ФАРМАКОЛОГІЯ І ТОКСИКОЛОГІЯ

УДК 614.31:637.11.055:579.2

Порівняльний аналіз ефективності аналітичних методів визначення афлатоксинів у молоці та молочних продуктах (огляд літератури)

Сенін С.А., Данчук В.В., Мідик С.В., Ушкалов В.О., Якубчак О.М.

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Ушкалов В.О. E-mail: ushkalov63@gmail.com

OPEN ACCESS

Сенін С.А., Данчук В.В., Мідик С.В., Ушкалов В.О., Якубчак О.М. Порівняльний аналіз ефективності аналітичних методів визначення афлатоксинів у молоці та молочних продуктах (огляд літератури). Науковий вісник ветеринарної медицини, 2020. № 2. С. 150–157.

Senin S.A., Danchuk V.V., Midyk S.V., Ushkalov V.O., Jakubchak O.M. Porivnjal'nyj analiz efektyvnosti analitychnyh metodiv vyznachennja aflatoksyniv u moloci ta molochnyh produktah (ogljad literatury). Naukovyj visnyk veterynarnoi' medycyny, 2020. № 2. PP. 150–157.

Рукопис отримано: 10.11.20
Прийнято: 27.11.20
Затверджено до друку: 24.11.20.

doi: 10.33245/2310-4902-2020-160-2-150-157

Молочна промисловість України динамічно розвивається, її вимоги до безпечності та якості сировини істотно зростають. Виявлення мікотоксинів у молоці-сировині є одним із основних показників його безпечності. Високий ступінь токсичності мікотоксинів є загрозою здоров'ю лактуючої тварини. Крім того, значна їх кількість секретується з молоком. Необхідно зазначити, що переважна більшість мікотоксинів утилізується мікроорганізмами передшлунків у жуйних, що не відбувається у моногастричних тварин, тому перелік мікотоксинів у їх молоці може бути значно ширшим, порівняно до секрету молочної залози жуйних. Нині встановлено максимально допустимі рівні (МДР) вмісту мікотоксинів у молоці-сировині та молочних продуктах. Отже, комплексне визначення вмісту мікотоксинів у секреті молочної залози має не тільки технологічне, але й важливе діагностичне значення.

Підготовка проб молока є найбільш важливим етапом під час визначення мікотоксинів і складається із відбору проб, екстракції та очистки від домішок. Для екстракції афлатоксинів використовують метод рідинної екстракції ацетонітрилом або хлороформом. Очищення екстрактів проводять на імуноафінних колонках, патронах із спеціальними сорбентами або використовують певних виробників (MycoSep®).

Для визначення афлатоксинів B_1 та M_1 у молоці-сировині корів використовують імуноферментний аналіз та високоефективну рідинну хроматографію з флуоресцентним детектуванням.

Однак усі ці методи мають ряд недоліків, а саме: тривала і високовартісна підготовка зразків та недостатньо висока селективність. На сьогодні набуває популярності комплексне визначення мікотоксинів у різних матрицях методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS/MS) та використанням модифікованої підготовки зразків QuEChERS. Перевагою цієї методики є поєднання більш швидкої та дешевшої пробопідготовки зразків QuEChERS з високоселективною хроматографією LC-MS/MS.

Ключові слова: мікотоксини, молоко-сировина, аналітичні методи, QuEChERS.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Мікроскопічні гриби, що контамінують корми та харчові продукти, є продуцентами багатьох видів мікотоксинів. У моногастричних, на відміну від тварин з багатокамерним шлунком, чутливість до мікотоксинів корму є значно вищою, що обумовлено відсутністю фази їх мікробіологічної детоксикації екосистемою рубця. Більш детальну інформацію стосовно мікотоксинів молока можна знайти у різних джерелах [1]. З огляду на те, що основною сировиною молочної промисловості на наших теренах є молоко корів, доцільно більше зосередитися на його аналізуванні.

Екстремальні умови посухи під час вирощування та збирання сільськогосподарських культур, можуть спричинити небезпечне підвищення концентрації в кормах тварин афлатокси-

ну B_1. Це високотоксична та канцерогенна речовина з групи мікотоксинів, яку продукують мікроскопічні гриби *Aspergillus*, переважно *Aspergillus flavus* та *Aspergillus parasiticus* [2].

