

## ПРИСУСТВО НА ОХРАТОКСИН А ВО МАКЕДОНСКИТЕ ВИНА ОД ТИКВЕШКИОТ РЕГИОН

Стојановска–Димзоска Билјана<sup>1</sup>, Димитриеска–Стојковиќ Елизабета<sup>1</sup>,  
Хајрулаи–Муслиу Зехра<sup>1</sup>, Секуловски Павле<sup>1</sup>, Јанкуловски Деан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт за храна, Факултет за ветеринарна медицина- Скопје  
e-mail: bsdimzoska@yahoo.com

### АБСТРАКТ

Аналитички метод кој се базира на квантитативно определување со течна хроматографија со флуоресцентен детектор, на кого му претходи процес на прочистување користејќи имуноафинитетни колони, е искористен за мониторинг на македонското вино кое потекнува од најпознатото, Тиквешко виногорје. Извршена е валидација на аналитичкиот метод и утврдена е линеарност во концентрациско подрачје од 0,1 до 60 ng/ml со задоволителен коефициент на корелација од 0,9976. Лимитот на детекција и квантификација изнесуваат 0,043 ng/ml и 0,141 ng/ml, соодветно. Точноста на методот беше определена преку методот на стандарден додаток користејќи две концентрации, 0,1 ng/ml и 1,0 ng/ml. Добиени се вредности за аналитичкиот принос од 100,66% и 106,83% за црвено вино (за двете предложени концентрации). Вредностите за аналитичкиот принос за бело вино, (98,50% и 93,31% за истите концентрации), се исто така задоволителни и ја потврдуваат точноста на методот. Вредноста за RSD, и за бели и за црвени вина, за двете предложени концентрации, беше задоволителна и се движи во граници од 7,13% до 10,41% за црвено, односно од 3,96% до 8,77% за бело вино. Мониторинг беше направен на 31 примерок на флаширано вино. Од нив, само 16 примероци (51,61%) беа со концентрација на ОТА над лимитот на детекција, но со вредност многу помала за да истите претставуваат ризик за консументите на вино.

**Клучни зборови:** охратоксин А, вино, Тиквешко виногорје, имуноафинитетни колони, LC-FD

### ВОВЕД

Охратоксин А (ОТА) е микотоксин кој воглавно го продуцираат некои видови од родот *Aspergillus* и *Penicillium* (1). Тој е нефротоксичен (бубрезите се главниот таргет орган), но исто така пројавува и имунотоксично, тератогено, генотоксично, мутагено и канцерогено дејство при високи дози (2); затоа претставува сериозен ризик по хуманото здравје. ОТА е поврзан и со етиологијата на ендемичната фатална болест карактеристична за јужна и југоисточна Европа, позната како балканска ендемска

нефропатија поврзана со тумори на горниот уринарен тракт (3). Затоа Интернационалната Агенција за истражување на Ракот (International Agency for Research on Cancer, IARC) го вклучува ОТА во групата на можни канцерогени супстанции кај луѓето (група 2Б).

Главен извор на ОТА се житариците, но исто така тој може да се најде и во други намирници (вино, пиво, гроздов сок, кафе, какао и негови производи, како и во свинското месо) (4). Иако нивото на ОТА во секоја од горе споменатите намирници е најчесто ниско, сепак внесот на различни контаминирани видови на

храна и пијалоци, можат да обезбедат вкупно количество на ОТА од близу 100 ng/kg телесна тежина, кое претставува провизорен толерантен неделен внес (provisional tolerable weekly intake, PTWI) одреден од Светската Здравствена Организација (5). Максимално дозволената концентрација (maximum residual level, MRL) за ОТА е регулирана со Европската Директива EC No.123/2005) (6) и истата се движи во граници од 0,5 до 10 µg/kg за различни намирници. Нашата земја ги има прифатено европските регулативи од декември 2005 година (7).

За контаминацијата на виното со охратоксин А е зборувано многу (8) имајќи го во предвид фактот дека истото е на второто место, веднаш по житариците и учествува со 13% како извор на ОТА (9). Виното е производ кој е многу значаен за европската економија и популација и истото бара, секоја ЕУ земја извозник на вино, да обезбеди континуиран и систематски мониторинг за да се осигура дека нејзиното вино е безбедно, без присуство на охратоксин А во него.

