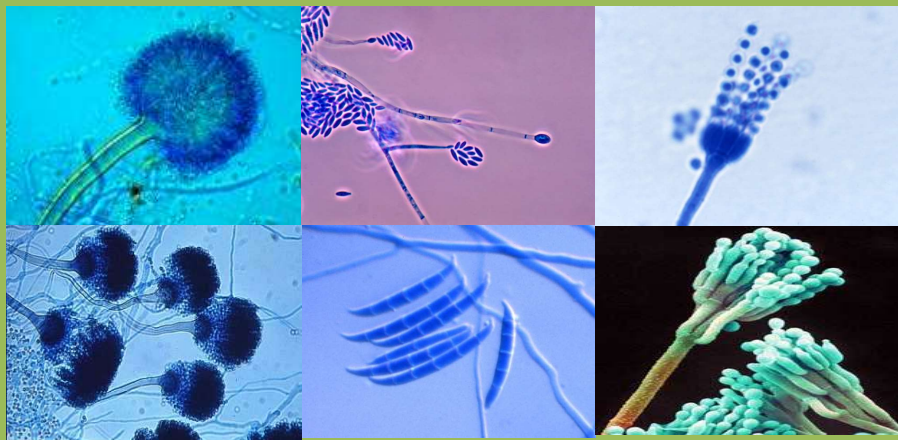


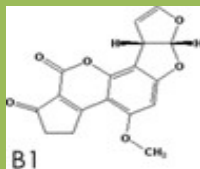
Методологія лабораторного контролю мікотоксинів

Лапоша Олена Адамівна к.б.н., ст. н. спів.
Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК

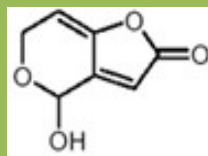
Мікотоксини – це вторинні метаболіти мікроскопічних плісневих грибів таких, як: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* та ін., які являються особливо небезпечними токсичними речовинами, що забруднюють зерно, корми та харчові продукти. В наш час їх описано більше 500 різновидів. Прodукуються мікотоксини біля 350 видами грибків та плісень, які мають до 10 000 штамів.



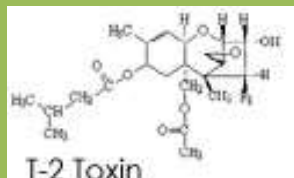
Наявні аналітичні та кількісні методи аналізу дають змогу виявити тільки десяту частину з усіх відомих мікотоксинів. Кращі європейські лабораторії визначають не більше 15 з них. У нашій країні найбільш часто зустрічаються наступні мікотоксини: *афлатоксини, охратоксини, фумонізани, зеараленон, патулін, ДОН і Т-2 токсин.*



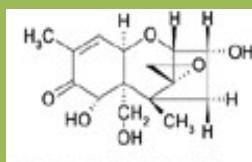
Афлатоксин B₁,
 продуцент –
 Aspergillus (A. Flavus
 або A. Parasiticus).



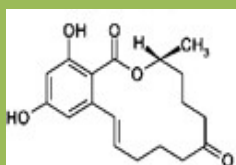
Патулін,
 продуцент –
 Penicillium та
 Aspergillus



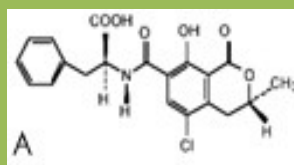
T-2 Токсин, продуцент –
 Fusarium.



Deoxynivalenol
 Деоксиніваленол,
 продуцент – Fusarium.



Зеараленон, продуцент
 – Fusarium, зокрема F.
 graminearum.



Охратоксин А,
 продуцент Aspergillus та
 Penicillium, (A. ochraceus
 або P. Viridicatum).

Україна є досить потужною аграрною державою, яка може постачати зерно на свій ринок та ринки країн Європи. Торгівельно-економічні відносини різних країн призводять до того, що переглядаються максимально допустимі рівні мікотоксинів в сировині та продукції рослинного та тваринного походження.



Максимально допустимі рівні мікотоксинів у харчових продуктах, прийняті в Україні та країнах ЄС

Назва мікотоксину	Максимально допустимий рівень мікотоксинів, мкг/кг	
	Державні гігієнічні правила і норми "Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах" Зареєстровано 18 травня 2013 р. за N 774/23306	РЕГЛАМЕНТ КОМІСІЇ (ЄС) № 1881/2006 від 19 грудня 2006 року
	Хліб	
Афлатоксин В ₁	5	2 (зернові і продукти із зернових)
Зеараленон	50	50
Дезоксиніваленон	500	500
	Мука	
Афлатоксин В ₁	5	не регламентовано
Зеараленон	75	75
Дезоксиніваленон	750	750
Т-2 токсин	не регламентовано	
	М'ясо свіже і морожене, ковбаси, м'ясні консерви	
Афлатоксин В ₁	5	не регламентовано
	Молоко	
Афлатоксин В ₁	0,1	не регламентовано
Афлатоксин М ₁	0,05	0,05
	Яйця	
Афлатоксин В ₁	5	не регламентовано
	Горіхи	
Афлатоксин В ₁	2	2
Сума афлатоксинів В ₁ , В ₂ , G ₁ , G ₂	4	4
	Кава	
Афлатоксин В ₁	5	не регламентовано
Охратоксин А	в зернах 5 розчинна 10	в зернах 5 розчинна 10
	Овочі, фрукти, ягоди	

Велика кількість міжнародних організацій, установ та агентств намагаються досягти універсальної стандартизації нормативних обмежень для мікотоксинів. Це є неймовірно складним завданням, оскільки потрібно враховувати багато чинників при прийнятті нормативних документів. Важливу роль у процесі ухвалення рішення відіграють: оцінка ризиків, аналітична точність, економічні аспекти та комерційні інтереси кожної країни при постачанні на ринок зерна, продуктів харчування чи кормів із нього.

