

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АФЛАТОКСИНІВ У КОВБАСНИХ ВИРОБАХ

Д. В. Янович, З. С. Засадна, С. М. Кіслова, Н. А. Майба, М. В. Вовк

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

Застосовано метод імуноферментного аналізу у поєднанні з використанням імуноафінних колонок для визначення вмісту афлатоксинів у ковбасних виробках у відповідності до вимог ДСТУ. Наведено дані, одержані при оцінці придатності розробленої методики підготовки різних зразків ковбасних виробів за критеріями викладеними у Рішенні Єврокомісії (2002/657/ЕС) від 12 серпня 2002 щодо виконання аналітичних методів та інтерпретації їх результатів, Рекомендаціях референс-лабораторій Євросоюзу в галузі контролю залишкових кількостей (CRLs) 20/1/2010 щодо оцінки придатності скринінгових методів для визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів та чинного законодавства України.

Характерною особливістю, яка довгий час відрізняла підприємства харчової промисловості країн колишнього Радянського Союзу від аналогічних підприємств країн ЄС та США, є відсутність системи аналізу ризиків, небезпечних чинників і контролю критичних точок (*Hazard Analysis and Critical Control Point — HACCP*). Це значною мірою вплинуло на особливості формування законодавства та нормативних вимог щодо показників безпеки харчових продуктів тваринного походження, викладених у технічних регламентах, СанПін, ГОСТ та ДСТУ країн СНД. Нормативи щодо показників безпеки готової продукції тваринного походження, яка пройшла глибоку промислову переробку, викладені у вищезгаданих документах, містять вимоги дослідження, зокрема таких продуктів, як сичужні сири та ковбасні вироби, за показниками: вміст антибіотиків та мікотоксинів. В законодавстві індустріально розвинутих країн вищезазначені вимоги стосуються тільки тваринницької сировини і не розповсюджуються на готову продукцію. Наявність на підприємствах системи HACCP не допускає можливості надходження небажаних залишків препаратів та забруднювачів у продукцію ще на етапі вхідного контролю сировини. Така норма законодавства виключає втрати, пов'язані з утилізацією небезпечної готової продукції. Небезпечні забруднення виявляються вже на етапі контролю сировини, що з одного боку дозволяє уникнути втрат, пов'язаних з її промисловою переробкою, а з другого - допомагає швидше і ефективніше провести відстеження шляхів надходження некондиційної сировини. Відповідальність виробників підприємств харчової промисловості за порушення норм, передбачає значне матеріальне, адміністративне та кримінальне покарання, що робить систему ефективною.

Одночасно варто зазначити, що контроль готової продукції тваринного походження, яка в процесі виготовлення пройшла термічну або ензиматичну обробку, за наявності додаткових смакових, ароматичних та формоутворюючих добавок, перетворюється на надскладне завдання для аналітичних лабораторій. Зважаючи на вищесказане, окремі вимоги до контролю за небезпечними речовинами в ДСТУ існують формально, аналіз їх має проводитись вибірково. Зокрема у ДСТУ 4435, 4436, 4591, що регламентують вимоги до якості ковбасних виробів, вказано норми МДР для афлатоксину В₁, передбачено проведення досліджень не рідше ніж раз на пів року, що в реальних умовах навряд чи виконується за відсутності надійних методів для таких складних і різноманітних за складом матриць. У той же час у випадку експорту продукції у інші країни СНД, виробники стикаються з

необхідністю проведення випробувань за всіма показниками, зазначеними у експортному контракті.

Із досліджених, на сьогоднішній день, більше ніж 240 видів різноманітних плісневих грибів, більшість з яких виділяє токсини, які можуть викликати захворювання людей та тварин. Гриби роду *Aspergillus* продукують афлатоксини, які є найбільш небезпечними серед вивчених токсинів і можуть утворюватись у забрудненій грибами сировині та продуктах протягом усього періоду їх зберігання.

Враховуючи високу токсичність афлатоксину В₁, введено доволі жорсткі норми максимально допустимих рівнів (МДР) у кормах та продуктах харчування. Для приготування ковбас використовують різні типи м'яса (яловичина, свинина, баранина з різним вмістом жиру), спеції, сіль, часник, вода, оброблені кишки корів або свиней або синтетичні кишки. У ДСТУ 4435, 4436, 4591, що регламентують вимоги до якості ковбас напівкопчених, варених, варено-копчених, сосисок, сардельок, вказано норми МДР для афлатоксину В₁ з посиланням на Медико-біологічні вимоги №5061-89. У МБВ передбачено однакові МДР як для сировини, так і для готової продукції, не враховуючи при цьому технологічних втрат вологи у готовому продукті і можливого концентрування афлатоксину, а також ймовірного додаткового забруднення такими компонентами, як спеції (перець чорний та білий, імбир, паприка, мускатний горіх тощо).

