



ΤΕΙ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ



**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΩΧΡΑΤΟΕΙΝΩΝ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ»

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΚΟΚΚΩΣΗ ΠΑΥΛΙΝΑ, ΑΜ: 2011058

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2017

ΤΕΙ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΩΧΡΑΤΟΕΙΝΩΝ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ»

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΚΟΚΚΩΣΗ ΠΑΥΛΙΝΑ, ΑΜ: 2011058

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΠΟΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. *Ιωάννη Καπόλο* για την πολύτιμη καθοδήγησή του.

Επιπλέον, θέλω να αφιερώσω την πτυχιακή μου εργασία στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση που μου παρείχε σε όλα τα χρόνια της φοίτησής μου στο Τ.Ε.Ι.Πελοποννήσου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μύκητες ευθύνονται για σημαντικές αλλοιώσεις στα νωπά και μεταποιημένα τρόφιμα. Η αλλοίωση αυτή δημιουργείται τόσο στην επιφάνεια των τροφίμων με τη μορφή της μούχλας, όσο και στο εσωτερικό τους, μέσω της παραγωγής τοξικών ουσιών που είναι γνωστές ως μυκοτοξίνες. Μια γνωστή μυκοτοξίνη είναι η ωχρατοξίνη που είναι γνωστή για την παρουσία της σε τρόφιμα καθημερινής διατροφής όπως το κρασί. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός των μυκοτοξινών στο κρασί. Αρχικά αναπτύσσονται γενικές έννοιες σχετικά με τις μυκοτοξίνες. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των ωχρατοξινών. Τέλος, αποδίδονται τα επίπεδα ωχρατοξίνης Α στο κρασί τόσο σε διεθνή, όσο και σε εγχώριο επίπεδο.

ABSTRACT

Fungi are responsible for significant lesions in fresh and processed foods. This lesion is created both on the surface of food in the form of mold and inside, through the production of toxic substances known as mycotoxins. A known mycotoxin is ochratoxin known for its presence in everyday foods such as wine. The purpose of this study is to determine mycotoxins in wine. Initially, general concepts about mycotoxins are being developed. The techniques used for the analysis and determination of ochratoxins are presented below. Finally, the levels of ochratoxin A in wine are attributed to both international and domestic levels.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Ωχρατοξίνες	15
1.2.1 Γενικά	15
1.2.2 Είδη και ιδιότητες Ωχρατοξινών	16
1.2.3 Ωχρατοξίνες στο κρασί.....	17
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσία Ωχρατοξίνης Α στο κρασί ..	19
1.3.1 Γενικά	19
1.3.2 Περιοχή και κλίμα	21
1.3.3 Καλλιέργεια και χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων.....	21
1.3.4 Επίδραση πρακτικών οινοποίησης	22

1.4	Μέτρα πρόληψης	23
1.4.1	Στον αγρό	23
1.4.2	Στο οινοποιείο	24
1.5	Νομοθεσία.....	25
1.5.1	Ευρωπαϊκή Νομοθεσία	25
1.5.2	Παγκόσμια Νομοθεσία	27
1.5.3	Ελληνική Νομοθεσία	29
1.6	Επιπτώσεις μυκοτοξινών στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων.....	32
1.6.1	Γενικά	32
1.6.2	Επιπτώσεις στον άνθρωπο	32
1.6.3	Οι επιπτώσεις των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων	34
1.6.4	Οικονομικές Επιπτώσεις.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΩΝ.....		36
2.1	Δειγματοληψία	36
2.2	Προετοιμασία δείγματος.....	36
2.3	Εκχύλιση	37
2.3.1	Γενικά	37
2.3.2	Εκχύλιση στερεής φάσης	37
2.4	Καθαρισμός.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....		42
3.1	Γενικά.....	42
3.2	Υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης HPLC.....	42
3.2.1	Γενικά	42
3.2.2	Οργανολογία	43

3.2.3	Εφαρμογές.....	47
3.2.4	Άλλες τεχνικές.....	49
3.2.4.1	RP-HPLC.....	49
3.2.4.2	LC/MS.....	50
3.3	Αέρια Χρωματογραφία.....	50
3.3.1	Γενικά.....	50
3.3.2	Οργανολογία.....	51
3.3.3	Εφαρμογές.....	54
3.3.4	Άλλες τεχνικές.....	56
3.3.4.1	Αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών (GC-MS).....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο. ΕΠΙΠΕΔΑ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ.....		57
4.1	Γενικά.....	57
4.2	Παρουσία ωχρατοξίνης Α σε διεθνή επίπεδα.....	58
4.3	Παρουσία ωχρατοξίνης Α στα Ελληνικά κρασιά.....	60
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....		65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Κατηγορίες Μυκοτοξινών και μύκητες που τις παράγουν	13
Πίνακας 1.2 Ανώτερα επιτρεπτά όρια Μυκοτοξινών σύμφωνα με την Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU) και των Ηνωμένων Πολιτειών (USA).....	29
Πίνακας 1.3 Μέγιστα επιτρεπτά όρια Ωχρατοξίνης Α σε διάφορα προϊόντα.....	31
Πίνακας 4.1 Επίπεδα ωχρατοξίνης Α σε διάφορες χώρες	59
Πίνακας 4.2 Επίπεδα Ωχρατοξίνης Α	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Χημική δομή της ωχρατοξίνης Α.	16
Εικόνα 1.2 Στάδια μετατροπής της ωχρατοξίνης	17
Εικόνα 1.3 Προσβεβλημένα σταφύλια από <i>Aspergillus sp.</i>	20
Εικόνα 2.1 Στάδια εφαρμογής εκχύλισης στερεάς φάσης	39
Εικόνα 3.1 Τυπική διάταξη Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης.....	47
Εικόνα 3.2 Τυπική διάταξη Αέριου Χρωματογράφου.....	54
Εικόνα 4.1 Προσβεβλημένη ρόγα σταφυλιού	57

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1 Πρότυπο ΟΤΑ (διακοπτόμενη γραμμή) και οίνος μολυσμένος με ΟΤΑ (πλήρη γραμμή)..... 48

Σχήμα 4.1 HPLC-FLD Χρωματογραφήματα: a) πρότυπου διαλύματος ΟΤΑ, b) δείγμα οίνου αρνητικό για ΟΤΑ, c) δείγμα οίνου θετικό για ΟΤΑ. 63

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μύκητες αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία οργανισμών που προκαλούν σημαντική αλλοίωση στα νωπά και μεταποιημένα τρόφιμα. Υπολογίζεται ότι ποσοστό 5-10% της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων αλλοιώνεται από μύκητες πριν φτάσει στον τελικό καταναλωτή με αντίστοιχη οικονομική απώλεια για τον τομέα της μεταποίησης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αλλοίωση των τροφίμων δεν περιορίζεται μόνο στην εμφανή παρουσία του μύκητα (μούχλας) στην επιφάνεια των τροφίμων, γεγονός που γίνεται εύκολα αντιληπτό από τον καταναλωτή τις περισσότερες φορές, αλλά ορισμένα είδη έχουν την ικανότητα παραγωγής τοξικών ουσιών που είναι γνωστές ως μυκοτοξίνες.

Μια γνωστή μυκοτοξίνη είναι η ωχρατοξίνη που είναι γνωστή για την παρουσία της σε τρόφιμα καθημερινής διατροφής όπως τα δημητριακά, ο καφές, τα αποξηραμένα φρούτα, το κακάο, το κρασί, κλπ. Σημαντικότερη από τις ωχρατοξίνες είναι η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) που παράγεται από διάφορα είδη του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* και ευθύνεται για διάφορες παθήσεις όπως βλάβες στα νεφρά και στο ανοσοποιητικό σύστημα, τερατογενέσεις, ενώ είναι εν δυνάμει καρκινογόνος ουσία. Υπάρχουν διάφορες αναφορές από πολλές χώρες στον κόσμο που αναφέρουν υψηλή συχνότητα επιμόλυνσης με ΟΤΑ σε μεγάλο αριθμό τροφίμων, γεγονός που οδήγησε Διεθνείς Οργανισμούς και Φορείς Ελέγχου στη διεξοδική έρευνα και πραγματοποίηση μελετών για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας του προβλήματος. Τα σταφύλια, οι σταφίδες, ο χυμός σταφυλιού και το κρασί μπορεί να θεωρηθούν προϊόντα υψηλού κινδύνου λόγω της παρουσίας του μύκητα *Aspergillus carbonarius*. Αυτό έχει οδηγήσει την ΕΕ να θεσπίσει χαμηλά νομοθετικά όρια ανίχνευσης ΟΤΑ για το κρασί, το χυμό σταφυλιού και τις σταφίδες. Θα πρέπει βέβαια να τονιστεί ότι η παρουσία των μυκοτοξινών παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση από χρόνο σε χρόνο, κυρίως λόγω του μεγάλου αριθμού παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων, όπως το κλίμα και οι γεωγραφικές συνθήκες, οι τεχνικές καλλιέργειας, η μετασυλλεκτική μεταχείριση του προϊόντος, κλπ.

Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητο όλα τα αγροτικά προϊόντα που προορίζονται για τον άνθρωπο ή για ζωοτροφές να υποβάλλονται σε συνεχή έλεγχο. Οι υπάρχουσες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των μυκοτοξίνων χαρακτηρίζονται τόσο από υψηλή ακρίβεια και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, όσο και από μειονεκτήματα. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός των μυκοτοξίνων στο κρασί.

Για την καλύτερη και αποδοτικότερη μελέτη του εξεταζόμενου αντικείμενου, η παρούσα μελέτη χωρίστηκε σε τέσσερα κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο αναπτύσσονται γενικές σχέσεις με τις μυκοτοξίνες. Αναλυτικότερα, προσδιορίζονται τα είδη και οι ιδιότητες των ωχρατοξίνων, και αναλύεται ο τρόπος με τον οποίο η παρουσία τους επηρεάζει το κρασί. Στα δύο επόμενα κεφάλαια που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των ωχρατοξίνων. Στο τελευταίο μέρος αποδίδονται τα επίπεδα ωχρατοξίνης Α στο κρασί τόσο σε διεθνή, όσο και σε εγχώριο επίπεδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

1.1 Εισαγωγή

Οι μυκοτοξίνες παράγονται από το μεταβολισμό νηματοειδών μυκήτων και είναι τοξικές τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα όταν καταναλώνονται μέσω της τροφής και των ζωοτροφών. Ο αριθμός των ειδών των μυκήτων έχει υπολογιστεί ότι είναι πάνω από 100.000 και ο γνωστός αριθμός τους ανέρχεται στις 60, ενώ τα είδη των μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές είναι σχετικά λίγα, περίπου 220. Οικυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, η πατουλίνη και οι ωχρατοξίνες (Kabaketal., 2006).

Πίνακας 1.1 Κατηγορίες Μυκοτοξινών και μύκητες που τις παράγουν

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

Πηγή: Kabaketal., 2006

Επιπλέον, οι μυκοτοξίνες μπορούν να παραχθούν και να αναπτυχθούν τόσο στις καλλιέργειες στα χωράφια, όσο συνηθέστερα στις ζωοτροφές οι οποίες είναι

αποθηκευμένες διότι το οξυγόνο που υπάρχει σε συνθήκες αποθήκευσης είναι μειωμένο και ευνοείται η μυκητιακή ανάπτυξη. Επίσης, η ανάπτυξη των μυκήτων λαμβάνει μέρος και σε βιομηχανικά επεξεργασμένες τροφές. Σύμφωνα με εκτιμήσεις το 25% των ζωοτροφών παγκοσμίως μολύνονται με μυκοτοξίνες κάθε χρόνο.

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

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων και κατ' επέκταση των μυκοτοξινών είναι:

- η υγρασία (> 80% σχετική υγρασία)
- η θερμοκρασία (7,5-40°C)
- φως (μεγαλύτερη παραγωγή με απουσία φωτός)
- pH (ιδανικό 4-4,6)
- υπόστρωμα (ευνοϊκό υπόστρωμα είναι τα προϊόντα φυτικής προέλευσης)
- παρουσία μυκοστατικών (NaCl, σορβικό οξύ, καφεΐνη, κ.α.) (Varga *et al.*, 2005).

Οι ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξής τους περιγράφονται όταν η υγρασία είναι υψηλή (πάνω από 70%), η θερμοκρασία μεταξύ 20°C-30°C, ενώ μπορούν να επιζήσουν και σε θερμοκρασίες μεταξύ 0°C-60°C. Επιπλέον, ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξής τους δημιουργεί το αναερόβιο περιβάλλον, ενώ ταυτόχρονα συντελεί σε μεγάλο βαθμό και το είδος του μύκητα καθώς υπάρχουν και μύκητες που χρειάζονται ειδικές συνθήκες για να αναπτυχθούν. Τέλος, ο αριθμός των μυκήτων επηρεάζει και το βαθμό ανάπτυξής τους, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός τους τόσο μεγαλύτερη ανάπτυξη παρουσιάζεται.

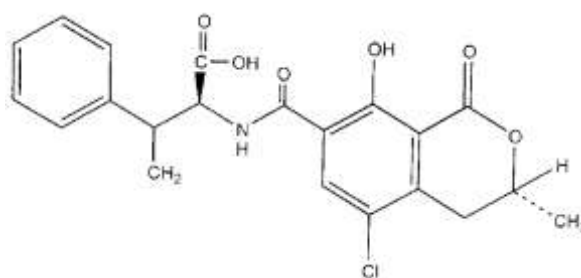
Οι συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών οι οποίες είναι σημαντικές για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, μετριοούνται συνήθως σε $\mu\text{g}/\text{Kg}$ τροφής(ppb). Οι μυκοτοξίνες, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αναπτύξεως ορισμένων μυκήτων, είτε απεκκρίνονται μέσα στο υλικό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

1.2 Ωχρατοξίνες

1.2.1 Γενικά

Οι Ωχρατοξίνες (ochratoxins, OT) παράγονται από διάφορα στελέχη μυκήτων των ειδών *Penicillium* και *Aspergillus* sp. (*Aspergillus Ochraceus* και *Aspergillus Carbonarius*), τα οποία αναπτύσσονται σε διάφορες συνθήκες και για το λόγο αυτό λέγεται ότι είναι από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες τοξίνες στις διάφορες τροφές.

Η πιο σημαντική από τις ωχρατοξίνες είναι η ωχρατοξίνη Α (OTA), καθώς είναι η περισσότερο τοξική και εντοπίζεται συχνότερα σε σχέση με τις ωχρατοξίνες Β και C. Η OTA απομονώθηκε για πρώτη φορά στη Νότια Αφρική το 1965 από τον μύκητα *Aspergillus ochraceus*, στον οποίο οφείλεται και η μετέπειτα ονομασία της (van de Merwe *et al.*, 1965). Αναλυτικότερα, στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές η ωχρατοξίνη Α παράγεται κυρίως από τα είδη *A. ochraceus*, *A. ostianus* και *A. melleus* ενώ στις εύκρατες περιοχές παράγεται κυρίως από είδη του γένους *Penicillium*.



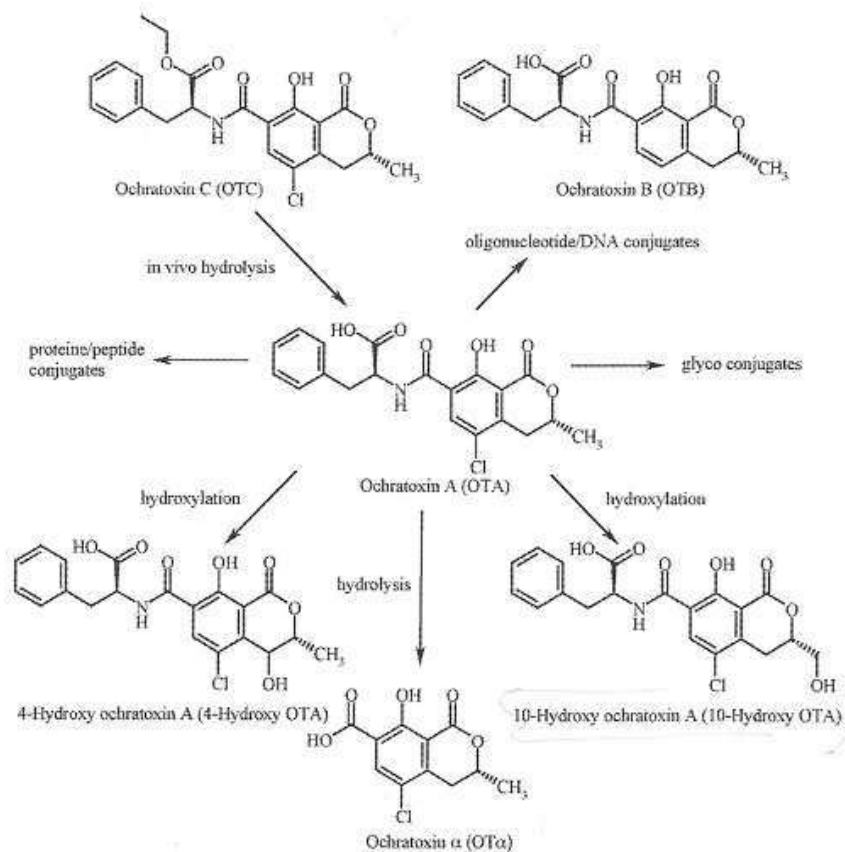
Εικόνα 1.1 Χημική δομή της ωχρατοξίνης Α.

Συναντάται, σε ελάχιστες ποσότητες συνήθως, σε πολλά φυτικά προϊόντα στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα δημητριακά, οι ξηροί καρποί, τα φασόλια, τα καρυκεύματα, το κακάο, ο καφές. Επιπλέον από το 1996 έχει ανιχνευτεί στο ζύθο και στον οίνο (Zimmerli and Dick, 1996). Παρόλο που στο παρελθόν στα δημητριακά θεωρούνταν η κύρια πηγή μόλυνσης από ωχρατοξίνες Α(ΟΤΑ), πρόσφατες μελέτες σε Ευρωπαϊκά δείγματα έχουν εστιάσει στους ερυθρούς οίνους ως πηγή πρόσληψης ωχρατοξίνης Α (Commission of the European Communities, 2005). Πιο συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι στην ΕΕ το 10% περίπου της συνολικής πρόσληψης ωχρατοξίνης Α προέρχεται από κόκκινο κρασί (Miraglia and Brera, 2002).