Сучасне законодавство України та Європейського Союзу піднімає рівень вимог щодо якості й безпеки зерна, кормів і кормової сировини. Одне із чільних місць у комплексі контролю санітарної безпеки кормів і діагностики отруєнь тварин займає фізико-хімічний аналіз, у тому числі методи визначення мікотоксинів у кормах.

Практично всі методи з визначення мікотоксинів включають чотири основні етапи: відбір зразка для дослідження; стадія виділення; стадія ідентифікації й кількісного визначення; аналіз отриманих результатів.

Відбір матеріалу для досліджень повинен проводитися у відповідності до загальновизнаних правил, ДСТів та інших нормативних документів. Відбір проб відіграє вирішальну роль в точності визначення рівнів мікотоксинів, які дуже нерівномірно розприділені в зерні, продуктах харчування і кормах. Недбалий чи неточний відбір проб може призвести до отримання невірних результатів і неправильних взаєморозрахунків.



Європейські стандартизовані методи визначення мікотоксинів в різних матрицях (харчові продукти)

1. **EN 14123:2007.** Визначення афлатоксину В1 і суми афлатоксинів В1, В2, G1 та G2 в лісових горіхах, арахісі, фісташках, інжирі, порошку паприки — Метод високоефективної рідинної хроматографії із пост-колоночною дериватизацією та очисткою на імуноафінній колонці.
2. **EN 13585:2009.** Визначення вмісту фумонізинів В1 та В2 у кукурудзі методом ВЕРХ з очищенням твердофазною екстракцією.
3. **EN 14133: 2009.** Визначення охратоксину А у вині та пиві - Метод ВЕРХ із очисткою на імуноафінній колонці.
4. **EN 14352:2004.** Визначення вмісту фумонізинів В1 та В2 в харчових продуктах на основі кукурудзи – метод ВЕРХ з очисткою на імуноафінній колонці.
5. **EN 15891:2010.** Визначення дезоксиніваленолу в продовольчому зерні, продуктах його переробки та продуктах на зерновій основі для харчування грудних дітей і дітей раннього віку.
6. **EN 15890: 2010.** Визначення патуліну в фруктових соках і фруктах на основі пюре для немовлят і дітей молодшого віку - метод ВЕРХ із розділенням рідина / рідина та очистка і витяг із твердої фази та УФ-детектування.

Європейські стандартизовані методи визначення мікотоксинів в різних матрицях (продовольчі продукти)

1. **EN 15851: 2010** Визначення афлатоксину В1 в продуктах харчування на зерновій основі для немовлят та дітей молодшого віку - методом ВЕРХ із очисткою на імуноафінній колонці.
2. **EN 14352: 2004** Визначення фумонізинів В1 і В2 в харчових продуктах на основі кукурудзи- метод ВЕРХ із очисткою на імуноафінній колонці.
3. **EN 14133: 2009** Визначення охратоксину А у вині і пиві - Метод ВЕРХ із очисткою на імуноафінній колонці.
4. **EN 15829: 2010** Визначення охратоксину А в смородині, изюмі, змішаних сухофруктах і висушеному інжирі - Метод ВЕРХ із очисткою на імуноафінній колонці.
5. **EN 15835: 2010** Визначення охратоксину А в продуктах харчування на зерновій основі для немовлят та дітей молодшого віку - методом ВЕРХ із очисткою на імуноафінній колонці.
6. **EN 14132: 2009** Визначення охратоксину А в ячмені та обжареній кафі - методом ВЕРХ із очисткою на імуноафінній колонці.
7. **EN 15850: 2010** Визначення зеараленону у дитячому харчуванні на основі кукурудзи, ячмінна мука, кукурудзяна мука, полента, пшенична мука та продуктах на зерновій основі для немовлят і дітей молодшого віку - Метод ВЕРХ із імуноафінною очисткою.

Європейські стандартизовані методи визначення мікотоксинів в різних матрицях (корм для тварин)

1. **EN 15791: 2009** Визначення дезоксиніваленолу в кормах — методом ВЕРХ із УФ-детектуванням та очисткою на імуноафінній колонці.
2. **EN 15792: 2009** Визначення зеараленону в кормах — методом ВЕРХ із очисткою на імуноафінній колонці.

Українські стандартизовані методи визначення мікотоксинів в різних матрицях (продовольчі продукти)

1. ДСТУ EN 12955-2001 Визначення афлатоксину В1 та суми афлатоксинів В1, В2, G1 та G2 у зернових культурах, фруктах із твердою шкіркою та похідних від них продуктах. Метод високоефективної рідинної хроматографії за допомогою постколоночної дериватизації.
2. ДСТУ EN ISO 15141-1-2001 Визначення охратоксину А в зерні та продуктах із зернових культур. Частина 1. Метод високоефективної рідинної хроматографії з очищенням силікагелем.
3. ДСТУ EN ISO 15141-2-2001 Визначення охратоксину А у зерні та продуктах із зернових культур. Частина 2. Метод високоефективної рідинної хроматографії з очищенням бікарбонатом.
4. ДСТУ EN 13585:2009 Визначення вмісту фумонізинів В1 та В2 у кукурудзі методом ВЕРХ з очищенням твердофазною екстракцією (EN 13585:2001, IDT).
5. ДСТУ 4947:2008 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Методи визначення вмісту мікотоксину патуліну.

