αλτερναριόλη (AOH), ο μονομεθυλικός αιθέρας της αλτερναριόλης (AME) και η τεντοτοξίνη (TEN). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους, οι συγκεντρώσεις της αλτερναριόλης κυμαίνονταν από 0,3 έως 50,5 μg/g, του μονομέθυλικού αιθέρα της αλτερναριόλης κυμαίνονταν από 0,5 έως 32,3 μg/g, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν επίπεδα τεντοτοξίνης. Οι τιμές LOD κυμαίνονταν από 0,015 μg/g έως 0,02 μg/g ενώ οι τιμές LOQ κυμαίνονταν από 0,05 έως 0,066 μg/g. Όταν στην συνέχεια εφάρμοσαν την μέθοδο αυτή σε 16 εμπορικά δείγματα, δεν ανιχνεύτηκαν οι διαφορετικές αυτές τοξίνες του μύκητα (Myresiotis, Testempasis, Vryzas, Karaoglanidis, & Papadopoulou-mourkidou, 2015).



Εικόνα 34: Βασική αρχή λειτουργίας ενός ανιχνευτή PDA

(<https://wiki.groenkennisnet.nl/display/CPC/4.5.+Detection+of+phytochemicals+in+food+extracts>)

Επιπλέον, η HPLC μπορεί και να συνδυαστεί ταυτόχρονα με την τεχνική της PDA και της ανίχνευσης φθορισμού. Ο συνδυασμός των τεχνικών αυτών αναδείχτηκε το 2017, από την ερευνητική ομάδα των Irakli et al, οι οποίοι τις χρησιμοποίησαν για την ανίχνευση διαφορετικών μυκοτοξινών, όπως αφλατοξινών, ωχρατοξίνης A, ζεαραλενόνης και δέοξυνιβαλενόλης σε δείγματα από πίτουρο σιταριού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους, οι τιμές LOD κυμαίνονταν από 0,12 έως 12,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$, οι οποίες είναι κάτω από τα ανώτατα επιτρεπτά όρια, τα οποία έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή επέδειξε καλή γραμμικότητα και μικρή παραλλακτικότητα στα αποτελέσματα της (Irakli, Skendi, & Papageorgiou, 2017).

Ωστόσο, η HPLC είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και όταν συνδυάζεται με την μέθοδο της φασματοσκοπίας μάζας, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση των μυκοτοξινών σε πολλά διαφορετικά δείγματα.

Το 2013, η ερευνητική ομάδα των Rubert et al, μελέτησε την παρουσία πολλαπλών διαφορετικών μυκοτοξινών, όπως αφλατοξινών ωχρατοξίνης Α κλπ. σε δείγματα από ευρωπαϊκές μύρες, με την χρήση HPLC συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης(HPLC-QqQ-MS/MS), ενώ η μέθοδος απομόνωσης, την οποία χρησιμοποίησαν ήταν η SPE. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους, οι κύριες τοξίνες, οι οποίες εντοπίστηκαν στις μύρες αυτές ήταν η ωχρατοξίνη Α, οι φουμονισίνες, η T2 και η HT2. Επιπλέον, η μύρα στην οποία εντοπίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μυκοτοξινών ήταν η ξανθιά μύρα τύπου lager (Rubert, Soler, Marín, James, & Mañes, 2013).

Σε μία άλλη εργασία, η οποία δημοσιεύτηκε το 2015, από την ερευνητική ομάδα των Hickert et al, μελετήθηκε η παρουσία 26 διαφορετικών μυκοτοξινών σε δείγματα καλαμποκιού με την χρήση HPLC συζευγμένης με πολλαπλή φασματοσκοπία μάζας (HPLC-MS/MS). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους, όλες οι μυκοτοξίνες αυτές ανιχνεύτηκαν εντός των προβλεπόμενων επιπέδων τους, σε χρόνο 6 λεπτών και σε ιδιαίτερα χαμηλό κόστος (Hickert, Gerding, Ncube, & Humpf, 2015).