1.2.2 Είδη και ιδιότητες Ωχρατοξινών

Οι ωχρατοξίνες είναι σχετικά σταθερές στη θερμότητα. Υπάρχουν τρία είδη ωχρατοξινών: Οι Ωχρατοξίνες Α, Β, και C τα οποία παράγονται από διάφορα γένη των *Aspergillus* και *Penicillium* μυκήτων (και ιδιαίτερα του μύκητα *Aspergillus ochraceus*) που αναπτύσσονται σε ημιτροπικά και θερμά κλίματα (Krogh, 1987).

Χημικά, οι ωχρατοξίνες είναι ασθενή οργανικά οξέα που αποτελούνται από μια ομάδα διυδροϊσοκουμαρίνης (dihydroisocoumarin) που ενώνεται με πεπτιδικό δεσμό με μια L-Φαινυλαλανίνη. Οι τρεις τοξίνες διαφέρουν ως προς τη δομή ελαφρώς μεταξύ τους. Ωστόσο, αυτές οι διαφορές έχουν μεγάλη σημασία στην τοξικότητα της κάθε μια από αυτές. Όπως προαναφέρθηκε η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), είναι και η πιο συχνά απαντόμενη, αλλά και η πιο τοξική από τις τρεις. Όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 1.2, αντικατάσταση του χλωρίου με ένα άτομο υδρογόνου μας δίνει την ωχρατοξίνη Β (ΟΤΒ), η οποία είναι κατά 10-20 φορές λιγότερο τοξική από την Α, τόσο in vivo όσο και in vitro.



Εικόνα 1.2 Στάδια μετατροπής της ωχρατοξίνης

Η ωχρατοξίνη C (OTC) παράγεται από περαιτέρω δομικές αλλαγές, η οποία δεν φαίνεται να έχει τοξική δράση. Ωστόσο, μια πρόσφατη δημοσίευση υποστηρίζει ότι η OTC είναι πολύ πιο τοξική από την OTA ή την OTB στην κυτταρική σειρά THP-1 από ανθρώπινο μονοκύτταρο (μονοπύρηννο, φαγοκυτταρικό λευκοκύτταρο) (Müller et al., 2003).

1.2.3 Ωχρατοξίνες στο κρασί

Η παρουσία της ωχρατοξίνης A στους οίνους αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1995, όταν ανιχνεύθηκε σε εμπορικούς Ελβετικούς οίνους. Ακολούθησαν πολλές μελέτες, με τις πιο πρόσφατες να έχουν δείξει σημαντικό επίπεδο επιμόλυνσης με υψηλές συγκεντρώσεις τοξίνης (μέχρι 7,6ng/ml) και ποσοστό ανίχνευσης (μέχρι 92%) στους ερυθρούς οίνους που προέρχονται από τις νότιες και θερμότερες περιοχές της Ευρώπης και της Βορείου Αφρικής.

Πολλοί ερευνητές ανίχνευαν την παρουσία της ωχρατοξίνης A σε οίνους και γλεύκη ποικίλης προέλευσης και συσκευασίας. Αναλυτικότερα, οι Zimmerli και Dick πραγματοποίησαν μια έρευνα σε 133 οίνους που λήφθηκαν από την ελβετική λιανική αγορά και η παρουσία της ωχρατοξίνης A κυμαινόταν από $< 0,003$ έως $0,338$ ng/ml. Οι Majerus και Otteneder σε μελέτη 20 Γαλλικών οίνων ανέφεραν ότι τα επίπεδα ωχρατοξίνης A παρουσίασαν τιμές από $0,13$ έως $0,78$ ng/ml. Σε έρευνα που διεξήχθη από το Βρετανικό Υπουργείο Τροφίμων και Ιχθυρών (MAFF) παρατηρήθηκε ότι στους τέσσερις από τους είκοσι οίνους που αναλύθηκαν τα επίπεδα ωχρατοξίνης A ήταν από $0,2$ έως 4 ng/ml. Οι Viscontietal. σε 56 δείγματα Ιταλικών οίνων ανέφεραν επίπεδα ωχρατοξίνης A από $< 0,01$ έως $7,6$ ng/ml. Τέλος, οι Taleoetal. ανέφεραν τιμές ωχρατοξίνης A μεταξύ $0,05$ - $3,80$ ng/ml για ιταλικούς οίνους συσκευασμένους σε ασηπτική χάρτινη συσκευασία, με την τοξίνη να ανιχνεύεται σε ποσοστό 97% των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Ως προς τους Ελληνικούς οίνους εκτενής αναφορά γίνεται σε παράγραφο που ακολουθεί.

Με κριτήριο το χρώμα του οίνου, οι Majerus και Otteneder λαμβάνοντας υπόψη στοιχεία για 450 δείγματα από βιβλιογραφία και 400 δείγματα από τις έρευνές τους, αναφέρουν ότι η ωχρατοξίνη A ανιχνεύεται συνηθέστερα και μάλιστα σε εντυπωσιακά υψηλότερες συγκεντρώσεις στους ερυθρούς οίνους σε σύγκριση με τους ροζέ και λευκούς οίνους. Αναλυτικότερα, στην έρευνα τους η ωχρατοξίνη A ανιχνεύτηκε σε 25% των λευκών, 40% των ροζέ και 54% των ερυθρών δειγμάτων οίνου. Επιπλέον διαφορές στα επίπεδα ωχρατοξίνης A μεταξύ λευκών και ερυθρών οίνων αναφέρουν οι Zimmerli και Dick, όπου τα επίπεδα ωχρατοξίνης A είναι $0,011$ ng/ml για τους οίνους και $0,079$ ng/ml για τους ερυθρούς οίνους. Οι Ospitaletal. έχουν παρατηρήσει την παρουσία της ωχρατοξίνης A σε 50% των δειγμάτων οίνου που αναλύθηκαν, με το περιεχόμενο της τοξίνης να κυμαίνεται από $0,01$ έως $0,27$ ng/ml στους ερυθρούς οίνους και από $0,01$ έως $0,02$ ng/ml στους λευκούς οίνους. Οι Viscontietal. ανίχνευαν την τοξίνη σε 95% των ερυθρών και 75% των λευκών οίνων που εξέτασαν με μέσους όρους περιεχόμενης ωχρατοξίνης A $1,24$ ng/ml και $0,29$ ng/ml αντίστοιχα. Τέλος, οι Soleaset.al. εντόπισαν ότι η ωχρατοξίνη A είναι συχνότερα παρούσα στους ερυθρούς οίνους παρά στους λευκούς οίνους.

Με κριτήριο τον τόπο προσέλευσης, οι Zimmerli και Dick παρατήρησαν ότι οι ερυθροί οίνοι που προέρχονται από τις νότιες περιοχές ήταν συχνότερα επιμολυσμένοι και περιείχαν υψηλότερα επίπεδα ωχρατοξίνης Α. Οι Pietri et al. επιβεβαιώνοντας το γεγονός αυτό, έδειξαν ότι οι οίνοι από την νότια Ιταλία ήταν πιο μολυσμένες από τους οίνους από άλλες Ιταλικές περιοχές. Οι Majerus και Otteneder συγκρίνοντας οίνους από διάφορες περιοχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Γερμανία, Ιταλία, Γαλλία), διαπίστωσαν ότι οι ερυθροί οίνοι από τις νότιες περιοχές εμφάνισαν συχνότητα επιμόλυνσης περίπου 95%. Αντιθέτως, οι οίνοι που προήλθαν από βόρειες περιοχές το ποσοστό επιμόλυνσης ήταν μόλις 12%. Για τους ερυθρούς οίνους που παράγονται σε μεσογειακές χώρες οι Markaki et al. αναφέρουν επιμόλυνση με ωχρατοξίνη Α σε ποσοστό 100%. Παρόμοια ευρήματα είχαν και οι Ospitalet al., που είχαν ανιχνεύσει υψηλά επίπεδα επιμόλυνσης. Στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι κανένα από τα παραπάνω δείγματα δεν προερχόταν από την Ελλάδα.

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσία Ωχρατοξίνης Α στο κρασί

1.3.1 Γενικά

Η παρουσία της ΟΤΑ στο μούστο και το κρασί οφείλεται στην επιμόλυνση των σταφυλιών από τους μύκητες, οι οποίοι αναπτύσσονται τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή τους, ή κατά τη διάρκεια των σταδίων πριν την παρασκευή του κρασιού (Cecchini et al., 2006). Η παρουσία της ΟΤΑ στα σταφύλια οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη του *Aspergillus carbonarius* (Rousseau and Blateyron, 2002).

Η ευρύτερη περιοχή της νοτιοανατολικής Μεσογείου σχετίζεται με υψηλά ποσοστά επιμόλυνσης των σταφυλιών από *Aspergillus Nigri*, εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας και ηλιοφάνειας κατά την διάρκεια της ημέρας, σε συνδυασμό με τις χαμηλές βροχοπτώσεις τον Αύγουστο. Αναλυτικότερα, τα στελέχη των μυκήτων *Aspergillus* διαχειμάζουν στο έδαφος. Τα μικλιακά κονίδια, τα οποία ενδημούν στην επιφάνεια της ρώγας, πολλαπλασιάζονται κατά την ωρίμανση και δημιουργούν ασκοσπόρια στο σταφύλι, προκαλώντας σάπισμα στις προσβεβλημένες ρώγες, οι οποίες συρρικνώνονται και ξεραίνονται (ασθένεια μαύρης σήψης), όπως

φαίνεται στις παρακάτω εικόνες. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν ή διευκολύνουν τη δημιουργία σπορίων, με αποτέλεσμα την επιμόλυνση με *Aspergillus*, είναι η ενεργότητα νερού, η θερμοκρασία και η αλληλεπίδρασή τους με τη διατροφική αξία του υποστρώματος.



Εικόνα 1.3 Προσβεβλημένα σταφύλια από *Aspergillus sp.*

Στα σταφύλια, η παραγωγή Ωχρατοξίνης Α από το μύκητα φαίνεται να έχει άμεση εξάρτηση από τις κλιματολογικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, η βροχή κατά τη διάρκεια της δημιουργίας σπορίων προκαλεί ανομοιογενή κατανομή υγρασίας και προκαλεί υψηλό κίνδυνο επιμόλυνσης με Ωχρατοξίνη Α. Άλλοι παράγοντες που ευνοούν την παρουσία των σπορίων είναι:

- Οι μηχανικοί παράγοντες, καθώς το εσωτερικό μέρος του σταφυλιού και γενικά του ευαίσθητου προϊόντος στην ΟΤΑ, είναι πιο ευάλωτο στη δράση των μυκήτων συγκριτικά με το εξωτερικό μέρος.
- Τα έντομα, τα οποία με το μεταβολισμό τους αυξάνουν την υγρασία του υποστρώματος και τη θερμοκρασία κι έτσι διασπών το προστατευτικό εξωτερικό μέρος του φυτού.
- Οι τραυματισμοί που προκαλεί η βροχή και η καταιγίδα
- Η διαθεσιμότητα των μεταλλικών συστατικών
- Το pH. Γενικότερα, η μούχλα είναι ανθεκτική σε όξινα μέσα και συχνά είναι ικανή να καθιστά το pH του υποστρώματος όξινο

- Τα επίπεδα του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα
- Χημικοί και φυσικοί χειρισμοί.

1.3.2 Περιοχή και κλίμα

Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων, άμεσα αλλά και έμμεσα, είναι η τοποθεσία και τοπογραφία, η βροχόπτωση, η σχετική υγρασία και οι θερμοκρασίες. Ορισμένες περιοχές είναι ελεύθερες μυκήτων που παράγουν ΟΤΑ, ή απλώς λόγω κλιματικών συνθηκών δεν ευνοείται η ανάπτυξή τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κρασιών με μη ανιχνεύσιμη ΟΤΑ ή κάτω από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Lo Curto *et al.*, 2004). Τέλος, οι διαφορές στην παραγωγή μεταξύ των χρόνων μπορεί να είναι αρκετά μεγάλες λόγω επίδρασης του κλίματος αλλά αυτές δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς (Stefanaki *et al.*, 2003).

1.3.3 Καλλιέργεια και χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων

Παρόλο που οι έρευνες έδειξαν ότι οι βιολογικές καλλιέργειες παράγουν προϊόντα με υψηλότερες συγκεντρώσεις, τα λίγα δεδομένα που έχουν δημοσιευτεί για το κρασί δείχνουν ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ συμβατικών και βιολογικών καλλιεργειών (Chiodini *et al.*, 2006).

Στην περίπτωση των βιολογικών καλλιεργειών γίνεται έλεγχος αντιμετώπισης των εντόμων και των ασθενειών αλλά με διαφορετικά μέσα και μεθόδους έναντι των συμβατικών καλλιεργειών. Και στις δύο περιπτώσεις συνιστάται να εφαρμόζεται καλή γεωργική πρακτική (GAP). Σε βιβλιογραφική έρευνα, έγινε σύγκριση μεταξύ 44 δειγμάτων του εμπορίου, όπου συγκρίνει στατιστικώς το κρασί του εμπορίου από βιολογικές με αυτό από συμβατικές καλλιέργειες. Στην έρευνα αυτή, παρατηρείται ότι διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών έχουν διαφορετική ανθεκτικότητα στους μύκητες αλλά δεν υπάρχουν παρά ελάχιστες δημοσιευμένες πληροφορίες πάνω σε αυτό το θέμα και αυτές αφορούν μελέτες *in vitro*.

Στην περίπτωση των συμβατικών καλλιεργειών, διάφορα μυκητοκτόνα όπως τα meranipyrim, pyrimethanil, fluazinam, iprodione και μίγμα cyprodinil/fludioxonil, έχουν επίδραση στα τελικά ποσά ΟΤΑ. Δεδομένου ότση παρουσία και η συγκέντρωση της ΟΤΑ στο κρασί εξαρτάται άμεσα από την ανάπτυξη μυκήτων στα σταφύλια, η αποτελεσματική εφαρμογή φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων, μυκητοκτόνων και εντομοκτόνων, μειώνει την αρχική προσβολή και επομένως τα τελικά επίπεδα της μυκοτοξίνης(LoCurto *et al.*, 2004). Επιπλέον, προσβολή από έντομα (*Lobesia botrana*), ακόμα και μικρής έκτασης, ευνοεί την ανάπτυξη μυκήτων αφού προσφέρει σημεία εισόδου στη ράγα.

1.3.4 Επίδραση πρακτικών οινοποίησης

Οι Gambuti *et al.* στη μελέτη τους ως προς την επίδραση διάφορων πρακτικών οινοποίησης στη συγκέντρωση της ΟΤΑ στο κρασί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότση ο κύριος παράγοντας μόλυνσης ήταν η ανεπαρκής απολύμανση και γενικά η καθαριότητα στο οινοποιείο. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της ΟΤΑ στο κρασί στις περιπτώσεις που εφαρμόστηκε:

- Μεγαλύτερη πίεση των στέμφυλων
- Μεγαλύτερης διάρκειας στέγνωμα των σταφυλιών
- Αποθήκευση σε μερικούς γεμάτα βαρέλια.

Αντιθέτως, το φιλτράρισμα μέσω μεμβράνης 0,45 μm μείωσε την ΟΤΑ κατά πολύ (Quintela and Villarán, 2012). Η μελέτη διαφόρων διαυγαστικών υλικών σχετικά με την ικανότητά τους να απομακρύνουν την ΟΤΑ από το κρασί έδειξε ότση ο μπεντονίτης, οι πρωτεΐνες αυγού και η ζελατίνη, έχουν μικρή αποτελεσματικότητα, ενώ ο ενεργός άνθρακας απομάκρυνε μέχρι και 72% της ΟΤΑ όταν χρησιμοποιήθηκε σε ποσότητα 30 g/hL (Gambuti *et al.*, 2005).

Και άλλες μελέτες έχουν δείξει ότση ο ενεργός άνθρακας, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, προσροφά την ΟΤΑ. Σε πειράματα με λευκό κρασί στο οποίο είχε προστεθεί ΟΤΑ σε συγκέντρωση 5μg/kg, χρησιμοποιήθηκε ενεργός άνθρακας σε ποσότητα 1g/l και προσρόφησε το 87% της ΟΤΑ σε σύντομο χρονικό

διάστημα (Vareta^{l.} 2008). Η τελική συγκέντρωση που απομένει στο κρασί εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση, την ποσότητα ενεργού άνθρακα που θα χρησιμοποιηθεί καθώς και από το χρόνο επώασης για την προσρόφηση. Μερικές μελέτες έδειξαν ότι ο ενεργός άνθρακας προσροφά επιλεκτικά την ΟΤΑ χωρίς να επηρεάζει τις πολυφαινόλες και τα συστατικά του χρώματος του κρασιού, ενώ άλλες δείχνουν το αντίθετο. Το μεγαλύτερο όμως πρόβλημα είναι η μείωση λόγω προσρόφησης σημαντικών ουσιών οι οποίες συμβάλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού.

Το 50-80% της ΟΤΑ βρίσκεται στα στέμφυλα και απομακρύνεται με αυτά, εκτός αν παραμείνουν μαζί με την υγρή φάση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (ερυθρή οινοποίηση) οπότε εκχυλίζεται και αυξάνεται η συγκέντρωσή της στο τελικό προϊόν. Σε αυτό βοηθά και η παραγωγή της αιθυλικής αλκοόλης όσο προχωρά η ζύμωση, καθώς η ΟΤΑ είναι περισσότερο διαλυτή στην αλκοόλη. Μεγαλύτερη πίεση των στέμφυλων στο τέλος της ζύμωσης για αύξηση της απόδοσης, αυξάνει και την περιεκτικότητα της ΟΤΑ. Αντίθετα, στην περίπτωση της λευκής οινοποίησης ακόμα και η προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων για την αύξηση τη απόδοσης δεν επηρέασε τη συγκέντρωση ΟΤΑ. Φυσικά σε κάθε περίπτωση πρέπει να απομακρύνονται πριν από την έκθλιψη όλοι οι βότρυες που παρουσιάζουν ανάπτυξη μυκήτων. Η ίδια η διαδικασία της ζύμωσης μειώνει τη συγκέντρωση ΟΤΑ, όχι λόγω μεταβολισμού της από τις ζύμες, αλλά πιθανών λόγω προσρόφησής της στο κυτταρικό τοίχωμα των ζυμών και κατακρήμνισης. Διαφορετικά στελέχη ζυμών προσροφούν λιγότερο ή περισσότερο την ΟΤΑ, από 40 μέχρι και 90%, αλλά πειράματα σε μεγάλη κλίμακα δεν έχουν πραγματοποιηθεί (Caridi, 2006).