Українські стандартизовані методи визначення мікотоксинів в різних матрицях (корм для тварин)

1. ДСТУ ISO 6870:2006 Метод визначення вмісту зеараленону.
2. ДСТУ EN 16006:2015 Визначення фумонізинів В1 та В2 з імуноафінним очищенням і високоефективною рідинною хроматографією з дериватизацією та флуоресцентним виявленням (EN 16006:2011). Дата введення в дію: 01.07.2017
3. ДСТУ EN 16007:2015 Визначення охратоксину А очищенням на імуноафінній колонці та високоефективною рідинною хроматографією з флуоресцентним виявленням (EN 16007:2011). Дата введення в дію: 01.07.2017

Питання виявлення мікотоксинів розглядається вже досить давно, а отже існують і багато методів їх визначення. Одні використовують для скринінгового аналізу (тонкошарова хроматографія-ТШХ, імуоферментний аналіз – ІФА), інші для підтвердження (високоєфективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектуванням - ВЕРХ, рідинна маспектрометрія-LS-MS). Відповідно до цілей використання данні методи мають свої недоліки, переваги та межі визначення, які необхідно враховувати при виборі методу аналізу мікотоксинів.

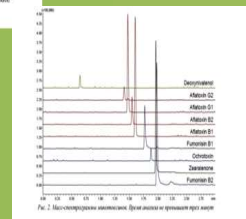
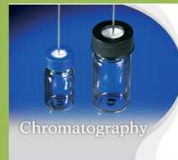
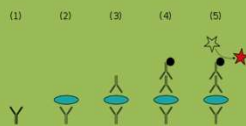
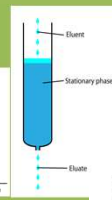
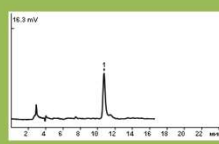
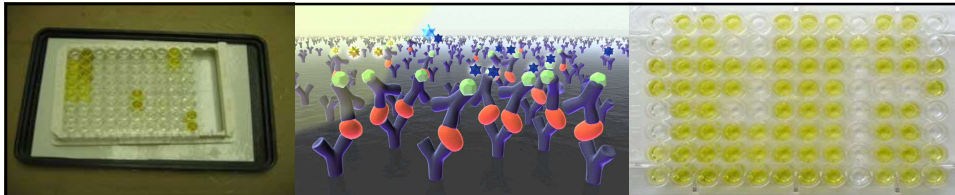


