Imunochemické stanovení ochratoxinu A ve víně a jeho aplikace

An Immunochemical Method for the Determination of Ochratoxine A in the Wine and its Applications

Marcel KARABÍN¹, Aneta LUČOKOVÁ¹, Jaromír FIALA¹, Lukáš JELÍNEK¹, Tereza HUDCOVÁ¹, Deliang WANG², Pavel DOSTÁLEK¹

¹ Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, Praha 6, 166 28 / *Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, Praha 6, 166 28*

² China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, China

email: karabinm@vscht.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Karabín, M. – Lučoková, A. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Hudcová, T. – Wang, D. – Dostálek, P.: Imunochemické stanovení ochratoxinu A ve víně a jeho aplikace. Kvasny Prum. 60, 2014, č. 9, s. 226–232

Sledování výskytu mykotoxinů v surovinách potravinářských výrob a zejména v samotných produktech je v současnosti jedním z nejvýznamnějších témat potravinářské analytiky. Tato práce je věnována testování využitelnosti postupu založeného na imunochemických principech pro stanovení ochratoxinu A na 28 vzorcích českých, portugalských a čínských vín a porovnání získaných výsledků s údaji získanými pomocí běžně používané HPLC-FLD metody. Získaná data jednoznačně potvrzují významné nadhodnocování výsledků imunochemické metody, což ovšem v podstatě nebrání využití metody jako jednoduchého postupu vhodného pro odhalení problematických vzorků.

Karabín, M. – Lučoková, A. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Hudcová, T. – Wang, D. – Dostálek, P.: An immunochemical method for the determination of Ochratoxine A in the wine and its applications. Kvasny Prum. 60, 2014, No. 9, pp. 226–232

Recently, the monitoring of the occurrence of mycotoxins in raw materials used for food processing and in the final products has become one of the most important topics in food analyses. This study tests the usability of the determination of ochratoxin A based on immunochemical principles. A total of 28 samples of Czech, Portuguese and Chinese wines were analysed and the results were compared with the results obtained by means of the routinely used HPLC-FLD method. The results obtained by means of the immunochemical determination proved unequivocally to be significantly overestimated. Nevertheless, this method could be used as a simple approach for the detection of objectionable samples.

Karabín, M. – Lučoková, A. – Fiala, J. – Jelínek, L. – Hudcová, T. – Wang, D. – Dostálek, P.: Immunochemische Feststellung des Ochratoxins im Wein und ihre Applikation. Kvasny Prum. 60, 2014, Nr. 9, S. 226–232

Zur Zeit gehört die Verfolgung des Auftretens von Mykotoxinen in den Lebensmittelrohstoffen und besonders in den Lebensmitteln selbst zu den bedeutenden Themen der Lebensmittelanalytik. Der Artikel befasst sich mit der Anwendungsmöglichkeit des auf Basis von Immunochemischen Prinzipien für Feststellung des Ochratoxins A gegründeten Testverfahrens auf 28 Mustern tschechischer, portugiesischer und chinesischer Wein und folgender Vergleich mit den durch die laufend aufgewandte HPLC-FLD Methode gewonnenen Ergebnissen. Die erworbene Daten eine bedeutende Überwertung der Ergebnisse der immunochemische Methode eindeutig bestätigen, was aber im Grunde die Verwendung der Methode als ein einfaches Verfahren zur Entdeckung von problematischen Mustern nicht verhindert.

Klíčová slova: mykotoxiny, víno, ochratoxin A, imunochemické stanovení, UPLC

Keywords: mycotoxins, wine, ochratoxin A, immunochemical determination, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

1 ÚVOD

Zajištění bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti produktů je jedním z nejvýznamnějších aspektů potravinářských výrob už několik desítek let. Významným rizikem, kterému je v tomto ohledu v poslední době věnována pozornost, je problematika kontaminace mykotoxiny. U zástupců této rozsáhlé (stovky sloučenin) skupiny sekundárních metabolitů plísní, produkovaných zejména rody *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* a *Penicillium*, byly prokázány významné negativní zdravotní účinky, vycházející zejména z jejich karcinogenních, teratogenních, nefrotoxických, hepatotoxických a imunosupresivních vlastností (Bezerra da Rocha et al., 2014; Ostrý, 2008; Speijers a Speijers, 2004; Schlatter, 2004).

V případě výroby alkoholických nápojů (piva a vína) je zdrojem mykotoxinů kontaminovaná surovina, což je v případě piva ječmen, respektive slad (Malachová et al., 2010; Kostelanská et al., 2009) a u vína jsou to hrozny, které jsou ideálním prostředím pro růst plísní rodu *Aspergillus*, produkujících široké spektrum mykotoxinů, zejména aflatoxiny, ochratoxin A a sterigmatocystin (Anli a Bayram, 2009; Lasram et al., 2012).

