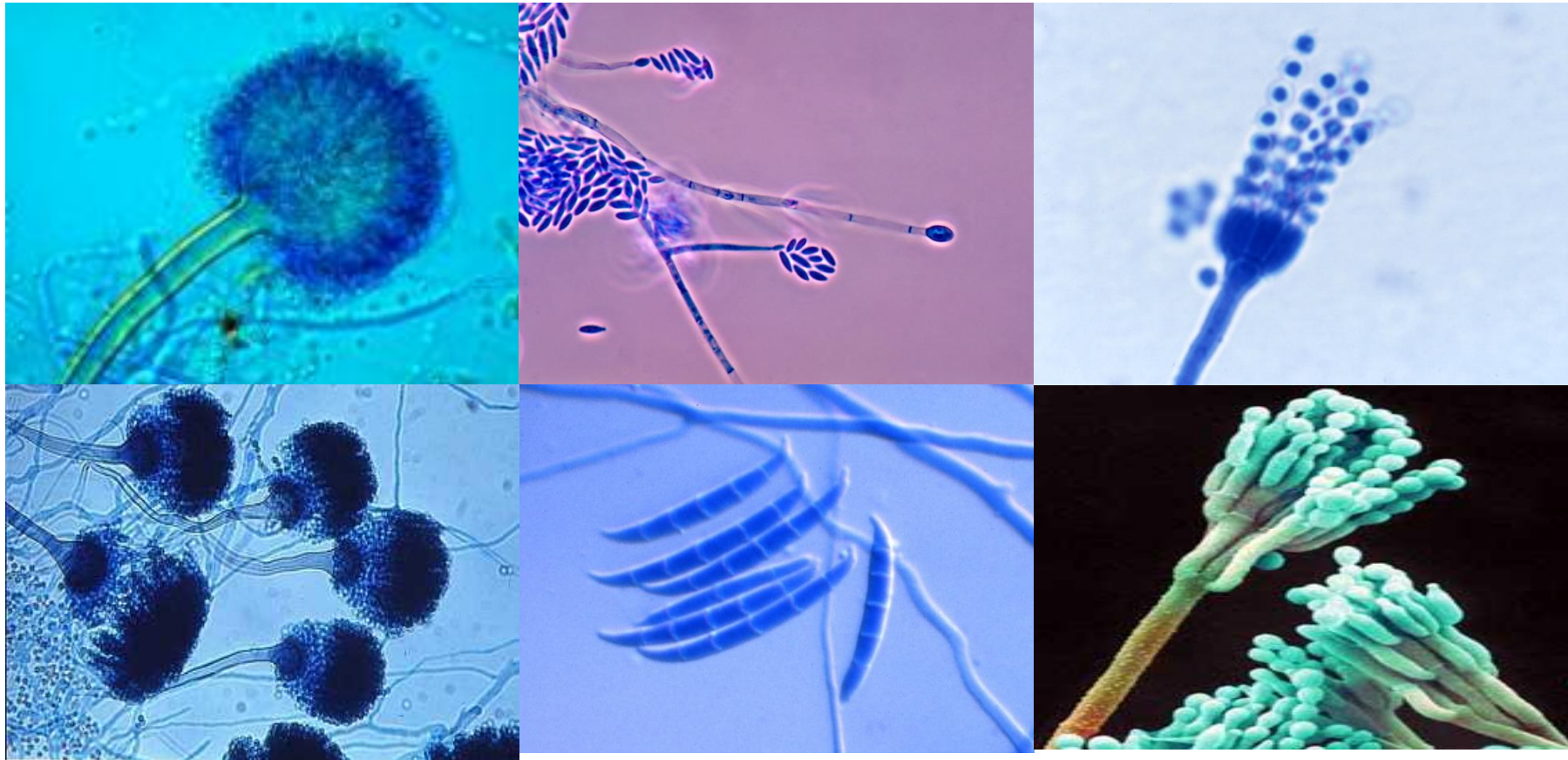
A microscopic image showing a dense network of light blue, filamentous structures (hyphae) with numerous small, round, greenish-brown spores attached to them. The background is a light, neutral color.

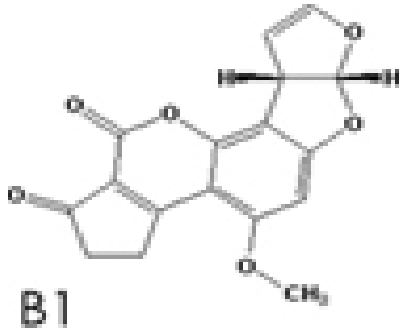
**МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ У
КОРМАХ, СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІЙ
СИРОВИНІ ТА ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ**

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

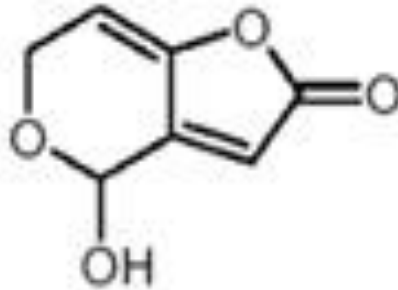


Наявні аналітичні та кількісні методи аналізу дають змогу виявити тільки десяту частину з усіх відомих мікотоксинів. Кращі європейські лабораторії визначають не більше 15 з них.

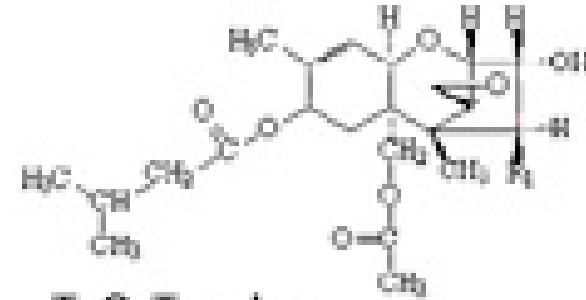
У нашій країні найчастіше зустрічаються наступні мікотоксини: **афлатоксини, охратоксини, фумонізени, зеараленон, патулін, ДОН і Т-2 токсин.**



Афлатоксин В₁, продуцент – *Aspergillus* (*A. Flavus* або *A. Parasiticus*)

