

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟ-ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΥΓΡΟΥ-
ΥΓΡΟΥ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ
ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΕΩΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΕ ΜΠΙΡΑ

ΣΕΡΓΙΟΥ ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ

ΛΕΜΕΣΟΣ 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή εργασία

DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION
COMBINED WITH HIGH-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION
OCHRATOXIN A IN BEER

Σεργίου Ευστρατιος

Σύμβουλος καθηγητής
Δρ. Βλάσης Γούλα

Λεμεσός 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Όνομα επίθετο φοιτητή, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Βλάσης Γούλας του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου. Με την υποστήριξη και τις συμβουλές που μου προσέφερε, βοήθησε στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Ακόμη να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας σε μένα αυτή την εργασία. Επίσης τον ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια του στην συγγραφή της πτυχιακής εργασίας και στην πραγματοποίηση των εργαστηριακών πειραμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το τεχνολογικό πανεπιστήμιο Κύπρο και πιο συγκεκριμένα το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων για την παροχή των απαραίτητου εργαστηριακού εξοπλισμού, χημικών και αντιδραστηρίων για την διεκπεραίωση των πειραμάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υπόλοιπους καθηγητές, οι οποίοι μου προσέφεραν, στα τέσσερα χρόνια φοίτησης μου, τις απαραίτητες γνώσεις που απαιτούσε η σπουδή μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Αντιγόνη Παρμαξή, για την πολύτιμη βοήθεια της. Τέλος, τις πιο θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένεια μου για την στήριξη και συμπαράσταση για όλα αυτά τα χρόνια της γνωστικής μου πορείας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ωχρατοξίνη Α παράγεται κυρίως από δύο γένη μυκήτων *Aspergillus* και *Penicillium*. Η ωχρατοξίνη Α συναντάται σε πλήθος τροφίμων όπως δημητριακά, σταφύλια, χυμό σταφυλιού, όσπρια, μπίρα, καρύδια, κακάο και κρασί. Η παρουσία της ωχρατοξίνης Α σε τρόφιμα καλό συνίσταται να ελέγχεται λόγω της τοξικότητάς της. Γενικά, για τον προσδιορισμό της ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα χρησιμοποιούνται μέθοδοι εκχύλισης που να αυξάνουν την προσυγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη μικρο-εκχύλιση διασποράς υγρού-υγρού (DLLME) σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC) για τον προσδιορισμό της ωχρατοξίνης Α σε μπίρα.

Για να επιτευχθεί η ανάπτυξη της μεθοδολογίας DLLME αρχικά αναζητήθηκαν οι βέλτιστοι διαλύτες διασποράς και εκχύλισης. Ως διαλύτες εκχύλισης αξιολογήθηκαν το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο και το βρωμοβενζόλιο ενώ ως διαλύτες διασποράς η μεθανόλη, η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο. Ακολούθως μελετήθηκαν και οι βέλτιστοι όγκοι τους για να επιτευχθεί η μέγιστη ανάκτηση της ωχρατοξίνης Α από δείγμα μπίρας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλότερη ανάκτηση της ωχρατοξίνης Α επιτεύχθηκε με την χρήση 200μL χλωροφορμίου ως διαλύτη εκχύλισης και 500μL ακετόνης ως διαλύτη διασποράς. Μετέπειτα, με την βελτιστοποιημένη μέθοδο προσδιορίστηκε η ωχρατοξίνη Α σε μπίρες, που κυκλοφορούν στην Κυπριακή αγορά. Η ωχρατοξίνη Α βρέθηκε στο 19,4% των αναλυθέντων μπιρών και σε συγκεντρώσεις μέχρι 0,5 ng mL⁻¹, οι οποίες δεν υπερβαίνουν το συνιστώμενο όριο των 2 ng mL⁻¹. Συνοψίζοντας, η παρούσα μεθοδολογία DLLME σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC) αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την ποσοτικοποίηση της ωχρατοξίνης Α στην μπίρα. Η προτεινόμενη μεθοδολογία είναι απλή, γρήγορη, χαμηλού κόστους και δεν απαιτεί εξειδικευμένη οργανολογία.

Λέξεις κλειδιά: ωχρατοξίνη Α, υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως, μυκοτοξίνη, μικρο-εκχύλιση διασποράς υγρού-υγρού, μπίρα

ABSTRACT

Ochratoxin A is produced mainly by two genera *Aspergillus* and *Penicillium* fungi. Ochratoxin A has been identified in an array of food such as grains, grapes, grape juice, beans, beer, nuts, cocoa and wine etc. The presence of ochratoxin A in foods has to be confirmed due to its toxicity. Generally, the analysis of ochratoxin A in food matrixes involves the elimination of matrix components and the preconcentration of analyte before the determination. The objective of this study was to develop a fast and inexpensive dispersive liquid liquid micro-extraction (DLLME) method suitable to the determination of ochratoxin A in beer.

The nature and volume of extraction and dispersive solvents were studied and optimized for the determination of ochratoxin A in beer. In particular, chloroform, dichloromethane and bromobenzene was evaluated as extractant solvent; whereas the efficacy of methanol, acetone and acetonitrile as disperser solvent was also determined. Furthermore, the volumes of extractant and disperser solvents were optimized to increase further the recoveries of ochratoxin A.

Results showed that the highest recovery of ochratoxin A from beer was carried out using 200 μL of chloroform as extractant solvent and 500 μL of acetone as disperser solvent. Thereafter, the optimized method was used to determine ochratoxin A in beers from Cypriot market. Ochratoxin A was found at 19.4% of studied beers and its concentration did not exceed the recommended limit of 2 ng mL^{-1} . Overall, the proposed DLLME method in combination with HPLC is a useful analytical tool for the determination ochratoxin A in beer. The proposed method is a simple, fast, and inexpensive method to recovery ochratoxin A from beer.

Keywords: ochratoxin A, high performance liquid chromatography, mycotoxin, dispersive liquid liquid micro-extraction, beer