Hlavním mykotoxinem vína je ochratoxin A (OTA), strukturně vycházející z fenylalaninu (obr. 1), jehož výskyt ve víně byl poprvé potvrzen již v 90. letech minulého století (Zimmerli a Dick, 1996). Obecně jsou za nejdůležitější producenty tohoto mykotoxinu považovány druhy *A. ochraceus* a *P. verrucosum*, nicméně v případě kontaminace révy a hroznů byl prokázán rozhodující příspěvek druhu *A. carbonarius*

1 INTRODUCTION

The health and safety assurance of products has been one of the most important aspects of food production for several decades. Recently, the risk of contamination by mycotoxins has been closely observed. This waist group of secondary metabolites of moulds produced mainly by the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* a *Penicillium* with their carcinogenic, teratogenic, nephrotoxic, hepatotoxic and immunosuppressive properties have considerable negative health impacts (Bezerra da Rocha et al., 2014; Ostrý, 2008; Speijers and Speijers, 2004; Schlatter, 2004).

In the production of alcoholic beverages such as beer or wine, contaminated raw materials such as barley and malt for beer, and grapes for wine could become sources of mycotoxins (Malachová et al., 2010; Kostelanská et al., 2009). The grapes are an ideal substrate for the growth of moulds genus *Aspergillus*, producing a wide spectrum of mycotoxins, especially aflatoxins, ochratoxin A and sterigmatocystin (Anli and Bayram, 2009; Lasram et al., 2012).

The most common mycotoxin in wine is ochratoxin A (OTA) with a chemical structure derived from phenylalanine (Fig. 1). The first time it was found was already in the 90s of the last century (Zimmerli and Dick, 1996).

Generally, the most important producers of this mycotoxin are *A. ochraceus* and *P. verrucosum*. Nevertheless, contamination of vines and grapes originates mainly from the genera *A. carbonarius*

a *A. niger* (Bau et al., 2005; Guzev et al., 2006). Tyto druhy byly izolovány z hroznů pěstovaných v Austrálii (Leong et al., 2006), Jižní Americe (Da Rocha Rosa et al., 2002) i v Evropě (Sage et al., 2002; Abarca et al., 2003; Battilani et al., 2006a). Inokulum zmíněných plísní je běžně přítomno ve vinohradech, přičemž k největšímu nárůstu obsahu OTA dochází během zrání bobulí vinného hroznu. Rozhodujícím faktorem v tomto procesu jsou meteorologické podmínky a zejména poškození hroznů (Battilani et al., 2004).

Během technologického zpracování hroznů množství OTA příliš neroste a je určeno jeho obsahem ve zbytcích bobulí, třepinách a slupkách, které jsou součástí mmutu. Určitý vliv mohou mít sanační podmínky zejména u mletí, protože mechanicky poškozené bobule mohou být snadno napadeny výše zmíněnými plísněmi. Vliv tohoto faktoru se značně zvyšuje u vín, během jejichž výroby je používán macerační krok (červená vína). Během něj může docházet ke zvýšení obsahu OTA až o 20 % (Battilani et al., 2003). Jeho hodnoty v moštu jsou značně proměnlivé a u kontaminovaných moštů se pohybují v desítkách až stovkách ng/l (Anli a Bayram, 2009). Během samotné fermentace moštu je růst kontaminujících plísní značně omezen, ať už v důsledku inhibičních účinků vznikajícího ethanolu, nebo vzhledem k přítomnosti značného množství kvasničné kultury (Battilani et al., 2006b, Delage et al., 2003). Nárůst obsahu OTA proto v této fázi výroby nebyl pozorován. Naopak během školení vína dochází k určitému poklesu v důsledku sorpce na kaly a buněčné stěny kvasinek, které jsou následně filtrací odstraněny (Bejjajoui et al., 2004). Výsledkem všech uvedených vlivů jsou značně kolísavé obsahy OTA v hotových vínech. Obecně je možno říci, že častěji se s přítomností OTA setkáváme u vín z teplejších oblastí a nižších nadmořských výšek (Anli, 2009). Obsahy se obvykle pohybují v tisícinách až desetinách µg/l, výjimečně i výše.

Vzhledem k imunosupresivním, karcinogenním, teratogenním a neurotoxickým účinkům OTA (EFSA 2006) je monitorování jeho obsahu ve vínech věnována v posledních letech značná pozornost. Or-

Obr. 1 Ochratoxin A / Fig. 1 Ochratoxine A

and *A. niger* (Bau et al., 2005; Guzev et al., 2006). These strains were isolated from grapes cultivated in Australia (Leong et al., 2006), South America (Da Rocha Rosa et al., 2002) and Europe (Sage et al., 2002; Abarca et al., 2003; Battilani et al., 2006a). The inoculums of the moulds mentioned above are commonly present in vineyards. The peak content of OTA is reached during the ripening of the grapes. The decisive factors in this process are the weather conditions and any grape damage (Battilani et al., 2004).

The content of OTA is given by its amount in the remains of the grapes, in the stalks (panicles) and the skins of the grapes and does not increase significantly during processing. The sanitation conditions, especially during pressing could have some influence since mechanically damaged grapes can easily be attacked by moulds. The influence of this factor is considerably increased in red wines because of the maceration step used in the manufacturing process. During the maceration, the content of OTA could increase by as much as 20% (Battilani et al., 2003). The content in the mash is very variable. A contaminated mash could contain tens to hundreds of ng/l of ochratoxin A (Anli a Bayram, 2009). The growth of moulds during mash fermentation is considerably restrained either due to the inhibitory properties of alcohol or to the massive presence of yeast culture (Battilani et al., 2006b, Delage et al., 2003). Therefore, during the fermentation process no increase in the OTA content was observed. On the contrary, the OTA content decreases during clarification of the wine because of mould adsorption onto the sludge and the skin cells of the yeasts, which are then removed later on by filtration (Bejjajoui et al., 2004). Consequently, the final content of OTA in the finished wines is very variable. Generally, OTA is more often present in wines from warmer regions and lower altitudes (Anli, 2009). The usual content ranges from thousandths to tenths of ng/l and only rarely is it higher.