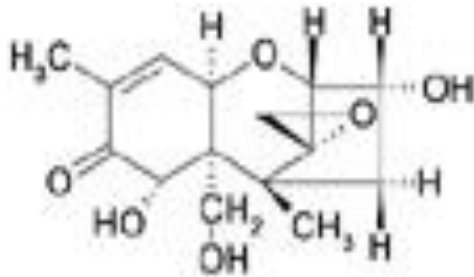


Патулін, продуцент – *Penicillium* та *Aspergillus*

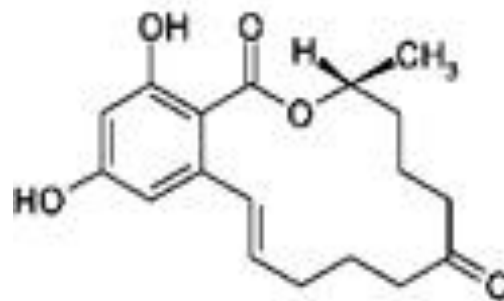


T-2 Toxin

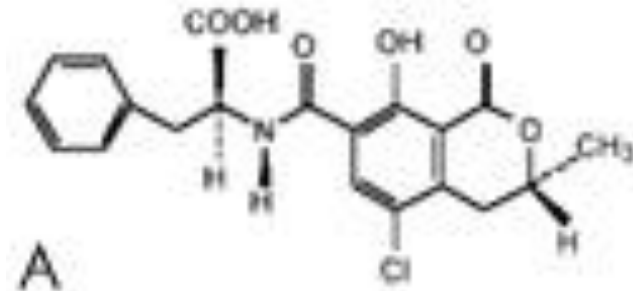
T-2 Токсин, продуцент – *Fusarium*



**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.



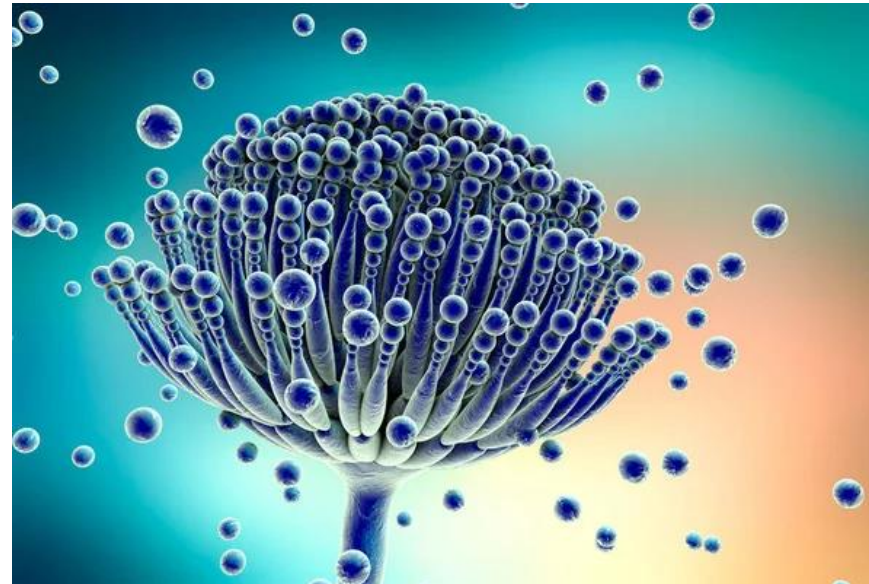
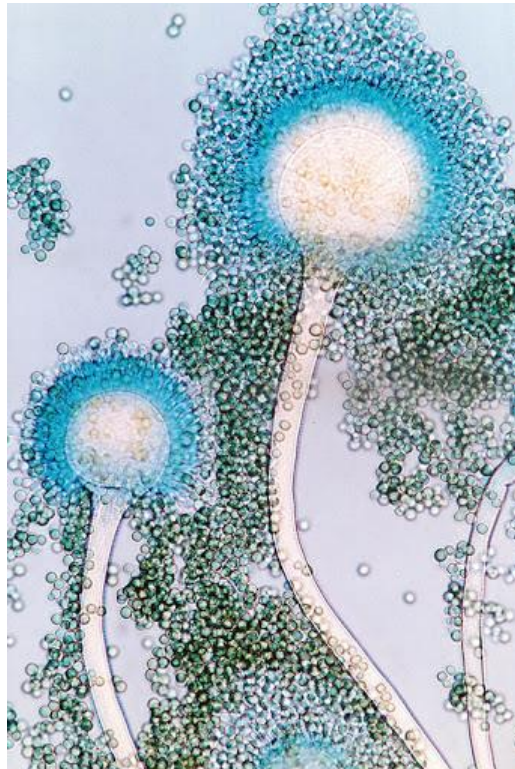
НЕБЕЗПЕКА ВІД РОЗВИТКУ ТОКСИНУТВОРЮЮЧИХ МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ НА ПРОДУКЦІЇ АПК

**Споживання
забрудненої
продукції АПК
спричиняє зміни
в організмі
людини та
тварини,
виникають
мікотоксикози,
мікози, алергії**

**Забруднення
мікотоксинами
продуктів:
молоко, сир,
м'ясо**

**Забруднення
мікотоксинами
рослинної
сировини:
корми, зерно**

- ✓ **30-40% всіх пліснявоутворюючих грибів здатні продукувати мікотоксини в небезпечній кількості**
- ✓ **мікотоксини утворюються у відповідь на будь-який стрес**



Фактори, що сприяють утворенню мікотоксинів



Вологість зерна:

> 12 %

Відносна вологість:

> 70 %

Температура (перепади):

> 13 °C

**Пошкоджене, бите зерно,
наявність комах**

■ **Харчова безпека продукції АПК формується впродовж всього ланцюга її отримання!**

- Дієвим способом попередження забруднення зерна токсичними видами грибів на всьому шляху від поля до споживача є:
 - ✓ застосування поліпшеної технології вирощування,
 - ✓ використання стійких до хвороб сортів,
 - ✓ своєчасні захисні заходи,
 - ✓ своєчасне збирання
 - ✓ правильне зберігання зернових культур,
 - ✓ проводити часткове знезаражування зернопродуктів під час переробки

Безпечність та якість продукції АПК не можна розпізнати безпосередньо Потрібні лабораторні дослідження!



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
Дезоксиніваленол	500	500
	Борошно	
Афлатоксин В ₁	5	не регламентовано
Зеараленон	75	75
Дезоксиніваленол	750	750
Т-2 токсин	не регламентовано	не регламентовано
	М'ясо свіже і заморожене, ковбаси, м'ясні консерви	
Афлатоксин В ₁	5	не регламентовано

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	
	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	
Патулін	50	не регламентовано

Гранично допустимі концентрації (ГДК) афлатоксинів у молоці та молочних продуктах згідно нормативних документів України та ЄС

№ з/п в таблиці додатку до документу	Назва харчової продукції	Максимальні рівні вмісту афлатоксинів, мкг/кг		
		M1	B1	Разом B1, B2, G1, G2
Державні гігієнічні правила і норми "Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах" Наказ МОН № 368 від 13.05.2013, додаток, розділ 2. Мікотоксини				
2.1.13	Молоко неперероблене, молоко, піддане термічній обробці, молоко для виготовлення молочних харчових продуктів, молокопродукти, молоко згущене, молоко і молочні продукти сухі, сири і сирні вироби, масло тваринне (коров'яче)	0.05	0.1	н/н
2.1.16	Дитячі суміші початкові та дитячі суміші для подальшого годування ¹	0.025	0.1	н/н
2.1.17	Харчові продукти для спеціальних медичних цілей, призначені для дитячого харчування	0.025	0.1	н/н
Регламент ЄК № 165/2010 Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins				
2.1.13	Молоко не перероблене ² , молоко, піддане термічній обробці, молоко для виготовлення молочних харчових продуктів, молокопродукти	0.050	н/н	н/н
2.1.16	Суміші для дитячого харчування для немовлят і для дітей старшого віку, у тому числі молоко і молочні продукти ^{3,4}	0.025	н/н	н/н
2.1.17	Харчові продукти для спеціальних медичних цілей, призначені для дитячого харчування ^{4,5}	0.025	0.1	н/н

- 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 безпечності 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



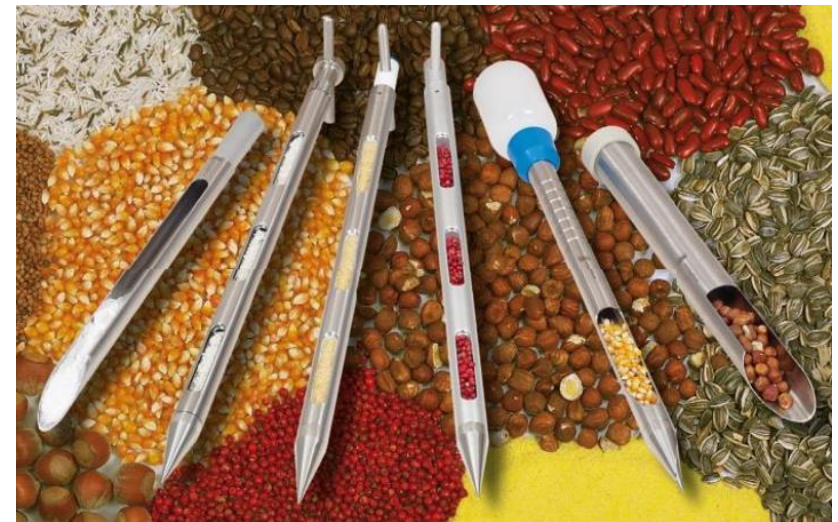
стадія
ідентифікації й
кількісного
визначення



аналіз
отриманих
результатів



- ✓ Відбір матеріалу для досліджень повинен проводитися у відповідності до загальноновизнаних правил, ДСТУ 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.