Афлатоксин B_1 вважається найбільш токсичним мікотоксином, який спричиняє отруєння. Цей токсин метаболізується в печінці корів з утворенням гідроксильованої форми – вторинного токсичного метаболіту афлатоксину M_1. Відомо, що B_1 виводиться з організму з сечею та молоком. Дослідження показали, що афлатоксин M_1 може бути виявлений в молоці корів вже через 12–24 години після впливу його попередника афлатоксину B_1. Однак, постійна наявність афлатоксину M_1 у молоці виявляється через 3–6 діб безперервного споживання контамінованого корму афлатоксином B_1. Крім того, у молоці також може виявлятись негідроксильований афлатоксин B_1 [3, 4].

Вміст мікотоксинів у молоці регламентується не тільки в Україні, а й у Європейському Союзі та інших країнах світу [1].

Максимально допустимі рівні вмісту афлатоксинів у молоці та молочних продуктах контролюються згідно з нормативними документами України та ЄС. Вміст окремих мікотоксинів не має перевищувати: M_1 – не більше 0,05 мкг/кг; B_1 – не більше 0,1 мкг/кг [5, 6].

Отже, враховуючи низькі рівні МДР, необхідні чутливі та ефективні хіміко-аналітичні методи визначення цих мікотоксинів у молоці-сировині та молочних продуктах.

Для визначення афлатоксинів B_1 та M_1 у молоці використовують імуноферментний аналіз [7], тонкошарову [8] та високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) з флюорометричним детектуванням [9].

Проте, всі ці методи об'єднує декілька недоліків: тривала та високовартісна підготовка проб, водночас недостатньо висока селективність. Останній показник є дуже важливим у практиці випробувальних лабораторій, оскільки будь-які невідповідності рівня афлатоксинів у харчових продуктах (зокрема і в молоці) необхідно підтверджувати або спростовувати арбітражним методом [7].

Останнім часом все більше набуває популярності визначення мікотоксинів у різних матрицях методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS/MS) з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS [2, 10]. Перевагою цієї методики є поєднання з одного боку більш швидкої та менш затратної за собівартістю пробопідготовки QuEChERS, а з іншого – високоселективного та арбітражного методу LC-MS/MS.

Метою роботи було провести аналіз ефективності існуючих аналітичних методів визначення афлатоксинів у молоці та молочних продуктах, описати їх переваги та недоліки.

Матеріал і методи дослідження. Аналізування вітчизняних та зарубіжних літературних джерел щодо наявних методів досліджень з визначення афлатоксинів у молоці.

Результати дослідження та обговорення. Об'єктом дослідження були наявні в літературі методики хімічного аналізу визначення мікотоксинів у молоці, опис етапів підготовки та типів екстракції проб.

Підготовка зразків молока-сировини для визначення мікотоксинів у молоці. Пробопідготовка молока є найважливішим етапом за визначення мікотоксинів і складається з відбирання зразка, екстракції та очищення екстрактів від домішок, що заважають визначенню токсинів. Для екстракції афлатоксинів використовують рідинну екстракцію ацетонітрилом або хлороформом. Очищення екстрактів проводять на імуноафінних колонках, патронах з різними сорбентами або використовуючи комерційні колонки MycoSep® [8, 9, 11].

Нині використовують рідинну екстракцію під тиском (прискорена екстракція). Вона більш швидка за часом виконання, ніж звичайна екстракція струшуванням. Цей спосіб потребує меншої кількості органічних розчинників та затрат часу на проведення пробопідготовки. Так, наприклад, під час екстракції афлатоксинів застосовують хлороформ або водно-ацетонітрильну суміш, метанол [11].

Іншим способом виділення й очищення мікотоксинів є твердофазна екстракція (ТФЕ). Для очищення екстрактів застосовують колонки, що заповнені сорбентом. Розроблені патрони, які заповнені сорбентом Supelclean LC-CN (силікагель, який модифікований ціанопропільними групами) для екстракції мікотоксинів та очищення отриманих екстрактів.

Одним із найбільш комерційно доступних способів для видалення домішок під час визначення мікотоксинів є використання колонок MycoSep.

Як сорбенти у колонках використовують вугілля, цеоліт та іонообмінні смоли. Через колонки пропускають екстракт, домішки сорбуються, аналіти ж виходять з колонки разом із розчином. Такий метод пробопідготовки використовують для одночасного і швидкого очищення ряду мікотоксинів: афлатоксинів, охратоксину, зеараленону та фумонізинів [3, 11].