1.4 Μέτρα πρόληψης

1.4.1 Στον αγρό

Τα διάφορα είδη του *Aspergillus* εντοπίζονται τόσο στον αγρό πάνω στα υπολείμματα της αμπελοκαλλιέργειας, όσο και στο χώμα, από όπου μεταφέρονται στα σταφύλια με τον άνεμο. Σε αυτό συμβάλει θετικά η χαμηλή υγρασία του εδάφους

καθώς και η συχνή καλλιέργεια του εδάφους. Αντίθετα, η κάλυψή του με άλλα φυτά μειώνει τη μεταφορά σπορίων. Η σημαντικότερη ενέργεια για την πρόληψη της προσβολής και κατά συνέπεια της μόλυνσης με ΟΤΑ είναι η αποφυγή του τραυματισμού των σταφυλιών. Ο παραγωγός ακολουθώντας τους κανόνες καλής γεωργικής πρακτικής μπορεί να επιτύχει:

- Το σωστό έλεγχο εντομοπροσβολών,
- Το κατάλληλο κλάδεμα των πρέμων ώστε να προστατεύονται οι βότρυες από ηλιακά εγκαύματα,
- Το κλάδεμα πρέμων σε σχήματα στα οποία οι βότρυες απέχουν αρκετά από το έδαφος, αποφυγή επαφής τους με σύρματα και
- Το σωστό πρόγραμμα αρδεύσεων ώστε να αποφεύγεται η σχάση των ραγών μετά από βροχή πριν τον τρύγο.

Τα σταφύλια που είναι προσβεβλημένα από έντομα θα πρέπει να απορρίπτονται πριν τη συγκομιδή. Επιπλέον, τα σταφύλια θα πρέπει να εξετάζονται και να απορρίπτονται όσα έχουν προσβολή από μαύρους μύκητες. Τέλος, πολύ σημαντικό είναι να γίνεται γρήγορη μεταφορά στο οινοποιείο. Το μεγαλύτερο ποσοστό ΟΤΑ βρίσκεται στις ράγες με εμφανή σημεία τραυματισμού και επομένως στην περίπτωση της σταφίδας μπορεί να εφαρμοστεί οπτικός έλεγχος και απομάκρυνση αλλοιωμένων ραγών με ανώμαλο χρωματισμό μετά την ξήρανση.

1.4.2 Στο οινοποιείο

Συνίσταται να γίνεται ανάλυση για ΟΤΑ στο μούστο πριν τη ζύμωση, στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις ότι τα σταφύλια ήταν πολύ προσβεβλημένα από μύκητες. Επίσης σε τέτοια περίπτωση να εξεταστεί το ενδεχόμενο παραγωγής ροζέ ή λευκού κρασιού αντί για κόκκινου, αν πρόκειται για κόκκινα σταφύλια. Η πίεση πρέπει να εξαρτάται από το ποσοστό μόλυνσης της πρώτης ύλης, μικρού όγκου και χρονικά σύντομες πιέσεις συνιστώνται σε περιπτώσεις επιβαρυσμένων σταφυλιών. Συνοπτικά, για τη μείωση της συγκέντρωσης Ωχρατοξίνης Α στο τελικό προϊόν είναι απαραίτητος ο έλεγχος των συνθηκών κατά την οινοποίηση:

- Διαλογή των σταφυλιών πριν τη σύνθλιψη με σκοπό τη μείωση των επιμολυσμένων σταφυλιών που συμμετέχουν στην οиноποίηση.
- Προγραμματισμός του τρύγου και ελαχιστοποίηση του χρόνου αναμονής των σταφυλιών από τη συγκομιδή στην έκθλιψη.
- Διατήρηση, κατά το δυνατόν, συνθηκών που δεν ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, κυρίως όταν πρόκειται για ερυθρή οиноποίηση.

Τέλος, αν χρειαστεί η εφαρμογή ενεργού άνθρακα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί η ελάχιστη αλλά αποτελεσματική ποσότητα και η εφαρμογή αυτή είναι προτιμότερο να γίνει στο μούστο και όχι στο κρασί.

Συνεπώς, η τήρηση ορθής γεωργικής πρακτικής και η εφαρμογή ενός συστήματος HACCP κατά τη διάρκεια της οиноποίησης, μπορεί να φανεί χρήσιμη τόσο στον έλεγχο του σχηματισμού και της συγκέντρωσης Ωχρατοξίνης Α στο τελικό προϊόν, ώστε να μην ξεπερνώνται νόμιμα όρια, όσο στην εφαρμογή μέτρων υγιεινότητας στην περίπτωση υπέρβαση.

1.5 Νομοθεσία

1.5.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

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

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραπάνω επιπτώσεις στον άνθρωπο θεωρείται σκόπιμο να περιοριστεί τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες στα τρόφιμα, όσο και

η περιεκτικότητα σε κάποιες συγκεκριμένες τοξίνες(αφλατοξίνη B₁). Επιπλέον, πρέπει ναληφθούν υπ' όψιν και οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού και κυρίως ταβρέφη.

Γενικότερα, η θέσπιση των μέγιστων ορίων για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστωνσυγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και εκτίμηση πολλών παραγόντωνόπως:

- τα τοξικολογικά δεδομένα,
- ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών,
- η οξείακαι χρόνια τοξικότητα.

Παράλληλα, πρέπει να υπάρχει σύνδεση των παραπάνωμε την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποίαεκτίθενται οι καταναλωτές. Σήμερα δεν είναι γνωστό κάποιο όριο κάτω από τοποίο να μην παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία τουκαταναλωτή από τις μυκοτοξίνες, συνεπώς δεν μπορεί να οριστεί ανεκτήημερήσια πρόσληψη. Η Ε.Ε. έχει θεσπίσει νομοθετικά όρια σταυλικά που προορίζονται για χρήση ως τρόφιμα ή ως ζωοτροφές(Maroto*et al.*, 2005). Για τηθέσπιση των μέγιστων ορίων λαμβάνονται υπ' όψινοι αποφάσεις πολλών επιστημονικώνοργανισμών και δημοσίων αρχών. Με σημείο αναφοράς την επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον πραγματοποιείται συνεργασία μεταξύ των παρακάτω οργανισμών:

- ΔιεθνέςΠρόγραμμαγιατηΧημικήΑσφάλεια (International Programon Chemical Safety–IPCS, www.who.int/pcs/)
- ΔιεθνήςΟργανισμόςγιατηνΈρευνατουΚαρκίνου (International Agencyon Research on Cancer–IARC, www.iarc.fr)
- Κοινή FAO/WHO ΕπιτροπήγιαταΠρόσθετακαιτουςΕπιμολυντέςτωνΤροφίμων (Joint FAO/WHO Committee on Food Additives and Contaminants–JECFA, www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm).

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζει ότι οι μέθοδοι διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες επιτρέπουν να μειωθεί η περιεκτικότητα σεμυκοτοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως στα αράπικα φιστίκια, στους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, στα ξηρά φρούτα και στον αραβόσιτο. Έτσι, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες περιεκτικότητες από τις προαναφερόμενες σεμυκοτοξίνες για τα εν λόγω προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων. Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις μυκοτοξίνες έχουν καθοριστεί λαμβανομένης υπόψη της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που ακολουθούνται.

Στις παρτίδες που ανιχνεύθηκαν μυκοτοξίνες μέσα στα όρια και προορίζονται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία θα πρέπει να υπάρχει η ανάλογη σήμανση. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και απαγορεύεται η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων. Επιπλέον, απαγορεύεται να αναμειγνύονται με καθαρά από μυκοτοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για τη ναπομάκρυνσή τους.

1.5.2 Παγκόσμια Νομοθεσία

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Αυτό έχει οδηγήσει τόσο σε εντατικούς ελέγχους ως προς την παρουσία τους στα διάφορα τρόφιμα όσο και στην καθιέρωση ανώτατων ορίων. Νομοθετικοί κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως (Gilbert and Anklam, 2002).

Στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου το προσδόκιμο ζωής έχει αυξηθεί σε συνδυασμό με τη βελτίωση της ποιότητας ζωής παρατηρείται μεγαλύτερη προσπάθεια όσον αφορά τον έλεγχο των αφλατοξινών (Yu *et al.*, 2005). Αντίθετα, στο μεγαλύτερο ποσοστό των αναπτυσσόμενων χωρών όπου κύριο μέλημα αποτελεί η καταπολέμηση της φτώχειας

και των ασθενειών δεν έχουν καθιερωθεί ευρέως οι κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες και γενικότερα δεν είναι το ίδιο αυστηροί (Whitaker *et al.*, 2005).

Ωστόσο, αν και η θέσπιση των ανώτερων ορίων είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών φορέων παρατηρούνται διαφορετικά όρια ανάμεσα στα διάφορα κράτη. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στις Η.Π.Α. το μέγιστο επιτρεπτό όριο για την παρουσία αφλατοξινών ανέρχεται στα 20 ppb για τρόφιμα και ζωοτροφές, ενώ για τα κελυφωτά φιστίκια στα κράτη της Ε.Ε. στα 2 ppb για την AFB1 και 4 ppb για το άθροισμα των αφλατοξινών, όπως προαναφέρθηκε. Αυτό σημαίνει ότι στην ΕΕ τα όρια είναι 5 φορές χαμηλότερα απ' ό,τι στις Η.Π.Α., όπως αποτυπώνεται στον παρακάτω Πίνακα 1.2. Στην πράξη τα διαφορετικά όρια που έχουν θεσπιστεί στις διάφορες χώρες του κόσμου, προκαλούν ενδεχόμενα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο σε βάρος συνήθως των λιγότερο αναπτυγμένων χωρών.

Πίνακας 1.2 Ανώτερα επιτρεπτά όρια Μυκοτοξινών σύμφωνα με την Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU) και των Ηνωμένων Πολιτειών (USA).

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

Πηγή: Gilbert and Anklam, 2002

1.5.3 Ελληνική Νομοθεσία

Μερικά από τα βασικότερα νομοθετήματα που έχουν θεσπιστεί για τις μυκοτοξίνες είναι τα ακόλουθα:

- **Καν.(ΕΚ) 466/2001:** Καθορισμός μεγίστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα
- **Καν.(ΕΚ) αριθ. 472/2002:** της Επιτροπής, της 12^{ης} Μαρτίου 2002, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ.466/2001 για τον καθορισμό μεγίστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα

- **Καν.(ΕΚ) 683/2004:** Τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 όσον αφορά τις αφλατοξίνες και την ωχρατοξίνη Α σε τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και μικρά παιδιά
- **Καν.(ΕΚ) αριθ. 123/2005:** της Επιτροπής, της 26^{ης} Ιανουαρίου 2005, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ.466/2001 όσον αφορά την ωχρατοξίνη Α
- **Καν.(ΕΚ) 1881/2006:** Καθορισμός μεγίστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα

Σύμφωνα με τον τελευταίο κανονισμό, στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζονται τα μέγιστα επιτρεπτά όρια της ΟΤΑ.

Πίνακας 1.3 Μέγιστα επιτρεπτά όρια Ωχρατοξίνης Α σε διάφορα προϊόντα

Προϊόν	Μέγιστα επιτρεπτά όρια(ppb)
Μη μεταποιημένα δημητριακά	5,0
Όλα τα προϊόντα που παράγονται από μη μεταποιημένα δημητριακά, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων με βάση τα δημητριακά και των δημητριακών που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων που προορίζονται για βρέφη	3,0
Σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή σταφίδα και σουλτανίνα)	10,0
Φρυγμένοι κόκκοι καφέ και φρυγμένος και αλεσμένος καφές, εξαιρουμένου του διαλυτού καφέ	5,0
Διαλυτός καφές (στιγμαιαίος καφές)	10,0
Οίνοι (συμπεριλαμβανομένων των αφρωδών οίνων, εξαιρουμένων των οίνων λικέρ και των οίνων με αλκοολικό τίτλο όχι μικρότερο του 15 % vol) και ποτά που προέρχονται από ζύμωση φρούτων (11)	2,0
Αρωματισμένοι οίνοι, αρωματισμένα ποτά με βάση τον οίνο και αρωματισμένα κοκτέιλ αμπελοοινικών προϊόντων	2,0
Χυμός σταφυλιών, συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιών, όπως αυτός ανασυστάθηκε, νέκταρ σταφυλιών, γλεύκος σταφυλιών και συμπυκνωμένος γλεύκος σταφυλιών όπως αυτός ανασυστάθηκε, οι οποίοι προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο	2,0
Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	0,50
Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη	0,50
Ωμός καφές, ξηρά φρούτα εκτός από τις σταφίδες, μπίρα, κακάο και προϊόντα με βάση το κακάο, λικέρ, προϊόντα με βάση το κρέας, καρυκεύματα και γλυκόριζα	-

1.6 Επιπτώσεις μυκοτοξίνων στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων

1.6.1 Γενικά

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) στο 25% των καρπών των δημητριακών που παράγονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, καταγράφεται μόλυνση από μυκοτοξίνες (CAST, 1989). Οι καρποί των δημητριακών αποτελούν σημαντικό μέρος τόσο του ανθρώπινου διατροφολογίου, όσο και των αγροτικών ζώων και χρησιμοποιούνται συστηματικά από τη βιομηχανία ζωοτροφών. Ο άνθρωπος μολύνεται άμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων φυτικής προέλευσης ή έμμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων ζωικής προέλευσης (Frank, 1991). Η παγκόσμια εξάπλωση του προβλήματος των μυκοτοξινώσεων, η επικινδυνότητα για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων και οι οικονομικές απώλειες της κτηνοτροφικής παραγωγής καθιστούν την έρευνα για τις μυκοτοξίνες επίκαιρη και αναγκαία.

1.6.2 Επιπτώσεις στον άνθρωπο

Οι αυξημένες πιθανότητες μόλυνσης του ανθρώπου από μυκοτοξίνες μέσω της τροφής του, και οι ακόλουθοι κίνδυνοι για την υγεία του, έχουν κινητοποιήσει την επιστημονική κοινότητα στη μελέτη των μυκοτοξινών. Ειδικότερα, η OTA έχει αναφερθεί ότι έχει νεφροτοξική, τερατογόνο, ανοσοκατασταλτική και νευροτοξική δράση τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους (Bennett and Klich, 2003).

Οι κίνδυνοι τοξικότητας της OTA για την ανθρώπινη υγεία έχουν αξιολογηθεί σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο από την επιστημονική Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής των τροφίμων (SCF) και τη Μικτή FAO/WHO ειδική Επιτροπή των πρόσθετων ουσιών τροφίμων (JECFA), οι οποίες έχουν καθιερώσει τα ανεκτά όρια συγκέντρωσης της OTA στα τρόφιμα (JECFA, 2001).

Η OTA το 1993 ταξινομήθηκε από το Διεθνές Κέντρο Έρευνας κατά του καρκίνου ως καρκινογόνος ουσία (κατηγορία 2B) (IARC, 1993). Επιπλέον, έχουν αποδοθεί σε OTA αρκετές νεφροπάθειες που έχουν προσβάλλουν τα ζώα καθώς και τους ανθρώπους. Ειδικότερα στους ανθρώπους, η OTA συμπεριλαμβάνεται στους

σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες της ενδημικής νεφροπάθειας των Βαλκανίων (Balkan Endemic Nephropathy and related Urinary Tract Tumours) (EFSA, 2006). Η πάθηση αυτή των νεφρών αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 στη Βουλγαρία, τη Ρουμανία και την πρώην Γιουγκοσλαβία με την τοξίνη να απομονώνεται σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις από τα αποθηκευμένα τρόφιμα των προσβεβλημένων οικογενειών. Τα κύρια χαρακτηριστικά της BEN είναι οι αμφοτερόπλευρες αλλοιώσεις του νεφρικού φλοιού. Σε προχωρημένα στάδια της νόσου το μέγεθος και το βάρος των νεφρών μειώνονται σημαντικά.

Η σημασία της OTA για τη δημόσια υγεία αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Η παρουσία των OTA στο αίμα των υγιή ανθρώπων επιβεβαιώνεται με συνεχή και εκτεταμένη έκθεση (Sangaré-Tigori *et al.*, 2006, Thu van der *et al.*, 2001). Είναι χαρακτηριστικό ότι σύμφωνα με έρευνες σε χώρες της Κεντρικής Ευρώπης, το 90% το εξετασθέντων δειγμάτων αίματος ανθρώπων ήταν θετικό στην παρουσία OTA με συγκεντρώσεις $> 0,1$ ppb.

Τα τελευταία χρόνια έχει επέλθει μια δραματική αύξηση της επίπτωσης του *Aspergillus* στον άνθρωπο, ως αποτέλεσμα της όλο και πιο δραστικής ανοσοκατασταλτικής θεραπείας. Ο *A. fumigatus* έχει αναδειχθεί στον πλέον σημαντικό αερομεταδιδόμενο παθογόνο μύκητα στις αναπτυγμένες χώρες. Η λοίμωξη του αναπνευστικού από *Aspergillus* εμπλέκεται με αλλεργικές αντιδράσεις, όπως στο άσθμα και την πνευμονίτιδα εξ υπερευαισθησίας, αλλά και με αποικισμό του βρογχικού δένδρου, με επακόλουθη αλλεργική βρογχοπνευμονική ή διηθητική ασπεργίλλωση. Παρά τις νεότερες εξελίξεις στη μελέτη του μύκητα αυτού, υπάρχουν πολλές άγνωστες πτυχές στη συμπεριφορά του και στην παθογένεια των νόσων που προκαλεί. Εξαιτίας της έλλειψης αυτής της γνώσης, η αντιμετώπιση των σχετιζόμενων με το μύκητα παθήσεων γίνεται συνήθως εμπειρικά και με δυσκολία. Για την καλύτερη κατανόηση των παθήσεων αυτών θα πρέπει να ανασυνταχθούν οι στρατηγικές της διάγνωσης, της επιδημιολογίας, της θεραπείας και της παθογένειάς τους (Μάρκογλου κ.α., 2008).