Fig. 2. Mass spectrometry of mycotoxins. (From: [10] in [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100] [101] [102] [103] [104] [105] [106] [107] [108] [109] [110] [111] [112] [113] [114] [115] [116] [117] [118] [119] [120] [121] [122] [123] [124] [125] [126] [127] [128] [129] [130] [131] [132] [133] [134] [135] [136] [137] [138] [139] [140] [141] [142] [143] [144] [145] [146] [147] [148] [149] [150] [151] [152] [153] [154] [155] [156] [157] [158] [159] [160] [161] [162] [163] [164] [165] [166] [167] [168] [169] [170] [171] [172] [173] [174] [175] [176] [177] [178] [179] [180] [181] [182] [183] [184] [185] [186] [187] [188] [189] [190] [191] [192] [193] [194] [195] [196] [197] [198] [199] [200] [201] [202] [203] [204] [205] [206] [207] [208] [209] [210] [211] [212] [213] [214] [215] [216] [217] [218] [219] [220] [221] [222] [223] [224] [225] [226] [227] [228] [229] [230] [231] [232] [233] [234] [235] [236] [237] [238] [239] [240] [241] [242] [243] [244] [245] [246] [247] [248] [249] [250] [251] [252] [253] [254] [255] [256] [257] [258] [259] [260] [261] [262] [263] [264] [265] [266] [267] [268] [269] [270] [271] [272] [273] [274] [275] [276] [277] [278] [279] [280] [281] [282] [283] [284] [285] [286] [287] [288] [289] [290] [291] [292] [293] [294] [295] [296] [297] [298] [299] [300] [301] [302] [303] [304] [305] [306] [307] [308] [309] [310] [311] [312] [313] [314] [315] [316] [317] [318] [319] [320] [321] [322] [323] [324] [325] [326] [327] [328] [329] [330] [331] [332] [333] [334] [335] [336] [337] [338] [339] [340] [341] [342] [343] [344] [345] [346] [347] [348] [349] [350] [351] [352] [353] [354] [355] [356] [357] [358] [359] [360] [361] [362] [363] [364] [365] [366] [367] [368] [369] [370] [371] [372] [373] [374] [375] [376] [377] [378] [379] [380] [381] [382] [383] [384] [385] [386] [387] [388] [389] [390] [391] [392] [393] [394] [395] [396] [397] [398] [399] [400] [401] [402] [403] [404] [405] [406] [407] [408] [409] [410] [411] [412] [413] [414] [415] [416] [417] [418] [419] [420] [421] [422] [423] [424] [425] [426] [427] [428] [429] [430] [431] [432] [433] [434] [435] [436] [437] [438] [439] [440] [441] [442] [443] [444] [445] [446] [447] [448] [449] [450] [451] [452] [453] [454] [455] [456] [457] [458] [459] [460] [461] [462] [463] [464] [465] [466] [467] [468] [469] [470] [471] [472] [473] [474] [475] [476] [477] [478] [479] [480] [481] [482] [483] [484] [485] [486] [487] [488] [489] [490] [491] [492] [493] [494] [495] [496] [497] [498] [499] [500] [501] [502] [503] [504] [505] [506] [507] [508] [509] [510] [511] [512] [513] [514] [515] [516] [517] [518] [519] [520] [521] [522] [523] [524] [525] [526] [527] [528] [529] [530] [531] [532] [533] [534] [535] [536] [537] [538] [539] [540] [541] [542] [543] [544] [545] [546] [547] [548] [549] [550] [551] [552] [553] [554] [555] [556] [557] [558] [559] [560] [561] [562] [563] [564] [565] [566] [567] [568] [569] [570] [571] [572] [573] [574] [575] [576] [577] [578] [579] [580] [581] [582] [583] [584] [585] [586] [587] [588] [589] [590] [591] [592] [593] [594] [595] [596] [597] [598] [599] [600] [601] [602] [603] [604] [605] [606] [607] [608] [609] [610] [611] [612] [613] [614] [615] [616] [617] [618] [619] [620] [621] [622] [623] [624] [625] [626] [627] [628] [629] [630] [631] [632] [633] [634] [635] [636] [637] [638] [639] [640] [641] [642] [643] [644] [645] [646] [647] [648] [649] [650] [651] [652] [653] [654] [655] [656] [657] [658] [659] [660] [661] [662] [663] [664] [665] [666] [667] [668] [669] [670] [671] [672] [673] [674] [675] [676] [677] [678] [679] [680] [681] [682] [683] [684] [685] [686] [687] [688] [689] [690] [691] [692] [693] [694] [695] [696] [697] [698] [699] [700] [701] [702] [703] [704] [705] [706] [707] [708] [709] [710] [711] [712] [713] [714] [715] [716] [717] [718] [719] [720] [721] [722] [723] [724] [725] [726] [727] [728] [729] [730] [731] [732] [733] [734] [735] [736] [737] [738] [739] [740] [741] [742] [743] [744] [745] [746] [747] [748] [749] [750] [751] [752] [753] [754] [755] [756] [757] [758] [759] [760] [761] [762] [763] [764] [765] [766] [767] [768] [769] [770] [771] [772] [773] [774] [775] [776] [777] [778] [779] [780] [781] [782] [783] [784] [785] [786] [787] [788] [789] [790] [791] [792] [793] [794] [795] [796] [797] [798] [799] [800] [801] [802] [803] [804] [805] [806] [807] [808] [809] [810] [811] [812] [813] [814] [815] [816] [817] [818] [819] [820] [821] [822] [823] [824] [825] [826] [827] [828] [829] [830] [831] [832] [833] [834] [835] [836] [837] [838] [839] [840] [841] [842] [843] [844] [845] [846] [847] [848] [849] [850] [851] [852] [853] [854] [855] [856] [857] [858] [859] [860] [861] [862] [863] [864] [865] [866] [867] [868] [869] [870] [871] [872] [873] [874] [875] [876] [877] [878] [879] [880] [881] [882] [883] [884] [885] [886] [887] [888] [889] [890] [891] [892] [893] [894] [895] [896] [897] [898] [899] [900] [901] [902] [903] [904] [905] [906] [907] [908] [909] [910] [911] [912] [913] [914] [915] [916] [917] [918] [919] [920] [921] [922] [923] [924] [925] [926] [927] [928] [929] [930] [931] [932] [933] [934] [935] [936] [937] [938] [939] [940] [941] [942] [943] [944] [945] [946] [947] [948] [949] [950] [951] [952] [953] [954] [955] [956] [957] [958] [959] [960] [961] [962] [963] [964] [965] [966] [967] [968] [969] [970] [971] [972] [973] [974] [975] [976] [977] [978] [979] [980] [981] [982] [983] [984] [985] [986] [987] [988] [989] [990] [991] [992] [993] [994] [995] [996] [997] [998] [999] [1000].



Аналітична ТШХ є скринінговим, якісним методом аналізу речовин. Необхідно пам'ятати, що інтенсивність кольору плям є досить приблизною кількісною характеристикою. Така оцінка можлива при використанні універсальних проявників, тоді детектування проводиться візуально або за допомогою денситометра. Точність аналізу залежить від чистоти реактивів, кваліфікації фахівця, оскільки важливе візуальне сприйняття. Методика ТШХ не достатньо прецизійна, низькопродуктивна та потребує використання великої кількості органічних розчинників. ТШХ витісняють більш точні кількісні методи такі, як: ІФА, ВЕРХ, ГРХ та ВЕРХ-мас-спектрометрія.