Ωστόσο, πλέον η πιο ακριβής μέθοδος για την ανίχνευση μυκοτοξινών από βιολογικά δείγματα θεωρείται ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας με την πολλαπλή φασματοσκοπία μάζας (LC-MS/MS). Η μέθοδος αυτή θεωρείται πιο ακριβής, ειδική και ευαίσθητη από την HPLC. Επιπλέον, Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (European Committee for Standardization, CEN) έχει εκδώσει από το 2017 επίσημα πρωτόκολλα για την ανίχνευση της ζεαραλενόνης σε λαχανικά και έλαια, καθώς και για την ανίχνευση των T2 και HT2 σε δημητριακά και προϊόντα δημητριακών (Agriopoulou et al., 2020).

Επιπλέον, η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και για την ανίχνευση διαφορετικών τοξινών από τον μύκητα *Alternaria* από ποικίλα τρόφιμα, όπως χυμούς, σάλτσες τομάτας, φρέσκο και ξηρό βασιλικό, μύρα, χυμό μήλου και ελιές (Prelle, Spadaro, Garibaldi, & Lodovica, 2013). Ακόμα, φαίνεται πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση τοξινών μυκήτων του γένους *Shiga* (Zhang et al., 2019)

3.1.2 Ανοσολογικές μέθοδοι

Οι διάφορες ανοσολογικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταχεία ανίχνευση διαφόρων μυκοτοξινών. Από τις μεθόδους αυτές, η ELISA είναι η πιο σημαντική.

Αν και παραδοσιακά, η μέθοδος αυτή ήταν ιδιαίτερα χρονοβόρα, το 2015 η ερευνητική ομάδα των Uruson et al, δημιούργησε ένα πρωτόκολλο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση διαφορετικών μυκοτοξινών, όπως της αφλατοξίνης B1, την ωχρατοξίνη A και της ζεαραλενόνης. Σύμφωνα με την μέθοδο την οποία ανέπτυξαν, η ανίχνευση του συνόλου και των 3 αυτών μυκοτοξινών μπορεί να πραγματοποιηθεί εντός 25 λεπτών, σε αντίθεση με τα 20 τουλάχιστον λεπτά, τα οποία θα χρειαζόταν η ανίχνευση της κάθε μίας τοξίνης ξεχωριστά. Ως σύστημα ανίχνευσης χρησιμοποίησαν το σύστημα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Οι τιμές LOD για κάθε τοξίνης ήταν 0,02ng/ml για την AFB1, 0,1 ng/ml για την ωχρατοξίνη A και 0,25ng/ml για την ζεαραλενόνη (Uruson et al., 2015).

Επιπλέον, όπως φάνηκε το 2016 από την ερευνητική ομάδα των Oplatowska-Stachowiak et al η ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύκολη και αποτελεσματική ανίχνευση των αφλατοξινών σε δείγματα από αράπικο φυστίκι (peanut), καλαμπόκι και άλλα είδη τροφίμων. Η ομάδα αυτή ανέπτυξε τα δικά της μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία μπορεί να βρουν εμπορική εφαρμογή (Oplatowska-stachowiak et al., 2016).

Ένα ακόμα ενδιαφέρον στοιχείο θα ήταν η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων μεταξύ τους, έτσι ώστε να μπορέσει να συγκριθεί η αποτελεσματικότητά τους στην ανίχνευση διαφορετικών μυκοτοξινών. Το 2019, η ερευνητική ομάδα των Beyene et al, δημοσίευσε μία μελέτη, στην οποία πραγματοποίησε σύγκριση μεταξύ της HPLC και της ELISA σχετικά με την ανίχνευσης αφλατοξίνης B1 σε διαφορετικά τρόφιμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης τους, και οι δύο μέθοδοι εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα αποτελεσματικότητας και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα για την ανίχνευση της αφλατοξίνης B1. Ωστόσο, η μεγαλύτερη

παραλλακτικότητα, την οποία εμφάνισε η ELISA, την καθιστά πιο κατάλληλη για μελέτες μεγάλης κλίμακας (Beyene, Du, Schrunk, Ensley, & Rumbelha, 2019).

Εκτός από την ELISA, υπάρχουν και άλλες ανοσολογικές τεχνικές, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση μυκοτοξινών. Μία από αυτές είναι η τεχνική dipstick, η οποία μοιάζει στην βασική της αρχή με την ELISA. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί και διάφορες ανοσοτεχνικές, οι οποίες βασίζονται στην ροή μέσα από μία μεμβράνη (flow-through membrane-based immunoassays). Οι τεχνικές αυτές προσφέρουν ποσοτικά ή ημιποσοτικά αποτελέσματα. Είναι αρκετά γρήγορες τεχνικές, ωστόσο δεν εμφανίζουν υψηλή ακρίβεια, με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό ή να έχουν βρει εμπορική εφαρμογή (Agriopoulou et al., 2020).