У випробувальних лабораторіях з метою очищення екстракту від домішок все часті-

ше використовують імуноафінні колонки (AflaTest, FumoniTest, ZearalaTest тощо). Для цього екстракт пропускають через колонку, що містить тверду фазу, до якої ковалентно приєднані специфічні антитіла до певних мікотоксинів. Молекули токсинів, що містяться у пробі, зв'язуються з відповідними імобілізованими антитілами. Наступне елюювання токсинів з колонки дозволяє визначити їх кількісно з використанням хроматографічних методів [8, 9, 11].

Варто зазначити, що перераховані вище методики екстракції мікотоксинів є довготривалими в часі (пробопідготовка може займати від 3 до 5 годин), багатоетапними, потребують затрат великої кількості токсичних органічних розчинників і високовартісних одноразових імуноафінних колонок [3], які можна використовувати під час визначення тільки окремих класів або будь-якого певного мікотоксину (афлатоксинів B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, охратоксину А, Т-2, дезоксиніваленолу, зеараленону, патуліну).

У зв'язку з цим завжди існувала потреба у наявності таких способів підготовки проб для визначення множинних залишків різних ксенобіотиків, які були б позбавлені недоліків, властивих традиційним методам. Для досягнення поставлених цілей і був введений метод підготовки проб QuEChERS, як швидкий (Quick), простий (Easy), дешевий (Cheap), ефективний (Efective), міцний/надійний (Rugged) і безпечний (Safe) аналітичний метод пробопідготовки [10].

Цей метод заснований на екстракції мікотоксинів із зразка сумішшю ацетонітрил/вода, додаванні буферу, що складається з неорганічних солей (магнію сульфат, натрію хлорид). У результаті такої екстракції мікотоксини переходять в органічну фазу, а більш полярні домішки – у водний шар. Органічні домішки (деякі цукри і жирні кислоти), що залишилися в ацетонітрилі, можна видалити за допомогою дисперсійної твердофазної екстракції (дТФЕ) [12]. Однак через кислу природу деяких мікотоксинів, використання сорбентів для дТФЕ не рекомендується, наприклад, під час визначення фумонізинів. Визначення фумонізинів у цьому випадку проводять без очищення екстракту [3, 11]. Отримані очищені екстракти аналізують, здебільшого, методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS/MS) [13, 14].

Існує величезна кількість модифікацій методу залежно від матриці та мети аналізування. Традиційно метод пробопідготовки QuEChERS використовують для екстракції залишкових кількостей пестицидів з твердих матриць, таких як зерно, овочі, фрукти тощо [10, 12]. Проте як інформують останні дослідження, модифікована пробопідготовка QuEChERS може бути адаптована для екстракції афлатоксинів B_1 та M_1 із молока та наступним їх визначенням методом LC-MS/MS (рис. 1) [2, 15].

Методи визначення мікотоксинів у молоці. Високий ступінь токсичності мікотоксинів зумовив необхідність введення моніторингу й вмісту у молоці-сировині та молочних продуктах. Ключовим моментом у вирішенні цього завдання є розробка сучасних аналітичних методів вимірювань, їх впровадження у практику випробувальних лабораторій [7].

З метою здійснення випробувань зразків молока-сировини корів на вміст мікотоксинів застосовують скринінгові методи, найбільш поширеним з яких є твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА). Принцип методу полягає у високоспецифічній реакції антиген-антитіло, детектування якої здійснюється за рахунок введення ферментативної мітки з подальшим її виявленням за допомогою відповідного субстрату, що змінює свій колір. Твердою фазою в імуноферментному аналізі зазвичай слугує поверхня лунки мікропланшету. Високоспецифічні взаємодії антигену та антитіла визначають високу специфічність і чутливість імуноферментних методик вимірювань. Крім того, ІФА має такі переваги як оперативність, висока продуктивність (одночасно на одному планшеті проводять кілька десятків аналізів), простота пробопідготовки і проведення вимірювань, низька вартість аналізу, порівняно з традиційними хроматографічними методиками та використання невеликих об'ємів випробувальних зразків молока [7].

Попри всі переваги, імуноферментний аналіз здебільшого використовують лише для скринінгових аналізувань наявності мікотоксинів (вище певного рівня/відсутність у зразку) у випробовуваних зразках молока-сировини корів. З урахуванням результатів ІФА, зразки молока-сировини із завищеними МДР афлатоксинів мають бути досліджені класичними хроматографічними методами з метою підтвердження/спростування встановленої кількості мікотоксину. Такий підхід пов'язаний із основним недоліком цього методу, а саме, з можливістю перехресної реактивності (крос-реактивності) з подібними сполуками [16]. Тому з метою уникнення ризику отримання хибнопозитивних результатів, застосовують арбітражні хроматографічні та мас-спектрометричні методи [17].