- ✓ Пробовідбірники для зерна

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 у 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 (харчові 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, імуноферментний аналіз – ІФА), інші для підтвердження (високоєфективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектуванням - ВЕРХ, рідинна мас-спектрометрія-LS-MS). Відповідно до цілей використання данні методи мають свої недоліки, переваги та межі визначення, які необхідно враховувати при виборі методу аналізу мікотоксинів.

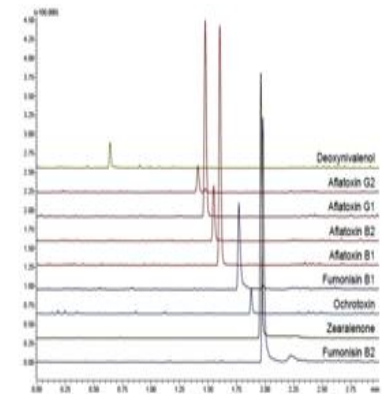
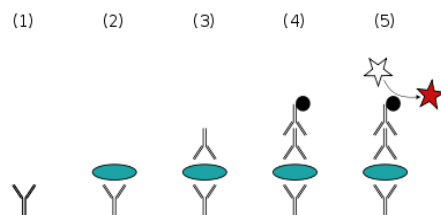
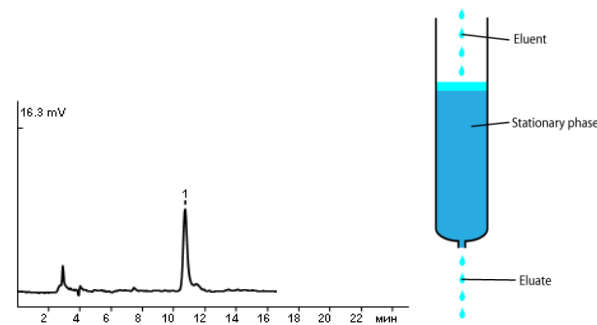
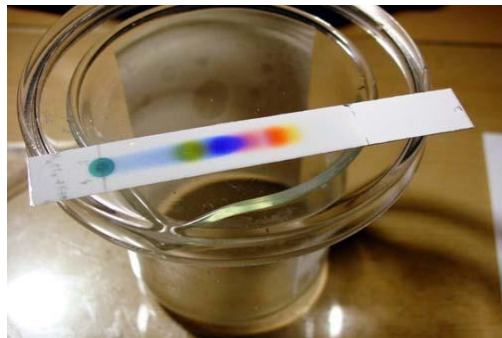
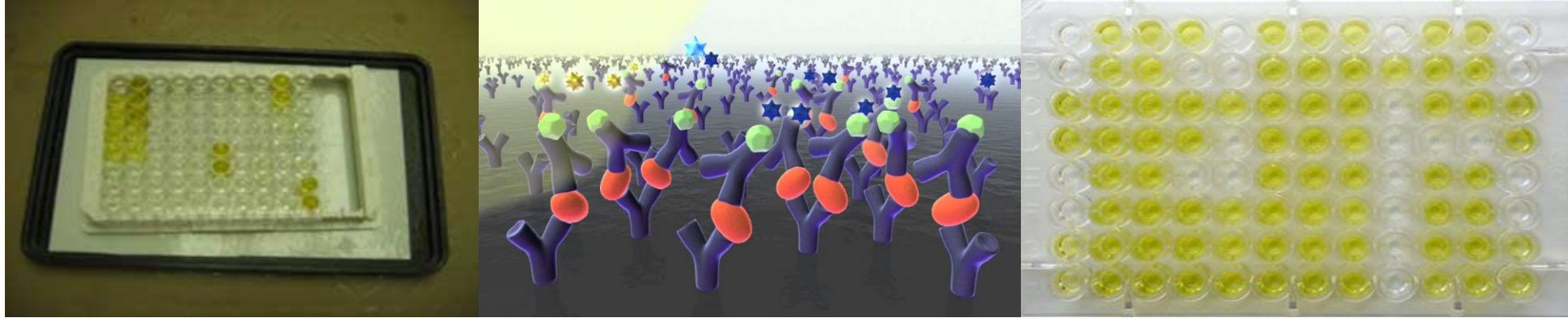


Рис. 2. Мас-спектрометричне визначення. Врешт аналізу не прийнятий перш заступ

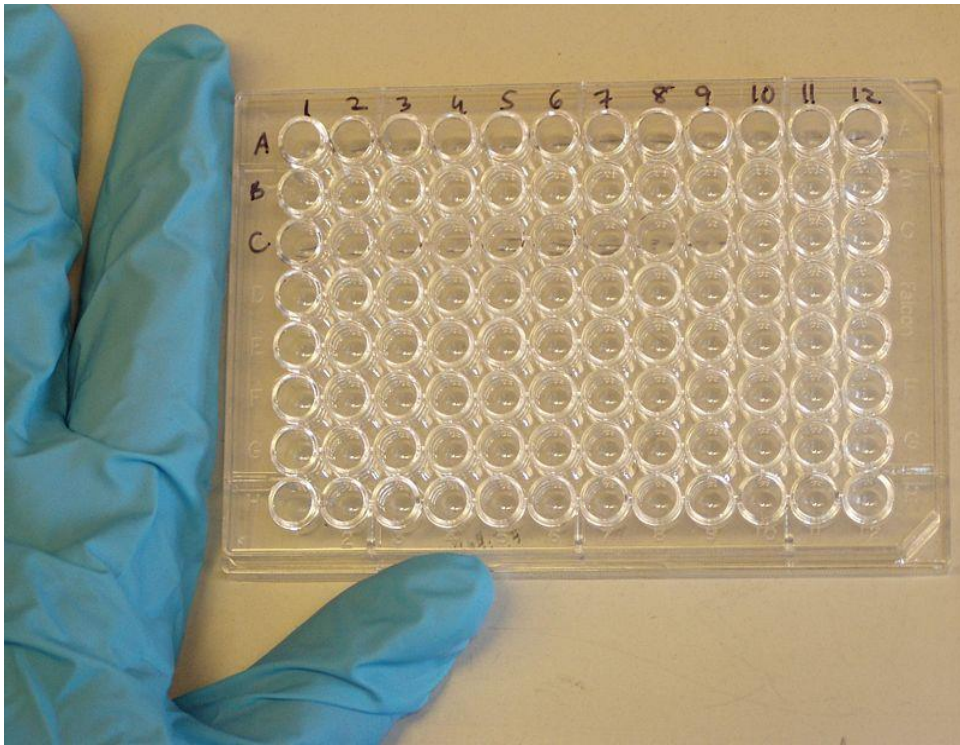


Аналітична ТШХ є скринінговим, якісним методом аналізу речовин. Необхідно пам'ятати, що інтенсивність кольору плям є досить приблизною кількісною характеристикою. Така оцінка можлива при використанні універсальних проявників, тоді детектування проводиться візуально або за допомогою денситометра. Точність 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