Вище перераховані особливості таких специфічних матриць, як ковбасні вироби, ставлять високі вимоги до методу аналізу щодо чутливості, точності та селективності.

Застосування методів тонкошарової та рідинної хроматографії, для визначення афлатоксинів, у таких порівняно простих матрицях, як зернові, не задовольняють вимогам аналізу готових продуктів харчування. Важливою характеристикою методики є також швидкість її виконання, яка повинна забезпечити продуктивність роботи лабораторії.

З метою забезпечення контрольних лабораторій методикою, яка відповідає усім вищезгаданим вимогам, та придатна для випробувань ковбасних виробів, нами було запропоновано метод імуноферментного аналізу, який застосовується при аналізі інших матриць для скринінгового аналізу відповідно до вимог Директиви 2002/657/ЕС і може забезпечити достовірність результатів не нижче 95% в межах хибної відповідності на очікуваному рівні.

Матеріали і методи. *Реактиви та матеріали.* Метанол (Lab-scan, Ірландія), імуноафінні колонки Aflatoxin column № R5001 фірми R-biopharm (Німеччина), тест-набір Ridascreen Aflatoxin В₁ 30/15 Art. No.: R1211 фірми R-biopharm (Німеччина) (згідно м/в ДКВМ № 1 від 21 грудня 2012 року). Розчин афлатоксину В₁ концентрацією 2,02 мкг/мл LGS-standart (Німеччина). Гомогенізатор тканин Ultra Turrax, ІКА Т 25, Німеччина. Кількісну оцінку кольорової реакції у мікротитрувальних полістеролових планшетах проводили на планшетному рідері Titertek Multiskan MCC, Німеччина, довжина хвилі поглинання – 450 нм. Розрахунок вмісту афлатоксинів у зразках проводили з використанням комп'ютерної програми RIDAWIN.

Об'єкт дослідження: ковбаси варені, напівкопчені та копчені.

Результати й обговорення. Для розробки методики було відібрано зразки варених, напівкопчених та копчених ковбас, виготовлених на підприємствах області. При підготовці зразків ковбасних виробів до випробувань застосовували запропоновану виробником імуноафінних колонок схему екстрагування мікотоксинів 70% розчином метанолу. Процедура екстрагування метанолом, яка застосовується для інших типів матриць, була модифікована у відповідності до специфічних особливостей матриці зразків. Попередньо подрібнені ножем наважки зразків ковбасних виробів гомогенізували протягом 60 сек. у 70% розчині метанолу до однорідної маси за використання гомогенізатора тканин. Екстрагування афлатоксинів продовжували за ретельного перемішування зразків на ротаційному змішувачі протягом 10 хв. Після центрифугування, аліквоту одержаного екстракту розводили

бідистильованою водою у співвідношенні 1:3. Наявність високого вмісту жирів в ковбасних виробках вимагає застосування додаткової процедури знежирення одержаних екстрактів. Із кількох можливих варіантів знежирення найбільш ефективною виявилась процедура із застосуванням гексану. Після 3-хвилинного знежирення і наступного центрифугування, нижню фракцію екстракту переносили в чисту пробірку для подальшого очищення методом імуноафінної препаративної хроматографії із застосуванням імуноафінних колонок.

Враховуючи можливий вплив екстрактів матриць ковбасних виробів на іммобілізовані на стаціонарній фазі специфічні антитіла, нами перевірялись значення рН одержаних екстрактів. Величина рН екстрактів знаходилась у межах 5,9 – 7,1, що відповідає умовам необхідним для взаємодії епітопа аналіту та паратопа специфічних антитіл. Aflatoxin column № R5001 фірми R-biopharm (Німеччина) містять антитіла, специфічні до афлатоксинів В1, В2, G1, G2. Одержані на попередніх етапах обезжирені екстракти, вносили в імуноафінні колонки згідно з інструкцією по використанню та проводили очищення та концентрування зразка. Після додаткового промивання стаціонарної фази, вимивання іммобілізованого антитілами аналіту проводили аліквотом 0,5 мл концентрованого метанолу. Одержаний розчин аналіту в метанолі, розводили бідистильованою водою у співвідношенні 1:10. Одержаний розчин придатний для подальшого визначення вмісту афлатоксину методом імуноферментного аналізу. Для визначення застосовували тест-набори Ridascreen Aflatoxin В1 30/15 згідно з інструкцією виробника.

