

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Vývoj on-line SPE HPLC metody pro stanovení ochratoxinu A
v Tokajských vínech**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce, konzultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatinský, Ph.D.

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Daliborovi Šatinskému za odborné rady, konzultace a podporu při zpracovávání. Dále děkuji mé rodině za toleranci a pochopení při psaní.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové, 15. 5. 2019

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Adéla Uhrová

Školitel, konzultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatinský, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj on-line SPE HPLC metody pro stanovení ochratoxinu A v Tokajských
víněch

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací a validací chromatografické metody stanovení ochratoxinu A v Tokajském víně s následnou aplikací na reálné vzorky. Byla vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí za využití on-line extrakce pomocí přepínání kolon. Vzorky byly o objemu 50 μ l dávkovány přímo na extrakční kolonu, kde v 1. minutě byl analyt extrahován na předkoloně Ascentis® Express RP-Amide za přítomnosti mobilní fáze – 40% MeOH ve 0,5% vodném roztoku kyseliny octové. Po extrakci došlo k přepnutí ventilu a extrahované látky tak byly separovány na analytické koloně YMC Triart C18 ExRS. Separace probíhala za gradientové eluce s počátečním poměrem acetonitrilu v mobilní fázi 45%, který v 5. minutě dosáhl koncentrace 80%. Detekce fluorimetrem byla optimalizována na excitační a emisní vlnové délky λ_{Ex} 335 nm a λ_{Em} 463 nm. V poslední části práce byl stanovován ochratoxin A v reálných vzorcích, kde byl ochratoxin A ve 45 případech potvrzen.

Klíčová slova: ochratoxin A, Tokajské víno, přepínání kolon,

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Adéla Uhrová

Supervisor, consultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatinský, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Development of on-line SPE HPLC method for determination of ochratoxin A in Tokaj wines

This diploma thesis deals with the optimization and validation of chromatographic method for determination of ochratoxin A in Tokaj wine with subsequent application on real samples. A high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection using on-line extraction by column switching has been developed. 50 μ l of sample was injected directly in the extraction column, where at 1st minute the analyte was extracted on the Ascentis® Express RP-Amide precolumn in the presence of a mobile phase of 40% MeOH in 0.5% aqueous acetic acid. After the extraction, the valve was switched and the extracted substances were separated on a YMC Triart C18 ExRS analytical column. The separation was carried out under gradient elution with an initial acetonitrile ratio of 45% in the mobile phase, which reached a concentration of 80% in the 5th minute. Fluorimeter detection was optimized for excitation and emission wavelengths λ_{Ex} 335 nm and λ_{Em} 463 nm. In the last part of the work, ochratoxin A was analyzed in real samples and was confirmed in 45 cases.

Keywords: ochratoxin A, Tokaj wine, column switching,

Obsah

Seznam zkratek.....	7
ÚVOD	8
CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1. Tokajské víno	11
1.1. Ušlechtilá plíseň	11
1.2. Biochemie Tokajského vína	12
1.3. Druhy.....	13
2. Ochratoxin A	15
2.1. Legislativa	17
2.2. Analytické metody stanovení OTA	18
2.2.1. Systém přepínání kolon	20
2.2.2. HPLC s fluorescenčním detektorem.....	21
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3. Materiály a pomůcky.....	24
3.1. Standardy a chemikálie.....	24
3.2. Vzorky	24
3.3. Přístroje a podmínky separace.....	26
3.4. Příprava roztoků standardů.....	26
3.5. Příprava vzorků	28
3.6. Příprava mobilních fází	28
4. Optimalizace.....	29
4.1. Modifikace gradientové eluce	29
4.2. Výběr kolony.....	32
4.3. Modifikace mobilní fáze.....	34
5. Validace.....	37
5.1. Linearita.....	37
5.2. Opakovatelnost.....	40
5.3. Výtěžnost.....	40
5.4. Přesnost	41
5.5. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)	41
6. Stanovení Ochratoxinu A ve vzorcích Tokajských vín	43
ZÁVĚR.....	46
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ES	Evropská směrnice
FD	Fluorescenční detekce
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAC	Imunoafinitní kolona
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LIF	Laserem indukovaná fluorescenční detekce
LLE	Liquid – liquid extraction
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MeOH	Metanol
MIPs	Molecularly imprinted polymers
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
OTA	Ochratoxin A
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
SPE	Solid phase extraction
TLC	Thin layer chromatography
TWI	Tolerable weekly intake

ÚVOD

Tokajské víno dostalo svůj název podle oblasti, z které víno pochází. Vinařská oblast Tokaj se nachází na území severovýchodního Maďarska a jihovýchodního Slovenska. Od roku 2002 je součástí Světového dědictví UNESCO. Podle historických pramenů název Tokaj pochází ze slova *stokaj* – tedy soutok řek Bogrodu a Tisy, který tuto oblast na jihu ohraničuje. Zde vyrobená vína disponují označením původu a zeměpisných označení chráněných v EU [1,2,3,4,5].

Přes tisíc let stará vinařská tradice zakládá svou jedinečnost na unikátní výrobě, která začíná už na vinicích před sběrem révy. Hrozny *vitis vinifera* jsou cíleně napadány plísní *Botrytis cinerea* za účelem rozvoje ušlechtilé plísně, která svým působením redukuje z hroznů vodu a dodává jim typické aroma [4].

Náplní této práce je, zda se Tokajské víno může při výrobě kontaminovat i jinými plísněmi. Spory plísní rodu *Aspergillus* a *Penicillium* jsou téměř všude přítomné a teoretické napadení hroznů je pravděpodobné. Riziko pro konzumenty není v podobě plísní, ale především v jejich sekundárním metabolitu – Ochratoxinu A. Důkazem o kontaminaci *vitis vinifera* těmito plísně je pravidelné hlášení RASFF o přítomnosti mykotoxinů v rozinkách a také limity stanovené EU pro maximální možnou hladinu ochratoxinu A ve vínech.

CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce je vyvinout metodu pro stanovení ochratoxinu A v Tokajském vínu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem za optimálních podmínek a zároveň stanovit hladiny mykotoxinu v získaných vzorcích s následným vyhodnocením závislosti hodnot na vlastnostech vína a posouzením souladu s platnou legislativou.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Tokajské víno

Tokajská vína jsou typická svou charakteristickou sladkou chutí a výrazným aroma. K získání výjimečných vlastností přispívá především plíseň *Botrytis cinerea*, vřeckovýtrusná houba patřící do řádu voskovičkotvaré a čeledě hlízenkovité. Houba je téměř všudypřítomná s destruktivními následky zejména pro oslabené ovoce. Nicméně za určitých klimatických podmínek se na hroznech vyvíjí tzv. ušlechtilá plíseň [6, 7, 8].

1.1. Ušlechtilá plíseň

Během invaze houba uvolňuje do bobule hydrolázy a oxidázy (celulázy, proteázy, fosfolipázy), které chemicky degradují slupku a rozptýlí se do dužiny, kde katalyzují změny ve složení šťávy hroznů. Bílé bobule se tak změní na růžové a následně na hnědé. V důsledku narušení slupky bobule se z dužiny odpařuje voda a koncentrují se přítomné látky. Hrozny s vysušenými bobulemi se nazývají cibéby [7, 8].



Obrázek 1 – Cibéba (tokaj.org)

Ztráta vlhkosti má zásadní význam při rozlišování ušlechtilé a šedé plísně. Proto je pro zrání botrytizovaných bobulí důležitý dlouhý, mírně vlhký, teplý a větrný podzim. Pokud nenastanou příhodné podmínky, plíseň šedá způsobí rozsáhlé hniloby hroznů, které je znehodnotí [7, 8, 9].

1.2. Biochemie Tokajského vína

Cukry hroznů jsou využívány houbou při výrobě biomasy, energie a různých metabolitů. Navzdory významným ztrátám cukru, vlivem metabolismu *Botrytis*, se jeho koncentrace dramaticky zvyšuje díky dehydrataci bobulí. Konečná koncentrace cukru může za ideálních podmínek dosáhnout až 700 – 800g/l. Zajímavý je také poměr glukózy k fruktóze, který je nižší než 1. Je to dáno opět přítomností ušlechtilé plísně, protože houba selektivně metabolizuje glukózu [7].

Ušlechtilá plíseň během infekce syntetizuje řadu vysokomolekulárních polysacharidů, které můžeme rozdělit do dvou skupin podle hmotnosti. První skupinu, v rozmezí 20 000 – 50 000 Da, tvoří manóza, galaktóza a v menší míře glukóza a ramnóza. Jejich přítomnost indukuje produkci kyseliny octové a glycerolu během fermentace. Druhá skupina je zastoupená β -glukany. Molekulová hmotnost β -glukanů je v rozmezí 100 000 – 1 000 000 Da. Jejich přítomnost je nežádoucí hlavně kvůli komplikování průběhu filtrace, kdy tyto lineární makromolekuly rychle zanášejí filtry i při malých koncentracích a mohou se podílet i na horším projasnění vína [6, 7, 8].

Další kosmetickou a zároveň jedinečnou vlastností je tvorba a srážení vápenných solí. Houba totiž oxiduje kyselinu galakturonovou, která vznikla rozkladem pektinu, na kyselinu galaktarovou (slizovou). Ta na sebe váže vápník a tvoří tak nerozpustné krystaly. Vyšší kyselost Tokajských vín způsobuje také kyselina glukonová. Přímá oxidace glukózy, za přítomnosti glukooxidázy, vede k akumulaci této kyseliny. Paralelně s touto reakcí vzniká glycerol. Protože glycerol a kyselina glukonová se prakticky nenachází ve šťávě zdravých hroznů, jsou indikátory aktivity *Botrytis cinerea*. Kyselina glukonová není dál fermentována kvasinkami, a proto ve výsledném produktu zůstává beze změny. Převládající kyselinami v hroznových bobulích jsou kyselina vinná a kyselina jablečná. Ty jsou také metabolizovány plísní. Degradace kyseliny vinné probíhá přibližně z 50% a kyseliny jablečné ze 70 - 90% [6, 7, 8].

V infikovaných bobulích je 30 – 80% z celkového obsahu aminokyselin degradováno. Exocelulární proteázy a aminooxidázy působí na proteiny. Uvolněné aminokyseliny a nitrosloučeniny metabolizuje *Botrytis cinerea*. Mezi degradované sloučeniny patří také vitamíny, jako je thiamin a pyridoxin [8].

Lakázy, přítomné v cibébách, jsou jedním s nejvýznamnějších enzymů produkovaných *B. cinerea*. Jejich funkce není zcela objasněna, avšak předpokládá se spojitost s eliminací fungicidních fytoalexinů (resveratrol, pterostilben). Hrozny reagují na napadení houbami produkcí zmiňovaných fenolů. Vědci se tedy domnívají, že lakázy umožňují houbě kolonizovat bobule *Vitis vinifera* i přes její obranné mechanismy [6, 7, 10].

Mezi poznávací znak Tokajských vín patří bezpochybně typické aroma. Terpenoly, primární aromatické sloučeniny v hroznech, jsou v průběhu infekce oxidovány, což vede ke snížení typické odrůdové vůně. Původní aroma je nahrazeno prostřednictvím *Botrytis cinerea* aromatickými aldehydy (benzaldehyd, fenylacetaldehyd), furfurem, laktony (sotolon) či hranolem [6, 7, 8].

1.3. Druhy

Produkce hodnotných vín záleží na mnoha faktorech. Jedním z nich je odrůda hroznů, jehož výběr je omezený ze zákona na místní odrůdy Furmint, Lipovina, Muškát žlutý, Zéta, Kövérszölő a od roku 2006 také Kabar. Rozmanitost Tokajských vín je ale dána především rozdílným zpracováním cibéb [7, 9].