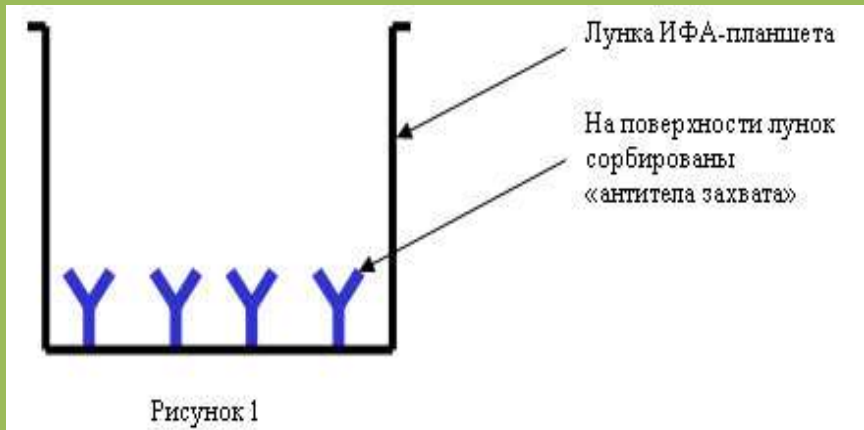
Імуноферментний метод (ІФА) є досить чутливим при досить низьких концентраціях оскільки ґрунтується на взаємодії антигену мікотоксину з антитілом. Оцінка реакції проводиться автоматично на спеціальній апаратурі, що дозволяє стандартизувати ці методи. Це скринінговий метод, що дозволяє за короткий термін провести дослідження великої кількості зразків. Є досить специфічним, високочутливим методом, з високим відсотком відтворюваності, про що свідчать міжлабораторні порівняльні дослідження та збіжність результатів в порівнянні з іншими високоточними методами. Методика виконується у три етапи: екстракція мікотоксинів із зразка водним розчином метанолу; проведення багатоступеневої реакції у мікротитрувальних полістеролових планшетах; вимірювання кольорової реакції на планшетному рідері, довжина хвилі поглинання - 450 нм.

Для проведення ІФА аналізу випускаються тест-набори що містять усі необхідні для ІФА/ELISA аналізу компоненти, включаючи готові стандартні розчини мікотоксинів, розчини специфічних антитіл, кон'югату, субстрату, хромогену та мікротитрувальні полістеролові планшети із сорбованими на них антитілами “захоплення”.