Obr. 2 Princip imunochromatografického stanovení ochratoxinu A / Fig. 2 The principle of a immunochromatographic determination of ochratoxin A (Bazin et al., 2010)

ganizací EFSA (European Food Safety Authority) byla stanovena tolerovatelná týdenní dávka (TWI – Tolerable Weekly Intake) 120 ng/kg tělesné hmotnosti a jeho maximální obsah ve víně byl na základě rozhodnutí Evropské komise (Anonymous 2006) stanoven na 2 µg/kg.

Pro kontrolu dodržování legislativně určených limitů byla vyvinuta řada metod detekce a stanovení obsahu OTA. U vína se pro přesnou kvantifikaci používá nejčastěji různých uspořádání RP-HPLC případně modernější UPLC obvykle v kombinaci s fluorescenčním (Mikulíková et al., 2012; Comuzzo et al., 2013; Flajs et al., 2009) nebo hmotnostním (Koch et al., 2011) detektorem. Vzhledem k náročnosti přípravy vzorků pro chromatografickou analýzu, využívající imunoafinitních kolon (Flajs et al., 2009; Mikulíková et al., 2012; Solfrizo et al., 2008) jsou studovány též možnosti využití imunochemických metod pro kvalitativní nebo semikvantitativní screening přítomnosti OTA. Kromě běžných ELISA metod se spektrofotometrickou detekcí jsou v poslední době předmětem zájmu také imunosensory. Ty využívají chemiluminiscence (Novo et al., 2013), případně jsou protilátky vázány na paramagnetické částice a detekce probíhá na základě diferenčně-pulsní voltametrie (Vidal et al., 2012). Kromě toho existuje v současné době na trhu několik komerčně vyráběných imunochemických sad, schopných semikvantitativně určit obsah OTA v širokém spektru potravinářských surovin a produktů (Shim et al., 2009). Jedním z těchto kitů je i ROSA (Rapid One Step Assay), který byl testován v této práci.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Analyzované vzorky vína

Byly analyzovány vzorky bílých, růžových a červených vín z vinařských oblastí Morava a Čechy z České republiky, dále z Portugalska a Číny. U každého vzorku je uvedeno místo pěstování, odrůda, jakostní třída a ročník sklizně.

Bílá, růžová a červená vína z vinařské oblasti Čechy
(podoblast Mělnická, vinařská obec Praha, vinice sv. Klára)

Bílá vína:

Müller – Thurgau (MT), pozdní sběr, ročník 2011
Ryzlink rýnský (RR), kabinetní víno, ročník 2011
Klára (K), bílé víno, ročník 2013
Tramín červený (TČ 10), slámové víno, ročník 2010
Bílé z botanické (BZB), zemské víno, ročník 2011
Tramín červený (TČ 09), Ryzlink vlašský, slámové víno, ročník 2009.

Růžová vína:

Modrý Portugal – klaret (MP 10), zemské víno, ročník 2010
Rulandské modré – rosé (RM – PS), pozdní sběr, ročník 2011
Rulandské modré – klaret (RM – VZH), výběr z hroznů, ročník 2011.

Červená vína:

Rulandské modré (RMČ – PS), pozdní sběr, ročník 2010.

Bílá a červená vína z vinařské oblasti Morava

Bílá vína:

(vinařská podoblast Znojemska, vinařská obec Stošíkovice na Louce)
Rulandské šedé (RŠ), ledové víno, ročník 2008
(vinařská podoblast Mikulovska, vinařská obec Brod nad Dyjí)
Rulandské bílé (RB), výběr z cibéb, ročník 2008.

Červená vína:

(vinařská podoblast Slovácká, vinařská obec Uherský Ostroh)
Merlot (M), slámové víno, ročník 2006
(vinařská podoblast Znojemska, vinařská obec Stošíkovice na Louce)
Rulandské modré (RM – ZV), zemské víno, ročník 2011
(vinařská podoblast Velkopavlovická)
Rulandské modré (RM – JV) jakostní odrůdové víno
(vinařská podoblast Mikulovska, vinařská obec Dolní Dunajovice)
Rulandské modré (RM – AV), archivní odrůdové víno, ročník 2006
(vinařská podoblast Slovácká, vinařská obec Mutěnice)
Frankovka (F), pozdní sběr, ročník 2011.

Červená vína typu portské – Portugalsko
A102 – A 325

Graham's (G), portské víno, ročník 2000.

At present, due to the immunosuppressive, carcinogenic, teratogenic, and neurotoxic effects of OTA (EFSA, 2006), close attention is paid to monitoring its content in wines. The organisation EFSA (European Food Safety Authority) set the TWI (Tolerable Weekly Intake) at 120 ng/kg body weight and the European Commission (Anonymous, 2006) set the maximum content in wine at 2 µg/kg.