Tokajská essence (Eszencia)

Tokajská essence se získává z výrobního procesu Tokajského výběru. Při skladování hroznů v malých nádržích se bobule vlastní vahou stlačují a produkují šťávu, která je sbírána do dřevěných sudů k následné fermentaci a zrání. Z jedné nádrže, která obsahuje přibližně 30 litrů hroznů určených k produkci Tokajského výběru (označována také jako 1 putna), dostaneme 1-1,5 litru essence. Kvůli vysokému obsahu cukru probíhá fermentace velmi pomalu a výsledná koncentrace alkoholu se pohybuje v rozmezí 5-8% [6, 9].

Tokajský výběr (Aszú)

Další typ výroby spočívá ve smíchání vína, či moštu ze zdravých hroznů a rozmělněných cibéb. Podle množství přidaných cibéb se rozlišovaly 2-6 putnové vína. Rozhodovalo tedy, kolik puten cibéb bylo dodáno k 135 litrovému göncskému sudu moštu nebo vína stejné odrůdy. V roce 2013 byla tato klasifikace zrušena a nahradila ho kategorizace dle zbytkového cukru 60, 90, 120 a 150 g/l, což by mělo odpovídat 3, 4, 5

a 6 putnovému tokajskému vínu. Změnou prošel také název Aszú, který se může používat jen pro tokajský výběr se 150 - 450 g/l zbytkového cukru. Vyšší hodnoty odpovídají Tokajské essenci [6, 9, 11].

Tokajské samorodné (Szamorodni)

Jak už napovídá název, hrozny se při sklizni sbírají “tak jak se urodily”, tedy se neroztrídí zdravé bobule a cibéby. Směs bobulí se dále jemně rozmělní tak, aby nedošlo i k rozdrčení semen. Vzniklá kaše se nechá následně stát, takže se maximální množství cenných látek extrahuje do moštu. Po vylisování směsi následuje fermentace v sudech. Kvalita samorodných vín závisí především na rozsahu kontaminace *Bortyris cinerea* a množství vysušených bobulí, tedy ve velké míře záleží na klimatických podmínkách během podzimu [9,11].

Fordítáš

Fakt, že jsou Tokajská vína a hlavně hrozny napadené ušlechtilou plísní ceněna, dokazuje výrobní proces dalšího druhu vína, při kterém se zpracovává vedlejší produkt lisování, matolína. Ta je spolu s moštem nebo Tokajským vínem 24 hodin macerována a dává tak vínu výraznější aroma a buket [9,11].

Másláš

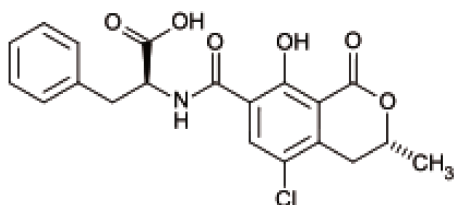
Druhým příkladem dokonalého využití vedlejších produktů je Másláš. Na rozdíl od Fordítáše se místo matoliny používají kvasničné kaly tokajských výběrů a samorodného. Sedimenty kvasinek se zalijí Tokajským vínem stejné sklizně a po dobu 4-6 týdnů se nechají louhovat [9,11].

Seznam možných postupů zpracování tokajských cibéb tímto ale nekončí. Tokajské suché víno se týká odrůdových vín, vyrábí se také slámové, ledové či přívlastkové tokajské [11].

2. Ochratoxin A

Sumární vzorec: C₂₀H₁₈ClNO₆

Molární hmotnost: 403,815 g/mol



Obrázek 2 – Struktura Ochratoxinu A

Ochratoxin A (OTA) se řadí mezi nejvýznamnější mykotoxiny. Často kontaminuje různé potraviny jako obiloviny, kávu, víno, sušené ovoce, ořechy a také se objevuje v masných výrobcích. Některé studie dokazují jeho výskyt v léčivých přípravcích, potravinářských barvivech nebo v balené vodě [12]. Prvním identifikovaným producentem byl v roce 1965 stanoven *Aspergillus ochraceus*. Postupem času byla produkce OTA prokázána i u dalších druhů rodu *Aspergillus* a *Penicillium* (viz Tab. 1) [13].

Tabulka 1 - Plísně, u kterých byla prokázána produkce OTA

Rod	Druh	Rok nálezů
<i>Aspergillus</i>	<i>ochraceus</i>	1965
	<i>niger</i>	1994
	<i>carbonarius</i>	1996
	<i>foetidus</i>	1996
	<i>steynii</i>	2004
	<i>westerdijkiae</i>	2004
	<i>lacticoffeatus</i>	2004
	<i>sclerotioniger</i>	2004
	<i>tubingensis</i>	2005
<i>Penicillium</i>	<i>verrucosum</i>	1969
	<i>nordicum</i>	2001

Ve skupině ochratoxinů je právě zkoumaný OTA nejtoxičtější. Podle Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) je přesný systematický název OTA (2S)-2-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydroisochromene-7-carbonyl]amino]-3-phenylpropanoic acid. Strukturní základ molekul ochratoxinů tvoří isokumarin, který na pátém a devátém uhlíku, obsahuje rozdílné funkční skupiny. OTA má pátý uhlík obsazený chloridem a devátý fenylalaninem [14,15].

Čistý ochratoxin A je bílý krystalický prášek odolný vůči vysokým teplotám (teplota tání 169°C). OTA, jako slabá kyselina, je rozpustný v organických rozpouštědlech – xylenu, metanolu, chloroformu nebo etanolu [15,16].

Hlavní metabolické dráhy zahrnují hydrolýzu, hydroxylaci či konjugaci. Hydrolýzou OTA vzniká Ochratoxin α , který můžeme nalézt v moči exponovaných jedinců společně s původní látkou. Právě tu nacházíme v moči několik dní po expozici v nízkých koncentracích (20-80 ng/l) v závislosti na přijaté dávce a množství volného OTA, tedy nevázaného na krevní albumin. Vylučování Ochratoxinu A močí nám dává informaci o nedávné expozici, naopak koncentrace v plasmě či séru svědčí o dlouhodobé intoxikaci [12,13,17].

Ochratoxin A je zařazen IARC do skupiny pravděpodobně karcinogenních látek – 2B. A to na podkladě důkazů provedených na pokusných zvířatech a nedostatečném průkazu karcinogenity u člověka. (IARC) Za klíčového spouštěče nádorového bujení je pokládán oxidativní stres indukovaný OTA. Dále se uvádí v mnoha zdrojích jako neurotoxická, hepatotoxická, teratogenní a imunotoxická látka. Často bývá spojována s Balkánskou endemickou nefropatií [12,18].

Jako antidotum proti akutní otravě OTA se podle studie Edmonda E. Creppy jeví fenylalanin. V rámci výzkumu bylo myším podáno i.p. 1 mg fenylalaninu spolu s 0,8 mg OTA (dávka, která je letální pro 100% myši za 24 hodin). Při podání obou látek současně bylo zachráněno 100% sledovaných zvířat. V případě že fenylalanin byl podán až po 30 minutách a dávka se zvýšila na 20 mg přežilo 92% [19].

2.1. Legislativa

Nařízením komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006 jsou stanoveny maximální limity kontaminujících látek v potravinách. Toto Nařízení se zabývá také ochratoxinem A a stanovuje jako nejvyšší tolerovaný týdenní příjem (TWI) 120 ng/kg tělesné hmotnosti. Kromě obecného stanoviska byly určeny i maximální limity pro konkrétní potraviny (tab.2).

Tabulka 2 - Limity OTA v potravinách

	Maximální limity (µg/kg)
Nezpracované obiloviny	5,0
nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé spotřebě	3,0
Sušené hrozny révy vinné	10,0
Pražené kávová zrna a mletá pražená káva	5,0
Rozpustná káva	10,0
Víno (včetně šumivého vína s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15%) a ovocné víno	2,0
Aromatizovaná vína, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly	2,0
Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva (nektar, mošt a mošt určený pro lidskou potřebu)	2,0
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	0,5
Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence	0,5

K upozornění veřejnosti byl na základě článku 50 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 zřízen Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF), který podává čtyři druhy oznámení: Varování, Informace, Odmítnutí na hranicích a Novinky. V tabulce 2 jsou shrnuta vydaná varování před vysokým obsahem OTA v potravinách v době od března 2018 do února 2019 [20].

Tabulka 3 - Varování RASFF před výskytem OTA v potravinách

Datum záchytu	Země záchytu	Produkt	OTA (µg/kg)
2.3.2018	Nizozemsko	Sušené meruňky z Turecka	21
5.3.2018	Slovensko	Sušené rozinky z Uzbekistánu	14,48
14.3.2018	Česká republika	Rozinky z Íránu	29
12.4.2018	Belgie	Snídaňové cereálie z Belgie	7,5
24.4.2018	Německo	Rozinky z Turecka	38,8
14.5.2018	Česká republika	Rozinky z Íránu	20,1
22.5.2018	Polsko	Rozinky z Turecka	15,2
24.5.2018	Česká republika	Bylinný čaj ze Slovenska	27,57
30.5.2018	Německo	Mletá paprika z Číny	114,2
31.5.2018	Litva	Mletá sladká paprika ze Španělska	40,6
11.6.2018	Finsko	Pohanková krupice z Litvy	11
25.6.2018	Nizozemsko	Sójové boby z Indie	36
25.6.2018	Nizozemsko	Sójové kousky z Indie	66
27.6.2018	Finsko	Organická bezlepková pohanková mouka ze Spojeného království	6
6.7.2018	Nizozemsko	Pistáciové oříšky z Nizozemska	430
19.7.2018	Švýcarsko	Chilli koření z Indie	28
19.7.2018	Polsko	Mletá sladká paprika z Číny	34
20.7.2018	Finsko	Pražené a solené pistácie ze Spojených států amerických	17
22.8.2018	Německo	Organický oves z České republiky	69
13.9.2018	Nizozemsko	Solené pistácie ze Spojených států amerických	35
21.9.2018	Německo	Mletá paprika z Německa	36
12.10.2018	Polsko	Pražená zrnková káva z Polska	5,9
6.11.2018	Nizozemsko	Sušená moruše z Turecka	47
2.1.2019	Finsko	Pražené a solené pistácie	96
4.1.2019	Česká republika	Rozinky z Uzbekistánu	66,5
11.1.2019	Rumunsko	Potravinový doplněk z Indie	54,81
11.1.2019	Slovinsko	Organické žito z České republiky	6,4
22.2.2019	Belgie	Organická hnědá rýže z Itálie	14,1
27.2.2019	Dánsko	Organická bezlepková kukuřičná pasta z Rumunska	7,8
1.3.2019	Nizozemsko	Sójové kousky z Indie	44

2.2. Analytické metody stanovení OTA

K nejčastěji používaným a tradičním analytickým metodám stanovení ochratoxinu A se řadí tenkovrstevná chromatografie (TLC), HPLC a ELISA. Všechny chemické metody analýzy OTA tvoří několik základních kroků – Extrakci, purifikaci, separaci, detekci, kvantifikaci a konfirmaci [13].