Ιδιαίτερα επιβαρυντική για τον άνθρωπο είναι η αφλατοξίκωση (κυρίως η χρόνια έκθεση σε αφλατοξίνες), η οποία συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου του ήπατος και νεφροπάθειες. Ως τοξίνες με πιθανή καρκινογόνο δράση έχουν θεωρηθεί η

ωχρατοξίνηΑ (νεοπλασίες του ουροποιητικού συστήματος), οι φουμονισίνες (καρκίνος του οισοφάγου) και η ZON (νεοπλασίες του ενδομητρίου) (Fink-Gremmels, 1991).

1.6.3 Οι επιπτώσεις των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων

Η ευαισθησία των ζώων στις μυκοτοξίνες, ποικίλει, αναλόγως του είδους του ζώου, της ηλικίας, του φύλου, της θρεπτικής κατάστασης, και της φυλής. Οι μυκοτοξίνες, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αναπτύξεως ορισμένων μυκήτων, είτε απεκκρίνονται μέσα στο υλικό που αναπτύσσεται ο μύκητας, είτε κατακρατούνται στο εσωτερικό του κυττάρου των μυκήτων και ελευθερώνονται μετά τη θραύση του μυκηλίου. Η επίπτωση στην υγεία τόσο των διαφορετικών τοξινών, όσο και του συνδυασμού τους είναι ιδιαίτερα μεταβλητή από είδος σε είδος. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν συχνά τη μείωση του γάλακτος, του κρέατος, και της παραγωγής αυγών, της μειωμένης κατανάλωσης τροφών, της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος (που μπορούν να οδηγήσουν σε άλλες κοινές ασθένειες), της στειρότητας και της ζημίας του ήπατος. Ο όρος «κλινική επίδραση» χρησιμοποιείται για να περιγράψει αυτά και άλλα γενικά αναγνωρίσιμα συμπτώματα και σημάδια της ζωικής ασθένειας.

Η υγεία και η παραγωγικότητα των ζώων επηρεάζεται από τις μυκοτοξίνες σε διαφορετικό βαθμό, ανάλογα με το είδος τους. Τα μηρυκαστικά είναι πιο ανθεκτικά στην επίδραση των μυκοτοξινών σε σύγκριση με άλλα είδη ζώων (χοίροι, πτηνά) διότι η μικροβιακή χλωρίδα της μεγάλης κοιλιάς έχει την ικανότητα να μειώνει την τοξικότητά τους. Το πρόβατο θεωρείται ανθεκτικότερο της αγελάδας. Στην τελευταία, η κατανάλωση αφλατοξίνης B₁ έχει ως επακόλουθο την απέκκρισή της με το γάλα ως M1, σε ποσοστό 0,5 έως 3% της συγκέντρωσής της στις ζωοτροφές. Το γεγονός ότι το γάλα είναι ένα προϊόν που απευθύνεται στο ευρύ καταναλωτικό κοινό (στο ποσοστό που περιλαμβάνονται και ευπαθείς ομάδες), σε συνδυασμό με τις καρκινογόνες

ιδιότητες των αφλατοξινών, καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικό τον έλεγχο των αφλατοξινών B₁ και M₁ στα μηρυκαστικά.

Ο χοίρος συγκαταλέγεται μεταξύ των πλέον ευπαθών ζώων στη μόλυνση από μυκοτοξίνες. Παχυνόμενοι χοίροι που κατανάλωσαν στη διατροφή τους αφλατοξίνες (κυρίως B₁ και ίχνη G₁, G₂ και B₂) σε συγκεντρώσεις από 0,02 έως 1,48 mg/kg τροφής παρουσίασαν μείωση της ημερήσιας αύξησης βάρους και βλάβες στα ηπατικά κύτταρα. Ο Huff και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν μείωση της ημερήσιας αύξησης βάρους των παχυνόμενων χοίρων των οποίων το σιτηρέσιο ήταν μολυσμένο με αφλατοξίνη ή/και ΩχρατοξίνηΑ (2 mg/kg τροφής). Μάλιστα η μείωση του ρυθμού αύξησης του σωματικού βάρους ήταν μεγαλύτερη όταν συνυπήρχαν και οι δύο τοξίνες, γεγονός που επιβεβαιώνει τη συνεργιστική δράση τους.

1.6.4 Οικονομικές Επιπτώσεις

Η μόλυνση των γεωργικών προϊόντων με μυκοτοξίνες είναι ένα διαρκές πρόβλημα σε πολλές παραγωγικές χώρες του κόσμου με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις. Η μόλυνση από μυκοτοξίνες προκαλεί απώλειες σε όλα τα επίπεδα παραγωγής τροφίμων και ζωοτροφών. Έχει υπολογιστεί ότι το 25% των καλλιεργειών παγκοσμίως έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες σύμφωνα με τον FAO - Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας. Τρόφιμα στα οποία ανιχνεύονται μυκοτοξίνες σε όρια πάνω από αυτά που έχει θεσπίσει η νομοθεσία κατάσχονται και καταστρέφονται. Αυτό οδηγεί σε οικονομική ζημιά πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων σε παγκόσμιο επίπεδο. Σχεδόν το 40% της συνολικής συγκομιδής στην Αμερική το 1990 αποσύρθηκε από την αγορά λόγω μόλυνσης από μυκοτοξίνες. Αν και η πρόληψη από μυκοτοξίνες, στα γεωργικά προϊόντα, στα γαλακτοκομικά και τα προϊόντα κρέατος είναι ο κύριος στόχος των τροφίμων και των γεωργικών βιομηχανιών σε ολόκληρο τον κόσμο η μόλυνση με μυκοτοξίνες είναι αναπόφευκτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΩΝ

2.1 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία αφορά την επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από το σύνολο της παρτίδας, στο οποίο θα γίνει και η ανάλυση. Η δειγματοληψία είναι το πιο σημαντικό στοιχείο της ανάλυσης δεδομένου ότι οι αφλατοξίνες είναι ανομοιόμορφα κατανεμημένες στα τρόφιμα. Στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό που καθορίζεται ο τρόπος δειγματοληψίας για τον έλεγχο των αφλατοξινών στα τρόφιμα αναφέρεται επίσης ότι η δειγματοληψία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια με την οποία καθορίζονται τα επίπεδα των μυκοτοξινών, τα οποία κατανέμονται κατά τρόπο ανομοιόμορφο σε μία παρτίδα και ότι οι αφλατοξίνες κατανέμονται κατά τρόπο πολύ ανομοιογενή σε μια παρτίδα, ειδικότερα σε παρτίδα τροφίμων με σωματίδια μεγάλου μεγέθους όπως είναι τα κελυφωτά φιστίκια ή τα αράπικα φιστίκια (Minervini *et al.*, 2001).

2.2 Προετοιμασία δείγματος

Η προετοιμασία αποσκοπεί στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των τροφίμων έτσι ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια και να υπάρξει καλύτερη εκχύλιση από το διαλύτη. Πιο συγκεκριμένα οι στόχοι της προετοιμασίας του δείγματος είναι:

- Η απομάκρυνση των παρεμποδίσεων
- Η εκλεκτική προ-συγκέντρωση των ουσιών που αναλύονται
- Η προστασία του οργάνου.

Η άλεση του δείγματος και η δημιουργία μικρών σωματιδίων ομογενοποιεί το δείγμα, στάδιο το οποίο αν και χρονοβόρο είναι απολύτως απαραίτητο και βασικό στην ανάλυση (Gilbert and Anklam, 2002).

2.3 Εκχύλιση

2.3.1 Γενικά

Η εκχύλιση είναι ένα σημαντικό στάδιο στον προσδιορισμό των αφλατοξίνων στα διάφορα υποστρώματα ή τρόφιμα. Ο σκοπός του σταδίου αυτού είναι η απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους της αφλατοξίνης από τη μήτρα των τροφίμων σε ένα διαλύτη κατάλληλο για μετέπειτα καθαρισμό και προσδιορισμό (Pittet,2005). Η εκχύλιση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από:

- Τις φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών που έχουν μολυνθεί με αφλατοξίνες
- Τη διαλυτότητα των αφλατοξίνων σε διαφορετικούς διαλύτες

Αναλυτικότερα, η εκχύλιση είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές διαχωρισμού και βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων που πρακτικά δεν αναμειγνύονται ή αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Οι συνηθέστερες τεχνικές εκχύλισης είναι οι εξής:

1. Εκχύλιση στερεών με υγρό (extraction). Βασίζεται στη διαλυτοποίηση ενός ή περισσότερων συστατικών μείγματος στερεών σε κατάλληλο διαλύτη.
2. Εκχύλιση υγρού ή στερεού σώματος διαλυμένου σε υγρό από άλλο υγρό (liquidextraction), δηλαδή η εκχύλιση ενός διαλύματος ουσιών με ένα υγρό.
3. Εκχύλισηστερεήςφάσης (solidphaseextraction). Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών από υγρά δείγματα, με διέλευση της υγρής φάσης μέσα από στερεό προσροφητικό υλικό, οπότε οι προς διαχωρισμό ουσίες προσροφούνται στη στερεή φάση (Ταραντίλης και Παππάς, 2015).

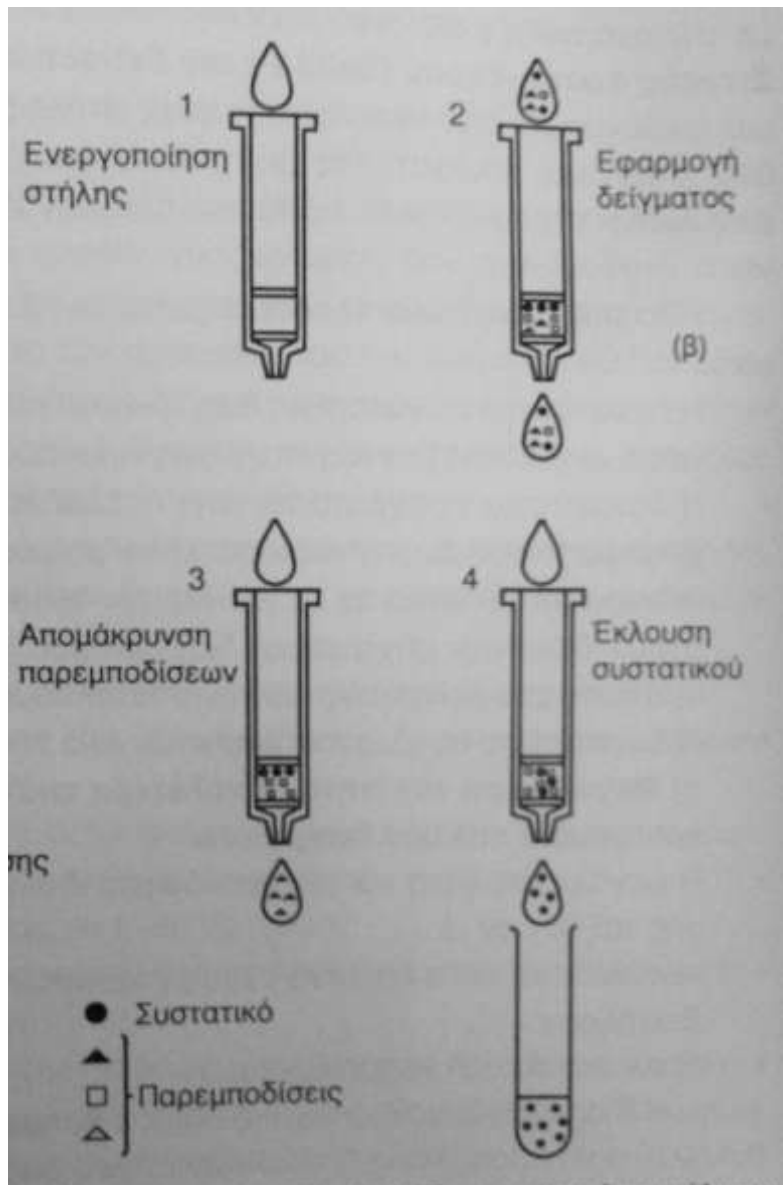
2.3.2 Εκχύλιση στερεής φάσης

Για αρκετά χρόνια η Εκχύλιση Υγρού-Υγρού αποτελούσε την πιο δημοφιλή τεχνική προκατεργασίας δείγματος, παρά το γεγονός ότι συγκεντρώνει αρκετά μειονεκτήματα, τα κυριότερα από τα οποία είναι:

- Η μεγάλη κατανάλωση διαλυτών
- Το γεγονός ότι είναι χρονοβόρα
- Η δημιουργία γαλακτωμάτων
- Η μη ποσοτική και μη επαναλήψιμη παραλαβή των ενώσεων του δείγματος.

Ωστόσο, δόθηκε λύση στα παραπάνω προβλήματα με την ανάπτυξη μιας νέας τεχνικής προ-κατεργασίας δειγμάτων της Εκχύλισης Στερεάς φάσης-Υγρού. Η τεχνική αυτή αποτελεί μια μικρογραφία της χρωματογραφίας στήλης, χρησιμοποιεί γυάλινες ή συνήθως πλαστικές μικροστήλες με στερεό προσροφητικό υλικό που είναι συνήθως διοξείδιο του πυριτίου με χημικά συνδεδεμένες ομάδες, ώστε να αποκτή διάφορες προσροφητικές ιδιότητες. Ανάλογα με τις δραστικές ομάδες, που φέρει το προσροφητικό υλικό, μπορούν να γίνουν διάφορα είδη εκχυλίσεων, όπως πολικές, μη πολικές, ομοιοπολικές, κατιονανταλλακτικές και ανιονανταλλακτικές εκχυλίσεις (Ταραντίλης και Παππάς, 2015). Το δείγμα φορτώνεται σε ένα διαλύτη, υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης όπου οι περισσότεροι από τους μεταβολίτες απομακρύνονται και μεταφέρονται σε άλλο διαλύτη. Αναλυτικότερα, η εκχύλιση στερεάς φάσης αποτελείται από τα παρακάτω στάδια(Παπαδόγιαννης και Σαμανίδου, 2001):

- i. Ενεργοποίηση του προσροφητικού της μικροστήλης με κατάλληλο διαλύτη
- ii. Εισαγωγή του δείγματος. Το διάλυμα του δείγματος εισέρχεται μέσω του προσροφητικού υλικού και τόσο τα προσδιοριζόμενα συστατικά όσο και ορισμένες παρεμποδίσεις συγκρατούνται πάνω στη μικροστήλη
- iii. Πλύσιμο των μικροστήλων με σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών του υποστρώματος του δείγματος που έχουν συγκρατηθεί πάνω στην μικροστήλη
- iv. Έκλυση των αναλυόμενων συστατικών χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο διαλύτη.



Πηγή: Παπαδόγιαννης και Σαμανίδου, 2001

Εικόνα 2.1 Στάδια εφαρμογής εκχύλισης στερεάς φάσης

2.4 Καθαρισμός

Η διαδικασία του καθαρισμού που χρησιμοποιείται σε ένα πρωτόκολλο αποτελεί το πιο σημαντικό βήμα, αφού η καθαρότητα του δείγματος επηρεάζει την ευαισθησία των αποτελεσμάτων. Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι αποστειρωμένα και να μην έχουν ίχνος μυκοτοξίνης. Οι περισσότερες μέθοδοι που

κυρίως χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μυκοτοξινών βασίζονται συνήθως σε μία διαδικασία καθαρισμού, ο οποίος πραγματοποιείται μετά την εκχύλιση.

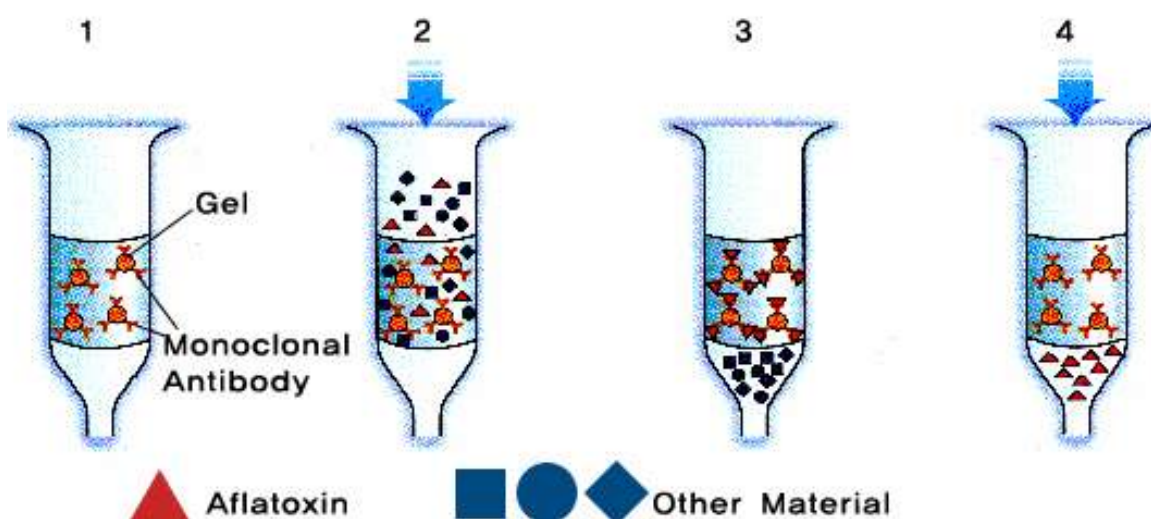
Γενικότερα, στις περιπτώσεις που ο καθαρισμός αποτελεί απαραίτητο στάδιο της διαδικασίας, όπως στα κελυφωτά φιστίκια, χρησιμοποιούνται διαχωριστές υγρού-υγρού (φίλτρα) ή πιο πρόσφατα συσκευές εκχύλισης στερεής φάσης (solidphaseextractioncartridges) και στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC) (Gilbert and Anklam, 2002). Οι τελευταίες, αποτελούν το πιο σύγχρονο εργαλείο καθαρισμού για τις αναλύσεις μυκοτοξίνης. Στην περίπτωση αυτή μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία είναι πολύ εξειδικευμένα για μυκοτοξίνες ακινητοποιούνται επάνω σε σεφαρόζη και στη συνέχεια ενσωματώνονται σε μικρές στήλες. Η προς εξέταση τοξίνη συλλέγεται με έκλυση με κατάλληλο διαλύτη, και κατ' επέκταση τα εκχυλίσματα από το δείγμα του τροφίμου περνούν μέσα από τη στήλη. Τελικά, παραλαμβάνεται ένα εντελώς καθαρό εκχύλισμα ελεύθερο από άλλες ουσίες (Pearson *et al.*, 1999).