To check the legislatively set value limits a number of analytical methods for the qualitative and quantitative determination of OTA were developed. For the quantification of OTA in wine RP-HPLC or the more sophisticated UPLC with a fluorescence detector (Mikulíková et al., 2012; Comuzzo et al., 2013; Flajs et al., 2009) or with a mass spectrometer (Koch et al., 2011) are used. Due to the very demanding sample preparation for the chromatographic analyses using immunoaffinity columns (Flajs et al., 2009; Mikulíková et al., 2012; Solfrizo et al., 2008), the utilization of immunochemical methods for quantitative or semi-quantitative screening of OTA presence was studied. Next to the common ELISA methods with a spectrophotometric detection, immunosensors have recently become the subject of interest. They use either a chemiluminescence (Novo et al., 2013), or the antibodies are bound to paramagnetic particles and detected by Differential Pulse Voltammetry (DPV) (Vidal et al., 2012). Moreover, with the number of commercially produced immunochemical essays on the market, semi-quantitative assessments of OTA contents in a wide spectrum of food products and raw material are possible (Shim et al., 2009). One of these kits, the ROSA (Rapid One Step Assay) was tested in the present study.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Wine Samples Analysed

Samples of white, rosé and red wines from the Czech Republic (the wine regions of Moravia and Bohemia), from Portugal and from China were analysed.

White, rosé and red wines from the wine region of Bohemia
(subregion Mělník, viticultural district The City of Prague, vineyard Saint Clara)

White wines:

Müller – Thurgau (MT), Late harvest, year 2011
Riesling (RR), Kabinett, year 2011
Klára (K), white wine, year 2011
Gewürztraminer (TČ 10), Straw wine, year 2010
White from Botanic (BZB), Country wine, year 2011
Gewürztraminer (TČ 09), Welschriesling, Straw wine, year 2009.

Rosé wines:

Blauer Portugieser – claret (MP 10), Country wine, year 2010
Pinot noir – rosé (RM – PS), Late harvest, year 2011
Pinot noir – claret (RM – VZH), Selection of grapes, year 2011.

Red wines:

Pinot noir (RMČ – PS), Late harvest, year 2010

White and red wines from the wine region of Moravia

White wines:

(wine subregion Znojmo, viticultural district Stošíkovice na Louce)
Pinot gris (RŠ), Ice wine, year 2008
(wine subregion Mikulovsko, viticultural district Brod nad Dyjí)
Pinot blanc (RB), Selection of berries affected by noble rot (Botrytis), year 2008.

Red wines:

(wine subregion Slovácko, viticultural district Uherský Ostroh)
Merlot (M), Straw wine, year 2006
(wine subregion Znojemska, viticultural district Stošíkovice na Louce)
Pinot noir (RM – ZV), Country wine, year 2011
(wine subregion Velké Pavlovice)
Pinot noir (RM – JV) Quality varietal wine
(wine subregion Mikulovsko, viticultural district Dolní Dunajovice)
Pinot noir (RM – AV), Vintage wine, year 2006
(wine subregion Slovácko, viticultural district Mutěnice)
Blaufränkisch (F), Late harvest, year 2011.

Red port wines – Portugal

A102 – A 325
Graham's (G), Port wine, year 2000

Tab. 1 Naměřená koncentrace ochratoxinu A ve vínech z vinařské oblasti Čechy; ROSA (ng/l) / Table 1 The concentrations of ochratoxin A in wines from the wine region of Bohemia in ng/l; ROSA method

	MT	RR	K	RM PS	RM VZH	TČ 10	BZB	MP 10	TČ 09	RMČ PS
1.měření / value	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0
2. měření / value	100	100	0	0	100	0	100	0	300	0
3. měření / value	200	0	0	0	100	0	0	0	200	0
Průměr / Average	100	70	0	0	70	0	70	0	200	0
σ	80	50	0	0	50	0	50	0	80	0

Tab. 2 Naměřená koncentrace ochratoxinu A ve vínech z vinařské oblasti Morava; ROSA (ng/l) / Table 2 The concentrations of ochratoxin A in wines from the wine region of Moravia in ng/l; ROSA method

	RŠ	RB	RM ZV	M	RM JV	RM AV	F
1.měření / value	0	0	0	0	0	0	0
2. měření / value	0	100	100	0	0	0	0
3. měření / value	0	200	100	0	0	0	0
Průměr / Average	0	100	70	0	0	0	0
σ	0	80	50	0	0	0	0

Tab. 3 Naměřená koncentrace ochratoxinu A ve vínech z Portugalska; ROSA (ng/l) / Table 3 The concentrations of ochratoxin A in port wines in ng/l; ROSA method

	A 102	A 108	A 123	A 321	A 325	G
1.měření / value	100	1300	200	0	100	0
2. měření / value	100	1200	200	0	0	100
3. měření / value	200	1400	400	0	100	100
Průměr / Average	130	1300	270	0	70	70
σ	50	80	90	0	50	50

Tab. 4 Naměřená koncentrace ochratoxinu A ve vínech z Číny; ROSA (ng/l) / Table 4 The concentrations of ochratoxin A in wines produced in China in ng/l; ROSA method

	GIV	CSW	CSR	CCE	CCGB
1.měření / value	0	0	0	0	0
2. měření / value	0	0	0	100	0
3. měření / value	0	0	0	100	0
Průměr / Average	0	0	0	70	0
σ	0	0	0	50	0

