



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Προσδιορισμός ανόργανου αρσενικού σε τρόφιμα
φυτικής προέλευσης με φασματομετρία ατομικής
μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού
(ICP - MS)**

**ΖΩΗ ΓΚΑΛΗΜΑΝΑ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Προσδιορισμός ανόργανου αρσενικού σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης με φασματομετρία ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (ICP - MS)

ΖΩΗ ΓΚΑΛΗΜΑΝΑ

A.M.: 51601

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Προεστός Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμαΐδης Νικόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαρκάκη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Προεστός Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 19/06/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αρσενικό συνιστά ένα από τα πιο τοξικά ιχνοστοιχεία που απαντώνται στο περιβάλλον τόσο σε οργανικές όσο και ανόργανες μορφές. Το ολικό ανόργανο αρσενικό (in As) είναι το άθροισμα των As(III) και As(V), που θεωρούνται καρκινογόνα. Πέραν της καρκινογόνου δράσης τους, επιφέρουν μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων, όπως αλλοιώσεις στο δέρμα, διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης, καρδιακές παθήσεις κλπ. Η ευαισθησία ωστόσο, του ανθρώπινου οργανισμού στις διάφορες δυσμενείς επιδράσεις που επιφέρει, ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ατόμων και καθορίζεται από παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και οι διατροφικές του συνήθειες. Η κύρια πηγή έκθεσης του ανθρώπου στο in As είναι μέσω της τροφικής αλυσίδας. Μεταξύ των αγροτικών προϊόντων, το ρύζι ως βιο-συσσωρευτικό φυτό και βασική τροφή για το μισό του παγκόσμιου πληθυσμού, συμβάλλει σημαντικά στο in As που προσλαμβάνει ο άνθρωπος. Παρά την υψηλή του τοξικότητα, νομοθετικά όρια στα τρόφιμα ορίστηκαν σχετικά πρόσφατα με τον Κανονισμό ΕΚ 2015/1006. Ειδικότερα, μέγιστα επίπεδα για το στιλβωμένο ή λευκό ρύζι, αποφλοιωμένο και επεξεργασμένο με βραστό νερό ορίστηκαν τα 0,20 και 0,25 mg/kg, αντίστοιχα. Χαμηλότερα είναι τα όρια για τα προϊόντα με βάση το ρύζι και που απευθύνονται σε βρέφη και μικρά παιδιά (0,30 και 0,10 mg/kg, αντίστοιχα). Συνεπώς, ο στοιχειακός προσδιορισμός του in As αποβαίνει σήμερα πρόκληση για τους αναλυτές στον κλάδο των τροφίμων.

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία περιγράφει την ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό in As σε ριζάλευρο με χρήση φασματομετρίας ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (ICP-MS), αποφεύγοντας τη σύζευξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με ICP-MS, που είναι η κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούμενη τεχνική διεθνώς, ώστε να γίνει ο προσδιορισμός απλός και ταχύς. Η ακρίβεια και η ορθότητα της μεθόδου ελέγχθηκαν με πιστοποιημένα υλικά αναφοράς και τα στοιχεία επικύρωσης που απαιτεί το διεθνές πρότυπο ISO 17025.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Χημεία τροφίμων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: τοξικό ιχνοστοιχείο, ανόργανο αρσενικό, στοιχειακός προσδιορισμός, ριζάλευρο, ICP-MS

ABSTRACT

Arsenic constitutes one of the most toxic trace elements found in the environment both as organic and inorganic forms. The total inorganic As (in As) is the sum of As(III) and As(V), which are considered carcinogenic. Besides being carcinogen, it also causes a wide range of adverse health effects such as skin lesions, abnormal glucose metabolism, cardiovascular diseases etc. However, the susceptibility to the toxic effects differs considerably between individuals and populations depending on factors such as age, gender and nutritional habits. The main source of human exposure to in As is *via* the food chain. Among agricultural products, rice as a bio-accumulative plant and staple food for half the world's population, contributes significantly to in As human intake. Despite its high toxicity, regulatory limits of in As in foodstuffs have been established recently by regulation EU 2015/1006. Specifically, maximum levels of in As for non-parboiled milled rice and parboiled, husked rice must be 0.20 and 0.25 mg/kg, respectively. Significantly lower limits have also been set for commodities such as rice-based products and food destined for the vulnerable portion of consumers, like infants and young children (0.30 and 0.10 mg/kg, respectively). Consequently, the selective determination of in As is nowadays considered a challenge for food analysts.

The present work describes the development of a method for determination of inAs in rice flour by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), avoiding the conjunction of HPLC by ICP-MS, which is the most common analytical technique internationally applied, in order to make the analysis simple and rapid. Accuracy and trueness of the method were tested by measuring certified reference materials and validation components based on international standard ISO 17025 requirements.

SUBJECT AREA: Food chemistry

KEYWORDS: toxic trace element, inorganic arsenic, selective determination, rice flour, ICP-MS

Στην οικογένεια μου . . .

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Χαράλαμπο Προεστό, για την πολύτιμη συνεχή στήριξή του όλο αυτό το διάστημα.

Τις θερμές μου ευχαριστίες οφείλω στον κ. Ευστράτιο Κωμαΐτη για την υπομονή του στο δύσκολο έργο που ανέλαβε, τις γνώσεις που μου μετέδωσε στο πεδίο της ενόργανης ανάλυσης και την άψογη συνεργασία μας γενικότερα.

Για την αμέριστη βοήθειά του και καθοδήγηση στον σχεδιασμό των πειραμάτων και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Χημείας ΕΚΠΑ κ. Ιωάννη Πασιά, υπεύθυνος ποιότητας του Γενικού Χημείου Έρευνας και Αναλύσεων «Πασιάς-Ραπτοπούλου», ο οποίος ακόμα και από μακριά ήταν ανά πάσα στιγμή δίπλα μας για να μας επιλύσει οποιαδήποτε απορία και ζήτημα.

Ισχυρό στήριγμά μου στην έρευνα αυτή, η κ. Ελευθερία Μαρνέλη. Ήτανε πλάι μου σε κάθε πειραματική δοκιμή στην οποία και αποδίδω τις από καρδιάς μου, ευχαριστίες για το χειρισμό του οργάνου και για κάθε άλλο πολύτιμο προσανατολισμό που μου έδωσε σε οποιαδήποτε τυχόν δυσκολία.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά όλους τους ανθρώπους του HRIC της εταιρίας ΓΙΩΤΗΣ για το φιλικό εργασιακό περιβάλλον. Ιδιαίτέρως την κ. Κλαίρη Τραχανά και Μαρία Κάτσα, για την προθυμία και καλή τους προαίρεση σε κάθε μου προβληματισμό κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τις ευγενικές μου ευχαριστίες αποδίδω στην εταιρία ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε. Ήταν αμέριμνη η στήριξή της στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα, συμπεριλαμβανομένων της διάθεσης όλων των αναλώσιμων και του εργαστηριακού εξοπλισμού που χρειάστηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και της δυνατότητας συμμετοχής μου στο Διεθνές Συνέδριο “Euro Food Safety 2017”, που έλαβε χώρα στην Αθήνα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	15
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 [ΕΙΣΑΓΩΓΗ]	16
1.1 Ανόργανα συστατικά.....	16
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 [ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ].....	19
2.1 Στοιχειακός προσδιορισμός.....	19
2.1.1 Τοξικότητα.....	19
2.1.2 Βιοδιαθεσιμότητα.....	21
2.1.3 Μεταβολισμός	22
2.2 Ανόργανα συστατικά στο περιβάλλον και στα τρόφιμα.....	23
2.3 Νομοθεσία για ανόργανα συστατικά	26
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 [ΤΟ ΑΡΣΕΝΙΚΟ].....	29
3.1 Ιστορικά στοιχεία	29
3.2 Χημικές μορφές του αρσενικού.....	29
3.3 Το αρσενικό στο περιβάλλον και στα τρόφιμα	33
3.3.1 Υδροφόρος ορίζοντας.....	33
3.3.2 Χερσαίο περιβάλλον	34
3.3.3 Η έκθεση του ανθρώπου στο αρσενικό μέσω της διατροφής του.....	34
3.4 Τοξικότητα του αρσενικού.....	39
3.4.1 Εκτίμηση επικινδυνότητας (Risk Assessment).....	44
3.4.2 Νομοθεσία για το αρσενικό.....	45
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 [ΤΟ ΡΥΖΙ]	47
4.1 Βοτανική Ταξινόμηση	47
4.2 Προέλευση - Εξέλιξη.....	48
4.3 Το ρύζι τρόφιμο για τον άνθρωπο.....	49

4.4 Η επεξεργασία του ρυζιού και τα είδη που προκύπτουν	51
4.5 Το περιεχόμενο του αρσενικού στο ρύζι και τα προϊόντά του.....	54
4.5.1 Παράγοντες που το επηρεάζουν	54
4.5.2 Αυθεντικότητα των τροφίμων	57
4.6 Νομοθεσία για το ανόργανο αρσενικό στο ρύζι και τα προϊόντα του	59
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 [ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΟ	
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ]	61
5.1 Γενικά	61
5.2 Η φασματομετρία ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, ICP-MS).....	62
5.2.1 Εισαγωγή	62
5.2.2 Αρχή λειτουργίας του ICP-MS.....	64
5.2.3 Κυψελίδα σύγκρουσης - αντίδρασης.....	66
5.2.4 Μελέτη των παρεμποδίσεων.....	68
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 [ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ]	72
6.1 Μέθοδος εκχύλισης με νιτρικό οξύ και EDTA για ICP-MS ανάλυση	73
6.1.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων της μεθόδου	79
6.2 Μέθοδος διφασικού συστήματος με υδροχλωρικό και χλωροφόρμιο για ICP-MS ανάλυση, που δοκιμάστηκε συμπληρωματικά στο εργαστήριο	87
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 [ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ, ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ	
ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ]	92
7.1 Εισαγωγή	92
7.2 Σχεδιασμός πειραμάτων επικύρωσης	92
7.2.1 Ορισμοί.....	93
7.2.2 Παράμετροι επικύρωσης	94

7.3 Πλάνο πειραμάτων επικύρωσης, Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	95
7.3.1 Γραμμικότητα	95
7.3.2 Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ)	96
7.3.3 Επαναληψιμότητα	97
7.3.4 Αναπαραγωγιμότητα.....	98
7.4 Διεργαστηριακές δοκιμές	99
7.4.1 Ο ρόλος των διεργαστηριακών δοκιμών.....	99
7.4.2 Αξιολόγηση της μέτρησης των διεργαστηριακών δοκιμών....	100
7.4.3 Συμμετοχή σε διεργαστηριακή δοκιμή, Αποτελέσματα και Συζήτηση	101
8. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	104
9. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	105
10. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	108

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Οι χημικές δομές των πιο συχνά απαντώμενων ενώσεων αρσενικού στο περιβάλλον.....	32
Σχήμα 2: Χημικές δομές των πιο κοινών ενώσεων που ανήκουν στη κατηγορία των σακχάρων συνδυασμένα με As.....	33
Σχήμα 3 : Οι χώρες ανά τον κόσμο, με την υψηλότερη παραγωγή ρυζιού (σε τόνους) που προορίζεται για επιφανειακή κατεργασία κατά το 2017.....	50
Σχήμα 4: Οι σημαντικότεροι παράμετροι για τον προσδιορισμό της γνησιότητας ενός αγροτικού προϊόντος.....	58
Σχήμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση των τμημάτων που διαθέτει το ICP-MS όργανο στο εργαστήριο, όπως εμφανίζεται στο λογισμικό του.....	73
Σχήμα 6: Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας για εκχύλιση με νιτρικό οξύ και EDTA.....	76
Σχήμα 7: Η καμπύλη βαθμονόμησης των πρότυπων διαλυμάτων As(III) στις δύο ακραίες συγκεντρώσεις νιτρικού οξέος, χρησιμοποιώντας υπερκάρθαρο νερό (α) και HNO ₃ 1M (β), αντίστοιχα.....	80
Σχήμα 8: Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας διφασικού συστήματος με υδροχλωρικό οξύ και χλωροφόρμιο.....	90
Σχήμα 9: Η διακύμανση των z-scores τιμών όλων των εργαστηρίων στη διεργαστηριακή δοκιμή για τον προσδιορισμό inAs στη ρυζογκοφρέτα FAPAS 7307.....	103

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η έκθεση του ανθρώπου στο ανόργανο αρσενικό μέσω της τροφικής αλυσίδας.....	39
Εικόνα 2: Κάλυψη στοιχείων του περιοδικού πίνακα από την ICP-MS τεχνική.....	63
Εικόνα 3: Τυπική απεικόνιση ICP-MS οργάνου με τετραπολικό αναλυτή μάζας.....	66
Εικόνα 4: Απεικόνιση ICP-MS οργάνου συμπεριλαμβανομένης οκταπολικής κυψελίδας συγκρούσεων-αντιδράσεων.....	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ορισμένες από τις ενώσεις αρσενικού με ενδιαφέρον για το πεδίο του στοιχειακού προσδιορισμού.....	31
Πίνακας 2: Συμπτώματα της έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού στο αρσενικό.....	43
Πίνακας 3: Διατροφική αξία του λευκασμένου ρυζιού.....	51
Πίνακας 4: Οι συγκεντρώσεις σε ολικό αρσενικό (μg/g) και τα ποσοστά (%) αναλογίας ανόργανου προς το ολικό αρσενικό σε διάφορες ποικιλίες ρυζιού που κυκλοφορούν στην αγορά με βάση τη χώρα προέλευσης.....	56
Πίνακας 5: Νομοθετικά όρια για το inAs στο ρύζι και τα προϊόντά του.....	60
Πίνακας 6: Συγκριτική παρουσίαση τεχνικών φασματομετρίας.....	62
Πίνακας 7: Κοινές ισοβαρικές παρεμποδίσεις.....	69
Πίνακας 8: Βασικές ενδείξεις που ελέγχονται πριν και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης στο σύστημα, σε κατάσταση i. shutdown mode (όπου το όργανο είναι κλειστό), ii. standby mode (το όργανο είναι ανοιχτό χωρίς όμως να πραγματοποιείται ανάλυση) και iii. analysis mode (όταν το όργανο βρίσκεται σε κατάσταση ανάλυσης).....	79
Πίνακας 9: Αποτελέσματα δοκιμής για την εκχύλιση του ανόργανου αρσενικού στο υλικό αναφοράς FAPAS 07298 των 0,2 και 0,5 g μέσω ποσοτικοποίησης με καμπύλες βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων As(III) και As(V) κατά περίπτωση.....	82
Πίνακας 10: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού της δοκιμής εμβολιασμένων υλικών αναφοράς FAPAS 07298 των 0,2 και 0,5 g για την εκχύλιση του ανόργανου αρσενικού με την εξίσωση της καμπύλης των πρότυπων διαλυμάτων As(III).....	83
Πίνακας 11: Οι συγκεντρώσεις του inAs σε διαφορετικούς συνδυασμούς του χρόνου εκχύλισης στο λουτρό υπερήχων και του χρόνου περιδίνησης στο υλικό αναφοράς FAPAS 07298.....	84
Πίνακας 12: Οι συγκεντρώσεις του inAs για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης στο λουτρό υπερήχων και χρόνο περιδίνησης τρία και πέντε λεπτά στο υλικό αναφοράς FAPAS 07298.....	85
Πίνακας 13: Οι συγκεντρώσεις του inAs σε διαφορετικούς συνδυασμούς του χρόνου εκχύλισης στο λουτρό υπερήχων και του χρόνου περιδίνησης σε ριζάλευρο (με ολικό As=114,41 μg/kg).....	86
Πίνακας 14: Εξίσωση παλινδρόμησης αρσενικού.....	95
Πίνακας 15: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου και μεθόδου για το As.....	96
Πίνακας 16: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας προσδιορισμού inAs.....	98
Πίνακας 17: Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας προσδιορισμού inAs.....	98

Πίνακας 18: Δείκτης <i>z-score</i> των διεργαστηριακών δοκιμών.....	101
Πίνακας 19: Αποτελέσματα διεργαστηριακής δοκιμής στη ρυζογκοφρέτα FAPAS 7307 για τον προσδιορισμό inAs σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε.....	102

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διεξήχθη στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του ΗΡΙC σε συνεργασία με το Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του ΕΚΠΑ. Μέρος των αποτελεσμάτων της εργασίας παρουσιάστηκαν στο Διεθνές Συνέδριο “Euro Food Safety 2017”, που έλαβε χώρα στην Αθήνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ανόργανα συστατικά

Τα οργανικά συστατικά, οι υδατάνθρακες, τα λίπη και οι πρωτεΐνες, μαζί με το νερό αποτελούν το 96% του σωματικού βάρους. Το υπόλοιπο 4% συνιστούν τα ανόργανα, τα οποία διαθέτουν εξειδικευμένη λειτουργία και χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα, καθότι ο ανθρώπινος οργανισμός αδυνατεί να τα συνθέσει, ενώ τα προσλαμβάνει μέσω της τροφής, εξυπηρετώντας περαιτέρω δράσεις για την φυσιολογική του ανάπτυξη [1].

Οποιαδήποτε λοιπόν, στοιχείο ανήκει στην κατηγορία των απαραίτητων συστατικών, συνεπάγεται ότι πληροί και ορισμένες προϋποθέσεις. Πρωτίστως, βρίσκεται σε σταθερή αναλογία στους ιστούς του οργανισμού. Ενώ, η έλλειψη του από την τροφή επιφέρει κάποιου είδους ανωμαλίες στον οργανισμό, οι οποίες υποχωρούν και αντιμετωπίζονται, όταν προστεθούν στο διαιτολόγιο [1].

Τα ανόργανα συστατικά που είναι απαραίτητα για τον οργανισμό διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με την τάξη μεγέθους της ποσότητας που καλύπτει τις ανάγκες του. Έτσι, από το σύνολο των στοιχείων αυτών, ορισμένα είναι απαραίτητα ημερησίως σε ποσότητες γραμμαρίων και είναι γνωστά ως μακρο-στοιχεία. Στην προκειμένη περίπτωση, ανήκουν το ασβέστιο, ο φώσφορος, το νάτριο, το κάλιο, το χλώριο, το μαγνήσιο και το θείο. Ενώ, άλλα απαντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες ή ίχνη, της τάξεως των χιλιοστογραμμάρων, και ονομάζονται μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία, όπως είναι ενδεικτικά ο σίδηρος, το ιώδιο, το μαγγάνιο, ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το κοβάλτιο, το φθόριο, το σελήνιο και το χρώμιο [1,2].

Οι λειτουργίες των ανόργανων συστατικών ποικίλλουν. Ως επί το πλείστον, αποτελούν δομικά υλικά των οστών, των δοντιών και πιο μαλακών ιστών, όπως είναι η περίπτωση των μυών, με κύριους εκπροσώπους το ασβέστιο, το φώσφορο και το μαγνήσιο. Από φυσιολογικής απόψεως, συνεισφέρουν στη

δημιουργία κατάλληλων φυσικών και χημικών συνθηκών για την λειτουργία των ιστών και των κυττάρων. Ενώ, παράλληλα, έχουν ρυθμιστικό ρόλο, καθότι συμβάλλουν στην διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας, του οξεοβασικού ισοζυγίου και την ενεργοποίηση ή αδρανοποίηση ενζυμικών συστημάτων. Επίσης, πρόκειται για ειδικούς μεταφορείς νευρικών ερεθισμάτων του οργανισμού [1,3].

Ενώ, είναι δυνατό να εμφανίζουν και εξειδικευμένες βιολογικές δράσεις. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί το ιώδιο το οποίο συνδέεται άρρηκτα με τα επίπεδα των ορμονών του θυροειδούς αδένου. Πιο συγκεκριμένα, εμπλέκεται στην έκκριση της ορμόνης από την υπόφυση, γνωστή και ως TSH (Thyroid Stimulating Hormone), η οποία με την σειρά της διεγείρει τον θυροειδή αδένου για να εκκρίνει τις δικές του ορμόνες, την θυροξίνη (T₄) και την τριϊωδοθυρονίνη (T₃), που επιδρούν στο ρυθμό του βασικού μεταβολισμού (BMR) [1]. Το ιώδιο συνεπώς, κατά αυτόν τον τρόπο, μετέχει δραστικά στην εκτέλεση μεταβολικών και άλλων διεργασιών στον ανθρώπινο οργανισμό, που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία του εγκεφάλου και τη διαχείριση της ενέργειας μέσα στο σώμα [1,3]. Ανάλογη σχέση «εξάρτησης» υφίσταται και μεταξύ του ψευδάργυρου και της ινσουλίνης. Πέραν ωστόσο των ορμονών, παρατηρείται και σύνδεση των ανόργανων συστατικών με θρεπτικές ύλες. Χαρακτηριστικά, αναφέρεται η περίπτωση του σιδήρου που παρεμβαίνει στην βιοσύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Πρωτεΐνη που περιέχει την προσθετική ομάδα της αίμης και καθορίζει περαιτέρω την διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής. Ειδικότερα, μεταφέρει το οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς και το διοξείδιο του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες [1,3]. Επίσης, η βιταμίνη D και η λακτόζη, επηρεάζουν θετικά την απορρόφηση ασβεστίου, ενώ το κοβάλτιο μετέχει ενεργά στο σχηματισμό της βιταμίνης B₁₂, γνωστή και ως κυανοκοβαλαμίνη, ονομασία που υποδηλώνει τη σύνδεση της με το συγκεκριμένο χημικό στοιχείο [1]. Το νάτριο, το κάλιο και το χλώριο συνδυαστικά, δρουν σαν ηλεκτρολύτες των υγρών του σώματος. Συγχρόνως, ρυθμίζουν την λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών και την μεταφορά ουσιών από και προς τα κύτταρα μέσω μηχανισμών ιοντοανταλλαγής. Ενώ, με τον σχηματισμό του υδροχλωρικού

οξύς του στομαχικού υγρού από τα ανάλογα στοιχεία διενεργείται η διαδικασία της πέψης φυσιολογικά. [1,2,3].

Ωστόσο, τα ανόργανα συστατικά εμφανίζουν διαφορές όσον αφορά την απορρόφησή τους από τον οργανισμό, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά και τον καθορισμό του δείκτη Συνιστώμενη Διαιτητική Πρόσληψη (Recommended Dietary Allowance, RDA), ο οποίος αναφέρεται στο μέσο όρο καθημερινής πρόσληψης που θεωρείται ότι καλύπτει τις απαιτήσεις όλων πρακτικά των υγιών ατόμων. Κύριο κριτήριο αποτελεί σαφώς, η μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών [1].

Παράλληλα με τον καθορισμό της τιμής RDA, είναι σημαντικό να ορισθεί και η τιμή που εκφράζει το ανώτατο αποδεκτό, από τον οργανισμό, επίπεδο (Upper Tolerable Intake Level, UTL), για καθεμιά από τις τάξεις των θρεπτικών υλών, αλλά κυρίως για κάποιες από αυτές που σε υψηλές δόσεις εμφανίζουν τοξική δράση [1].

Στην κατηγορία των τοξικών ανόργανων συστατικών ανήκουν το αρσενικό, το αντιμόνιο, ο μόλυβδος, το βρώμιο, το κάδμιο, ο υδράργυρος, το βόριο, το στρόντιο, το γερμάνιο, το αργίλιο, το καίσιο και ο άργυρος [1,2] τα οποία εξετάζονται διεξοδικά παρακάτω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

2.1 Στοιχειακός προσδιορισμός

Ο στοιχειακός προσδιορισμός καθίσταται ένα εργαλείο εξέχουσας σημασίας, πρωτίστως κατά την διαδικασία εκτίμησης και αξιολόγησης κινδύνου για την υγεία του ανθρώπου, ενώ έπεται η παρακολούθηση του περιβάλλοντος, περαιτέρω και ο έλεγχος ποιότητας των τροφίμων [4]. Κρίνεται απαραίτητος καθώς η τοξικότητα, η βιοδιαθεσιμότητα και τα μεταβολικά μονοπάτια των στοιχείων είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τις χημικές μορφές που προκύπτουν. Συγκεκριμένα λοιπόν, οι οξειδωτικές μορφές έχουν διαφορετική επίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς [5]. Αναφερόμενοι αποκλειστικά στο ολικό περιεχόμενο του εκάστοτε χημικού στοιχείου, ενδέχεται να αποβεί κανείς σε λανθασμένα συμπεράσματα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού στο αρσενικό, μέσω της κατανάλωσης θαλασσινών. Πράγματι, σε αυτά τα προϊόντα απαντάται κυρίως υπό μορφές μη τοξικές για τον άνθρωπο, σε αντίθεση με τις ανόργανες μορφές του.

Επομένως, ο προσδιορισμός διαφορετικών ειδών του στοιχείου είναι σημαντικότερος από την ολική συγκέντρωσή του στα διάφορα τρόφιμα. Η στοιχειακή λοιπόν, ανάλυση έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών. Αντιπροσωπευτικοί είναι οι τομείς που επιδίδονται στον έλεγχο ποιότητας των τροφίμων, στα φάρμακα, στα συμπληρώματα διατροφής καθώς και στα καλλυντικά, παρακολουθώντας την συστηματική έκθεση ή τον έλεγχο της διεργασίας [6,7].

2.1.1 Τοξικότητα

Στη βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα ειδών από χημικά στοιχεία που καταδεικνύουν την αρνητική τους επίδραση στους ζωντανούς οργανισμούς. Τυπική περίπτωση που αποτυπώνει την σχέση μεταξύ της τοξικότητας ενός στοιχείου και της κατάστασης οξειδωσής του είναι η επίδραση των διάφορων ειδών του χρωμίου στο ανθρώπινο σώμα. Το εξασθενές χρώμιο Cr(VI) και οι ενώσεις του, εμφανίζουν τοξική δράση στους ζωντανούς οργανισμούς, λόγω

των οξειδωτικών ιδιοτήτων, προκαλώντας βλάβες στο αναπνευστικό, πεπτικό σύστημα, καθώς και αλλοιώσεις στο δέρμα [8,9,10]. Ο Διεθνής Οργανισμός για την ασθένεια του καρκίνου (IARC), από το 1990 κατατάσσει το εξασθενές χρώμιο στην κατηγορία των ενώσεων που ορίζονται ως ανθρώπινα καρκινογόνα [9]. Ενώ, ο Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (USEPA), τα εν λόγω είδη του χρωμίου, χαρακτηρίζει και ως μεταλλαξιογόνους παράγοντες [8]. Αντιθέτως, το τρισθενές χρώμιο Cr(III) και οι ενώσεις του είναι γενικά μη τοξικές για τον άνθρωπο. Μάλιστα, για χρόνια ήταν στην κατηγορία των θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, υφίστανται αμφιβολίες σχετικά με την αναγκαιότητά του [11].

Επίσης, το αρσενικό σε μικρές ποσότητες παρά το γεγονός ότι ενεργεί διεγερτικά στον άνθρωπο και στους ζωικούς οργανισμούς γενικότερα [12], η επιστημονική κοινότητα δεν κάνει αποδεκτή την βιολογική του σημασία και δεν το συμπεριλαμβάνει στα θρεπτικά συστατικά. Βέβαια, οι τοξικές επιδράσεις των ανόργανων μορφών του αρσενικού στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ευρέως γνωστές. Αλλοιώσεις μέχρι και καρκίνο του δέρματος, καθώς και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης διαταραχών στην ουροδόχο κύστη, το ήπαρ και τους πνεύμονες υφίστανται έπειτα από χρόνια έκθεση σε ενώσεις τρισθενούς και πεντασθενούς αρσενικού. Αντιθέτως, οργανικές ενώσεις, όπως η arsenobetaine As(III)B και τα arsenosugars κρίνονται αβλαβή για τον άνθρωπο [9,13,14].

Η τοξικότητα του αντιμονίου, σαν το αρσενικό, αυξάνεται όσο μειώνεται η κατάσταση οξειδωσης, για παράδειγμα η μορφή Sb(III) είναι 10 φορές πιο τοξικό για τους ζωντανούς οργανισμούς απ' ό τι η μορφή Sb(V) [12]. Ο Διεθνής Οργανισμός IARC, παραθέτει το Sb(III) στην κατηγορία των πιθανών καρκινογόνων ουσιών για τον άνθρωπο [9].

Ο υδράργυρος, ένα πλήρως αναγνωρισμένο στοιχείο υψηλής επικινδυνότητας, του οποίου επίσης οι τοξικές επιδράσεις εξαρτώνται από την χημική μορφή που απαντάται. Η μεθυλιωμένη μορφή MeHg(II) ενδέχεται να επιφέρει νευρολογικές διαταραχές, με δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη του εγκεφάλου. Ο Διεθνής Οργανισμός IARC, το κατατάσσει και αυτό στην

κατηγορία των δυνητικώς καρκινογόνων ουσιών για τον άνθρωπο [9]. Η έκθεση στον στοιχειακό υδράργυρο εκδηλώνεται με νευρολογικές διαταραχές και επιφέρει συμπτώματα, όπως είναι η κώφωση, η απώλεια όρασης, μνήμης, οι μυϊκοί σπασμοί κι άλλα. Παρατηρούνται επιπροσθέτως, και βλάβες στα νεφρά και στο θυροειδή, ενώ υψηλή έκθεση μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε θάνατο [16]. Ωστόσο, δεν είναι όλες οι ενώσεις βλαβερές για τον άνθρωπο. Ο θειούχος υδράργυρος, αδιάλυτος στο νερό, δεν είναι επικίνδυνος. Χρησιμοποιείται μάλιστα σαν μέσο με θεραπευτικές ιδιότητες για την φροντίδα ορισμένων τύπων δέρματος [16].

Για την εκτίμηση της επίδρασης που ασκεί το βρώμιο στον ανθρώπινο οργανισμό, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το βρωμικό άλας, το οποίο θεωρείται και αυτό «δυσνητικό» καρκινογόνο από τον Διεθνή Οργανισμό IARC, για τον άνθρωπο [9]. Ενδέχεται να βρεθεί στο πόσιμο νερό σαν προϊόν οξειδωσης, λόγω της οζονόλυσης, στην οποία υπόκειται, σαν στάδιο απολύμανσης [9,17,18].

2.1.2 Βιοδιαθεσιμότητα

Η βιοδιαθεσιμότητα ενός στοιχείου στον οργανισμό, εξαρτάται από τα είδη που εισέρχονται σε αυτόν. Ενώ, σαν όρος διατυπώνεται με διαφορετικούς τρόπους. Ενδεικτικά, αναφέρεται ως «το κλάσμα ενός στοιχείου το οποίο απορροφάται, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η συστηματική κυκλοφορία και διανομή του στα διάφορα όργανα και ιστούς, όπου τελικά καθίσταται βιοενεργό» [19]. Αυτό, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κυρίως στην περίπτωση των απαραίτητων στοιχείων με στόχο να αποφεύγονται ανεπάρκειες.

Δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στο σελήνιο. Όντως απαραίτητο για τον οργανισμό στοιχείο, και μάλιστα λόγω των αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών του ιδιοτήτων, συνίσταται η αύξηση της πρόσληψης του, κυρίως σε περιοχές όπου το συγκεκριμένο στοιχείο στο περιβάλλον βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα [20]. Ωστόσο, ενδέχεται να προκαλέσει τοξικές δράσεις, όπως αδυναμίες στα νύχια και τα μαλλιά, βλάβες στο δέρμα, το ήπαρ και τα νεύρα, καθώς και

γαστρεντερικές διαταραχές, όταν η κατανάλωσή του ξεπερνά τα φυσιολογικά επίπεδα [21,22]. Επομένως, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στα συμπληρώματα διατροφής και τα τρόφιμα που περιέχουν σελήνιο, προσλαμβάνοντας τις κατάλληλες ποσότητες σε ολικό περιεχόμενο καθώς και σε πολύ συγκεκριμένες χημικές μορφές του. Στις τροφές, το σελήνιο βρίσκεται είτε με την μορφή ανόργανων ενώσεων, ως εξασθενές Se(VI) και ως τετρασθενές Se(IV) σελήνιο, είτε με την μορφή οργανικών ενώσεων, ως σεληνομεθειονίνης Se(II)Met και σεληνοκυστεϊνης Se(II)Cys, καθώς και των μεθυλιωμένων παραγώγων τους. Η βιβλιογραφία επισημαίνει ότι η μορφή Se(II)Met είναι μακροπρόθεσμα πιο αποτελεσματική στην πρόβλεψη ανεπάρκειας σεληνίου, συγκριτικά με τις άλλες οργανικές ενώσεις του. Αντιθέτως, τα ανόργανα άλατα σεληνίου ενδέχεται να αντισταθμίσουν την έλλειψη αυτή σε γρήγορους ρυθμούς, όμως εμφανίζουν υψηλότερη πιθανότητα να αποβούν τοξικά για τον οργανισμό με την πάροδο του χρόνου [19].

2.1.3 Μεταβολισμός

Η εκτίμηση της έκθεσης για την υγεία του ανθρώπου, σε ένα αποκλειστικά, συγκεκριμένο στοιχείο καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις μεταβολικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό και οδηγούν περαιτέρω σε άλλες δομές. Συνεπώς, απαιτείται βαθιά γνώση των χημικών μορφών που προκύπτουν στα ενδιάμεσα στάδια των μεταβολικών μονοπατιών έως ότου επιτευχθεί ο σχηματισμός των τελικών ενώσεων, καθώς και τον τρόπο με τον οποίο ενσωματώνονται στα μακρομόρια και απελευθερώνονται από αυτά, συνυπολογίζοντας και την παράμετρο της βιοδιαθεσιμότητας τους στο ανθρώπινο σώμα [4].