3.1.2 Βιοαισθητήρες

Μία ιδιαίτερα υποσχόμενη μέθοδος για την ανίχνευση μυκοτοξινών είναι η χρήση βιοαισθητήρων. Η χρήση των βιοαισθητήρων είναι γρήγορη, εύκολη και οικονομική, ενώ εξασφαλίζει υψηλή επαναληψιμότητα, σταθερότητα και με υψηλή ακρίβεια, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί και εκτός εργαστηρίου, στον τόπο των οποίου βρίσκονται τα δείγματα.

Τα κύρια συστήματα μεταγωγής σήματος, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των διαφόρων μυκοτοξινών είναι οπτικά, όπως για παράδειγμα φθορισμός ή συντονισμός επιφανειακού πλάσμονιου (surface plasmon resonance, SPR), πιεζοηλεκτρικά, όπως μικροϊσοροπία κρυστάλλων χαλαζία (quartz crystal microbalance, QCM), καθώς και ηλεκτροχημικά, όπως ηλεκτρικό δυναμικό.

Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά συστήματα αναγνώρισης, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν πεπτίδια, ένζυμα, αντισώματα, κύτταρα, νουκλεϊκά οξέα κλπ (Oliveira et al., 2019).

ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

ΙΜΠΕΝΤΙΜΕΤΡΙΚΟ Σ(IMPEDIMETRIC)	Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, Μικρή χρονική διάρκεια, απλό, Μικρό μέγεθος	Ακριβοί δείκτες, περίπλοκη κατασκευή
ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΣ	Γρήγορο, μικρό μέγεθος, χωρίς προετοιμασία δείγματος, υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα	Επιρροή από διαφορετικούς παράγοντες περιβάλλοντος και δείγματος
ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΣ	Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, μικρό μέγεθος	Αναγέννηση μεταξύ μετρήσεων
ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΥ ΠΛΑΣΜΟΝΙΟΥ	Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, μελέτη σε πραγματικό χρόνο και γρήγορα, φορητές συσκευές, μη χρήση ανιχνευτή, χαμηλό κόστος	Καινούργια μέθοδος, ακόμα δεν έχει βρει εμπορική εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα
ΜΙΚΡΟΪΣΣΟΡΟΠΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ ΧΑΛΑΖΙΑ	Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, μελέτη σε πραγματικό χρόνο, μη χρήση ανιχνευτών και ακτινοβολίας	Τεχνικές δυσκολίες

Πίνακας 4: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διαφορετικών βιοαισθητήρων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση μυκοτοξινών (Agriopoulou et al., 2020)

3.1.2 Μοριακές τεχνικές

Οι διάφορες μοριακές τεχνικές, όπως η PCR, η ποσοτική PCR, ο in-situ υβριδισμός κλπ, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση των διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι παράγουν διαφορετικές τοξίνες, μεταξύ των οποίων βρίσκονται και οι μυκοτοξίνες. Με την χρήση των τεχνικών αυτών δεν μπορούν απλά να ανιχνευτούν μόνο συγκεκριμένα είδη, αλλά και συγκεκριμένα στελέχη των μυκήτων αυτών, τα οποία παρουσιάζουν υψηλό δυναμικό για την παραγωγή μυκοτοξινών.

Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται και διαφορετικές τεχνικές, οι οποίες βασίζονται στην PCR και επιτρέπουν των πιο ακριβή προσδιορισμό συγκεκριμένων μυκήτων, οι οποίοι παράγουν μυκοτοξίνες.