Tab. 5 Naměřená koncentrace ochratoxinu A; HPLC–FLD (ng/l) / Table 5 The concentrations of ochratoxin A in wines in ng/l; HPLC–FLD method

Vzorek / Sample	Koncentrace / Concentration	Vzorek / Sample	Koncentrace / Concentration
MT	5.4	A 108	257.0
K	<1.0	A 123	70.9
TČ 10	<1.0	A 321	62.9
TČ 09	8.4	G	25.0
RM	12.5	GIV	<1.0
RŠ	24.9	GSW	3.3
RB	5.8	CCE	11.5
M	<1.0		

Bílá a červená vína – Čína**Bílá vína:**

(vinařská podoblast Yantai)

Golden Icewine Valley (GIV), ročník 2009

Changyu (CSW), Shandong White, Chardonnay/Riesling, ročník 2006.

Červená vína:

(vinařská podoblast Yantai)

Changyu (CSR), Shandong Red, Cabernet Sauvignon, ročník 2006

(vinařská podoblast Ningxia)

Changyu (CCE), Cabernet d' Est, ročník 2010

Changyu(CCGB), Cabernet Gernischt Blend, ročník 2010.

White and red wines from China**White wines:**

(subregion Yantai)

Golden Icewine Valley (GIV), year 2009

Changyu (CSW), Shandong White, Chardonnay/Riesling, year 2006.

Red wines:

(subregion Yantai)

Changyu (CSR), Shandong Red, Cabernet Sauvignon, year 2006

(subregion Ningxia)

Changyu (CCE), Cabernet d' Est, year 2010

Changyu(CCGB), Cabernet Gernischt Blend, year 2010.

Obr. 3 Srovnání koncentrací stanovených oběma metodami – tuzemská vína / Fig. 3 The comparison of the OTA contents in domestic wines determined by the ROSA and the HPLC-FLD methods

2.2 Imunochemické stanovení ochratoxinu A – ROSA Ochratoxin W

Princip této imunochromatografické metody znázorněný na obr. 2 je využíván pro diagnostické testy už od 80. let minulého století.

Molekuly OTA, případně jiných mykotoxinů, vnesené ve vzorku na počátek stripu, se vážou na protilátku ukotvenou na barvící složku (nejčastěji koloidní částice zlata). Tento komplex OTA-protilátka spolu s nezreagovanou protilátkou postupuje na testovací linii, kde je zachycen, zatímco nezreagovaná protilátka pokračuje až na tzv. kontrolní linii, kde se váže na další protilátku, která je k ní specifická. Koncentrace mykotoxinu je následně odečtena automaticky prostřednictvím interní kalibrace na základě rozdílu ve zbarvení testovací a kontrolní linie.

2.3 Stanovení obsahu ochratoxinu A metodou HPLC

Stanovení bylo provedeno ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Brně za použití metody publikované v roce 2011 Bělákovou (Běláková et al., 2011). Tato metoda je založena na využití UPLC systému (Waters ACQUITY) v kombinaci s fluorescenčním detektorem. Chromatografické dělení probíhalo na koloně Waters ACQUITY HSS T3 (2,1x100mm, velikost částic 1,8µm) za použití gradientu acetonitrilu ve vodě okyselené kyselinou fosforečnou. Metoda je akreditována jako „Metoda pro stanovení ochratoxinu A (OTA) a patulinu metodou UPLC s FLR a PDA detekcí“.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Smyslem studie bylo ověření použitelnosti metody ROSA pro stanovení obsahu ochratoxinu A v různých druzích vín a porovnání hodnot získaných touto metodou s výsledky stanovenými prostřednictvím certifikované metody založené na kombinaci HPLC a fluorescenční detekce.

Pro tento účel byly stanoveny metodou ROSA obsahy v bílých, růžových a červených vínech z vinařských oblastí Čechy (tab. 1) i Morava (tab. 2), v portských vínech (tab. 3) a ve vínech vyrobených v Číně (tab. 4). Portská vína byla zvolena na základě předpokladu, že by tento druh vín, vzhledem ke klimatickým podmínkám a technologii zpracování, měl obsahovat zvýšené koncentrace mykotoxinů (Gomez et al., 2006; Burdspal a Legarda, 2007; Duarte et al., 2010). O obsahu zdraví škodlivých látek v čínských révových vínech je doposud jen málo informací, a proto bylo analyzováno také 5 vzorků bílých a červených vín získaných v rámci spolupráce s čínským partnerem. U jednotlivých vzorků jsou uvedeny hodnoty tří paralelních stanovení a jejich průměr a směrodatná odchylka (σ). Hodnoty průměru a směrodatné odchylky byly s ohledem na nízkou citlivost metody zaokrouhleny s přesností na desítky.