Η προετοιμασία των δειγμάτων θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά στάδια ολόκληρης της αναλυτικής διαδικασίας, καθώς μπορεί να επηρεάσει την ταυτοποίηση, την επιβεβαίωση και τον προσδιορισμό της ποσότητας των δειγμάτων προς ανάλυση. Ανάμεσα στις σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης, η χρήση των στηλών ανοσοσυγγένειας (ImmunoaffinitiveColumns) έγινε ιδιαίτερα δημοφιλής τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της υψηλής τους εκλεκτικότητας. Επιπλέον, εξαλείφει την πολύπλοκη και χρονοβόρα εξαγωγή συμπερασμάτων και απλοποιεί τα πειραματικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται (Pichon *et al.*, 2002). Είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό των δειγμάτων, τα οποία είναι μiasμένα με κάποια μυκοτοξίνη. Γενικά, χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό και τη συμπύκνωση των τοξινών από πολύπλοκα δείγματα τροφίμων, πριν την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τους με κλασικές αναλυτικές τεχνικές όπως GC, HPLC και TLC.

Οι στήλες ανοσοσυγγένειας έχουν δείξει πολλά πλεονεκτήματα στην εφαρμογή τους σε διάφορα τρόφιμα, λόγω του ότι δίνουν τη δυνατότητα μεγαλύτερων όγκων εκχυλίσματος του δείγματος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου. Επιπλέον, είναι η πολύ ειδική φύση της αλληλεπίδρασης μυκοτοξίνης και αντισώματος που οδηγεί σε αποτελεσματικό και εξειδικευμένο καθαρισμό των εκχυλισμάτων. Τέλος, δεν είναι απαιτητικές όσον αφορά την ικανότητα και την

εμπειρία που απαιτείται από το χρήστη. Αντιθέτως, το υψηλό κόστος, ο περιορισμένος χρόνος αποθήκευσής τους και το γεγονός ότι είναι μιας χρήσης, είναι μερικά από τα μειονεκτήματα (Gilbert and Anklam, 2002).

Ο ρυθμός ροής του υγρού της εκχύλισης από τα διάφορα φίλτρα καθαρισμού είναι πολύ σημαντικός για την απόδοση της εκχύλισης και την παραλαβή μυκοτοξίνης όσο το δυνατό πιο καθαρής. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι όσο μειώνεται ο ρυθμός ροής και αυξάνει έτσι ο χρόνος του καθαρισμού, αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης λόγω του ότι ο χρόνος επαφής του διαλύτη και του υποστρώματος είναι μεγαλύτερος (Sheibani and Ghaziaskar, 2008). Το διάλυμα που εκχυλίζεται μετά και τον καθαρισμό συλλέγεται και συμπυκνώνεται για την περαιτέρω ανάλυση. Η αρχή λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας αποτυπώνεται στην παρακάτω εικόνα.



Πηγή: SheibaniandGhaziaskar, 2008

Εικόνα2.2Βασικές αρχές λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

3.1 Γενικά

Λόγω της ικανότητας της ΟΤΑ να ανιχνεύεται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων, η εύρεση μιας αναλυτικής μεθόδου που να ενδείκνυται για κάθε τρόφιμο είναι δύσκολη. Λαμβάνοντας υπόψη τη βασική αρχή και τη διάρκεια της εκάστοτε εφαρμοζόμενης ανάλυσης, οι μέθοδοι ανίχνευσης της ΟΤΑ ταξινομούνται στις:

- Χρωματογραφικές μεθόδους (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Επίδοσης– HPLC, Αέρια Χρωματογραφία-GC, Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας- TLC, Υγρή Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας- LC-MS/MS)
- Ταχείες μεθόδους (ανοσοενζυμικές –ELISA, LateralFlowDevice(LFD)).

Ο όρος κλασική τεχνική συνήθως αναφέρεται σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς οι οποίοι είναι συνδυασμένοι με τον κατάλληλο ανιχνευτή. Οι ποσοτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών σε τρόφιμα περιλαμβάνουν ανοσοχημικές στήλες, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλή Επίδοσης(HPLC) ή Αέρια Χρωματογραφία (GC) σε συνδυασμό με μια μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών όπως ανιχνευτές φθορισμού(FLD), ιονισμού φλόγας (FID), συλλήψεως ηλεκτρονίων (ECD), ανιχνευτές υπεριώδους(UV) ή ακόμα και φασματοσκοπία μάζας(MS)(Krskaetal, 2005).

3.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης HPLC

3.2.1 Γενικά

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η HPLC υπερέχει ως μέθοδος ανάλυσης μυκοτοξινών σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους και ιδιαίτερα τις ανοσοχημικές, εξαιτίας του υψηλού βαθμού εκλεκτικότητας και ακρίβειάς της (Pearsonetal., 1999). Η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει εφαρμοστεί σε μια σειρά υποστρωμάτων και τροφίμων για

τον έλεγχο της παρουσίας σε αφλατοξίνες όπως σιτηρά, μυκηλιακά εκχυλίσματα, βαμβακόσπορο, κρασί, αραβόσιτο, ξηροί καρποί, μπαχαρικά κ.α. Παρ' όλα αυτά η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει κόστος και απαιτεί πιο εξειδικευμένο και έμπειρο εργαστηριακό προσωπικό (Gilbert, and Anklam, 2002).

3.2.2 Οργανολογία

Η HPLC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό και την ανάλυση μιγμάτων μοριακών, ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών καθώς και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Στην HPLC διακρίνουμε δυο φάσεις:

- I. Τη στατική φάση, που αποτελείται από στερεό πορώδες υλικό, ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη.
- II. Την κινητή φάση που είναι ένας διαλύτης, ή μίγμα διαλυτών. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική, πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά.

Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται είναι:

1. **Φιάλη αποθήκευσης διαλυτών.** Ο διαλύτης ή το μίγμα διαλυτών που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας και να απαερώνεται σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης.

Το δοχείο του διαλύτη είναι συνήθως γυάλινη φιάλη για την ισοκρατική έκλυση (isocratic), ή φιάλες μέχρι τέσσερις στη βαθμωτή έκλυση (gradient) όπου τοποθετούνται οι διαλύτες και απαερώνονται. Η απαέρωση είναι απαραίτητη προκειμένου να φύγουν όλα τα διαλυμένα αέρια και κυρίως το οξυγόνο, που δημιουργούν φυσαλίδες στην κυψελίδα και μη σταθερή πίεση στο κύκλωμα ροής. Η απαέρωση γίνεται, ή με διαβίβαση ηλίου στο χώρο των

διαλυτών, ή περνώντας τους μέσα από συσκευή με ειδικές μεμβράνες που κατακρατούν όλα τα διαλυμένα αέρια, ή και με υπερήχους. Με την αντλία υψηλής πίεσης αφήνουμε να περάσει το σύστημα των διαλυτών μέσα από τη στήλη, που παρασύρει το δείγμα και διαχωρίζει τα διάφορα συστατικά του, ανάλογα με την πολικότητά τους και σε σχέση με το εκλουστικό σύστημα.

Οι δυο εφαρμοζόμενες τεχνικές ανάλυσης είναι η ισοκρατικήέκλουση (isocraticelution) στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση καθ' όλη την ανάλυση και η βαθμιδωτή έκλουση (gradientelution) στην οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία, ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα με βάση προγραμματισμό.Οι δυο αυτές τεχνικές είναι ανάλογες με την ισόθερμη και την θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία.

2. **Το σύστημα της αντλίας (pump).** Οι αντλίες που χρησιμοποιούνταιστην υγρή χρωματογραφία είναι υψηλής πίεσης. Ο ρόλος τους είναι η άντληση της κινητής φάσης από το δοχείο και η διαβίβασήτης κάτω από μεγάλη πίεση στη στήλη. Οι αντλίες αυτές πρέπει να είναι ικανές να λαμβάνουν ακριβή όγκο διαλύτη, χωρίς παλμούς και με επιλήψιμα σταθερή ταχύτητα ροής και πίεσης (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).
3. **Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (injectorvalve).** Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει τόσο με μικροσύριγγα, όσο και με ειδική βαλβίδα εισαγωγής δείγματος.

Η μονάδα εισαγωγής του δείγματος σε ένα σύστημα HPLC παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης. Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναιεφοδιασμένος με βαλβίδα.Η βαλβίδα στη θέση «πλήρωσης» συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση «εισαγωγής» εισάγει το δείγμα στη στήλη. Η ποιότητα της βαλβίδας κρίνεται κατ' αρχήν από την ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος. Σημαντικό ρόλο παίζει η κεφαλή, καθώς από το σχήμα της εξαρτάται η κατανομή ταχυτήτων της κινητής φάσης, μέσα στη στήλη, καθώς και η ποιότητα των υλικών κατασκευής, τα οποία θα πρέπει να είναι από αδρανή ως προς την χρησιμοποιούμενη κινητή φάση. Επιπλέον, υπάρχουν βαλβίδες εισαγωγής που η λειτουργία τους ελέγχεται αυτόματα από

την κεντρική μονάδα ελέγχου του συστήματος HPLC, αν και πολλοί χρήστες προτιμούν για διάφορους λόγους χειροκίνητο χειρισμό (Ταραντίλης και Παππάς, 2015).

4. **Στήλη (column).** Οι στήλες της HPLC ανάλογα με τις διαστάσεις τους κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- Προστήλες.

Η προστήλη χρησιμοποιείται σε διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής επίδοσης για προληπτικούς λόγους. Η στήλη αυτή τοποθετείται μεταξύ του συστήματος εισαγωγής δείγματος και αναλυτικής στήλης και έχει σκοπό την προστασία της αναλυτικής στήλης κατά την εισαγωγή ακατέργαστων δειγμάτων.

- Αναλυτικές στήλες.

Η αναλυτική στήλη είναι η καρδιά ενός χρωματογραφικού συστήματος, η οποία πρέπει να είναι υψηλής πιστότητας, ώστε να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

- Ημι-παρασκευαστικές

- Παρασκευαστικές

Είναι στήλες μεγάλων διαστάσεων, που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό και την παραλαβή των ενώσεων ενός μίγματος σε ποσότητα της τάξης των mg.

5. **Ανιχνευτής (detector).** Ο ανιχνευτής σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής επίδοσης χρησιμοποιείται για το συνεχή έλεγχο του υγρού που βγαίνει από τη στήλη. Ανεξάρτητα από την αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία του, πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, όπως:

- Χαμηλό επίπεδο θορύβου
- Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής

- Μικρό χρόνο απόκρισης
- Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής
- Ευελιξία σε μεταβολές της σύστασής της κινητής φάσης
- Αξιοπιστία και ευκολία χρήσης
- Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους
- Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος.

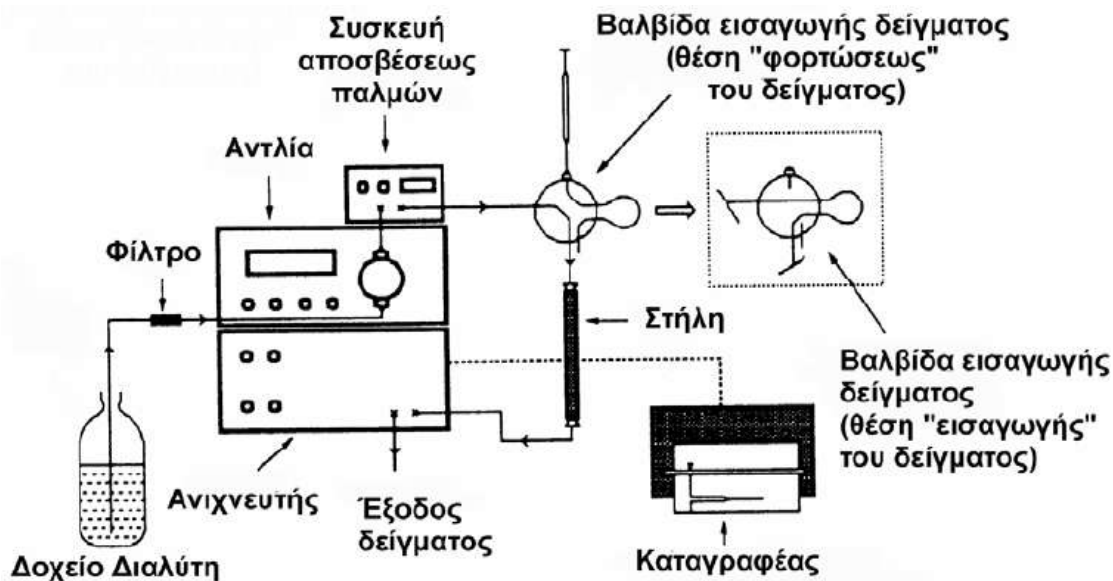
Οι ανιχνευτές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης κατατάσσονται στους γενικούς και ειδικούς ανιχνευτές. Αναλυτικότερα, οι γενικοί ανιχνευτές μετράνε την αλλαγή μιας ιδιότητας της κινητής φάσης και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι ανιχνευτές δείκτηδιάθλασης και αγωγιμότητας. Αντίστοιχα, οι ειδικοί ανιχνευτές μετράνε την αλλαγή μιας φυσικοχημικής ιδιότητας των αναλυόμενων συστατικών και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους και οι πολαρογραφικοί ανιχνευτές.

6. **Καταγραφικό.** Το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή, με τη βοήθεια ειδικών σημάτων καταγραφής, καταγράφεται ως ένα σύνολο κορυφών (καμπύλες του Gauss) που αποτελούν το χρωματογράφημα. Η καταγραφή του χρωματογραφήματος μπορεί να γίνει με απλό καταγραφικό σύστημα και ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στο χρωματογράφημα εκτός από το χρόνο συγκράτησης κάθε συστατικού, δίνεται για κάθε κορυφή το ύψος ή το εμβαδόν της, ώστε στη συνέχεια να μπορεί να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών.

Η ταυτοποίηση των ουσιών γίνεται με βάση το χρόνο συγκράτησης ο οποίος είναι σταθερός για ορισμένο χρωματογραφικό σύστημα. Τα πλεονεκτήματα που απορρέουν από τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή για τη συλλογή και την επεξεργασία των αναλυτικών δεδομένων είναι (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001):

- Η αποθήκευση των δεδομένων στη μνήμη του Η/Υ.

- Η επεξεργασία ενός χρωματογραφήματος, ενώ ταυτόχρονα γίνεται συλλογή δεδομένων
- Η δυνατότητα παρέμβασης στον τρόπο ολοκλήρωσης, με μετατόπιση των ορίων ολοκλήρωσης
- Η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών ενός δείγματος με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς.



Πηγή: Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001

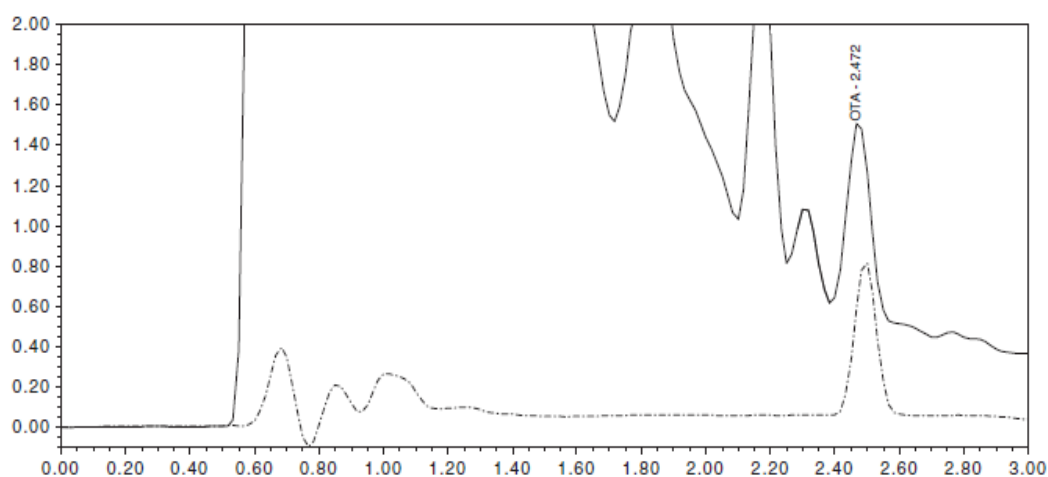
Εικόνα 3.1 Τυπική διάταξη Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης

3.2.3 Εφαρμογές

Η νέα ανάλυση των μυκοτοξινών βασίζεται στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Επίδοσης (HPLC) περιλαμβάνοντας διάφορες προσροφητικές ουσίες που εξαρτώνται από τη φυσική και χημική δομή των μυκοτοξινών. Οι στήλες κανονικής και ανάστροφης φάσης χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και τον καθαρισμό τοξινών που εξαρτώνται από την πολικότητα τους. Επίσης, χρησιμοποιούνται μικρές στήλες για την προ-επεξεργασία του δείγματος και μεγάλης κλίμακας στήλες για την προετοιμασία των προτύπων διαλυμάτων των μυκοτοξινών. Στην ουσία, τα περισσότερα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται στην HPLC για την ανίχνευση των

μυκοτοξινών είναι παρόμοια. Οι πιο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης είναι οι ανιχνευτές UV ή φθορισμού, οι οποίοι στηρίζονται στην παρουσία ενός χρωμοφόρου στα μόρια. Η HPLC αποτελεί τη βασική τεχνική ανίχνευσης των μυκοτοξινών και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό πρωτοκόλλων για την ανάλυση της ωχρατοξίνης Α.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε με στόχο τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας ωχρατοξίνης Α σε δείγματα κρασιού προερχόμενα από την περιοχή της Μοραβίας χρησιμοποιώντας τη βελτιωμένη και εκσυγχρονισμένη έκδοση της HPLC, δηλαδή τη νέα πιο ευαίσθητη μέθοδος UPLC, και να συγκρίνει τα ανιχνεύσιμα επίπεδα ΟΤΑ με αυτά που βρίσκονται σε ξένα κρασιά, αποτυπώνονται στο παρακάτω χρωματογράφημα.