Ενδεικτικά, αναφέρονται οι διαλυτές τρισθενείς και πεντασθενείς ενώσεις αρσενικού που μεταβολίζονται σε μονομεθυλσονικό οξύ MMA(V) και στη συνέχεια σε διμεθυλαρσενικό οξύ DMA(V), τα οποία είναι λιγότερο τοξικές ενώσεις. Ενώ, ο υδράργυρος στον ανθρώπινο οργανισμό, οξειδώνεται σε μορφή Hg(II), στο αίμα. Δύναται ακόμη να γίνει πιο τοξικός εφόσον μεθυλιωθεί MeHg(II) [16].

2.2 Ανόργανα συστατικά στο περιβάλλον και στα τρόφιμα

Αναλόγως με τον τύπο του τροφίμου καθώς και την προέλευσή του, το περιεχόμενο στα διάφορα στοιχεία και τις ανάλογες χημικές ενώσεις που προκύπτουν, εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία. Σε γενικές γραμμές, τα πιο συχνά απαντώμενα στοιχεία είναι το αρσενικό, το χρώμιο, το αντιμόνιο, το σελήνιο και ο υδράργυρος. Ενώ, επικεντρώνεται το ενδιαφέρον σε δείγματα όπως είναι το νερό, το έδαφος, ο αέρας, οι ζωοτροφές και τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, παράγοντες επικινδυνότητας, οι οποίοι περαιτέρω ενδέχεται κατά την περάτωση των διάφορων σταδίων της παραγωγικής διαδικασίας και μέσω της τροφικής αλυσίδας να διαπεράσουν στον ανθρώπινο οργανισμό [4].

Το χρώμιο έχει την ικανότητα να εμφανίζεται σε μια πληθώρα μορφών, αναφορικά με την κατάσταση οξειδωσης, εκ των οποίων μόνο δύο από αυτές, του τρισθενούς Cr(III) και εξασθενούς Cr(VI) χρωμίου, είναι αρκετά σταθερές προκειμένου να ανιχνευθούν στο περιβάλλον [23]. Το Cr(VI) βρίσκεται κυρίως σαν $[\text{Cr}(\text{O}_4)]^{2-}$ ή $[\text{HCr}(\text{O}_4)]^-$, ενώ το Cr(III) συναντάται σαν $[\text{Cr}(\text{OH})_n]^{(3-n)+}$. Η διανομή τους στο περιβάλλον εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το δυναμικό οξειδοαναγωγής, το pH ή η παρουσία οξειδωτικών ή αναγωγικών ουσιών. Στο έδαφος, το Cr(III) αποτελεί μια φυσικώς απαντώμενη μορφή, ενώ το Cr(VI) προέρχεται σχεδόν ολοκληρωτικά από ανθρωπογενείς πηγές [4]. Κατά μέσο όρο, το περιεχόμενο του εδάφους σε χρώμιο είναι 40 mg/kg, και η συγκέντρωσή του στο γλυκό νερό είναι 1.0 μg/L, με διακύμανση από 0.1 έως 6.0 μg/L. Για το θαλασσινό νερό, ισχύει συνήθως μία τάξη μεγέθους μικρότερη σε σχέση με αυτή στο γλυκό νερό, σε εύρος από 0.2 έως 50 μg/L με μέση τιμή τα 0.3 μg/L [8]. Το χρώμιο απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα λόγω της ανθρωπογενούς δραστηριότητας, δηλαδή των βιομηχανιών μετάλλων, της καύσεως φυσικού αερίου ή της παραγωγής χάλυβα. Εκτιμάται έστω ότι μόλις και 1/3 της ποσότητας του χρωμίου που διοχετεύεται στην ατμόσφαιρα είναι πιθανόν να βρίσκεται υπό την καρκινογόνο μορφή του Cr(VI) [4]. Στα υγιή άτομα, τα μέσα επίπεδα του χρωμίου στο πλάσμα του αίματος και στα ούρα, προβλέπεται να κυμαίνονται από 0,10 έως 0,16 μg/L και 0,22 μg/L, αντίστοιχα. Ωστόσο, η έκθεση σε υψηλά επίπεδα μπορεί να επιφέρει αύξηση της συγκέντρωσης στο αίμα, τα ούρα, τα μαλλιά και τα νύχια [4,10].

Όσον αφορά το αντιμόνιο, η μορφή $[Sb(OH_6)]^-$ είναι αυτή που θεωρείται περισσότερο ευνοϊκή στο νερό. Ενώ, σαν στοιχείο βρίσκεται στα λαχανικά ή σε προϊόντα που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες μολυσμένων εδαφών, σε χαμηλές ωστόσο συγκεντρώσεις των $\mu\text{g}/\text{kg}$ ή και μικρότερες [9].

Το σελήνιο στη φύση, προκύπτει στις καταστάσεις οξειδωσης, -2, 0, 4 ή 6, αναλόγως με την τιμή του δυναμικού οξειδοαναγωγής, το pH και την μικροβιακή δραστηριότητα [4]. Στις αστικές περιοχές, η συγκέντρωσή του κυμαίνεται από 0,1 έως 10 ng/m^3 . Τα υπόγεια ύδατα διαφέρουν ως προς τις συγκεντρώσεις σε σελήνιο, λόγω της γεωχημικής κάθε φοράς, ιδιομορφίας του εκάστοτε περιβάλλοντος και σε ορισμένες περιοχές ενδέχεται να προσεγγίζει ακόμα και τα 6000 $\mu\text{g}/\text{L}$. Τυπικά, στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα βρίσκεται σε τιμές από 0,06 έως 400 $\mu\text{g}/\text{L}$. Στους φυτικούς και ζωικούς ιστούς, ως επί το πλείστον συνδέεται με αμινοξέα, όπως τις μορφές σεληνομεθειονίνης Se(II)Met και σεληνοκυστεΐνης Se(II)Cys , που προαναφέρθηκαν. Επομένως, πηγές πρόσληψης για το συγκεκριμένο στοιχείο είναι τα πρωτεϊνούχα τρόφιμα. Χαρακτηριστικά, στο κρέας και τα θαλασσινά, το σελήνιο βρίσκεται σε συγκεντρώσεις των 0,3 - 0,5 mg/kg , στα δημητριακά από 0,1 έως 10 mg/kg . Ενώ, τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν σχετικά χαμηλές ποσότητες, ειδικότερα μικρότερες του 0,01 mg/kg [4, 22].

Ο υδράργυρος, στο περιβάλλον συναντάται είτε με την μορφή μεταλλικού στοιχείου είτε ως ανόργανη ένωση, θειούχου ή χλωριούχου υδραργύρου. Ενώ, οι οργανικές του ενώσεις προκύπτουν από την δράση μικροοργανισμών στα ανόργανα άλατα [4]. Η πιο κοινή οργανική μορφή είναι η μεθυλιωμένη, που προαναφέρθηκε και η οποία συσσωρεύεται στους υδρόβιους οργανισμούς. Συμπερασματικά, τα επίπεδα της συγκέντρωσης MeHg(II) ενδέχεται να είναι αυξημένα στο πόσιμο νερό και στους ιστούς των ψαριών που προέρχονται από αλμυρά υδάτινα περιβάλλοντα [4,22]. Σχεδόν λοιπόν το 100% του υδραργύρου που ανιχνεύεται στα ψάρια, είναι στην πιο τοξική μορφή του ως MeHg(II) και ενδεχομένως, θέτει σε υψηλό κίνδυνο την υγεία των ατόμων που ακολουθούν διατροφή που βασίζεται σε αυτά. Τυπικά, στα

επιφανειακά και υπόγεια ύδατα βρίσκεται σε τιμές μικρότερες του 0,5 µg/L, ενώ οι κατά τόπους αποθέσεις των βιομηχανιών μετάλλων συνδράμουν στην αύξηση των επιπέδων του στα υπόγεια ύδατα. Στην ατμόσφαιρα, οι συγκεντρώσεις του κυμαίνονται σε εύρος 2 έως 10 ng/m³ [4,9].

Το αρσενικό στο περιβάλλον συναντάται κυρίως υπό ανόργανες μορφές. Είναι κοινό συστατικό του νερού, ενώ καθίσταται δύσκολη η εκτίμηση της τυπικής περιεκτικότητας σε αυτό, καθώς εξαρτάται από τις πηγές ή τις γεωχημικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής [4]. Η συγκέντρωση του σε νερά ποταμού και λίμνης είναι σχετικά χαμηλότερη και σπάνια υπερβαίνει τα 2 µg/L [37]. Ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα, από 1 έως 8 µg/L, ενδεχομένως να ανιχνεύονται στα αλμυρά νερά [38]. Το μεγαλύτερο εύρος τιμών, καθώς και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, το αρσενικό εκτιμάται να παρίστανται σε υπόγεια νερά ως αποτέλεσμα απόπλυσης από βραχώδη εδάφη που περιέχουν σε μεγάλα ποσοστά ορυκτά αρσενικού. Το συγκεκριμένο φαινόμενο αποτελεί πρόβλημα σε αρκετές περιοχές στον κόσμο, όπως το Μπανγκλαντές, τη Βεγγάλη, το Μεξικό και τη βόρεια Κίνα, όπου το αρσενικό στα υπόγεια ύδατα αγγίζει ακόμη τα 5 mg/L [39]. Ακόμα, σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, το αρσενικό προσδιορίζεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, εκατοστών ή χιλιοστών mg/kg [40]. Οι υδρόβιοι οργανισμοί εξαιρούνται, καθότι συσσωρεύουν αρσενικό. Τυπική συγκέντρωση που ανιχνεύεται στα ζώα και τα φυτά του υδάτινου περιβάλλοντος, όπως τα φύκη, τα ψάρια, τα οστρακόδερμα και τα καρκινοειδή, κυμαίνεται από 0,5 έως 50 mg/kg νωπού βάρους. Η μορφή As(III)B συμβάλλει από 75% έως 95% στο ολικό περιεχόμενο σε αρσενικό για αυτήν την κατηγορία των ζωντανών οργανισμών [4]. Επίσης, το αρσενικό βρίσκεται και σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Εντοπίζονται σε τυπική συγκέντρωση από 0 έως 20 µg/kg. Ενώ, υψηλότερα επίπεδα αρσενικού προκύπτουν στο ρύζι, από 150 έως 250 µg/kg και σε ορισμένα βρώσιμα είδη μανιταριών [14]. Σε αυτά τα φυτικά προϊόντα, το αρσενικό είναι παρόν υπό των πιο τοξικών ανόργανων μορφών του. Στα ούρα του ανθρώπου απαντάται από 20 έως 50 µg/L, με κυριότερα τα είδη DMA(V) και MMA(V) [39]. Η περίπτωση του αρσενικού εξετάζεται διεξοδικότερα και σε επόμενο κεφάλαιο, καθότι αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

2.3 Νομοθεσία για ανόργανα συστατικά

Οι Διεθνείς Κανονισμοί στη πλειοψηφία τους, που αφορούν συγκεντρώσεις των στοιχείων στο περιβάλλον, τα τρόφιμα, τους ιστούς και τα σωματικά υγρά ορίζουν το ολικό περιεχόμενο, και επικεντρώνονται στη μέγιστη τιμή ή κάποια συνιστώμενη δόση σχετικά με την πρόσληψή τους [4,24]. Ωστόσο, εξαιτίας της τοξικότητας των στοιχείων και της ισχυρής τους αλληλεξάρτησης με τα διάφορα είδη που προκύπτουν, η νομοθεσία επιδίδεται και στον στοιχειακό προσδιορισμό. Διεθνείς Οργανισμοί όπως ο IARC που προαναφέρθηκε, ο FAO των Ηνωμένων Εθνών που ασχολείται με θέματα διατροφικού και γεωργικού ενδιαφέροντος, και ο WHO που αποσκοπεί στην προστασία και διασφάλιση της παγκόσμιας υγείας, περιλαμβάνουν κατευθυντήριες γραμμές για την επίδραση των στοιχειακών μορφών στον ανθρώπινο οργανισμό και το περιβάλλον του, οι οποίες σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες νομοθεσίες ανά τον κόσμο αποβαίνουν εξαιρετικής σημασίας.

Στις οδηγίες για την ποιότητα του πόσιμου νερού, ο Διεθνής Οργανισμός WHO επισημαίνει την καρκινογόνο επίδραση του εισπνεόμενου Cr(VI) στον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, τίθεται μονάχα η προσωρινή επιτρεπόμενη συγκέντρωση για το ολικό χρώμιο στο πόσιμο νερό που αντιστοιχεί στα 50 μg/L [9]. Ενώ, σύμφωνα με διεθνή υπηρεσία της Καλιφόρνιας για την εκτίμηση κινδύνων του περιβάλλοντος στην υγεία (OEHHA), η τοξικότητα της μορφής Cr(VI) υφίσταται αναγνωρισιμότητα και ορίζεται στόχος για τη δημόσια υγεία (PHG) το επίπεδο συγκέντρωσης των 0,02 μg/L, η οποία κρίνεται απόλυτα ασφαλής για τον άνθρωπο, χωρίς καμιά από τις ενδεχόμενες τοξικές επιδράσεις είτε μέσω της στοματικής είτε μέσω της αναπνευστικής οδού [28]. Ενώ, περαιτέρω ορίστηκε από το Υπουργείο Υγείας της Καλιφόρνιας (CDPH), μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή του εξασθενούς χρωμίου στο πόσιμο νερό τα 10 μg/L [29].

Οι ενώσεις που προκύπτουν από τον υδράργυρο, ειδικά η μεθυλιωμένη μορφή Me(II)Hg, περιλαμβάνεται στην νομοθεσία πολλών χωρών. Ενδεικτικά, στην Ιαπωνία, οι επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις ολικού και μεθυλιωμένου υδράργυρου στα ψάρια είναι 0,4 mg/kg και 0,3 mg/kg αντίστοιχα. Στις

Φιλιππίνες, η μέγιστη τιμή για τη μορφή Me(II)Hg συνάδει με αυτή που ορίζεται από τον FAO/WHO και είναι το 1 mg/kg νωπού προϊόντος για τα ψάρια που ανήκουν στην κατηγορία των αρπακτικών και 0,5 mg/kg νωπού προϊόντος για τα υπόλοιπα είδη ψαριών [4,30]. Ακόμη, η τιμή PTWI για το Me(II)Hg έχει οριστεί ως 1,6 μg/kg σωματικού βάρους, συνυπολογίζοντας την αυξημένη ευαισθησία που εμφανίζουν τα βρέφη στην εν λόγω χημική μορφή [31]. Ενώ, η παρουσία του υδραργύρου σε άλλα τρόφιμα δεν προκαλεί έντονες ανησυχίες καθώς βρίσκεται υπό άλλες μορφές, οι οποίες κρίνονται λιγότερο επικίνδυνες [34]. Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία δεν θέτει μέγιστα επίπεδα για τον μεθυλυδράργυρο Me(II)Hg στα τρόφιμα, ενώ από την EFSA έχει εγκριθεί ως προσωρινό ανεκτό όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης (PTWI) τα 1,6 μg/kg σωματικού βάρους [34].

Αντιθέτως, στον Κανονισμό ΕΚ 629/2008 ορίζεται τιμή επιτρεπτή για το ολικό περιεχόμενο σε κάδμιο και μόλυβδο σε διάφορα προϊόντα. Ενδεικτικά, η ανώτατη επιτρεπόμενη περιεκτικότητα σε κάδμιο για κρεατοσκεύασμα βοδινό, χοιρινό, προβατίνας και πουλερικών αντιστοιχεί σε 0,050 mg/kg νωπού προϊόντος. Το ίδιο ισχύει για φρούτα και λαχανικά, εξαιρουμένων αυτών που ανήκουν στην κατηγορία των φυλλωδών και άλλων που αποτελούν υπόγεια μέρη του φυτού, δηλαδή ριζοειδή ή όργανα αποθήκευσης, όπως είναι τα γεώμηλα, καθώς και νωπών αρωματικών φυτών. Η ανάλογη τιμή για δημητριακά, πλην των πίτουρων, φύτρων και των σπόρων σιταριού και ρυζιού, είναι τα 0,10 mg/kg νωπού προϊόντος, και 0,20 mg/kg νωπού προϊόντος για όσα αναφέρθηκαν πως εξαιρούνται [32,34].

Αναφορικά με το μόλυβδο, μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα ορίζονται τα 0,30 mg/kg νωπού προϊόντος για κράμβες, φυλλώδη λαχανικά και συγκεκριμένα είδη καλλιεργούμενων μανιταριών [32,34]. Τα μέγιστα επίπεδα για το κάδμιο, το μόλυβδο και τον υδράργυρο θα πρέπει να είναι ασφαλή και να υπακούουν στην αρχή για τις ουσίες που φέρουν καρκινογόνο δράση, δηλαδή τα όρια να είναι τόσο χαμηλά όσο είναι λογικό να επιτευχθούν, γνωστή με το αγγλικό αρτικόλεξο ALARA, “As Low As Reasonably Achievable”, το οποίο αποδίδεται ως «Κατώτερο Ευλόγως Εφικτό Επίπεδο», με βάση την ορθή βιομηχανική πρακτική που εφαρμόζεται για την παραγωγή γεωργικών και προϊόντων

αλιείας [34]. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται για τα ανόργανα συστατικά που περιέχονται στα συμπληρώματα διατροφής καθώς αποτελούν μια πολύ ιδιαίτερη κατηγορία, ενώ θα πρέπει να ισχύουν όσα ορίζει η Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/46/EC [35]. Οποιαδήποτε παρέκκλιση κοινοποιείται μέσω του Γρήγορου Συστήματος Επαγρύπνισης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF), το οποίο λειτουργεί ως συναγερμός για την Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Τη νομική βάση του συστήματος RASFF αποτελεί ο Καν. (ΕΕ) Ν. 178/2002, στο άρθρο 50 του οποίου προσδιορίζεται ως ένα δίκτυο που περιλαμβάνει τα κράτη-μέλη της Ε.Ε, τα κράτη των Ενώσεων του Ευρωπαϊκού Ελεύθερου Εμπορίου και της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Περιοχής (European Free Trade Associations & European Economic Area, EFTA/EEA), την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (Commission) και την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) [36].

Για την περίπτωση του βρώμιου, υφίσταται ανώτατη επιτρεπτή συγκέντρωση στο πόσιμο νερό, η τιμή των 10 µg/kg και αναφέρεται στο παράρτημα 1 της Οδηγίας 98/83/EC. Συμβαδίζει με αυτήν που συνιστά ο οργανισμός WHO. Ωστόσο, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή επισημαίνει ότι εφόσον δεν παρατηρούνται ανεπιθύμητες επιδράσεις, δεδομένου ότι το βρώμιο απαντάται σε συγκεντρώσεις που δεν ελλοχεύουν κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, τα κράτη-μέλη έχουν τη δυνατότητα να προσπαθήσουν να διασφαλίσουν και πιο χαμηλά επίπεδα σε βρώμιο [4, 33].

Για τον ανόργανο κασσίτερο, προκειμένου να προστατευθεί η δημόσια υγεία θεσπίστηκαν αυστηρότερα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα, τα οποία είναι 200 mg/kg για τα κονσερβοποιημένα τρόφιμα και 100 mg/kg για ποτά ή αφεψήματα σε μεταλλικούς περιέκτες, συμπεριλαμβανομένων και των διάφορων χυμών, αντί των αντίστοιχων 250 mg/kg και 150 mg/kg που υφίστανται στο παρελθόν. Ωστόσο, μέχρις ότου υπάρξουν διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την ευαισθησία των βρεφών και των μικρών παιδιών στο συγκεκριμένο κίνδυνο είναι απαραίτητο σε προληπτική βάση, να προστατευθεί η υγεία τους, καθότι οι τωρινές καθορισμένες τιμές για τα παρασκευάσματα που απευθύνονται σε αυτήν την ευάλωτη ομάδα του

πληθυσμού, ενδέχεται να επιφέρουν γαστρικό ερεθισμό σε ορισμένα άτομα [34].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΤΟ ΑΡΣΕΝΙΚΟ

3.1 Ιστορικά στοιχεία

Το αρσενικό ανά τους αιώνες, ήταν γνωστό ως στοιχείο με διπτό ρόλο. Από τη μία πλευρά, χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία πολλών ασθενειών, όπως η νόσος Allesch [41]. Επίσης, η περίπτωση του Salvarsan (arsphenamine), φάρμακο το οποίο υπήρξε και το μοναδικό για την καταπολέμηση της σύφιλης μέχρις ότου ανακαλυφθεί η πενικιλίνη [42]. Από την άλλη όμως πλευρά, στο παρελθόν, υφίσταται σκόπιμη χρήση του αρσενικού, ως δηλητήριο, ειδικά στην τρισθενή του μορφή, λόγω της τοξικής δράσης του [43]. Ωστόσο, ακόμα και στις μέρες μας, εκατομμύρια άνθρωποι ανά τον κόσμο, κυρίως η περιοχή της Δυτικής Βεγγάλης η οποία εκτείνεται ενδιάμεσα της Ινδίας και του Μπανγκλαντές, είναι εκτεθειμένοι επί μακρόν χρονικό διάστημα σε υψηλά επίπεδα ανόργανου αρσενικού μέσω του νερού που καταναλώνουν, γεγονός που συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνων του δέρματος, του ήπατος, της ουροδόχου κύστης, και άλλων νευρολογικών και καρδιαγγειακών παθήσεων [44]. Ο κλάδος ωστόσο, που ασχολείται με τον προσδιορισμό των στοιχειακών μορφών του αρσενικού, κατά τα τελευταία χρόνια σημειώνει ραγδαία εξέλιξη, με τις σύγχρονες τεχνικές που εφαρμόζονται. Με αποτέλεσμα σταδιακά να επιτυγχάνεται όλο και μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση σχετικά με την γνώση της πρόσληψης, των μηχανισμών συσσώρευσης, μεταφοράς, αποθήκευσης ή απελευθέρωσης του στοιχείου στο φυσικό περιβάλλον και εισχώρησης στους ζωντανούς οργανισμούς και περαιτέρω το πεδίο της εκτίμησης κινδύνου [45].

3.2 Χημικές μορφές του αρσενικού

Οι τοξικές γενικά, ιδιότητες που φέρει το αρσενικό, καθορίζονται τόσο από την κατάσταση οξειδωσης των ανόργανων μορφών, όσο και από τα διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας που εμφανίζουν οι οργανικές μορφές του [45]. Το ανόργανο αρσενικό είναι και αυτό που εμφανίζει οξεία τοξική δράση [46], ενώ

αναφέρεται σε ένα σύνολο χημικών ενώσεων οι οποίες προκύπτουν από τα ιόντα As(III) και As(V), γνωστά στην βιβλιογραφία και ως arsenite και arsenate, αντίστοιχα. Τα διάφορα λοιπόν, ιόντα που προέρχονται από το αρσενικό, δε διακρίνονται με βάση το βαθμό της πρωτονίωσης τους. Για παράδειγμα, τα ιόντα που προέρχονται από το αρσενικό οξύ (H_3AsO_4), διυδρογόνο- και υδρογόνο- πεντασθενές αρσενικό, με χημικούς τύπους $[H_2As(O_4)]^-$ και $[Has(O_4)]^{2-}$, αντίστοιχα, όπως και το αρσενικό $[As(O_4)]^{3-}$, σημειώνονται πάντοτε ως As(V). Όπως, συμβαίνει και με τα μεθυλιωμένα οξέα (MA), τα οποία ανάλογα με το σθένος τους, αναφέρονται ως As(III) ή As(V) [54]. Ο προσδιορισμός λοιπόν, του ολικού ανόργανου αρσενικού προκύπτει από το άθροισμα των μορφών As(V) και As(III) [55].

Οι εν διαλύσει, του αρσενικού, μορφές στο νερό είναι πάντοτε ανόργανες. Εκ των οποίων οι τρισθενείς, αποτελούν και το κυρίαρχο είδος όταν υφίστανται αναγωγικές συνθήκες, ενώ οι πεντασθενείς καθίστανται πιο σταθερές μορφές σε οξειδωτικό περιβάλλον [47]. Εφόσον λοιπόν, οι ενώσεις του ανόργανου αρσενικού έχουν τοξικό χαρακτήρα κατά τις μεταβολικές διεργασίες, οδηγούν περαιτέρω στον σχηματισμό οργανικών μορφών που υπεισέρχονται εν συνεχεία σε διάφορα μονοπάτια βιοσύνθεσης με εκατοντάδες παράγωγά τους στη φύση [48]. Ωστόσο, η χρόνια τοξικότητα των ενώσεων του αρσενικού δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως, ενώ ακόμα διερευνάται [45].

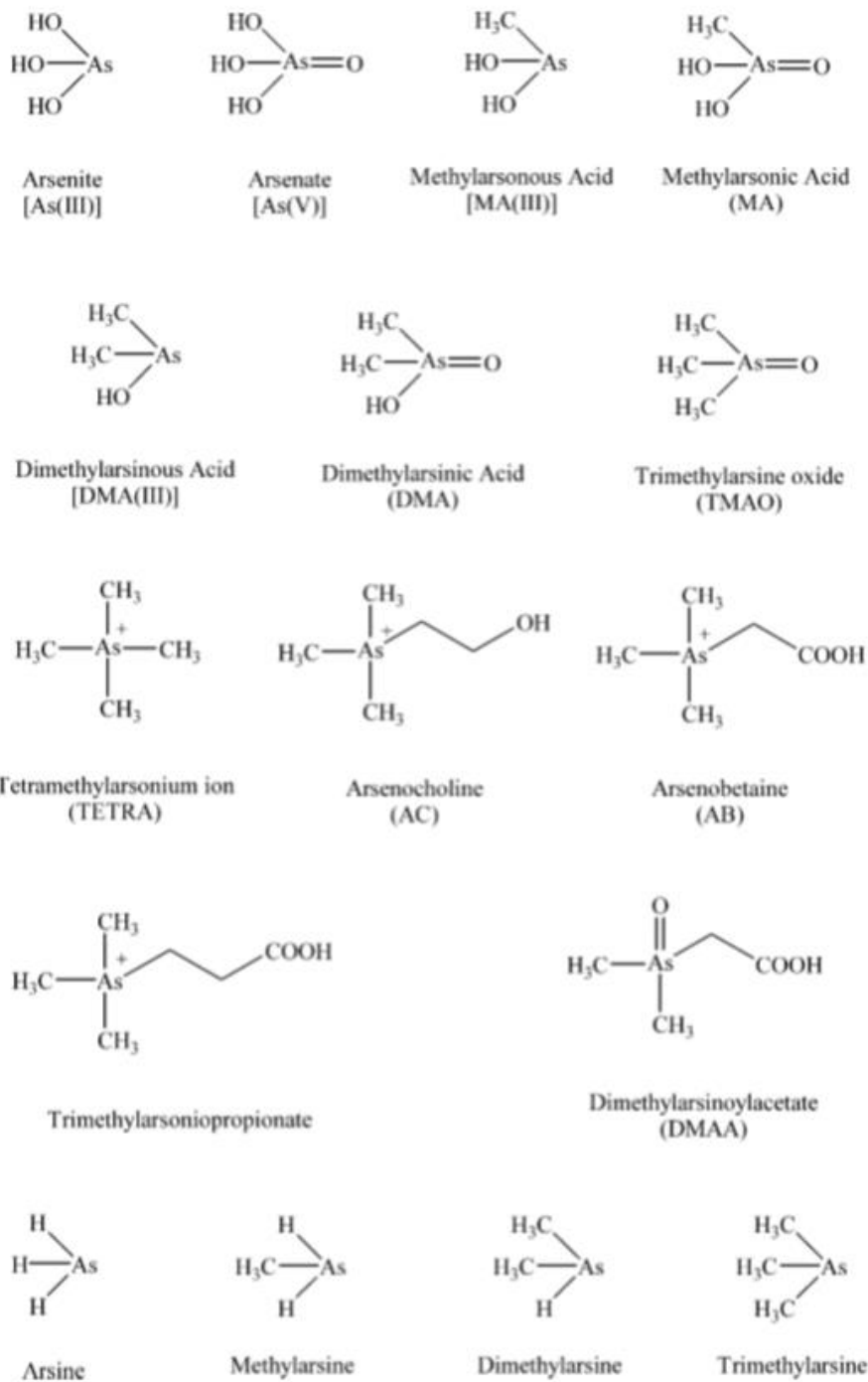
Οι κοινοί ανόργανοι μεταβολίτες παράγονται από τα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων και του ανθρώπινου είδους, και είναι τα πεντασθενή μεθυλιωμένα είδη i. MMA (monomethylarsonic acid) με χημικό τύπο $CH_3AsO(OH)_2$ και ii. DMA (dimethylarsinic acid) με χημικό τύπο $(CH_3)_2AsO(OH)$. Συναντώνται κατά κόρων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, σαν μεταβολικά προϊόντα ανόργανου αρσενικού, εκ των οποίων το MMA(V) ανιχνεύεται σε ιχνοποσότητες, καθώς και σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα, με χαρακτηριστική την περίπτωση του ρυζιού [49,52] In vivo, οι τρισθενείς μεθυλιωμένες μορφές i. MMA(III) (monomethylarsonous acid) με χημικό τύπο $(CH_3)As(OH)_2$ και ii. DMA(III) (dimethylarsinous acid) με χημικό τύπο $(CH_3)_2AsOH$ είναι ασταθείς μεταβολίτες και μάλιστα με ισχυρή τοξική δράση [49,50,51], ενώ η παρουσία τους γενικά σε τρόφιμα είναι περιορισμένη [49].

Επισημαίνεται ότι οι τρισθενείς μορφές είναι πιο τοξικές συγκριτικά με τις αντίστοιχες πεντασθενείς [45].

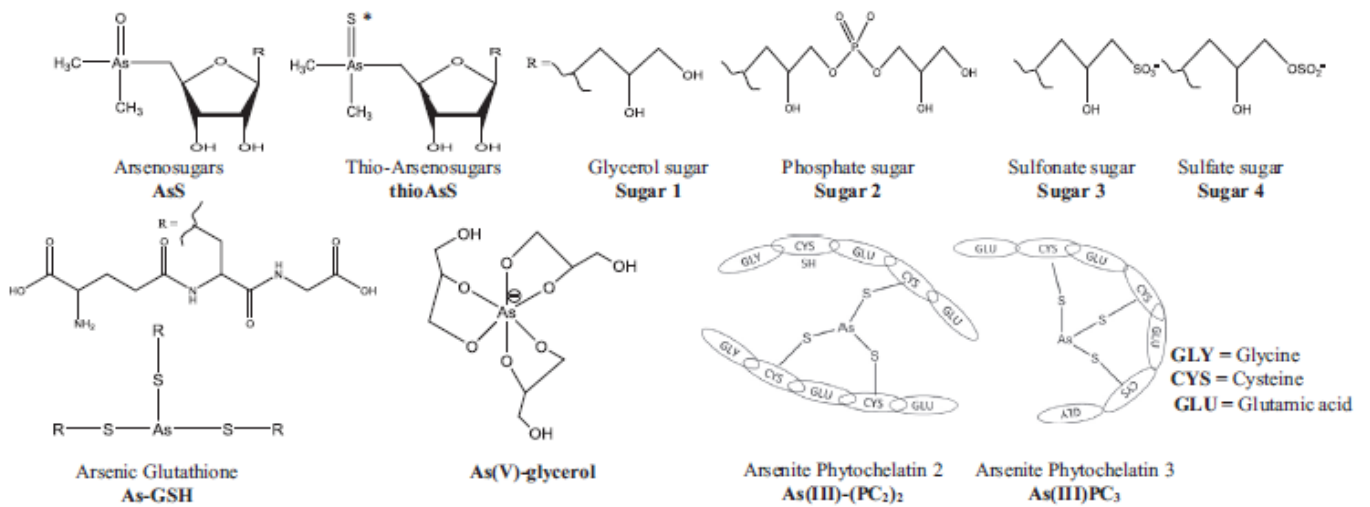
Στην κατηγορία των οργανικών μορφών του αρσενικού ανήκει η AsB, γνωστή στη βιβλιογραφία ως arsenobetaine, με χημικό τύπο $(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$, η οποία κυριαρχεί σαν ένωση στα διάφορα ιχθυηρά, κυρίως στα θαλασσινά και άλγη, ενώ δεν προκαλεί κάποιου είδους ανησυχία σχετικά με ενδεχόμενη τοξική δράση [52]. Επίσης, η AsC, γνωστή ως arsenocholine, με χημικό τύπο $(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}^-$ δεν θεωρείται και αυτή τοξική ένωση [53]. Ενώ, το αρσενικό εμφανίζεται συνδεδεμένο με ενώσεις που ανήκουν σε άλλες τάξεις θρεπτικών υλών, όπως υδατάνθρακες και λιπίδια, συνιστώντας τις ανάλογες κατηγορίες, που αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως arsenosugars και arsenolipids, αντίστοιχα, με ανεπαρκή επιστημονικά στοιχεία σχετικά με το βαθμό τοξικότητας τους, οι οποίες μετατρέπονται κατά τις μεταβολικές διαδικασίες κυρίως σε DMA [48].

Πίνακας 1: Ορισμένες από τις ενώσεις αρσενικού με ενδιαφέρον για το πεδίο του στοιχειακού προσδιορισμού [45].