Постојат различни аналитички постапки за определување на ОТА во вино (10). Течната хроматографија со флуоресцентна детекција (LC-FD) е најкористена техника (11). Една од најсигурните, високо осетливи и точни методи е методот предложен од Visconti et al. (12), кој препорачува употреба на имуноафинитетни колони (IAC) за постапката за прочистување на примероците, по кое следи квантификација со LC-FD. Употребата на имуноафинитетни колони за прочистување во постапката за определување на ОТА претставува врв во аналитиката, со многу предности во однос на другите користени колони за прочистување: селективност, прецизност, точност и ефикасност за добивање на елуат кој ќе биде ослободен од интерферирачките, флуоресцентни материји кој би влијаеле на крајниот резултат (13).

Целта на овој труд беше да се направи мониторинг на македонското вино од најпознатиот вински регион во Македонија, Тиквешкото виногорје, применувајќи имуноафинитетни колони во постапката на прочистување и LC-FD квантификација. Колку што ни беше познато, систематски мониторинг на македон-

ското вино во однос на присуството на ОТА во него не е направен, со исклучок на “screening”-от за присуство на ОТА со примена на флуорометриски метод (14). Имајќи ги во предвид напорите на производителите за извоз на македонското вино на европскиот пазар, сметаме дека овој труд на некој начин може да ја помогне и олесни оваа економска активност.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

#### Хемикалии материјали

Растворувачите со HPLC чистота (метанол, ацетонитрил, вода), р.а. хемикалиите (бензен, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>) и 100% глацијална оцетна киселина (suprapur) беа набавени од Merck (Darmstadt, Germany). PEG 8000 беше набавен од Biochemica, Fluka.

Имуноафинитетните OchraTest® колони (Viam, USA) беа користени за постапката на прочистување на примероците. Стандардот ОТА беше набавен од Supelco (50 µg/ml, растворен во бензен: оцетна киселина (99:1)). Работниот стандарден раствор (2 µg/ml), е подготвен од стандардот ОТА со растворање на аликвотот со миксот на растворувачи и е чуван на температура од +2–8°C. 1,5 ml од работниот стандарден раствор се префрла во силанизиран вијал и се упарува под струја од азот. Сувиот остаток се раствора во 1,5 ml LC мобилна фаза (филтрирана низ 0,20 µm филтер) и квантитативно се префрла во волуметриски сад од 25,0 ml. Се дополнува до марката со филтрирана мобилна фаза. Крајната концентрација на ОТА изнесува 100 ng/ml. Од овој раствор, според официјалниот AOAC метод (15), се подготвуваат 6 работни стандарди со концентрација од 0,6 до 60 ng/ml. Но имајќи ги во предвид нашите претходни, прелиминарни “screening” истражувања (14) според кои не се очекува толку висока концентрација на ОТА во македонското вино, решивме да го прошириме калибрационо подрачје до концентрација од 0,1 ng/ml така да користевме вкупно девет калибрациони раствори.

## Инструменти

Беше користен Perkin Elmer (PE) HPLC систем опремен со бинарна пумпа (PE LC-250), мануелен инјектор (тип PE Rheodyne 7125) и флуоресцентен детектор (PE LC-240). Хроматографското разделување беше направено на собна температура на Supelcosil колона (150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), врзана за заштитна (Supelcguard™ LC-18, 2 cm cartridge) колона. Мобилната фаза беше смеса на ацетонитрил:вода:оцетна киселина (99:99:2, V/V/V), претходно дегазирана во ултразвучно купатило. Протоколот беше поставен на 1,0 ml/min, а волуменот на инјектирање беше 100  $\mu$ l. Брановите должини на апсорпција и емисија беа 333 и 460 nm, соодветно.

## Примероци на вино

Вкупно 31 (14 бели и 17 црвени) флаширано вино, произведено во Тиквешкиот регион, беше набавено или од локалните продавници или директно од винариите (5 различни винарии). Примероците на вино беа чувани во нивната оригинална амбалажа во фрижидер на температура од 2–8°C, се до анализата. Сите примероци беа работени во дупликати. За анализата на аналитички принос беа користени примероци на бело и црвено вино кои во претходните анализи (со HPLC-FD метод) не покажаа присуство на ОТА. Се користеа две концентрации, 0,1 и 1,0 ng/ml.