Провідні аналітичні лабораторії самостійно розробляють методики визначення мікотоксинів, адаптують їх відповідно під існуюче обладнання, імуноафінні колонки певного виробника, проводять валідацію методик [18]. Практика розробки та валідації методик лабораторіями є досить поширеним явищем не тільки для визначення мікотоксинів, а також інших показників у молоці [19].

Одним із основних арбітражних (підтверджуючих) методів кількісної оцінки мікотоксинів у молоці є метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Цей метод широко поширений у випробувальних лабораторіях, оскільки має суттєві преваги у роздільній здатності, селективності та чутливості порівняно з тонкошаровою хроматографією [3, 11].

Методи на основі ВЕРХ були розроблені для багатьох основних мікотоксинів не тільки в зернових культурах та інших сільськогосподарських продуктах, а й для молока-сировини та молочних продуктів [9]. Принцип методу ВЕРХ полягає у розділенні аналізованого екстракту у нерухомій фазі хроматографічної колонки з подальшою ідентифікацією та кількісному визначенні компонентів за допомогою відповідних аналітичних стандартів. Нині для визначення вмісту афлатоксинів у молоці застосовують рідинну хроматографію з флуоресцентним детектуванням. Межа чутливості методу ВЕРХ із застосуванням флуоресцентного детектору може досягати до 1 мкг/кг. Крім того, вже розроблено методики ВЕРХ для одночасного аналізу декількох мікотоксинів [3, 16].

У літературі описана методика визначення метаболіту афлатоксину B_1 – токсину M_1 у молоці методом ВЕРХ з флуоресцентним детектуванням. Розбавлені водою зразки молока пропускають через імуноафінні колонки з метою виділення і очищення токсину від домішок. Як рухому фазу використовують суміш ацетонітрилу і води (25:75), нерухома фаза – сорбент XDB C18, довжини хвиль збудження і детектування – 365 і 435 нм, відповідно. Межа виявлення токсину M_1 у молоці складала 0,04 мкг/л [11].

Основним обмеженням для методу ВЕРХ з флуоресцентним детектором є необхідність дотримання спеціальних умов хроматографічного розділення мікотоксинів. Крім того, з метою підвищення чутливості методики необхідно отримувати похідні мікотоксинів за допомогою додаткового етапу пробопідготовки – дериватизації [9, 11].

Складність виявлення мікотоксинів звичайними хроматографічними методами пов'язана з їхніми фізико-хімічними особливостями, а також з наявністю великої кількості непередбачуваних домішок у молочних продуктах. Саме тому загальноприйняті методики їх визначення, зазвичай, стосуються тільки одного компонента або декількох одного класу [3, 8, 11].

З огляду на це, постає питання пошуку, розробки та впровадження у випробувальних лабораторіях хіміко-аналітичних методів, які б дозволяли кількісно визначати широкий спектр мікотоксинів однією пробопідготовкою та одним методом детектування.

Не викликає сумніву, що використання однієї уніфікованої пробопідготвки для екстракції широкого спектру мікотоксинів дозволяє скоротити за часом випробування, зменшити використання реактивів та інших витратних матеріалів, порівняно з традиційними методами.

Одним із сучасних методів, який дозволяє здійснювати багатокомпонентний аналіз в складних матрицях – є метод високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS/MS). Як відомо, багатокомпонентний аналіз є можливим завдяки тому, що розділення речовин відбувається у декількох площинах: з одного боку – розділення речовин на хроматографічній колонці, а з іншого – розділення речовин за їх співвідношенням маси до заряду (m/z) [16, 17].

За допомогою методу LC-MS/MS можна розділити та кількісно визначити більшість водорозчинних речовин, що наявні у випробувальному зразку, зокрема і мікотоксини після їх специфічної фрагментації. Детектування мікотоксинів здійснюється за допомогою режиму – моніторингу множинних реакцій (MRM) іонів у процесі хроматографічного елюювання. Кількісно мікотоксини визначають за методом внутрішнього стандарту або за методом абсолютного градуювання [13, 14].