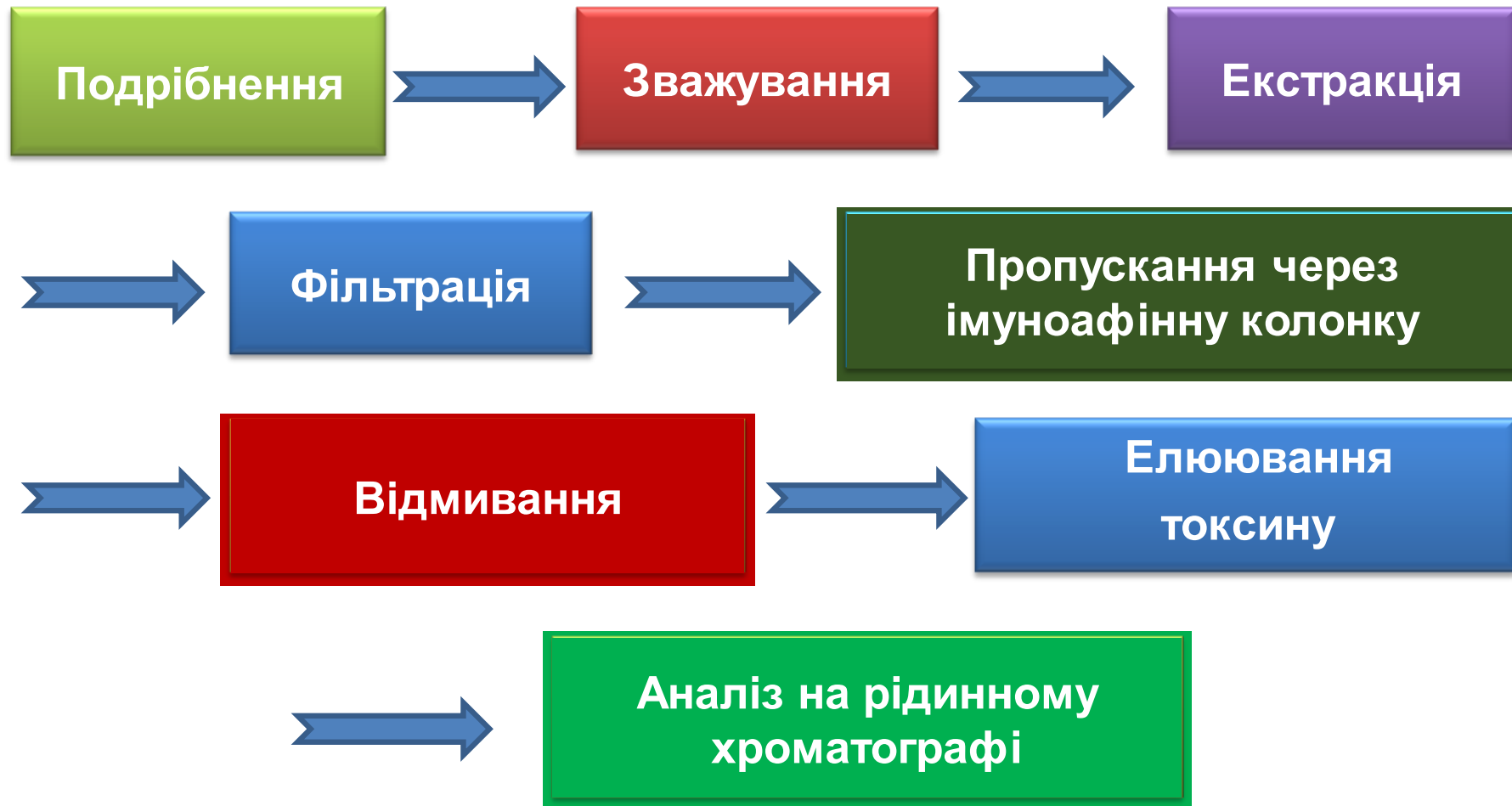
ІФА/ELISA



- ✓ В лунки планшету 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 планшету утворюється структура типу "сендвіч".
- ✓ Після промивання із лунок планшету 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 лунок, виступає в якості каталізатора, перетворює субстрат в забарвлений продукт реакції.
- ✓ Після інкубації, в лунки додається стоп-реагент, при цьому блакитний колір розчину міняється на жовтий.
- ✓ 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 1-3 год.

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

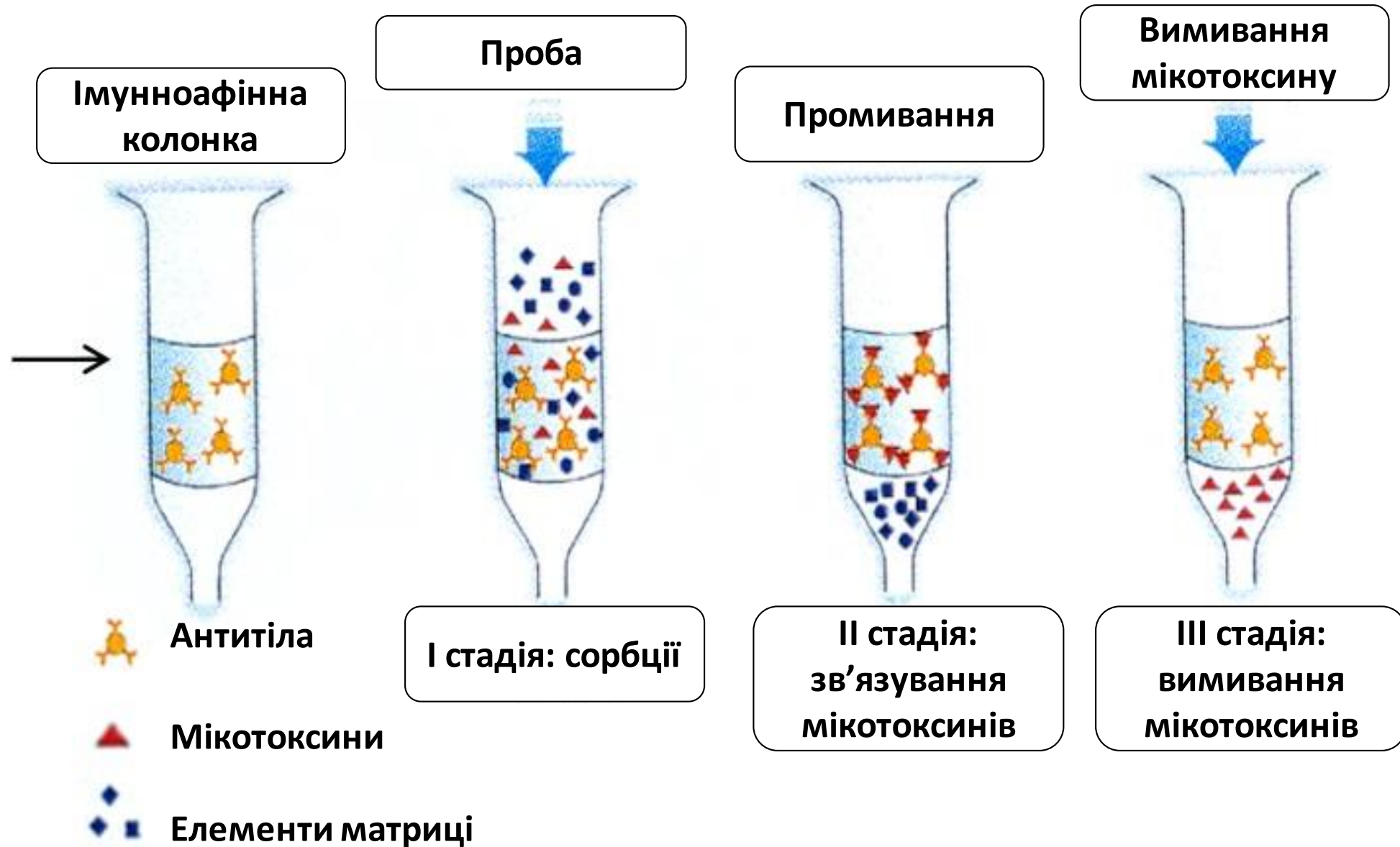


Схема процесу ТФЕ

Твердофазна екстракція (ТФЕ) - метод пробопідготовки, що полягає в концентруванні та відділенні від матриці аналіту із використанням твердофазних сорбентів, з послідуочим елююванням (екстракцією) певними розчинниками.

- ТФЕ дозволяє скоротити час пробопідготовки, зменшити витрати розчинників і підняти точність і правильність аналізу.



