

ПИЩЕВЫЕ СИСТЕМЫ

Обзорная статья

УДК 637.074

Современные методы определения контаминации молока афлатоксином М₁

Антонида Викторовна Чернова¹, Анастасия Вячеславовна Петроченкова²

^{1,2}Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
Владивосток, Россия

¹ Chernova.av@dgtru.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8143-7228>

² nastya-petrochenkova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0520-3045>

Аннотация. Афлатоксины – это тесно связанные вторичные метаболиты плесневых грибов *Aspergillus flavus* и *A. parasitica*, представляющие собой опасные органические соединения, которые при попадании в организм могут вызвать неблагоприятные последствия как для людей (канцерогенное и мутагенное действие, серьезные поражения почек и печени, иммунодефицит), так и для животных (поражения печени, хронические отравления, генные мутации). Грибы, продуцирующие афлатоксины, широко распространены в природе и серьезно загрязняют пищевые запасы людей и животных, что приводит к опасности для их здоровья. Контроль за загрязнением пищевых продуктов афлатоксином М₁, содержащимся в молоке животных, в нынешнее время имеет особое значение. Поэтому существует спрос на изучение афлатоксинов для разработки методов их количественного определения с целью обеспечения безопасности. На основе анализа отечественных и зарубежных данных в статье представлены общие сведения, касающиеся микотоксинов (токсичность, свойства, механизм действия), а также рассмотрены и проанализированы методы определения содержания афлатоксина М₁ в коровьем молоке (ВЭЖХ, ИФА, ТСХ, экспресс-методы), выявлены преимущества и даны рекомендации по применению экспресс-методов определения контаминанта в молоке с целью оценки его соответствия требованиям технических регламентов.

Ключевые слова: афлатоксин М₁, молоко, микотоксины, метод, определение афлатоксина М₁, безопасность

Для цитирования: Чернова А.В., Петроченкова А.В. Современные методы определения контаминации молока афлатоксином М₁ // Научные труды Дальрыбвтуза. 2022. Т. 62, № 4. С. 25–33.

FOOD SYSTEMS

Review article

Modern methods for determining the contamination of milk with aflatoxin M₁

Antonida V. Chernova¹, Anastasia V. Petrochenkova²

^{1,2}Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok, Russia

¹ Chernova.av@dgtru.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8143-7228>

² nastya-petrochenkova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0520-3045>

Abstract. Aflatoxins are closely related secondary metabolites of the mold fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasitica*, which are dangerous organic compounds that, if ingested, can cause adverse effects for humans (carcinogenic and mutagenic effects, serious damage to the kidneys and liver, immunodeficiency), and for animals (liver damage, chronic poisoning, gene mutations). Aflatoxin-producing fungi are widely distributed in nature and seriously contaminate the food supply of people and animals, which leads to a danger to their health. The control of contamination of food products with aflatoxin M₁ contained in animal milk is of particular importance at the present time. Therefore, there is a demand for the study of aflatoxins in order to develop methods for their quantification in order to ensure safety. Based on the analysis of domestic and foreign data, the article presents general information related to mycotoxins (toxicity, properties, mechanism of action), as well as reviewed and analyzed methods for determining the content of aflatoxin M₁ in cow's milk (HPLC, ELISA, TLC, express methods), identified advantages and recommendations are given on the use of express methods for determining a contaminant in milk in order to assess its compliance with the requirements of technical regulations.

Keywords: aflatoxin M₁, milk, mycotoxins, method, determination of aflatoxin M₁, safety

For citation: Chernova A.V., Petrochenkova A.V. Modern methods for determining the contamination of milk with aflatoxin M₁. *Scientific Journal of the Far Eastern State Technical Fisheries University*. 2022; 62(4):25–33. (in Russ.).

Введение

Микотоксины как наиболее значительная группа загрязнителей сырья и пищевых продуктов представляют опасность вследствие их широкого распространения и способности заражать как сырье, так и пищевые продукты на всех этапах производства, что делает проблему контаминации продуктов микотоксинами наиболее актуальной.

Микотоксины – это токсичные соединения, которые естественным образом вырабатываются определенными видами плесневых грибов и присутствуют почти на всех сельскохозяйственных товарах во всем мире. Эти соединения встречаются как в кормах, так и в пище. Они невидимы, безвкусны, химически стабильны и устойчивы к температурам и хранению [1, 2].

В настоящее время зарегистрировано около 400 видов микотоксинов, но наиболее распространенными и опасными для здоровья человека являются афлатоксины. Они представляют собой вторичные метаболиты, продуцируемые грибами *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* и *Aspergillus niger* при определенных условиях выращивания и хранения.

Вопрос контроля за загрязнением пищевой продукции микотоксинами является актуальным в нынешнее время из-за периодических вспышек отравлений, которые происходят повсеместно, и решается не только внутри отдельных стран, но и на международном уровне, находясь под контролем Всемирной организации здравоохранения [1].

Полное предотвращение заражения продукции микотоксинами практически невозможно, поэтому предприятиям необходимо уделять особое внимание контролю содержания микотоксинов в продукции и сырье.