Nejčastěji používanou formou extrakce je SPE, zavádí se i imunoafinitní kolony (IAC) či molekulárně vtištěné polymery (MIPs) s anti-OTA protilátkami a prostorově specifickými cílovými molekulami. Tyto metody jsou vysoce specifické, přesto s podstatným nedostatkem. V alkalickém prostředí OTA mění svou strukturu (cyklický lakton se mění na acyklický). IAC a MIPs tak nerozeznají ochratoxin. K detekci zkoumané látky se, pro její fluorescenční vlastnosti, v minulosti používalo převážně

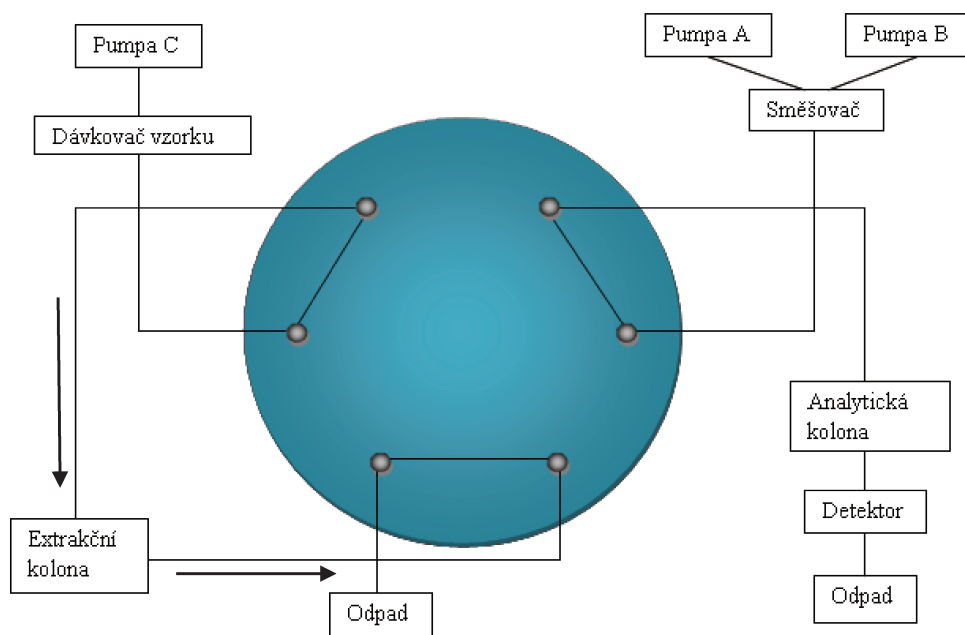
TLC. Zdokonalování metod analýzy vedlo také k vyšší citlivosti detekce. Právě HPLC s fluorescenčním detektorem se v současné době pokládá za nejvhodnější volbu metody stanovení ochratoxinu A [13,21].

Tabulka 4–Stručný přehled vybraných HPLC metod stanovení OTA ve víně

Extrakce	Kolona/Separace	Detekce	LOD LOQ	Zdroj
QuEChERS	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm; 1,8µm) Gradientová eluce MF-A vodný roztok 0,1% kys. mravenčí; MF-B ACN s 0,1% kys. mravenčí	MS/MS	0,1 µg/l 0,3 µg/l	[22]
LLE	Sonoma C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 100 Å) Isokratická eluce Voda / ACN / 2% kys. octová ledová (49,5/49,5/1)	FD Ex 333 nm Em 460 nm	0,1 µg/l 0,3 µg/l	[23]
DLLME	Luna C18 Phenomenex (150 x 0,5 mm; 5 µm) Isokratická eluce 2% kys. octová + 0,2M SDS/metanol (30/70)	LIF	5,5 ng/l 18,4 ng/l	[24]
IAC (Ochraprep)	Předkolona Zorbax SB-C18 (12,5 x 4,6mm; 5 µm) Analytická kolona Zorbax SB-C18 (250 x 4,6mm; 5 µm) Isokratická eluce ACN / 2% kys.octová (50/50)	FD Ex 333 nm Em 460 nm	0,1 µg/l 0,3 µg/l	[25]
IAC (Ochraprep)	Eurospher RP C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Isokratická eluce 48% ACN + 52% octan sodný/ kys.octová (19:1)	FD Ex 330 nm Em 460 nm	0,03 µg/l 0,05 µg/l	[26]

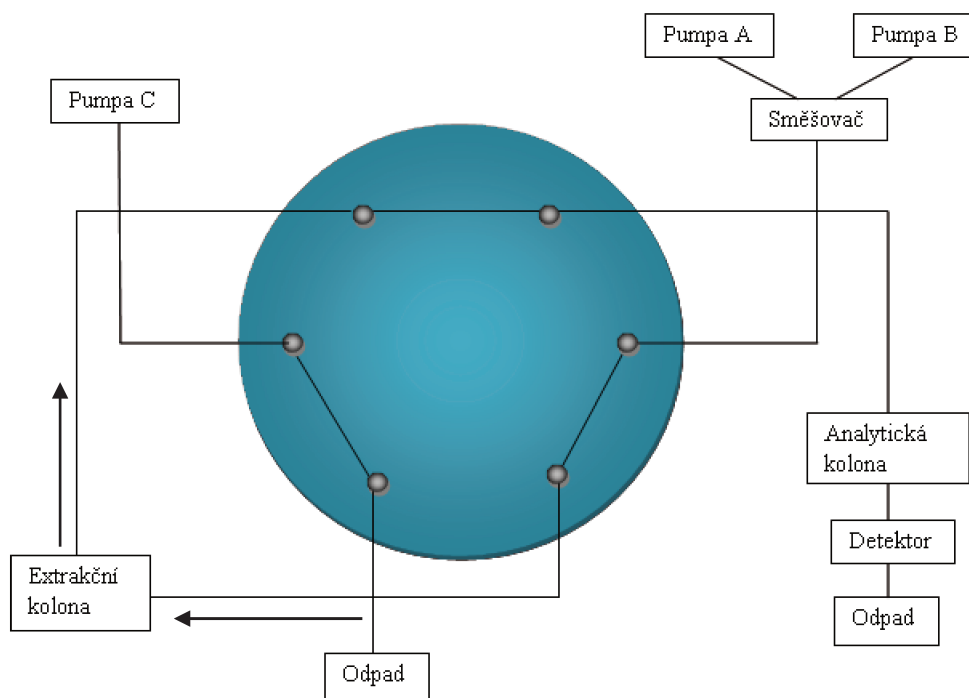
2.2.1. Systém přepínání kolon

Jak již bylo výše uvedeno, k extrakci analytu z matrice se obvykle používá extrakce na pevné fázi. Tato účinná metoda je ale časově a manuálně náročnější, proto byla snaha tuto metodu automatizovat. On-line SPE extrakce nabízí řešení - zapojením extrakční kolony před analytickou kolonu se systémem přepínání kolon pomocí vícecestného ventilu.



Obrázek 3 - Vícecestný ventil v poloze 1 [27]

Vícecestný ventil umožňuje dvě rozdílné polohy s odlišnými cestami toku mobilní fáze se vzorkem. V první poloze pumpa C pohání vzorek na prekoncentrační extrakční kolonu, kde se analyt zachytává a balastní látky pokračují dále do odpadu [27].



Obrázek 4 - Vícecestný ventil v poloze 2 [27]

V druhé poloze ventilu pumpa A a B (v případě gradientové eluce) pohání mobilní fázi opačným směrem přes extrakční kolonu, ze které se analyt vymývá do separační analytické kolony a následně do detektoru.

Důležitou vlastností extrakční kolony je dostatečná adsorpční kapacita. V opačném případě by se mohl hledaný analyt už v první poloze ventilu vymývat do odpadu a snížila by se tak výtěžnost metody.

2.2.2. HPLC s fluorescenčním detektorem

Podstata chromatografických metod je založena na rozdílné migraci látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Stacionární fáze je tvořena nejčastěji silikagelem s navázaným vhodným ligandem. Mobilní fázi v případě reverzního systému pak zastupují roztoky vody s organickými polárními rozpouštědly. Základní instrumentace HPLC systému je tvořena vysokotlakým čerpadlem, autosamplerem, separační kolonou a detektorem.

Fluorescenční detektor pracuje na principu měření emisního záření, které analyt vydá po absorpci excitačního elektromagnetického záření. Molekuly látek přecházejí absorpcí elektromagnetického záření ze základního vibračního stavu do různých vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu. Ztrátou vibrační

energie přejde molekula do základního vibračního stavu a emituje fluorescenční záření, které má většinou vyšší vlnovou délku než absorbované záření z důvodu vibrační relaxace [28].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. Materiály a pomůcky

3.1. Standardy a chemikálie

- Ochratoxin A, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Methanol, pro HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Acetonitril, pro HPLC $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Kyselina octová, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Ultračistá voda čištěná Merck / Millipore Milli-Q

3.2. Vzorčky Tokajského vína

		Ročník	Výrobce
1	Archívné víno 5-Put	1983	Zlatý Strapec
2	Archívné víno 3-Put	2003	Ostrožovič
3	Tok. Archívné víno 6-Put	1972	Zlatý Strapec
4	Archívné víno 5-Put	2004	Ostrožovič
5	Archívné víno 5-Put	1989	Ostrožovič
6	Archívné víno 6-Put	2002	Ostrožovič
7	Tok. Archívné víno 6-Put	1983	neuveden
8	Archívné víno 6-Put	1993	Zlatý Strapec
9	Archívné víno 4-Put	2004	Ostrožovič
10	Archívné víno 4-Put	2002	Ostrožovič
11	Archívné víno 3-Put	1995	Ostrožovič
12	Archívné víno 4-Put	1999	Ostrožovič
13	Tokaj 4-Put	2016	Ostrožovič
14	Šupkáč-90 dní Furmint	2017	Šupkáč
15	Archívné víno 6-Put	1997	Zlatý Strapec
16	Archívné víno 5-Put	1993	Zlatý Strapec
17	Archívné víno 3-Put	1999	Ostrožovič
18	Archívné víno 4-Put	1995	Tokaj&Co
19	Archívné víno 6-Put	1993	Ostrožovič
20	Tokajský výběr, 4-Put	1993	Zlatý Strapec
21	Furmint-Šupkáč 30 dní	2017	Šupkáč
22	Tokajský výběr, 6-Put	2003	Ostrožovič
23	Archívné víno 3-Put	1988	Zlatý Strapec
24	Archívné víno 5-Put	2003	Ostrožovič
25	Archívné víno 6-Put	1993	Tokaj&Co
26	Archívné víno 6-Put	1989	Ostrožovič
27	Tokajský výběr, 3-Put	1995	Zlatý Strapec
28	Tok. Archívné víno 5-Put	1959	Zlatý Strapec
29	Muškát žltý, Cibébový výběr	2012	Ostrožovič
30	Archívné víno samorodé sladké	1997	Tokaj&Co

31	Archívne víno Esencia	2000	Ostrožovič
32	Archívne víno Esencia	1999	Tokaj&Co
33	Archívne víno 5-Put	1993	Ostrožovič
34	Samorodné suché	1997	Zlatý Strapec
35	Tok. Archívne víno 5-Put	1972	Zlatý Strapec
36	Muškat žltý, Slámové víno	2010	Ostrožovič
37	Muškat žltý	2015	Ostrožovič
38	Archívne víno 6-Put	1999	Ostrožovič
39	Archívne víno 2-Put	1990	Tokaj&Co
40	Archívne víno 6-Put	1989	Tokaj&Co
41	Tokajský výběr 4-Put;L1	2000	Zlatý Strapec
42	Tokajský výběr 3-Put	2000	Zlatý Strapec
43	Furmint, Cibébový výběr	2013	Ostrožovič
44	Furmint, Cibébový výběr	2012	Ostrožovič
45	Archívne víno 5-Put	1990	Tokaj&Co
46	Archívne víno 3-Put	1990	Tokaj&Co
47	Archívne víno 2-Put	1989	Tokaj&Co
48	Samorodné suché	2016	Ostrožovič
49	Tokajský výběr 5-Put	2000	Zlatý Strapec
50	4-P výběr	2009	Tokaj&Co
51	6-P výběr	2006	Tokaj&Co
52	3-P výběr	2009	Tokaj&Co
53	Tok. Forditáš	2011	Tokaj&Co
54	Tok. Esencia	2009	Tokaj&Co
55	Samorodné sladké	2006	Tokaj&Co
56	Lipovina	2015	Ostrožovič
57	5-P výběr	2003	Tokaj&Co
58	Furmint	2014	Ostrožovič
59	Samorodné suché	2009	Tokaj&Co

Všetchny vzorky Tokajského vína byly získány ve spolupráci s Technickou Univerzitou Bratislava, Fakultou chemické a potravinářské technologie. Každý v objemu cca 8 ml.