Z údajů uvedených v tab. 1 a 2 je jasné patrné, že v analyzovaných vzorcích tuzemských vín se obsahy ochratoxinu A pohybují na velmi nízkých úrovních. U 10 vzorků ze 17 nebyl mykotoxin detekován ani při jedné analýze a u zbývajících se pohyboval v rozmezí 70 až 200 ng/l, což jsou hodnoty nejméně o řád nižší, než je legislativní limit pro obsah OTA ve víně. Z hodnot je jasné zřejmé, že rozptyl výsledku při stanovení pomocí metody ROSA je při takto nízkých koncentracích značný. Důvodem je skutečnost, že mez detekce této

Obr. 4 Srovnání koncentrací stanovených oběma metodami – zahraniční vína / Fig. 4 The comparison of the OTA contents in foreign wines determined by the ROSA and the HPLC-FLD methods

2.2 The Immunochromatographic determination of ochratoxin A by ROSA Ochratoxin W

The principal of this immunochromatographic method is shown in Fig. 2. It has already been used for diagnostic tests since the 80s of the last century.

The sample was applied at the beginning of the sample pad. The molecules of OTA or other mycotoxins present bind to the antibodies embedded in colouring substance (usually colloidal gold particles). The complex OTA-antibody together with any unused antibodies proceeds up to the test line where the complex is blocked. The unused antibodies proceed further up to the control line where they were fixed to another specific antibody (anti-antibody). The concentration of mycotoxin is subtracted automatically by means of internal calibration based on the colour difference between the test line and the control line.

2.3 Determination of ochratoxin A by the HPLC method

The determinations were carried out at The Research Institute of Brewing and Malting in Brno by means of the method published by Běláková et al. (2011). This method is based on the utilization of the UPLC system (Waters ACQUITY) equipped with a fluorescence detector (FLD). The chromatographic separation was carried out on the Waters ACQUITY HSS T3 (2.1 x 100 mm) column with a particle size of 1.8 µm. The elution was performed with a mixture of water / acetonitrile acidified with phosphoric acid in a gradient mode. This method has been recognised as the official method for the determination of Ochratoxin A and Patulin by means of UPLC and Fluorescence (FLR) and Photodiode-Array (PDA) Detection.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The objective of this study was to evaluate the applicability of the ROSA method for the determination of the Ochratoxin A content in different wines and the comparison of the values obtained with results acquired by means of the certified method based on HPLC with fluorescence detection.

For this purpose, the contents of OTA in white, rosé and red wines from the wine regions of Bohemia (Table 1) and of Moravia (Table 2), from port wines (Table 3) and from wines produced in China (Table 4) were determined. The port wines were chosen as increased concentrations of mycotoxins were expected due to the climatic conditions and the production technology (Gomez et al., 2006; Burdspal and Legarda, 2007; Duarte et al., 2010). As information about health damaging substances in Chinese grape wines is rare, five samples of white and red wines were obtained within a co-operation with Chinese partners. Each result is an average of three parallel determinations with a standard deviation (σ). With regard to the low sensitivity of the method, the values of averages and standard deviations were rounded to a factor of ten.

The results in Tables 1 and 2 show very low contents of OTA in the domestic wines. In 10 out of 17 samples no mycotoxin was detected at all. The OTA contents of remaining samples varied from 70 to 200 ng/l. These values are at least an order of magnitude lower than the legislative limit for the OTA content in wine. Obviously, the values obtained by means of the ROSA method varied considerably at such low concentrations. The reason for this was that the detection limit

metody je 100 ng/l a citlivost také 100 ng/l. Je zřejmé, že v tomto uspořádání se jedná o semikvantitativní metodu vhodnou pro identifikaci rizikových vzorků, které budou následně analyzovány jinými, přesnějšími metodami.

Předpoklad, že by portská vína měla vykazovat významně vyšší koncentrace OTA (Gomez et al., 2006), byl jeho stanovením v šesti zkoumaných vzorcích potvrzen (tab. 3). Kromě jednoho vzorku byla všechna zbývající na výskyt mykotoxinu pozitivní, přičemž průměrné hodnoty koncentrací se pohybovaly v rozmezí 70 až 1300 ng/l. Nejvyšší hodnota se již poměrně blíží maximálně povolené hodnotě a takový vzorek by měl být podroben ověřující analýze.

Relativně překvapivé byly výsledky stanovení obsahu OTA ve vzorcích vín z čínské produkce (tab. 4). Přestože o dodržování technologických a legislativních pravidel na tomto dynamicky se rozvíjícím trhu lze mít oprávněně pochybnosti, v případě námi analyzovaných vzorků byl pozitivně testován pouze jeden z nich, přičemž zjištěná hodnota obsahu byla blízká mezi detekce metody.

Pro ověření hodnot získaných imunochemickou metodou bylo 15 vybraných vzorků z různých oblastí podrobeno analýze pomocí UPLC/FLD, jejíž výsledky jsou uvedeny v tab. 5. Je možno říci, že bylo potvrzeno zjištění, že koncentrace OTA v námi analyzovaných vzorcích byly velmi nízké, v některých případech dokonce nižší než mez stanovitelnosti (1 ng/l). Při porovnání hodnot získaných oběma metodami pro tuzemská (obr. 3) a zahraniční (obr. 4) vína je zřejmé, že imunochemická metoda hodnoty prakticky bez výjimky nadhodnocuje, pouze ve dvou případech nebyly metodou ROSA identifikovány velice nízké koncentrace mykotoxinů. V některých případech (MT, TČ 09) jsou hodnoty zjištěné touto metodou až dvacetkrát vyšší. S ohledem na fakt, že se má jednat o metodu „prvního varování“, sloužící k vyčlenění problematických vzorků, je tento fakt nutno, s ohledem na ochranu lidského zdraví, považovat za pozitivum. Zjevnou nevýhodou může být významný nárůst nákladů spojených s analýzami falešně pozitivních vzorků.