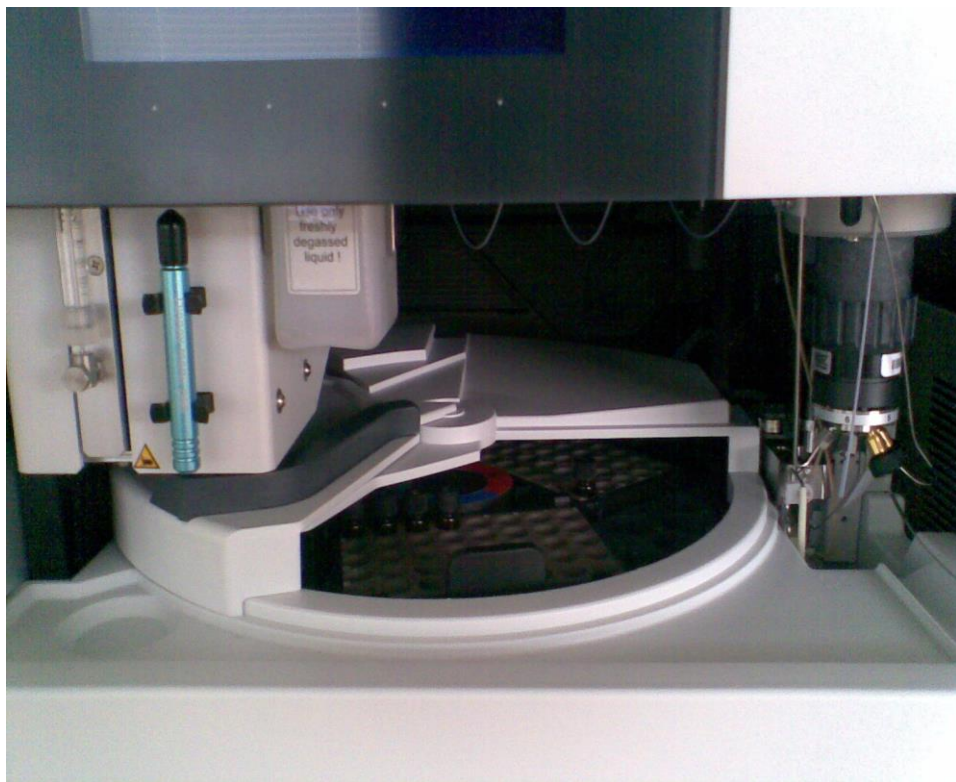
**ТФЕ метод
забезпечує:**

**переведення
компонентів
проби на
іншу
матрицю**

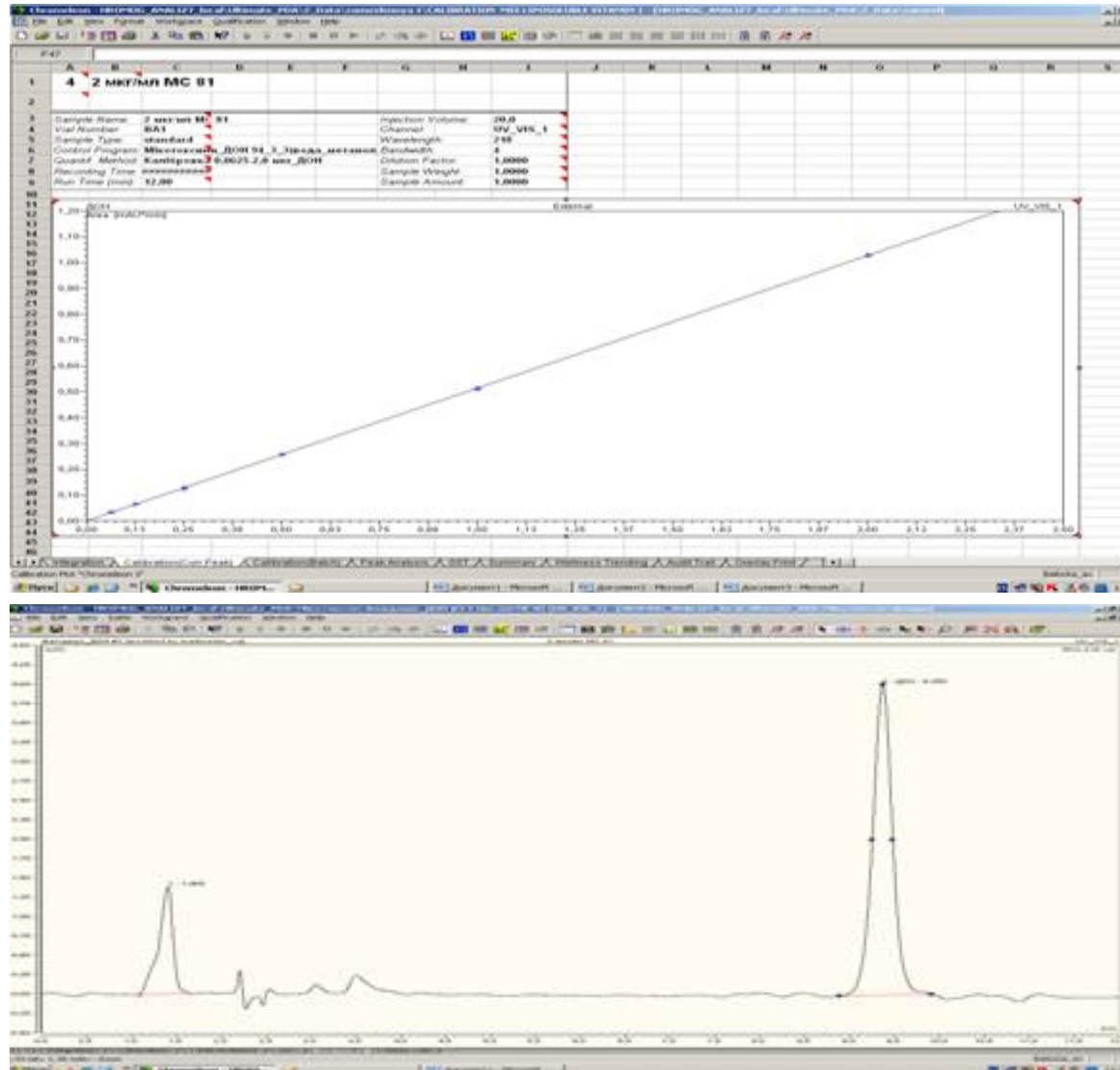
**очищення
проби від
небажаних
домішок**

**концентрування
компонентів проби для
полегшення наступних
досліджень**

Аналізування на рідинному хроматографі



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 аналізів. **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 у пробі.