3.3. Přístroje a podmínky separace

Chromatograf	Kapalinový chromatogram LC Prominence, Shimadzu
Kolony	Kinetex Phenyl Hexyl 100 x 4,6; 2,6 μm (Phenomenex) Ascentis® Express C18 100 x 4,6; 2,7μm (Supelco) Ascentis® Express RP-Amide 100 x 4,6; 2,7μm (Supelco) Triart C18 ExRS 100 x 4,6;5,0 μm (YMC)
Extrakční kolona	Ascentis® Express RP-Amide 5 x 4,6; 2,7μm (Supelco)
Detektor	Fluorescenční detektor Shimadzu RF10A XL
Detekce	Ex 335nm / Em 497nm Ex 335nm / Em 463nm
Mobilní fáze	A - Acetonitril B - 0,5% vodný roztok kyseliny octové C - 0,5% vodný roztok kyseliny octové + Metanol (70/30)
Průtok	A+B= 1 ml/min; C= 1 ml/min
Dávkování vzorku	50 μl
Teplota	50°C
Vyhodnocení výsledků	Program LC Solutions

3.4. Příprava roztoků standardů

Vycházelo se z předem připraveného standardu ochratoxinu A o koncentraci 1ppm. Nejdříve byl připraven roztok (2x) o koncentraci 100 ppb a to odebráním 100 μl připraveného standard a doplněním 900 μl metanolu.

V následujících tabulkách je upřesněn postup přípravy pracovních roztoků pro kalibraci. Pracovní roztoky o koncentraci 2 ppb a 0,2 ppb byly připraveny 2-krát, aby se mohly dále použít pro další ředění. Roztoky se ředily 40% metanolem okyseleným 0,5% kyselinou octovou.

Tabulka 6 - Příprava standardů z roztoku OTA o koncentraci 100ppb

Požadovaná koncentrace OTA (ppb)	Objem roztoku 100ppb (μl)	Doplnění 40% metanolem (μl)
50	500	500
25	250	750
15	150	850
10	100	900
5	50	950
2	20	980

Tabulka 5 - Příprava standardů z roztoku OTA o koncentraci 2 ppb

Požadovaná koncentrace OTA (ppb)	Objem roztoku 2 ppb (μl)	Doplnění 40% metanolem (μl)
1	500	500
0,5	250	750
0,2	100	900

Tabulka 7 - Příprava standardů z roztoku OTA o koncentraci 0,2 ppb

Požadovaná koncentrace OTA (ppb)	Objem roztoku 0,2 ppb (μl)	Doplnění 40% metanolem (μl)
0,1	500	500
0,05	250	750

Pro optimalizaci metody se používaly roztoky ochratoxinu A o koncentraci 10 ppb. Ten se připravil smísením 100 μl zásobního roztoku (100ppb) a 900 μl metanolu. Dále byla metoda optimalizována s roztokem ochratoxinu A v matrici o koncentraci 2 ppb připraveným z 20μl zásobního roztoku (100 ppb) a 980 μl tokajského vína Hárslevelű. OTA v tomto víně nebyl obsažen (potvrzeno absencí píku na chromatogramu).

3.5. Příprava vzorků

Vzorky vína byly skladovány v lednici při cca 5°C v tmavých vialkách. Vybrané vzorky, které po měření vykazovaly vyšší koncentrace OTA, byly ředěné metanolem (2x/4x).

3.6. Příprava mobilních fází

Při analýze bylo pracováno se třemi pumpami s rozdílnými mobilními fázemi. Pumpa A do systému poháněla čistý acetonitril, pumpa B 0,5% vodný roztok kyseliny octové, připravený smísením 995 ml ultračisté vody z Millipore Milli-Q a 5ml kyseliny octové. Tyto pumpy vytvářely gradient na analytické koloně. Pumpa C sloužila k čerpání metanolu nebo acetonitrilu v 0,5% vodném roztoku kyseliny octové v různém poměru pro extrakci a přečištění vzorků na extrakční předkoloně.

4. Optimalizace

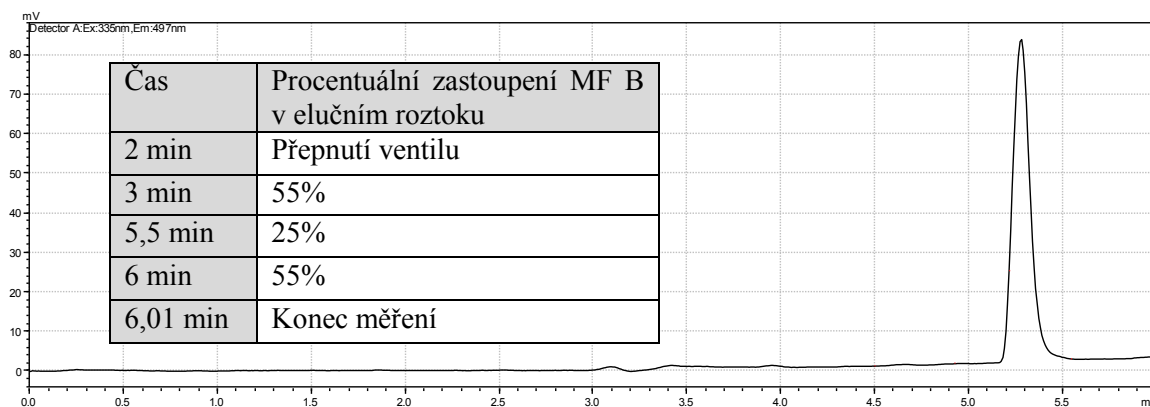
Stanovení Ochratoxinu A bylo optimalizováno na třech úrovních. V první řadě byly modifikovány podmínky gradientové eluce spolu s parametry detekce. Následně byla vybrána nejvhodnější kolona a mobilní fáze, kterou poháněla pumpa C.

4.1. Modifikace gradientové eluce

Pro optimalizaci gradientové eluce byla vybrána kolona Kinetex Phenyl Hexyl 100 x 4,6 mm, velikost částic 2.6 μm , (Phenomenex, USA).

4.1.1. Metoda 1

První testovaná metoda započala nástřikem roztoku OTA (10ppb) v matrici vína na extrakční kolonu a promýváním 30% metanolem poháněného pumpou C. Po přepnutí ventilu, acetonitril (pumpa A) a vodný roztok kyseliny octové (pumpa B), vymývali pomocí gradientu z extrakční kolony analyt (viz tabulka). Detektor, nastavený na 335 nm excitačního a 497 nm emisního záření, zachytil OTA po 5. minutě s odezvou okolo 85 mV. Na chromatogramu se nevyskytovaly výraznější balastní píky.

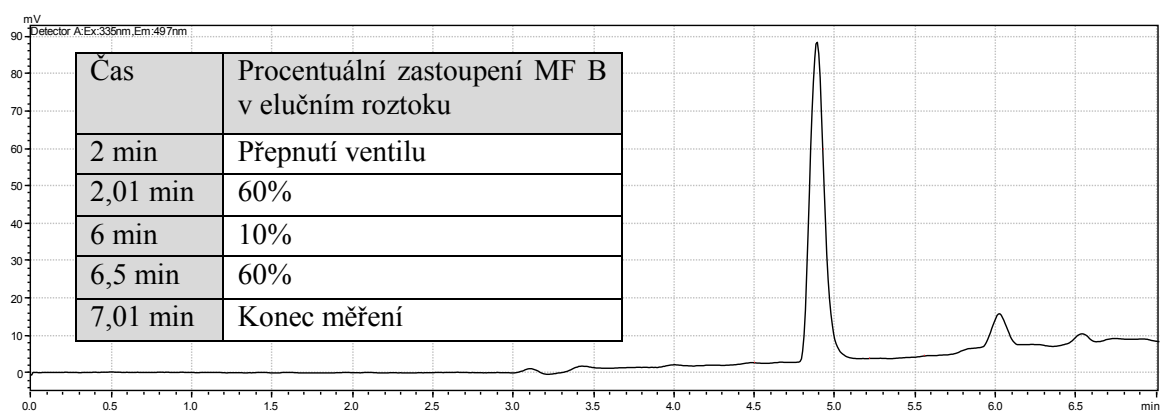


Obrázek 5 – Chromatogram metody 1

4.1.2. Metoda 2

Druhá metoda byla prodloužena o minutu a také poměry mobilních fází v elučním roztoku se lišily. Po dvouminutové extrakci organická složka tvořila 40%, ale v 6. minutě dosahovala 90%. Podmínky extrakce a detekce se nezměnily.

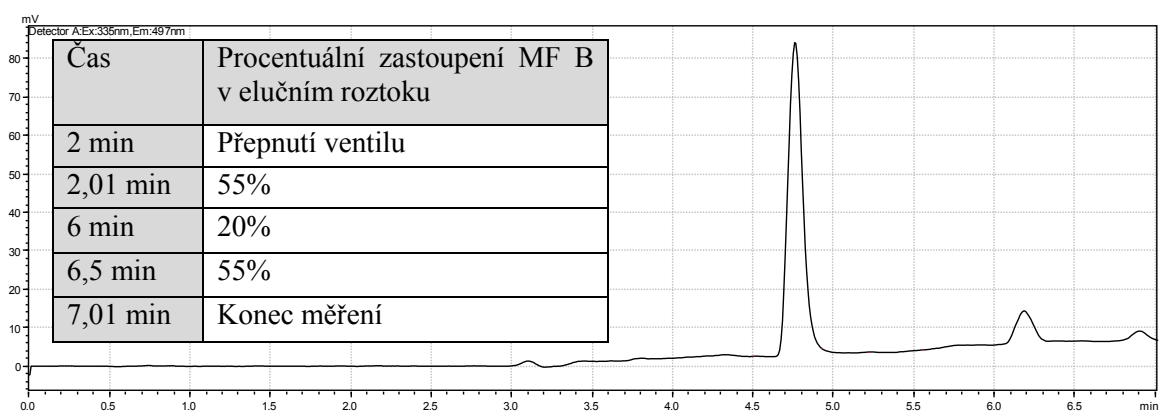
Ze záznamu je patrné, že odezva detektoru je sice větší, ovšem začaly se objevovat balastní píky.



Obrázek 6 - Chromatogram metody 2

4.1.3. Metoda 3

Při této metodě organická složka dosahovala maximálně 80%. Ani v tomto případě se nedosáhlo lepší odezvy.

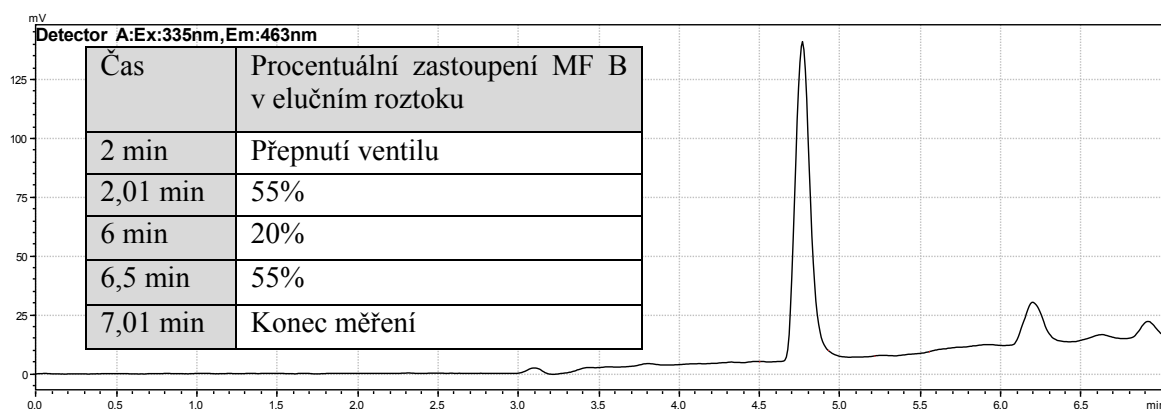


Obrázek 7 - Chromatogram metody 3

4.1.4. Metoda 4

Metoda 4 byla stejně organizována jako Metoda 3. Lišila se pouze v detekci. Vlnová délka excitačního záření byla ponechána, změnila se u emisního záření na 463 nm.