4 ZÁVĚR

Přestože překotný vývoj moderních chromatografických metod umožňuje odhalit případnou kontaminaci potravin mykotoxiny prakticky v reálném čase, relativní nákladnost potřebného vybavení ponechává dostatek prostoru i pro použití rychlých a méně nákladných metod založených na imunochemických principech.

Testováním komerčního kitu ROSA Ochratoxin W na vzorcích tuzemských i zahraničních vín bylo potvrzeno, že svému účelu, tj. semikvantitativnímu stanovení obsahu ochratoxinu A, zmíněný postup víceméně vyhovuje, byť při nízkých koncentracích budou jeho výsledky zatíženy poměrně značnou chybou. U 15 vzorků z 28 se obsahy OTA pohybovaly pod mezí detekce metody, ve zbývajících vzorcích nepřekročily legislativně povolenou hranici a s výjimkou jednoho vzorku se jí ani nepřibližovaly. Významně vyššími obsahy mykotoxinů (130 až 1300 ng/l) se vyznačovala některá portská vína, což je zcela v souladu s dosud publikovanými údaji.

Porovnání výsledků s běžně používaným postupem vycházejícím z kombinace HPLC a fluorescenční detekce ukázalo, že imunochemický postup výsledky značně nadhodnocuje (až o 2000 % rel.), což ovšem neznemožňuje jeho využití k výše uvedeným účelům.

PODĚKOVÁNÍ:

Autoři děkují MŠMT ČR (projekt KONTAKT II – LH12166) za finanční podporu.

LITERATURA/REFERENCES

- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castella, G., Cabanes, F.J., 2003: *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. J. Food Prot. 66(3): 504–506.
- Anli, E., Bayram, M., 2009: Ochratoxin A in wines. Food Rev. Int. 25(3): 214–232.
- Anonymous, 2006: NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Úřední věstník EU, L 364: 5–24.

and the sensitivity of this method were the same, namely 100 ng/l. Consequently, this method was only semi-quantitative and hence could be used for the identification of samples with suspiciously high OTA concentrations. They must be subsequently analysed by other, more precise, methods.

The presumption of significantly increased concentrations of OTA in port wines (Gomez et al., 2006) was confirmed in the six tested samples (Table 3). Mycotoxins were found in all samples apart from one. The average concentrations varied from 70 to 1300 ng/l. The highest value almost reached the allowed limit. Such a sample should be repeatedly analysed by a more accurate method.

The results of the determinations of the OTA contents in Chinese wines were quite surprising (Table 4). In spite of the fact that the observance of the legislative and technologic rules in this dynamically developing market is possibly not guaranteed, only one of the samples tested contained OTA. Moreover, the value found was very close to the detection limit of the method.

The values obtained by the immunochemical ROSA method were evaluated against those obtained by means of the UPLC-FLD method. For this purpose, 15 samples from different regions were selected and analysed. The results are given in Table 5. They confirmed the very low OTA concentrations in the samples examined. In some samples the OTA concentration was even lower than the determination limit of 1 ng/l. The comparisons of the values obtained by both methods are given in Fig. 3 (for domestic wines) and Fig. 4 (for foreign wines). It is obvious that the immunochemical method overestimates the OTA contents almost without exception. In some samples such as MT and TČ 09, the measured values were almost 20-fold higher. The ROSA method only failed for two samples, in which the very low OTA concentrations have not been detected. Nevertheless, this method should only be a method “for first warning” preventing potential health hazards. Regarding this fact, the ROSA method must be considered as acceptable. The obvious disadvantage could be the increased costs involved in the analyses of samples incorrectly tested as positive.

4 CONCLUSIONS

Despite the fact that rapid development of sophisticated chromatographic methods enables the nearly real-time detection of possible food contamination by mycotoxins, the equipment needed is rather expensive. Therefore, fast and less costly methods based on immunochemical principals could be used instead.

The examination of a commercial kit ROSA Ochratoxin W for samples of domestic and foreign wine confirmed its suitability for the semi-quantitative determination of ochratoxin A contents, in spite of the fact that the measured values were rather incorrect at low concentrations. The contents of OTA were under the detection limit of the method for 15 out of 28 samples. None of the remaining samples exceeded the legislatively allowed norm and only one sample was near to this limit. Significantly higher contents of mycotoxins, namely of 130 to 1300 ng/l were only found in the port wines. This agrees with the hitherto published results.

The comparison of the ROSA method with the commonly used combination of HPLC with fluorescence detection indicated a significant overestimation by as much as 2000% rel. Nevertheless, this method could be recommended for the purposes given above.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors are grateful for the financial support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic for the project KONTAKT II – LH 12166.

Translated by Eva Paterson

- Battilani, P., Pietri, A., Silva, A., Giorni, P., 2003: Critical control points for ochratoxin A control in the grape-wine chain. J. Plant Pathol. 85: 285.
- Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A., 2004: Risk assessment and management in practice: ochratoxin in grapes and wine. Mycotoxins in food: detection and control. Woodhead Pub. 244–261.
- Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S., Pietri, A., 2006a: Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. Int. J. Food Microbiol. 111(1): 53–60.

- Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A., 2006b: European research on ochratoxin A in grapes and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 2–4.
- Bau, M., Bragulat, M. R., Abarca, M.L., Minguez, S., Cabanes, F.J., 2005: Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 98(2): 125–130.
- Bazin, I., Nabais, E., Ferber, M.L., 2010: Rapid visuals test: Rapid and reliable detection of ochratoxin A. *Toxins*. 2: 2230–2241.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrhi, A., 2004: Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1038–1044.
- Běláková, S., Benešová, K., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2011: Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chem.* 126(1): 321–325.
- Bezerra da Rocha, M.E., Freire, F. Ch.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., Rondina, D., 2014: Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36(1): 159–165.
- Burdaspal, P., Legarda, T., 2007: Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. *Food Addit. Contam.* 24(9): 976–986.
- Comuzzo, P., Rauhut, D., Werner, M., Lagazio, C., Zironi, R., 2013: A survey on wines from organic viticulture from different European countries. *Food Control* 34(2): 274–282.
- Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M., 2002: Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Addit. Contam.* 19(4): 408–414.
- Delage, N., d'Harlingue, A., Colonna Ceccaldi, B., Bompeix G., 2003: Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food Control* 14: 225–227.
- Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M., 2010: Ochratoxin A in Portugal: a review to assess human exposure. *Toxins*. 2: 1225–1249.
- Flajs, D., Domijan, A.-M., Ivic, D., Cvjetkovic, B., Peraica, M., 2009: ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control* 20(6): 590–592.
- Gomez, C., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S., Cabanes, F. J., 2006: Ochratoxin A producing fungi from grapes intended for liquor wine production. *Food Microbiol.* 23(6): 541–545.
- Guzev, L., Danshin, A., Ziv, S., Lichter, A., 2006: Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. *Int. J. Food Microbiol.* 111(1): 67–71.
- Koch, M., Bremser, W., Koeppen, R., Krueger, R., Rasenko, T., Siegel, D., Nehls, I., 2011: Certification of reference materials for ochratoxin A analysis in coffee and wine. *Accredit. Qual. Assur.* 16(8–9): 429–437.
- Kostelanská, M., Hajšlová, J., Zachariášová, M., Malachová, A., Kalachová, K., Poustka, J., Fiala, J., Scott, P.M., Berthiller, F., Krska, R., 2009: Occurrence of Deoxynivalenol and Its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in beer and some brewing intermediates. *J. Agric. Food Chem.* 57(8): 3187–3194.
- Lasram, S., Barketi, A., Mliki, A., Ghorbel, A., 2012: Growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* at different pHs and grape maturation stages. *Lett. Appl. Microbiol.* 54(5): 418–424.
- Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S., 2006: Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *Int. J. Food Microbiol.* 111(1): 10–17.
- Malachová, A., Cerkal, R., Ehrenbergerová, J., Dzuman, Z., Vaculová, K., Hajšlová, J., 2010: Fusarium mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. *J. Sci. Food Agric.* 90(14): 2495–2505.
- Mikulíková, R., Běláková, S., Benešová, K., Svoboda, Z., 2012: Study of ochratoxin A content in South moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection. *Food Chem.* 133(1): 55–59.
- Novo, P., Moulas, G., Franca, P., Duarte, M., Chu, V., Conde, J.P., 2013: Detection of ochratoxin A in wine and beer by chemiluminescence-based ELISA in microfluidics with integrated photodiodes. *Sens. Actuators, B*. 176: 232–240.
- Ostry, V., 2008: Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J.* 1(2): 175–188.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., 2002: Fungal flora and Ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agric. Food Chem.* 50(5): 1306–1311.
- Shim, W., Dzantiev, B.B., Eremin, S.A., Chung, D., 2009: One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin A and zearalenone. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(1): 83–92.
- Schlatter, J., 2004: Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicol. Lett.* 153(1): 83–89.
- Speijers, G. J. A., Speijers, M. H. M., 2004: Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol. Lett.* 152: 91–98.
- Solfrizzo, M., Panzarini, G., Visconti, A., 2008: Determination of Ochratoxin A in grapes, dried vine fruits, and winery byproducts by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection (HPLC-FLD) and immunoaffinity cleanup. *J. Agric. Food Chem.* 56(23): 11081–11086.
- Vidal, J.C., Bonel, L., Ezquerro, A., Duato, P., Castillo, J.R., 2012: An electrochemical immunosensor for ochratoxin A determination in wines based on a monoclonal antibody and paramagnetic microbeads. *Anal. Bioanal. Chem.* 403(6): 1585–1593.
- Zimmerli, B., Dick, R., 1996: Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13(6): 655–68.

Do redakce došlo / Manuscript received: 8. 5. 2014

Přijato k publikování / Accepted for publication: 28. 6. 2014

PIVOVARSKÝ KALENDÁŘ 2014

cena 200 Kč včetně DPH

CHMELÁŘSKÁ ROČENKA 2014

cena 200 Kč včetně DPH

JEČMENÁŘSKÁ ROČENKA 2014

cena 200 Kč včetně DPH

Objednávky: Irena Boudová, boudova@beerresearch.cz, tel. 224 900 146

Množstevní slevy na obě ročenky