Πηγή: Mikulíková *et al*, 2011

Σχήμα 3.1 Πρότυπο ΟΤΑ (διακοπτόμενη γραμμή) και οίνος μολυσμένος με ΟΤΑ (πλήρη γραμμή)

Στα πλαίσια αυτής της έρευνας, κατά τη διάρκεια της τριετίας (2008-2010), χρησιμοποιήθηκαν 72 δείγματα οίνου από τη Μοραβία και από άλλες περιοχές με τα ποσοστά ανίχνευσής της ΟΤΑ να είναι 11% και 64% αντίστοιχα. Τα ανιχνευθέντα επίπεδα κυμαίνονταν από 1,2 έως 71,2 ng / L στην πρώτη περίπτωση και από 1,6 έως 227,0 ng / L στη δεύτερη. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την άποψη ότι σε οίνους προερχόμενους από την περιοχή της Νότιας Μοραβίας ο κίνδυνος επιμόλυνσης με ωχρατοξίνης Α είναι πολύ χαμηλός.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της HPLC είναι η υψηλή ποιότητα διαχωρισμού και η δυνατότητα συνδυασμού πολλών συστημάτων ανίχνευσης (φθορισμός, UV) με τη συγκεκριμένη τεχνολογία, επιτρέποντας έτσι πολλαπλές ανιχνεύσεις των συστατικών από ένα δείγμα. Επίσης, μπορεί και να αυτοματοποιηθεί γεγονός το οποίο της προσφέρει ένα προβάδισμα σε σχέση με την TLC και την ELISA.

3.2.4 Άλλες τεχνικές

3.2.4.1 RP-HPLC

Σήμερα, η HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και πολλές φορές αναφέρεται απλά ως HPLC χωρίς να επεξηγείται ιδιαίτερα. Η RP-HPLC αποτελείται από μία μη-πολική στατική φάση (συνήθως silica στο οποίο έχει εφαρμοστεί RMe₂SiCl, όπου R είναι αλκύλιο όπως C₁₈H₃₇ ή C₈H₁₇) και μία υδατική μέτρια πολική κινητή φάση. Το σύστημα RP-HPLC αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο λόγω της ευκολίας στο χειρισμό και της μικρότερης τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση.

Η κύρια μέθοδος ανάλυσης για τον προσδιορισμό της ωχρατοξίνης A στον τομέα της οινολογίας πραγματοποιείται ακολουθώντας την HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) σε συνδυασμό με ανίχνευση φθορισμού (FLD) (Battilani *et al.*, 2004, Aresta *et al.*, 2006). Η μέθοδος αυτή συχνά ακολουθείται από το στάδιο καθαρισμού, όπου χρησιμοποιούνται συσκευές εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) ή στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC) (Visconti *et al.*, 1999, Hernandez *et al.*, 2006). Η τελευταία μέθοδος συνιστάται από το Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου και Οίνου (OIV, 2001). Για την ανάλυση των οίνων με την μέθοδο αυτή σε εργαστήρια, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που συνδέονται άμεσα με οινοποιεία, θα ήταν επιθυμητή η προετοιμασία του δείγματος, η ανάπτυξη μικροσκοπικών και αυτοματοποιημένη αναλυτικών μεθόδων από έμπειρους χειριστές, εξαιτίας της πολυπλοκότητας των διαδικασιών αυτών και του χρόνου που απαιτείται.

3.2.4.2 LC/MS

Την τελευταία δεκαετία η LC/MS αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την ποιοτική ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών. Η φασματοσκοπία μαζών δεν είναι απλά μια τεχνική ανίχνευσης, αλλά μια ακόμα διαχωριστική τεχνική η οποία στηρίζεται σε διαφορετική φυσική ιδιότητα ώστε να επιτευχθεί διαχωρισμός. Συνεπώς, ενώ η HPLC στηρίζεται στη συγγένεια του συστατικού προς τη στατική φάση, η MS στηρίζεται στην αναλογία μάζας/ φορτίο των ιόντων που παράγονται από τις ενώσεις που προσδιορίζονται (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

Συγκρινόμενη με τις κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους ανίχνευσης φασματοσκοπία μάζας μπορεί να προσφέρει αυξημένη ευαισθησία και επιλεκτικότητα (αν και ο ανιχνευτής φθορισμού μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητος για τις αφλατοξίνες). Επιπλέον, είναι δυνατό να διερευνήσει τη μοριακή δομή μεταβολιτών και να παρακάμψει τελείως τα στάδια της παραγοντοποίησης και του καθαρισμού που είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και ελλοχεύουν κινδύνους για εργαστηριακά λάθη.

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μικρή ποσότητα του αρχικού προπαρασκευαστικού δείγματος. Υπάρχει κίνδυνος μείωσης της ακρίβειας της μεθόδου εξαιτίας της τελείως απρόβλεπτης επίδρασης των συστατικών που συνυπάρχουν στο αρχικό δείγμα με την αναλυόμενη ουσία. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός μεθόδων που έχουν ως βάση την LC/MS (Sforzaetal., 2006).

3.3 Αέρια Χρωματογραφία

3.3.1 Γενικά

Η αέρια χρωματογραφία είναι μία τεχνική, ιδιαίτερα αποτελεσματική, που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών ενός μίγματος. Ενώ άλλες τεχνικές ενόργανης ανάλυσης προσφέρονται για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιγμάτων που αποτελούνται από λίγα μόνο συστατικά, με την αέρια χρωματογραφία είναι δυνατή η ανάλυση μιγμάτων που

περιέχουν εκατοντάδες συστατικών. Η τεχνική αυτή έχει πολλές εφαρμογές στον τομέα της οινολογίας. Με τον τρόπο αυτό η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός μεγάλου αριθμού συστατικών των οίνων και των αποσταγμάτων, που παλαιότερα ήταν δύσκολος και κάποτε αδύνατος, σήμερα με τη βοήθεια της αερίου χρωματογραφίας, αποτελεί καθημερινή ρουτίνα. Έτσι εμπλουτίστηκαν αφάνταστα οι γνώσεις των οινολόγων και ταυτόχρονα ανοίχθηκαν νέοι ορίζοντες στον τομέα της έρευνας και των εφαρμογών.

3.3.2 Οργανολογία

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία τριάντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή, αν συγκριθεί με ανάλογες τεχνικές χημικής ανάλυσης και με τις μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής που έχει.

Ο αέριος χρωματογράφος αποτελείται από δύο τμήματα, δηλαδή το φέρον αέριο και το κυριότερο μέρος του χρωματογράφου, όπου γίνεται ο διαχωρισμός και το σύστημα ανίχνευσης, καταγραφής και αποτίμησης του σήματος. Αναλυτικότερα, τα βασικά μέρη ενός αερίου χρωματογράφου είναι τα παρακάτω (Ταραντίλης και Παππάς, 2015):

1. **Οβίδα ή φιάλη φέροντος αερίου (κινητής φάσης).** Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση. Πρέπει να είναι αδρανές και να μην αντιδρά με τη στατική φάση ή με τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν. Χρησιμοποιούνται κυρίως το άζωτο (N_2), το ήλιο (He) και το αργό (Ar). Η επιλογή του φέροντος αερίου γίνεται με βάση τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή, καθώς το φέρον αέριο πρέπει να διαφέρει σημαντικά από τις διαχωριζόμενες ουσίες ως προς μια ιδιότητα. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο αέριο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας είναι το ήλιο, επειδή έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα και μικρή πυκνότητα, που επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής αερίου, με αντίστοιχη μείωση του χρόνου ανάλυσης. Με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας προτιμάται το άζωτο. Με ανιχνευτή συλλήψεως ηλεκτρονίων απαιτείται άζωτο ή αργό.

2. **Ρυθμιστής πίεσης - ροόμετρο.** Το φέρον αέριο στη φιάλη βρίσκεται σε πίεση 100-200 atm. Συνήθως η πίεση στην είσοδο της στήλης είναι 1-3 atm. Αυτό επιτυγχάνεται με το ρυθμιστή (μειωτήρα) πίεσης και στη συνέχεια μέσα από το ροόμετρο μετριέται με ακρίβεια η ταχύτητα (η ροή) του φέροντος αερίου.

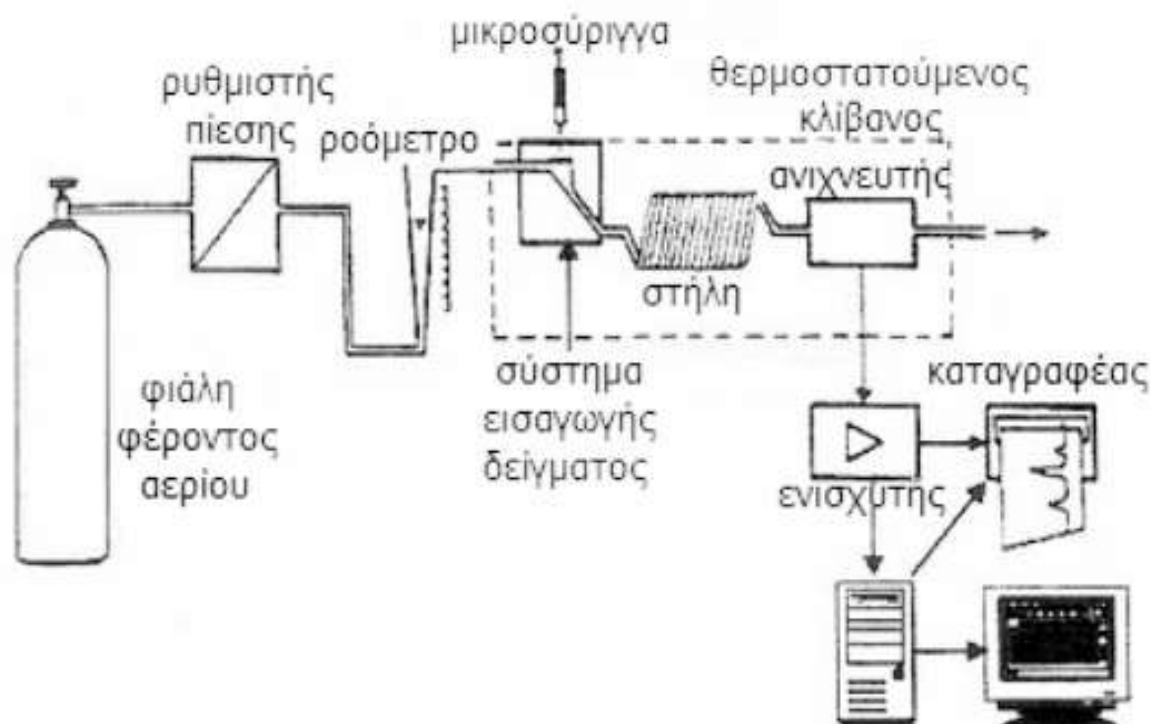
Η ροή του φέροντος αερίου παίζει καθοριστικό ρόλο στο διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος. Η πολύ ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι απαραίτητη, επειδή οι χρόνοι συγκρατήσεως εξαρτιούνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα. Χρησιμοποιούνται ροόμετρα με πλωτήρα στην είσοδο της στήλης ή ροόμετρα με σαπωνοδιαλύματος στην έξοδο της. Η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου όταν χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πληρωμένες στήλες (packedcolumns) είναι μερικές δεκάδες mL/min (10-60 mL/min), ενώ όταν χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες (capillarycolumns) είναι μερικά mL/min (1-6 mL/min).

3. **Σύστημα εισαγωγής δείγματος.** Είναι το σημείο μέσω του οποίου εισάγεται το δείγμα στο χρωματογραφικό σύστημα. Στο χώρο αυτό γίνεται η εξάερση του δείγματος, εφ' όσον αυτό είναι υγρό. Το δείγμα εισάγεται στο θάλαμο εξάερσης με μικροσύριγγα. Ο όγκος του δείγματος είναι 0,5-2 mL προκειμένου για αέρια και 1-10 μ L όταν πρόκειται για υγρά.

Το μέγεθος του δείγματος που εισάγεται στη στήλη καθορίζεται από πολλούς παράγοντες (διαθέσιμη ποσότητα, χωρητικότητα της στήλης, ευαισθησία ανιχνευτή κ.λπ.). Στην ιδανική περίπτωση το εισαγόμενο δείγμα καταλαμβάνει μια θεωρητική πλάκα. Συνήθως χρησιμοποιούνται 1-10 μ L και 0,1-1 μ L όταν χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πληρωμένες στήλες (packedcolumns) και τριχοειδείς στήλες (capillarycolumns) αντίστοιχα.

- 4 **Θερμοστατούμενος κλίβανος.** Η λειτουργία του φούρνου του χρωματογράφου μπορεί να είναι ισόθερμη ή αυξομειούμενης θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η δεύτερη περίπτωση εφαρμόζεται συνήθως όταν το προς διαχωρισμό μείγμα αποτελείται τόσο από συστατικά χαμηλού όσο και από συστατικά υψηλού σημείου ζέσεως.

- 5 **Στήλη χρωματογραφίας.** Το κύριο μέρος του χρωματογράφου είναι η στήλη. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία είναι συνήθως γυάλινες ή χαλύβδινες στήλες γεμισμένες με διάφορα υλικά ανάλογα με τα συστατικά που θέλουμε να διαχωρίσουμε (στήλες υλικού πλήρωσης, packedcolumns). Το σχήμα τους έχει μορφή έλικας και η διάμετρος του είναι πάρα πολύ μικρή. Σήμερα χρησιμοποιούνται τριχοειδείς γυάλινες στήλες μήκους μέχρι 25 m, οι οποίες εσωτερικά είναι καλυμμένες με διάφορα υλικά (CoatedCapillaryGlassColumns).
- 6 **Ανιχνευτής.** Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης, ανιχνεύει τα διάφορα συστατικά και δίνει ηλεκτρικά σήματα. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι:
- α) ανιχνευτήςθερμικήςαγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, TCD)
 - β) ανιχνευτήςιονισμούφλόγας (Flame Ionization Detector, FID)
 - γ)ανιχνευτήςσυλλήψεωσηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD).
7. **Ενισχυτής.** Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα.
8. **Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής – εκτυπωτής.** Ο καταγραφέας είναι το όργανο που μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα που φτάνει από τον ανιχνευτή, σε μηχανική κίνηση. Κατάλληλα προσαρμοσμένη γραφίδα καταγράφει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα εκλούόμενα από τη στήλη συστατικά του προς διαχωρισμό μείγματος. Τα σύγχρονα αεροχρωματογραφικά συστήματα διαθέτουν ηλεκτρονικό υπολογιστή για τη συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία και παρουσίαση των αποτελεσμάτων.



Πηγή: Ταραντίλης και Παππάς, 2015

Εικόνα 3.2Τυπική διάταξη ΑέριουΧρωματογράφου

3.3.3 Εφαρμογές

Στα γλεύκη υπάρχουν αρωματικές ουσίες, που βρίσκονται στο σταφύλι και οι οποίες συνθέτουν το πρωτογενές άρωμα του οίνου. Οι ποσότητες των αρωματικών αυτών συστατικών έχει αποδειχθεί ότι αυξάνονται κατά την διάρκεια της ωρίμανσης. Συγκεκριμένα, λίγο πριν από το αντίστοιχο μέγιστο των σακχάρων φθάνουν σ' ένα μέγιστο και στη συνέχεια ακολουθούν μια ελαφρά καθοδική πορεία. Με βάση τα δεδομένα αυτά, ερευνητές έχουν διατυπώσει την άποψη ότι η ημερομηνία τρυγητού καθορίζεται στο σημείο που παρουσιάζεται το μέγιστο των αρωματικών συστατικών. Συνεπώς, η δυνατότητα προσδιορισμού των αρωματικών συστατικών με την αέριο χρωματογραφία κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης δίνει στον οινολόγο που ενδιαφέρεται να παρασκευάσει ένα οίνο με ιδιαίτερα ανεπτυγμένο το πρωτογενές άρωμα, πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την εκτίμηση του χρόνου τρυγητού. Η εφαρμογή της τεχνικής της αερίου χρωματογραφίας δίνει πολύτιμες πληροφορίες στον οινολόγο ως προς τα παρακάτω στοιχεία:

α) Εκτίμηση ποικιλιών: Δεδομένου ότι όλες οι ποικιλίες αμπέλου δεν προσφέρονται για την παραγωγή των ίδιων τύπων οίνων, οι λευκοί ξηροί οίνοι που παράγονται από διάφορες ποικιλίες οι οποίες οινοποιήθηκαν με την ίδια τεχνική, εμφανίζουν διαφορετικούς αρωματικούς χαρακτήρες (έντονο βαρύ άρωμα, σύνθετο και λεπτό που θυμίζει φρούτα ή άνθη, έλλειψη αρώματος κλπ.). Οι χαρακτήρες αυτοί αναγνωρίζονται με την μελέτη των αντιστοίχων χρωματογραφημάτων που επιτρέπουν την εξαγωγή των σχετικών συμπερασμάτων.

β) Μελέτη των συνθηκών ζύμωσης: Όταν αναφερόμαστε στο άρωμα ενός λευκού ξηρού οίνου, με εξαίρεση την περίπτωση των Μοσχάτων, πρόκειται για το δευτερογενές άρωμα που συνίσταται από ταπητικά παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης. Επομένως, οι συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται η αλκοολική ζύμωση, είναι φυσικό, να επιδρούν θετικά ή αρνητικά στο άρωμα του οίνου. Η σύνθεση, δηλαδή, του αρώματος, με το οποίο ο ποικιλιακός παράγοντας προικίζει τον οίνο, μπορεί να βελτιωθεί ή, αντίθετα, να επιβαρυνθεί με την παραγωγή συστατικών που ασκούν θετική ή αρνητική επίδραση. Η παραγωγή των ουσιών αυτών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως: ο τρόπος πίεσης των σταφυλών, η θερμοκρασία και η διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, οι απολασπώσεις κ.λ.π.

γ) Χρήση οινολογικών ουσιών: Ακόμα και η χρήση ορισμένων οινολογικών ουσιών, όπως πχ τα αμμωνιακά άλατα, τα οποία προστίθενται στα γλεύκη ως τροφή των ζυμών, επιδρούν στη διαμόρφωση του αρώματος των οίνων. Η θετική ή αρνητική επίπτωση αυτών και ο βαθμός επίδρασης μελετώνται με τη χρήση της αερίου χρωματογραφίας.

δ) Συνθήκες παλαίωσης: Το δευτερογενές άρωμα των οίνων μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, δίνοντας τη θέση του στο λεγόμενο τριτογενές άρωμα. Το άρωμα αυτό, που λέγεται και μπουκέτο, αποτελείται από πτητικά συστατικά τα οποία σχηματίζονται με αναγωγικές ή οξειδωτικές αντιδράσεις κατά την ωρίμανση των οίνων σε βαρέλια ή φιάλες.