Воздействие некоторых пищевых микотоксинов является наиболее острым, при этом симптомы тяжелых заболеваний быстро проявляются после употребления пищевых продуктов, загрязненных микотоксинами. Другие микотоксины, содержащиеся в пищевых продуктах, связаны с долгосрочным воздействием на здоровье, включая развитие онкологических заболеваний и иммунодефицита. Из нескольких сотен микотоксинов, идентифицированных на сегодняшний день, около дюжины привлекли наибольшее внимание из-за их серьезного воздействия на здоровье человека и их присутствия в продуктах питания [2].

Микотоксины появляются в пищевой цепи в результате заражения сельскохозяйственных культур плесенью как до, так и после сбора урожая. Даже если внешне признаки отсут-

ствуют, продукция все равно может быть заражена. Воздействие может происходить либо непосредственно при употреблении зараженной пищи, либо косвенно от животных, которых кормят зараженными кормами.

Молоко как продукт, входящий в состав диетического питания и составляющий основу рациона детей, социально значим. Его качество напрямую зависит от кормового рациона животных, состоящего из растительного сырья, наиболее часто подвергающегося заражению микотоксинами [2].

Загрязнение молока афлатоксином M_1 происходит главным образом в результате превращения афлатоксина B_1 , который метаболизируется ферментами, обнаруживаемыми в основном в печени. После образования афлатоксина M_1 он выделяется с молоком животных. Поскольку афлатоксин M_1 влияет на возникновение онкологических заболеваний у людей, его уровень строго регламентируется [2].

Так как афлатоксины являются значимым контролируемым показателем безопасности молока и представляют серьезную угрозу для людей и животных, практически каждая страна установила максимально допустимые уровни для этих соединений в кормах, продуктах питания, в частности, в молоке.

Афлатоксины могут содержаться не только в сыром молоке, но также в стерилизованном и пастеризованном, в йогуртах, сыре, сухом молоке, детских смесях, молочных продуктах и даже грудном молоке.

Целью данной работы является исследование и анализ известных методов определения содержания афлатоксина M_1 в коровьем молоке с целью оценки его соответствия требованиям технических регламентов.

Результаты и их обсуждение

В России содержание афлатоксина M_1 устанавливает технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции».

ТР ТС 021/2011 определяет максимально допустимую концентрацию афлатоксина M_1 в молоке и молочных продуктах на уровне 0,0005 мг/кг, а по ТР ТС 033/2013 уровень афлатоксина M_1 в молочных продуктах не должен превышать 0,00002 мг/кг. Такое различие в значениях нормируемых показателей обусловлено тем, что в ТР ТС 033/2013 данный показатель определяется для детского питания. Данная тема вызывает озабоченность здравоохранения, поскольку именно дети зависят от молока как основного источника питательных веществ, поэтому они наиболее подвержены риску воздействия афлатоксинов и их последствий.

Также в ТР ТС 033/2013 содержатся разграничения для питания детей разных возрастных групп: детей раннего возраста, дошкольного/школьного, но допустимый уровень содержания афлатоксина M_1 при этом не изменяется. В обоих случаях показатель не должен превышать 0,00002 мг/кг.

В зарубежных странах также нормируется содержание афлатоксина M_1 в молоке и в молочной продукции (табл. 1) [7].

Исходя из данных табл. 1 можно заметить, что в Европейском союзе установлены наиболее высокие требования к уровню содержания афлатоксина M_1 в молочной продукции. В целом развитые страны озабочены содержанием этого контаминанта в молочных продуктах и строго его регламентируют.

Афлатоксин M_1 относительно стабилен как токсичное соединение в сыром и уже переработанном молоке, и дальнейшая обработка, такая как пастеризация, не уничтожит его и не превратит в менее токсичное соединение.

Так как молочная продукция является основным питательным веществом для людей, особенно детей, афлатоксин M_1 в молочной продукции следует систематически контролировать, используя различные качественные и количественные методы определения.

Таблица 1

Максимально допустимые уровни содержания афлатоксина М₁ в молоке и в молочной продукции (мировые и российские регламенты)

Table 1

Maximum permissible levels of aflatoxin M₁ in milk and dairy products (world and Russian regulations)

Страна	Пищевой продукт	Максимально допустимый уровень, мг/кг
1	2	3
Европейский союз	Сырое молоко, термически обработанное молоко и молоко-сырье	<0,000050
	Смеси для грудных детей и последующие смеси, в том числе детское и последующее молоко	<0,000025
Соединенные Штаты Америки	Молоко и молочные продукты	<0,00050
Российская Федерация	Молоко и продукты переработки молока	<0,00050
	Молоко и продукты переработки молока для питания детей разных возрастных групп	<0,00002

В настоящее время существуют различные нормативные документы, содержащие методы определения афлатоксина М₁ в молоке. Рассмотренные методы представлены в табл. 2.