Το 2012 η ερευνητική ομάδα των Luo et al ανέπτυξε μία μέθοδο για την ανίχνευση μυκήτων, οι οποίοι παράγουν αφλατοξίνες. Η μέθοδος αυτή βασιζόταν στην τεχνική της ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόγχου (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, η αλληλουχία στόχος ενισχύεται σε μία σταθερή θερμοκρασία, με δύο ή τρία ζεύγη εκκινητών και μία ειδική πολυμεράση, η οποία προκαλεί μία αυτοκυκλική μετατόπιση (displacement) της αλυσίδας της αλληλουχίας στόχου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται στο εσωτερικό της αλληλουχίας αυτής μία δομή βρόγχου. Η μαζική αυτή παραγωγή DNA οδηγεί σε αύξηση της θολερότητας του διαλύματος, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί από ειδικές συσκευές. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τους, η τεχνική LAMP εμφανίζει ιδιαίτερα υποσχόμενα αποτελέσματα για την ακριβή ανίχνευση πολλαπλών ειδών μυκήτων, τα οποία παράγουν αφλατοξίνες. Τα αποτελέσματα αυτά φάνηκαν, τόσο στην μελέτη καθαρών καλλιιεργειών μυκήτων, όσο και σε διαφορετικά τρόφιμα, όπως φασόλια, αράπικα φιστίκια, πράσινους κόκκους καφέ και φιστίκια Βραζιλίας (Luo, Vogel, & Niessen, 2012).

3.2 Βαρέα μέταλλα

Η ανίχνευση των διαφορετικών βαρέων μετάλλων είναι ζωτικής σημασίας, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα, τα οποία είναι εξαιρετικά επιβαρυμένα.

Σε γενικές γραμμές, η μέτρηση των βαρέων μετάλλων σε διαφορετικά δείγματα τροφίμων περιλαμβάνει 4 στάδια:

- Την λήψη κατάλληλου δείγματος
- Την αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας
- Την απομόνωση του μετάλλου ενδιαφέροντος
- Την μέτρηση του

Η αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές μεθόδους, όπως:

- Υγρή οξείδωση (wet oxidation)
- Ξηρή τεφροποίηση (dry ashing)
- Πέψη με μικροκύματα (microwave digestion)

Στην συνέχεια, η μέτρηση των διαφορετικών βαρέων μετάλλων μπορεί να πραγματοποιηθεί ή με φασματοσκοπικές ή με χημικές μεθόδους.

3.2.1 Χημικές μέθοδοι

Οι χημικές αυτές μέθοδοι ανιχνεύουν συνήθως ένα μέταλλο ανά αντίδραση και βασίζονται στην αλλαγή του χρώματος του διαλύματος της αντίδρασης, όταν το βαρύ μέταλλο αντιδράσει με το κατάλληλο αντιδραστήριο. Στην συνέχεια, η αλλαγή αυτή ποσοτικοποιείται μέσω της χρήσης οπτικού φασματοφωτόμετρου απορρόφησης ("MANUAL OF METHODS OF ANALYSIS OF FOODS METALS," 2015).

Τα κύρια αντιδραστήρια, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων είναι τα παρακάτω:

- Αρσενικό με μπλε του μολυβδενίου
- Αρσενικό με διαιθυλοδιθειοκαρβαμικό νάτριο
- Κάδμιο με διθειοζόνη
- Ψευδάργυρος με διθειοζόνη
- Χαλκός με καρβαμικό
- Σίδηρος με υδροχλωρικό οξύ της υδροξυλαμίνης
- Μόλυβδος με χλωροφόρμιο και κιτρικό οξύ
- Μόλυβδος με νιτρικό οξύ και θειικό οξύ
- Κασσίτερος με μωβ της κατεχόλης