Важливо, що LC-MS/MS метод дає можливість працювати безпосередньо з неочищеними екстрактами, що значно прискорює аналіз. Даний метод дозволяє кількісно визначити одночасно декілька мікотоксинів незалежно від їхньої хімічної структури або біологічної активності [20].

У літературі описаний метод визначення афлатоксинів B_1 та M_1 у молоці-сировині за допомогою методу LC-MS/MS високої роздільної здатності у поєднанні з модифікованою пробопідготовкою QuEChERS [15].

Отже, авторами описаний метод детектування, який здатний визначити декілька мікотоксинів у молоці-сировині, та за якого застосовується уніфікована методика екстракції мікотоксинів та очищення QuEChERS, яка

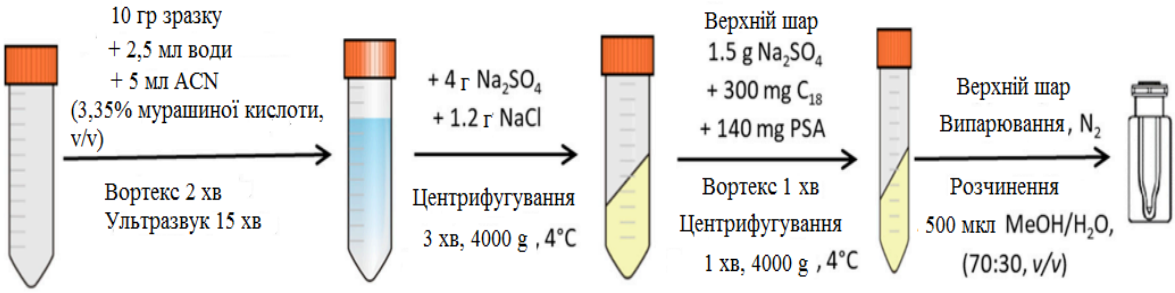

Рис.1. **Етапи модифікованої підготовки зразків QuEChERS для визначення мікотоксинів у молоці-сировині методом LC-MS/MS** [15].

може бути задіяна для екстракції також інших мікотоксинів різних класів.

На відміну від стандартної методики для екстракції пестицидів [10, 12], у модифікованому методі QuEChERS на етапі екстракції використовують 3,35 % розчин мурашиної кислоти в ацетонітрилі, а замість магнію сульфату – натрію сульфат (рис. 1). Для афлатоксинів M_1 та B_1 у молоці-сировині авторами були встановлені основні валідаційні характеристики цієї методики: повернення – 75–96 %; відносне стандартне відхилення збіжності – менше 7 %; відносне стандартне відхилення відтворюваності – менше 16 %; межа детектування – 0,001 мкг/кг та межа кількісного визначення – 0,002 мкг/кг [15].

Варто зазначити, що для проведення точного кількісного визначення мікотоксинів, необхідно враховувати матричні ефекти, які можуть суттєво вплинути на результати LC-MS/MS аналізу. Зміни результатів випробування можуть бути зумовлені впливом коекстрагованих компонентів матриці на ефективність іонізації речовини, що аналізується. Матричні ефекти зазвичай проявляються як різке зниження чутливості аналізу за рахунок пригнічення іонізації речовини, що аналізується компонентами матриці [11, 13].

З метою усунення матричних ефектів використовують для побудови градуювальної кривої не чистий розчинник, а екстракт з матриці (наприклад, молока). Таким чином, використання матричних градуювальних кривих для кількісної оцінки мікотоксинів дасть більш точніші результати аналізу, оскільки враховується матричний ефект [16, 17, 20].

Висновки. 1. Для визначення афлатоксинів у молоці та молочних продуктах застосовують імуноферментний аналіз (ІФА) та хроматографічні методи: високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) з флуоресцентним детектуванням і рідинну хроматографію з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS/MS аналіз).

2. Переваги LC-MS/MS методу аналізування: істотно спрощує процес підготовки проб, має найвищу чутливість у порівнянні з іншими методами, дає можливість розширити спектр мікотоксинів, тобто передбачає комплексне визначення декількох афлатоксинів одночасно.

3. За наявності відповідного обладнання доцільно для аналізування афлатоксинів використовувати метод високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS/MS) у поєднанні з пробопідготовкою QuEChERS.