Za těchto podmínek se docílilo vyšší odezvy, potřebné k dostatečně citlivé kvantifikaci ochratoxinu A v matrici.



Obrázek 8 - Chromatogram metody 4

Další modifikace měla za cíl zkrácení doby analýzy. Toho se docílilo přepnutím ventilu již po 1 minutě.

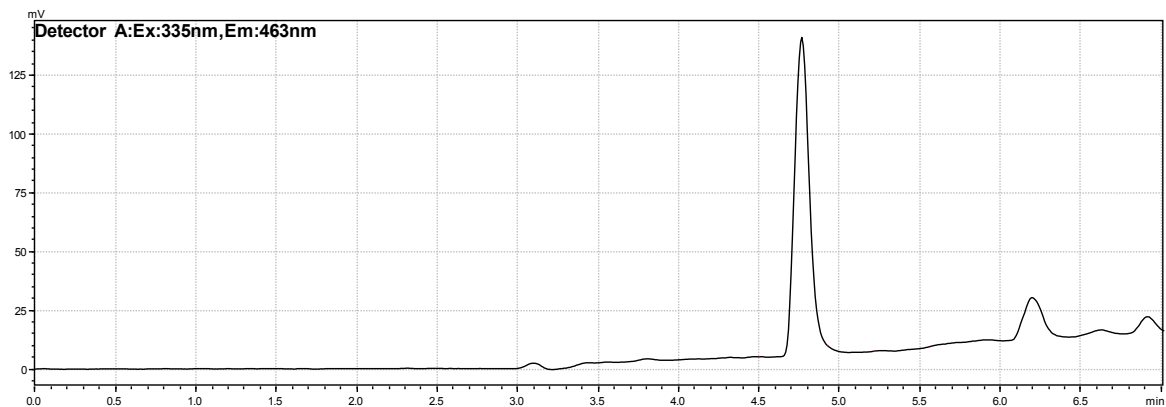
Čas	Procentuální zastoupení MF B v elučním roztoku
1 min	Přepnutí ventilu
1,01 min	55%
5 min	20%
5,5 min	55%
6,01 min	Konec měření

4.2. Výběr kolony

V předešlé části bylo zjištěno, že jako nejvhodnější se jevila metoda 4 (později zkrácena o 1 minutu). Ta byla aplikována na čtyři druhy kolon. Při každém měření byl analyzován ochratoxin A o koncentraci 10 ppb.

4.2.1. Kinetex® Phenyl Hexyl 100x4,6 mm, 2,6 μm, 100 Å (Phenomenex)

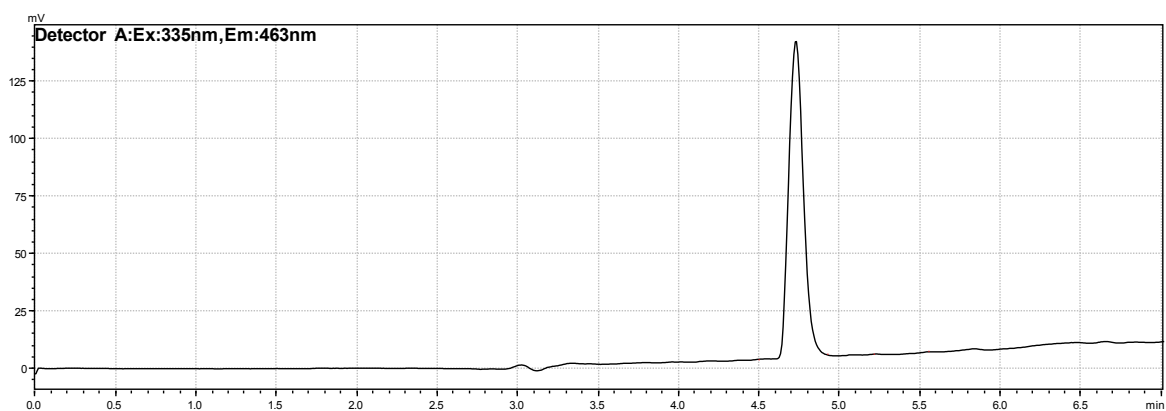
Phenyl-hexylová kolona s technologií Core shell o velikosti částic 2,6 μm a velikostí pórů 100Å vykazovala dobrou odezvu. Přítomnost OTA potvrzoval dostatečně úzký a vysoký pík. Na konci analýzy se objevovaly nežádoucí balastní píky.



Obrázek 9 -Phenyl-hexylová kolona

4.2.2. Ascentis® Express C18 10cm x 4.6mm, 2.7μm (Sigma-Aldrich)

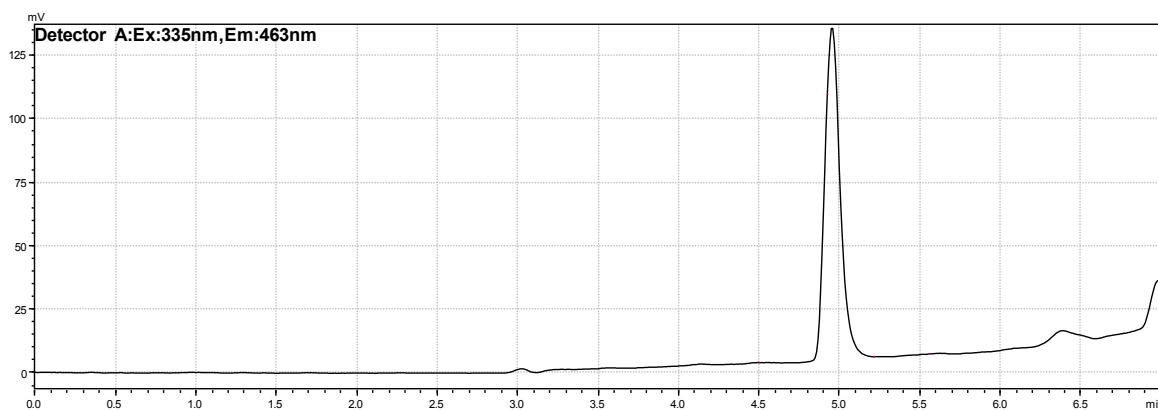
Analytická kolona C18 s Fused-Core® částicemi o velikosti 2,7μm poskytovala obdobný výsledek, ovšem bez balastních píků.



Obrázek 10 - Kolona C18

4.2.3. Ascentis® Express RP-Amide 10cm x 4.6mm, 2.7µm (Sigma-Aldrich)

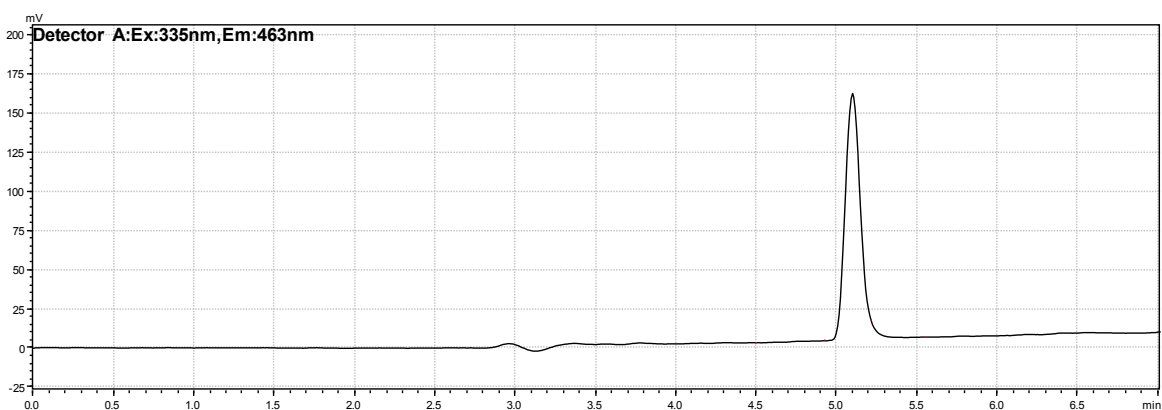
Ve srovnání s kolonou C18 stejné firmy, RP-Amide podle výrobce vyniká zvýšenou selektivitou pro polární sloučeniny. Výsledný chromatogram však neposkytl lepší výsledky.



Obrázek 11 - Kolona RP-Amide

4.2.4. Triart C18 ExRS 100mmx 4.6mm, 3µm , 80Å (YMC)

Poslední testovanou kolonou byla opět C18 fáze na bázi organických/anorganických hybridních částic silikagelu. Za optimální kolonu byla vybrána právě kolona Triart C18. A to z důvodu největší odezvy detektoru a minimu balastních píků.



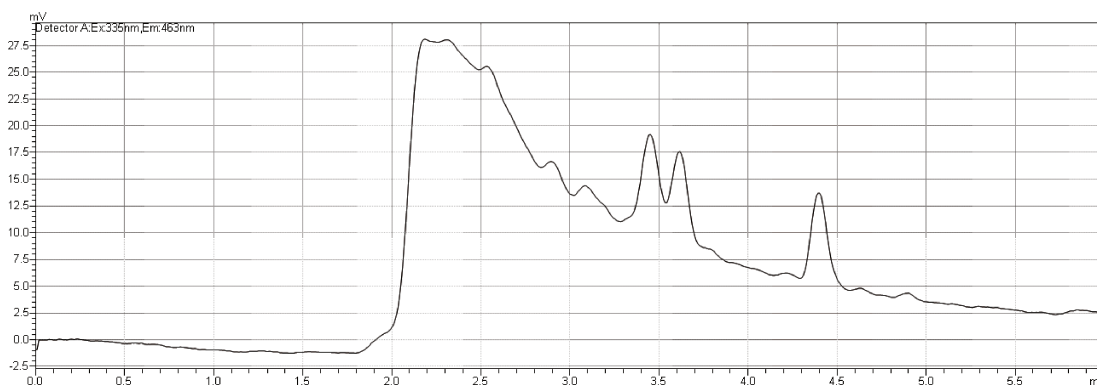
Obrázek 12 - Kolona Triart C18

4.3. Modifikace mobilní fáze

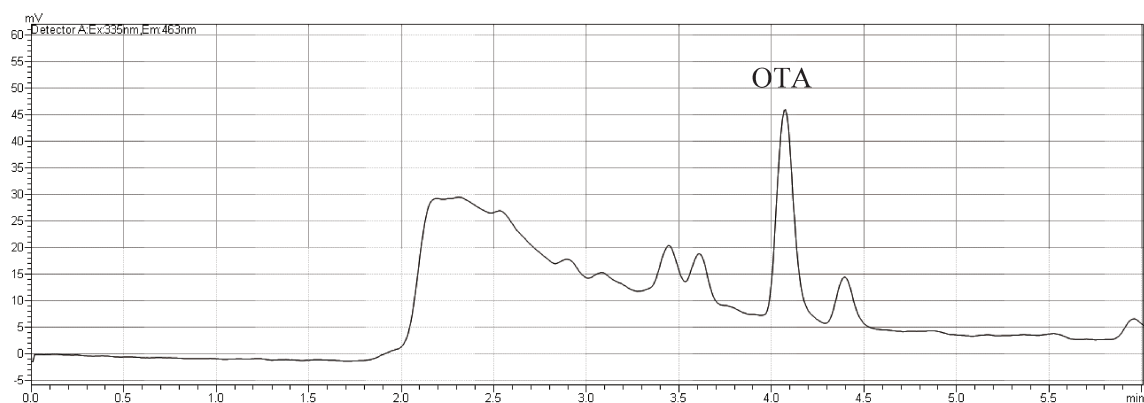
Mobilní fáze C (promývací fáze) byla testována na koloně Triart C18 (YMC) za podmínek gradientové eluce podle metody 4. Snahou optimalizace bylo získat takovou promývací fázi, která vzorek před analýzou zbaví balastní matrice a zároveň na předkoloně udrží hledaný analyt s maximální výslednou výtěžností.