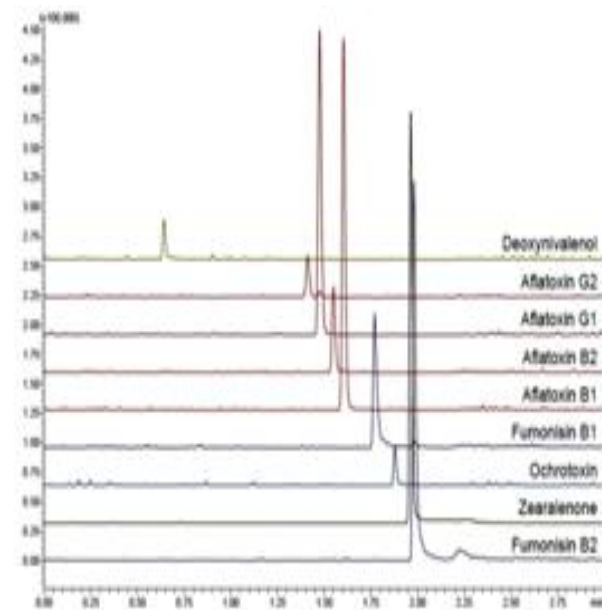
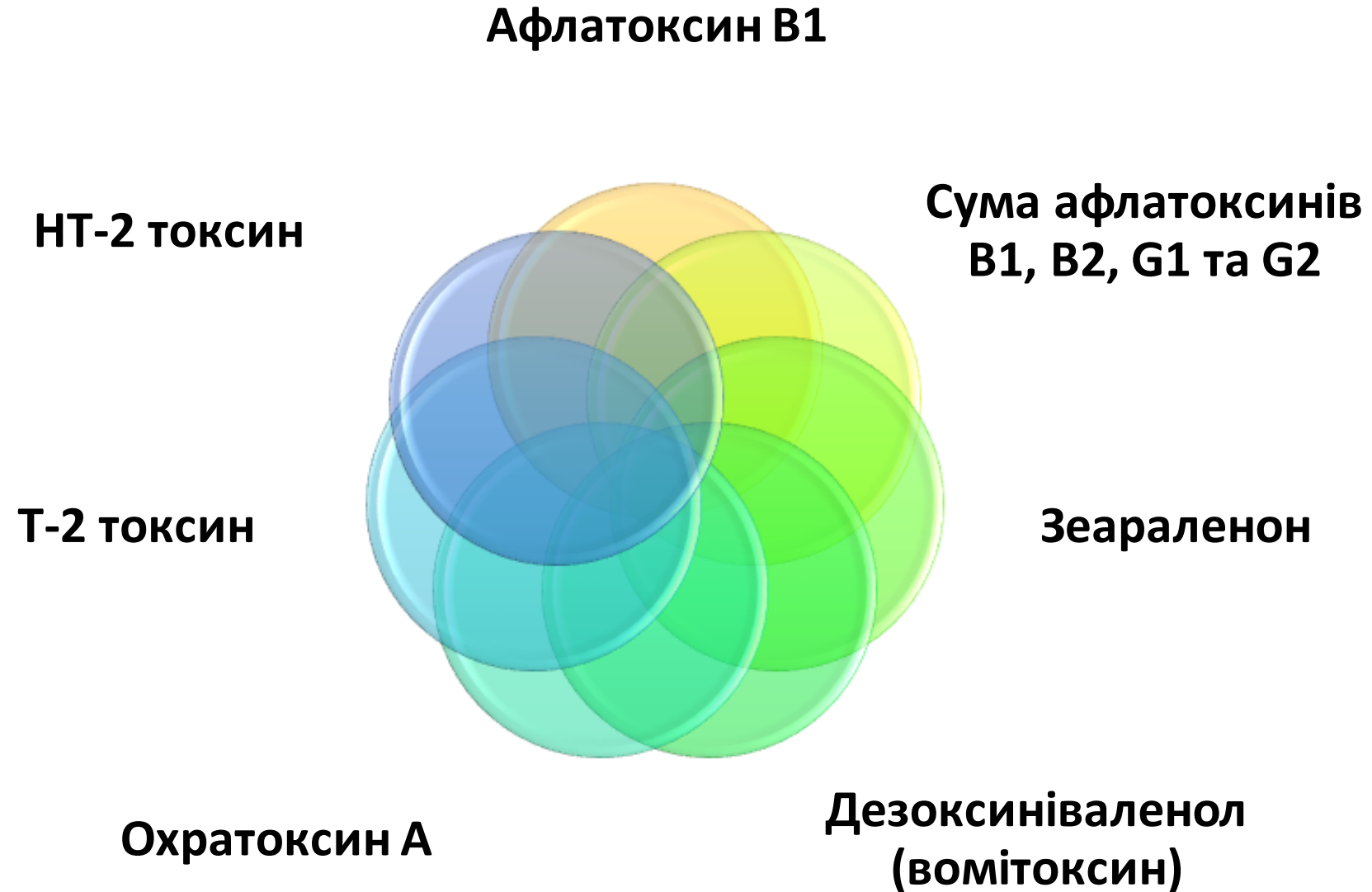


Рис. 2. Мас-спектрометричний аналіз микотоксинів. Час аналізу не зображено через масштаби

ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ МЕТОДОМ ВЕРХ-МС/МС В УЛЯБП АПК:



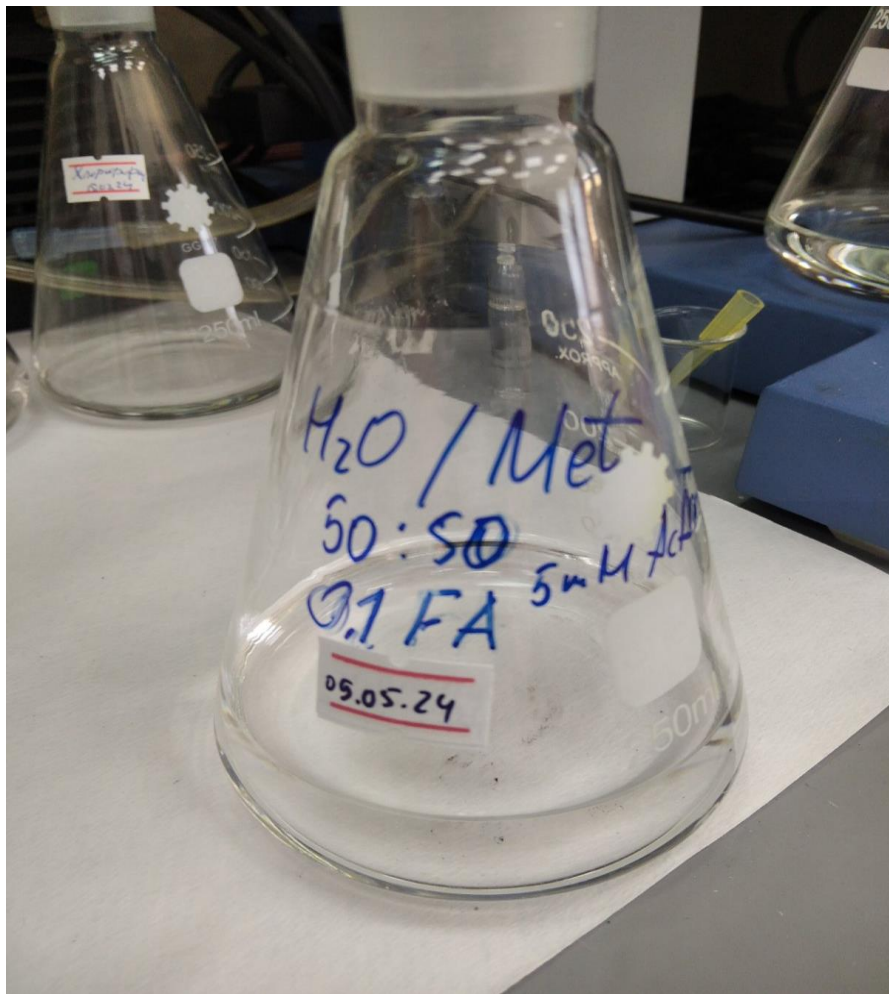
1) Наважку 5 г дрібно помеленого на млинку зерна поміщаємо у 50 мл пластикові центрифужні пробірки.