Відомості про конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ushkalov V., Danchuk V., Midyk S., Voloshchuk N., & Danchuk O. Mycotoxins in milk and in dairy products. Food Science and Technology. 2020. Vol. 14(3). P. 137–149. Doi:https://doi.org/10.15673/fst.v14i3.1786

2. Gruber-Dorninger C., Jenkins T., Schatzmayr G. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. Toxins. 2019. Vol. 11 (7). P. 1–25.

3. Карасева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Сочетание QuEChERS и дисперсионной жидкостной микроэкстракции при определении афлатоксинов B_1 и M_1 в молоке и молочных продуктах методом ВЭЖХ. Журнал аналитической химии. 2014. Т. 69. № 5. С. 510–515.

4. Transfer of aflatoxin M1 from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods/ L. Cavallarin et al. Food Control. 2014. Vol. 38. P. 174–177.

5. 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. URL:https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/165/oj/eng (cited 15.06.2020).

6. Державні гігієнічні правила і норми "Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах": наказ МОН № 368 від 13.05.2013. Додаток. Глава 2. Мікотоксини. URL:https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0774-13#n16 (дата звернення: 20.10.2020)

7. Экспрессные методики иммуноферментного определения содержания микотоксинов в зерне, кормах и крехах/ М.Ю. Медведевских и др. Пищевая промышленность. 2018. № 2. С. 56–59.

8. ISO 14674:2005. Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M1 content – Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by thin-layer chromatography.

9. ISO 14501:2007 Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M1 content – Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography.

10. AOAC Official 2007.01 Method. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.

11. Амелин В. Г., Карасева Н. М., Третьяков А. В. Хроматографические методы определение микотоксинов в пищевых продуктах. Журнал аналитической химии. 2013. Т. 68. № 3. С. 212–223.

12. DIN EN 15662-2018 Foods of plant origin – Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/ partitioning and clean-up by dispersive SPE – Modular QuEChERS-method.

13. Flores-Flores M.E., González-Penas E. An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. Food Chemistry. 2017. Vol. 218. P. 378–385.

14. Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study/ P.A. Geary et al. J. Food Control. 2016. Vol. 68. P. 337–343.

15. Simultaneous determination of AFB1 and AFM1 in milk samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry/ Yelko Rodríguez-Carrasco et al. Beverages. 2018. Vol. 4 (43). P. 1–9.

16. Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS methods for determination of Aflatoxin M1 in natural contaminated milk samples/ J. Kos et al. Acta Chim. Slov. 2016. Vol. 63. P. 747–756.

17. Carballo D., Font G., Ferrer E., Berrada H. Evaluation of Mycotoxin Residues on Ready-to-Eat Food by Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry in Tandem. Toxins. 2018. V. 10. P. 1–13.

18. Assessment of the conformity of the methods for aflatoxin B1 and deoxynivalenol determination in grain and feeds by method of High-Performance Liquid Chromatography/ O.M. Yakubchak et al. Methods Objects Chem. Anal. 2018. Vol. 13. Issue 3. P. 121–130. Doi:https://doi.org/10.17721/moca.2018.121-130.

19. Evaluation of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for determination of avermectin residues in milk/ O.V. Bayer et al. Ukrainian Journal of Ecology. 2019. Vol. 9. Issue 4. P. 521–526. Doi: https://doi.org/10.15421/2019_784.

20. Multi-mycotoxins analysis in dried fruit by LC/MS/MS and a modified QuEChERS procedure/ I. Azaiez et al. Food Anal. Methods. 2014. Vol. 10. P. 1–12.

REFERENCES

1. Ushkalov, V., Danchuk, V., Midyk, S., Voloshchuk, N., Danchuk, O. (2020). Mycotoxins in milk and in dairy products. Food Science and Technology. Vol. 14(3), pp. 137–149. Available at:https://doi.org/10.15673/fst.v14i3.1786

2. Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G. (2019). Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. Toxins. Vol. 11 (7), pp. 1–25.

3. Karaseva, N. M., Amelyn, V. G., Tretyakov, A. V (2014). Sochetanie QuEChERS i dispersionnoj zhidkostnoj mikrojekstrakcii pri opredelenii aflatoksinov V1 i M1 v moloke i molochnyh produktah metodom VJeZhH [Combination of QuEChERS and dispersive liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1 and M1 in milk and dairy products by HPLC]. Zhurnal analytycheskoi khymyy [Journal of Analytical Chemistry]. Vol. 69, no. 5, pp. 510–515.

4. Cavallarin, L., Antoniazzi, S., Giaccone, D., Tabacco, E., Borreani, G. (2014). Transfer of aflatoxin M1 from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods. Food Control. Vol. 38, pp. 174–177.