Όνομασία	Σύντμηση	Χημικός τύπος
Ανόργανες ενώσεις		
Arsenite (Arsenous acid)	As(III)	$\text{As}(\text{OH})_3$
Arsenate (Arsenic acid)	As(V)	$\text{AsO}(\text{OH})_3$
Οργανικές ενώσεις		
Monomethylarsonous acid	MMA(III)	$\text{CH}_3\text{As}(\text{OH})_2$
Monomethylarsonic acid	MMA(V)	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$
Dimethylarsinous acid	DMA(III)	$(\text{CH}_3)_2\text{AsOH}$
Dimethylarsinic acid	DMA(V)	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$
Arsenobetaine	AsB	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
Arsenocholine	AsC	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
Trimethylarsine oxide	TMAO	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$
Tetramethylarsonium ion	Me_4As^+	$(\text{CH}_3)_4\text{As}^+$



Σχήμα 1: Οι χημικές δομές των πιο συχνά απαντώμενων ενώσεων αρσενικού στο περιβάλλον [54].



Σχήμα 2: Χημικές δομές των πιο κοινών ενώσεων που ανήκουν στη κατηγορία των σακχάρων συνδυασμένα με As [95].

3.3 Το αρσενικό στο περιβάλλον και στα τρόφιμα

Το αρσενικό, αναφορικά με την αφθονία του στο πλανήτη Γη, ανιχνεύεται στο περιβάλλον, με 30 περίπου διαφορετικά είδη ενώσεων, τόσο στο υδάτινο όσο και στο χερσαίο περιβάλλον, με λιγιστές σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο οικοσυστημάτων, σε χαμηλές ωστόσο, συγκεντρώσεις [52,54].

3.3.1 Υδροφόρος ορίζοντας

Την κύρια οδό από την οποία προέρχεται το αρσενικό στο υδάτινο περιβάλλον συνιστούν είτε οι υπόγειες αποθέσεις είτε οι συνθήκες που επικρατούν στην επιφάνεια του νερού [45], με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς, τα διάφορα άλγη και ψάρια, με μη τοξικές επιδράσεις [54]. Γεγονός που προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους πληθυσμούς ανά τον κόσμο των οποίων η διατροφή βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στα προϊόντα αλιείας, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την περίπτωση της Ιαπωνίας. Η εθνική νομοθεσία παράλληλα οφείλει να διασφαλίζει και την δημόσια υγεία των ατόμων αυτών των χωρών [54]. Οι τυπικές συγκεντρώσεις του αρσενικού στα θηλαστικά του υδάτινου

περιβάλλοντος και τα φύκη κυμαίνονται από 0,5 έως 50 mg/kg νωπού βάρους τους, με κυρίαρχες χημικές μορφές της AsB και της τάξεως των “arsenosugars” που έχουν κιάλας προαναφερθεί [48,52,57].

3.3.2 Χερσαίο περιβάλλον

Οι τυπικές στο έδαφος, συγκεντρώσεις αρσενικού είναι σημαντικά χαμηλότερες συγκριτικά με αυτές του υδάτινου περιβάλλοντος και κυμαίνονται από 0,5 έως 2,5 mg/kg δείγματος [54]. Ενώ, σε περιοχές με έντονη ηφαιστειακή δραστηριότητα, όπως η Ιαπωνία και το Μεξικό, το έδαφος ενδέχεται να φέρει συγκεντρώσεις τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους υψηλότερες από τις μέσες τιμές που είναι μικρότερες των 10 mg/kg [58]. Εκτός αυτών, οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το περιεχόμενο του περιβάλλοντος σε αρσενικό [45]. Ειδικότερα, η ανάγκη για εντατική χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών [56], και για βελτίωση των διάφορων καλλιεργητικών πρακτικών, κατέστησε το αρσενικό μόλυβδο εντομοκτόνο και ζιζανιοκτόνο για πολλά χρόνια, μέχρι που αντικαταστάθηκε από άλλες προηγμένες οργανικές ενώσεις. Η χρήση επίσης, του αρσενικού από την βιομηχανία, για την κατασκευή ημιαγωγών-σωληνώσεων, αλλά και η χρήση του ως συστατικό με συντηρητική δράση στα διάφορα προϊόντα ξυλείας, συνέβαλαν καθοριστικά στην αύξηση της συγκέντρωσής του στο περιβάλλον [45,56]. Πέραν της ανθρωπογενούς δραστηριότητας, εκτιμάται να ευθύνεται και αυτή των μικροοργανισμών για το ποσό που απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα από την επιφάνεια του εδάφους [60]. Σε προϊόντα που καλλιεργούνται, ανιχνεύονται οι χημικές μορφές As(III), As(V), MA, DMA, TMAO και TETRA [54]. Σε διάφορα φυτά που αναπτύσσονται σε μη μολυσμένα εδάφη, το αρσενικό σπάνια υπερβαίνει τα 20 μg/kg νωπού προϊόντος, με κατ’ εξαίρεση ορισμένα είδη μανιταριών τα οποία ενδέχεται να περιέχουν ποσότητες εκφρασμένες σε mg/kg νωπού προϊόντος [54,60].

3.3.3 Η έκθεση του ανθρώπου στο αρσενικό μέσω της διατροφής του

Ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή με το αρσενικό μέσω του αέρα, των τροφών και του πόσιμου νερού που καταναλώνει. Πέραν των καύσεων διαφόρων

προϊόντων άνθρακα πλούσιων σε αρσενικό και την πιθανή έκθεση που υφίσταται στο περιβάλλον εργασίας από εκπομπές ουσιών μεγάλων βιομηχανιών, η αντίστοιχη επίδραση που δέχεται μέσω του αέρα καθίσταται δευτερεύουσας σημασίας. Ενώ, το ολικό περιεχόμενο σε αρσενικό που παραλαμβάνει μέσω της τροφικής αλυσίδας αποτελεί και την πιο σημαντική πηγή της έκθεσής του στο στοιχείο [54]. Μέσα στα πλαίσια της ανθρωπογενούς δραστηριότητας, επισημαίνεται και η χρήση ορισμένων ενώσεων αρσενικού σαν πρόσθετα στις ζωοτροφές, οι οποίες ακολούθως μέσω των μεταβολικών μονοπατιών κατά τα διάφορα στάδια της τροφικής αλυσίδας, διαπερνούν ενδεχομένως και στην διατροφή του ανθρώπου. Για παράδειγμα, η ένωση 4-hydroxy-3-nitrophenylarsonic acid χρησιμοποιείται κοινώς ως ενισχυτική ουσία για την ανάπτυξη των ζώων στις ζωοτροφές των πουλερικών [67].

Από το χερσαίο περιβάλλον, το ανόργανο αρσενικό εισέρχεται και διαχέεται στην τροφική αλυσίδα μέσω των προϊόντων φυτικής προέλευσης, τα οποία με τους ιστούς και τα ριζοειδή που διαθέτουν, επιτυγχάνουν την απορρόφηση του στοιχείου, σε βαθμό που καθορίζεται από την βιοδιαθεσιμότητα στο έδαφος [49]. Εκτός από τα επίπεδα των συγκεντρώσεων του αρσενικού στο έδαφος, και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες μετέχουν ενεργά στο κλάσμα του στοιχείου που απορροφάται από τα φυτά, παρεμποδίζοντας έτσι τη μετανάστευση και διανομή του σε γειτονικά εδάφη [61]. Σημειώνεται επιπλέον, τα βρώσιμα μέρη που προέρχονται από φυτά που αναπτύσσονται σε εδάφη πλούσια σε αρσενικό, φέρουν και αυξημένες αισθητά συγκεντρώσεις, ενώ τα ζώα μεταβολίζουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ανόργανου αρσενικού, με αποτέλεσμα τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης να μην περιέχουν τόσο υψηλά επίπεδα αρσενικού [62,63].

Στο υδάτινο περιβάλλον, το ανόργανο αρσενικό προέρχεται κυρίως από τους ζωντανούς οργανισμούς που διαβιούν στον πυθμένα και εν συνεχεία μεταβολίζεται σε πληθώρα οργανικών ενώσεων με μειωμένη τοξική δράση, που ανιχνεύονται στους ιστούς των ψαριών [48]. Το ανόργανο αρσενικό στους υδρόβιους οργανισμούς σε γενικές γραμμές ανευρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ειδικότερα μικρότερες των 5 ng/g. Ωστόσο, ορισμένα είδη ψαριών του γλυκού νερού, τα οποία μάλιστα προέρχονται και από

επιβαρυμένα με αρσενικό υδάτινα περιβάλλοντα, συσσωρεύουν και υψηλότερες συγκεντρώσεις [64]. Τα διάφορα θαλασσινά, με τυπικό παράδειγμα τα μύδια, καθώς και τα φύκη ενδέχεται να περιέχουν μέτρια και πολύ υψηλά επίπεδα ανόργανου αρσενικού, αντίστοιχα [50].

Αναφορικά με την διαιτητική πρόσληψη, τα τρόφιμα τα οποία συμβάλλουν περισσότερο στην έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού στο αρσενικό είναι κυρίως το ρύζι, τα δημητριακά και τα προϊόντα τους, όπως και τρόφιμα πλούσια γενικά σε υδατάνθρακες, ορισμένα φρούτα, λαχανικά και οι χυμοί τους, τα θαλασσινά, τα φύκη, το νερό και κάποια αλκοολούχα και μη, ποτά [49,50,65,66]. Αυτά τα τρόφιμα μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν όσα από αυτά εμφανίζουν υψηλά έως πολύ υψηλά επίπεδα αρσενικού, δηλαδή της τάξεως των δεκάδων έως χιλιάδων ng/g, με κύριους αντιπροσώπους το ρύζι, τα άλγη και τα θαλασσινά.

Το **ρύζι**, ωστόσο, μεταξύ των άλλων τροφίμων της κατηγορίας του, παρουσιάζει μια ιδιομορφία καθότι το φυτό έχει την ικανότητα να απορροφά και να μεταφέρει το ανόργανο αρσενικό στο σπόρο, ειδικά σε ημι-υδατικό αναερόβιο περιβάλλον, για την περίπτωση καλλιέργειας μη αποφλοιωμένου ρυζιού που ευνοεί την πρόσληψη ανόργανου αρσενικού [61]. Τα επίπεδα βέβαια της συγκέντρωσης ανόργανου αρσενικού, στο ρύζι ποικίλλουν ευρέως, ανάλογα με την χώρα προέλευσης του φυτού. Ωστόσο, κυμαίνονται περίπου στα 100 ng/g, ενώ τα 130 ng/g προσφάτως θεωρήθηκαν σαν μέση τιμή από αποτελέσματα ερευνών που έχουν εκδοθεί [68]. Σημαντική αξία για την μελέτη του περιεχομένου που φέρει το ρύζι σε ανόργανο αρσενικό, προσδίδει το γεγονός ότι συνιστά ένα πολύ συνηθισμένο και θερμιδογόνο τρόφιμο στην διατροφή μιας μεγάλης κατηγορίας ανθρώπων στο κόσμο, κυρίως της Νότιας Ασίας [69]. Επίσης, είναι το βασικό προϊόν σε περιοχές της Ν.Α Ασίας, όπου παρατηρείται αυξημένη περιεκτικότητα σε αρσενικό λόγω μετανάστευσης των ενώσεων του, έπειτα από χρήση μολυσμένου νερού σε συστήματα άρδευσης των καλλιεργειών ή και περαιτέρω σε επόμενα στάδια κατά το μαγείρεμα του τροφίμου [70].

Υψηλές επίσης, συγκεντρώσεις αρσενικού ανιχνεύονται σε προϊόντα ρυζιού, όπως είναι οι γκοφρέτες, τα κέικ και κράκερς με βάση το ρύζι, τα οποία ως επί το πλείστον προορίζονται για κατανάλωση από βρέφη και παιδιά

[71,72,73,74]. Για τα κράτη-μέλη της Ε.Ε, για τους συγκεκριμένους τύπους τροφίμων, έχει τεθεί ως ανώτατο επιτρεπτό όριο τα 300 ng/g και 200 ng/g για το λευκασμένο ρύζι. Ενώ, για το ρύζι που χρησιμοποιείται στην παρασκευή τροφών βρεφικής και παιδικής ηλικίας, ορίζεται μέγιστη συγκέντρωση As τα 100 ng/g [26], το οποίο είναι υπό συζήτηση και για τις Η.Π.Α [77].

Τα οστρακοειδή επίσης, και ειδικά τα μαλάκια, αναμένεται να περιέχουν σημαντικές ποσότητες ανόργανου αρσενικού, κατά μέσο όρο περίπου 130 ng/g [68]. Ενώ, τα επίπεδα στα βρώσιμα θαλασσινά μπορεί να είναι και ακόμα υψηλότερα, της τάξεως των χιλιάδων ng/g σε κάποια από τα είδη που διατίθενται μάλιστα και στην αγορά [50].

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τρόφιμα με βάση τα σιτηρά και άλλων δημητριακών, εκτός του ρυζιού, φρούτα και λαχανικά, καθώς και τα προϊόντα αυτών, όπως και το νερό και διάφορα αφεψήματα. Με κριτήριο την απουσία περιβαλλοντικής επιμόλυνσης αρσενικού, τα συγκεκριμένα τρόφιμα γενικά φέρουν σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις ανόργανου αρσενικού, μικρότερες των 20 ng/g. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ειδικά σε ρευστά προϊόντα μικρότερες των 10 ng/g. Ενώ, στα αφεψήματα είναι κάτω από 5 ng/g και στο νερό κάτω από 1 μg/L. Ωστόσο, συνεισφέρουν σημαντικά στην έκθεση του ανθρώπου στο inAs μέσω της διατροφής, καθότι καταναλώνονται τακτικά και σε μεγάλο βαθμό. Για τον υπολογισμό της διατροφικής πρόσληψης επίσης, διευκρινίζεται ότι τα μανιτάρια ανήκουν στα λαχανικά, σε ορισμένα είδη των οποίων ανιχνεύονται υψηλές συγκεντρώσεις inAs. Όμως, η συμβολή τους στην παράμετρο της έκθεσης του ανθρώπου στο στοιχείο κρίνεται δευτερεύουσας σημασίας, λόγω της περιορισμένης κατανάλωσής τους [49]. Στα πλαίσια της φυσιολογικής πρόσληψης ανόργανου αρσενικού, τα κύρια συνηθέστερα προϊόντα είναι τα δημητριακά και το νερό [75]. Τα διάφορα σιτηρά αποτελούν μάλιστα και το βασικό προϊόν διατροφής για πολλές περιοχές σε παγκόσμια κλίμακα, ενώ τα επίπεδα σε ανόργανο αρσενικό παρατηρούνται σε γενικές γραμμές κατά μία τάξη μεγέθους χαμηλότερα από τα αντίστοιχα στο ρύζι [63]. Όταν όμως καλλιεργούνται σε εδάφη επιβαρυσμένα με αρσενικό, ενδέχεται να επιτύχουν και πιο υψηλές συγκεντρώσεις [76].

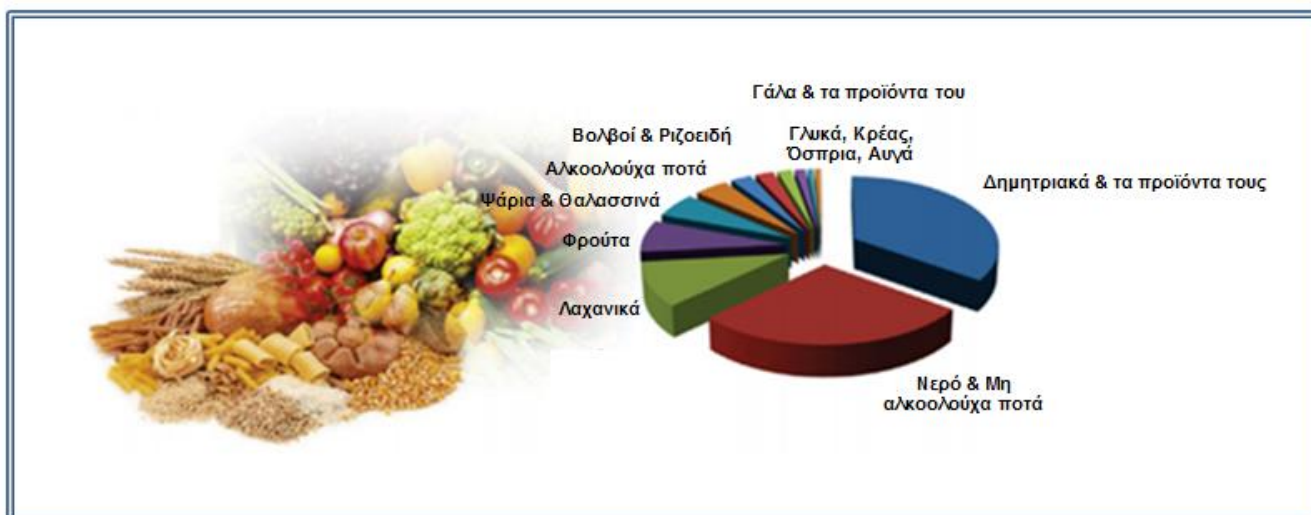
Όσον αφορά τις βρεφικές και παιδικές τροφές, συνιστούν μια ιδιαίτερη κατηγορία προϊόντων καθότι προορίζονται για ευαίσθητο σύνολο του

πληθυσμού. Ενώ, πολλές από αυτές προκύπτουν με βάση το ρύζι [49]. Το προ-μαγειρεμένο, λευκασμένο ρύζι αποτελεί τη βασική πηγή πρόσληψης υδατανθράκων κατά την περίοδο απογαλακτισμού των βρεφών μέχρι και το πρώτο έτος της ηλικίας τους, χάρη στην ήπια γεύση, τη χαμηλή πιθανότητα δράσης ως αλλεργιογόνο, την θρεπτική αξία και του συνόλου των ιδιοτήτων που φέρει ως πρώτη ύλη [50]. Ενώ, για την κατηγορία των παιδιών που πάσχουν από δυσανεξία στη λακτόζη ή γαλακτοζαιμία, τα προϊόντα ή ροφήματα με βάση το ρύζι αποτελούν άριστα υποκατάστατα και αναπληρώματα του γάλακτος, για την ανάγκη ρύθμισης μηχανισμών πέψης και μεταβολισμού των υδατανθράκων στον οργανισμό [1,49]. Σχετικά λοιπόν με τα επίπεδα του ανόργανου αρσενικού σε αυτούς τους τύπους τροφίμων, έντονη ανησυχία προκαλεί και η περίπτωση του βρεφικού γάλακτος [71,72,74,77,78,79,80,81,82].

Και άλλα προϊόντα με βάση το ρύζι, τα οποία απευθύνονται περαιτέρω σε μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά, όπως είναι τα κράκερς και τα δημητριακά πρωινού καθώς και άλλα που χρησιμοποιούνται σε ειδικές δίαιτες, όπως είναι των χορτοφάγων και τα τρόφιμα χωρίς γλουτένη και λακτόζη για συγκεκριμένο καταναλωτικό κοινό αποτελούν σημαντικές πηγές έκθεσης στο αρσενικό για τις ανάλογες μερίδες του πληθυσμού [71,72,73]. Ενώ, τα βρέφη που πάσχουν από κοιλιοκάκη συνιστούν ξέχωρα ένα ακόμα ευαίσθητο σύνολο ατόμων [83].

Η επιμόλυνση του νερού, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί και αυτή σημαντική πιθανή πηγή, από την οποία ο άνθρωπος προσλαμβάνει αρσενικό. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), το όριο για το πόσιμο νερό είναι τα 10 $\mu\text{g/L}$. Στις Η.Π.Α με βάση το τωρινό πρότυπο, ισχύουν τα 50 $\mu\text{g/L}$, τιμή η οποία επιδιώκεται να μειωθεί και αυτή στα 10 $\mu\text{g/L}$, έπειτα από οδηγία του Οργανισμού Προστασίας του Περιβάλλοντος (USEPA). Ενώ, σε κάποιες χώρες, όπως το Μπανγκλαντές, ακόμα και τα πιο υψηλά, σε σχέση με τα υπόλοιπα, όρια υπερβαίνονται κατά πολύ εξαιτίας της γεωγραφικής θέσης και τη μορφολογία του εδάφους τους [54]. Επιπλέον, η χρήση του επιφανειακού νερού ως πόσιμου δεν αποτελεί εναλλακτική λύση λόγω του αυξημένου μικροβιακού φορτίου. Οι υψηλές θερμοκρασίες και τα υψηλά επίπεδα υγρασίας που σημειώνονται σε αυτές τις περιοχές, ευνοούν την ανάπτυξη των βακτηρίων [54]. Επισημαίνεται ωστόσο, ότι τα συγκεκριμένα όρια αναφέρονται

σε ολικό περιεχόμενο σε αρσενικό, ενώ παράλληλα καταδεικνύουν την ανάγκη για ύπαρξη νομοθετικών ορίων των επιμέρους χημικών μορφών του αρσενικού, έπειτα από πιο εκτεταμένη έρευνα στο πεδίο του στοιχειακού προσδιορισμού [45].



Εικόνα 1: Η έκθεση του ανθρώπου στο ανόργανο αρσενικό μέσω της τροφικής αλυσίδας [49].

3.4 Τοξικότητα του αρσενικού

Η χημική μορφή και η κατάσταση οξειδωσης του αρσενικού καθορίζει και την τοξικότητα του στοιχείου, η οποία εξαρτάται επιπλέον και από άλλους παράγοντες, όπως είναι η φυσική κατάσταση του δείγματος που περιέχει το αρσενικό. Δηλαδή αν απαντάται σε αέρια, υγρή ή στερεή μορφή, λαμβάνοντας ειδικά για την τελευταία περίπτωση, υπόψη και το μέγεθος των σωματιδίων. Επίσης, η πιθανή τοξική δράση που φέρει το τρόφιμο στον ανθρώπινο οργανισμό, λόγω της περιεκτικότητας σε αρσενικό, επηρεάζεται από τον ρυθμό απορρόφησης του στοιχείου από τα κύτταρα και την εξουδετέρωση του, από την φύση των επιμέρους χημικών υποκαταστατών στις διάφορες τοξικές μορφές και την γενικότερη κατάσταση υγείας των ατόμων που καταναλώνουν το εκάστοτε προϊόν [45].

Σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό IARC, στην έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού στο ανόργανο αρσενικό μέσω της διατροφής του περιλαμβάνονται συμπτώματα όπως είναι ο καρκίνος του δέρματος, στους πνεύμονες και την ουροδόχο κύστη, ενδεχομένως στο συκώτι, τα νεφρά και

στον προστάτη [87]. Εκτός του καρκίνου και των αλλοιώσεων στο δέρμα [45,50], μπορεί να επιφέρει και άλλα σοβαρά προβλήματα υγείας. Ειδικότερα, καρδιαγγειακές παθήσεις, πνευματική καθυστέρηση, μη φυσιολογικό μεταβολισμό της γλυκόζης με περαιτέρω εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου II, γνωστός και ως μη ινσουλινο-εξαρτώμενος (Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) ή γεροντικός διαβήτης καθώς και διαταραχές του νευρικού συστήματος [52]. Η ευαισθησία ωστόσο, του ανθρώπινου οργανισμού στις διάφορες δυσμενείς επιδράσεις που επιφέρει το ανόργανο αρσενικό, ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ατόμων και καθορίζεται από παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, το στάδιο που διανύει το άτομο, τυπικά αναφέρεται το χρονικό διάστημα της εγκυμοσύνης και η περίοδος γαλουχίας, οι διατροφικές του συνήθειες και οι γενετικοί πολυμορφισμοί που ρυθμίζουν τα ένζυμα για την βιομετατροπή του ανόργανου αρσενικού στο ανθρώπινο σώμα [50]. Ενώ, και η εντερική του μικροχλωρίδα δείχνει να μετέχει σε μεγάλο βαθμό ως προς την πιθανότητα εμφάνισης των διάφορων κλινικών συμπτωμάτων [88].

Επικρατούσε η άποψη ότι το φαινόμενο της μεθυλίωσης των χημικών ενώσεων του αρσενικού αποτελούσε κύριο μονοπάτι κατά τις μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού που συνέβαλλε στην αποτοξίνωση του. Εν αντιθέσει, οι μεθυλιωμένοι μεταβολίτες του αποδείχθηκε να ευθύνονται μερικώς για τις δυσμενείς επιδράσεις που προκαλεί η έκθεση του ανθρώπου στο αρσενικό, ενώ με περαιτέρω έρευνα, έγινε αποδεκτή η συνέργεια τους στην χρόνια τοξικότητα, η οποία ακόμα και σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως [45].

Η μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού θεωρείται γενικά, ότι προκύπτει από την αναγωγή του πεντασθενούς αρσενικού $As(V)$, σε τρισθενή $As(III)$, με την προσθήκη μεθυλ-ομάδας από την S-adenosylmethionine χημική ένωση κατά τον σχηματισμό MA σε MA(III) και περαιτέρω μεταφορά της μεθυλ-ομάδας για να δώσει DMA [54]. Ενώ, είναι περιορισμένη η γνώση σχετικά με τα ένζυμα που εμπλέκονται στην προκειμένη διαδικασία. Το συκώτι δείχνει να αποτελεί σημαντική περιοχή για την μεθυλίωση του αρσενικού, χωρίς όμως να λαμβάνει χώρα αποκλειστικά και μόνο εκεί [85]. Οι οργανικές μορφές, DMA και MA, αντιδρούν σε μικρότερο βαθμό με τα συστατικά των διάφορων ιστών

του οργανισμού και εκκρίνονται πιο γρήγορα σε σχέση με το As(V) και As(III) στα ούρα. Ενώ, οποιαδήποτε ένωση τρισθενούς μορφής, ακόμα και οι οργανικές, είναι εξίσου τοξικές με τις ανόργανες μορφές της αντίστοιχης οξειδωτικής κατάστασης, εκ των οποίων οι DMA(III) και MA(III) επιπλέον εμφανίζουν και γονιδιοτοξική δράση [86].

Συμπερασματικά, **η χρόνια τοξικότητα** σχετικά με το αρσενικό, περιλαμβάνει συμπτώματα καρκινογένεσης και χρωμοσωμικές ανωμαλίες [45,84]. Οι τρισθενείς ενώσεις αρσενικού είναι πιο τοξικές από τις πεντασθενείς, λόγω του ότι οι πρώτες μεταβολίζονται εντονότερα και πιο εύκολα στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, η χρόνια τοξικότητα που αποδίδεται στις ανόργανες μορφές, περαιτέρω μεταβιβάζεται και στις μεθυλιωμένες χημικές ενώσεις που προκύπτουν μέσω των διάφορων μεταβολικών διεργασιών [45]. Ο πιο κοινός τρόπος με τον οποίο δρα το συγκεκριμένο χημικό στοιχείο είναι η απενεργοποίηση των ενζυμικών συστημάτων. Ενώ, τα ένζυμα είναι ζωτικής σημασίας, στοιχεία για την λειτουργία του οργανισμού καθότι δρουν σαν βιολογικοί καταλύτες [54]. Σε υψηλά επίπεδα αρσενικού, τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα και τους ιστούς μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (Κύκλος του Kreb's) επηρεάζονται αρνητικά από τις τρισθενείς μορφές του αρσενικού. Η παρεμποδιστική δράση βασίζεται στην απενεργοποίηση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού λόγω συμπλοκοποίησης με το ανόργανο As(III). Η παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (μορίων ATP) παρεμποδίζεται, προκαλώντας βλάβες ακόμα και θάνατο των κυττάρων που έρχονται σε επαφή με το αρσενικό. Εν συνεχεία, οι διάφορες τρισθενείς ενώσεις αρσενικού δύνανται να συνάψουν ισχυρούς δεσμούς με πρωτεΐνες, με δυσμενείς επιπτώσεις ως προς το γενετικό υλικό καθώς συχνά οδηγούν στην εμφάνιση καρκινωμάτων στο δέρμα.

Όσον αφορά τον μηχανισμό για την τοξική δράση του As(V), χαρακτηριστικά σημειώνεται το στάδιο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπου παράγεται ενέργεια με τη μορφή ATP, ενώ ταυτόχρονα οξειδώνεται η μορφή NADH. Η διαδικασία που περιγράφεται, διαταράσσεται από το As(V), όταν σχηματίζει εστέρα ADP, που είναι αρκετά ασταθής και γρήγορα υπόκειται μη ενζυματική υδρόλυση με αντίστοιχη βλάβη ή και θάνατο των κυττάρων που προσβάλλονται. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται με το όρο "arsenolysis" [54].

Επίσης, οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται παρουσία των χημικών μορφών As(III), MMA και DMA, απελευθερώνουν TMAO. Ενώ, από την σειρά των αντιδράσεων που καταλύονται με τη βοήθεια των ενζύμων στους διάφορους ζωικούς οργανισμούς, προκύπτει πληθώρα προϊόντων μεθυλίωσης, των οποίων οι μηχανισμοί και τα επιμέρους στάδια κατά τα μεταβολικά μονοπάτια δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί με μεγάλη ακρίβεια [54].

Ο ανθρώπινος οργανισμός, αποβάλλει το μεγαλύτερο ποσοστό αρσενικού που έχει παραλάβει λόγω της κατάποσης διάφορων τροφών που το περιέχουν, μέσω των νεφρών του. Η συγκέντρωση του στα ούρα των ατόμων που δεν έχουν εκτεθεί σε αυτό είναι μικρότερη των 10 µg/L [85]. Ενώ, σχετικά με την αναλογία των ενώσεων αρσενικού που εκκρίνονται, ποσοστό 60-80% αντιστοιχεί στο DMA, 10 - 30% στο κλάσμα As(III) και As(V) και 10-20% στο MA, που σαφώς αλλάζουν σύμφωνα με την διατροφή του οργανισμού και μάλιστα σε περίπτωση κατανάλωσης θαλασσινών σε τακτική βάση [54]. Επομένως, είναι δυνατός ο ισχυρισμός περί πολυμορφισμού που εμφανίζουν οι διάφορες ενώσεις σχετικά με τις διαδικασίες μεθυλίωσης που υπόκειται το αρσενικό. Ενδεικτικά, σημειώνεται ότι άτομα από περιοχές της βορειοδυτικής Αργεντινής, ανιχνεύονται στα ούρα τους χαμηλά ποσοστά MA (~2%), ενώ στο Ταϊβάν φέρουν μέση τιμή συγκέντρωσης MA, 27% [85].

Όσον αφορά τον στοιχειακό προσδιορισμό του αρσενικού στο αίμα, λίγες μελέτες έχουν διεξαχθεί. Έχει παρατηρηθεί ύπαρξη της μορφής AsB στον ορό του αίματος και DMA επιπλέον, σε άτομα που πάσχουν από την ασθένεια της ουραιμίας, ως επακόλουθο ανεπάρκειας νεφρικής λειτουργίας [54].

Λόγω της υψηλής συγγένειας του αρσενικού με την κυστεΐνη, που απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην κερατίνη των μαλλιών, συνεπάγεται ότι το αρσενικό συσσωρεύεται και στο τριχωτό της κεφαλής. Το ολικό περιεχόμενο σε As των ατόμων που δεν έχουν εκτεθεί στο στοιχείο σπάνια υπερβαίνει τα 200 µg/kg, αντιθετικά με εκείνα που έχουν εκτεθεί και φέρουν μάλιστα και κατά δέκα φορές υψηλότερες τιμές, με κυρίαρχες τις διμεθυλ-μορφές του [54].

Συγκεντρωτικά λοιπόν, το αίμα, τα ούρα, τα μαλλιά και τα νύχια καθώς συγκεντρώνουν σημαντικές ποσότητες αρσενικού, αποτελούν κατάλληλους

δείκτες για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου στο στοιχείο και των ενδεχόμενων ανεπιθύμητων συμπτωμάτων που επιφέρουν, οι οποίοι στην επιστημονική βιβλιογραφία αναφέρονται ως “biomarkers” [50,54].

Ενώ, η **οξεία τοξικότητα** του ανόργανου αρσενικού, έπειτα από έκθεση χρονικής διάρκειας μικρότερης των δύο έως και τριών εβδομάδων, διαταράσσει γενικώς την φυσιολογική λειτουργία των διάφορων συστημάτων του ανθρώπινου οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων πρωτίστως του γαστρεντερικού, καρδιαγγειακού, νευρικού, νεφρικού και ακολούθως αναπνευστικού συστήματος, με τυχόν βλάβες στο ήπαρ, στην κυκλοφορία του αίματος και αλλοιώσεις στο δέρμα [50]. Ενώ, τα λιγότερο έντονα συμπτώματα που αναφέρθηκαν, παρατηρούνται σε επίπεδα πρόσληψης αρσενικού σε εύρος τιμών/όρια ανοχής (LOAEL, Lowest Observed Adverse Effect Level), που κυμαίνεται περίπου μεταξύ 0,05 και 0,1 mg/kg σωματικού βάρους την ημέρα [50,94].

Πίνακας 2: Συμπτώματα της έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού στο αρσενικό [45,50,52].