## Подготовка на примероците

Пред почетокот на анализата, сите примероци на вино беа дегазирани во ултразвучно купатило 20 min. Аликвот од 10 ml вино се раствора со раствор за растворање кој содржи 5% NaHCO<sub>3</sub> и 1% PEG 8000 и силно се меша. Вредноста на pH се дотерува до 8,5 со 1M NaOH. Растворот се филтрира низ микрофибер филтерна хартија. 10 ml од филтратот (еквивалентно на 5 ml вино) се пропушта низ имуноафинитетната колона со брзина на проток од околу 1 капка/sec. Препорака на производителот е да не се дозволи комплетно исушување на имуноафинитетната колона. Постапката на миење на колоната е со 5 ml раствор кој содржи 2,5% NaCl и 0,5% NaHCO<sub>3</sub>, а потоа колоната се плакне и со 5 ml вода. Миењето се изведува со брзина на проток од

околу 1–2 капки/sec. Потоа колоната се суши со пропуштање на воздух низ неа. ОТА се елуира со 2 ml метанол. Метанолниот раствор се суши под струја на азот на температур од 50°C. Сувиот остаток се раствора во 250  $\mu$ l филтрирана мобилна фаза и се чува во фрижидер сè до HPLC-FD анализата.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### Валидација на HPLC-FD методот

Калибрационата крива за квантификација на ОТА, конструирана од девет калибрациони раствори во концентрациско подрачје од 0,1 до 60 ng/ml беше линеарна со коефициент на корелација од 0,9976 ( $y = 98184x + 19209$ ).

Лимитот на детекција (LOD) изнесува 0,043 ng/ml, пресметан како 3,3xSD/нагиб на крива (пресметано спрема ICH-регулативите за валидација на аналитички методи:Q2) (16) Нагибот на кривата се пресметува од калибрационата крива во пониското концентрациско подрачје, а SD е стандардна девијација на измерени десет слепи проби. Лимитот на квантификација (LOQ) изнесува 0,131 ng/ml, пресметан како 10xSD/нагиб на крива, на ист начин како и лимитот на детекција.

Точноста и прецизноста на методот беа определени преку определување на аналитичкиот принос и повторливоста (изразена како RSD вредност), соодветно. За таа цел беа користени примероци на бело и црвено вино кои во претходните анализи не покажале присуство на ОТА (со HPLC-FD метод). Анализите беа вршени со двете предвидени концентрации од 0,1 и 1,0 ng/ml. Валидационите параметри се дадени во Табела 1.

Вредностите за аналитичкиот принос кај црвеното вино изнесуваат 100,66% и 106,83% за двете предложени концентрации и истите се малку повисоки во однос на вредностите за аналитичкиот принос кај белото вино (98,50% и 93,31%). Прецизноста, изразена преку RSD вредноста е задоволителна и се движи во граници од 7,13% до 10,41% за црвено, односно од 3,96% до 8,77% за бело вино. Добиените вредности се доказ за точноста и прецизноста на аналитичкиот метод.

Прецизноста пак на системот, беше определена и преку анализа на шест серии од де-

**Табела 1. Валидациони параметри**

Параметар	Црвено вино		Бело вино	
	0.1 ng/ml	1.0 ng/ml	0.1 ng/ml	1.0 ng/ml
RSD (%)	10,41	7,13	8,77	3,96
Аналитички принос (%)	100,66	106,83	98,50	93,31
Линеарност	0,9976			
LOD (ng/ml)	0,043			
LOQ (ng/ml)	0,131			

ветте калибрациони раствори. Резултатите се поместени во Табела 2. Може да се забележи дека вредноста за RSD се движи во граници од 1,93 до 11,43%, што укажува на добра и задоволителна повторливост на системот.

видови на грозје; 5 видови на бело (Temjanika, Chardonnay, Sauvignon blanc, Rein Riesling и Traminac) како и 5 видови на црвено грозје (Vranec, Cabernet sauvignon, Merlot, Pinot Noir и Rosé. Највисоката најдена вредност за OTA

**Табела 2. Податоци за прецизноста на HPLC системот**

OTA концентрација (ng/ml) на калибрационите раствори									
	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	6,0	20,0	40,0	60,0
Определена OTA концентрација (ng/ml)									
1	0,09	0,19	0,45	1,05	1,93	5,58	21,24	41,23	57,11
2	0,08	0,19	0,46	1,21	1,99	5,53	20,10	42,10	58,52
3	0,08	0,20	0,48	1,20	1,98	6,30	21,30	42,25	56,71
4	0,10	0,21	0,55	1,15	2,05	6,25	20,07	42,64	60,26
5	0,11	0,19	0,54	1,22	2,19	5,64	21,35	41,14	59,42
6	0,10	0,18	0,45	0,99	1,94	5,57	20,33	40,53	58,32
$\bar{x}$	0,09	0,19	0,49	1,14	2,01	5,81	20,73	41,65	58,39
SD	0,01	0,01	0,05	0,10	0,10	0,36	0,63	0,80	1,34
RSD (%)	11,43	5,34	9,29	8,44	4,79	6,21	3,02	1,93	2,30