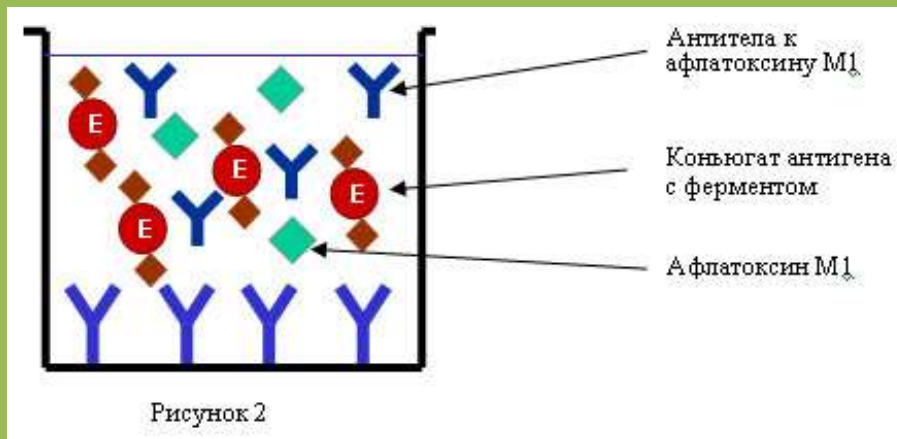


**Полістироловий планшет
на 96 лунок.**

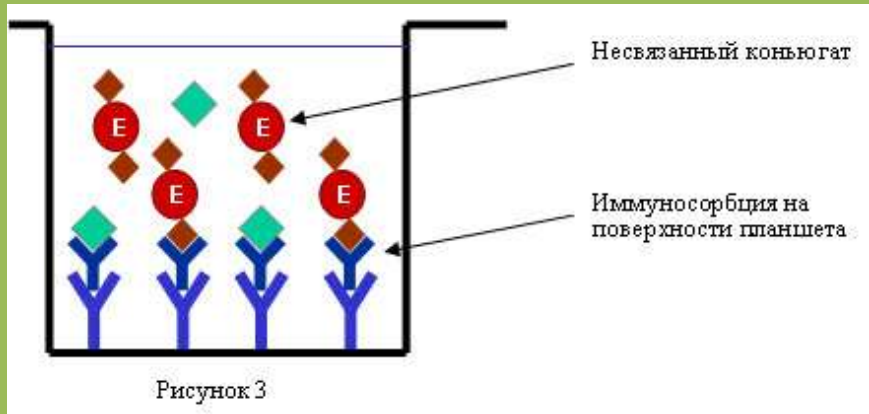
Восьмиканальний дозатор



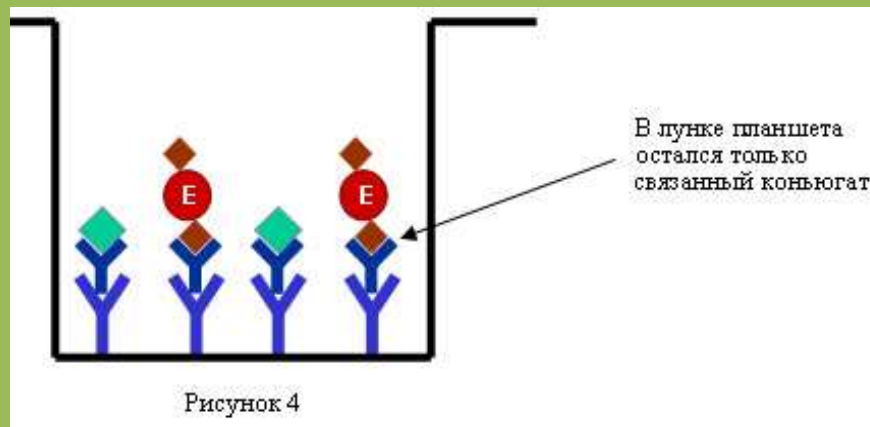
На рисунку 1 схематично показана лунка полістиролового планшета, в якій послідовно виконуються всі стадії імуноферментного аналізу.



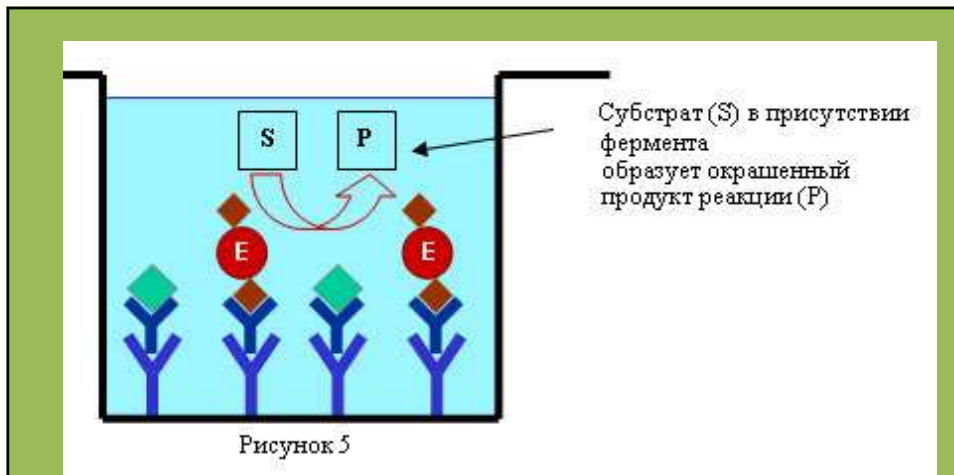
В лунки планшета дозуються стандартні та досліджувані розчини, препарат, що містить антитіла до афлатоксину M₁ та препарат, який містить кон'югат афлатоксину M₁ із ферментом.



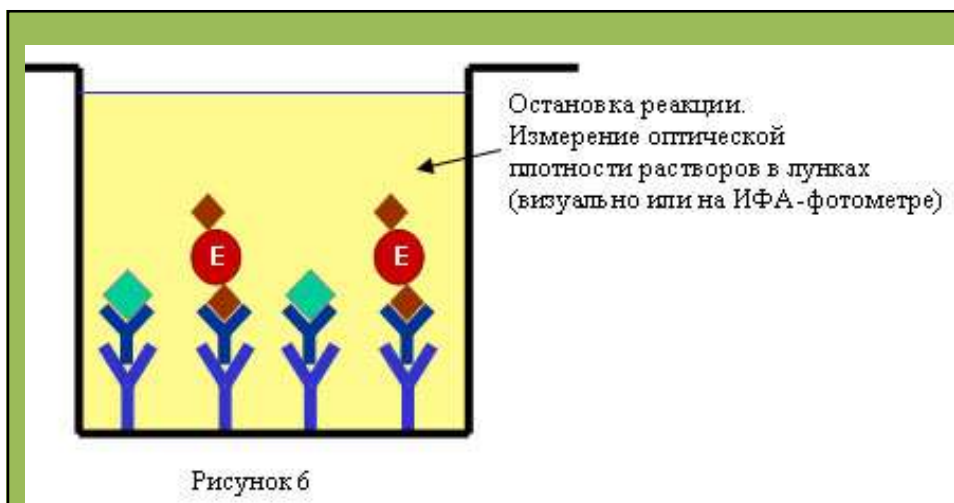
Під час інкубації відбувається імуносорбція антитіл до антигену, який визначається "антитілами захоплення". На поверхні лунок планшета утворюється структура типу "сендвіч".



Після промивання із лунок планшета видаляються вільні молекули кон'югату.



Після промивання планшету в його лунки дозується розчин, що містить субстрат і хромоген. В процесі інкубації, при хімічній взаємодії безбарвного субстрату з хромогеном, в якому ферментний фрагмент молекули кон'югату зв'язаний на поверхні лунки, виступає в якості каталізатора, перетворює субстрат в забарвлений продукт реакції.



Після інкубації, в лунки додається стоп-реагент, при цьому голубий колір розчину міняється на жовтий.