Τύπος Τοξικότητας	Συμπτώματα
Οξεία	<ul style="list-style-type: none">➤ Διαταραχή της ομαλής λειτουργίας των διάφορων συστημάτων (π.χ Γαστρεντερικού, Νεφρικού, Αναπνευστικού)➤ Μη φυσιολογικός μεταβολισμός της γλυκόζης με περαιτέρω εμφάνιση διαβήτη➤ Πνευματική καθυστέρηση➤ Καρδιαγγειακές παθήσεις➤ Βλάβες στο ήπαρ➤ Αλλοιώσεις στο δέρμα
Χρόνια	<ul style="list-style-type: none">➤ Καρκινογένεση➤ Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

3.4.1 Εκτίμηση επικινδυνότητας (Risk Assessment)

Για την εκτίμηση επικινδυνότητας σχετικά με την έκθεση του ανθρώπου στο αρσενικό μέσω της διατροφής, πρωτίστως λαμβάνονται στοιχεία από άτομα που ανήκουν σε πληθυσμούς χωρών όπως το νοτιοδυτικό Ταϊβάν, το Μπανγκλαντές, τη βόρεια Χιλή και την Αργεντινή, όπου επί μακρόν χρονικό διάστημα καταναλώνουν νερό, το οποίο ξεπερνά σε συγκέντρωση αρσενικού τα 50 µg/L [49]. Προκειμένου λοιπόν να προληφθούν οι δυσμενείς, ως προς την υγεία του ανθρώπου, επιδράσεις του, κάποιο κατώφλι σχετικά με την ασφαλή δόση απαιτείται να ορίζεται [51]. Ωστόσο, δεν αναφέρεται ως ανεκτή ημερήσια ή εβδομαδιαία πρόσληψη, ενώ οι πρότυπες γενικά τιμές, για την δημόσια υγεία βασίζονται σε δείκτες αναφοράς ενός δεδομένου ποσοστού που φέρει επιπλέον κίνδυνο και έχουν δοκιμαστεί για τον ανθρώπινο οργανισμό [49]. Μία δόση αναφοράς «χαμηλής εμπιστοσύνης» (Benchmark Dose Lower Confidence Limit, BMDL) για 0,5% αύξηση του κινδύνου για καρκίνο στο πνεύμονα ορίζεται από την επιτροπή μελών του οργανισμού FAO/WHO που ειδικεύεται στα πρόσθετα των τροφίμων (JECFA), η οποία αντιστοιχεί στα 3 µg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα (BMDL_{0.5}) [52]. Ενώ, η επιστημονική ομάδα για τις μολυσματικές προσμείξεις στην τροφική αλυσίδα (ομάδα CONTAM) της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) παρέχει εύρος τιμών κατώτερου ορίου εμπιστοσύνης της δόσης αναφοράς (BMDL) για αύξηση του κινδύνου κατά 1%, σχετικά με την πρόκληση αλλοιώσεων στο δέρμα καθώς και καρκίνου, όπως και για την περίπτωση του πνεύμονα και της ουροδόχου κύστης, που κυμαίνεται μεταξύ 0,3 - 8 µg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα (BMDL₀₁) [50]. Για την εκτίμηση της επικινδυνότητας του στοιχείου, απαιτείται και επιπλέον αξιολόγηση, όσον αφορά τα περιθώρια της έκθεσης (Margins Of Exposure, MOE's) μεταξύ των αναγνωρισμένων τιμών αναφοράς και της εκτιμώμενης καθημερινής έκθεσης μέσω της διατροφής, εφόσον δεν υπάρχουν επίπεδα συγκεντρώσεως του ανόργανου αρσενικού που να συνδέονται με την απουσία των προαναφερθέντων, για την ανθρώπινη υγεία, κινδύνων μακροπρόθεσμα [49].

Ωστόσο, αναδυόμενος συνεχώς κίνδυνος προκύπτει και από την επί μακρόν, έκθεση των πληθυσμών στο αρσενικό μέσω του πόσιμου νερού, σε ενδιάμεσα και χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεως, μικρότερα των 50 µg/L

[89,90,91]. Παράλληλα, παρατηρούνται ανωμαλίες κατά την εμβρυακή και περαιτέρω ανάπτυξη των ατόμων προσχολικής ηλικίας [92,93]. Συνεπώς, ενδιαφέρον προκύπτει για την εξέταση της επίδρασης της έκθεσης στο αρσενικό κατά τα διάφορα στάδια της ηλικίας ενός ατόμου και μάλιστα σε αυτά που κρίνονται ιδιαίτερα ευαίσθητα για το υπόλοιπο της ζωής του [49].

Επισημαίνεται ωστόσο ότι παρά το γεγονός της κατάταξης του στις δυνητικά, καρκινογόνες ουσίες για τον άνθρωπο, νομοθετικό όριο για την συγκέντρωση του ανόργανου αρσενικού στα τρόφιμα τέθηκε πολύ μετέπειτα σε σχέση με τα υπόλοιπα τοξικά διατροφικά στοιχεία, όπως είναι το κάδμιο, ο μόλυβδος και οι μεθυλιωμένες μορφές του υδράργυρου [49]. Ενώ, ο ακριβής στοιχειακός προσδιορισμός για το ανόργανο ειδικά, αρσενικό παραμένει πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα καθότι υφίστανται πολλές οργανικές μορφές του στις διάφορες τροφές με χαμηλή ή και αμελητέα τοξική δράση. Σαφώς, και απαιτείται αξιολόγηση του κινδύνου κατά περίπτωση, λαμβάνοντας υπόψη τον τύπο του τροφίμου που εξετάζεται κάθε φορά, συνδυαστικά με την συγκέντρωση και τις χημικές μορφές που αναμένεται να ανιχνευθούν σε αυτό και βέβαια συνυπολογίζοντας την εκάστοτε μερίδα των ανθρώπων που πρόκειται να το καταναλώσουν και την κατάσταση υγείας τους. Συνεπώς, η εκτίμηση του κινδύνου (Risk Assessment), αποβαίνει μία ιδιαίτερα σύνθετη και πολύπλοκη διαδικασία [49].

3.4.2 Νομοθεσία για το αρσενικό

Σύμφωνα με τον οργανισμό WHO, η κύρια έκθεση του ανθρώπου στο αρσενικό επιτυγχάνεται μέσω της τροφής και του πόσιμου νερού, που καταναλώνει. Οδηγίες για την ποιότητα, του προς πόση νερού, συνιστούν ως μέγιστη συγκέντρωση ανόργανου αρσενικού τα 10 μg/L, που αντιστοιχεί στην «Προσωρινή Ανεκτή Εβδομαδιαία Δόση» (Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI), των 15 μg/kg σωματικού βάρους, η οποία καθορίζεται από το Συμβούλιο Επιτροπής των Διεθνών Οργανισμών FAO/WHO, όπου μετέχουν ειδικοί εμπειρογνώμονες για τα πρόσθετα των τροφίμων, γνωστή και με το αρτικόλεξο JECFA, υποθέτοντας μια κατανομή 20% σε πόσιμο νερό [9,14]. Ωστόσο, προσφάτως έπεται από επαναξιολόγηση του κινδύνου της έκθεσης

στο αρσενικό, η επιστημονική κοινότητα της Ευρωπαϊκής Αρχής για την ασφάλεια των τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), που επιδίδεται σε θέματα που σχετίζονται με ρύπους, επιμολυντές και προσμίξεις οι οποίοι υπεισέρχονται στην τροφική αλυσίδα (CONTAM Panel), απέσυρε την προηγούμενη τιμή, ισχυριζόμενη πως το ανόργανο αρσενικό επιφέρει καρκίνο στους πνεύμονες, την ουροδόχο κύστη, το δέρμα και άλλες δυσμενείς επιδράσεις, προχωρώντας στις διαδικασίες για να θέσει εκ νέου τιμή [4, 25]. Ενώ, ο οργανισμός WHO αποφάσισε να διατηρήσει την τιμή των 10 µg/L για την περιεκτικότητα σε ανόργανο αρσενικό καθότι για πολλές χώρες ακόμα και αυτό το επίπεδο δεν κρίνεται εφικτό [9].

Στον “Codex Alimentarius” των Διεθνών Οργανισμών FAO/WHO για την διασφάλιση της παγκόσμιας υγείας, ορίζονται πρότυπες τιμές για το ολικό περιεχόμενο σε αρσενικό και για άλλους τύπους τροφίμων. Ως ανώτατο επιτρεπόμενο όριο της συγκέντρωσης του αρσενικού στο φυσικό μεταλλικό νερό, όπως προαναφέρθηκε, ισχύουν τα 0,01 mg/L, ενώ στα βρώσιμα λίπη και έλαια, με τυπικό το παράδειγμα της μαργαρίνης, στα ζωικά λίπη, όπως είναι το λαρδί, στα ελαιόλαδα, τα πυρηνέλαια και σε 21 ακόμη φυτικά έλαια αντιστοιχούν τα 0,1 mg/kg και 0,5 mg/kg για την κατηγορία των αλάτων που περιέχονται σε τρόφιμα [30,50]. Ενώ, σύμφωνα με τη σύσταση της Ε.Ε υπ’ αριθμόν 2015/1381, τα κράτη-μέλη οφείλουν να παρακολουθούν την παρουσία ολικού και ανόργανου αρσενικού και σε άλλα είδη τροφίμων, όπως είναι τα δημητριακά, οι χυμοί φρούτων και λαχανικών, ο καφές, το τσάι, η μπύρα, τα ψάρια και τα θαλασσινά, τα τρόφιμα που περιέχουν άλγη, το γάλα και τα προϊόντα του, τις βρεφικές και παιδικές τροφές καθώς και τα συμπληρώματα διατροφής [27]. Επισημαίνεται ότι η περίπτωση του ρυζιού ανάλογα με το τύπο του και τα διάφορα τρόφιμα που παράγονται από αυτό θα εξετασθούν στο επόμενο κεφάλαιο.

Προς το παρόν, η Ευρωπαϊκή νομοθεσία δεν θέτει ανώτατα επιτρεπτά όρια για τα διάφορα είδη ενώσεων ανόργανου αρσενικού, πιθανώς λόγω έλλειψης κάποιας πλήρως επικυρωμένης πρότυπης αναλυτικής μεθόδου και μη διαθεσιμότητας πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRM’s) [109].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΤΟ ΡΥΖΙ

4.1 Βοτανική Ταξινόμηση

Το ρύζι ανήκει στη φυλή *Oryzae* της οικογένειας *Gramineae*, κοινώς αγρωστώδη, με τη λατινική βοτανική ονομασία *Oryza sativa L.*

Το γένος *Oryza* περιλαμβάνει περίπου 20 είδη, ιθαγενή των υγρών περιοχών της Αφρικής, Ν. και ΝΑ. Ασίας, Ν. Κίνας, Ν. και Κ. Αμερικής και Αυστραλίας. Από τα είδη αυτά καλλιεργείται κυρίως το *O. sativa L.* και σποραδικά σε ορισμένες περιοχές της Δ. Αφρικής το *O. glaberrima Steud.*

Στο είδος *O. sativa* διακρίνονται 3 ποικιλίες, εκ των οποίων είναι οι εξής i. ποικ. *indica*, ii. *japonica* και iii. *javanica*, με βάση οικογεωγραφικά κριτήρια. Έτσι λοιπόν, η ποικιλία *indica* είναι ιθαγενής των υγρών τροπικών και υποτροπικών περιοχών της Ασίας, η *japonica* των εύκρατων και υποτροπικών περιοχών και η *javanica*, ορισμένων περιοχών της Ινδονησίας.

Η μεν πρώτη, είναι κυρίως μακρόκαρπη. Ωστόσο, είναι πιθανή η παραγωγή καρπών μεσαίου ή μικρού μεγέθους. Εμφανίζει έντονη βλαστητική ανάπτυξη που την καθιστά περισσότερο ευαίσθητη στο πλάγιασμα και θεωρείται λιγότερο αποδοτική από την *japonica* υπό ευνοϊκές συνθήκες. Αντίθετα, είναι πιο ανθεκτική σε δυσμενείς συνθήκες και επομένως, καταλληλότερη για καλλιέργεια σε περιοχές οριακές από πλευράς περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως για παράδειγμα σε εδάφη χαμηλής γονιμότητας ή με σχετική έλλειψη νερού. Για αυτό λοιπόν, καλλιεργείται συνήθως στις τροπικές περιοχές, όπως είναι η Ινδία, η Ινδοκίνα, η Ν. Κίνα και οι Φιλιππίνες [96].

Η δε δεύτερη, χαρακτηρίζεται από μικρούς καρπούς και παρουσιάζει αντοχή στο πλάγιασμα σε αντίθεση με την *indica*, λόγω των βραχέων και ισχυρών στελεχών. Είναι περισσότερο παραγωγική και προσαρμόζεται σε εύκρατες περιοχές με δροσερό κλίμα και σχετικά μεγάλες φωτοπεριόδους. Έτσι, καλλιεργείται κυρίως στην Ιαπωνία, την Κορέα, τη Β. Κίνα, σε χώρες της Ευρώπης και στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α [96].

Εκτός από τις δύο ποικιλίες που αναφέρθηκαν, υπάρχουν και ομάδες που προκύπτουν από διασταυρώσεις μεταξύ αυτών και φέρουν χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των δύο βασικών ποικιλιών.

Πέραν των βοτανικών χαρακτηριστικών, οι ποικιλίες διαφοροποιούνται σε επιμέρους κατηγορίες, σύμφωνα και με άλλα κριτήρια, συμπεριλαμβανομένων μορφολογικών και τεχνολογικών παραμέτρων, όπως είναι το σχήμα και το μέγεθος του καρπού. Ενδεικτικά, με βάση την φυσιολογία τους, ανάλογα δηλαδή με την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, διακρίνονται σε πολύ πρώιμες, πρώιμες, μεσοπρώιμες και όψιμες ποικιλίες. Ενώ, με γνώμονα τις διάφορες οικολογικές συνθήκες στις οποίες ευνοείται η ανάπτυξη του φυτού, προκύπτει η διάκριση των ποικιλιών σε α) πεδινών περιοχών ή κατακλυζόμενες (lowland ή paddy rice) με έντονη επάρκεια νερού και μειωμένο ανταγωνισμό από ζιζάνια, β) ορεινών περιοχών ή μη κατακλυζόμενες (upland rice), εξαρτώμενες από τις εποχιακές βροχοπτώσεις και γ) επιπλέουσες και βαθένων υδάτων (floating και deepwater rice) με γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης σε εδάφη πλούσια σε νερό [96].

4.2 Προέλευση - Εξέλιξη

Επικρατεί η άποψη ότι και τα δύο καλλιεργούμενα είδη έχουν ένα κοινό πρόγονο, ο οποίος πιθανόν να είναι το είδος *O. perennis Moench*. Από τον κοινό πρόγονο φαίνεται ότι ξεκίνησε μια διακριτή εξελικτική πορεία από δύο κέντρα, την Ν. και ΝΑ. Ασία, στην περιοχή μεταξύ της Ν. Ινδίας και Ινδοκίνας, και την τροπική Αφρική, που τελικά κατέληξε στα αντίστοιχα καλλιεργούμενα είδη, το *O. sativa* το *O. glaberrima*.

Ο άμεσος πρόγονος της *O. sativa* εκτιμάται να είναι το ετήσιο άγριο είδος *O. nivara* της Κ. Ινδίας, ενώ και το πολυετές άγριο είδος *O. rufipogon* συμμετείχε με κάποιο τρόπο.

Η πρώτη καλλιέργεια του ρυζιού χρονολογείται γύρω στο 10.000 π.Χ. και εντοπίζεται στις υγρές περιοχές της τροπικής και υποτροπικής Ασίας, πιθανότητα στις Ινδίες, όπου υπήρχε αφθονία άγριων συγγενών ειδών με το ρύζι. Κατά το 5.000 π.Χ. είχαν ήδη αναπτυχθεί στην Κίνα συγκεκριμένες καλλιεργητικές τεχνικές που εν συνεχεία μεταδόθηκαν και νοτιότερα. Από τις

Ινδίες, το ρύζι διαδόθηκε στην Ιάβα γύρω στο 1.100 π.Χ. και αργότερα στην αρχαία Περσία και από εκεί στη Μεσοποταμία, το Τουρκεστάν και την Αίγυπτο. Από την Κίνα έγινε γνωστό στην Κορέα και κατά το 100 π.Χ. και στην Ιαπωνία. Από και έπειτα η διάδοση του ρυζιού στα διάφορα νησιά επιτεύχθηκε με πολύ βραδύ ρυθμό ενώ εκτιμάται πως συμπληρώθηκε γύρω στο 1.800 μ.Χ. Στη Ευρώπη κατέφθασε το ρύζι με τους στρατιώτες του Μέγα Αλέξανδρου, αλλά δεν καλλιεργήθηκε συστηματικά μέχρι περίπου το 700 μ.Χ. Στην Ιβηρική Χερσόνησο, μέσω των Μαυριτανών το 711 μ.Χ. και έπειτα πέρασε στην Λατινική Αμερική. Στη χώρα μας, η καλλιέργεια του αναπτύχθηκε μετά το Β' Παγκόσμιο πόλεμο, ενώ σήμερα όχι μόνο καλύπτει τις ανάγκες της εσωτερικής κατανάλωσης, αλλά επαρκεί και για εξαγωγή. Στις Η.Π.Α. παρότι το έφεραν μαζί τους οι άποικοι στις αρχές του 17^{ου} αιώνα, η πρώτη συστηματική καλλιέργεια του ρυζιού χρονολογείται το 1685 στη Ν. Καρολίνα [96].

4.3 Το ρύζι τρόφιμο για τον άνθρωπο

Το ρύζι καλλιεργείται αποκλειστικά για ανθρώπινη κατανάλωση. Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό FAO, στον κώδικα υπ' αριθμόν 198-1995 για το ρύζι [25] και την εθνική νομοθεσία στο Άρθρο 101 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π), ορίζεται ως το προϊόν που λαμβάνεται από την επεξεργασία των ώριμων καρπών του φυτού *O. sativa* [99]. Τόσο οι καρποί που παράγονται από αυτό, όσο και τα διάφορα ριζάλευρα συνιστούν βασικά προϊόντα με τα οποία διατρέφεται σχεδόν το μισό του παγκόσμιου πληθυσμού χάρη στις θρεπτικές του ιδιότητες, το χαμηλό κόστος παραγωγής και περαιτέρω της τελικής τιμής που διαμορφώνεται και με την οποία διατίθεται στην αγορά [95]. Για τους λαούς των αναπτυσσόμενων χωρών της Ασίας, το ρύζι μάλιστα συμβάλλει κατά 70% στο ποσό της ενέργειας που προσλαμβάνεται από τον ανθρώπινο οργανισμό μέσω των διάφορων τροφίμων. Ενώ, η παραγωγή και κατανάλωσή του δεν περιορίζεται μονάχα εκεί αλλά εκτείνεται έντονα και στις υπόλοιπες ηπείρους [95,97,98].



Σχήμα 3 : Οι χώρες ανά τον κόσμο, με την υψηλότερη παραγωγή ρυζιού (σε τόνους) που προορίζεται για επιφανειακή κατεργασία κατά το 2017 [120].

Ανάλογη σχεδόν εικόνα δίνουν τα στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από τους λαούς αυτών των χωρών για την κατανάλωση του αντίστοιχου τύπου ρυζιού [121].

Αναφορικά με την χημική σύσταση του ρυζιού, περιέχει σύνθετους υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, φυτικές ίνες και μια πληθώρα μακρο- και μικρο-στοιχείων, όπως κάλιο, φώσφορο, μαγνήσιο και σίδηρο, αντίστοιχα, απαραίτητων για την υγεία του ανθρώπου [95]. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες του ρυζιού είναι κυρίως γλουτελίνες, ενώ η περιεκτικότητα σε αυτές φαίνεται να εξαρτάται περισσότερο από το γονότυπο παρά από το περιβάλλον. Από θρεπτικής απόψεως και βιολογικής αξίας, υπερτερούν των πρωτεϊνών που περιέχονται στα δημητριακά, δεδομένου ότι η λυσίνη βρίσκεται σε ποσοστό 4% [96]. Οι υδατάνθρακες κυρίως περιλαμβάνουν άμυλο και τις ινώδεις ουσίες, απαρτίζονται οι κυτταρίνες και ημικυτταρίνες. Επισημαίνεται γενικά ότι ο καρπός του ρυζιού υπερτερεί σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο, και σε μικρότερο βαθμό σε λιποπεριεκτικότητα και ανόργανα άλατα από τους καρπούς των άλλων δημητριακών. Το ενεργειακό του περιεχόμενο σε γενικές γραμμές εκτιμάται στις 4,04 cal/g [96]. Όσον αφορά την τάξη των βιταμινών, συγκριτικά

με τα άλλα δημητριακά, το ρύζι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πυριδοξίνη (βιταμίνη B₆), νιασίνη (βιταμίνη B₃) και τοκοφερόλες (βιταμίνη E), υστερεί σε θειαμίνη (βιταμίνη B₁), ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B₂) και βιοτίνη (βιταμίνη H), ενώ δεν περιέχει χολίνη και προβιταμίνη A [96].

Πίνακας 3: Διατροφική αξία του λευκασμένου ρυζιού [96].

Διατροφική αξία (ανά 100g)	
Ενέργεια	1527 kJ ή 365 kcal
Πρωτεΐνες	7,3 g
Υδατάνθρακες	80 g
Εκ των οποίων σάκχαρα	0,12 g
Λιπαρά	0,66 g
Διαιτητικές ίνες	1,3 g

Επισημαίνεται ότι η κατεργασία του αποφλοιωμένου ρυζιού, λόγω της απομάκρυνσης τμημάτων του καρπού συνεπάγεται και απώλεια των βιταμινών του συμπλέγματος B, που υπάρχουν σε αυτά, σε ποσοστό των 60 έως 80%. Σε περιοχές όπου το ρύζι αποτελεί βασικό προϊόν διατροφής, η εν λόγω κατεργασία αποτελεί και αιτία για την εμφάνιση της σοβαρής ασθένειας beri-beri, λόγω έλλειψης βιταμινών. Για την πρόληψη της, ακολουθείται μια ειδική τεχνική που εφαρμόζεται πριν την αποπιτύρωση. Είναι γνωστή ως υδροθερμική κατεργασία (parboiling) και ουσιαστικά επιτρέπει την διάχυση ενός τμήματος των βιταμινών από τα πίτυρα προς το ενδοσπέρμιο [96].

4.4 Η επεξεργασία του ρυζιού και τα είδη που προκύπτουν

Το ρύζι διατίθεται στο εμπόριο ως αναποφλοϊωτο (paddy rice), αποφλοιωμένο (cared rice) και κατεργασμένο, που διακρίνεται σε κατεργασμένο είτε ως έχει είτε κατόπιν υδροθερμικής επεξεργασίας (parboiling) πριν την αποφλοϊωση και την περαιτέρω επεξεργασία του [25,99].

Με βάση λοιπόν την επεξεργασία του, το ρύζι διαχωρίζεται σε τρεις βασικούς τύπους, το καστανό ή ακατέργαστο, το λευκό και το υποκίτρινο, εκ των

οποίων τα δύο πρώτα είναι και αυτά που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη κατανάλωση. Η κύρια διαφορά μεταξύ του καστανού και λευκού τύπου, έγκειται στο στάδιο της στίλβωσης κατά την διαδικασία της επιφανειακής κατεργασίας του αναποφλοιώτου ρυζιού [100]. Στην περίπτωση όπου μονάχα το εξωτερικό περίβλημα του καρπού αφαιρείται, προκύπτει ο τύπος του καστανού, ακατέργαστου ρυζιού (brown, unpolished rice). Ενώ, εάν αφαιρεθούν και τα επόμενα στρώματα κάτω από το φλοιό, προκύπτει ο τύπος του λευκού (white, polished rice) [101]. Χαρακτηριστικά, αναφέρονται οι ποικιλίες *basmati* και *jasmine* που αποτελούν αρωματικούς τύπους ρυζιού και καλλιεργούνται στις περιοχές των ποταμών που πηγάζουν από τα Ιμαλάια μεταξύ Ινδίας και Πακιστάν και στα υψίπεδα της Ταϊλάνδης, αντίστοιχα [102], ενώ ποικιλίες ιταλικής προέλευσης, όπως οι καλλιέργειες *jaronica* φέρουν υψηλό υδατανθρακικό περιεχόμενο με αυξημένη ικανότητα απορρόφησης νερού, κατάλληλες στο σερβίρισμα για μερίδες ριζότο [103]. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι ποικιλίες με έγχρωμο πυρήνα στον καρπό, η χρήση των οποίων προτείνεται κυρίως σαν χρωστική ουσία ή διατροφικό συμπλήρωμα στο λευκό ρύζι [100]. Επίσης, τύποι ρυζιού με κηρώδες ενδοσπέρμιο συνιστούν μια ακόμη ιδιαίτερη ποικιλία. Το άμυλο αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από αμυλοπηκτίνη, συγκριτικά με τα υπόλοιπες ποικιλίες, στις οποίες απαντάται και αμυλόζη. Έχουν μαλακότερη, αδιαφανή υφή και εμφανίζουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα κατά το μαγείρεμα [25,96].

Αναλυτικότερα, η επεξεργασία του ρυζιού περιλαμβάνει κυρίως την υδροθερμική (parboiling) και την επιφανειακή κατεργασία (milling).

Η υδροθερμική προηγείται της επιφανειακής κατεργασίας και έχει ως σκοπό τη βελτίωση της αποδοτικότητας των φυσικών και περαιτέρω θρεπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος, καθώς περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Αρχικά, πραγματοποιείται διαβροχή του ρυζιού με νερό (soaking ή steeping) προκειμένου να αυξηθεί η υγρασία του μέχρι περίπου 30%.
2. Ακολουθεί θερμική κατεργασία του υγρού προϊόντος (heating) σε θερμούς υδρατμούς υπό πίεση ή όχι.
3. Τέλος, επιτυγχάνεται ξήρανση του προϊόντος σε επίπεδα υγρασίας ασφαλή για την επιφανειακή κατεργασία (~18%).

Έτσι, ζελατινοποιείται το άμυλο και ανακατανέμεται περισσότερο ομοιογενώς στον καρπό γεμίζοντας πόρους, σχισμές ή περιοχές με χαμηλότερη περιεκτικότητα, βελτιώνοντας σημαντικά φυσικές ιδιότητες του καρπού, όπως η σκληρότητα και η αντοχή στη θραύση. Επιπλέον, η ομαλότερη κατανομή των συστατικών στον καρπό επιτυγχάνεται και για την περίπτωση των υδατοδιαλυτών βιταμινών και των ανόργανων αλάτων [96].

Η επιφανειακή κατεργασία που υφίσταται το ρύζι πραγματοποιείται ανεξάρτητα από το εάν έχει προηγουμένως υποστεί υδροθερμική κατεργασία. Επιδιώκεται ουσιαστικά η απομάκρυνση των λεπυριδίων (αποφλοιώση) καθώς και του εμβρύου, του περικάρπιου και του εξώτατου στρώματος του ενδοσπερμίου, γνωστή και ως αποπιτύρωση. Συνοπτικά, περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Πραγματοποιείται καθαρισμός της πρώτης ύλης, όπου απομακρύνονται όλες οι ξένες ύλες, όπως τμήματα άχυρου, σπόροι ζιζανίων, τεμάχια εδάφους κλπ. Εν συνεχεία, οι καθαροί από προσμίξεις επενδεδυμένοι καρποί (cleaned paddy) προωθούνται στις επόμενες βαθμίδες.
2. Κατά την αποφλοιώση (shelling), αφαιρούνται και απομακρύνονται τα λεπυρίδια.
3. Το αποφλοιωμένο ρύζι που προέκυψε (brown rice), υφίσταται την διαδικασία της αποπιτύρωσης (bran removing) όπου αφαιρούνται και απομακρύνονται το περικάρπιο, τμήματα του ενδοσπερμίου και το έμβryo. Έτσι, παράγονται οι αποπιτυρωμένοι καρποί (milled rice).
4. Ακολουθεί το στάδιο της στίλβωσης (polishing) στο οποίο απομακρύνονται τα υπολείμματα της αποπιτύρωσης από την επιφάνεια των καρπών και υφίστανται ένα είδος «γυαλίσματος».
5. Η κατεργασία ολοκληρώνεται με το στάδιο του διαχωρισμού (grading), όπου οι στιλβωμένοι καρποί ανάλογα με το μέγεθος τους διακρίνονται σε ακέραιους (head rice) και σπασμένους διαφόρων μεγεθών [96].

Ως προς τη χρήση, οι ακέραιοι επεξεργασμένοι καρποί καταναλίσκονται μαγειρευμένοι με διάφορους τρόπους. Η βιομηχανία των τροφίμων, επιπλέον τους αξιοποιεί ως συστατικά για την παρασκευή κόκκων, νιφάδων ή άλλων

επεξεργασμένων τροφών, όπως και τους σπασμένους καρπούς. Το αλεύρι του ρυζιού χρησιμοποιείται ευρέως στην ζαχαροπλαστική. Ενώ, τα πίτυρα, ως υποπροϊόντα της επεξεργασίας του ρυζιού συνιστούν καλής ποιότητας ζωοτροφή [96].

4.5 Το περιεχόμενο του αρσενικού στο ρύζι και τα προϊόντά του

4.5.1 Παράγοντες που το επηρεάζουν

Η επιμόλυνση του ρυζιού με το αρσενικό συνδέεται με παραμέτρους, όπως η μορφολογία του εδάφους που καλλιεργείται το φυτό, το νερό της άρδευσης, η χώρα προέλευσης, με την έννοια της γεωγραφικής θέσης και της εκάστοτε ποικιλίας, καθώς και η ανάλογη επέμβαση του ανθρώπινου παράγοντα στο περιβάλλον. Ενώ, ενδέχεται να πηγάζει και από τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας του [100].

➤ Διαδικασίες επεξεργασίας και χειρισμού του τροφίμου

Τα υψηλότερα επίπεδα του αρσενικού προσδιορίζονται στο αναποφλοιώτο καστανό ρύζι, σε αντίθεση με το λευκό που φέρει τα χαμηλότερα, επιδεικνύοντας το γεγονός ότι το αρσενικό συσσωρεύεται στα πίτυρα και το εξωτερικό περίβλημα που αφαιρούνται κατά τις διαδικασίες επεξεργασίας του [100].

Τα επίπεδα της συγκέντρωσης σε ολικό αρσενικό στους διάφορους τύπους ρυζιού του εμπορίου ανά τον κόσμο ποικίλουν και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών. Ποσοστό περίπου 50% κατά μέσο όρο του ολικού, αντιστοιχεί στο ανόργανο αρσενικό, ενώ η τρισθενής μορφή του είναι και αυτή που επικρατεί συνηθέστερα. Συμπερασματικά, το ρύζι έναντι των υπόλοιπων προϊόντων φυτικής προέλευσης, μαζί με το νερό συνιστούν τα είδη των τροφών που συμβάλλουν περισσότερο στο περιεχόμενο σε ανόργανο αρσενικό [100].

Επισημαίνεται ακόμη, ότι και οι διάφορες τεχνικές προ-κατεργασίας και χειρισμού του τροφίμου μέχρι τη στιγμή που θα καταναλωθεί, ασκούν επίδραση στο περιεχόμενο του σε αρσενικό. Ειδικότερα, από το νερό που χρησιμοποιείται για το ζεμάτισμα ή το βράσιμο και περιέχει αρσενικό, ενδέχεται να διαπεράσουν μικροποσότητες του και στο τρόφιμο. Τα επίπεδα ωστόσο των συγκεντρώσεων, καθορίζονται σημαντικά από την χρονική

διάρκεια και άλλες παραμέτρους της διεργασίας. Συνεπώς, τα επεξεργασμένα τρόφιμα συνηθέστερα εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις απ' ότι τα νωπά [49]. Ενώ, υφίσταται και η άποψη ότι η χρήση ατμού σε κάποιους τύπους τροφίμων δείχνει να μειώνει τα επίπεδα του αρσενικού, εξαλείφοντας ορισμένες από τις μορφές του [49].

➤ Γεωγραφική περιοχή και ποικιλία του φυτού

Πίνακας 4: Οι συγκεντρώσεις σε ολικό αρσενικό (μg/g) και τα ποσοστά (%) αναλογίας ανόργανου προς το ολικό αρσενικό σε διάφορες ποικιλίες ρυζιού που κυκλοφορούν στην αγορά με βάση τη χώρα προέλευσης [100].