Postupně byly měřeny vzorky ochratoxinu A o koncentraci 2ppb v matrici (Tokaj Hárslevelű) a vzorky samotné matrice s osmi rozdílnými mobilními fázemi. Jednalo se o 10%, 20%, 30% a 40% metanol a 10%, 15%, 20% a 30% acetonitril v 0,5% kyselině octové.

Acetonitril v nízkých koncentracích nedostatečně vymýval matrici. Při použití 10% ACN se na analytickou kolonu dostalo přibližně 10x více matrice než OTA, v případě 15% už jen 2x. Organická fáze zastoupená z 30% ACN kromě matrice vymyla z extrakční kolony také analyt. Kompromis v podobě 20% představoval ideální poměr, který vzorku zbavil většiny balastních píků a OTA poskytl dostatečnou odezvu detektoru.

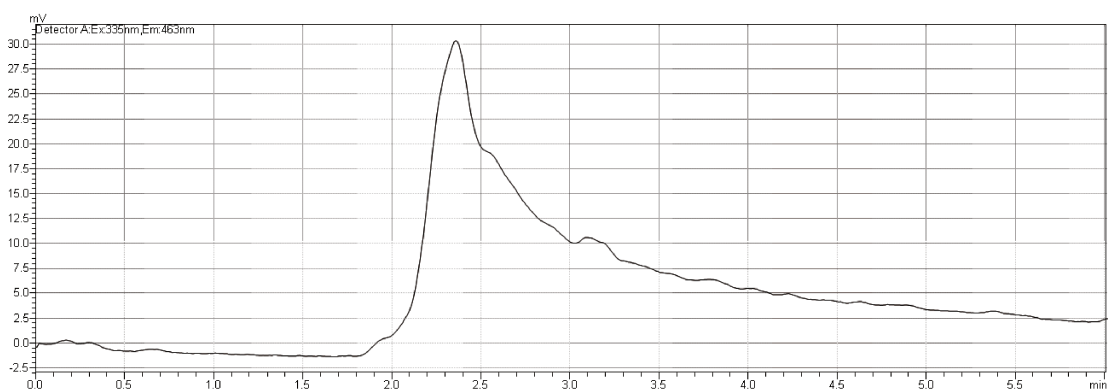


Obrázek 13 - Chromatogram matrice za použití extrakce 20% ACN v 0,5% kyselině octové

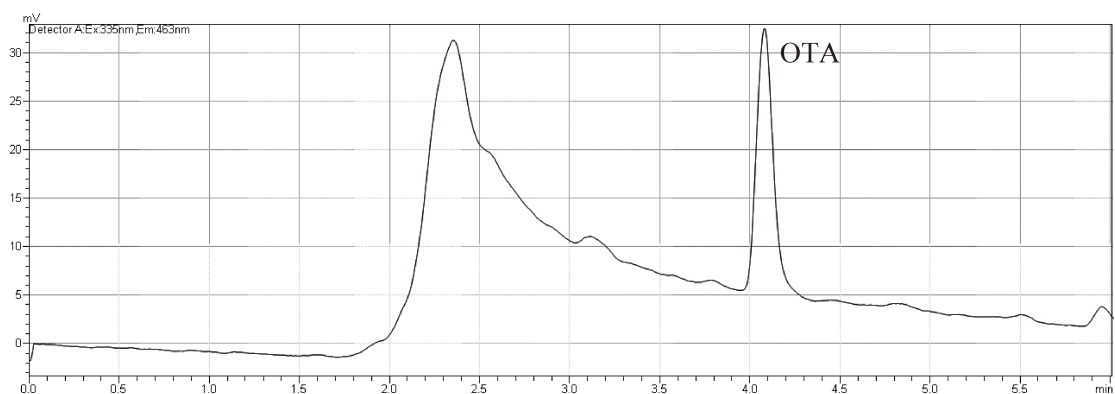


Obrázek 14 - Chromatogram matrice s 2ppb OTA za použití extrakce 20% ACN v 0,5% kyselině octové

Stejně jako ACN v nízkých koncentracích nedokázal dostatečně vzorku zbavit matrice z extrakční kolony, tak i 10% a 20% metanol poskytoval mnohonásobně vyšší odezvy matrice naproti OTA. Nejlepšího výsledku dosáhl 40% MeOH. 30% MeOH, používaný u výběru kolony a správné gradientové eluce, vyhovoval, ale vyšší koncentrace organické fáze dokázala z chromatogramu odstranit více balastů.



Obrázek 15 - Chromatogram matrice za použití extrakce 40% MeOH v 0,5% kyselině octové



Obrázek 16 - Chromatogram matrice s 2ppb OTA za použití extrakce 40% MeOH v 0,5% kyselině octové

Přestože s 20% ACN poskytoval OTA nejvyšší odezvu, přítomnost balastních píků v blízkosti hledaného analytu by v reálných vzorcích mohly komplikovat identifikaci či kvantifikaci. Proto byl jako optimální promývací fáze vybrán 40% MeOH v 0,5% kyselině octové.

5. Validace

Podle ISO 9000:2001 je validace definována jako: „Potvrzení prostřednictvím poskytnutí objektivního důkazu, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny.“

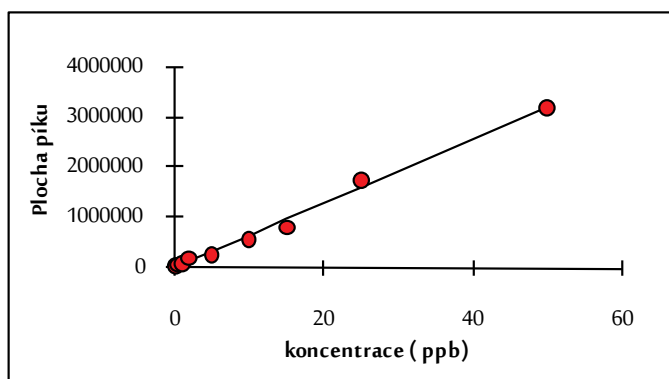
Validace stanovení OTA v Tokajském víně, podle parametrů optimalizovaných v předešlé kapitole, byla stanovena pomocí čtyř parametrů – linearitou, opakovatelností, výtěžností a citlivostí metody. Byl také proveden test vhodnosti chromatografického systému, kde byl hodnocen retenční čas hodnotou 4,07, symetrie píku hodnotou: 1,201, píková kapacita při gradientové eluci hodnotou: 15,85 a rozlišení od píku balastní matrice hodnotou: 13,247.

5.1. Linearita

Podstatou linearity je stanovit závislost mezi body určenými koncentrací analytu a odezvou detektoru[29]. Výsledkem byla kalibrační křivka, z které byly odvozeny statistické parametry. Pro získání tohoto parametru bylo připraveno 10 roztoků OTA různé koncentrace v 40% MeOH s 0,5% vodným roztokem kyseliny octové a 10 kalibračních roztoků v matrici tokajského vína. Každý vzorek se změřil třikrát a z výsledných ploch píků byla do kalibrační křivky zapsána průměrná hodnota k odpovídající koncentraci.

5.1.1. Ochratoxin A –kalibrační křivka na standardech

c (ppb)	Plocha píku
0,1	33781
0,2	42736
0,5	58755
1	93639
2	195916
5	266449
10	578609
15	811767
25	1761340
50	3197044

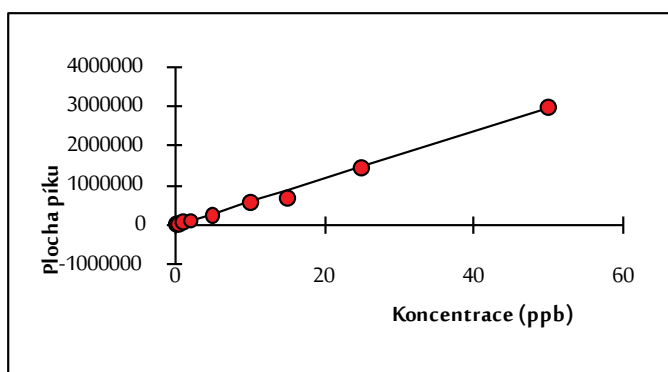


Obrázek 17 - Kalibrační křivka pro OTA v 40% MeOH

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby
Směrnice	k =	64057,53	± 1835,585
Abs. člen	q =	7057,407	± 34243,88
Korelační koef.	r =	0,996732	
Reziduální odch.	s =	87965,65	

5.1.2. Ochratoxin A - kalibrační křivka v matrici

c (ppb)	Plocha píku
0,1	35357
0,2	43590
0,5	57293
1	84631
2	118503
5	277993
10	586843
15	696337
25	1490293
50	3022305



Obrázek 18 - Kalibrační křivka pro OTA v matrici

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby
Směrnice	k =	59508,03	± 1548,709
Abs. člen	q =	-6132,889	± 28892,04
Korelační koef.	r =	0,997302	
Reziduální odch.	s =	74217,85	

5.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost měření ochratoxinu A byla zjištěna u koncentrací standardů - 2ppb, 5ppb a 50 ppb v 7 opakováních. Výsledkem opakovatelnosti je relativní směrodatná odchylka, která ukazuje variabilitu výsledků měření.

Tabulka 8 - Opakovatelnost měření

Koncentrace OTA	0,2 ppb	5 ppb	50 ppb
Nástřik 1	44137	250622	3220646
Nástřik 2	42150	277511	3243639
Nástřik 3	41019	271215	3227061
Nástřik 4	41335	274022	3216579
Nástřik 5	44298	274022	3178731
Nástřik 6	43698	277040	3174535
Nástřik 7	42514	275092	3118115
Průměr	42736	271361	3197044
Směrodatná odchylka	1232	8687	39790
RSD	2,88%	3,20%	1,24%

5.3. Výtěžnost

Obdobně jako v rámci ověřování opakovatelnosti měření se výtěžnost určovala u koncentrací 0,2ppb, 5ppb a 50ppb. Výtěžnost byla získána z průměrné plochy píku OTA v matrici danou do poměru k ploše standardů OTA. Díky výsledné výtěžnosti mohla být také určena správnost metody prostřednictvím výpočtu relativní směrodatné odchylky ze tří různých koncentrací.

Tabulka 9 -Výtěžnost měření a určení správnosti metody

Koncentrace OTA	OTA 40% MeOH	OTA matrici	Výtěžnost
0,2ppb	42736	43590	102%
5ppb	271361	276682	102%
50ppb	3197044	2919909	91%
		Průměr	98%
		SD	0,0502
		RSD	5%

5.4. Přesnost

Přesnost metody byla určena u koncentrace 5ppb OTA přidané k Tokajskému vínu na základě šesti měření, z kterých byla získána relativní směrodatná odchylka.