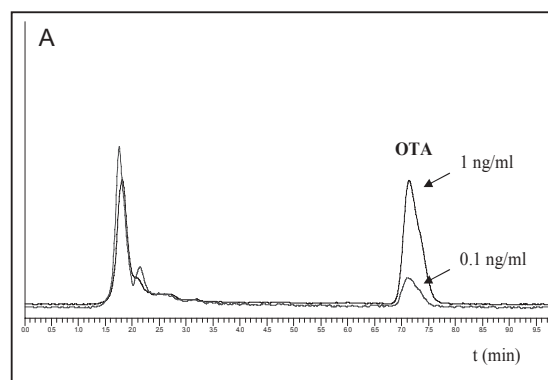
Добиените хроматограми се чисти, со рамна базна линија, мал матрикс ефект, без влијание на OTA пикот, практично без нечистоти, неидентификувани пикови и други интерферирачки, флуоресцентни супстанции (Слика 1). Сето ова е резултат на високата селективност и специфичност на имуноафинитетните колони.

Мониторинг на македонското вино од Тиквешкото виногорје

Општо земено, ниедно од испитаните македонски вина од Тиквешкото виногорје не ја надминува MRL вредноста за OTA (2 µg/ml). Напротив, од вкупно испитан 31 примерок на вино, 15 примероци (48,39%) се со OTA концентрација под лимитот на детекција (Табела 3). 16 примероци (51,61%) се со OTA концентрација над LOD. Беа испитани 10 различни

беше 0,233 ng/ml (Rein Riesling) и 0,302 ng/ml (Вранец) за бело и црвено вино, соодветно. Двете вина се од иста година на берба, 2005.

**Слика 1. HPLC-FD хроматограми на примероци бело вино на кои им е додаден стандарден додаток од 0,1 и 1,0 ng/ml OTA стандард**



**Табела 3. Концентрација на охратоксин А во вината**

Објект (винарија)	Број на примероци на вино		Најдена ОТА концентрација			
	бело	црвено	под LOD		над LOD	
			бело	црвено	бело	црвено
Винарија 1	4	4	4	2	–	2
Винарија 2	3	4	1	–	2	4
Винарија 3	3	5	3	2	–	3
Винарија 4	1	1	1	–	–	1
Винарија 5	3	3	1	1	2	2
Вкупно	14	17	10	5	4	12
	31		15 (48,39%)		16 (51,61%)	

Највисоката најдена ОТА концентрација во нашите истражувања, е многу пониска во споредба со многу автори (17, 18, 19), како и во споредба со средната европска вредност за ОТА кој изнесува 0,357 ng/ml (9).

Ниските вредности за ОТА во македонското вино не претставуваат потенцијален ризик за просечните консументи на вино. Имено, ако македонски консумент, со просечна телесна тежина од 70 kg, пие во просек по 200 ml вино дневно (една чаша) и тоа од виното со највисоко детектирана концентрација на ОТА (0,302 ng/ml), ќе има дневен внес на ОТА во својот организам од 0,86 ng/kg телесна тежина, што е многу помалку од просечната, очекувана, дневна изложеност на ОТА која изнесува 2–3 ng/kg телесна тежина дневно за просечни консументи и 6–8 ng/kg телесна тежина дневно за посебен вид консументи (на пример оние на вино) (18). Овие податоци говорат дека македонското вино од Тиквешкото виногорје, барем што се однесува до присуството на ОТА во него, по ништо не заостанува зад вината присутни на европскиот и светски пазар.

## ЗАКЛУЧОЦИ

Методот кој користи PEG-NaHCO<sub>3</sub> во постапката на екстракција и имуноафинитетни колони во постапката на прочистување на примероците, е брз и сигурен метод, кој обезбедува високи вредности за аналитички принос во предвиденото концентрациско подрачје, со прифатливи вредности за прецизноста како и висок степен на селективност и ефикасност.

Единствена пречка во користење на имуноафинитетните колони би била нивната висока цена и неможност за нивно повторно користење, што резултира со висока цена и на самите анализи.

Определувањето на ОТА е многу важно за процесите на истражувања на ризиците по здравјето на луѓето и затоа секоја земја треба да спроведува мониторинг на своите вина, а посебно ако сака да биде конкурентен извозник на пазарот.

Според добиените резултати, македонското вино е многу побезбедно за пиење од она на другите земји и затоа треба да се вложуваат повеќе напори и средства за развој и унапредување преку создавање на бренд, со цел препознавање на македонското вино на европската и светска трпежа.