5. 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. Available at: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/165/oj/eng (cited 15.06.2020).

6. Derzhavni hihiienichni pravyla i normy "Rehlament maksymalnykh rivniv okremykh zabrudniuiuchykh rechovyn u kharchovykh produktakh": nakaz MON № 368 vid 13.05.2013. Dodatok. Hlava 2. Mikotoksyny [State hygienic rules and norms "Regulations of maximum levels of certain contaminants in food products: Chapter 2. Mycotoxins]. Availaible at: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0774-13#n16 (date of application 20.10.2020)

7. Medvedevskykh, M. Yu., Krashenynyna, M. P., Serheeva, A. S., Shanyn, Y. A., Petukhov, P.A. (2018). Ekspressnie metodyky ymmunofermentnoho opredelenyia soderzhanyia mykotoksynov v zerne, kormakh y orekhakh [Express methods for the enzyme immunoassay for the determination of the content of mycotoxins in grain, feed and nuts]. Pyshchevaia promishlennost [Food industry]. no. 2, pp. 56–59.

8. ISO 14674:2005. Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M1 content – Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by thin-layer chromatography.

9. ISO 14501:2007 Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M1 content – Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography.

10. AOAC Official 2007.01 Method. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.

11. Amelyn, V.H., Karaseva, N.M., Tretiakov, A.V. (2013). Khromatohrafycheskye metodi opredelenye mykotoksynov v pyshchevikh produktakh [Chromatographic methods for the determination of mycotoxins in food]. Zhurnal analytycheskoi khymyy [Journal of Analytical Chemistry]. Vol. 68, no. 3, pp. 212–223.

12. DIN EN 15662-2018 Foods of plant origin – Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/ partitioning and clean-up by dispersive SPE – Modular QuEChERS-method.

13. Flores-Flores, M.E., González-Penas, E. (2017). An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. Food Chemistry. Vol. 218, pp. 378–385.

14. Geary, P.A., Chen, G., Kimanya, M.E., Shirima, C.P., Oplatowska-Stachowiak, M., Eliott, C.T., Routledge, M.N., Gong, Y.Y. (2016). Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study. J. Food Control. Vol. 68, pp. 337–343.

15. Rodríguez-Carrasco, Yelko., Izzo, Luana, Gaspari, Anna, Graziani, Giulia, Mañes, Jordi, Ritieni, Alberto. (2018). Simultaneous Determination of AFB1 and AFM1 in milk samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. Beverages. Vol. 4 (43), pp. 1–9.

16. Kos, J., Hajnal, Elizabet J., Jajic, I., Krstovic, S., Mastilovic, J., Saric, B., Jovanov, P. (2016). Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS Methods for Determination of Aflatoxin M1 in Natural Contaminated Milk Samples. Acta Chim. Slov. Vol. 63, pp. 747–756.

17. Carballo, D., Font G., Ferrer E., Berrada H. (2018). Evaluation of Mycotoxin Residues on Ready-to-Eat Food by Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry in Tandem. Toxins. Vol. 10, pp. 1–13.

18. Yakubchak, O.M., Laposha, O.A., Midyk, S.V., Taran, T.V., Zabarna, I.V. (2018). Assessment of the conformity of the methods for aflatoxin B1 and deoxynivalenol determination in grain and feeds by method of High-Performance Liquid Chromatography. Methods Objects Chem. Anal. Vol. 13, Issue 3, pp. 121– 130. Available at:https://doi.org/10.17721/moca.2018.121-130

19. Bayer, O.V., Kaminska, O.V., Bondarets, O.V., Yaremchuk,O.S.,Skoromna,O.I.,Midyk,S.V.,Shevchenko,L.V., Mykhalska, V. M., Stupak, O. M., Liniichuk, N.V. (2019). Evaluation of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for determination of avermectin residues in milk. Ukrainian Journal of Ecology. Vol. 9, Issue 4, pp. 521–526. Available at:https://doi.org/10.15421/2019_784

20. Azaiez, I., Giusti, F., Sagratini, G., Mañes, J., Fernández-Franzón, M. (2014). Multi-mycotoxins analysis in dried fruit by LC/MS/MS and a modified QuEChERS procedure. Food Anal. Methods. Vol. 10, pp.1–12.