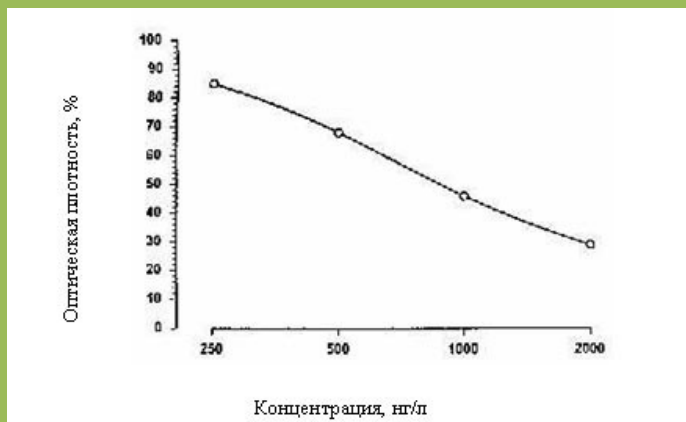


Рисунок 7. Калібрувальна крива мікотоксину.

Інтенсивність забарвлення в лунках ІФА-планшету зворотно пропорційна концентрації мікотоксину, іншими словами - чим насиченіший колір розчинів, тим менша концентрація мікотоксину.

Обробка результатів вимірювань може виконуватися вручну, або за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення.

Час проведення аналізу від 1-єї до 3-ьох годин.

Етапи пробопідготовки для визначення мікотоксинів методом ВЕРХ



Пробопідготовка за допомогою імуноафінних колонок



Сучасні можливості дозволяють використовувати імуноафінну хроматографію для очистки зразків, що ґрунтується на утворенні комплексу антиген-антитіло та концентрувати аналіт. Це підвищує відсоток вилучення аналіту з проби, що дозволяє більш точно детектувати мікотоксини на приладі.

Схематичне зображення імуноафінної колонки та стадії очистки і концентрування аналіту

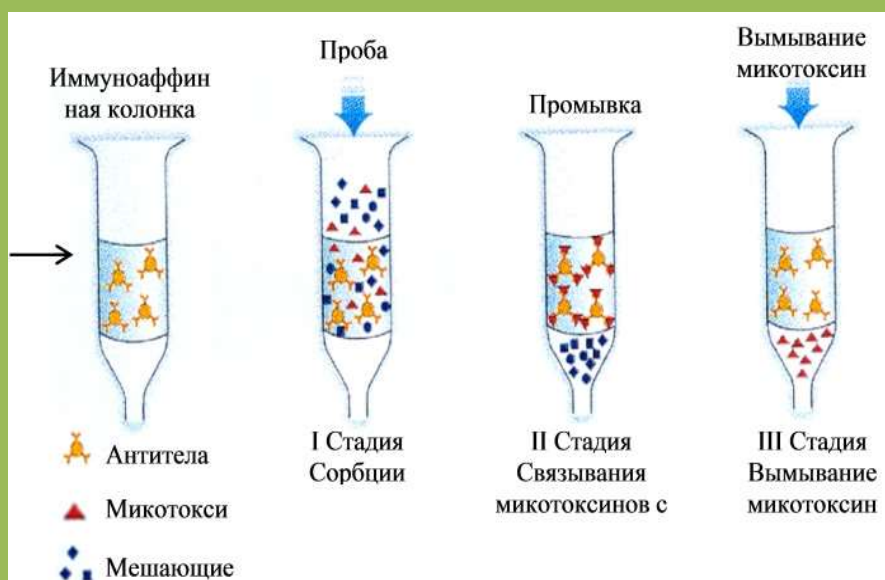
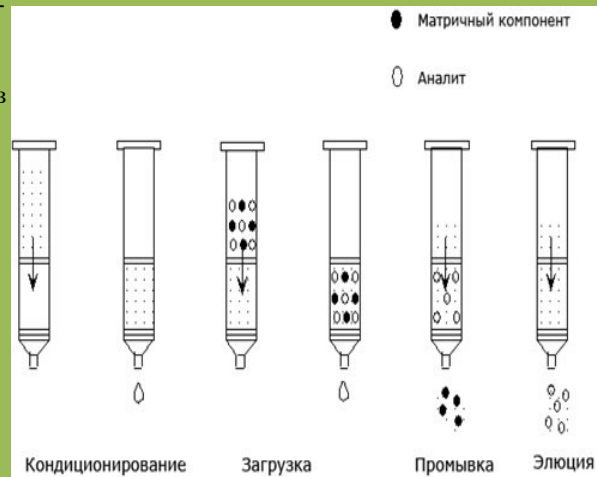


Схема процесу ТФЕ

Твердофазна екстракція (ТФЕ) - метод пробопідготовки, що полягає в концентруванні та відділенні від матриці аналіту із використанням твердофазних сорбентів, з послідовним елююванням (екстракцією) певними розчинниками. ТФЕ дозволяє скоротити час пробопідготовки, зменшити витрати розчинників і підвищити точність і правильність аналізу. Основними цілями методу, являються:

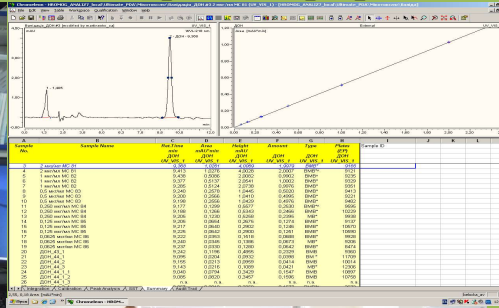
- очистка проби від небажаних домішок
- концентрування компонентів проби для полегшення подальших досліджень
- перевід компонентів проби на іншу матрицю