3.2.2 Φασματοσκοπικές μέθοδοι

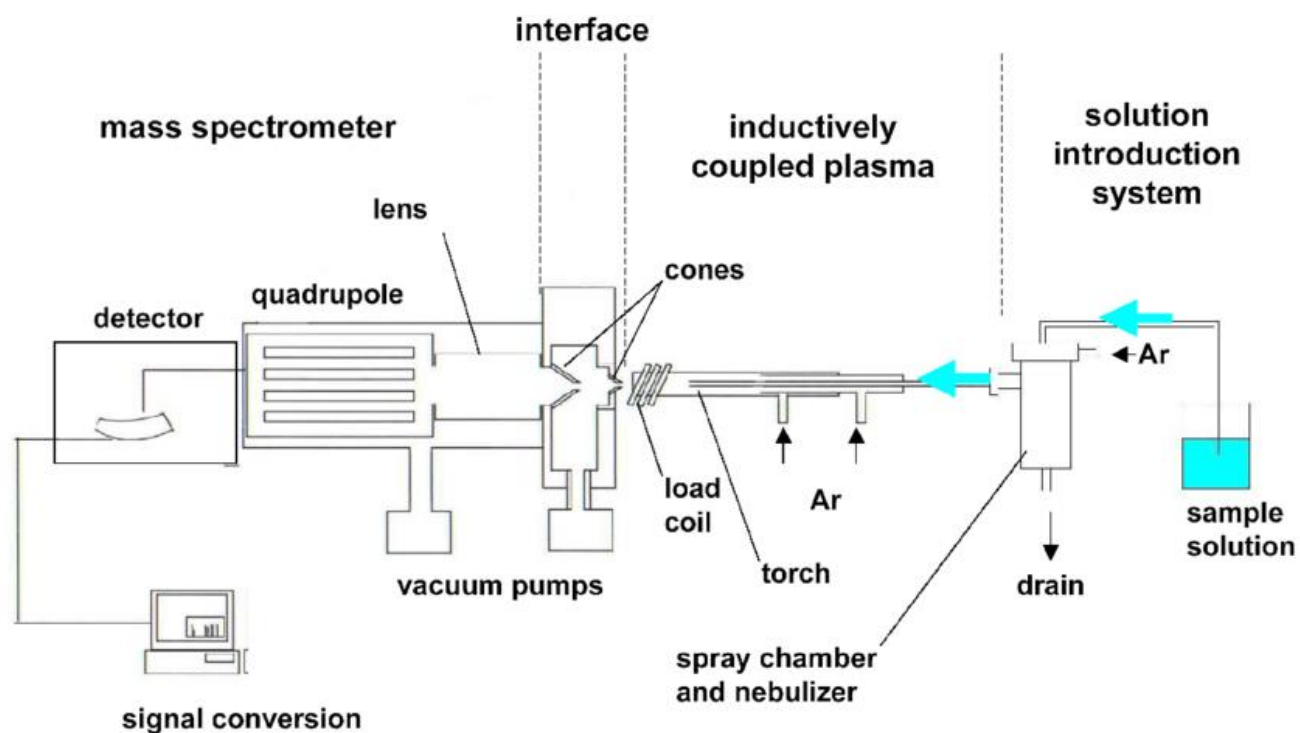
Οι διάφορες χημικές μέθοδοι, αν και εύκολες και οικονομικές εμφανίζουν μικρή ακρίβεια, ενώ είναι και ιδιαίτερα ευαίσθητες στην παρουσία διαφορετικών προσμίξεων. Για τον λόγο αυτό έχει επικρατήσει η χρήση διαφόρων φασματοσκοπικών τεχνικών.

Από αυτές, η κυριότερη τεχνική, η οποία έχει επικρατήσει είναι η φασματοσκοπία μάζας πλάσματος με επαγωγική σύζευξη (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, ICP-MS), καθώς και διάφορες άλλες παραλλαγές της όπως η

φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής πλάσματος με επαγωγική σύζευξη (ICP-AES) ή η φασματοσκοπία οπτικής εκπομπής πλάσματος με επαγωγική σύζευξη (ICP-OES).

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, μία ακτίνα πλάσματος οδηγεί σε ιονισμό του δείγματος. Αυτό οδηγεί σε διάσπαση του δείγματος σε ατομικά ή μικρά πολυατομικά ιόντα, τα οποία στην συνέχεια ανιχνεύονται από κάποια διαφορετική φασματοφωτμετρική μέθοδο.

Η μέθοδος αυτή έχει βρει εφαρμογή στην ανίχνευση πολλαπλών διαφορετικών βαρέων μετάλλων στα τρόφιμα (Liang, Gong, Li, Zuo, & Pan, 2019).



Εικόνα 35: Σχηματική αναπαράσταση ενός ICP-MS φασματογράφου

https://www.researchgate.net/publication/44226526_A_colloidal_nanoparticle_for_m_of_indium_tin_oxide_system_development_and_characterization/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic

3.3 Άλλες τοξικές ουσίες

Τα διάφορα φυτοφάρμακα αποτελούν μία ιδιαίτερα ετερόκλητη ομάδα ενώσεων, η οποία χαρακτηρίζεται από πολλές διαφορές, όσον αφορά την πολικότητα τους, τις διάφορες χημικές τους ομάδες, το μέγεθος και το σχήμα τους κλπ.

Οι διαδικασίες απομόνωσης των διαφορετικών φυτοφαρμάκων από τα βιολογικά δείγματα είναι παρόμοιες με αυτές οι οποίες αναλύθηκαν για τις μυκοτοξίνες.