Сравнительный анализ эффективности аналитических методов определения афлатоксинов в молоке и молочных продуктах (обзорная информация)

Сенин С.А., Данчук В.В., Мидык С.В., Ушкалов В.А., Якубчак О.Н.

Молочная промышленность Украины динамично развивается, ее потребности к качеству сырья существенно возрастают. Выявление микотоксинов в молоке-сырье является одним из основных показателей его безопасности. Высокая степень токсичности микотоксинов является угрозой здоровью лактирующих животных. Кроме того, значительное их количество секретируется с молоком. Подавляющее большинство микотоксинов утилизируется микроорганизмами преджелудков жвачных, что не происходит в моногастричных животных, поэтому перечень микотоксинов в их молоке может быть значительно шире, по сравнению с секретом молочной железы жвачных. На сегодня установлены максимально допустимые уровни (МДУ) содержания микотоксинов в молоке-сырье и молочных продуктах. Итак, комплексное определение содержания микотоксинов в секрете молочной железы имеет не только технологическое, но и важное диагностическое значение.

Подготовка проб молока является наиболее важным этапом при определении микотоксинов и состоит из отбора проб, экстракции и очистки от примесей. Для экстракции афлатоксинов используют метод жидкостной экстракции ацетонитрилом или хлороформом. Очистку экстрактов проводят на имунноафинных колонках, патронах со специальными сорбентами или используют определенных производителей (MycoSep®).

Для определения афлатоксинов B_1 и M_1 в молоке-сырье коров используют иммуноферментный анализ и высокоэффективную жидкостную хроматографию с флуоресцентным детектированием.

Однако все эти методы имеют ряд недостатков, а именно: длительная и дорогостоящая подготовка образцов и недостаточно высокая селективность. На сегодня приобретает популярность комплексное определение микотоксинов в различных матрицах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (LC-MS/MS) и использованием модифицированной подготовки образцов QuEChERS. Преимуществом этой методики является сочетание более быстрой и дешевой пробоподготовки образцов QuEChERS с высокоселективной хроматографией LC-MS/MS.

Ключевые слова: микотоксины, молоко-сырье, аналитические методы, QuEChERS.

Comparative analysis of the effectiveness of analytical methods for the determination of aflatoxins in milk and dairy products (review information)

Senin S., Danchuk V., Midyk S., Ushkalov V., Iakubchak O.

The dairy industry of Ukraine is developing dynamically, its needs for the quality of raw materials are growing significantly. Detection of mycotoxins in raw milk is one of the main indicators of its safety. The high degree of toxicity of mycotoxins is a threat to the health of the lactating animal, so a large number of them are excreted in milk. If we talk about ruminants, the vast majority of mycotoxins are utilized by microorganisms of the pancreas, which does not occur in monogastric animals, so the list of mycotoxins in their milk can be much wider than the secretion of mammalian mammals. To date, the maximum permissible levels (MRLs) of mycotoxins in raw milk and dairy products have been established. Thus, a comprehensive determination of the content of mycotoxins in the secretion of the breast has not only technological but also important diagnostic value.

Milk sample preparation is the most important step in the determination of mycotoxins and consists of sampling, extraction and purification from impurities.

For the extraction of aflatoxins, the method of liquid extraction with acetonitrile or chloroform is used. Purification of extracts is carried out on immunoaffinity columns, cartridges with special sorbents or using certain manufacturers (MycoSep®).Enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection are used to determine aflatoxin B1 and M1 in raw milk of cows.

However, all these methods have a number of disadvantages, namely: long and expensive sample preparation and insufficiently high selectivity. Currently, the complex determination of mycotoxins in various matrices by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (LC-MS/MS) and the use of modified QuEChERS sample preparation is gaining popularity. The advantage of this technique is the combination of faster and cheaper sample preparation of QuEChERS samples with highly selective LC-MS/MS chromatography.

Key words: mycotoxins, raw milk, analytical methods, QuEChERS.

Робота виконана за підтримки МОН України по проєкту: «Наукове обґрунтування критеріїв оцінки якості та безпечності молока-сировини – гармонізація до міжнародних вимог».

Copyright: © Сенін С.А. та ін. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Сенін С.А. ID https://orcid.org/0000-0001-7972-5714
Данчук В.В. ID https://orcid.org/0000-0003-2156-1758
Мідик С.В. ID https://orcid.org/0000-0002-2682-2884
Ушкалов В.О. ID https://orcid.org/0000-0001-5694-632X
Якубчак О.М. ID https://orcid.org/0000-0002-9390-6578