Вивчення ефективності різних процедур знежирення зразків оцінювалось за показниками відсотків витягу аналіту та зменшення впливу матриці на аналітичний сигнал. За умов знежирення гексаном в три етапи, при додаванні свіжих порцій гексану, одержано найвищий відсоток витягу аналіту із зразків з концентрацією 5 мкг/кг — 44,8%. Найбільша ефективність знежирення досягнута за промивання гексаном екстрактів, що містили 70% метанол. За одержаними даними встановлено, що ефективність процедури знежирення впливає на витяг аналіту, внесеного у зразок, та зменшує неспецифічне зв'язування антитіл в планшеті, що виражається в збільшенні оптичної щільності, одержаної у чарунках, які містили контрольні зразки.

Оцінка придатності запропонованої методики проводилась за критерієм “додано-отримано”. За відсутності контрольних (чистих) референтних матриць, використовували зразки продукції, для яких попередньо було одержано найнижчі значення вмісту цільового аналіту. Збагачення вибраних зразків проводилось стандартними розчинами афлатоксину В1 з розрахунку на вміст цільового аналіту в зразках на рівні значення ½ МДР та 1 МДР 2,5 та 5 мкг/кг відповідно.

При встановленні показника „технічний поріг методики” вивчався вплив відмінності складу та технології виготовлення різних видів продукції. Зразки відібраних різноманітних ковбасних виробів (варені, напівкопчені, копчені) та приготовленого модельного контрольного зразок (термічно оброблений змішаний м'ясний фарш з додаванням сала та солі) готувались за вищевикладеною методикою з використанням триступеневого знежирення екстракту гексаном. Збагачення контрольних зразків проводили до рівня 5 мкг/кг стандартним розчином афлатоксину В1. Одержані результати вмісту афлатоксину В1 наведено в таблиці.

Таблиця

Результати дослідження зразків ковбасних виробів на вміст афлатоксину В1

Назва зразків	Кількість афлатоксину мкг/кг
Контрольний зразок	0,92±0,07
Контрольний зразок навантажений на рівні 5 мкг/кг	6,52±0,39
Ковбаса варена	0,99±0,05
Ковбаса напівкопчена	1,21±0,08
Ковбаса копчена	1,04±0,11

Для модельних зразків отримано середнє значення сигналу відповіді $0,92 \pm 0,07$ мкг/кг, що вказує на незначне неспецифічне зв'язування антитіл матрицею, а для навантажених контрольних зразків стандартом В₁ на рівні МДР (5 мкг/кг) – $6,52 \pm 0,39$ мкг/кг. Для серії контрольних зразків можна обчислити граничне значення або “технічний поріг” Т:

$$T = B + 1,64 \times SDb,$$

де: В – середнє значення відповіді;

SDb – стандартне відхилення значень порожніх зразків.

Для серії навантажених зразків обраховують середнє значення відповіді М та стандартне відхилення SD їх відповіді. В подальшому обчислюють “фактор відсікання” Fm:

$$Fm = M - 2,33 \times SD,$$

де: М – середнє значення відповіді;

SD – стандартне відхилення значень збагачених зразків.

У даному випадку технічний поріг методики становить 1,08 мкг/кг і лінія відсікання для даної методики — 5,88 мкг/кг (рис.). Таким чином, усю продукцію, для якої одержано результати випробувань на вміст афлатоксину В₁, менші за значення лінії відсікання, можна вважати такими, що відповідають вимогам ДСТУ 4435:2005, 4436:2005, 4591:2009.