Tabulka 10 - Přesnost metody stanovení OTA ve víně

Vzorek	Plocha píku
1	279673
2	278280
3	276025
4	273336
5	276193
6	274782
7	278488
Průměr	276682
SD	2078
RSD	0,75%

5.5. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez detekce je nejnižší koncentrace, při které můžeme na základě chromatogramu prohlásit, že hledaná látka se ve vzorku vyskytuje a je dostatečně rozpoznatelná od šumu. Při limitu (mezi) stanovitelnosti je nutno danou látku i přesně kvantifikovat. LOQ je definovaná jako odezva desetkrát větší než šum. V praxi byla experimentálně získána pomocí postupného ředění a následně z ní teoreticky vypočítaná nejnižší detekovatelná koncentrace.

$$\text{LOD} = \frac{3 * \text{LOQ}}{10}$$

Nejnižší kvantifikovatelná koncentrace standardů OTA byla určena 20krát nižší hodnota, než kterou nařídila Evropská komise jako nejvyšší přípustnou pro víno. Ze vztahu LOD a LOQ, vyjádřený rovnicí výše, byla určena mez detekce na 0,03ppb.

Tabulka 11 - Limit kvantifikace standardu OTA

Koncentrace MeOH 40%	v	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3	Průměr	RSD
0,1 ppb		33704	32759	34880	33781	2%

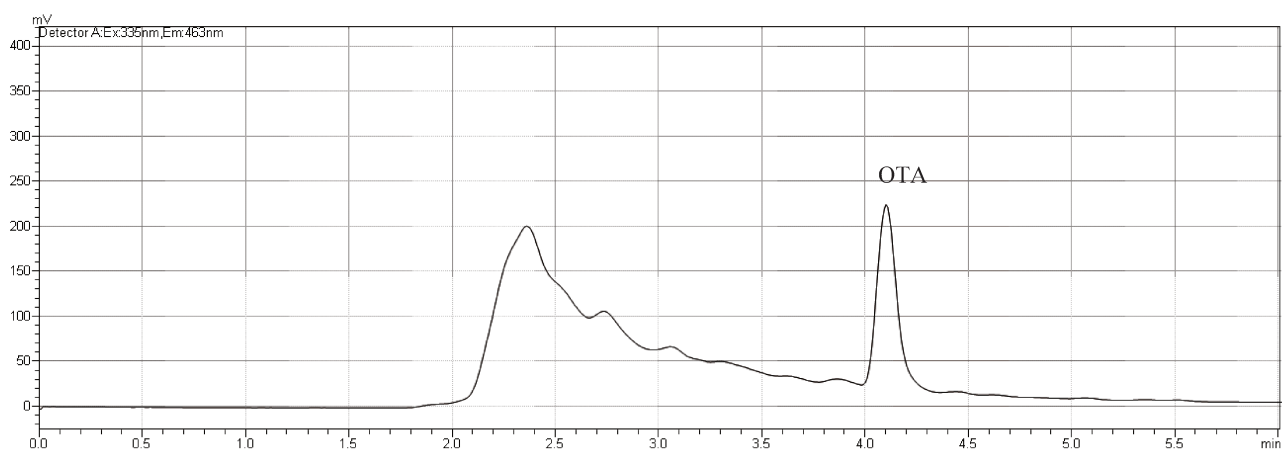
Pro stanovení OTA v matrici platily totožné podmínky, které sebou přinesly i stejné výsledky, tedy nejnižší detekovatelná koncentrace 0,03ppb a nejnižší kvantifikovatelná koncentrace 0,1ppb. V tabulkách 6 a 7 jsou zaznamenány plochy píků Ochratoxinu A při nejnižší stanovitelné koncentraci.

Tabulka 12 -Limit kvantifikace pro OTA v matrici

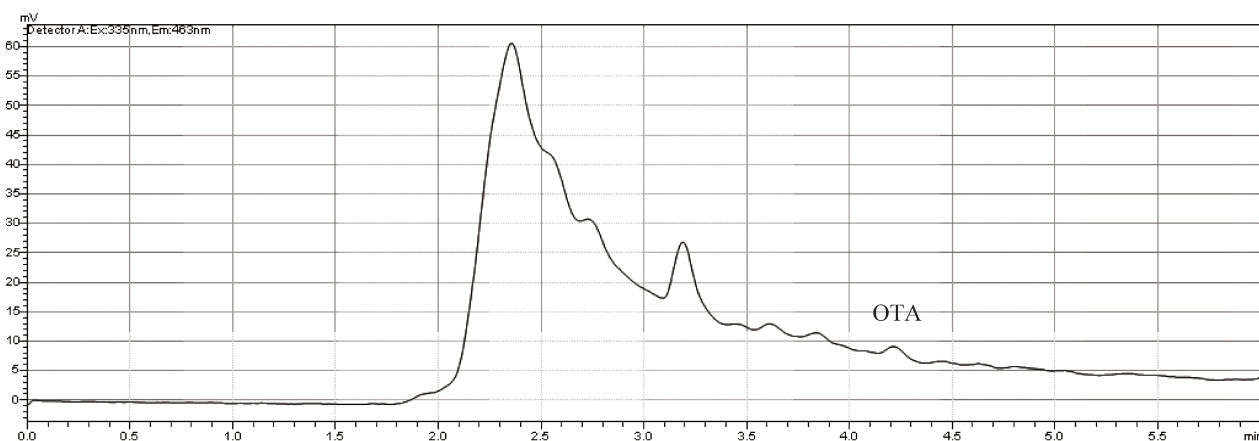
Koncentrace Tokaji	v	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3	Průměr	RSD
0,1ppb		35552	34797	35723	35357	1%

6. Stanovení Ochratoxinu A ve vzorcích Tokajských vín

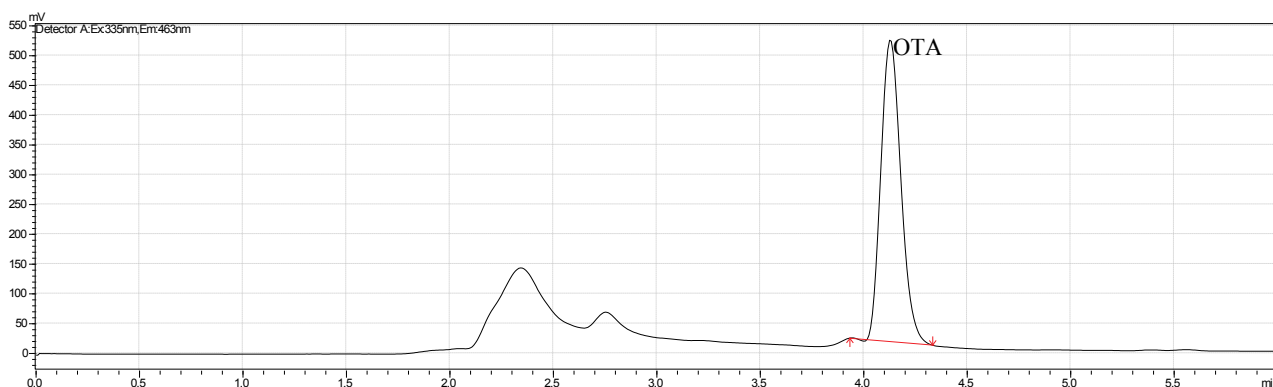
Pro potřeby této diplomové práce bylo získáno 59 vzorků Tokajských vín různých ročníků, druhů a také od různých výrobců. Nejstarší je Archivní víno 5-putnové z roku 1959. Před měřením byla vína pouze přepipetována (1ml) do vialek. Koncentrace OTA byla vypočtena na základě matricové kalibrační křivky. Po získání prvních výsledků musely být některé vzorky, z důvodu silné odezvy, naředěny a znovu přeměřeny. Dvakrát byly ředěny vzorky s číslem 1, 6, 10, 15, 16, 19, 23, 25, 28, 32, 33, 35, 45, 46, 47 a čtyřikrát 5, 7, 18, 26 a 40.



Obrázek 19 - Chromatogram vzorku 49 - Tokajský výběr 5-Put (2000)



Obrázek 20 - Chromatogram vzorku 59 - Samorodé suché (2009)



Obrázek 21 - Chromatogram vzorku 5 - Archívné víno 5-Put (1989)

Seznam a nalezené kontaminace ochratoxinu A v archívních Tokajských vínech je uvedený v níže přiložené tabulce 13.

Tabulka 13 - Koncentrace OTA ve vzorcích Tokajského vína (podle ročníku)

Číslo vzorku		Ročník	Výrobce	Koncentrace OTA (ppb)
14	Šupkáč-90 dní Furmint	2017	Šupkáč	1,207
21	Furmint-Šupkáč 30 dní	2017	Šupkáč	0,682
13	Tokaj 4-Put	2016	Ostrožovič	0,320
48	Samorodné suché	2016	Ostrožovič	7,879
37	Muškáť žltý	2015	Ostrožovič	0,000
56	Lipovina	2015	Ostrožovič	1,593
58	Furmint	2014	Ostrožovič	1,511
43	Furmint, Cibébový výběr	2013	Ostrožovič	1,751
29	Muškáť žltý, Cibébový výběr	2012	Ostrožovič	1,007
44	Furmint, Cibébový výběr	2012	Ostrožovič	1,418
53	Tok. Forditáš	2011	Tokaj&Co	7,878
36	Muškáť žltý, Slámové víno	2010	Ostrožovič	0,196
50	4-P výběr	2009	Tokaj&Co	6,722
52	3-P výběr	2009	Tokaj&Co	1,426
54	Tok. Esencia	2009	Tokaj&Co	6,956
59	Samorodné suché	2009	Tokaj&Co	1,291
51	6-P výběr	2006	Tokaj&Co	16,503
55	Samorodné sladké	2006	Tokaj&Co	2,556
4	Archívné víno 5-Put	2004	Ostrožovič	21,235
9	Archívné víno 4-Put	2004	Ostrožovič	9,946
2	Archívné víno 3-Put	2003	Ostrožovič	2,635
22	Tokajský výběr, 6-Put	2003	Ostrožovič	21,513
24	Archívné víno 5-Put	2003	Ostrožovič	4,471
57	5-P výběr	2003	Tokaj&Co	7,760
6	Archívné víno 6-Put	2002	Ostrožovič	41,820
10	Archívné víno 4-Put	2002	Ostrožovič	29,078

31	Archívné víno Esencia	2000	Ostrožovič	15,810
41	Tokajský výběr 4-Put;L1	2000	Zlatý Strapec	11,087
42	Tokajský výběr 3-Put	2000	Zlatý Strapec	7,995
49	Tokajský výběr 5-Put	2000	Zlatý Strapec	20,326
12	Archívné víno 4-Put	1999	Ostrožovič	16,412
17	Archívné víno 3-Put	1999	Ostrožovič	5,637
32	Archívné víno Esencia	1999	Tokaj&Co	41,443
38	Archívné víno 6-Put	1999	Ostrožovič	7,483
15	Archívné víno 6-Put	1997	Zlatý Strapec	42,775
30	Archívné víno samorodé sladké	1997	Tokaj&Co	9,016
34	Samorodné suché	1997	Zlatý Strapec	0,868
11	Archívné víno 3-Put	1995	Ostrožovič	17,941
18	Archívné víno 4-Put	1995	Tokaj&Co	114,087
27	Tokajský výběr, 3-Put	1995	Zlatý Strapec	18,033
8	Archívné víno 6-Put	1993	Zlatý Strapec	15,036
16	Archívné víno 5-Put	1993	Zlatý Strapec	30,307
19	Archívné víno 6-Put	1993	Ostrožovič	28,666
20	Tokajský výběr, 4-Put	1993	Zlatý Strapec	6,204
25	Archívné víno 6-Put	1993	Tokaj&Co	45,194
33	Archívné víno 5-Put	1993	Ostrožovič	0,750
39	Archívné víno 2-Put	1990	Tokaj&Co	19,618
45	Archívné víno 5-Put	1990	Tokaj&Co	124,562
46	Archívné víno 3-Put	1990	Tokaj&Co	76,666
5	Archívné víno 5-Put	1989	Ostrožovič	230,039
26	Archívné víno 6-Put	1989	Ostrožovič	190,535
40	Archívné víno 6-Put	1989	Tokaj&Co	127,005
47	Archívné víno 2-Put	1989	Tokaj&Co	70,499
23	Archívné víno 3-Put	1988	Zlatý Strapec	54,245
1	Archívné víno 5-Put	1983	Zlatý Strapec	40,099
7	Tok. Archívné víno 6-Put	1983	neuveden	115,008
3	Tok. Archívné víno 6-Put	1972	Zlatý Strapec	24,728
35	Tok. Archívné víno 5-Put	1972	Zlatý Strapec	47,294
28	Tok. Archívné víno 5-Put	1959	Zlatý Strapec	30,669

Z výsledků je patrné, že 45 vzorků z 59 měřených přesáhlo hranici 2ppb určenou Evropskou komisí jako limitní koncentraci Ochratoxinu A pro vína. Z toho 14 přesáhlo hranici 20ppb (tmavě šedá) a dalších 9 dokonce 50ppb (červená). Pouze v jednom případě Ochratoxin A nebyl detekován.