ε) Ασθένειες: Η εκδήλωση πολλών ασθενειών στους οίνους συνοδεύεται από την παραγωγή πτητικών ουσιών, που εύκολα μπορούν να ανιχνευθούν και να προσδιορισθούν ποσοτικά με την αέριο χρωματογραφία. Με τον τρόπο αυτό, είναι

δυνατόν να εκτιμηθεί γρήγορα ο βαθμός προσβολής του οίνου χωρίς να απαιτείται η προσφυγή σε εξειδικευμένες και πολλές φορές χρονοβόρες αναλύσεις.

στ) Νοθείες: Ένας άλλος σημαντικός τομέας, για τον οποίο ο αέριος χρωματογράφος αποτελεί απαραίτητο βοηθό, είναι ο έλεγχος του έτοιμου προϊόντος. Η εποχή που ο προσδιορισμός της αλκοόλης, της οξύτητας, της πτητικής, ήταν αρκετός για τον έλεγχο του οίνου ανήκει στο παρελθόν. Σήμερα, η νοθεία των διαφόρων προϊόντων έχει εξελιχθεί σε σημείο τέτοιο, ώστε να είναι απαραίτητη η χρήση πιο εξειδικευμένων οργάνων για την διαπίστωσή της. Ενδεικτικά αναφέρονται δυο σχετικά πρόσφατα παραδείγματα: η νοθεία ιταλικών οίνων με προσθήκη μεθανόλης καθώς και αυστριακών με διαιθυλένο – γλυκόλη (Μπενά– Τζούρου, 1990).

3.3.4 Άλλες τεχνικές

3.3.4.1 Αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία (GasChromatography, GC) είναι βασικά μέθοδος διαχωρισμού και όχι μέθοδος ταυτοποίησης των συστατικών δείγματος. Όταν όμως αυτή συνδυαστεί με τη φασματομετρία μαζών (MassSpectrometry, MS) τότε γίνεται ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Το GC-MS αποτελεί μια από τις πιο πετυχημένες συνδυαστικές τεχνικές (hyphenatedtechniques).

Ο αέριος χρωματογράφος (GC) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των ουσιών ενώ ο φασματόμετρο μαζών (MS) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των ουσιών. Η ευαισθησία του GC-MS όταν το σύστημα χρησιμοποιείται με την τεχνική «normalscanningmode» είναι αντίστοιχη εκείνης του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) (Ταραντίλης και Παππάς, 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο. ΕΠΙΠΕΔΑ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ

4.1 Γενικά

Αν και στα σταφύλια έχουν αναγνωριστεί πολλά είδη μυκήτων τα οποία είναι δυνατόν να παράγουν διάφορες μυκοτοξίνες, η μόνη που ενδιαφέρει την οινοβιομηχανία είναι η ωχρατοξίνη Α. Η κατανάλωση κρασιού συμβάλει κατά 13% στην πρόσληψη ΟΤΑ από τον άνθρωπο σύμφωνα με παλαιότερες εκτιμήσεις της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (European Commission, 2002). Η ΟΤΑ ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε κρασί το 1995 (Zimmerli and Dick) και από τότε έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμες μελέτες πάνω στο θέμα αυτό, τόσο για το κρασί όσο και για άλλα αμπελουργικά προϊόντα όπως σταφίδες και χυμό σταφυλιών. Όπως αναφέρθηκε η Ωχρατοξίνη Α παράγεται από κάποια ενδημικά στελέχη του μύκητα *Aspergillus* (*Aspergillus Negri*, *Aspergillus Carbonarius*), οι οποίοι ενδημούν σε ξηροθερμικές περιβαλλοντικές συνθήκες και επιβιώνουν σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας νερού, όπως αυτές που επικρατούν στο εσωτερικό της ρώγας του σταφυλιού κατά την διαδικασία ωρίμανσης των σταφυλιών.



Εικόνα 4.1 Προσβεβλημένη ρόγα σταφυλιού

Αν και η παρουσία της Ωχρατοξίνης Α στο κρασί αποτελεί δυνητικά σοβαρό πρόβλημα, τα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι με σωστή διαχείριση μπορεί να μειωθεί δραστικά ο σχετικός κίνδυνος. Η μείωση ή αποφυγή του τραυματισμού των ραγών στον αγρό, η γρήγορη μεταφορά τους και οι άριστες συνθήκες υγιεινής στο οινοποιείο, έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή κρασιού με χαμηλά ποσά ΟΤΑ. Στο μέλλον οι οινοποιοί ίσως έχουν στη διάθεσή τους διάφορες ποικιλίες ζυμών οι οποίες να προσροφούν πολύ αποτελεσματικά την Ωχρατοξίνη Α ελαχιστοποιώντας έτσι την πιθανότητα να μεταφέρεται αυτή στο τελικό προϊόν ακόμα και όταν η πρώτη ύλη την περιέχει.

4.2 Παρουσία ωχρατοξίνης Α σε διεθνή επίπεδα

Η παρουσία αυτής της μυκοτοξίνης στο κόκκινο κρασί έχει αναφερθεί σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένων των μεσογειακών. Ωστόσο, λόγω της μεγάλης ποικιλίας των υπό εξέταση κρασιών και των διαφορών που παρουσιάζονται κατά την αναλυτική μεθοδολογία, ιδίως όσον αφορά το βαθμό επίτευξης των διαφορετικών ορίων ανίχνευσης (LOD), είναι δύσκολο να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των χωρών που σχετίζονται με το ποσοστό των θετικών δειγμάτων ή τα επίπεδα της μόλυνσης (SCOOP, 2002).

Διάφοροι παράγοντες, όπως το κλίμα, η καλλιέργεια της αμπέλου και οι τεχνικές οινοποίησης επηρεάζουν τα επίπεδα της ωχρατοξίνης στα κρασιά. Υπάρχει η μερίδα των συγγραφέων που υποστηρίζουν ότι οι κόκκινοι οίνοι της Νότιας Ευρώπης έχουν μολυνθεί με αυτή τη μυκοτοξίνη σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με αυτούς που παράγονται στις βόρειες περιοχές, εξαιτίας των πιο θερμών κλιματικών συνθηκών (Brera *et al.*, 2008., Otteneder and Majerus, 2000). Παρόλο αυτά, η έκθεση SCOOP και η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων επεσήμανε ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης ΟΤΑ φαίνεται να είναι αρκετά κοντά μεταξύ τους και ότι δεν υπάρχουν συστηματικές διαφορές μεταξύ των χωρών (EFSA, 2006). Αναλυτικότερα, τα επίπεδα της μέσης συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α που παρατηρούνται ανάμεσα στις διάφορες χώρες του κόσμου κατατάσσονται ως εξής:

**Γαλλία <Κροατία <Ισραήλ <Ιταλία ≈ Τουρκία <Ισπανία <Ελλάδα <Βόρεια
Αφρική**

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονίσουμε ότι στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ωχρατοξίνης Α παρατηρήθηκαν μόνο στα δείγματα προερχόμενα από τη Βόρεια Αφρική. Τα χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της αναλυτικής μέθοδος που ακολουθήθηκε έδωσε ένα μεγάλο ποσοστό θετικών δειγμάτων, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα. Δεδομένου ότι κάθε χώρα χρησιμοποιεί διαφορετικά μέσα και τρόπους υπολογισμού μέσης τιμής, θα πρέπει να είμαστε προσεκτικοί ως προς τα επίπεδα μόλυνσης και τις εκτιμήσεις μας.

Πίνακας 4.1 Επίπεδα ωχρατοξίνης Α σε διάφορες χώρες

Χώρα	+ ^a /N ^c total	% ^a	Μέσος όρος (μg L ⁻¹)	Διάμεσος (μg L ⁻¹)	Ευρος (μg L ⁻¹)
Spain	66/72	91.7	0.038 ^c	NS	<0.003–0.603 ^c
	13/28	46.4	0.147 ^a	<0.05	0.056–0.316 ^a
	24/130	18.5	0.465 ^a	<0.05	0.06–4.24 ^a
	21/61	34.4	0.281 ^b	<0.01	0.06–0.53 ^b
	54/94	57.4	0.037 ^a	NS	0.004–0.179 ^a
France	8/8	100	0.225 ^{a,c}	NS	0.004–0.452 ^{a,c}
	2/5	40.0	0.028 ^a	<0.021	0.028 ^a
Italy	13/14	92.9	0.058 ^a	NS	0.010–0.237 ^a
	6/8	75.0	0.052 ^c	NS	<0.003–0.191 ^c
	37/38	97.4	1.24 ^a	0.76 ^a	<0.01–7.63 ^c
	82 ^b /96	85.4 ^b	0.419 ^c	0.090	<0.001–3.18 ^c
	36/43	83.7	0.30 ^a	NS	0.04–1.44 ^a
	88 ^b /112	78.6 ^b	0.64 ^{NS}	NS	<0.01–4.93 ^c
Croatia	535/773	69.2	0.34 ^c	0.10	<0.01–7.50 ^c
	695 ^b /1002	69.4 ^b	0.121 ^b	NS	<0.0072–2.63 ^c
	7/7	100	0.022 ^{a,c}	0.022 ^{a,c}	0.012–0.047 ^{a,c}
Greece	8/10	80.0	0.015 ^a	0.015	<0.005–0.021 ^c
	71/104	68.3	0.34 ^c	0.09	<0.05–2.69 ^c
Turkey	9/14	64.3	0.68 ^a	0.09	<0.02–2.51 ^c
	35/35	100	0.728 ^{b,c}	0.09 ^{b,c}	0.04–1.92 ^{b,c}
	44/51	86.3	0.110 ^b	NS	<0.010–0.815 ^c
Hungary	20/20	100	2.85 ^{b,c}	2.73 ^{b,c}	0.39–7.96 ^{b,c}
	33/33	100	0.117 ^{a,c}	NS	0.03–0.533 ^{a,c}
Slovakia	12/18	66.7	NS	0.011	<0.011–0.463 ^c
Russia	3 ^b /7	42.9 ^b	2.9 ^b	<0.5	1.8–4.4 ^b
South America	7/22	31.2	0.039 ^a	<0.021	0.028–0.071 ^a
Canada	5/36	13.9	0.024 ^c	<0.008	<0.008–0.393 ^c

Πηγή: Mikulíková *et al*, 2011

4.3 Παρουσία ωχρατοξίνης Α στα Ελληνικά κρασιά

Στους Ελληνικούς οίνους, όπως και σε αυτούς των άλλων χωρών, ο κίνδυνος επιμόλυνσης είναι ελαφρώς υψηλότερος για τους ερυθρούς οίνους παρά για τους λευκούς, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από τις διαφορετικές μεθόδους οινοποίησης. Συνήθως, τα λευκά σταφύλια πιέζονται άμεσα, ενώ στα κόκκινα σταφύλια εφαρμόζεται εκχύλιση για κάποιο διάστημα, η οποία επιτρέπει ένα ποσοστό της τοξίνης να μεταφερθεί στο χυμό.

Όσον αφορά την επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης σε σχέση με το βαθμό εμφάνισης και τη συχνότητα των ΟΤΑ στο Ελληνικά κρασιά, παρατηρείται ότι (Sarigiannis*et al.*, 2014):

- Ξηρά κρασιά προερχόμενα από την περιοχή της Θεσσαλίας ήταν μολυσμένα με ΟΤΑ σε συγκέντρωση που κυμαίνονται από 0,04 έως 2,52 ng mL⁻¹, επιπλέον το 42,8% από αυτά είχαν συγκέντρωση ΟΤΑ πάνω από 1 ng mL⁻¹.
- Ξηρά κρασιά προερχόμενα από την περιοχή της κεντρικής Ελλάδας ήταν μεν μολυσμένα με ΟΤΑ, αλλά κανένα από αυτά δεν υπερέβαινε την συγκέντρωση των 0,5 ng mL⁻¹.
- Ξηρά κρασιά προερχόμενα από τη δυτική Ελλάδα ήταν μολυσμένα με ΟΤΑ σε ποσοστό μόνον οι μισοί (50%) σε συγκέντρωση που κυμαίνεται από <0,01 έως 0,51 ng mL⁻¹.

Οι Brera, Soriano, Debegnach, και Miraglia (2005) απέδειξαν ότι στην γειτνίαση με τη θάλασσα ωφελείται η ανάπτυξη της ΟΤΑ, καθώς οι υπεύθυνοι μύκητες αναπτύσσονται σε αυτά τα επίπεδα της υγρασίας. Γενικότερα οι οίνοι που προέρχονται από την ηπειρωτική Ελλάδα είναι λιγότερο μολυσμένοι από τους οίνους που παρήχθησαν στα νησιά. Αυτό αποδίδεται στους κλιματολογικούς παράγοντες που εμφανίζονται στα νησιά, δηλαδή στους εποχιακούς άνεμους και την αυξημένη υγρασία αυτών των περιοχών.

Οι Anli*et al.*, (2005) ανέφεραν ότι οι οίνοι που προήλθαν από την περιοχή της Θράκης και του Αιγαίου περιείχαν υψηλότερες τιμές ΟΤΑ συγκριτικά με τους οίνους των περιοχών της κεντρικής και ανατολικής Ελλάδας. Επιπλέον, οίνοι προερχόμενοι

από τους αμπελώνες της κεντρικής και δυτικής Ελλάδας, παρά την γειτνίαση με την ακτή ήταν λιγότερο μολυσμένοι με ΟΤΑ από τους οίνους προερχόμενους από τη Θεσσαλία. Σημαντικό ρόλο σε αυτό θα μπορούσε να διαδραματίζει το υψόμετρο του εδάφους των αμπελώνων. Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότεροι από αυτούς παρουσιάζουν κατά μέσο όρο υψόμετρο (300-700 m) σε αντίθεση με τους αμπελώνες της Θεσσαλίας (50-200 m) όπως αποτυπώνεται στον παρακάτω Πίνακα.

Πίνακας 4.2 Επίπεδα Ωχρατοξίνης Α

Είδος	N	Θετικά Δείγματα (%) ^a	Μέσο	Μέσος όρος	Διακύμανση	LOD – 0.50	0.50–1.00	1.00–2.00	>2.00
Σύνολο	60	52 (86.7)	0.38	0.10	<LOD ^d – 2.52	42 (80.8)	3 (5.8)	2 (3.8)	5 (9.6)
Σύνολο Κόκκινοι Οίνοι	55	47 (85.4)	0.37	0.08	<LOD – 2.52	38 (80.9)	3 (6.4)	2 (4.2)	4 (8.5)
Κεντρική Ελλάδα	25	25 (100)	0.12	0.07	<LOD – 0.29	25 (100)	0	0	0
Ξηροί Κόκκινοι Οίνοι	14	14 (100)	0.09	0.07	<LOQ – 0.18	14 (100)	0	0	0
Ξηροί Λευκοί Οίνοι	11	11 (100)	0.14	0.07	<LOQ – 0.29	11 (100)	0	0	0
Δυτική Ελλάδα	16	8 (50)	0.13	0.02	<LOD – 0.51	7 (87.5)	1 (12.5)	0	0
Ξηροί Κόκκινοι Οίνοι	6	1 (16, 7)	0.01	<LOD	<LOD – 0.04	6 (100)	0	0	0
Ξηροί Λευκοί Οίνοι	10	7 (70)	0.19	0.13	<LOD – 0.51	9 (90)	1 (10)	0	0
Θεσσαλία	14	14 (100)	1.1	0.64	0.04 – 2.52	6 (42.8)	2 (14.3)	2 (14.3)	4 (28.6)
Ξηροί Κόκκινοι Οίνοι	1	1 (100)	0.71	0.71	0.71	0	1 (100)	0	0
Ξηροί Λευκοί Οίνοι	5	5 (100)	0.32	0.42	0.04–0.56	4 (80)	1 (20)	0	0
Ξηροί Ροζέ Οίνοι	8	8 (100)	1.64	1.93	0.19–2.52	2 (25)	0	2 (25)	4/8 (50)
Σύνολο Γλυκοί Οίνοι	5	5 (100)	0.54	0.10	0.05 – 2.30	4 (80)	0	0	1 (20)