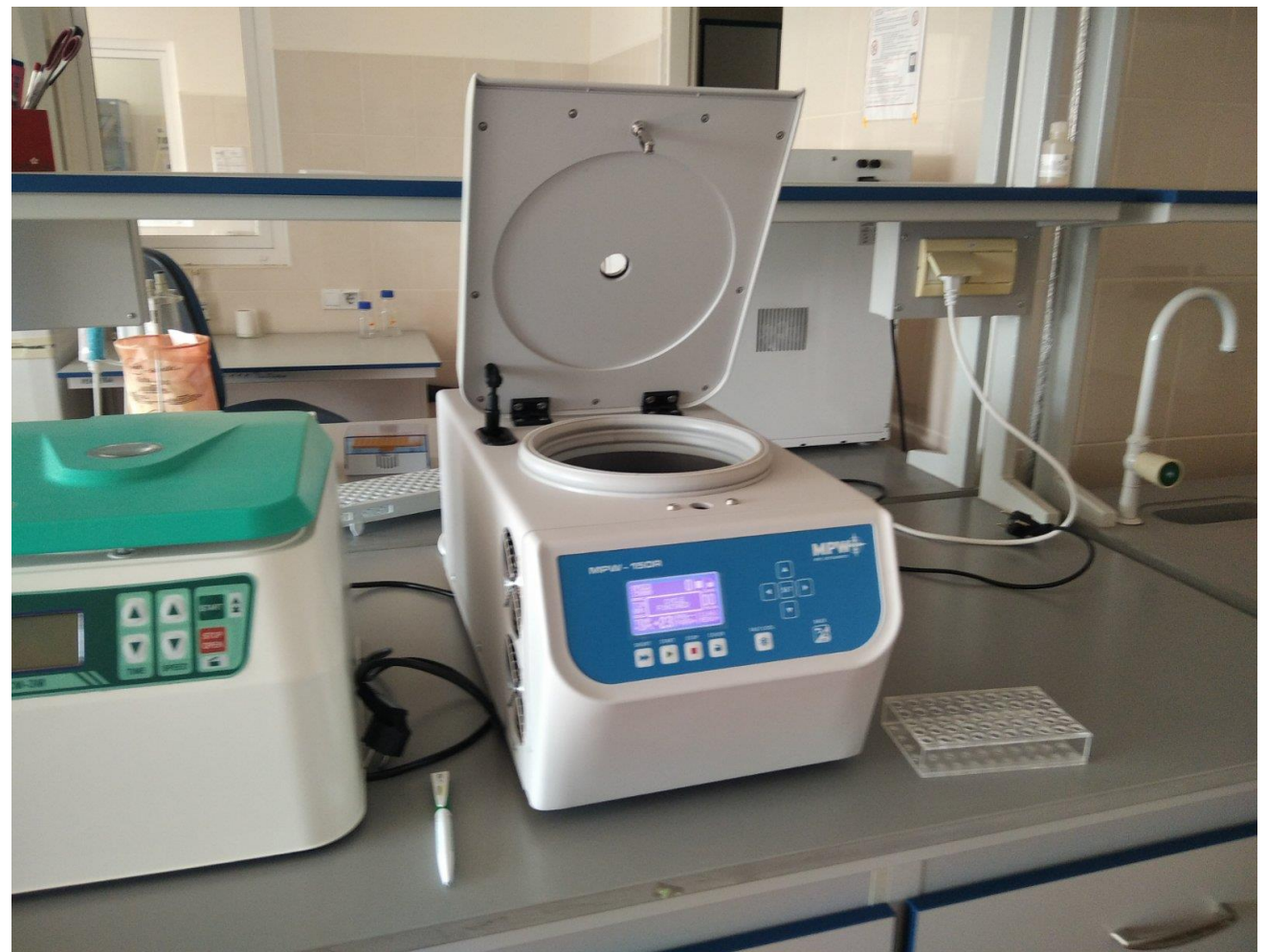
СХЕМА ПІДГОТОВКИ ПРОБ:



- 1) 5 г помеленого зерна поміщаємо у 50 мл пластикові центрифужні пробірки
 - 2) +10 мл H₂O, вортекс
 - 3) + 10 мл ACN (1% AcAc): 99 мл ACN + 1 мл оцтова кислота, на Вортекс та На ультразвук без підігріву на 15 хв (можна без цього)
 - 4) + 4 г сульфату натрію +1 г Натрій хлор – струшувати вручну + вортекс
 - 5) Центрифугування на 7000 об/хв - 7 хв.
 - 6) Відбирати 2-7 мл верхнього прозорого шару (екстракт ACN).
 - 7) Випарити досуха на ротерному випарювачі (40°C).
- На кінчику серцевидної колби може залишатися трішки води.

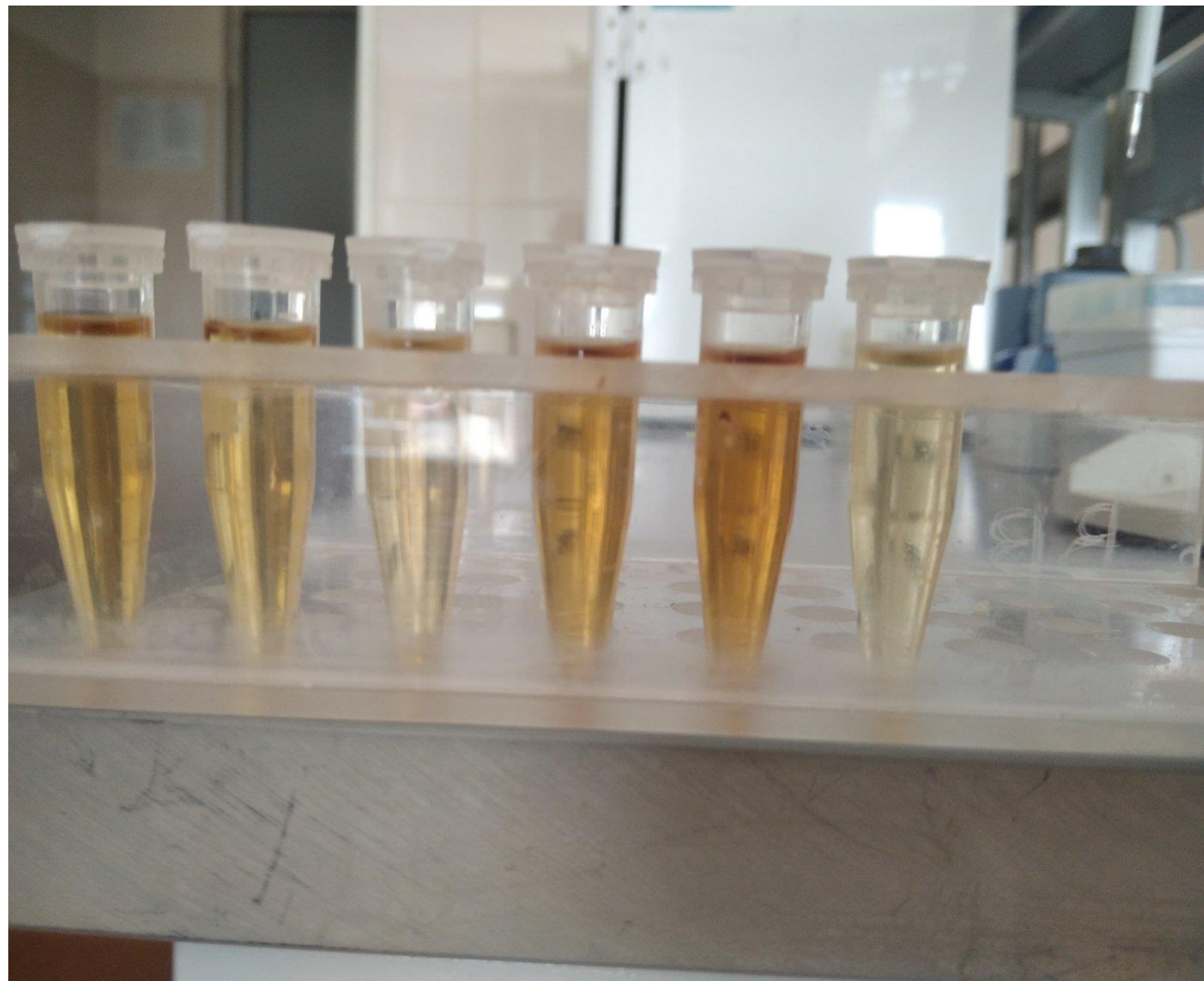


8) Додати 1 мл розчину 2 (метанол: вода) у співвідношенні 50:50 (як співвідношення у рідкій фазі).



9) Перемішати.