Η ανίχνευση των φυτοφαρμάκων γίνεται κυρίως με διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές, όπως αέρια χρωματογραφία ή υγρή χρωματογραφία.

Όσον αφορά την αέρια χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί ανιχνευτές, όπως φασματογράφοι μάζας, φωτομετρικοί ανιχνευτές φλόγας, ανιχνευτές αζώτου και φωσφόρου ή ανιχνευτές παγίδευσης ηλεκτρονίων. Ωστόσο, ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία, η χρήση της αέρια χρωματογραφίας ως μεθόδου ανίχνευσης φυτοφαρμάκων έχει μειωθεί. Αυτό συμβαίνει καθώς, τα σύγχρονα φυτοφάρμακα εμφανίζουν αυξημένη πολικότητα (γεγονός το οποίο τα καθιστά λιγότερο υπολειμματικά και τοξικά), με αποτέλεσμα να μην είναι τόσο πτητικά και θερμοσταθερά, έτσι ώστε να μπορούν να μελετηθούν με αέρια χρωματογραφία.

Στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται επίσης διαφορετικές μέθοδοι ανίχνευσης, όπως η φασματοσκοπία μάζας και η PDA. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτή δεν παρέχουν δομικές πληροφορίες για τα διάφορα φυτοφάρμακα, τα οποία ανιχνεύονται. Για τον λόγο αυτό πλέον, χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία με πολλαπλή φασματοσκοπία μάζας (LC-MS/MS).

Άλλες τεχνικές, οι οποίες φαίνεται να οδηγούν σε εύκολη και γρήγορη ανίχνευση διαφορετικών φυτοφαρμάκων, φαίνεται να είναι η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση και η ELISA (Narendran, Meyyanathan, & Babu, 2020).

Το 2019 η ερευνητική ομάδα των Zhao et al, ανέπτυξε μία μέθοδο μελέτης καταλοίπων φυτοφαρμάκων και βαρέων μετάλλων με την χρήση ενισχυμένης από

νανοϋλικά φασματοσκοπίας διάσπασης από λέιζερ (Nanoparticle-Enhanced Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, NE-LIBS).

Η απλή LIBS χρησιμοποιήσει μία ακτίνα λέιζερ ως πηγή ιονισμού. Με την μέθοδο αυτή μπόρεσαν να μετρήσουν με ακρίβεια βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο καθώς και το εντομοκτόνο Chlorpyrifos (Zhao, Zhao, Du, & Dong, 2019).

3.4 Άλλες τοξικές ουσίες

Το ακρυλαμίδιο ανιχνεύεται κυρίως με χρωματογραφικές τεχνικές σε συνδυασμό με φασματοσκοπία. Οι κυριότερες μέθοδοι είναι η HPLC, η αέρια χρωματογραφία, η LC-MS/MS και η GC-MS. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται και άλλες μέθοδοι, όπως για παράδειγμα η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, καθώς και η ELISA (Pan, Liu, Yang, Hong, & Xie, 2020).

Παρόμοιες μέθοδοι χρησιμοποιούνται και για την ανίχνευση των αλκαλοειδών πυρρολιζιδίνης.

Συμπεράσματα

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί μία βιβλιογραφική ανασκόπηση των κυριότερων θεμάτων, τα οποία αφορούν την ανίχνευση τοξικών ουσιών στα τρόφιμα. Από την ανάλυση της βιβλιογραφίας μπορούν να εξαχθούν ορισμένα ιδιαίτερα ενδιαφέροντα συμπεράσματα.

- Υπάρχουν πολλές διαφορετικές τοξικές ουσίες, οι οποίες μπορούν να εμφανιστούν στα τρόφιμα. Επιπλέον, οι πηγές αυτών των ουσιών μπορεί να διαφέρουν.
- Η έρευνα όσον αφορά την ανίχνευση των τοξικών αυτών ουσιών αφορά ως επί το πλείστο τις μυκοτοξίνες.
- Οι περισσότερες τοξικές ουσίες ανιχνεύονται με έναν συνδυασμό χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών προσεγγίσεων.
- Η χρήση της κάθε μεθόδου ανίχνευσης εξαρτάται από την χημική φύση της υπό ανίχνευση ουσίας

Οι μέθοδοι αυτοί αποτελούν ένα συνεχές και ιδιαίτερα δυναμικό πεδίο ανάπτυξης. Είναι σίγουρο πως με την πάροδο των χρόνων θα συνεχίσουν να αναπτύσσονται νέες τεχνικές, όσο και να βελτιώνονται οι ήδη υπάρχουσες, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η παροχή ασφαλών τροφίμων στο σύνολο του πληθυσμού.