Аналіз на рідинному хроматографі



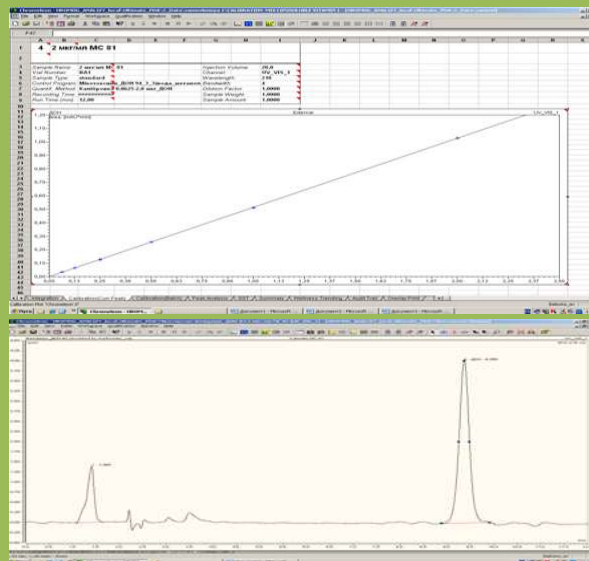
Високоєфективна рідинна хроматографія



Рідинна хроматографія – це метод розділення і аналізу складних сумішей, в якому рухомою фазою є рідина.



Визначення концентрації токсину відбувається за калібрувальною кривою робочих розчинів аналітичного стандарту мікотоксину.



Метод рідинної хромато-мас-спектрометрії (LC-МС) є одним із сучасних гібридних методів, який поєднує можливості хроматографічного і мас-спектрометричного аналізу. **Мас-спектрометричний аналіз** – метод дослідження речовини, заснований на визначенні відношення маси до заряду іонів, що утворюються при іонізації компонентів проби. Один з найпотужніших способів якісної ідентифікації речовин, що допускає також і кількісне визначення. Можна сказати, що мас-спектрометрія - це «зважування» молекул, що знаходяться в пробі.

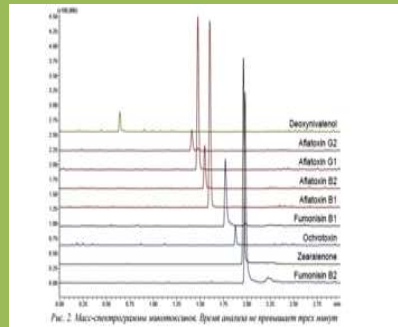
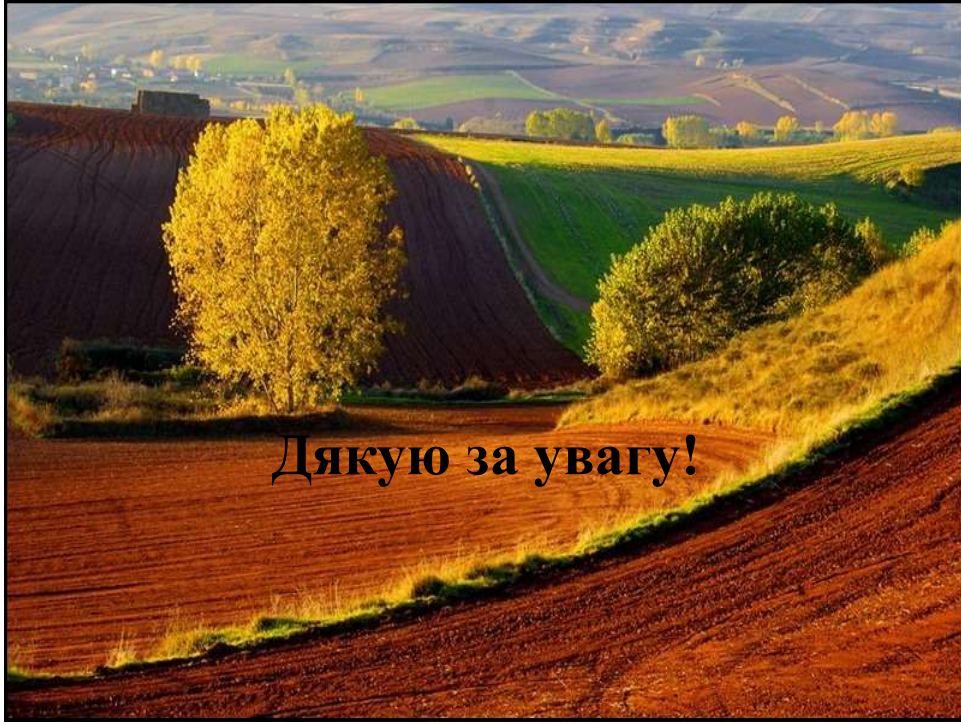


Рис. 2. Мас-спектрометричне визначення. Проби аналізи на протязі часу

ВИСНОВКИ

1. Щоб проводити лабораторний контроль за залишками мікотоксинів у зерні, харчовій та кормовій продукції необхідно використовувати сучасні, точні, кількісні методи вимірювання.
2. Для отримання конкурентноспроможних результатів лабораторного дослідження необхідне використання підтверджуючих методів визначення рівнів мікотоксинів.



Дякую за увагу!