DISKUSE A ZÁVĚR

První část experimentální části diplomové práce se zabývá optimalizací metody, ze které byla navržena nejvhodnější gradientová eluce pro separaci, analytická kolona a mobilní fáze při extrakci a promývání během extrakčního kroku.

Vytvořená metoda byla celkově nastavena na 6 minut po redukci procesu extrakce z 2 minut na 1 minutu. Mobilní fáze v poměru 55:45 ve prospěch vodného roztoku začala analytickou část separace v čase 1,01 minuty po přepnutí ventilu. Nejvyšší koncentrace organické fáze protékala kolonou v 5. minutě a o 30 vteřin později se kolona ekvilibrovala opět na původních 45% organické fáze. Pík OTA na chromatogramu vykazoval retenční čas 4,1 min.

Tabulka 14 - Organizace gradientu mobilních fází

Čas	Procentuální zastoupení MF B v elučním roztoku
1 min	Přepnutí ventilu
1,01 min	55%
5 min	20%
5,5 min	55%
6,01 min	Konec měření

Všechny testované kolony měly stejné rozměry a jejich stacionární fáze byly na bázi silikagelových částic. Nejlepší výsledek však poskytovala kolona Triart C18 ExRS 100mmx 4.6mm, 3 μ m, 80Å (YMC) s nejvyšší odezvou a minimem rušivých balastních píků.

Jako poslední modifikovaný parametr byla upravována mobilní fáze, která byla používána při extrakci analytu z matrice. Acetonitril ani metanol v nízkých koncentracích do 10-15% nebyly vůbec vhodné jako promývací fáze, protože v extrakční koloně kromě OTA bylo zachyceno i velké množství interferující matrice. 20% acetonitril a 40% metanol poskytl požadované výsledky při odstranění interferencí. Pro zavedení do praxe byl nakonec vybrán metanol. Přestože s 20% acetonitrem detektor dával lepší odezvu, při testování na reálných vzorcích se v blízkosti OTA objevoval balastní pík, který znemožňoval správnou kvantifikaci a v případě nízkých koncentrací OTA by zvyšoval mez detekce.

Optimalizovaná metoda byla v další části validována. Metoda poskytla vhodné výsledky v oblasti linearity s korelačním koeficientem pro standard 0,9967 a matici 0,9973. V rámci opakovatelnosti se relativní směrodatná odchylka pohybovala pod 5%, stejně jako přesnost, která pro koncentraci 5ppb nepřesáhla 1%. Výťažnost pro koncentrace 0,2 a 5ppb dosahovala uspokojivých 102%, při koncentraci 50ppb však výťažnost dosahovala jen 91%. Z toho důvodu byly reálné vzorky Tokajských vín, které vykazovaly v prvním měření koncentrace vyšší než 20ppb, ředěny. Limit kvantifikace byl stanoven na 0,1ppb a limit detekce na 0,03ppb.

Pro potřeby této diplomové práce bylo získáno celkem 59 vzorků Tokajského vína. Jednalo se především o archivní vína. Z celkového počtu pouze 13 vzorků obsahovalo méně ochratoxinu než je dáno legislativou. Všechny vína, která přesáhla hranici 50ppb, byly archivní putnové vína, přičemž se vysoké hodnoty nevztahovaly pouze na jednoho výrobce.

V tabulce 13 je ale patrná návaznost výsledné koncentrace na stáří vzorku. Průměrná koncentrace OTA ve vzorcích z let 2017-2000 je 8,5ppb, naproti tomu starší ročníky z období 1999-1959 vykazují průměrnou koncentraci 53,5ppb. Jako vysvětlení je možné pokládat vyšší pozornost výrobců těchto vín vůči rozdílu mezi ušlechtilou, šedou plísní a jinými houbovými nákazami *vitis vinifera* s rostoucím povědomím o možných kontaminacích a se zpřísněním legislativy po roce 2006. Nabízí se také otázka, zda koncentrace OTA může být ovlivněna zráním vína. Zajímavým fenoménem je také vyšší koncentrace sledovaného analytu u putnových vín.

Nejvyšší koncentrace OTA byla zaznamenána u archivního 5-putnového vína z roku 1989 firmy Ostrožovič. Koncentrace dosahovala 230ppb, tedy 115-krát překročila limit. Pokud tuto hodnotu převedeme na maximální týdenní příjem (120ng/kg/týden), tak pro 70 kg člověka je Evropskou komisí povolené množství tohoto vína 36,5 ml. Světová zdravotnická organizace týdenní limit ještě snížila na 112ng/kg/týden [30], to znamená, že na týden je doporučeno zkonsumovat nanejvýš 34 ml.

Nicméně je potřeba zmínit že takto vysoké výsledky kontaminace ochratoxinem A je nutné potvrdit komparativní metodou založenou na jiném způsobu extrakce či detekce. Jako metoda první volby se nabízí technika LC-MS. Nejvíce kontaminované vzorky byly mimo rámec této diplomové práce změřeny pomocí LC-MS. Vysoká

kontaminace ochratoxinem A však zatím nebyla potvrzena. V některých případech se tedy může jednat o falešně pozitivní hodnotu, která je způsobena neznámou interferencí nacházející se pouze u určitých typů tokajských vín. Nabízí se také otázka, zda se nejedná o falešně pozitivní výsledek získaný jinou interferencí např. z látek uvolněných při dlouhodobém zrání v sudech. V několika použitých maticích při validaci metody (Tokaj Furmint, Tokaj Hárslevelű) však nebyla tato interference nalezena. Proto byla metoda za těchto podmínek validována. Nicméně, vývoj selektivní metody pro takto široké spektrum vzorků tokajských vín s různým obsahem dalších maticových látek je tedy značně problematický a vyvinutou metodu bude nutné dále optimalizovat z hlediska identifikace a odstranění interference, tak aby bylo možné považovat výsledky za jednoznačně spolehlivé.

Závěrem je důležité upozornit na fakt, že s archivním Tokajským vínem, především kvůli vysoké ceně, nesetkáme často a je spíš součástí výjimečných příležitostí. Více pozornosti široké veřejnosti si v tomto ohledu zaslouží kontrola kontaminace potravin, které konzumujeme denně – obiloviny, ořišky, sušené ovoce a zejména také rozinky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Zeměpisné označení: Tokaji [online]. *Evropská komise-Zemědělství a rozvoj venkova-Zemědělské trhy-Víno-E-Bacchus*. Dostupné na : <http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/e-bacchus/index.cfm?event=detailPEccgi&language=CS&eccgiId=7345> (3. 4. 2019)
- [2] Zeměpisné označení: Tokaj [online]. *Evropská komise-Zemědělství a rozvoj venkova-Zemědělské trhy-Víno-E-Bacchus*. Dostupné na : <http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/e-bacchus/index.cfm?event=detailPEccgi&language=CS&eccgiId=7346> (3. 4. 2019)
- [3] Zeměpisné označení: Vinohradnícka oblast Tokaj [online]. *Evropská komise-Zemědělství a rozvoj venkova-Zemědělské trhy-Víno-E-Bacchus*. Dostupné na: <http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/e-bacchus/index.cfm?event=pdfEccgi&language=CS&eccgiId=8348> (3. 4. 2019)
- [4] SZAKÁL, Z. Tokaj Wine Region as a World Heritage Site Complex Development Opportunities. *Marketing – from Information to Decision Journal*. 2018, 1(1), 41-48.
- [5] UNESCO, Tokaj Wine Region Historic Cultural Landscape. [online]. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://whc.unesco.org/en/list/1063>
- [6] JACKSON, R. Wine Science. 3rd. Canada: Elsevier, 2008.
- [7] MAGYAR, I. Botrytized Wines. *Advances in Food and Nutrition Research: Speciality Wines*. Elsevier, 2011, (63), 147-206.
- [8] THAKUR, N.S. Botrytized Wines: A Review. *International Journal of Food and Fermentation Technology*. 2018, 8(1), 1-13.
- [9] FARKAŠ, J. Technology and biochemistry of wine. 1. New York: Gordon and Breach Science Publishers, c1988.
- [10] PATOČKA, J. Bioaktivní látky hub rodu *Coprinus* (hnojník). *Toxicology* [online]. 2016 [cit. 2019-03-01]. Dostupné z: <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=918>
- [11] LAMBERT-GÓCS, M. Tokaji wine: fame, fate, tradition : A-Z through the history of Tokaji wine. South San Francisco, CA: Distributed by the Wine Appreciation Guild, c2010.
- [12] TAO, Y, et al. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, 112, 320-331.

- [13] MALIR, F. et al. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*. 2016, 8(7), 1-49.
- [14] GIL-SERNA, J. et al. Wine Contamination with Ochratoxins: A Review. *Beverages*. 2018, 4(1), 1-21.
- [15] IARC, Ochratoxin A: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1993, (56), 489-521.
- [16] Cameo chemicals, Ochratoxin A. [online]. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/20805>
- [17] WARTH, B. et al. LC-MS/MS-based multibiomarker approaches for the assessment of human exposure to mycotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 5687–5695.
- [18] ABBAS S. et al.. Induce Cancer by Ochratoxin A. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018, 12(4), 1825-1828.
- [19] CREPPY, E. et al. Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin A in mice. *Toxicology Letters*. Elsevier, 1980, (6), 77-80.
- [20] Informační centrum pro bezpečnost potravin. Toxicita ochratoxinu A nově posuzována. [online]. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/toxicita-ochratoxinu-a-nove-posuzovana.aspx>
- [21] TURNER, N.W. et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chem. Acta* 2009, 632, 168–180.
- [22] ZHANG, B. et al. Simultaneous Analysis of 20 Mycotoxins in Grapes and Wines from Hexi Corridor Region (China): Based on a QuEChERS–UHPLC–MS/MS Method. *Molecules* 2018, 23(8), 1-17.
- [23] DE JESUS, Ch. High Incidence and Levels of Ochratoxin A in Wines Sourced from the United States. *Toxins*. 2018, 10(1), 1-12.
- [24] ARROYO-MANZANARES, N. Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction. *Food chemistry*. 2012, 135(2), 368-372.
- [25] BELAJOVÁ, E. et al. Determination of ochratoxin A and occurrence in wines of Slovakian retail. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2007, 46(2), 68-74.
- [26] LASRAM, S. et al. Occurrence of ochratoxin A in domestic beers and wines from Tunisia by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants*. 2013, 6(1), 1-5

- [27] LHOTSKÁ, I. A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408(12), 3319-3329.
- [28] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Europrint. Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [29] HPLC High Performance Liquid Chromatography [online]. Michal Douša, c1999-2016 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- [30] WHO. Ochratoxin A. [online]. 2018 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=1905>