Προέλευση/Τύπος Ρυζιού	Λευκασμένο ή Λευκό	Καστανό	Κίτρινο
Αυστραλία	0,106 - 0,188	0,080	
Μπανγκλαντές	0,040 - 0,75 (24 - 60%)	0,143 (38 - 57%)	
Βραζιλία	0,109 - 0,376 (53%)	0,271 - 0,428 (58%)	
Χιλή	0,143	0,080 - 1,18 (55 - 87%)	
Κίνα	0,019 - 0,710 (47 - 86%)		
Αίγυπτος	0,10 - 0,58		
Γαλλία	0,090 - 0,56		
Ελλάδα	0,110 - 0,270 (28 - 91%)	0,189 (28%)	0,201 (66%)
Ινδία	0,030 - 0,226 (36 - 98%)	0,060 - 0,089 (61%)	0,077 - 0,228
Ιταλία	0,078 - 0,33 (56 - 78%)	0,19 (53%)	
Κορέα	0,015 - 0,150 (36 - 88%)		
Ιαπωνία	0,070 - 0,42 (59 - 100%)	0,080 - 0,540 (64 - 100%)	
Μαλαισία	0,088 - 0,123 (66 - 71%)		
Πακιστάν	0,061 - 0,187 (38 - 98%)		0,141
Ισπανία	0,050 - 0,82 (22 - 84%)	0,113 - 0,360 (53 - 90%)	
Ταϊβάν	0,19 - 0,76 (58 - 67%)	0,070 - 0,12	
Ταυλάνδη	0,010 - 0,39 (42 - 96%)	0,030 - 0,343 (40 - 84%)	
Η.Π.Α	0,030 - 0,66 (10 - 100%)	0,030 - 0,71 (22 - 94%)	0,145 - 0,464
Βιετνάμ	0,093 - 0,204 (51 - 78%)	0,25 - 0,344 (67 - 78%)	
Βέλγιο	0,198 (24%)	0,178 (24%)	
Σουηδία	0,13 - 0,26 (58-77%)	0,31 - 0,35 (54%)	

Προέλευση/Τύπος Ρυζιού	Μπασμάτι	Επεξεργασμένο με βραστό νερό
Ελλάδα		0,093 - 0,204 (51 - 78%)
Ινδία		
Λευκό	0,042 - 0,204 (34 - 84%)	
Καστανό	0,040 - 0,157 (36 - 67%)	
Ιταλία	0,13 - 0,26 (58-77%)	0,10 - 0,28 (15-91%)
Πακιστάν	0,049 (61%)	
Βραζιλία		
Λευκό		0,226 - 0,316 (64%)
Καστανό		0,108 - 0,367 (63%)

➤ Μορφολογία του εδάφους και καλλιεργητικές πρακτικές

Συγκριτικά με τα υπόλοιπα δημητριακά, όπως το κριθάρι και το σιτάρι, το ρύζι συσσωρεύει περισσότερο αρσενικό και βαρέα μέταλλα γενικότερα, στους βλαστούς και τους καρπούς [104,105,106]. Αυτό συμβαίνει διότι όταν το φυτό αναπτύσσεται σε αναερόβια, πλούσια σε υγρασία, εδάφη προσλαμβάνει τα στοιχεία ευκολότερα μέσω του νερού άρδευσης απ' ό,τι τα άλλα σπαρτά [104,107].

4.5.2 Αυθεντικότητα των τροφίμων

Με αφορμή τους παράγοντες που περιγράφηκαν παραπάνω, κρίνεται σημαντική η αναφορά στον προσδιορισμό της αυθεντικότητας των τροφίμων.

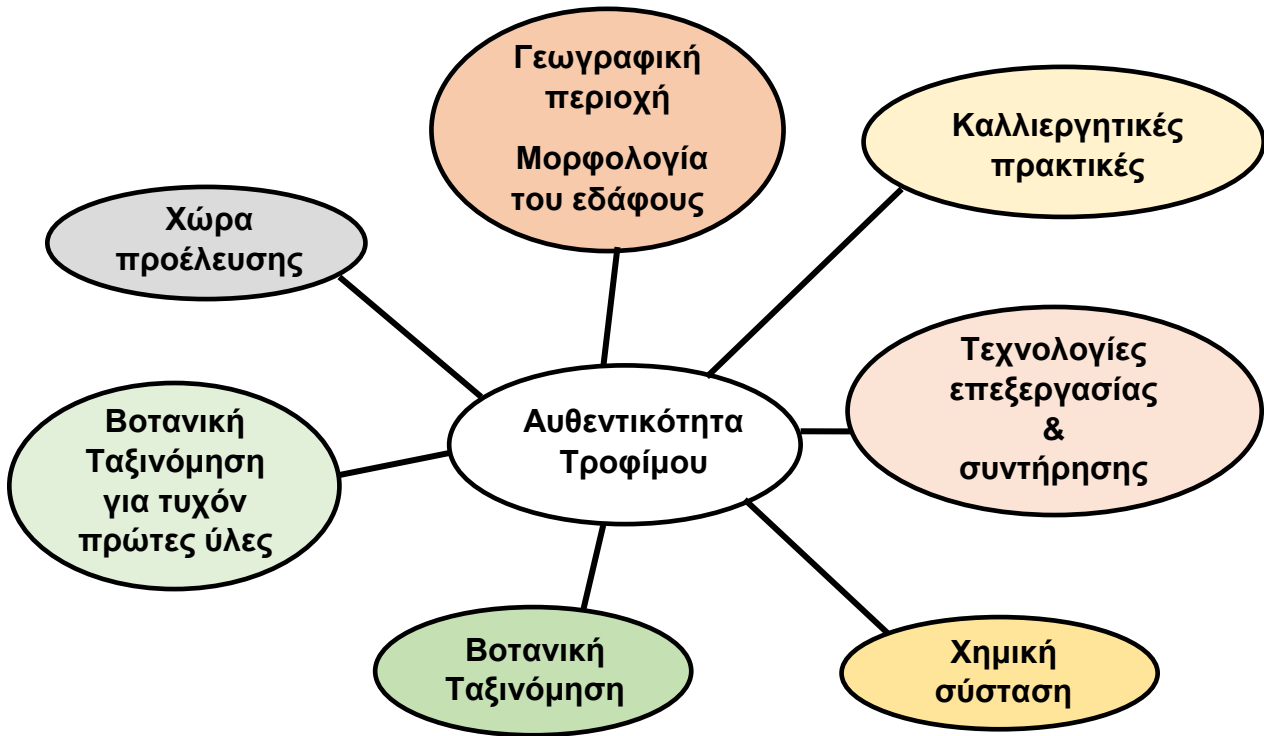
Έπειτα από τα διατροφικά σκάνδαλα που ξέσπασαν στην παγκόσμια αλυσίδα εφοδιασμού τα τελευταία χρόνια, με κυριότερα αυτό της επιμόλυνσης γάλακτος με μελαμίνη στην Κίνα και εμπορίας κρέατος αλόγου στην Ευρώπη, αποτελεί ζωτικό στοιχείο στα πλαίσια του Ελέγχου Ποιότητας. Η αυθεντικότητα συνεπώς που ορίζεται στα αγγλικά ως authenticity, συνδέεται άρρηκτα με την ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων.

Τα προϊόντα που φτάνουν στα χέρια των καταναλωτών θα πρέπει να μην ελοχεύουν κίνδυνο για την υγεία τους καθώς και να ανταποκρίνονται στις ιδιότητές τους (σύσταση, χώρα προέλευσης, χρήση κλπ), χωρίς ουδεμία παραπλάνηση, γεγονός που διασφαλίζεται με τη συμμόρφωση στον Κανονισμό ΕΚ. αριθμ. 1169/2011 για την επισήμανση των τροφίμων, γνωστό και ως "food labelling". Επιπροσθέτως, στον προσδιορισμό της αυθεντικότητας των τροφίμων συμβάλλουν και τα συστήματα ιχνηλασιμότητας (traceability) που θα πρέπει να εφαρμόζονται καθόλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας [129].

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα της σύγχρονης αγοράς, ο προσδιορισμός της αυθεντικότητας κρίνεται πρόκληση για τον πεδίο της ενόργανης ανάλυσης στη βιομηχανία των τροφίμων με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερες τεχνικές για αυτό το σκοπό. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων σχετίζονται με την αξιολόγηση συγκεκριμένων παραμέτρων, οδηγώντας στην

ταυτοποίηση προϊόντος και περαιτέρω στον προσδιορισμό της γνησιότητάς του, εφόσον πληροί καθορισμένα κριτήρια ανάλογα με τον τύπο του.

Σχήμα 4: Οι σημαντικότεροι παράμετροι για τον προσδιορισμό της αυθεντικότητας ενός αγροτικού προϊόντος [130].



4.6 Νομοθεσία για το ανόργανο αρσενικό στο ρύζι και τα προϊόντα του

Όσον αφορά την ισχύουσα νομοθεσία, στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό ΕΚ. 2015/1006, που εξέδωσε η Ε.Ε., με τροποποίηση του ΕΚ. 1881/2006, επισημαίνονται τα μέγιστα επίπεδα (Maximum Levels, ML's), για το ανόργανο αρσενικό στο ρύζι και τα προϊόντα του. Ειδικότερα, τίθενται όρια ανά κατηγορία ρυζιού, όπως αυτά ορίζονται στον "Codex Standard 198-1995" [25]. Πιο συγκεκριμένα, 200 µg/kg για μη μερικώς βρασμένο αλεσμένο ρύζι, είτε είναι ακατέργαστο είτε λευκό, 250 µg/kg για μερικώς βρασμένο και αποφλοιωμένο ρύζι, 300 µg/kg για προϊόντα με βάση το ρύζι, τύπου γκοφρέτας, βάφλας, κράκερ και κέικ. Ενώ, η συγκέντρωση του ανόργανου αρσενικού σε ρύζι το οποίο περαιτέρω χρησιμοποιείται στην παραγωγή βρεφικών και παιδικών τροφών δεν πρέπει να ξεπερνά τα 100 µg/kg [26]. Στην επιστημονική γνώμη της Ε.Ε, καταναλωτές υψηλού βαθμού πρόσληψης ρυζιού στην Ευρώπη, όπως ορισμένες εθνοτικές ομάδες και παιδιά ηλικίας κάτω των τριών ετών, χαρακτηρίζονται ως οι πλέον διατροφικά εκτεθειμένοι σε ανόργανο αρσενικό. Η διατροφική έκθεση σε ανόργανο αρσενικό για παιδιά κάτω των τριών ετών, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε τρόφιμα που βασίζονται στο ρύζι, υπολογίζεται ότι είναι, σε γενικές γραμμές περίπου 2 έως 3 φορές όσο εκείνη των ενηλίκων [26].

Στα πλαίσια εκτίμησης επικινδυνότητας, τα βρέφη που πάσχουν από την ασθένεια της κοιλιοκάκης, επιβάλλεται να καταναλώνουν τρόφιμα χωρίς γλουτένη, καταφεύγοντας συχνά σε μεγάλο βαθμό στο ρύζι και τα προϊόντα του. Για τη συγκεκριμένη λοιπόν, μερίδα των ανθρώπων που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη, απαιτείται μεγάλη προσοχή και προτείνεται η κατανάλωση προϊόντων σιταριού, βρώμης και κριθαριού ως υποκατάστατα αυτών με βάση το ρύζι, προκειμένου να προσλαμβάνεται η όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα αρσενικού [110].

Στα πρότυπα για επιμολυντές σε τρόφιμα, του αντίστοιχου οργανισμού της Κίνας, το μέγιστο όριο για το ανόργανο αρσενικό στο ρύζι ίσους και αυτό με 200 µg/kg [108].

Πίνακας 5: Νομοθετικά όρια για το inAs στο ρύζι και τα προϊόντά του [26].

Τρόφιμο	Μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης inAs (μg/kg)
Λευκασμένο ρύζι μη επεξεργασμένο με βραστό νερό (στιλβωμένο ή λευκό)	200
Επεξεργασμένο με βραστό νερό και αποφλοιωμένο ρύζι	250
Ρύζι για παραγωγή βρεφικών και παιδικών τροφών	100
Γαλέτες, γκοφρέτες, κράκερ & μπισκότα ρυζιού	300

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

5.1 Γενικά

Ο στοιχειακός προσδιορισμός περιλαμβάνει δύο κύριες προσεγγίσεις. Η πρώτη αφορά των διαχωρισμό των διαφορετικών χημικών μορφών ορισμένου στοιχείου με τεχνικές χρωματογραφίας, όπως είναι η αέρια (Gas Chromatography, GC) ή υγρή (Liquid Chromatography, LC), συζευγμένες με τεχνικές ανίχνευσης, σαν την φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS), την φασματομετρία ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα Αργού (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP - MS), την φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrometry, AAS) ή την φασματομετρία ατομικού φθορισμού (Atomic Fluorescence Spectrometry, AFS). Η δεύτερη προσέγγιση επικεντρώνεται στον διαχωρισμό των επιμέρους ειδών του στοιχείου έπειτα από εκλεκτική εκχύλιση τους που βασίζεται ουσιαστικά στις διαφορετικές χημικές ιδιότητες που εμφανίζουν ως ενώσεις. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται κοινώς τεχνικές όπως η φασματοσκοπία ηλεκτροθερμικής ατομικής απορρόφησης (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, ETAAS), η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με παραγωγή υδριδίων (Hydride Generation - Atomic Absorption Spectrometry, HG - AAS), η φασματομετρία ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα Αργού (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP - MS), καθώς και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με τη φασματομετρία ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (High Performance Liquid Chromatography/Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, HPLC/ICP - MS) [55,67]. Εξίσου ανταγωνιστικές είναι και η φασματοσκοπία οπτικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy, ICP - OES), η φασματομετρία ατομικής εκπομπής σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα Αργού (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy, ICP - AES), η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης ιονισμού φλόγας (Flame - Atomic Absorption Spectrometry, Flame - AAS) και η φασματομετρία ατομικής

απορρόφησης με φούρνο γραφίτη (Graphite Furnace - Atomic Absorption Spectrometry, GF - AAS). Ωστόσο, η ICP-MS τεχνική υπερτερεί έναντι των υπολοίπων σε μια πληθώρα από παραμέτρους [119].

Πίνακας 6: Συγκριτική παρουσίαση τεχνικών φασματομετρίας [119].

	ICP - MS	ICP - OES	Flame AAS	GF – AAS
Όρια ανίχνευσης	Άριστα για την πλειοψηφία των στοιχείων	Πολύ καλά για την πλειοψηφία των στοιχείων	Πολύ καλά για ορισμένα στοιχεία	Άριστα για ορισμένα στοιχεία
Χρόνος διακίνησης δείγματος	Όλα τα στοιχεία/2-6 λεπτά	5 - 30 στοιχεία/λεπτό	Στοιχείο/15''	Στοιχείο/4'
Εύρος γραμμικής περιοχής	$10^5 - 10^8$ (με εύρος επέκτασης)	$10^4 - 10^8$	10^3	10^2
Ισότοπα	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Μέγιστη συγκέντρωση διαλυμένων στερεών	0,1 – 0,4	1 - 30	0,5 – 3	>30
Αριθμός στοιχείων	>75	>75	>68	>50
Ημι-ποσοτική ανάλυση	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
Ισοτοπική ανάλυση	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
Ανάπτυξη μεθόδου	Απαιτητική	Απαιτητική	Εύκολη	Απαιτητική
Εύφλεκτα αέρια	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι
Κόστος	Πολύ υψηλό	Υψηλό	Χαμηλό	Μέτριο/Υψηλό

5.2 Η φασματομετρία ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP - MS)

5.2.1 Εισαγωγή

Οι ερευνητές R.S. Houk, A.L. Gray και οι λοιποί συνεργάτες τους ήταν και οι πρώτοι που εισήγαγαν την ICP-MS τεχνική στον κλάδο της αναλυτικής χημείας. Στην αγορά έκανε την εμφάνισή της το 1983, ενώ σήμερα έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών. Εξαιρετικής χρησιμότητας εργαλείο αποτελεί για την βιομηχανία των τροφίμων και μάλιστα για τον έλεγχο ποιότητας καθότι είναι δυνατή η ανίχνευση και ο προσδιορισμός βαρέων μετάλλων, επικίνδυνων για την υγεία

του ανθρώπου, που απαντώνται στις διάφορες τροφές ακόμα και σε ιχνοποσότητες [115,116]. Αναπτύχθηκε ως μια από τις σπουδαιότερες τεχνικές πολυστοιχειακής ανάλυσης, λόγω των χαμηλών ορίων ανίχνευσης για τα περισσότερα στοιχεία, του υψηλού βαθμού εκλεκτικότητας και της σχετικά καλής επαναληψιμότητας και ακρίβειας [115,116]. Καλύπτει λοιπόν, την πλειοψηφία των στοιχείων του περιοδικού πίνακα. Διαθέτει εξαιρετική ταχύτητα καθώς εμφανίζει και την μεγαλύτερη δυναμική περιοχή κατά 8 - 9 τάξεις μεγέθους. Έχει πληθώρα εφαρμογών καθότι δεν υφίστανται περιορισμοί σχετικά με τον τύπο του δείγματος που αναλύεται. Χάρη στις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται στην πηγή ιονισμού, παρατηρούνται ελάχιστες παρεμποδίσεις από την μήτρα που εξετάζεται. Επιπλέον, μέσω της τεχνικής είναι δυνατή η ανάκτηση πληροφορίας σχετικά με τις ισοτοπικές μορφές των στοιχείων. Καθώς εμφανίζουν ίδιο ατομικό αριθμό (p^+) αλλά διαφορετικές ατομικές μάζες ($p^+ + n$), λαμβάνεται και διαφορετικό σήμα από τον ανιχνευτή [111,112]. Τα φάσματα που παράγονται είναι αξιοσημείωτα απλά συγκρινόμενα με τα συμβατικά οπτικά φάσματα ICP, επειδή αποτελούνται από απλές σειρές κορυφών των ισοτόπων κάθε στοιχείου που υπάρχει στο δείγμα. Χρησιμοποιούνται τόσο για την ποιοτική ταυτοποίηση, όσο για τον ημι- και ποσοτικό προσδιορισμό των στοιχείων του δείγματος [116].



Εικόνα 2: Κάλυψη στοιχείων του περιοδικού πίνακα από την ICP-MS τεχνική [118].

5.2.2 Αρχή λειτουργίας του ICP - MS

Ο προσδιορισμός του εκάστοτε στοιχείου με τη συζευγμένη τεχνική ICP-MS βασίζεται στην διάσπαση αρχικά, των μορίων σε άτομα, ενώ έπεται ο ιοντισμός τους, παράγοντας δέσμη μονο-φορτισμένων θετικών ιόντων. Ο διαχωρισμός τους εν συνεχεία, επιτυγχάνεται με κριτήριο τον λόγο m/z , ενώ η απαρίθμησή τους γίνεται με κατάλληλο μεταλλάκτη, παρέχοντας το ανάλογο σήμα [111].

Το αρχικό στάδιο της ανάλυσης είναι η εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα με ροή αργού, το οποίο εν συνεχεία δημιουργεί και το πλάσμα. Ανάλογα με τον τύπο, γίνεται χρήση και της ανάλογης μεθόδου, με σκοπό την μετατροπή των υγρών δειγμάτων σε μορφή αερολύματος. Στις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανήκουν η πνευματική και υπερηχητική εκνέφωση και η ηλεκτροθερμική εξαέρωση. Ενώ, τελευταία υψηλής αναγνωρισιμότητας καθίσταται και η θερμική αποσύνθεση με σπινθήρα, η αποσύνθεση με λέιζερ ή εκκένωση λάμπης για τα στερεά δείγματα που απαιτούν ωστόσο όργανα μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας. Το σύστημα διαχειρίζεται με τέτοιο τρόπο το αερόλυμα στο θάλαμο του ψεκασμού (Spray chamber), προκειμένου να μειώσει το μέγεθος των σταγονιδίων κατά το επιθυμητό στα 5 μm και

συνηθέστερα στα 10 μm. Ακολουθεί η προώθηση του στο πλάσμα και τα επόμενα στάδια [112].

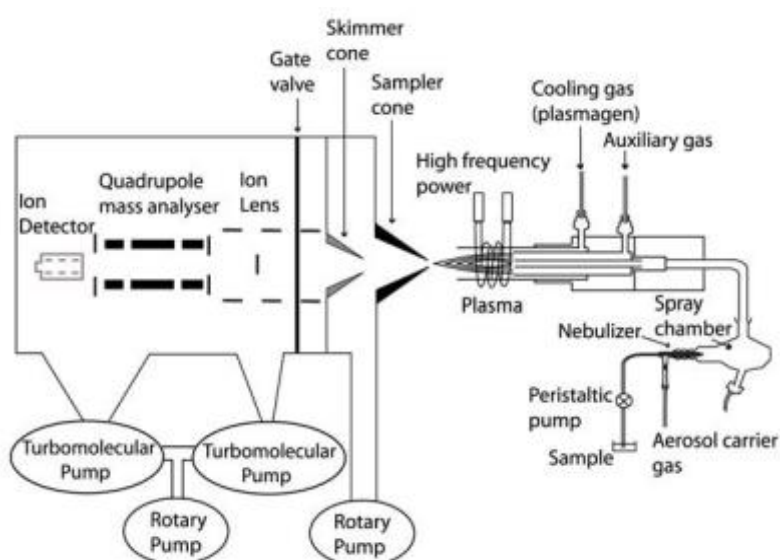
Έπεται η ατομοποίηση και ο ιοντισμός των στοιχείων που πραγματοποιούνται στην πηγή ή πλάσμα αργού (ICP) μέσω των πολύ υψηλών θερμοκρασιών της τάξεως των 6000 - 10.000 K που εφαρμόζονται, η οποία καλείται και πυρσός. Απαρτίζεται από τρεις ομόκεντρους σωλήνες χαλαζία, ένα ηλεκτρομαγνητικό πηνίο που τροφοδοτείται από γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων και επιπλέον βοηθητικές παροχές αερίων. Η έναρξη του ιοντισμού γίνεται με έναν σπινθήρα. Μόλις το αερόλυμα φτάσει στο πηνίο έχει αποσυντεθεί πλήρως. Με τη φλόγα, τα στοιχεία του μετατρέπονται σε αέρια άτομα, και εν συνεχεία αυτά σε θετικά ιόντα κατά το τέλος του πλάσματος. Ο ηλεκτρικός σπινθήρας που εφαρμόζεται για μικρό χρονικό διάστημα είναι και αυτός που εισάγει τα ηλεκτρόνια στο αέριο ρεύμα τα οποία λόγω του μεταβαλλόμενου μαγνητικού πεδίου από το επαγωγικό πηνίο, διαχέονται κατ' επιτάχυνση προς δακτυλιοειδείς διαδρομές, προκαλώντας συγκρούσεις με τα άτομα του αργού και κατά περίπτωση απελευθέρωση ενός από τα ηλεκτρόνια τους [112,116].

Τα ιόντα μέσω δύο κώνων, της δειγματοληψίας και του αποκορυφωτή, (sample and skimmer cone), όπου παρεμβάλλεται κενό μέσω αντλιών, λόγω διαφοράς πίεσης που υφίσταται από και προς το τμήμα του συστήματος που μεταβιβάζονται, αφού συγκεντρωθούν στους ιοντικούς φακούς, τους διαπερνούν και φέρονται στο φασματόμετρο μάζας. Συμπερασματικά, το σημείο διασύνδεσης του πυρσού ICP και του MS αποτελεί κρίσιμο τμήμα του οργάνου. Πραγματοποιείται αρχικά μια ταχεία διαστολή του αερίου, προκαλώντας την ψύξη του, ενώ ένα κλάσμα του αερίου που έχει ψυχθεί, διατηρείται σε θάλαμο πίεσης ίδια με αυτή του φασματόμετρου μαζών [116]. Επισημαίνεται, ο ρόλος των στομιών που φέρουν οι κώνοι καθότι είναι και αυτά που περιορίζουν την προσέλευση των διαλυμένων στερεών του δείγματος που συνεχίζουν στην πορεία του συστήματος. Για την καλύτερη επίδοση και σταθερότητα του οργάνου, προτείνεται το ολικό περιεχόμενο της μήτρας σε διαλυμένα στερεά (Total Dissolved Solids, TDS) να μην ξεπερνά το 0,2%, καθώς επέρχεται το φράξιμο των κώνων, μειώνοντας σημαντικά την ευαισθησία του οργάνου και την ικανότητα ανίχνευσης [111,112].

Οι ιοντικοί φακοί εν συνεχεία, εστιάζουν την δέσμη των ιόντων και επιτυγχάνουν την ευθυγράμμισή της. Με ένα αρνητικό δυναμικό, τα θετικά ιόντα

διαχωρίζονται από τα ηλεκτρόνια, ενώ τα φωτόνια και τα ουδέτερα σωματίδια απομακρύνονται [112,115,116].

Έπειτα, στο MS, ο διαχωρισμός των θετικών ιόντων γίνεται με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Συνεπώς, μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένο m/z φθάνουν στο μεταλλάκτη. Ο πιο κοινός αναλυτής μάζας είναι το τετράπολο με χαρακτηριστικό την ταυτόχρονη εφαρμογή συνεχών και υψίσυχνων τάσεων στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και ανιχνευτής, ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής, που επιτυγχάνει ουσιαστικά την μετατροπή των θετικών ιόντων που παραλαμβάνονται από το τετράπολο σε ηλεκτρικό σήμα (e^-) και περαιτέρω την ενίσχυσή του με σκοπό την ανάκτηση ημι-/ποσοτικής πληροφορίας [111,112].

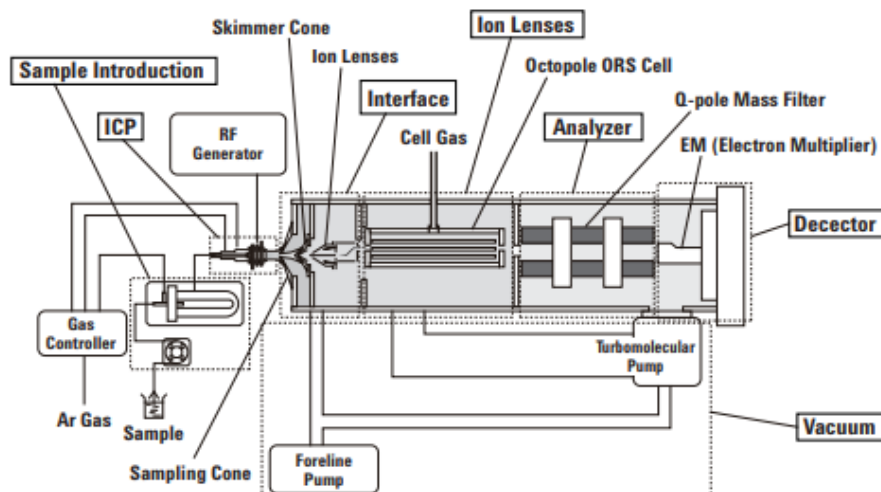


Εικόνα 3: Τυπική απεικόνιση ICP-MS οργάνου με τετραπολικό αναλυτή μάζας [119].

5.2.3 Κυψελίδα σύγκρουσης - αντίδρασης

Η τεχνολογία κυψελίδας σύγκρουσης ή αντίδρασης (Collision-Reaction Cell, CRC technology) αποτελεί μία επιπλέον προσέγγιση που καθιστά εφικτή τη σχεδόν πλήρη εξουδετέρωση των φασματικών παρεμποδίσεων. Οι κυρίαρχοι μηχανισμοί άρσης των παρεμποδίσεων είναι οι θραυσματοποιήσεις που προκαλούνται από τις συγκρούσεις μεταξύ ιόντων και μορίων ή/και η διαφοροποίησή τους σύμφωνα με κάποια τιμή, ορισμένη ως κατώφλι, για την κινητική τους ενέργεια (Kinetic Energy Discrimination, KED), κυρίως όσων δρουν παρεμποδιστικά και οι χημικές αντιδράσεις [4,114]. Κατ' ουσία, γίνεται

χρήση κατά περίπτωση είτε αδρανών, όπως είναι το ήλιο, είτε δραστικών αερίων συγκρούσεων-αντιδράσεων, όπως το οξυγόνο, το υδρογόνο και η αμμωνία, που διοχετεύονται σε κυψελίδα πολλαπλών πόλων, συνηθέστερα οκταπολική (Octapole Reaction System, ORS) που επιτρέπει να διαπεράσει η δέσμη των ιόντων του αναλύτη, απορρίπτοντας τα πολυατομικά ιόντα. Λόγω της ισχυρότερης ενεργειακά σύγκρουσης στην οποία υποβάλλονται τα πολυατομικά ιόντα, χάνουν ενέργεια και έτσι δεν καταφέρνουν να συνεχίσουν την πορεία τους προς τον αναλυτή μάζας ή αντιδρούν με το δραστικό αέριο, σχηματίζοντας μορφές με διαφορετικό λόγο m/z . Συνίσταται και η πολλή γρήγορη εναλλαγή αερίων ήλιου/υδρογόνου ή η χρήση δεύτερου ελεγκτή αερίου, ως πιο αυτοματοποιημένες τεχνικές. Συμπερασματικά, η κυψελίδα λειτουργεί ως φίλτρο των ιόντων προς ανάλυση που παρεμβάλλεται μεταξύ των ιοντικών φακών και του τετράπολου. Για τον πολυ- και στοιχειακό προσδιορισμό, η CRC τεχνολογία αποβαίνει εξαιρετικής σημασίας, καθώς συνέβαλλε σημαντικά στην εξέλιξη της σύγχρονης ICP-Q-MS τεχνικής (Inductively Coupled Plasma-Quadrupole-based Mass analyzer System), με τετραπολικό αναλυτή μάζας, υψηλής ταχύτητας σάρωσης [111,113,114,115].



Εικόνα 4: Απεικόνιση ICP-MS οργάνου συμπεριλαμβανομένης οκταπολικής κυψελίδας σύγκρουσης-αντίδρασης [122].

5.2.4 Μελέτη των παρεμποδίσεων

Οι φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις προκύπτουν λόγω των πολυατομικών και ισοβαρικών ιόντων, από οξειδία και υδροξείδια, καθώς και από διφορισμένα ιόντα, έχοντας τον ίδιο λόγο m/z^+ (μάζα προς φορτίο) των στοιχείων που προσδιορίζονται στην εκάστοτε μήτρα του δείγματος, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διάφορες επικαλύψεις μεταξύ τους στο φάσμα που παράγεται [4,116,117].

Τα πολυατομικά ιόντα σχηματίζονται κυρίως από την σύνδεση του αργούπου προέρχεται από το πλάσμα, με άλλα βασικά στοιχεία που περιέχονται στη μήτρα του δείγματος ή στην ατμόσφαιρα, όπως το ασβέστιο, το νάτριο, το υδρογόνο, το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο και τον άνθρακα με σχετικά χαμηλό λόγο m/z^+ και παρεμπόδιση κατά κύριο λόγο με στοιχεία με τιμή m/z^+ μικρότερη του 100 [113]. Για παράδειγμα, κατά τον προσδιορισμό του αρσενικού σε δείγματα πλούσια σε χλωριούχα, οι παρεμποδίσεις οφείλονται στη σύνδεση τους με το αργό, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ [4].

Ισοβαρικά σωματίδια ορίζονται δύο στοιχεία με ισότοπα, που έχουν ουσιαστικά την ίδια μάζα. Συνήθως ισοβαρικές παρεμποδίσεις παρουσιάζονται στα ισότοπα μεγαλύτερης φυσικής αφθονίας (natural abundance) και επομένως στην πιο ευαίσθητη κορυφή. Με άλλα λόγια, συγκεκριμένη έντονη κορυφή κάποιου στοιχείου επικαλύπτει την αντίστοιχη του πιο άφθονου ισότοπου άλλου στοιχείου, καθιστώντας αναγκαία τη χρήση της κορυφής του αμέσως λιγότερο άφθονου ισότοπου. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του πιο άφθονου ισότοπου του νικελίου, $^{58}\text{Ni}^+$ που παρεμποδίζεται από την ισοβαρική επικάλυψη του $^{58}\text{Fe}^+$. Διόρθωση επιτυγχάνεται με μέτρηση της κορυφής του $^{56}\text{Fe}^+$. Συνεπώς, οι ισοβαρικές παρεμποδίσεις αποβαίνουν προβλέψιμες από τους πίνακες φυσικής αφθονίας των ισότοπων και έτσι μπορούν να πραγματοποιηθούν διορθώσεις με χρήση κατάλληλου λογισμικού [116].

Πίνακας 7: Κοινές ισοβαρικές παρεμποδίσεις [118].

Στοιχείο	Ισότοπο	Ιόν παρεμπόδισης
Ασβέστιο	^{40}Ca	$^{40}\text{Ar}^+$
Βανάδιο	^{51}V	$^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}^+$
Χρώμιο	^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$
Σίδηρος	^{56}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$
Αρσενικό	^{75}As	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$
Σελήνιο	^{78}Se ^{80}Se	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$ $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$

Ο σχηματισμός των ιόντων MO^+ και MOH^+ , όπου το M αντιπροσωπεύει τα οξειδία και υδροξειδία του αναλύτη και των συστατικών της μήτρας του δείγματος, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις διάφορες πειραματικές μεταβλητές, οι οποίες μπορούν να ρυθμιστούν προκειμένου να εξουδετερωθεί το πρόβλημα των επικαλύψεων από κορυφές αυτών των χημικών σωματιδίων [116].

Οι επιδράσεις και αστάθειες των συστατικών της μήτρας καθώς και τυχόν ολισθήσεις του οργάνου, γνωστές και ως φυσικές παρεμποδίσεις, μπορούν γενικά να ελαχιστοποιηθούν με χρήση αραιότερων δειγμάτων, με αλλαγή της πορείας εισαγωγής του δείγματος, με απομάκρυνση των ουσιών που δρουν παρεμποδιστικά καθώς και με χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου (Internal Standard, IS). Το εσωτερικό πρότυπο είναι ένα στοιχείο, που απουσιάζει από τα δείγματα και έχει ατομική μάζα και δυναμικό ιοντισμού παραπλήσια με αυτή του αναλύτη [116].

Η κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης με πρότυπα δείγματα αποτελεί και την πλέον συνηθέστερη μέθοδο ποσοτικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται με την ICP-MS τεχνική. Η χρήση υδατικών πρότυπων διαλυμάτων είναι ικανοποιητική,

εάν τα άγνωστα διαλύματα είναι αρκετά αραιά και η συγκέντρωση του συνολικά διαλυμένου στερεού είναι μικρότερη από 2000 $\mu\text{g/mL}$, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Σε περίπτωση όπου οι συγκεντρώσεις των συστατικών της μήτρας του δείγματος είναι μεγαλύτερες, καταβάλλεται προσπάθεια να προσομοιάσουν τα πρότυπα δείγματα κατά το δυνατόν με τα άγνωστα, με την προσθήκη στα πρότυπα, των ίδιων συστατικών που υπάρχουν στα δείγματα [116].