Πηγή: Sarigiannis*et al.*, 2014

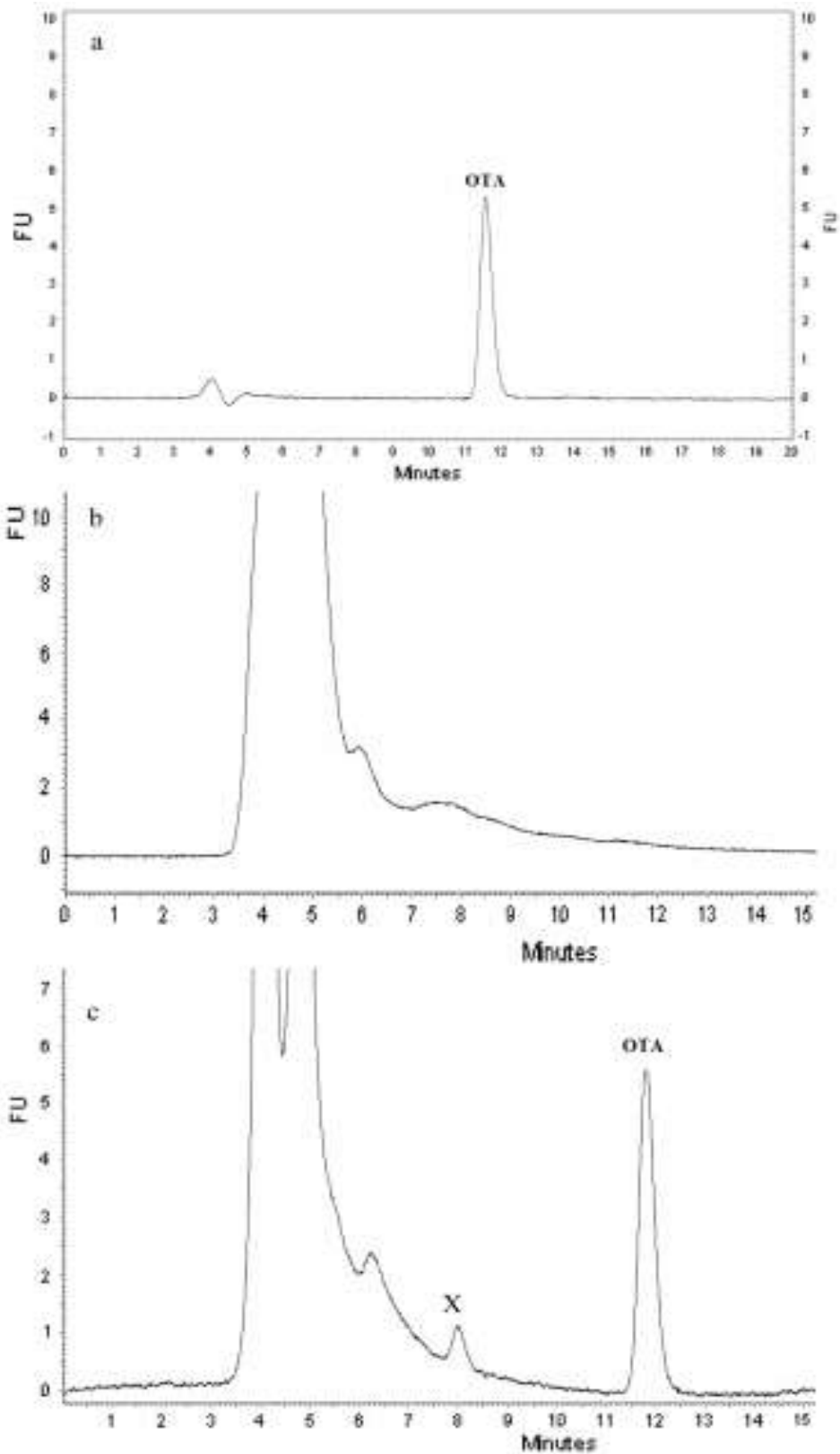
Ωστόσο η επίδραση της χρονιάς στο περιεχόμενο σε ωχρατοξίνη Α έχει μελετηθεί σε σχέση με την ποικιλία και την προέλευση των σταφυλιών. Οι Soufleros, Tricard and Bouloumpasi (2003) σε έρευνα που έχουν πραγματοποιήσει, με στόχο την αξιολόγηση της παρουσίας της ωχρατοξίνης Α σε Ελληνικούς οίνους, έχουν αποδώσει υψηλές τιμές στη μεγάλη πυκνότητα του βότρυ των αντίστοιχων ποικιλιών, ενώ η επιμόλυνση των δειγμάτων έχει συνδεθεί αφενός με την ευαισθησία του αντίστοιχου σταφυλιού στο βοτρώτη και αφετέρου με την συγκεκριμένη τεχνική οινοποίησης που απαιτεί την υπερωρίμανση του σταφυλιού στο αμπέλι. Η παρατεταμένη παραμονή των σταφυλιών στα πρέμνα πριν από τη συγκομιδή (ώστε να επιτευχθεί περιεκτικότητα σε ζάχαρα 14-15 Baume), μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη του μύκητα όταν η υγρασία είναι υψηλή. Αυτός είναι ενδεχομένως ο λόγος

για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης της προσβολής και τα υψηλά επίπεδα ωχρατοξίνης A που παρουσιάζουν οι γλυκοί οίνοι. Τέλος, οι γλυκοί οίνοι εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα τοξίνης σε σχέση με τους ξηρούς οίνους της ίδιας προέλευσης.

Στην έρευνα αυτή, οι επιμολυσμένοι γλυκοί οίνοι από τις νότιες περιοχές περιείχαν 0,41 ng/ml ωχρατοξίνης A κατά μέσον όρο, ενώ οι ξηροί οίνοι από τις ίδιες περιοχές περιείχαν 0,11 ng/ml. Στο σημείο αυτό, προκύπτει ότι μεταξύ των γλυκών οίνων τα λευκά περιέχουν τα υψηλότερα επίπεδα της τοξίνης και εμφανίζουν συχνότητα επιμόλυνσης 100%.

Πρακτικές όπως η μακρά έκθεση των σταφυλιών στον ήλιο μετά τη συγκομιδή προκειμένου να αφυδατωθούν και να υπάρξει μια αύξηση των περιεχομένων των ζαχάρων, αυξάνουν την ευαισθησία των σταφυλιών σε ενδεχόμενη προσβολή από μύκητες. Επιπλέον, τα επίπεδα επιμόλυνσης που ανιχνεύθηκαν στους γλυκούς οίνους στην παρούσα μελέτη είναι γενικά υψηλότερα από εκείνα που αναφέρονται για παρόμοιες μελέτες που διεξήχθησαν σε άλλες χώρες. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο συνδυασμό υψηλών θερμοκρασιών και υψηλής σχετικής υγρασίας.

Οι παράμετροι αυτοί ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων που παράγουν ωχρατοξίνη A και σε συνδυασμό με την παραμονή των σταφυλιών τόσο στα πρέμνα, όσο στον ήλιο σε ειδικούς χώρους συμπυκνώνονται τα ζάχαρα τους και εκτίθενται σε κλιματολογικούς παράγοντες. Γενικότερα, είναι αποδεκτό ότι η υγρασία, η υψηλή θερμοκρασία, οι μετασυλλεκτικές συνθήκες, ο αερισμός και ο χρόνος της προσβολής από το μύκητα είναι ευνοϊκοί παράγοντες για την παραγωγή της ωχρατοξίνης A (Soufleros *et al.*, 2003). Με την εφαρμογή της χρωματογραφίας τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα.



Πηγή: Sarigiannis *et al.*, 2014

Σχήμα 4.1 HPLC-FLD Χρωματογραφήματα: a) πρότυπου διαλύματος OTA, b) δείγμα οίνου αρνητικό για OTA, c) δείγμα οίνου θετικό για OTA.

Τέλος, ενέργειες καταπολέμησης του βοτρυτή θα μπορούσαν να μειώσουν αποτελεσματικά την πηγή επιμόλυνσης των σταφυλιών. Ανάμεσα στα είδη μυκήτων που έχουν εξετασθεί ως προς την ικανότητά τους να αποσυνθέτουν την ωχρατοξίνη Α είναι ο *Aspergillus fumigatus* και στελέχη του μαύρου *Aspergillus*. Αναλυτικά τα είδη αυτά βρέθηκε ότι μπορούν να αποτοξινώνουν την ωχρατοξίνη σε συνθετικά υλικά. Επιπλέον, ένα στέλεχος *A. niger* παρατηρήθηκε ότι μπορεί να μειώνει αποτελεσματικά την ωχρατοξίνη Α είτε από υγρά, είτε από στερεά θρεπτικά υλικά. Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι μερικά από τα πολλά διαφορετικά τοξικά αποτελέσματα της μυκοτοξίνης στους καταναλωτές μπορούν να ελεγχθούν μερικώς με πρόσληψη αντιοξειδωτικών, ιδιαίτερα βιταμίνης Ε, συμπληρωματικά στη διατροφή και ενδεχομένως πρόσληψη άλλων παραγόντων, όπως καροτενοειδή και φλαβονοειδή.

Στους Ελληνικούς οίνους οι τιμές της ωχρατοξίνης Α ως προς τον μέσο όρο και τη διάμεσο αντίστοιχα ήταν 59,4 και 31,7 ng L⁻¹ με εύρος: 4,35- 212 ng L⁻¹. Αυτό σημαίνει ότι και οι μέγιστες τιμές ήταν δέκα φορές χαμηλότερες από προηγούμενες μελέτες (Soufleros *et al.*, 2003; Stefanaki *et al.*, 2003). Στο γεγονός ότι οι τιμές της διαμέσου κυμαίνονταν στον ίδιο βαθμό, αποδίδονται τα μεγαλύτερα επίπεδα ΟΤΑ στις Νότιες περιοχές της Ελλάδας σε σύγκριση με τις Βορειότερες, με μέγιστες τιμές να εμφανίζονται στα νησιά του Αιγαίου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αν και στα σταφύλια έχουν αναγνωριστεί πολλά είδη μυκήτων τα οποία είναι δυνατόν να παράγουν διάφορες μυκοτοξίνες, η μόνη που ενδιαφέρει την οινοβιομηχανία είναι η ωχρατοξίνη Α(ΟΤΑ). Η κατανάλωση κρασιού συμβάλει κατά 13% στην πρόσληψη ΟΤΑ από ανθρώπους σύμφωνα με παλαιότερες εκτιμήσεις της Επιτροπής.

Οι μύκητες που την παράγουν ανήκουν στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium*, με το μεσογειακό κλίμα να ευνοεί την ανάπτυξη των ειδών του *Aspergillus* ενώ το *Penicillium* κυριαρχεί στις χώρες με κρύο κλίμα. Η Ωχρατοξίνη Α παράγεται αποκλειστικά από το είδος *Penicillium verrucosum*, το οποίο πιθανόν παράγει το μεγαλύτερο ποσοστό την μυκοτοξίνης σε περιοχές με κρύο κλίμα. Επιπλέον, μεταξύ των Ασπεργίλλων, ο *Aspergillus carbonarius* αποτελεί την κύρια πηγή ΟΤΑ.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κυρίως για τον προσδιορισμό τους είναι η αέρια και η υγρή χρωματογραφία. Αναλυτικότερα, η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και προσδιορισμό ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι οι εξεταζόμενες ουσίες να είναι πτητικές ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλα αντιδραστήρια, όπως συμβαίνει με τις λιπαρές ύλες όπου τα γλυκερίδια των λιπαρών οξέων μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες, πτητικές ενώσεις. Κάποια από τα βασικά πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας είναι :

- Η μεγάλη ευαισθησία
- Η ταχύτητα
- Η απλότητα
- Πάρα πολύ δύσκολοι, επίπονοι διαχωρισμοί
- Ποσοτική απομόνωση συστατικών και λήψη τους με τη μορφή που βρίσκονται στο αρχικό μίγμα.

Εξαιτίας αυτών των πολλαπλών πλεονεκτημάτων η αέρια χρωματογραφία είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για αναλυτικούς σκοπούς από όλες τις μεθόδους διαχωρισμού τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική ανάλυση. Επιπλέον με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο έλεγχος της καθαρότητας ουσιών και μπορεί να εφαρμοσθεί στο 95% τουλάχιστον των οργανικών ενώσεων. Όμως, η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης υπερτερεί της αέριας χρωματογραφίας, εξαιτίας των παρακάτω λόγων:

α) αναλύει απ' ευθείας και μη πτητικές ουσίες

β) παρέχει τη δυνατότητα συνδυασμού δύο φάσεων (κινούμενη, στατική) για καλύτερο διαχωρισμό έναντι της μιας (στατικής) φάσης που παρέχει η GC,

γ) λειτουργεί σε θερμοκρασίες πολύ χαμηλότερες της GC, οπότε ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αποικοδόμησης ή απώλειας μέρους του δείγματος,

δ) παρέχει δυνατότητα χρήσης ποικιλίας ανιχνευτών, όπως φασματοφωτομετρικών (UV-Vis), ηλεκτροχημικών, μέτρησης δείκτη διάθλασης κ.ά.

Γενικά, διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα της ωχρατοξίνης στα κρασιά είναι το κλίμα, η καλλιέργεια της αμπέλου και οι τεχνικές οινοποίησης. Η παρουσία αυτής της μυκοτοξίνης στο κόκκινο κρασί έχει αναφερθεί σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένων των μεσογειακών. Στους Ελληνικούς οίνους, ο κίνδυνος επιμόλυνσης είναι ελαφρώς υψηλότερος για τους ερυθρούς οίνους παρά για τους λευκούς, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από τις διαφορετικές μεθόδους οινοποίησης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anli, E., Çabuk, B., Vural, N., & Bas, pinar, E. (2005). Ochratoxin A in Turkish wines. *Journal of Food Biochemistry*, 29(6), 611-623

Aresta, A., Vatinno, R., Palmisano, F., & Zambonin, C. G. (2006). Determination of ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1115, 196-201.

Battiliani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T., & Pietri, A. (2004). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1736-1740.

Bennet, J.W., Klich, M., (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497-516.

Brera, C., Debegnach, F., Minardi, V., Prantera, E., Pannunzi, E., Faleo, S., et al. (2008). Ochratoxin A contamination in Italian wine samples and evaluation of the exposure in the Italian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10611.

CAST (Council for Agricultural Science and Technology). Mycotoxins: Economic and Health Risks. Council for Agricultural Science and Technology *Task Force Report No 116*. Ames, IA., 1989.

Caridi, A., (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 417-422.

Cecchini F., Morassut, M., Moruno, E.G. & Di Stefano, R., (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.* 23,411-417.

Chiodini, M., Scherpenisse, P., & Bergwerff, A. A. (2006). Ochratoxin A content in wine: comparison of organically and conventionally produced products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7399-7404.

Commission, European. (2005). Commission regulation (EC) No.123/2005 of 26January 2005 amending regulation (EC) No. 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union L*, 25, 3-5.

Comission, European. (2002). Commission Decision (EC) No. 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union L*, 221, 8-36.

EFSA. (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. Question NEFSA-Q-2005-154. *The EFSA Journal*, 365, 1-56.

Fink-Gremmels, J., (2005). Conclusions from the workshops on Ochratoxin A in Food. *Food Addit. Contam.*, 22: 1-5.

Gambutì, A., Strollo, D., Genovese, A., Ugliano, M., Ritieni, A. & Moio. L., 2005. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 155-162.

Hernandez, M. J., García-Moreni, M. V., Duran, E., Guillen, D., & Barroso, C. G. (2006). Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. *Analytica Chimica Acta*, 566, 117-121.

IARC. (1993). Ochratoxin A. Monographs 56 on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins (pp. 489-521). Lyon, France.

Gilbert, J., Anklam, J., (2002). Validation of analytical methods for determination mycotoxins in foodstuff. *Trends in analytical chemistry*, 21, p.468-486.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series 47, FAO food and Nutrition Paper 74.

Kabak, B, Dobson, ADW, Var, I., (2006). *Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review*. *Crit. Rev FoodSci.Nutr.*, 46:593619.

Krogh, P., (1987). *Mycotoxins in Food*. Academic Press, London, UK.

Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A., Mizaikoff, B., (2005). Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants* 22, pp. 345-353.

Lo Curto, R., Pellicano, T., Vilasia, F., Munafo, P. & Dugoa, O., 2004. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chem.* 84, 71-75.

Maroto, A., Boque, R., Riu, J., Ruisanchez, It., Odena, M., (2005). Uncertainty in aflatoxin B1 analysis using information from proficiency tests», *Anal. BioanalChem* 382, p.1562-1566.

Mikulíková., R., Belakova., S., Benesova., K., & Svoboda., Z. (2012). Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 133, 55- 59.

Minervini.F., Dell'Aquila,M.E., Maritato.F, Minoia. P., Visconti. A., (2001). Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol in vitro* 15:489-495.

Miraglia., M., Brera., C., (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States, January.
http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.htm

Μάρκογλου, Ν., Δημητρόπουλος,Χ., Φιλίππου, Ν.,(2008). Τα πολλά πρόσωπα του *Aspergillusfumigalus* και οι επιπτώσεις του στον άνθρωπο. *Αρχές Ελληνικής Ιατρικής*. 25(3):295-307.

Μπενά– Τζούρου,Ε. (1990). Η τεχνική της αερίου Χρωματογραφίας, Εφαρμογές στην Οινολογία. *Οινολόγος*.

Müller,G., Rosner,H., Rohrmann,B., Erler,W., Geschwend,G., Gräfe,U., Burkert,B., Möller,U., Diller,R., Sachse,K., Köhler,H., (2003). Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1.*Toxicology*, 184(1):69-82.

Otteneder, H., & Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, 17, 793e798

OIV. (2001). International Organisation of Vine and Wine, Resolution Oeno 16/2001 (revisedbyOeno, 349-2011).

Παπαδογιάννης, Ι. και Σαμανίδου, Β. (2001). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*. Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη.

Pearson, M., Candlish, G., Aidoo, E., Smith, E., (1999). Determination aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immune affinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection. *Biotechnology Techniques* 13: 97-99.

Pichon, V., Delaunay-Bertoncini, M., Hennion, M.B (2002). Immunosorbents in sample preparation, in: J. Pawliszyn (Ed.), *Sampling and sample preparation for field and laboratory. Comprehensive Analytical Chemistry Series, Vol. 37*, Elsevier Science, pp. 1081–1100.

Pittet, A., (2005). Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 94, 424-444.

Quintela, S., Villarán, M.C., (2013). Ochratoxin A removal in wine: A review. López de Armentia I., Elejalde E, *Food Control*; 30: 439–445.

Rousseu, J. and Blateyron, L. (2002). Ochratoxine A in wines: no curative solution in wine, priority in the vineyard sanitary management. *Revue des Oenologues France*, 29, 14-16.

Sarigiannis, Y., Kapolos, J., Koliadima, A., Tsegenidis, T., & Karaiskakis, G. (2014). Ochratoxin A levels in Greek retail wines. *Food Control*, 42, 139-143.

SCOOP. (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Reports on Tasks for Scientific Cooperation, task 3.2.7

Sforza, S., Dall'Asta, C., Marchelli, R. (2006). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25, pp. 54-76.

Sheibani, A. and Ghaziaskar, S., (2008). Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B₁ and B₂ from pistachi, *Food Control* 20 p. 124-128.

Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E. C., & Tricard, C. (2003). Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 173e179.

Stefanaki, I., Foufa, E., Tsatsou-Dritsa, A., & Dais, Photis (2003). Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. *Food Additives & Contaminants*, 20(1), 74–83.

Ταραντίλης, Π. και Παππάς, Χ., (2015). Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.

Varga, J., Kiss, R., Mátrai, T., Mátrai, T., & Téren, J. (2005). Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers. *Acta Alimentaria*, 34(4), 381-392.

Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., & Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205, 1112-1113.

Var, I., Kabak, B., & Erginkaya, Z. (2008). Reduction in ochratoxin A levels in whitewine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control*, 19(6), 592-598.

Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G., (1999). Determination of ochratoxin A in wine by means of immune affinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A* 864, 89–101.

Zimmerli B. and Dick R., (1996). Ochratoxin A in table wine and grapes juice: occurrence and risk assessment, *Food Additives & Contaminants*, 13: 655, 668.

Whitaker, B., Slate, A., Johansson, A., (2005). Sampling feeds for mycotoxin analysis. *The mycotoxin Blue Book*, Nottingham University Press, Ed. Duarte Diaz Chapter 1 p.1-21.

Yu, J., Cleveland, T.E., Nierman, W.C., Bennett, J.W., 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana De Micologia* 22, 194-202.