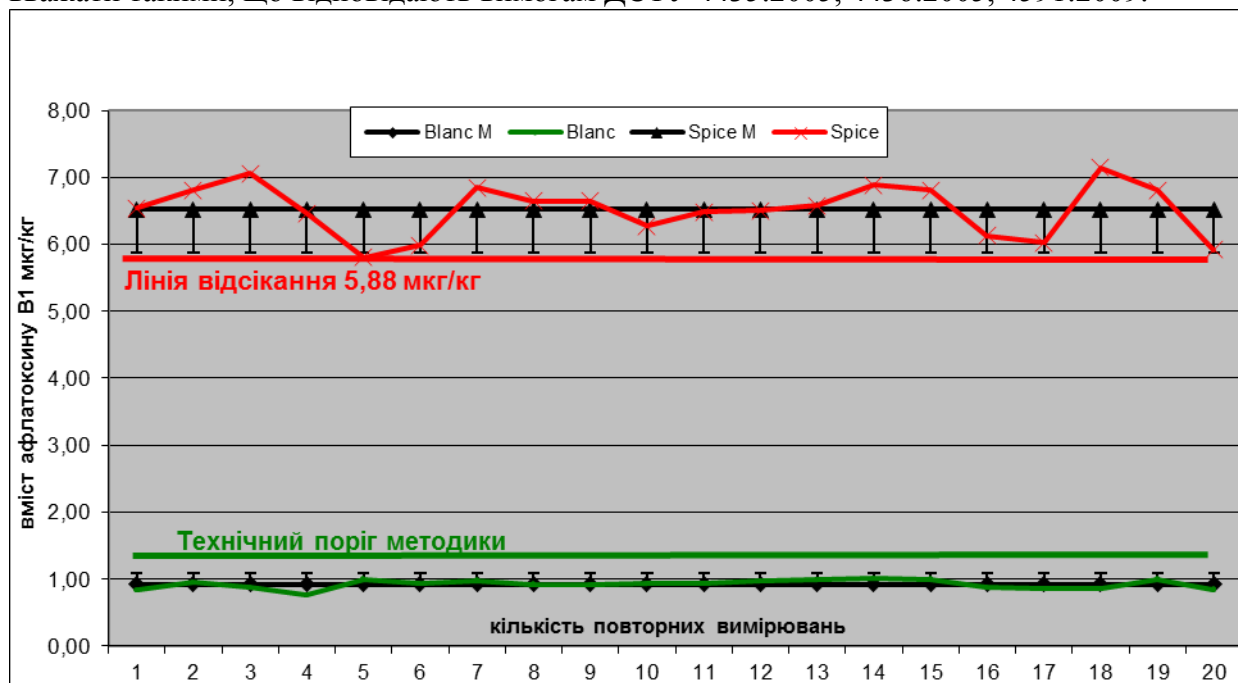


Рис. Графічне подання межі відсікання при визначенні афлатоксину В₁ в ковбасних виробках (межа прийняття рішення 5 мкг/кг)

Використання імуноафінних колонок, які є специфічними також для афлатоксинів В₂, G₁ та G₂ дозволить визначати у зазначеній продукції загальний вміст афлатоксинів.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено нову методику підготовки зразків різних типів ковбасних виробів для визначення афлатоксину В₁ з використанням імуноафінних колонок для проведення скринінгових досліджень.

2. Згідно з проведеною за скороченою схемою валідацією, дана методика може застосовуватись для контролю різних типів ковбасних виробів з метою визначення як загального вмісту афлатоксинів так і афлатоксину В₁ скринінг-методом.

Перспективи подальших досліджень. Буде апробовану розроблену методику підготовки зразків для проведення досліджень викритих позитивних зразків скринінг-методом методом підтвердження високоефективною рідинною хроматографією.

DETERMINATION AFLATOXIN CONTENT IN SAUSAGE PRODUCTS

D. Yanovych, Z. Zasadna, S. Kislova, N. Maiba, M. Vovk

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additive

S U M M A R Y

ELISA method used in conjunction with immune-affinity column for the determination of aflatoxins in sausage products in accordance with Standard Documents Ukraine. The data obtained in assessing the suitability methods for various samples of sausages on the criteria set out in the Commission Decision (2002/657 / EC) of 12 August 2002 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of the results, Recommendations EU reference laboratories in the control of residual amounts (CRLs) 20/1/2010 to assess the suitability of screening methods for the determination of residual amounts of veterinary drugs and laws of Ukraine.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АФЛАТОКСИНОВ В КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЯХ

Д. Янович, З. Засадная, С. Кислова, Н. Майба, М. Вовк

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

Использовано метод иммуноферментного анализа совместно с иммуноаффинными колонками для определения содержания афлатоксинов в колбасных изделиях в соответствии с требованиями ГОСТ. Приведено данные, полученные при оценке пригодности разработанной методики подготовки разнообразных образцов колбасных изделий за критериями, описанными в Решении Еврокомиссии (2002/657/ЕС) от 12 августа 2002 относительно проведения аналитических методов и интерпретации полученных результатов, Рекомендациях референс-лабораторий Евросоюза относительно контроля остаточных количеств (CRLs) 20/1/2010 по оценке пригодности скрининг-методов для определения остаточных количеств ветеринарных препаратов, действующего законодательства Украины.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of the results.
2. Методичні вказівки з оцінки придатності методик імуноферментного аналізу для скринінгового визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів та забруднювачів у харчовій сировині тваринного походження: Методичні вказівки / І. Я. Коцюмбас, Д. В. Янович, З. С. Засадна та ін. — Л., 2011. — 23 с.
3. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.

4. Методичні вказівки по кількісному визначенню афлатоксину В₁ у злаках, кормах та продуктах харчування тест-системою Рідаскрин Афлатоксин В₁ 30/15 / Д. В. Янович, З. С. Засадна, О. М. Паздерська та ін. — Л., 2012. — 9 с.

5. Методичні вказівки по застосуванню імуноафінних колонок при підготовці зразків кормів та продуктів харчування для кількісного визначення вмісту афлатоксинів хроматографічними методами / Д. В. Янович, Н. В. Біронт, О. І. Федякова та ін. — Л., 2014. — 8 с.