Βιβλιογραφία

- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. *Foods*, 9(518), 1–23.
- Aydin, S. (2015). Peptides A short history , principles , and types of ELISA , and our laboratory experience with peptide / protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Bajwa, U., & Sandhu, K. S. (2014). Effect of handling and processing on pesticide residues in food- a review. *J Food Sci Technol*, 51(2), 201–220. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0499-5>
- Beyene, A. M., Du, X., Schrunk, D. E., Ensley, S., & Rumbelha, W. K. (2019). High - performance liquid chromatography and Enzyme - Linked Immunosorbent Assay techniques for detection and quantification of aflatoxin - B 1 in feed samples : a comparative study. *BMC Research Notes*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4538-z>
- Buchberger, A. R., DeLaney, K., Johnson, J., & Li, L. (2018). Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Analytical Chemistry*, 90(1), 240–265. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04733>
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Darbeau, R. W. (2006). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy : A Review and a Look at Its Use as a Probative Tool in Deamination Chemistry
Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy : A Review and a Look at Its Use as a Probative Tool in Deamination Chemistry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 41(4), 401–425. <https://doi.org/10.1080/05704920600726175>
- Dolan, L. C., Matulka, R. A., & Burdock, G. A. (2010). Naturally Occurring Food Toxins. *Toxins*, 2, 2289–2332. <https://doi.org/10.3390/toxins2092289>

- He, S., Simpson, B. K., Sun, H., Ngadi, M. O., & Ma, Y. (2015). Phaseolus vulgaris Lectins : A Systematic Review of Characteristics and Health Implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1096234>
- Hickert, S., Gerding, J., Ncube, E., & Humpf, H. (2015). A new approach using micro HPLC-MS / MS for multi-mycotoxin analysis in maize samples. *Mycotoxin Research*, 31, 109–115. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0221-y>
- Irakli, M. N., Skendi, A., & Papageorgiou, M. D. (2017). HPLC-DAD-FLD Method for Simultaneous Determination of Mycotoxins in Wheat Bran. *Journal Of Chromatographic Science*, 55(7), 690–696.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx022>
- Lai, X., Liu, R., Ruan, C., Zhang, H., & Liu, C. (2015). Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control*, 50(1881), 401–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.029>
- Liang, G., Gong, W., Li, B., Zuo, J., & Pan, L. (2019). Analysis of Heavy Metals in Foodstuffs and an Assessment of the Health Risks to the General Public via Consumption in Beijing , China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(909). <https://doi.org/10.3390/ijerph16060909>
- Luka, G., Ahmadi, A., Najjaran, H., Alocilja, E., & Derosa, M. (2015). Microfluidics Integrated Biosensors : A Leading Technology towards Lab-on- Microfluidics Integrated Biosensors : A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications. *Sensors*, 15, 30011–30031.
<https://doi.org/10.3390/s151229783>
- Luo, J., Vogel, R. F., & Niessen, L. (2012). Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid identification of aflatoxigenic molds and their detection in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 214–224.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.018>