Για ποσοτικές αναλύσεις μεγαλύτερων απαιτήσεων σε ακρίβεια μπορεί να εφαρμοσθεί η μέθοδος ισοτοπικής αραίωσης που βασίζεται στη μέτρηση της μεταβολής του λόγου εντάσεων δύο ισότοπων ενός στοιχείου, που επέρχεται κατά την προσθήκη γνωστής ποσότητας (spike) ενός πρότυπου διαλύματος εμπλουτισμένου σε ένα από τα δύο ισότοπα. Η συγκέντρωση του αναλύτη με την ποσότητα του προστιθέμενου προτύπου και τη μεταβολή στον λόγο σημάτων περιγράφονται με μαθηματικές σχέσεις. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου ισοτοπικής αραίωσης είναι η βελτίωση στην ακρίβεια και η ανθεκτικότητά της ως προς μια σειρά από χημικές και φυσικές παρεμβολές [116].

Η ημι-ποσοτική ανάλυση καθίσταται δυνατή έπειτα από μέτρηση του ιοντικού ρεύματος κορυφής (kcounits s^{-1}) σε διάλυμα του στοιχείου με γνωστή συγκέντρωση. Στη συνέχεια η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα υπολογίζεται προϋποθέτοντας αναλογική σχέση μεταξύ ιοντικού ρεύματος και συγκέντρωσης [116].

Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του οργάνου ICP-MS, με σκοπό την άρση των εν λόγω παρεμβολών, εξετάζονται οι παράμετροι της εισαγωγής δείγματος και του πλάσματος, καθώς και οι ιδιότητες του εκνεφωτή. Επιδιώκεται η ρύθμιση της ροής του αέριου αργού στον εκνεφωτή και τον πυρσό, το μέγεθος του στομίου εισαγωγής του δείγματος, της τάσης των ιοντικών φακών καθώς και της ισχύς της ακτινοβολίας των ραδιοσυχνοτήτων στο τετραπολικό αναλυτή μάζας. Γίνεται η σωστή επιλογή ισότοπων και διόρθωση με τις αντίστοιχες εξισώσεις. Προσδιορίζονται επίσης, χωριστά το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) και ο δείκτης συγκέντρωσης ισοδύναμου υποβάθρου (Background Equivalent Concentration, BEC) [4]. Η εφαρμογή της τεχνικής του ψυχρού έναντι του θερμού πλάσματος (Cold Vs Hot Plasma) καθίσταται επίσης, ικανή να επιλύσει τέτοιου είδους περιορισμούς της ICP-MS ανάλυσης. Με χαμηλότερες του κανονικού,

θερμοκρασίες στο πλάσμα δεν σχηματίζονται τα διάφορα ιόντα από τη σύνδεση των στοιχείων με το αργό, με αποτέλεσμα το αντίστοιχο φάσμα να φέρει τελικά μειωμένες αλληλοεπικαλύψεις στοιχείων και χαμηλότερη τιμή LOD [111,113,115,116,117].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό του ανόργανου αρσενικού σε ριζάλευρο με φασματομετρία ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (ICP-MS) απουσία μικροκυμάτων χώνευσης και σύζευξης HPLC/ICP-MS που εφαρμόζονται κατά κόρων ως αναλυτικές τεχνικές. Η παρούσα έρευνα εξετάζει την ανάπτυξη μιας καινοτόμου ιδέας με στόχο την ανάπτυξη απλούστερων και ταχύτερων αναλύσεων για τον προσδιορισμό του ανόργανου αρσενικού.

Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την βελτίωση παραμέτρων που φάνηκε να καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το αποτέλεσμα της ανάλυσης, οι οποίες περιγράφονται σε ξεχωριστή ενότητα του κεφαλαίου.

Επιτεύχθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός που απαιτεί κάθε διαδικασία επικύρωσης μεθόδου για την περίπτωση των μετάλλων, επιμολυντών, ιχνοστοιχείων για τη μήτρα του ριζάλευρου σύμφωνα με τις προδιαγραφές που ορίζει ένα ολοκληρωμένο «Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας» και με βάση την νομοθεσία. Αφού ολοκληρώθηκαν τα ανάλογα πειράματα, ακολούθησε η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και συμμετοχή σε διεργαστηριακή δοκιμή σε προϊόν κέικ ρυζιού.

Μελλοντικά, θα πρέπει να συγκριθεί η αναπτυχθείσα μέθοδος παράλληλα με μέθοδο που εμπλέκει σύζευξη HPLC/ICP-MS.

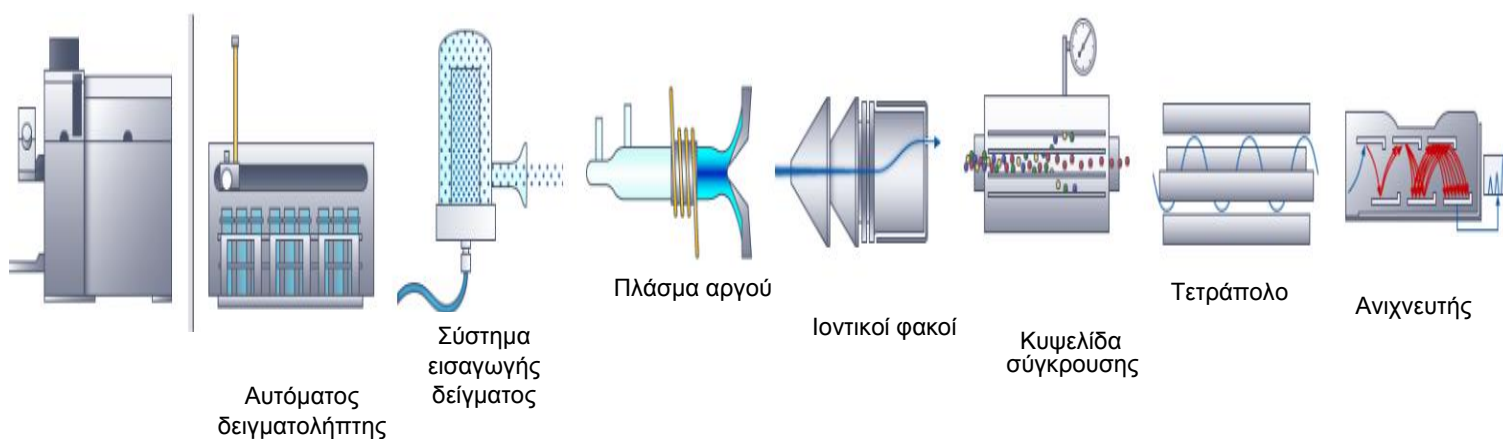
6.1 Μέθοδος εκχύλισης με νιτρικό οξύ και EDTA για ICP-MS ανάλυση

Σκοπός

Ο ποιοτικός και ποσοτικός στοιχειακός προσδιορισμός του ανόργανου αρσενικού (inAs) σε μήτρα ριζάλευρο με χρήση με τη χρήση της τεχνικής της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος αργού (ICP-MS), συμπεριλαμβανομένης κυψελίδας σύγκρουσης (ORS).

Αρχή μεθόδου

Η λειτουργία του αναλυτικού οργάνου ICP-MS βασίζεται στις αρχές που περιγράφονται στις παραγράφους 5.2.2, 5.2.3 και 5.2.4.



Σχήμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση των τμημάτων που διαθέτει το ICP-MS όργανο στο εργαστήριο, όπως εμφανίζεται στο λογισμικό του.

Όργανα - Σκεύη

- ❖ Φασματόμετρο ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Agilent ICP-MS 7700x, Model G3281A), με ενιαίο πρόγραμμα λογισμικού, αυτόματο δειγματολήπτη, κυκλοφορητή νερού (Recirculating Chiller G3292A, Agilent Technologies), σύστημα αερίου αργού (Ar) - ηλίου (He), κυψελίδα σύγκρουσης και τα λοιπά μέρη που το απαρτίζουν
- ❖ Συσσκευή υπερήχων (BRANSON 1200)
- ❖ Συσσκευή υπερκάθαρου νερού (Purite Select Fusion 40)

- ❖ Φυγόκεντρος τεσσάρων θέσεων (Rotofix 32A, Hettich, ZENTRIFUGEN)
- ❖ Συσκευή Vortex (VORTEX GENE 2, Scientific Industries)
- ❖ Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Mettler Toledo, Model: AB204, min = 10 mg, max = 210 g)
- ❖ Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 2-20 μL , 20-200 μL και 100-1000 μL και tips (Eppendorf)
- ❖ Πλαστικός εξοπλισμός (ογκομετρικές φιάλες των 50 και 100 mL (PMP Brand), πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL (SARSTEDT))

Αντιδραστήρια

- ❖ Αέριο Αργό (Ar) High purity grade ~ 99,99% (Air Liquide Hellas) εμπορικά διαθέσιμο σε pressurized cylinders
- ❖ Ήλιο (He) καθαρότητας ~ 99,999% (Air Liquide Hellas)
- ❖ Υπερκάθαρο νερό
- ❖ Νιτρικό οξύ HNO_3 ~ 65% (SupraPur)
- ❖ EDTA disodium salt solution 0,1 M (Honeywell Fluka)
- ❖ Sodium Arsenite solution (Titripur Reag. USP Merck), contains As trioxide, $c(\text{NaAsO}_2) = 0,05 \text{ mol/L}$ (0,1 N) για την παρασκευή των προτύπων
- ❖ ICP-MS Internal Standard Mix (Agilent Technologies), contains Bi, Ge, In, Li, Lu, Rh, Sc, Tb, 100 $\mu\text{g/mL}$, Matrix 10% HNO_3 (ISTD)

Πειραματική Διαδικασία

- Προκατεργασία των δειγμάτων

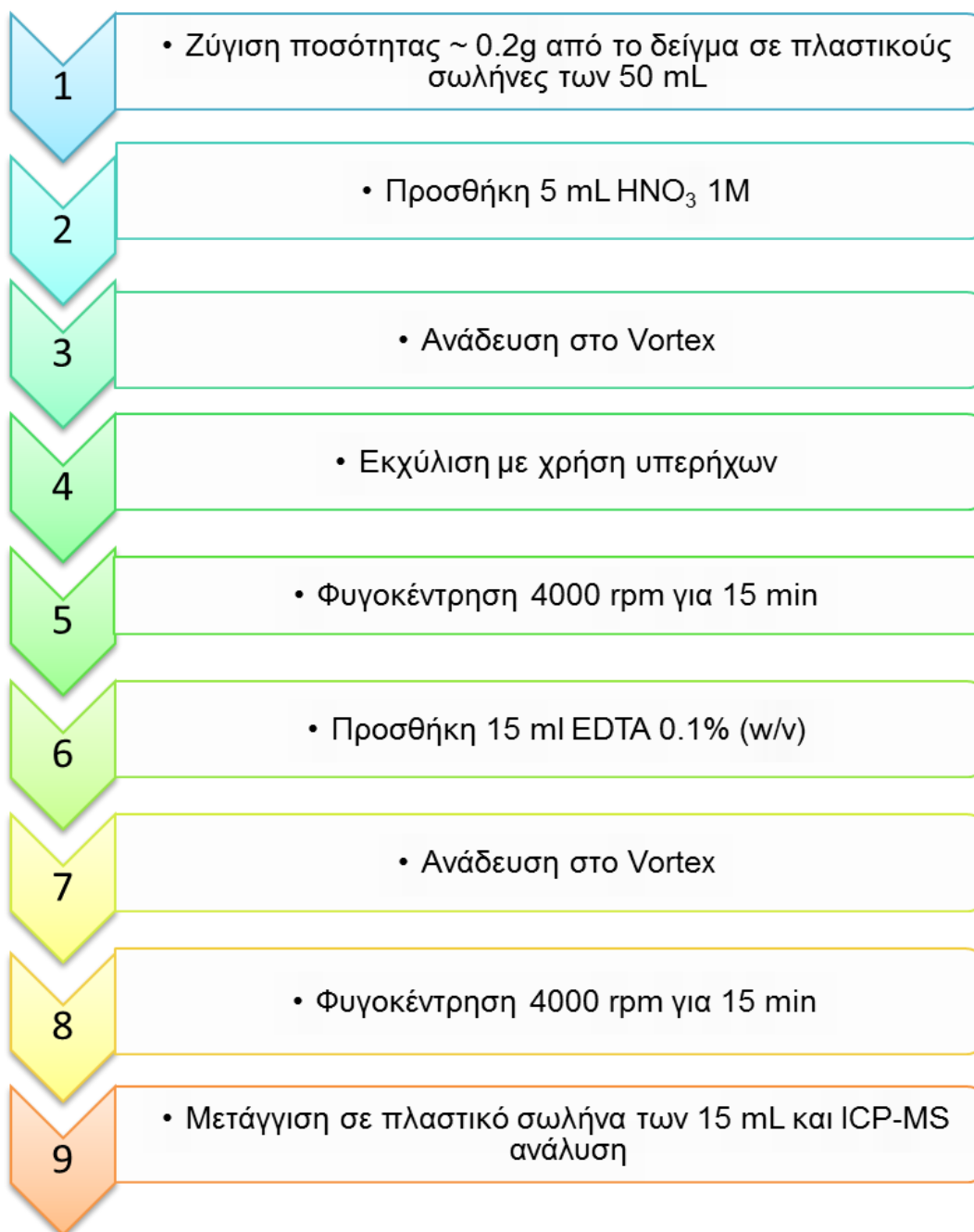
Αρχικά, γίνεται ζύγιση ~ 0,2 g δείγματος ριζάλευρου σε πλαστικό σωλήνα των 50 mL και προστίθενται 5 mL νιτρικού οξέος 1 M. Ακολουθεί ανάδευση και περιδίνηση του περιεχομένου σε συσκευή Vortex για 1 λεπτό και έπειτα εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων που εφαρμόζονται για 15 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί φυγοκέντρηση 4000 rpm για 15 λεπτά, γίνεται προσθήκη 15 mL διαλύματος EDTA 0,1% (w/v). Ενώ, ο πλαστικός σωλήνας υποβάλλεται ξανά για ανάδευση και περιδίνηση στη συσκευή Vortex για 1 λεπτό. Επαναλαμβάνεται το στάδιο φυγοκέντρησης για τις ίδιες συνθήκες χρόνου και

έντασης. Πραγματοποιείται μετάγγιση του υπερκειμένου σε πλαστικό σωλήνα των 15 mL και είναι έτοιμο για ICP-MS ανάλυση.

Επισημαίνεται ότι οι συνθήκες χρόνου περιδίνησης και εκχύλισης με τη χρήση υπερήχους αναφέρονται στο τελικό πρωτόκολλο της μεθόδου, αποφέροντας τα καταλληλότερα αποτελέσματα έπειτα από συγκριτική εκτίμησή τους με δοκιμές διαφορετικών χρόνων παραμονής στις συγκεκριμένες συσκευές που διεκπεραιώθηκαν στα πλαίσια της βελτιστοποίησης.

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από την εξίσωση της καμπύλη βαθμονόμησης (Calibration Curve), που κατασκευάστηκε από τις τιμές του δείκτη απόκρισης γνωστός ως Response Factor (RF) των πρότυπων διαλυμάτων NaAsO_2 διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,25, 0,5, 1,25, 2,5, 5, 10 και 20 ($\mu\text{g/L}$) έπειτα από διόρθωση της συγκέντρωσης τους πολλαπλασιάζοντας με τον ατομικό αριθμό του αρσενικού προς όλο του μορίου NaAsO_2 (δηλαδή επί 75/130) προκειμένου να αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις As(III) και έχοντας ακολουθήσει την ίδια πειραματική πορεία. Ο δείκτης απόκρισης RF αποτελεί τον λόγο των μονάδων που δίνει το όργανο για τον αναλύτη (As counts) προς των αντίστοιχων για το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται (Ge counts). Έγινε χρήση επτά πρότυπων διαλυμάτων As (III) συγκεντρώσεων 0,14, 0,29, 0,72, 1,44, 2,88, 5,77 και 11,54 ($\mu\text{g/L}$).

Η ακρίβεια και ορθότητα της μεθόδου εξετάστηκαν με δοκιμές σε πρότυπα υλικά αναφοράς (Standard Reference Materials, SRM's). Ειδικότερα, έγινε χρήση του NIST 1568b με αποδιδόμενη τιμή ολικού αρσενικού ίση με 0,285 mg/kg και ανόργανου (inAs) ίση με 0,092 mg/kg και του FAPAS 07298 για μέταλλα - επιμολυντές σε ριζάλευρο με ολικό As = 0,246 mg/kg και inAs = 0,185 mg/kg.



Σχήμα 6: Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας για εκχύλιση με νιτρικό οξύ και EDTA.

- Χειρισμός και προετοιμασία του οργάνου για ανάλυση

Το σύστημα διαθέτει Οκταπολική Κυψελίδα Σύγκρουσης (ORS) για την άρση φασματικών (ισοβαρικών και πολυατομικών) παρεμποδίσεων. Επίσης, μέσω της περισταλτικής αντλίας γίνεται συνεχής προσθήκη διαλύματος κατάλληλων εσωτερικών προτύπων (ISTD) για την μείωση των φυσικών παρεμποδίσεων. Το αναλυτικό όργανο για το As (με ατομικό αριθμό 75) δουλεύει σε «Gas mode»

όπου το αέριο είναι το ήλιο He και το εσωτερικό πρότυπο με το οποίο συσχετίζεται η ποσότητα του μετάλλου είναι το Ge (με ατομικό αριθμό 72). Το λογισμικό που ανοίγει παράλληλα με τη διεξαγωγή της ανάλυσης είναι το «Online ICP-MS Data Analysis». Στο πλαίσιο αυτό, ο αναλυτής είναι σε θέση να παρατηρήσει σε πραγματικό χρόνο για το κάθε δείγμα τις κρούσεις του αναλύτη, την παραχθείσα καμπύλη βαθμονόμησης καθώς και να προβεί σε υπολογισμό συγκεντρώσεων.

Η ανάλυση περιλαμβάνει μια σειρά από ενέργειες για τον αναλυτή προκειμένου να διασφαλίσει την ομαλή λειτουργία του οργάνου, οι οποίες συνοψίζονται στα εξής βήματα:

✓ Εκκίνηση του οργάνου

Θέτοντας σε λειτουργία τον κυκλοφορητή του νερού (19°C, 50 psi) και το κλιματιστικό (~20°C), προσαρμόζοντας καταλλήλως τους τρεις βρόγχους του συστήματος επί της περισταλτικής αντλίας και ρυθμίζοντας μέσω του Online προγράμματος (“Online ICP-MS Mass Hunter”) την ροή HNO₃ 2% στο εσωτερικό τους για εκπλύσεις και «σετάρισμα» του οργάνου.

Ενδεικτικά, περιγράφεται εται ο ρόλος του κάθε βρόγχου ως:

α) Ο πρώτος αντλεί το εκάστοτε δείγμα ή πρότυπο διάλυμα μέσω του αυτόματου δειγματολήπτη (ασπρόμαυρος, διαφανής και άχροος βρόγχος - ID: 1,02 mm, Wall: 0,85 mm, IDEX Health & Science, ISMATEC).

β) Ο δεύτερος αντλεί το εσωτερικό πρότυπο διάλυμα (ISTD) (πορτοκαλί, μπλε διαφανής και άχροος βρόγχος “Flared Peripump tube” - ID: 0,25, Agilent Technologies).

γ) Ο τρίτος που απομακρύνει τις πιο ογκώδεις σταγόνες από τον θάλαμο ψεκασμού (κίτρινος, αδιαφανής σωλήνας - ID: 1,52 mm, Wall: 0,75 mm, IDEX Health & Science, ISMATEC).

✓ Άνοιγμα πλάσματος – Συντονισμός οργάνου και μεθόδου

Κατά τη διάρκεια του συντονισμού τόσο του οργάνου όσο και της μεθόδου θα πρέπει τόσο ο δειγματολήπτης όσο και ο βρόγχος του ISTD να είναι εμβαπτισμένοι και να αντλούν το κατάλληλο πρότυπο διάλυμα

βαθμονόμησης (Tuning Solution for ICP-MS: 1 µg/L Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y, 500 mL Part No: 5185-5959, Agilent Technologies).

- Συντονισμός (Tuning) Οργάνου

Μετά από τη θερμική εξισορρόπηση, το όργανο αυτορυθμίζεται ή βελτιστοποιείται στις παρακάτω παραμέτρους ή μέρη του:

- ❖ HW Settings: Torch Axis
- ❖ HW Settings: EM
- ❖ HW Settings: Plasma Correction
- ❖ Standards Lenses Tune
- ❖ HW Settings: Resolution/Axis
- ❖ Performance Report
- ❖ Standard Full Spectrum
- ❖ HW Settings: P/A Factor

- Συντονισμός μεθόδου

Περιλαμβάνει τη τοποθέτηση του δεύτερου βρόγχου σε πλαστικό δοχείο που περιέχει Tuning Solution. Επιλέγοντας τη προαποθηκευμένη στο λογισμικό, μέθοδο που «τρέχει» το όργανο για αυτό το σκοπό ο εκτυπωτής του συστήματος παρέχει στον αναλυτή έγγραφο επιβεβαίωσης, γνωστό ως "Tune Report" καθώς και ηλεκτρονικό αρχείο σε μορφή pdf.

- ✓ Εισαγωγή βαθμονομητών, δειγμάτων και ανάλυση

Αφού πραγματοποιηθεί η δημιουργία λίστας πρότυπων διαλυμάτων και δειγμάτων που προορίζονται για ανάλυση και τοποθέτηση του δεύτερου βρόγχου σε πλαστικό δοχείο που περιέχει το ISTD 100 µg/L, το όργανο είναι έτοιμο για ανάλυση. Οι βαθμονομητές αποτελούν πρότυπα διαλύματα ιχνοστοιχείων, συγκέντρωσης 0, 0,25, 0,5, 1,25, 2,5 και 5,0 µg/L, συμπεριλαμβανομένου και του αρσενικού.

Πίνακας 8: Βασικές ενδείξεις που ελέγχονται πριν και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης στο σύστημα, σε κατάσταση i. shutdown mode (όπου το όργανο είναι κλειστό), ii. standby mode (το όργανο είναι ανοιχτό χωρίς όμως να πραγματοποιείται ανάλυση) και iii. analysis mode (όταν το όργανο βρίσκεται σε κατάσταση ανάλυσης).

Meter	Typical Ranges			Units
	Shutdown Mode	Standby Mode	Analysis Mode	
IF/BK Press	---	0.3~5	250~490 (Use Foreline Pump)	Pa
Analyzer Press		1×10^{-5} ~ 6×10^{-4}	1×10^{-4} ~ 2×10^{-3}	Pa
TMP Revolution	---	65~100	95~100	%
Water RF/WC/IF	0.0	0.0	1~2	L/min
Water Temp	15~25	15~25	15~45	°C
Inlet Temp	Room Temp	Room Temp	15~35	°C
Internal Temp	Room Temp	Room Temp	---	°C
Forward Power	0	0	700~1600	W
Reflected Power	0	0	<20	W
Plasma Freq.	---	---	26.0~28.0	MHz
Carrier Gas (BP)	0	0	200~500	KPa
OP Gas Tank Press	0	0		KPa
Ar Gas Tank Press	700	700	500~700	KPa
Carrier Gas	0	0	0.8~1.3	L/min
MU/Dil. Gas	0	0	0~1.0	L/min
Optional Gas	0	0		%
Plasma Gas	0	0	15	L/min
Aux Gas	0	0	0~1.0	L/min
H2 Gas	0	0	3~5	mL/min
He Gas	0	0	3~5	mL/min
3 rd Cell Gas	0	0	3~5	mL/min
S/c Temp (L)	Room Temp	Room Temp	2	°C

6.1.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων της μεθόδου

Μέσα στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRM's) για παραμέτρους του συστήματος που κρίνονται κρίσιμοι σε διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας και περαιτέρω ενδεχομένως επηρεάζουν το αποτέλεσμα.

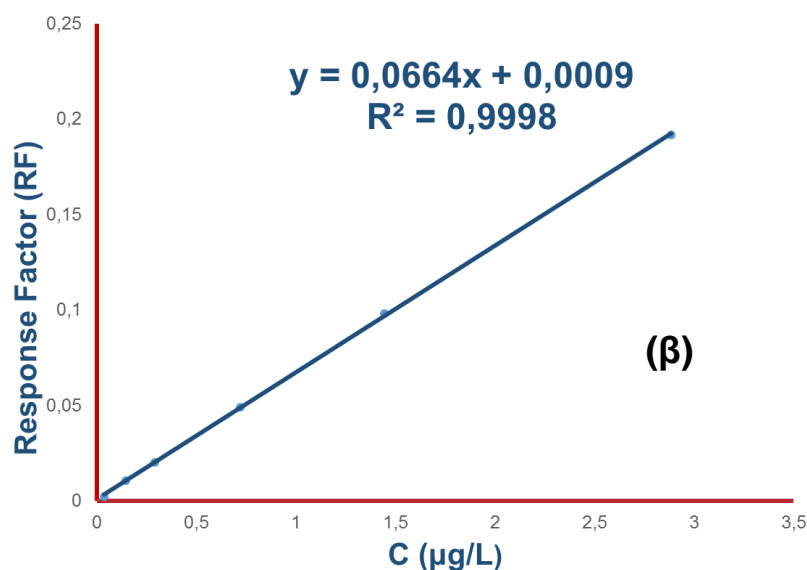
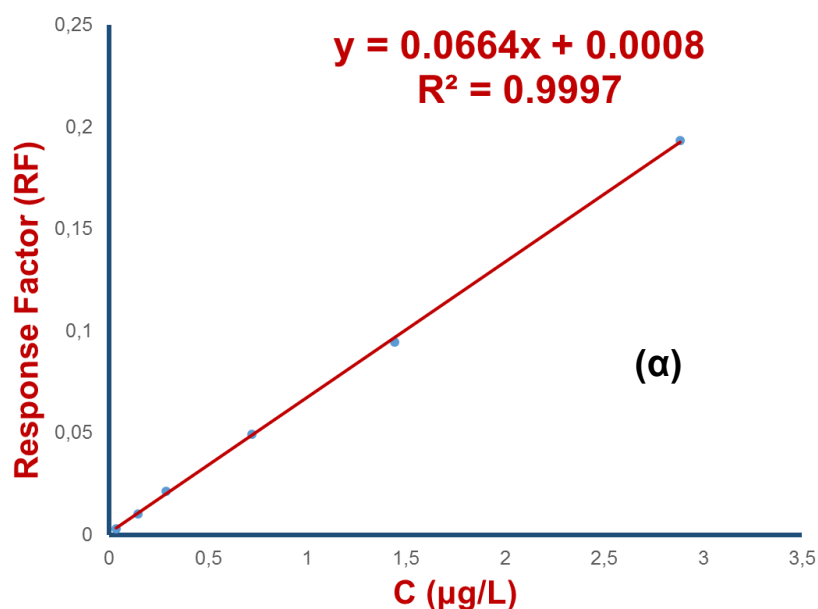
➤ Επιλογή βέλτιστης συγκέντρωσης νιτρικού οξέος

Σε αρχικό στάδιο της έρευνας, επιχειρήσαμε την εκχύλιση με νιτρικό οξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων (0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 και 1 M) στο υλικό αναφοράς NIST 1568b και υπολογίστηκε η ανάκτηση (Recovery, %) με βάση το ανόργανο και το ολικό αρσενικό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση νιτρικού οξέος (HNO_3) διαφορετικών συγκεντρώσεων δεν φάνηκε να επηρεάζει την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης των πρότυπων διαλυμάτων As(III) . Με τις καμπύλες βαθμονόμησης αποδείχτηκε ότι η απόκριση των προτύπων διαλυμάτων δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση νιτρικού οξέος.

Σχήμα 7: Η καμπύλη βαθμονόμησης των πρότυπων διαλυμάτων As(III) στις δύο ακραίες συγκεντρώσεις νιτρικού οξέος, χρησιμοποιώντας υπερκάθαρο νερό (α) και HNO_3 1 M (β), αντίστοιχα.



- Έλεγχος διαφορετικής απόκρισης των διάφορων μορφών ανόργανου αρσενικού

Εξετάστηκε η ποσοτικοποίηση και με πρότυπα διαλύματα As(V) (As ICP Std: H₃AsSO₄ σε HNO₃ 2-3%, Merck). Ίδια απόκριση εμφάνισαν τα διαφορετικά πρότυπα και τα πειράματα συνεχίστηκαν με As(III) λόγω μεγαλύτερης περιεκτικότητας του στα τρόφιμα. Όσον αφορά τη μάζα, του προς ανάλυση δείγματος, εκτός των 0,2 g του ριζάλευρου, πραγματοποιήθηκε δοκιμή και με 0,5 g ζύγισης στο υλικό αναφοράς FAPAS 07298.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πιο εύλογη κρίθηκε η ποσοτικοποίηση με τα πρότυπα του As(III) των διαφορετικών συγκεντρώσεων, σημειώνοντας τιμές πλησιέστερες στην πρότυπη σύμφωνα με αυτά που ορίζονται για το υλικό αναφοράς FAPAS 07298. Άλλωστε, όπως καταδεικνύεται και στην βιβλιογραφία, το As(III) απαντάται και σε μεγαλύτερη αφθονία στο τρόφιμο, γι' αυτό και προτιμήθηκε έναντι του As(V).

- Βελτιστοποίηση μάζας δείγματος

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μικρές ήταν οι διαφορές στην συγκέντρωση του ανόργανου αρσενικού που προσδιορίστηκε είτε με 0,2 είτε με 0,5 g ριζάλευρου FAPAS 07298. Επιλέχθηκε ωστόσο, η μάζα των 0,2 g δείγματος καθότι έδωσε συγκέντρωση σε ανόργανο αρσενικό (inAs) 0,184 mg/kg, με γνώμονα την αποδιδόμενη τιμή inAs = 0,185 mg/kg. Οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν με την εξίσωση:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \text{Πειραματική τιμή} * 100 / \text{Αληθή τιμή}$$

Πίνακας 9: Αποτελέσματα δοκιμής για την εκχύλιση του ανόργανου αρσενικού στο υλικό αναφοράς FAPAS 07298 των 0,2 και 0,5 g μέσω ποσοτικοποίησης με καμπύλες βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων As(III) και As(V) κατά περίπτωση.

Ποσοτικοποίηση
με τα πρότυπα
διαλύματα As(III)

Ποσοτικοποίηση
με τα πρότυπα
διαλύματα As(V)

Μάζα (g)	Μονάδες As	Μονάδες Ge	Συντελεστής Απόκρισης	C (μg/L)	C _{inAs} (μg/kg)	Ανάκτηση με βάση το in As (%)	C (μg/L)	C _{inAs} (μg/kg)	Ανάκτηση με βάση το in As (%)
0,2	4547	30648	0,1484	1,84	184	99	1,74	174	94
0,5	9926	32621	0,3043	3,78	153	83	3,64	147	80

➤ Δοκιμή εμβολιασμού των δειγμάτων

Συνέχεια της βελτιστοποίησης μάζας του δείγματος αποτελεί η δοκιμή εμβολιασμού των δειγμάτων. Δοκιμάστηκαν για ανάλυση εμβολιασμένα υλικά δείγματος FAPAS 07298 (spike) As(III) και μίγματος των δύο κλασμάτων, As(III) & As(V) για την μάζα των 0,2 και 0,5 g με προσθήκη της συγκέντρωσης inAs που ορίζεται ως πρότυπη δηλαδή τα 0,185 mg/kg, προκειμένου να περιέχεται στο δείγμα η διπλάσια συγκέντρωση. Η ποσοτικοποίηση έγινε μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε από τα πρότυπα διαλύματα As(III). Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για διάφορες μάζες και με εμβολιασμό δειγμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Λαμβάνουμε σε ικανοποιητικό βαθμό την συγκέντρωση του αρσενικού λόγω εμβολιασμού (spike), όπως φαίνεται και από τις ανακτήσεις που προκύπτουν για την πλειοψηφία των δειγμάτων καθότι εμφανίζουν ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Ωστόσο, κρίνεται πιο δύσκολο να αποδεσμεύσουμε το αρσενικό που περιέχεται στο τρόφιμο.

Ο υπολογισμός της ανάκτησης στα εμβολιασμένα δείγματα έγινε με τη χρήση της εξίσωσης:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = (\text{Πειραματική τιμή} - \text{Αρχική τιμή}) * 100 / \text{Θεωρητική τιμή εμβολιασμού}$$

Ισχύουν τα εξής:

Προσθήκη $\text{As(V)} = 185 \text{ppb}$

Προσθήκη $\text{NaAsO}_2 = 185 \text{ppb} \rightarrow$ Προσθήκη $\text{As(III)} = 185 * 75/130 = 106 \text{ppb}$

Προσθήκη $\text{As(III)} \ \& \ \text{As(V)} = 185 + 106 = 291 \text{ppb}$

Πίνακας 10: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού της δοκιμής εμβολιασμένων υλικών αναφοράς FAPAS 07298 των 0,2 και 0,5 g για την εκχύλιση του ανόργανου αρσενικού με την εξίσωση της καμπύλης των πρότυπων διαλυμάτων As(III).