10) Відібрати 1,5 мл в епіндорф, центрифугувати при 15 000 об - 10 хв

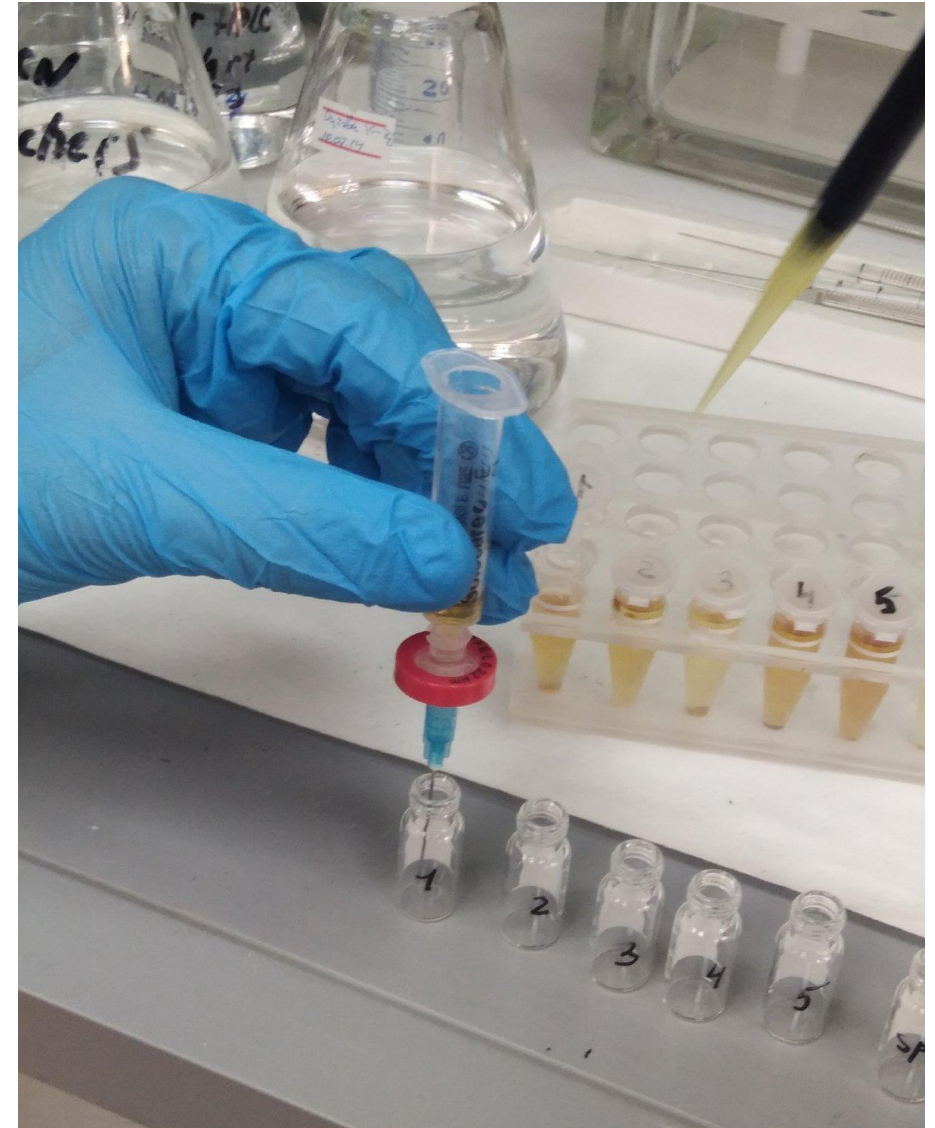


Осад залишається внизу у конусі:

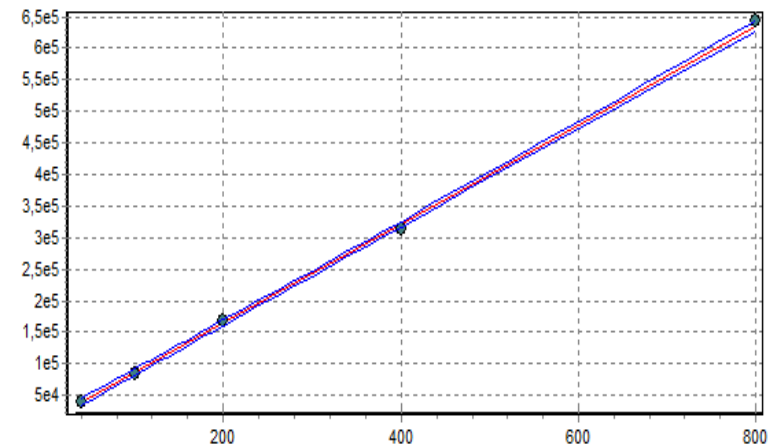
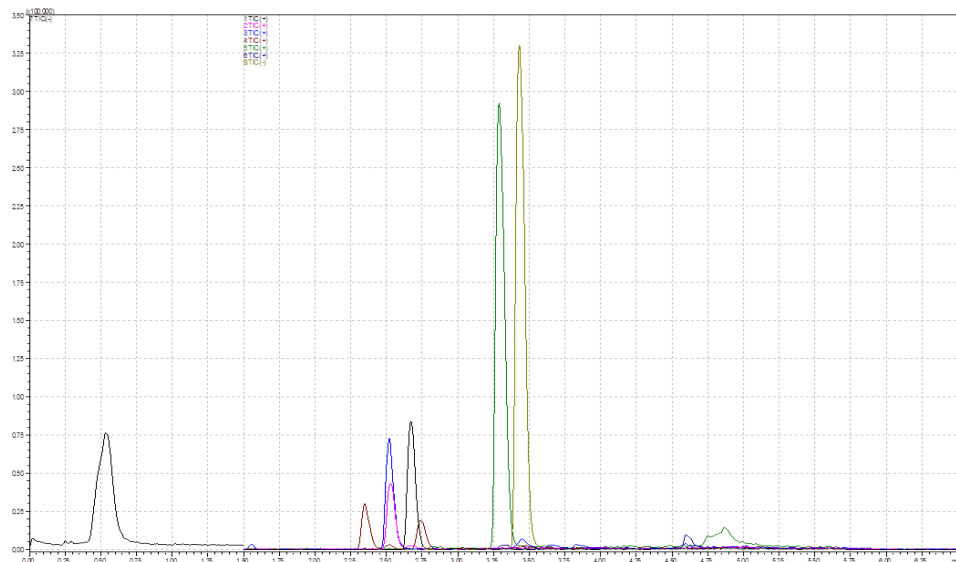
З епіндорфів весь розчин (не зачепивши осад) переносимо у шприц і фільтруємо у 1,5 мл віали.

Аналізуємо на ВЕРХ-МС/МС

Якщо без ДОНу –упарювання і концентрування не потрібно.



LC MS/MS визначення мікотоксинів. Екстракція методом QuEChERS



Мас- хроматограма мікотоксинів

	LC-MS/MS	ELISA
Детектування	✓	✓
5 і більше токсинів	✓	✗
Арбітраж	✓	✗

Основні показники придатності методики (валідація)

Назва	ГДК мкг/кг	R ²	LOD, мкг/кг	LOQ, мкг/кг	Повернення	U _c
Афлатоксин. В ₁	≤ 5	0.9999	0.227	0.454	80,2	0.1211
Афлатоксин. В ₂	Сума афлатоксинів (В1 + В2 + G1 + G2)	0.9998	0.497	0.994	88	0.2647
Афлатоксин. G ₁		0.9994	0.484	0.967	85	0.2584
Афлатоксин. G ₂		≤ 20	0.9998	0.377	0.755	95,5
Т-2 токсин	≤ 100	0.9998	6.36	12.7	96,4	3.386
Зеараленон	≤ 200	0.9995	11.6	23.2	97,9	6.167

Методи визначення мікотоксинів?