## OCCURRENCE OF OCHRATOXIN A IN MACEDONIAN WINES FROM TIKVEŠ REGION

Stojanovska-Dimzoska Biljana<sup>1</sup>, Dimitrieska-Stojkovic Elizabeta<sup>1</sup>, Hajrulai-Musliu Zehra<sup>1</sup>,  
Sekulovski Pavle<sup>1</sup>, Jankuloski Dean<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Food Institute, Faculty of Veterinary Medicine - Skopje  
e-mail: bsdimzoska@yahoo.com

### ABSTRACT

An analytical method based on immunoaffinity column (IAC) clean-up and quantitative determination with liquid chromatography - fluorescence detection (LC-FD) was used to determine the occurrence of ochratoxin A (OTA) in Macedonian wines originated from the most famous, Tikveš, wine producing region. The linearity of the method was checked, and a good coefficient of correlation (0.9976) was found, over wide concentration range of 0.1 to 60 ng/ml. The limit of detection and quantification were 0.043 ng/ml and 0.131 ng/ml, respectively. The accuracy of the method was determined with spiked OTA free samples at the concentration levels of 0.1 ng/ml and 1.0 ng/ml. The recoveries for red wine were found to be 100.66% and 106.83 %, for the proposed spiking levels. The recoveries for white wine were satisfactory (98.50% and 93.31%) too, in the same spiking levels. RSD values for both, red and white wine samples, for the proposed concentration level was satisfactory, in the rang of 7.13% to 10.41% for red wine and 3.96% to 8.77% for white wine samples. A survey was done on 31 bottled wine samples. Among them, 16 samples (51.61%) were with OTA concentration over the LOD. However, the determined concentrations were too low to present a risk for wine consumers.

**Keywords:** ochratoxin A, wine, Tikveš wine producing region, immunoaffinity columns, LC-FD

### ЛИТЕРАТУРА

1. Creppy E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127, p.19-28.
2. FAO FOOD AND NUTRITION PAPER. 1990. Manuals of food quality control. Training in mycotoxins analysis. No.14/10. Rome.
3. Peraica M, Domijan A-M. 2001. Mycotoxins in food and human health. *Arh Hig Toksikol* 52, p. 23-55.
4. Domijan, A., and Peraica, M. 2005. Ochratoxin A in wine. *Arh. Hig. rada Toksikol.* 56, p.17-20.
5. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization), 1996. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 35. WHO, Geneva Switzerland.
6. Official Journal of European Union L25/3. 2005. Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A.
7. Службен весник на Република Македонија (118/2005); Правилник за безбедност на храната
8. Pacin A., Rasnik, S., Vega, M., Saelzer, R., Ciancio Bovier. E., Rios, G., and Martinez, N. 2005. Occurrence of ochratoxin A in wines in the Argentinian and Chilean markets. *ARKIVOC* (XII) 214-223.
9. Reports on tasks for scientific cooperation – Report No 17523 of experts participating in Task 3.2.7- Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member

- States, Directorate-General Health and Consumer Protection, January 2002.
10. N.Ratola, P.Barros, T. Simões, A.Cerdeira, A.Venâncio, A.Aves. 2006. Worldwide inter-laboratory study on the determination of ochratoxin A in different wine type samples. *Talanta* 70, p. 720-731.
11. Siquez, J.M., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J.V. Mateo, R., and Jimenez, M. 2004. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1029, p. 125-133.
12. Visconti A., Pascale M., Centonze G. 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 864, p. 89-101
13. Prado, G., Oliveira, M.S., Carvalho, E.P., Oliveira Lima, L.C., Veloso, T., Souza, L.A.F. and Cardoso, A.C.F. 2003. Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 23 (Supl): 58-61.
14. Hajrulai-Musliu Z., Stojanovska-Dimzoska B., Sekulovski P., Dimitrieska-Stojkovic E., Jankuloski D. and Serafimovski I. 2007. Determination of ochratoxin A in wines intended for EU market with fluorometric method. Paper presented at: XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Istanbul, Abstract No.1455.
15. AOAC Official Methods of Analysis 2005. Chapter 49, p.66. AOAC Official Method 2001.01. Ochratoxin A in wine and beer. Immunoaffinity column clean-up/liquid chromatographic analysis (First action 2001, Final action 2005).
16. ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), current step 4 version (complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005)
17. Markaki, P., Delpont-Binet, C., Grosso, F., and Dragacci, S. 2001. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *J Food Prot. Apr*; 64 (4): 533-537
18. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal (2006), 365, 1-56 ([www.efsa.eu.int](http://www.efsa.eu.int)).
19. Jeretin, B. 2007. Ochratoxin A in Slovenian wines. Paper presented at: XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Istanbul, Abstract No.1138.