	Μάζα (g)	Μονάδες As	Μονάδες Ge	Συντελεστής Απόκρισης	C (μg/L)	C _{inAs} (μg/kg)	Ανάκτηση με βάση το in As (%)
Δείγμα χωρίς προσθήκη	0,2	4547	30648	0,1484	1,84	184	99
	0,5	9926	32621	0,3043	3,78	153	83
Δείγμα με προσθήκη As(III)	0,2	7714	32751	0,2355	2,93	293	103
	0,5	14913	33373	0,4469	5,55	225	67
Δείγμα με προσθήκη As(III) & As(V)	0,2	12365	34902	0,3543	4,40	451	92
	0,5	30282	34294	0,8830	10,9	439	98

- Επιλογή κατάλληλου χρόνου περιδίνησης και χρόνου εκχύλισης στο λουτρό υπερήχων

Σχετικά με την περιδίνηση των δειγμάτων στα διάφορα στάδια και την έκθεση στους υπερήχους, δοκιμάστηκαν για το υλικό αναφοράς FAPAS 07298 και για ριζάλευρο που λειτούργησε ως δείγμα εσωτερικού Ελέγχου Ποιότητας (Quality Control, QC) καθ' όλο το χρονικό διάστημα των πειραμάτων,

διαφορετικοί συνδυασμοί των χρόνων παραμονής τους στις εν λόγω συσκευές. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την εξίσωση της καμπύλης πρότυπων διαλυμάτων As(III).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Έγινε αντιληπτή κάποια συνέργεια μεταξύ των δύο παραγόντων, με ισχυρότερη την δράση των υπερήχων. Με σκοπό την αποτελεσματικότερη εκχύλιση του ανόργανου αρσενικού με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται (νιτρικό οξύ και EDTA), **επιλέχθηκε για το επίσημο πρωτόκολλο της μεθόδου η εφαρμογή των 3 λεπτών στη συσκευή Vortex και 30 λεπτών για την εκχύλιση με χρήση υπερήχων.**

Πίνακας 11: Οι συγκεντρώσεις του inAs σε διαφορετικούς συνδυασμούς του χρόνου εκχύλισης στο λουτρό υπερήχων και του χρόνου περιδίνησης στο υλικό αναφοράς FAPAS 07298.

Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (min)	Χρόνος περιδίνησης (min)	C _{inAs} (μg/kg)	Ανάκτηση με βάση το in As (%)
15	1	123	66
	2	125	67
	3	134	73
	5	135	73
	10	138	75
20	3	131	71
30	3	141	76
40	3	143	77

Στην περίπτωση του FAPAS 07298 για χρόνο παραμονής στους υπερήχους 15 λεπτά, σημειώθηκε μια μικρή αύξηση στις τιμές της συγκέντρωσης του inAs όσο αυξανόταν και ο χρόνος της περιδίνησης στη συσκευή Vortex χωρίς να επιτευχθεί η επιθυμητή των 185 μg/kg. Για πρακτικούς λόγους της πειραματικής διαδικασίας στην πορεία επιλέχθηκε αυτός των τριών λεπτών και έπειτα δοκιμάσθηκαν μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στη συσκευή των υπερήχων τα οποία φαίνεται πως συνέβαλλαν στην άνοδο της συγκέντρωσης που προσδιορίστηκε.

Σε χρονικό διάστημα παραμονής στους υπερήχους άνω των 40 λεπτών, παρατηρήθηκε πτωτική τάση στις τιμές της συγκέντρωσης ανόργανου αρσενικού. Συνεπώς στα 50 και 60 λεπτά οι υπέρηχοι έδειξαν πως δεν καθορίζουν σημαντικά το αποτέλεσμα. Μικρή αυξανόμενη, μη ουσιαστική διαφορά σημειώθηκε στην εφαρμογή μεταξύ τριών και πέντε λεπτών.

Πίνακας 12: Οι συγκεντρώσεις του inAs για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης στο λουτρό υπερήχων και χρόνο περιδίνησης τρία και πέντε λεπτά στο υλικό αναφοράς FAPAS 07298.

Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (min)	Χρόνος περιδίνησης (min)	C_{inAs} (μg/kg)	Ανάκτηση με βάση το in As (%)
50	3	127	69
	5	129	70
60	3	132	72
	5	134	73

Πίνακας 13: Οι συγκεντρώσεις του inAs σε διαφορετικούς συνδυασμούς του χρόνου εκχύλισης στο λουτρό υπερήχων και του χρόνου περιδίνησης σε ριζάλευρο (με ολικό As=114,41 μg/kg).

Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (min)	Χρόνος περιδίνησης (min)	C _{inAs} (μg/kg)
15	3	44,3
30	3	73,2
40	3	97,4
50	3	92,2
60	3	105

Για το ριζάλευρο που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα εσωτερικού Ελέγχου Ποιότητας (Quality Control, QC) για χρόνους παραμονής στους υπέρηχους άνω των 30 λεπτών και σταθερά στα 3 λεπτά για τη συσκευή Vortex σημειώθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις inAs και μάλιστα οι οποίες έδειξαν να προσεγγίζουν την τιμή των 100 μg/kg που αντιστοιχεί στο όριο συγκέντρωσης που θέτει η Ευρωπαϊκή νομοθεσία για τη συγκεκριμένη μήτρα. Παρά ταύτα, δεν μπορούμε να αποφανθούμε με σιγουριά τον επιτυχή προσδιορισμό inAs στο ριζάλευρο, λαμβάνοντας υπόψη τις ανακτήσεις που προέκυψαν στη δοκιμή για την περίπτωση του πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (CRM) που χρησιμοποιήθηκε για αυτό το σκοπό.

ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ

Έπειτα από όλες τις ενέργειες βελτιστοποίησης που διενεργήθηκαν, επιλέχθηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες για το επίσημο πρωτόκολλο. Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας όπως περιγράφονται συνοπτικά και στο Σχήμα 6, συνιστούν μέθοδο για γρήγορες αναλύσεις με καλές ανακτήσεις και

σχετικά χαμηλό κόστος, για τον προσδιορισμό του ανόργανου αρσενικού. Εφαρμόζεται σε πολύ συγκεκριμένες μήτρες, στο ρύζι και τα προϊόντα του. Διακρίνεται όμως για την απουσία μικροκυμάτων χώνευσης και σύζευξης HPLC/ICP-MS που εφαρμόζονται κατά κόρων ως αναλυτικές τεχνικές.

6.2 Μέθοδος διφασικού συστήματος με υδροχλωρικό και χλωροφόρμιο για ICP-MS ανάλυση, που δοκιμάστηκε συμπληρωματικά στο εργαστήριο

Σκοπός

Ο ποιοτικός και ποσοτικός στοιχειακός προσδιορισμός του inAs, και ειδικότερα του As(III), σε υπό εξέταση υπόστρωμα ριζάλευρο με χρήση της ICP-MS τεχνικής και ORS προσέγγισης, έπειτα από προκατεργασία του τροφίμου με αντιδραστήρια που συντάσσουν διφασικό σύστημα (υδροχλωρικό και χλωροφόρμιο).

Αρχή μεθόδου

Η προκατεργασία των δειγμάτων αποσκοπεί αρχικά στην εκχύλιση όλων των μορφών αρσενικού μέσω του υδροχλωρικού που χρησιμοποιείται. Έπειτα, για το διαχωρισμό των ανόργανων μορφών γίνεται χρήση του χλωροφορμίου, με το οποίο μόνο το As(III) έχει καλή «σχέση». Επανεκχυλίζουμε λοιπόν σε HCl προκειμένου να παραλάβουμε το As(III) στη στοιβάδα του, καθότι η εισαγωγή του χλωροφορμίου στο αναλυτικό όργανο δεν είναι επιτρεπτή. Ο προσδιορισμός εν συνεχεία, βασίζεται σε όλες τις αρχές που διέπει μια ICP-MS ανάλυση.

Όργανα - Σκεύη

- ❖ Φασματόμετρο ατομικής μάζας σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Agilent ICP-MS 7700x, Model G3281A), με ενιαίο πρόγραμμα λογισμικού, αυτόματο δειγματολήπτη, κυκλοφορητή νερού (Recirculating Chiller G3292A, Agilent Technologies), σύστημα αερίου αργού (Ar) - ηλίου (He) και τα λοιπά μέρη που το απαρτίζουν

- ❖ Συσκευή υπερήχων (BRANSON 1200)
- ❖ Συσκευή υπερκάθαρου νερού (Purite Select Fusion 40)
- ❖ Φυγόκεντρος τεσσάρων θέσεων (Rotofix 32A, Hettich, ZENTRIFUGEN)
- ❖ Συσκευή Vortex (VORTEX GENE 2, Scientific Industries)
- ❖ Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Mettler Toledo, Model: AB204, min = 10 mg, max = 210 g)
- ❖ Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 2-20 μL , 20-200 μL και 100-1000 μL και tips (Eppendorf)
- ❖ Πλαστικός εξοπλισμός (πλαστικοί σωλήνες των 15 και 50 mL (SARSTEDT) και πιπέτες Pasteur)

Αντιδραστήρια

- ❖ Αέριο Αργό (Ar) High purity grade ~ 99,99% (Air Liquide Hellas) εμπορικά διαθέσιμο σε pressurized cylinders
- ❖ Ήλιο (He) καθαρότητας ~ 99,999% (Air Liquide Hellas)
- ❖ Υπερκάθαρο νερό
- ❖ $\text{HCl} \geq 37\%$ (Sigma-Aldrich)
- ❖ Chloroform (Honeywell)
- ❖ Sodium Arsenite solution (Titripur Reag. USP Merck), contains As trioxide, $c(\text{NaAsO}_2) = 0,05 \text{ mol/L}$ (0,1 N) για την παρασκευή των προτύπων
- ❖ ICP-MS Internal Standard Mix (Agilent Technologies), contains Bi, Ge, In, Li, Lu, Rh, Sc, Tb, 100 $\mu\text{g/mL}$, Matrix 10% HNO_3 [ISTD]

Πειραματική Διαδικασία

- Προκατεργασία των δειγμάτων

Αρχικά, γίνεται ζύγιση ~ 0,2 g δείγματος ριζάλειου σε πλαστικό δοχείο σωλήνα των 50 mL και προστίθενται 20 mL υδροχλωρικού (HCl) 10 M. Ακολουθεί ανάδευση και περιδίνηση του περιεχομένου σε συσκευή Vortex για 1 λεπτό και έπειτα εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων που εφαρμόζονται για 15 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί φυγοκέντρηση 4000 rpm για 15 λεπτά, λαμβάνονται 15 mL από το υπερκείμενο και τοποθετούνται σε άλλο πλαστικό

σωλήνα των 50 mL. Αφού γίνει η προσθήκη 10 mL χλωροφορμίου και πραγματοποιηθεί ανάδευση στη συσκευή Vortex για 5 λεπτό, ακολουθεί με πλαστική πιπέτα Pasteur λήψη της κάτω φάσης, η οποία αποτελεί και την στοιβάδα χλωροφορμίου. Το στάδιο της εκχύλισης με το χλωροφόρμιο επαναλαμβάνεται ακόμη τρεις φορές, ενώ το σύνολο το στοιβάδων χλωροφορμίου παράλληλα συλλέγεται σε ένα διαφορετικό πλαστικό σωλήνα των 50 mL. Από αυτό λοιπόν που περιέχει τις ενωμένες στοιβάδες χλωροφορμίου από τις τέσσερις εκχυλίσεις, λαμβάνονται:

α) 10 mL και σε καινούργιο πάλι πλαστικό σωλήνα των 50 mL προστίθενται 10 mL HCl 1 M. Ακολουθεί ήπια ανάδευση χειροκίνητα και αφήνεται το δείγμα σε ηρεμία. Στη συνέχεια, ~ 10 mL από την πάνω φάση του διαλύματος, που συνιστά αυτή του HCl μεταγγίζονται σε πλαστικό σωλήνα των 15 mL και είναι έτοιμα για ανάλυση.

Δοκιμάζεται με τον ανάλογο τρόπο και η επανεκχύλιση σε νερό.

β) Αντίστοιχα, σε πλαστικό σωλήνα των 50 mL, με 10 mL των στοιβάδων χλωροφορμίου γίνεται προσθήκη, αντί του HCl , 10 mL υπερκάρου νερού και στην πορεία με τον ίδιο τρόπο προετοιμάζεται δείγμα εκχυλίσματος νερού, το οποίο ξανά παραλαμβάνεται από την επιφάνεια που αποτελεί και την υδατική φάση του συγκεκριμένου διαλύματος.

Τα εκχυλίσματα λοιπόν HCl που προκύπτουν από το στάδιο (α) και του νερού από το στάδιο (β) υποβάλλονται σε ICP-MS ανάλυση.

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς, που κατασκευάστηκε από τις τιμές του δείκτη απόκρισης RF, των πρότυπων διαλυμάτων As(III) διαφορετικών συγκεντρώσεων (συμπεριλαμβανομένης της ανάλογης διόρθωσης όπως και στην προηγούμενη μέθοδο) που κατεργάστηκαν με την ίδια πειραματική πορεία, κατά περίπτωση ανάλογα των εκχυλισμάτων HCl και νερού. Οι δοκιμές εκτός του ριζάλειου, έγιναν και στο υλικό αναφοράς FAPAS 07298.



Σχήμα 8: Διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας διφασικού συστήματος με υδροχλωρικό οξύ και χλωροφόρμιο

- Χειρισμός και προετοιμασία του οργάνου για ανάλυση, όπως ακριβώς περιγράφηκε και για την προηγούμενη μέθοδο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Σε απόπειρα εφαρμογής της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας, παρατηρήθηκε πως δεν λειτούργησε όπως αναμενόταν. Παρατηρήθηκε δυσκολία στον διαχωρισμό των δύο φάσεων. Οι μετρήσεις για τα πρότυπα διαλύματα As(III) που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς δεν έδωσαν γραμμικό αποτέλεσμα. Αποφέροντας περαιτέρω αδύνατη και την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με τις αντίστοιχες εξισώσεις οι οποίες παρουσίασαν χαμηλότερο από τον συνηθισμένο συντελεστή συσχέτισης ($R^2 < 1$). Σε περίπτωση ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου με τη συγκεκριμένη διαδικασία, απαιτούνται συμπληρωματικά πειράματα στα οποία δεν προβήκαμε λόγω αυξημένου κόστους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ, ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

7.1 Εισαγωγή

Τα εργαστήρια που διενεργούν επίσημους ελέγχους τροφίμων υποχρεούνται να είναι διαπιστευμένα σύμφωνα με το πρότυπο ISO 17025 ως προς τις «Γενικές απαιτήσεις για την ικανότητα των εργαστηρίων δοκιμών και διακριβώσεων» [123].

Με σκοπό την ενίσχυση συντονισμού και δημιουργίας ενιαίας αγοράς στην Ε.Ε, οφείλουν επιπλέον να συμμετέχουν σε κάποιο από τα διεθνώς αναγνωρισμένα συστήματα εξωτερικής αξιολόγησης (διεργαστηριακές δοκιμές), αποδεικνύοντας ταυτόχρονα και την δική τους καταλληλότητα, σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων που εφαρμόζουν και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που παρέχουν [123].

Αυτό όλο σαφώς προϋποθέτει την συμμόρφωση με τα κριτήρια επίδοσης, τις απαιτήσεις και τα όσα ορίζει η νομοθεσία για τις αναλυτικές μεθόδους, ανάγοντας λοιπόν κατά αυτόν τον τρόπο τα υποψήφια εγκεκριμένα εργαστήρια να προβούν σε διαδικασίες επικύρωσης, εν συνεχεία διαπίστευσης των μεθόδων τους και γενικότερα τήρησης και εγκατάστασης ενός ολοκληρωμένου «Συστήματος Διαχείρισης Ποιότητας» που πληροί όλες τις προδιαγραφές και διαθέτει τα απαραίτητα έγγραφα που τεκμηριώνουν κάθετι μέσα στο χώρο των εργαστηρίων.

Στην Ελλάδα, ο κρατικός ελεγκτικός οργανισμός που εξυπηρετεί αυτές τις ανάγκες, επιθεωρεί και αξιολογεί τα εργαστήρια είναι το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης, με τον διακριτικό τίτλο Ε.ΣΥ.Δ. Ενώ, τους παρέχει περαιτέρω και την επίσημη αναγνώριση στην περίπτωση που κρίνονται ικανά να εκτελούν τις δοκιμές για τις οποίες εξετάστηκαν.

Εν κατακλείδι, σε μια διευρυμένη, παγκοσμιοποιημένη αγορά, η ανάγκη για αξιόπιστα, έγκυρα εργαστηριακά αποτελέσματα καθίσταται επιτακτική πρωτίστως προκειμένου να διασφαλίζεται η υγεία του καταναλωτή καθώς και

να υφίσταται μια εναρμονισμένη πολιτική στο πεδίο ελέγχου των τροφίμων στα διάφορα κράτη-μέλη της Ε.Ε.

7.2 Σχεδιασμός πειραμάτων επικύρωσης

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων επικύρωσης διενεργήθηκε σύμφωνα με την απόφαση της Επιτροπής για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων [123], καθώς και με όλες τις οδηγίες Eurachem/CITAC [126] και του Ε.ΣΥ.Δ [124] με βάση την ισχύουσα νομοθεσία για το ανόργανο αρσενικό [26].

Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ριζάλευρο με τις δοκιμές βελτιστοποίησης που λειτουργούσε ως δείγμα εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου (Quality Control, QC).

* Οι δοκιμές επικύρωσης προηγήθηκαν των δοκιμών βελτιστοποίησης για τις παραμέτρους του χρόνου περιδίνησης και εκχύλισης στο λουτρό υπερήχων, όπου εφαρμόστηκαν 1 και 15 λεπτά, αντίστοιχα.

7.2.1 Ορισμοί

- Ως *ακρίβεια* νοείται η εγγύτητα μεταξύ του αποτελέσματος μιας δοκιμής και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Προσδιορίζεται με τον προσδιορισμό ορθότητας και πιστότητας.
- Ως *ανάκτηση* νοείται το ποσοστό της αληθούς συγκέντρωσης μιας ουσίας που ανακτάται κατά την αναλυτική διαδικασία.
- Ως *επαναληψιμότητα* νοείται η πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας.
- *Συνθήκες επαναληψιμότητας* είναι οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα ανεξάρτητων δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων τεμαχίων δοκιμής στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή που χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό.
- Ως *αναπαραγωγιμότητα* νοείται η πιστότητα υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.

- *Συνθήκες αναπαραγωγιμότητας* αποτελούν οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα ανεξάρτητων δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων τεμαχίων δοκιμής σε διαφορετικά εργαστήρια με διαφορετικούς χειριστές που χρησιμοποιούν διαφορετικό εξοπλισμό.
- Ως *πρότυπο βαθμονόμησης* νοείται μια διάταξη μετρήσεων η οποία εκφράζει την ποσότητα της ουσίας που μας ενδιαφέρει κατά τρόπον ώστε να συνδέεται η τιμή της ουσίας με μια βάση αναφοράς.
- *Πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM)* αποτελεί ένα υλικό στο οποίο έχει αποδοθεί συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε αναλυτέα ουσία.
- *Εμβολιασμένο υλικό δείγματος (spike)* είναι ένα δείγμα εμπλουτισμένο με γνωστή ποσότητα της αναλυτέας ουσίας που πρόκειται να ανιχνευθεί.
- Ως *επίπεδο* που ενδιαφέρει νοείται η συγκέντρωση ουσίας ή αναλυτέας ουσίας σε ένα δείγμα, της οποίας έχει σημασία να προσδιορισθεί η συμμόρφωση με τη νομοθεσία.
- Ως *επικύρωση* νοείται η επιβεβαίωση κατόπιν εξέτασης και η προσκόμιση πραγματικών τεκμηρίων για το ότι πληρούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για μια συγκεκριμένη σκοπούμενη χρήση [123,125].

7.2.2 Παράμετροι επικύρωσης

Επαναληψιμότητα (Repeatability) «r»: Η τιμή κάτω από την οποία δύναται να αναμένεται ότι η απόλυτη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμασιών, που λαμβάνονται υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (δηλαδή ίδιο δείγμα, ίδιος χειριστής, ίδιος εξοπλισμός, ίδιο εργαστήριο και μικρή χρονική απόσταση), βρίσκεται εντός των ορίων μιας καθορισμένης πιθανότητας (κατά κανόνα 95 %) και επομένως

$$r = 2,8 \times s_r$$

Τυπική απόκλιση «sr», υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας.

Σχετική τυπική απόκλιση «RSD_r», υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας

$$RSD_r = [(s_r / \bar{x}) \times 100]$$

Αναπαραγωγισιμότητα (Reproducibility) «R»: η τιμή κάτω από την οποία δύναται να αναμένεται ότι η απόλυτη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεμονωμένων δοκιμών, που ελήφθησαν υπό συνθήκες αναπαραγωγισιμότητας (δηλαδή για το ίδιο προϊόν που ελήφθη από χειριστές σε διάφορα εργαστήρια, χρησιμοποιώντας την τυποποιημένη μέθοδο δοκιμής), βρίσκεται εντός ορισμένου ορίου πιθανότητας (κατά κανόνα 95 %).

$$R = 2,8 \times s_R$$

Τυπική απόκλιση «s_R», υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες αναπαραγωγισιμότητας.

Σχετική τυπική απόκλιση «RSD_R», υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες αναπαραγωγισιμότητας.

$$RSD_R = [(s_R/x) \times 100]$$

Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection) «LOD»: η μικρότερη μετρούμενη περιεκτικότητα από την οποία μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα για την παρουσία του αναλύτη με ικανοποιητική στατιστική βεβαιότητα. Το όριο ανίχνευσης είναι αριθμητικώς ίσο με το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου των τυφλών προσδιορισμών (n =10).

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantification) «LOQ»: η κατώτατη περιεκτικότητα του αναλύτη που μπορεί να μετρηθεί με ικανοποιητική στατιστική βεβαιότητα. Αν τόσο η ορθότητα όσο και η πιστότητα είναι σταθερές σε μια περιοχή τιμών συγκεντρώσεων γύρω από το όριο ανίχνευσης, τότε το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού είναι αριθμητικώς ίσο με το εξαπλάσιο ή το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου τυφλών προσδιορισμών.

7.3 Πλάνο πειραμάτων επικύρωσης, Αποτελέσματα και Συζήτηση

7.3.1 Γραμμικότητα

Για τη γραμμικότητα αναλύθηκαν 7 πρότυπα διαλύματα As(III) συγκεντρώσεων 0,25, 0,5, 1,25, 2,5, 5, 10 και 20 (μg/L). Εξυπακούεται ότι σε

κάθε ανάλυση, τα πρότυπα διαλύματα κατασκευάζουν καμπύλη αναφοράς που εμφανίζει γραμμικότητα. Συμβατικά, για την εξίσωση παλινδρόμησης του αρσενικού επιλέχθηκαν οι τιμές για την εξίσωση της καμπύλης των πρότυπων διαλυμάτων που προέκυψε την ημέρα της ανάλυσης των 10 λευκών δειγμάτων (LOD's).

Πίνακας 14: Εξίσωση παλινδρόμησης αρσενικού

Στοιχειακό	Σταθερός όρος (a)	Κλίση (b)	Συντελεστής συσχέτισης (R ²)
As	5,984 x 10 ⁻⁴	7,218 x 10 ⁻⁴	0,999

7.3.2 Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ)

Υφίστανται γενικά πληθώρα προσεγγίσεων στην βιβλιογραφία σχετικά με τον τρόπο υπολογισμού για τον προσδιορισμό των LOD και LOQ ορίων, συμπεριλαμβανομένων των τυφλών δειγμάτων ή μήτρας η οποία περιέχει την αναλυτέα ουσία σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στην οποιαδήποτε περίπτωση, θα πρέπει να βασίζεται σε εμβολιασμένα δείγματα (spike) και να υπακούει στα όσα ορίζει ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός υπ' αριθμόν 333/2007 για τον επίσημο έλεγχο των μολυσματικών ουσιών στα τρόφιμα [124,125].

Τα LOD και LOQ υπολογίστηκαν με τον προσδιορισμό 10 ανεξάρτητων τυφλών δειγμάτων (απουσία μήτρας) με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\text{LOD}_{\text{οργάνου}} (\mu\text{g/L}) = 3,3 * \text{SD} / \text{b}$$

$$\text{LOQ}_{\text{οργάνου}} (\mu\text{g/L}) = 10 * \text{SD} / \text{b}$$

$$\text{LOD}_{\text{μεθόδου}} (\mu\text{g/kg}) = \text{LOD}_{\text{οργάνου}} * \text{V}_{\text{ap}} / \text{m}_{\text{δείγματος}}$$

$$\text{LOQ}_{\text{μεθόδου}} (\mu\text{g/kg}) = \text{LOQ}_{\text{οργάνου}} * \text{V}_{\text{ap}} / \text{m}_{\text{δείγματος}}$$

Όπου SD: Η τυπική απόκλιση 10 ανεξάρτητων λευκών δειγμάτων των τιμών του δείκτη απόκρισης (Response Factor, RF) που προκύπτουν από το λόγο των μονάδων της αναλυτέας ουσίας δηλαδή το As προς των αντίστοιχων του εσωτερικού προτύπου, του Ge

$V_{αρ}$: ο όγκος όπου αραιώνονται τα αντιδραστήρια κατά την πειραματική διαδικασία (20mL)

$m_{\text{δείγματος}}$: η μάζα του δείγματος (0,2g)

b: η κλίση της καμπύλης

Πίνακας 15: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου και μεθόδου για το As

Στοιχειακό As	LOD_{οργάνου} (μg/L)	0,018
	LOQ_{οργάνου} (μg/L)	0,056
	LOD_{μεθόδου} (μg/kg)	1,865
	LOQ_{μεθόδου} (μg/kg)	5,653

7.3.3 Επαναληψιμότητα

Η πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας αξιολογήθηκε βάση των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών που αποκτήθηκαν με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων τεμαχίων δοκιμής στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή και στον ίδιο εξοπλισμό.

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία (ΕΚ 2015/1006), για το ριζάλευρο που ανήκει στις βρεφικές/παιδικές τροφές ορίζει μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση σε ανόργανο αρσενικό τα 100 μg/kg [26]. Σύμφωνα λοιπόν με αυτή τη τιμή, καθορίστηκε και το πλάνο των πειραμάτων επικύρωσης. Συγκεκριμένα αναλύθηκε ριζάλευρο που λειτουργούσε ως δείγμα εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου, σε 4 διαφορετικά επίπεδα, για αριθμό δειγμάτων $n=6$ ανά επίπεδο, για τον προσδιορισμό ανόργανου αρσενικού όπως περιγράφονται παρακάτω:

1^ο Επίπεδο: Νομοθεσία για LOQ μετρήσεις χωρίς προσθήκη As(III)

(Αναμενόμενη $C_{inAs} \leq 100$ μg/kg)

2^ο Επίπεδο: 1,5 * Νομοθεσία Δηλ. Με προσθήκη As(III) 50 μg/kg

3^ο Επίπεδο: 2 * Νομοθεσία Δηλ. Με προσθήκη As(III) 100 μg/kg

4^ο Επίπεδο: 3 * Νομοθεσία Δηλ. Με προσθήκη As(III) 200 μg/kg

Πίνακας 16: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας προσδιορισμού inAs

Επίπεδο	Μέση περιεκτικότητα (μg/kg)	Τυπική απόκλιση (S _R)
1 ^ο	23,5	1,8
2 ^ο	64,5	2,4
3 ^ο	102,8	6,1
4 ^ο	185,7	5,2

7.3.4 Αναπαραγωγιμότητα

Η πιστότητα υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας αξιολογήθηκε βάση των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών που αποκτήθηκαν με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων τεμαχίων δοκιμής, εκτός του πρώτου επιπέδου, για αριθμό δειγμάτων n=6 ανά επίπεδο, σε διαφορετικές ημέρες, ως εξής:

2^ο Επίπεδο: 1,5 * Νομοθεσία

3^ο Επίπεδο: 2 * Νομοθεσία

4^ο Επίπεδο: 3 * Νομοθεσία

Πίνακας 17: Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας προσδιορισμού inAs

Επίπεδο	Μέση περιεκτικότητα (μg/kg)	Τυπική απόκλιση (S _R)
2 ^ο	62,5	8,3
3 ^ο	103,2	7,1
4 ^ο	186,7	3,1

7.4 Διεργαστηριακές δοκιμές

7.4.1 Ο ρόλος των διεργαστηριακών δοκιμών

Οι διεργαστηριακές δοκιμές, γνωστές και ως Ring tests ή Proficiency tests αποσκοπούν στην εκτίμηση των κριτηρίων επίδοσης των δοκιμών που διεκπεραιώνει ένα εργαστήριο. Πρόκειται ουσιαστικά για ενδοεργαστηριακές δοκιμές που βασίζονται στην ανάλυση ομοειδών δειγμάτων ανά εργαστήριο, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα στο καθένα από αυτά που λαμβάνει μέρος, να αξιολογήσει και να βελτιώσει τις αναλυτικές μεθόδους του, εμπειρικλείοντας τον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται και τον ανθρώπινο παράγοντα που εμπλέκεται [127].

Κατά αυτόν το τρόπο, το υποψήφιο εργαστήριο που συμμετέχει σε διεργαστηριακή δοκιμή επωφελείται ενός συστήματος εξωτερικής αξιολόγησης των δοκιμών και των αποτελεσμάτων που παράγει. Καθότι μάλιστα, συγκεκριμένη ανάλυση πραγματοποιείται σε μεγαλύτερη κλίμακα, του προσφέρει τη δυνατότητα να συγκρίνει την επίδοσή του με άλλα εργαστήρια. Η αναγκαιότητα συμμετοχής σε τέτοιου είδους δοκιμές, έγκειται στο γεγονός άπαξ και χαρακτηρίζονται ως αυτόνομα τα εργαστήρια όσον αφορά τη δραστηριότητα και ικανότητά τους στο πεδίο της ανάλυσης των τροφίμων [127].

Οι διεργαστηριακές δοκιμές λοιπόν αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του ελέγχου ποιότητας καθόλα τα στάδια της εφοδιαστικής αλυσίδας. Είναι ζωτικό εργαλείο για την εκτίμηση των διαδικασιών και των μεθόδων που εφαρμόζονται, της σωστής χρήσης του εργαστηριακού εξοπλισμού, της κατάρτισης των αναλυτών και των λοιπών παραμέτρων με βάση το πρότυπο ISO 17025 [127,128].

Ενώ, συμβάλλουν στην εγκαθίδρυση και τήρηση εν συνέχεια ενός ολοκληρωμένου «Συστήματος Διαχείρισης Ποιότητας» στη βιομηχανία των τροφίμων, προϋποθέτοντας την συμμόρφωση με την ισχύουσα νομοθεσία, τους φορείς διαπίστευσης και κάθε άλλο ρυθμιστικό παράγοντα στα δεδομένα της ενιαίας αγοράς [127].

Κυρίαρχη λοιπόν σε παγκόσμιο επίπεδο είναι η εταιρία Fera Science Ltd. (Fera) που διαθέτει στην αγορά πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRM's) και

διοργανώνει ανάλογες δοκιμές με αυτές που περιγράφηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, γνωστή για τα “FAPAS Proficiency Tests” [128].

7.4.2 Αξιολόγηση της μέτρησης των διεργαστηριακών δοκιμών

Τα δείγματα των διεργαστηριακών δοκιμών αναλύονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και τα αντίστοιχα δείγματα ρουτίνας. Ακολουθούνται οι ίδιες πειραματικές διαδικασίες και συνθήκες, όπως ορίζονται στις πιστοποιημένες μεθόδους ή σε διεθνώς αναγνωρισμένα πρωτόκολλα που εφαρμόζει το εκάστοτε εργαστήριο για την ανάλυση ανάλογης μήτρας χωρίς καμία ειδική μεταχείριση για τα Ring test δείγματα [127].

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία υποβολής του αποτελέσματος πριν τη λήξη της προθεσμίας από τα υποψήφια εργαστήρια, σε επόμενο στάδιο τους παρέχεται έγγραφο με τα αποτελέσματα όλων των εργαστηρίων που συμμετείχαν σε αντιστοιχία με έναν αριθμό κωδικοποίησης, αποκρύπτοντας έτσι την επωνυμία τους. Επιπλέον, γνωστοποιείται η αληθής τιμή της προσδιοριζόμενης παραμέτρου για το πιστοποιημένο δείγμα, με αποτέλεσμα τα εργαστήρια να είναι σε θέση πια να αποφανθούν για την επίδοση και καταλληλότητα της μεθόδου που εφαρμόζουν για το συγκεκριμένο σκοπό.

Η εκτίμηση του αποτελεσμάτων στα διεργαστηριακών δοκιμών επιτυγχάνεται ως επί το πλείστον με τον ποσοτικό δείκτη *z-score*, που αποδίδεται ξεχωριστά για κάθε εργαστήριο που λαμβάνει μέρος και αντικατοπτρίζει την επίδοσή του [127].

Για κάθε δοκιμή, ο δείκτης *z-score* υπολογίζεται ως εξής:

$$\mathbf{z - score} = \frac{\mathbf{X_{lab} - X_{RT}}}{\mathbf{S_{RT}}}$$

Όπου X_{lab} : το αποτέλεσμα του εργαστηρίου

X_{RT} : ο μέσος όρος όλων των αποτελεσμάτων που έδωσαν τα εργαστήρια που έλαβαν μέρος στο διεργαστηριακό τεστ

S_{RT} : η τυπική απόκλιση όλων των αποτελεσμάτων

Ο δείκτης *z-score* εκφράζει την διαφορά μεταξύ του αποτελέσματος του εκάστοτε εργαστηρίου και του μέσου όρου όλων των αποτελεσμάτων που κατέθεσαν στο σύνολο τους τα εργαστήρια ως προς την παράμετρο που προσδιορίζεται. Η τυπική απόκλιση στον παρονομαστή της εξίσωσης που περιγράφτηκε, χαρακτηρίζεται ως η έκταση της πραγματικής απόκλισης όλων των μετρήσεων [127].