MANUAL OF METHODS OF ANALYSIS OF FOODS METALS. (2015). *FOOD SAFETY AND*

- Melough, M. M., Cho, E., & Chun, O. K. (2018). Furocoumarins : A review of biochemical activities , dietary sources and intake , and potential health risks Furocoumarins : A review of biochemical activities , dietary sources and intake , and potential health risks. *Food and Chemical Toxicology*, 113(January), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.030>
- Moreira, R., & Pereira, D. M. (2018). Pyrrolizidine Alkaloids : Chemistry , Pharmacology , Toxicology and Food Safety. *International Journal of Molecular Sciences Review*, 19(1668). <https://doi.org/10.3390/ijms19061668>
- Myresiotis, C. K., Testempasis, S., Vryzas, Z., Karaoglanidis, G. S., & Papadopoulou-mourkidou, E. (2015). Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method. *FOOD CHEMISTRY*, 182, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.141>
- Narenderan, S. T., Meyyanathan, S. N., & Babu, B. (2020). Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables . Pre-treatment , extraction and detection techniques. *Food Research International*, 133(March), 109141. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109141>
- Nkwunonwo, U. C., Odika, P. O., & Onyia, N. I. (2020). A Review of the Health Implications of Heavy Metals in Food Chain in Nigeria. *The Scientific World Journal*, 2020.
- Oliveira, I. S., Galdino, A., Augusto, C., Andrade, S. De, Danielly, M., & Oliveira, L. (2019). Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. *Current Opinion in Food Science*, 29, 64–79. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.004>
- Oplatowska-stachowiak, M., Sajic, N., Xu, Y., Haughey, S. A., Mooney, M. H., Yun, Y., ... Elliott, C. T. (2016). Fast and sensitive aflatoxin B1 and total aflatoxins ELISAs for analysis of peanuts , maize and feed ingredients. *Food Control*, 63(1881), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.041>

- Pan, M., Liu, K., Yang, J., Hong, L., & Xie, X. (2020). Review of Research into the Determination of Acrylamide in Foods. *Foods*, 9(524).
- Piñeiro, C., Carrera, M., Cañas, B., Lekube, X., & Martinez, I. (2015). Proteomics and Food Analysis: Principles, Techniques, and Applications. In *Handbook of Food Analysis* (pp. 369–391). <https://doi.org/10.1201/b18668-22>
- Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Lodovica, M. (2013). A new method for detection of five alternaria toxins in food matrices based on LC – APCI-MS. *Food Chemistry*, 140(1–2), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.065>
- Rainieri, S., & Barranco, A. (2019). Microplastics , a food safety issue ? *Trends in Food Science & Technology*, 84(June 2017), 55–57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.009>
- Rather, I. A., Koh, W. Y., Paek, W. K., & Lim, J. (2017). The Sources of Chemical Contaminants in Food and Their Health Implications. *Frontiers in Pharmacology*, 8(November). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00830>
- Rifai, L., & Saleh, F. A. (2020). A Review on Acrylamide in Food : Occurrence , Toxicity , and Mitigation A Review on Acrylamide in Food : Occurrence , Toxicity , and Mitigation Strategies. *International Journal of Toxicology*, 39(2), 93–102. <https://doi.org/10.1177/1091581820902405>
- Rodríguez-Carrasco, Y., Berrada, H., Font, G., & Manes, J. (2012). Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction procedure and gas chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A J*, 1270, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.061>
- Rubert, J., Soler, C., Marín, R., James, K. J., & Mañes, J. (2013). Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. *Food Control*, 30(1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.035>
- Severin, I., Souton, E., Dahbi, L., & Chagnon, M. C. (2017). Use of bioassays to assess hazard of food contact material extracts : State of the art. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 429–447. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.046>

- Thompson, L. A., & Darwish, W. S. (2019). Environmental Chemical Contaminants in Food : Review of a Global Problem. *Journal of Toxicology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2345283>
- Tola, M., & Kebede, B. (2016). Occurrence , importance and control of mycotoxins : A review Occurrence , importance and control of mycotoxins : A review. *Cogent Food & Agriculture*, 21(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1191103>
- Urusov, A. E., Zherdev, A. V, Petrakova, A. V, Sadykhov, E. G., Koroleva, O. V, & Dzantiev, B. B. (2015). Rapid Multiple Immunoenzyme Assay of Mycotoxins. *Toxins*, 7, 238–254. <https://doi.org/10.3390/toxins7020238>
- Wong, A. L., Xiang, X., Ong, P. S., Qin, E., Mitchell, Y., Syn, N., ... Wang, L. (2018). A Review on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods for Rapid Quantification of Oncology Drugs. *Pharmaceutics*, 10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040221>
- Zhang, L., Zhang, L., Du, Y., Li, X., Unger, M., Davlut, D., ... Cheng, K. (2019). Mass spectrometry-based Shiga toxin identification : A clinical validation. *Journal of Proteomics*, 198(February), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.01.020>
- Zhao, X., Zhao, C., Du, X., & Dong, D. (2019). Detecting and Mapping Harmful Chemicals in Fruit and Vegetables Using Nanoparticle-Enhanced Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Nature Scientific Reports*, 9(906), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37556-w>