Οι τιμές που μπορεί να πάρει ο δείκτης *z-score* συνηθέστερα είναι οι παρακάτω, όπως φαίνονται στον πίνακα, και καταδεικνύουν την ανάλογη εκτίμηση του αποτελέσματος [127].

Πίνακας 18: Δείκτης *z-score* των διεργαστηριακών δοκιμών [127].

Τιμή <i>z-score</i>	Ερμηνεία αποτελέσματος
$ z \leq 2$	Επιτυχές
$2 < z < 3$	Αμφίβολο
$ z > 3$	Ανεπιτυχές

Κατά κανόνα, η συμμετοχή του εργαστηρίου κρίνεται επιτυχής σε περίπτωση που εμφανίζει τιμή $|z| \leq 2$, παράγει δηλαδή ικανοποιητικά αποτελέσματα σε ποσοστό 80%. Το εργαστήριο ταυτόχρονα οφείλει να πληροί και τα άλλα κριτήρια, όπως είναι ο υπολογισμός των ποσοστών ανάκτησης και η εκτίμηση της αβεβαιότητας. Σε περίπτωση αμφίβολου ή ανεπιτυχούς αποτελέσματος, το εργαστήριο θα πρέπει να προβεί στις απαραίτητες διορθωτικές ενέργειες και έπειτα να επαναλάβει δοκιμή για τον προσδιορισμό της συγκεκριμένης παραμέτρου προκειμένου να ελέγξει την *z-score* τιμή του [127].

7.4.3 Συμμετοχή σε διεργαστηριακή δοκιμή, Αποτελέσματα και Συζήτηση

Προηγήθηκε ανάλυση στο εργαστήριο για ολικό αρσενικό και προέκυψε συγκέντρωση 322,4 μg/kg σε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς FAPAS 7307, υπόστρωμα που αναφέρεται ως ρυζογκοφρέτα. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση για τον προσδιορισμό inAs με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε για αριθμό δειγμάτων n=3.

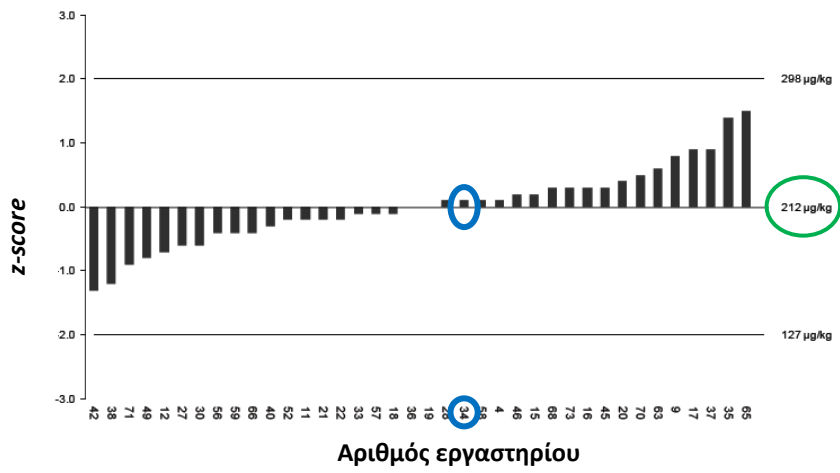
Έπειτα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων υποβλήθηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων, τα 215,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για συγκέντρωση inAs στο δείγμα. Υπενθυμίζεται ότι για γαλέτες, γκοφρέτες, κράκερ και μπισκότα ρυζιού, η Ευρωπαϊκή νομοθεσία (ΕΚ 2015/1006) θέτει όριο για το inAs τα 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [26]. Σαν πρώτη εκτίμηση, η μέθοδος έδωσε αποτέλεσμα εντός των νομοθετικών ορίων. Η συμμετοχή του εργαστηρίου μας εγκρίθηκε με τον αριθμό κωδικοποίησης 34.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα διεργαστηριακής δοκιμής στη ρυζογκοφρέτα FAPAS 7307 για τον προσδιορισμό inAs σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε.

**Ποσοτικοποίηση
με τα πρότυπα
διαλύματα As(III)**

Μάζα (g)	Χρόνος περιδίνηση (min)	Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (min)	Μονάδες As	Μονάδες Ge	Συντελεστής Απόκρισης	C ($\mu\text{g}/\text{L}$)	C _{inAs} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
~ 0,2	3	30	5459	62734	0,0870	2,060	213
			5653	64473	0,0883	2,090	217
			6132	67715	0,0905	2,144	215

Επίσημα, η αποδιδόμενη συγκέντρωση του δείγματος FAPAS 7307, ανακοινώθηκε στα 212 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Συμπερασματικά, η συμμετοχή στη διεργαστηριακή δοκιμή κρίθηκε επιτυχής και μάλιστα με εξαιρετική z-score τιμή, ίση με 0,1** όπως αποτυπώνεται στο γράφημα παρακάτω για τον αριθμό 34 που αντιστοιχεί στο εργαστήριο μας. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και στο πιστοποιητικό του υλικού αναφοράς, που παρέχεται στο εργαστήριο.



Σχήμα 9: Η διακύμανση των z-scores τιμών όλων των εργαστηρίων στη διεργαστηριακή δοκιμή για τον προσδιορισμό inAs στη ρυζογκοφρέτα FAPAS 7307.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενογλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Codex Alimentarius	Διεθνής Κώδικας Τροφίμων
CRM	Πιστοποιημένο Υλικό Αναφοράς
LOD	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού
Risk Assessment	Εκτίμηση επικινδυνότητας
RSD	Σχετική Τυπική Απόκλιση
Spike	Εμβολιασμένο υλικό δείγματος
SRM	Πρότυπο Υλικό Αναφοράς

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

AAS	Atomic Absorption Spectrometry
AFS	Atomic Fluorescence Spectrometry
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
ATP	Adenosine Tri – Phosphate
BEC	Background Equivalent Concentration
BMDL	Benchmark Dose Limit
BMR	Basic Metabolic Rate
CDPH	California Department of Public Health
CITAC	Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry
CRC	Collision-Reaction Cell
CRM's	Certified Reference Materials
CONTAM PANEL	EFSA's Scientific Panel on Contaminants in the food chain
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EFSA	European Food Safety Authority
EFTA/EEA	European Free Trade Associations & European Economic Area
ETAAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
FAO	Food and Agriculture Organization

GF - AAS	Graphite Furnace - Atomic Absorption Spectrometry
HG - AAS	Hydride Generation - Atomic Absorption Spectrometry
HRIC	Hellenic Research & Innovation Centre
IARC	International Agency of Research Cancer
ICP - MS	Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
ICP - AES	Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy
IS	Internal Standard
ISO	International Organization for Standardization
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
KED	Kinetic Energy Discrimination
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
LOD	Limit Of Detection
ML's	Maximum Levels
MOE's	Margins Of Exposure
NIDDM	Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus
OEHHA	Office of Environmental Health Hazard Assessment

ORS	Octapole Reaction System
PHG	Public Health Goal
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake
QC	Quality Control
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RDA	Recommended Dietary Allowance
RF	Response Factor
RSD	Relative Standard Deviation
SRM	Standard Reference Material
TDS	Total Dissolved Solids
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
USEPA	US Environmental Protection Agency
UTL	Upper Tolerable Intake Level
WHO	World Health Organization
ΕΚΠΑ	Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ε.ΣΥ.Δ.	Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. N. Γαλανοπούλου, Γ. Ζαμπετάκης, Μ. Μαυρή, Α. Σιαφάκα, *Διατροφή και Χημεία Τροφίμων*, 2^η Εκδ. Σταμούλη, 2011, σελ. 27-30, 118-127
2. Γ. Ζαμπετάκης, Π. Μαρκάκη, Χ. Προεστός, *Χημεία Τροφίμων*, Εκδ. Σταμούλη, 2014, σελ. 281-284, 295, 297, 299
3. M. J. Gibney, H. H. Vorster, F. J. Kok, *Εισαγωγή στη Διατροφή του Ανθρώπου*, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., 2007, σελ. 246-258, 274-278
4. M. Marcinkowska, D. Baralkiewicz, *Multielemental speciation analysis by advanced hyphenated technique – HPLC/ICP-MS: A review*, 2016 pp.1-86
5. L. Xing, D. Beauchemin, *Sample Introduction in ICP-MS - Liquid Chromatography*, in: D. Beauchemin, D. Matthews (Eds.), *Elemental and Isotope Ratio Mass Spectrometry. The Encyclopedia of Mass Spectrometry*, Elsevier, Oxford, UK, 2010, pp. 73-81
6. O.F.X. Donard, J.A. Caruso, *Trace metal and metalloid species determination: Evolution and trends*, *Spectrochimica Acta Part B Spectroscopy*, vol. 53, 1988, pp. 157-163
7. A. Kot, J. Namieśnik, *The role of speciation in analytical chemistry*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 19, 2000, pp. 69-79
8. U.S. Environmental Protection Agency, *Toxicological review of hexavalent chromium*, 1998, 21.06.2017
9. World Health Organisation (WHO), *Guidelines for Drinking-water Quality*, (3rd Ed.), 2008, 21.06.2017
10. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances, Disease Registry, *Toxicological Profile of Chromium*, 2008, 21.06.2017
11. A. Pechova, L. Pavlata, *Chromium as an essential nutrient: A review*, *Veterinary Medicine*, vol. 52, 2007, pp. 1-18
12. L. Kovacs, D. Csupir, G. Lente, T. Gunda, *Poison in Groundwater: Arsenic*, in: L. Kovacs, D. Csupir, G. Lente, T. Gunda (Eds.), 100

- Chemical Myths. Misconceptions, Misunderstandings, Explanations, Springer, Switzerland, 2014, pp. 351
13. B.A. Fowler, C.-H.S. Chou, R.L. Jones, C.J. Chen, *Arsenic*, in: G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, L.T. Friberg (Eds), *Handbook on the Toxicology of Metals*, Amsterdam, 2007, pp. 367-406
 14. Food and Agriculture Organization/World Health Organisation (FAO/WHO), Codex Alimentarius Commission, *Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Position Paper on Arsenic, CX/FAC 99/22*, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome, 1998
 15. M. Krachler, H. Emons, J. Zheng, *Speciation of antimony for the 21st century: Promises and pitfalls*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 20, 2001, pp. 79-90
 16. J. Liu, J. Z. Shi, L. M. Yu, R. A. Goyer, M. P. Waalkes, *Mercury in traditional medicines: Is cinnabar toxicologically similar to common mercurials?* *Experimental Biology and Medicine*, vol. 233, 2008, pp. 810-817
 17. W. Liu, H. Yang, B. Li, S. Xu, *Determination of Bromine and Iodine Speciation in Drinking Water Using High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, *Geostandards and Geoanalytical Research*, vol. 35, 2011, pp. 69-74
 18. J.H. Chen, K.E. Wang, S.J. Jiang, *Determination of iodine and bromine compounds in foodstuffs by CE-inductively coupled plasma MS*, *Electrophoresis*, vol. 28, 2007, pp. 4227-4232
 19. C. Thiry, A. Ruttens, L. De Temmerman, Y. J. Schneider, L. Pussemier, *Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food*, *Food Chemistry*, vol. 130, 2012, pp. 767-784
 20. H. M. Crews, *Speciation of trace elements in foods, with special reference to cadmium and selenium: Is it necessary?*, *Spectrochimica Acta Part B, Spectroscopy*, vol. 53, 1998, pp. 213-219
 21. L.J. Raymond, N.V.C. Ralston, *Mercury: selenium interactions and health implications*, *SMDJ Seychelles Medical and Dental Journal*, vol. 7, 2004, pp. 72-77
 22. I. Zwolak, H. Zaporowska, *Selenium interactions and toxicity: A review*, *Cell Biology and Toxicology*, vol. 28, 2012, pp. 31-46

23. B. Markiewicz, I. Komorowicz, A. Sajnog, M. Belter, D. Baralkiewicz, *Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS – Technique establishing metrological traceability: A review since 2000*, Talanta, vol. 132, 2014, pp. 814-828
24. T. Berg, E.H. Larsen, *Speciation and legislation – Where are we today and what do we need for tomorrow?*, Fresenius Journal Analytical Chemistry, vol. 363, 1999, pp. 431-434
25. Food and Agriculture Organization (FAO), *Standard for Rice, Codex Standard 198-1995*, 25.06.2017
26. European Union Commission (2015) Commission Regulation (EU) 2015/1006 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of inorganic arsenic in foods, 2015/1006, 25.06.2017
27. European Union Commission (2015) Recommendations on the monitoring of arsenic in food 2015/1381, 25.06.2017
28. Pesticide and Environmental Toxicology Branch, Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Agency, *Public Health Goal for Hexavalent Chromium (Cr VI) in Drinking Water*, 2011, 25.06.2017
29. California Department of Public Health, Memorandum. *State Adoption of a hexavalent chromium MCL*, 2014, 25.06.2017
30. Food and Agriculture Organization (FAO), *Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed, Codex Standard 193-1995*, 25.06.2017
31. World Health Organization (WHO), *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 25.06.2017
32. European Union Commission (2008) Commission Regulation amending Regulation (EC) No1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 629/2008, 25.06.2017
33. World Health Organization (WHO), *Bromide in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*, 2009, 25.06.2017

34. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής, για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα, 25.06.2017
35. European Law & Publications, DIRECTIVE 2002/46/EC on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements, 25.06.2017
36. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 178/2002 της Επιτροπής, για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφαλείας των τροφίμων, 25.06.2017
37. P.L. Smedley, D.G. Kinniburgh, *A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters*, Applied Geochemistry, vol. 17, 2002, pp. 517-568
38. B.K. Mandal, K.T. Suzuki, *Arsenic round the world: A review*, Talanta, vol. 58, 2002, pp. 201-235
39. P.L. Smedley, *Managing Arsenic in the Environment: from Soil to Human Health*, Edited by R. Naidu, E. Smith, G. Owens, P. Bhattacharya & P. Nadebaum, European Journal of Soil Science, vol. 58, 2007, pp. 519-520
40. C. Delgado – Andade, M. Navarro, H. López, *Determination of total arsenic levels by hydride generation atomic absorption spectrometry in foods from south-east Spain: Estimation of daily dietary intake*, Food Additives & Contaminants, vol. 20, 2003, pp. 923-932
41. R.M. Allesch, *Arsenik*. Ferd. Kleinmayr, 1959, pp. 239-250
42. J.M. Azcue and J.O. Nriagu, *Arsenic: historical perspectives*, J.O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the Environment. Part I: Cycling and Characterisation*. Wiley, New York, 1994, pp. 1-15
43. J.O. Nriagu, *Arsenic poisoning through the ages*, W.T. Frankenberger (Ed.), *Environmental Chemistry of Arsenic*. Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 1-26
44. *Arsenic in drinking water 2001 update*. National Academy Press, Washington, DC, 2001

45. C. B'Hymer, J.A. Caruso, *Review: Arsenic and its Speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 1045, 2004, pp. 1-13
46. M.O. Andraea, in: P.J. Craig (Ed.), *Organometallic Compounds in the environment: Principles and Reactions*, Longman, London, 1986, pp. 198-228
47. World Health Organization (WHO), *Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds*, Second Edition (Geneva), 2001
48. V. Taylor, B. Goodale, A. Raab, T. Schwerdtle, K. Reimer, S. Conklin, K. Francesconi, M. Karagas, *Human exposure to organic arsenic species from seafood*. *Science of the Total Environment* (this issue), 2017
49. F. Cubadda, B.P. Jackson, K.L. Cottingham, Y.O. van Horne, M.Kurzius-Spencer, *Human exposure to dietary inorganic arsenic and other arsenic species: State of knowledge, gaps and uncertainties*, *Science of the Total Environment*, 2016, pp. 1-12
50. European Food Safety Authority (EFSA), Panel on contaminants in the food chain (CONTAM): scientific opinion on arsenic in food. *EFSA Journal*, vol. 7 no. 10, 1351, 2009
51. S.M. Cohen, L.L. Arnold, B.D. Beck, A.S. Lewis, M. Eldan, *Evaluation of the carcinogenicity of inorganic arsenic*, *Critical Reviews in Toxicology*, vol 43, 2013, pp. 711-752
52. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), *Safety evaluation of certain contaminants in food*, prepared by the seventy-second meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Food Additives Services, vol. 63, 2011, pp. 153-316
53. V. Foa, A. Colombi, M. Maroni, M. Buratti, in: L. Alessio, A. Berlin, M. Bori, R. Roi (Eds.), *Arsenic in Biological Indicators for the Assessment of Human Exposure to Industrial Chemicals*, CEC ISPRA, Luxembourg, vol. 25, 1987

54. W. Goessler and D. Kuehnelt, *Chapter 31: Sample preparation for arsenic speciation*, Comprehensive Analytical Chemistry XLI, Mester and Sturgeon (Eds.), 2003, pp. 1027-1044
55. I.N. Pasiyas, N.S. Thomaidis, E.A. Piperaki, *Determination of total arsenic, total inorganic arsenic and inorganic arsenic species in rice and rice flour by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Microchemical Journal, vol. 108, 2013, pp. 1-6
56. N.N. Greenwood, A. Earsnshaw, *Chemistry of the Elements*, 1st Ed. Pergamon Press, Oxford, UK, 1984
57. K.A Francesconi and D. Kuehnelt, *Arsenic compounds in environment*, W.T. Frankenberger (Ed.), Environmental Chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 51-94
58. P. O'Neil, Arsenic. In: B.J. Alloway (Ed.), *Heavy Metals in Soils*, 2nd Ed. Blackie Academic & Professional, London, 1995, pp. 105-121
59. W.T. Frankenberger and M. Arshad, *Volatilization of arsenic*, In: W.T. Frankenberger (Ed.), Environmental Chemistry of Arsenic Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 360-380
60. Z. Slejkovec, A.R. Byrne, T. Stijve, W. Goessler and K.J. Irgolic, *Applied Organometallic Chemistry*, vol. 11, 1997, pp. 673
61. T. Punshon, M.L. Guerinot, B. Jackson, K. Scheckel, T. Warczak, A. Meharg, *Understanding arsenic dynamics in arable systems to decrease human dietary arsenic exposure*, Science of the Total Environment (this issue), 2017
62. A.J. Signes-Pastor, K. Mitra, S. Sarkhel, M. Hobbes, F. Burló, W.T. de Groot, A.A. Carbonell-Barrachina, *Arsenic speciation in food and estimation of the dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of West Bengal*, India Journal of Agricultural Food Chemistry, vol. 56, 2008, pp. 9469-9474
63. P.N. Williams, A. Villada, C. Deacon, A. Raab, J. Figuerola, A.J. Green, J. Feldmann, A.A. Meharg, *Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley*. Environmental Science Technology, vol. 41, 2007, pp. 6854-6859
64. P. Jankong, C. Chalhoud, N. Kienzl, W. Goessler, K.A. Francesconi, P. Visoottiviset, *Arsenic accumulation and speciation in freshwater fish*

- living in arsenic-contaminated waters*. Environmental Chemistry, vol. 4, 2007, pp. 11-17
65. T. Oguri, J. Yoshinaga, H. Tao, T. Nakazato, *Inorganic arsenic in the Japanese diet: daily intake and source*. Archives of the Environmental Contamination & Toxicology, vol. 66, 2014, pp. 100-112
 66. W.W. Wong, S.W. Chung, B.T. Chan, Y.Y. Ho, Y. Xiao, *Dietary exposure to inorganic arsenic of the Hong Kong population: results of the first Hong Kong total diet study*, Food Chemistry Toxicology, vol. 51, 2013, pp. 379-385
 67. Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt, X.C. Le, *Arsenic speciation analysis*, Talanta, vol. 58, 2002, pp. 77-96
 68. H.N. Lynch, G.I. Greenberg, M.C. Pollock, A.S. Lewis, *A comprehensive evaluation of inorganic arsenic in food and considerations for dietary intake analyses*, Science of the Total Environment, vol. 496, 2014, pp. 299-313
 69. C.W. Schmidt, *The challenge of regulating arsenic in rice*. Environmental Health Perspectives, vol. 123, 2015, pp. A18-19
 70. A.A. Carbonell-Barrachina, A.J. Signes-Pastor, L. Vazquez-Araujo, F. Burio, B. Sengupta, *Presence of arsenic in agricultural products from arsenic-endemic areas and strategies to reduce arsenic intake in rural villages*. Molecular Nutrition & Food Research, vol. 53, 2009, pp. 531-541
 71. A.A. Carbonell-Barrachina, X. Wu, A. Ramirez-Gandolfo, G.J Norton, F. Burló, C. Deacon, A.A. Meharg A.A., *Inorganic arsenic contents in rice-based infant foods from Spain, UK, China and USA* Environmental Pollution, vol.163, 2012, pp. 77-83
 72. A.J. Signes-Pastor, M. Carey, A.A. Meharg, *Inorganic arsenic in rice-based products for infants and young children*. Food Chemistry, vol. 191, 2016, pp. 128-134
 73. G.X. Sun, P.N. Williams, Y.G. Zhu, C. Deacon, A.M. Carey, A. Raab, J. Feldmann, A.A. Meharg, *Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments*. Environmental International, vol. 35, 2009, pp. 473-475

74. M.R. Karagas, T. Punshon, V. Sayarath, B.P. Jackson, C.L. Folt K.L. Cottingham, *As-sociation of rice and rice product consumption with arsenic exposure early in life* JAMA Pediatrics, vol. 170, 2016, pp. 609-616
75. European Food Safety Authority (EFSA), *Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population*. EFSA Journal, vol. 12 no 3, 2014, pp. 3597
76. F. Cubadda, S. Ciardullo, M. D'amato, A. Raggi, F. Aureli, M. Carcea, *Arsenic contamination of the environment-food chain: a survey on wheat as a test plant to investigate phytoavailable arsenic in Italian agricultural soils and as a source of inorganic arsenic in the diet* Journal of Agricultural Food Chemistry, vol. 58, 2010, pp. 10176-10183
77. US Food and Drug Administration (US FDA), *Arsenic in Rice and Rice Products Risk Assessment Report*, 2016, 05.07.2017
78. C.C. Carignan, T. Punshon, M.R. Karagas, K.L.Cottingham, *Potential exposure to arsenic from infant rice cereal*. Annals of Global Health, vol. 82, 2016, pp. 221-224
79. B.P. Jackson, V.F. Taylor, T. Punshon, K.L Cottingham, *Arsenic concentration and speciation in infant formulas and first foods*. Pure Applied Chemistry, vol. 84, 2012, pp. 215-223
80. R. Juskelis, W. Li, J. Nelson, J.C. Cappozzo, *Arsenic speciation in rice cereals for infants* Journal of Agricultural & Food Chemistry, vol. 61, 2013, pp. 10670-10676
81. A.A. Meharg, G. Sun, P.N. Williams, E. Adomako, C. Deacon, Y.G. Zhu, J. Feldmann, A. Raab, *Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern*. Environmental Pollution, vol. 152, 2008, pp. 746-749
82. N.P. Vela, D.T. Heitkemper, *Total arsenic determination and speciation in infant food products by ion chromatography-inductively coupled plasma – mass spectrometry* Journal Chromatography, vol. A 789, 2004, pp. 339-348
83. S. Munera-Picazo, A. Ramirez-Gandolfo, F. Burlo, A.A. Carbonell-Barrachina, *Inorganic and total arsenic contents in rice-based foods for children with celiac disease*. Journal of Food Science, vol. 79, 2014, pp. T122-128

84. R.A. Goyer (Chair), *Arsenic in Drinking Water*, National Academy Press, Washington, DC, 1999, pp. 152-192
85. M. Vahter, Variation in human metabolism of arsenic. In: W.R. Chappel, C.O. Abernathy, R.L. Calderon (Eds.), *Arsenic exposure and health effects*. Amsterdam: Elsevier, 1999, pp. 267-279
86. M.J. Mass, A. Tennant, R.C. Roop, W.R. Cullen, M. Styblo and D.J. Thomas, *Chemical Research in Toxicology*, vol. 14, 2001, pp. 305
87. International Agency for Research on Cancer (IARC), *Arsenic, Metals, Fibres and Dusts*. Lyon: IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. vol. 100C, 2012, 10.07.2017
88. D.J. Carlin, M.F. Naujokas, K.D. Bradham, J. Cowden, M. Heacock, H.F. Henry, J.S. Lee, D.J. Thomas, C. Thompson, E.J. Tokar, M.P. Waalkes, L.S. Brinbaum, W.A. Suk, *Arsenic and environmental health: state of the science and future research opportunities*. Environmental Health Perspectives, vol. 124, 2016, pp. 890-899
89. D. D'Ippoliti, E. Santelli, M. De Sario, M. Scortichini, M. Davoli, P. Michelozzi, *Arsenic in drinking water and mortality for cancer and chronic diseases in central Italy, 1990 – 2010*. PLoS One 10, e0138182, 2015
90. E. García-Esquinas, M. Pollán, J.G. Umans, K.A. Francesconi, W. Goessler, E. Guallar, B. Howard, J. Farley, L.G. Best, A. Navas-Acien, *Arsenic exposure and cancer mortality in a US-based prospective cohort: the strong heart study*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, vol. 22, 2013, pp. 1944 - 1953
91. K.A. Moon, E. Guallar, J.G. Umans, R.B. Devereux, L.G. Best, K.A. Francesconi, W. Goessler, J. Pollak, E.K. Silbergeld, B.V Howard, A. Navas-Acien, *Association between exposure to low to moderate arsenic levels and incident cardiovascular disease. A prospective cohort study*. Annals International Medicine, vol. 159, 2013, pp. 649-659
92. A. Rahman, M. Vahter, E.C. Ekström, M. Rahman, A.H Golam Mustafa, M.A Wahed, M. Yunus, L.A. Persson, *Association of arsenic exposure during pregnancy with fetal loss and infant death: a cohort study in Bangladesh*. American Journal of Epidemiology, vol. 165, 2007, pp. 1389-1396

93. M. Vahter, *Health effects of early life exposure to arsenic*. Basic Clinical Pharmacology Toxicology, vol. 102, 2008, pp. 204-211
94. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), *Toxicological profile for arsenic*. U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA, 2007
95. M. M. Nearing, I. Koch, K. J. Reimer, *Complementary arsenic speciation methods: A review*, Spectrochimica Acta Part B, 2014, pp. 150-162
96. A. I. Καραμάνος, *Τα σιτηρά των θερμών κλιμάτων, Αραβόσιτος, Σόργο, Ρύζι, Κεχρί*, Εκδ. Παπαζήση, 1999, σελ. 250-263, 280-289
97. T. Llorente-Mirandes, J. Calderón, J.F. López-Sánchez, F. Centrich, R. Rubio, *A fully validated method for the determination of arsenic species in rice and infant cereal products*, Pure Applied Chemistry, vol. 84, 2012, pp. 225-238
98. A. Meharg, P.N. Williams, E. Adomako, Y.Y. Lawgali, C. Deacon, A. Villada, et al., *Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice*, Environmental Science & Technology, vol. 43, 2009, pp. 1612-1617
99. Κώδικας Τροφίμων & Ποτών (Κ.Τ.Π) Ισχύουσες εκδόσεις των άρθρων - XII. Δημητριακά - Προϊόντα εξ αυτών, Άρθρο 101: Ρύζι, 17.07.2017
100. M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, *Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice*, Trends in Analytical Chemistry, vol. 65, 2015, pp. 122-136
101. L. Jorhem, C. Arstand, B. Sundström, M. Baxter, P. Stokes, J. Lewis, et al., *Elements in rice from the Swedish market: 1. Cadmium, lead and arsenic (total and inorganic)*, Food Additives & Contaminants, vol. 25A, 2008, pp. 284-292
102. H. Lamont, *Concentration of inorganic arsenic in samples of white rice from the United States*, Journal of Food Composition & Analysis, vol. 16, 2003, pp. 687-695
103. A. Sommella, C. Deacon, G. Norton, M. Pigna, A. Violante, A.A. Meharg, *Total arsenic, inorganic arsenic and other elements*

- concentrations in Italian rice grain varies with origin and type*, Environmental Pollution, vol. 181, 2013, pp. 38-43
104. L. Ma, L. Wang, J. Tang, Z. Yang, *Optimization of arsenic extraction in rice samples* by Plackett – Burman design and response surface metholody, Food Chemistry, vol. 204, 2014, pp. 283-288
 105. A.M. Carey, K.J. Scheckel, E. Lombi, M. Newville, Y. Choi, G.J. Norton, A.A. Meharg, *Grain unloading of arsenic species in rice*. Plan Physiology, vol. 152 no 1, 2010, pp. 309-319
 106. J. Sun, L. Ma, Z. Yang, H. Lee, L. Wang, *Speciation and determination of bioavailable arsenic species in soil samples by one-step solvent extraction and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry*. Journal of Separation Science, vol. 38 no 6, 2015, pp. 943-950
 107. G. Chen and T. Chen, *SPE speciation of inorganic arsenic in rice followed by hydride-generation atomic fluorescence spectrometric quantification*. Talanta, vol. 119, 2009, pp. 202-206
 108. China Food Standard Agency, *Maximum levels of contaminants in food* (GB 2762), Beijing, 2012
 109. I. Baer, M. Baxter, V. Devesa, D. Vélez, G. Raber, R. Rubio et al., *Performance of laboratories in speciation analysis in seafood - Case of methylmercury and inorganic arsenic*. Food Control, vol. 22 no 12, 2011, pp. 1928-1934
 110. T. Llorente-Mirandes, J. Calderón, F. Centrich, R. Rubio, J. F. López-Sánchez, *A need for determination of arsenic species at low levels in cereal-based food and infant cereals. Validation of a method by IC-ICPMS*, Food Chemistry, vol. 147, 2014, pp. 377-385
 111. D.J. Douglas S.D. and Tanner, 1998, *Fundamental considerations in ICP-MS*. In: Montaser A. ed.: Inductively coupled plasma mass spectrometry. Wiley-WCH, New York, 1998, pp. 615-679
 112. R. Thoma, *A beginner's Guide to ICP-MS Part I*, Spectroscopy, vol. 16 no 4, 2001, pp. 38-42
 113. R.F.J. Dams, J. Goosens, L. Moens, *Spectral and Non-Spectral Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry*, Microchimica Acta, vol. 119, 1995, pp. 277-286

114. T. Narukawa, K. Chiba, *Oxygenation mechanism of ion in dynamic reaction cell ICP-MS*, Analytical Science, vol. 29, 2013, 747-752
115. R.S. Houk, *Mass spectrometry of inductively coupled plasmas*. Analytical Chemistry, vol. 58, 1986, pp. A95-105
116. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*, 5^η Έκδ., Κωσταράκης Α.Ε., vol. 11Γ, 2005, pp. 311-325
117. K. E. Jarvis, A. L. Gray and R. S. Houk, 1192, *Handbook of Inductively Coupled Mass Spectrometry*, New York: Chapman and Hall
118. Ν.Σ. Θωμαΐδης, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, ΕΚΠΑ, Διαφάνειες Ενόργανης Ανάλυσης, ICP-MS; <https://eclass.uoa.gr/modules/document/?course=CHEM233>
30.07.2017
119. G. Tyler, J. Yvon S.A.S, Horiba Group, *ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared*, ICP OPTICAL EMISSION SPECTROSCOPY TECHNICAL NOTE 05, pp. 1-11 Longjumeau, France, 30.07.2017
120. International Rice Research Institute (IRRI), Database of World Rice Statistics (WRS) Online Facility, Rice production (tons) of milled rice per country in 2017, 30.07.2017
121. International Rice Research Institute (IRRI), Database of World Rice Statistics (WRS) Online Facility, Total consumption (tons) of milled rice per country in 2017
122. "Hardware Maintenance Manual", Agilent 7700 Series ICP-MS, Agilent Technologies Inc. 2013, Overview "Function of Components" p.1
123. Απόφαση της Επιτροπής της 12.8.2002 για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/EK του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, (2002/657/EK) [κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό Ε(2002) 3044, 28.03.2018
124. Guidance for the accreditation of generic methods & methods of flexible scope of determination of metals in foods, Hellenic Accreditation System, ESYD G-METALS/01/01/20-10-2016 p.1-6
125. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 333/2007 της Επιτροπής της 28ης Μαρτίου 2007 για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μολύβδου, καδμίου, υδραργύρου, ανόργανου κασσιτέρου, 3-μονοχλωροπροπανοδιόλης και

πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στα τρόφιμα,
06.05.2018

126. *Guide to Quality in Analytical Chemistry, An Aid to Accreditation*, EURACHEM/CITAC Guide, 3rd Edition, QAC, 2016
127. Food and Agricultural Organization (FAO), AGES “*Things to know about the Ring test*”; http://www.fao.org/ag/againfo/home/documents/2015_Announcement_Ring_test.pdf 16.05.2018
128. Fapas Proficiency Testing Programme 2018-2019 Issue 2: 22.03.2018 Fera Science Ltd.; <https://fapas.com/new-2018-fapas-programme> 16.05.2018
129. C.A. Georgiou, G.P. Danezis, *Food Authentication, Management, Analysis and Regulation*, John Wiley & Sons Ltd., Introduction, 2017
130. G. Mencinicopschi and D. Raba, *Siguranța alimentară: autenticitate și trasabilitate*, Mirton Publisher, Timișoara, 2005