Таблица 2

Методы определения содержания афлатоксина М₁ в молоке и молочных продуктах

Table 2

Methods for determining the content of aflatoxin M₁ in milk and dairy products

Наименование документа	Метод измерения	Содержание метода
1	2	3
ГОСТ 34049-2017 «Молоко и кисломолочные продукты. Определение содержания афлатоксина М ₁ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием» [3]	Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ)	Согласно данному методу диапазон измеряемых значений составляет от 0,00002 до 0,00015 мг/кг. Процедуры метода: - экстракция афлатоксина; - очистка экстракта; - перевод афлатоксина в флуоресцирующее соединение и определение массовой доли афлатоксина
ГОСТ ISO 14675-2014 «Молоко и молочные продукты. Руководящие указания по стандартизованному описанию конкурентоспособных иммуноферментных анализов. Определение содержания афлатоксина М ₁ » [4]	Метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА)	Метод основан на способности антител связываться со специфическими веществами. Обратимая связь между антителами и их соответствующими антигенами называется иммунологической реакцией. Метод основан на способности антител связываться с афлатоксином и образовывать комплекс антитело-антиген

Окончание табл. 2

1	2	3
ГОСТ 30711-2001 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В ₁ и М ₁ » [6]	Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ)	Метод основывается на выделении афлатоксинов В ₁ и М ₁ из образца продукта, очистке посторонних веществ и измерении массовой концентрации афлатоксинов методом тонкослойной хроматографии. Диапазон измеряемых содержаний для молочной продукции варьируется в диапазоне: 0,0005–0,005 мг/кг
ГОСТ 33601-2015 «Молоко и молочная продукция. Экспресс-метод определения афлатоксина М ₁ » [5]	Экспресс-метод определения афлатоксина М ₁ с применением тест-набора «IDEXX SNAP Афлатоксин М ₁ »	Метод основан на визуальном оценивании изменения окраски тестовых пятен реакции по комплексообразованию афлатоксина М ₁ со специфическим реагентом
ГОСТ 33601-2015 «Молоко и молочная продукция. Экспресс-метод определения афлатоксина М ₁ » [5]	Экспресс-метод определения афлатоксина М ₁ с применением тест-набора «Aflasensor»	Метод основан на визуальном выявлении свободных меченых белковых рецепторов на индикаторных полосках хроматографической бумаги. Диапазон измеряемых содержаний для молочной продукции варьируется в диапазоне от 0,00002 до 0,00015 мг/кг. Суть теста – хроматографическое разделение и цветовая идентификация антител, связанных и не связанных с молекулами афлатоксина М ₁ . По итогу используют устройство Readsensord, которое определяет содержание афлатоксина

Среди известных методов скрининга иммуноферментный анализ (ИФА) используется наиболее часто, но не является полностью надежным из-за осуществления перекрестных реакций. Метод имеет ряд преимуществ: наборы для ИФА дешевы и просты в использовании, не требуют обширной очистки образцов, также отсутствует опасность для здоровья человека. Серьезным недостатком метода является длительность анализа (3–4 ч).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) считается наиболее универсальным методом определения афлатоксина М₁. Хотя многие хроматографические методы очень чувствительны, но они требуют подготовки квалифицированного персонала, громоздкой предварительной обработки образцов и дорогостоящего оборудования.

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) наиболее точен при анализе афлатоксинов. Однако сложность в эксплуатации оборудования, высокие требования к квалификации персонала, трудности при предварительной подготовке и обработке образцов ограничивают возможности данного метода условиями лабораторий, поэтому он неприменим в «полевых» условиях. Также метод достаточно длителен и требует применения токсичных растворителей.

Хоть хроматографические методы и являются наиболее универсальными, тем не менее они громоздки, требуют дополнительной подготовки образцов и использования дорогостоящего оборудования. Это приводит к значительному ограничению их использования в условиях лабораторий. Именно поэтому возникла необходимость в разработке более простых и чувствительных методов анализа афлатоксинов, основанных на иммунохимии (например, метод ИФА). Такие методы требуют квалифицированных и хорошо обученных операторов.

Для наиболее упрощенного использования были разработаны универсальные тест-наборы, позволяющие определять афлатоксины вне условий лаборатории.

Наиболее быстрым и относительно экономичным является экспресс-метод с применением тест-наборов различных производителей. Тесты просты в использовании и обеспечивают быстрое обнаружение афлатоксинов на первых стадиях технологического процесса в течение нескольких минут (около 10 мин). Это экономичные устройства, которые могут быть адаптированы для ежедневного мониторинга афлатоксинов. Хотя данный метод и является менее дорогостоящим и быстрым по скорости выполнения анализа, предпочтение все же отдается лабораторным методам: высокоэффективной жидкостной хроматографии, иммуноферментному анализу, тонкослойной хроматографии. Экспресс-метод целесообразно использовать при необходимости обнаружения афлатоксина в составе молока, но для количественного определения вещества следует прибегнуть к более точным методам.

На рис. 1 представлен тест-набор Aflasensor, принцип работы которого основан на визуальном выявлении свободных меченых белковых рецепторов на индикаторных полосках хроматографической бумаги [5].

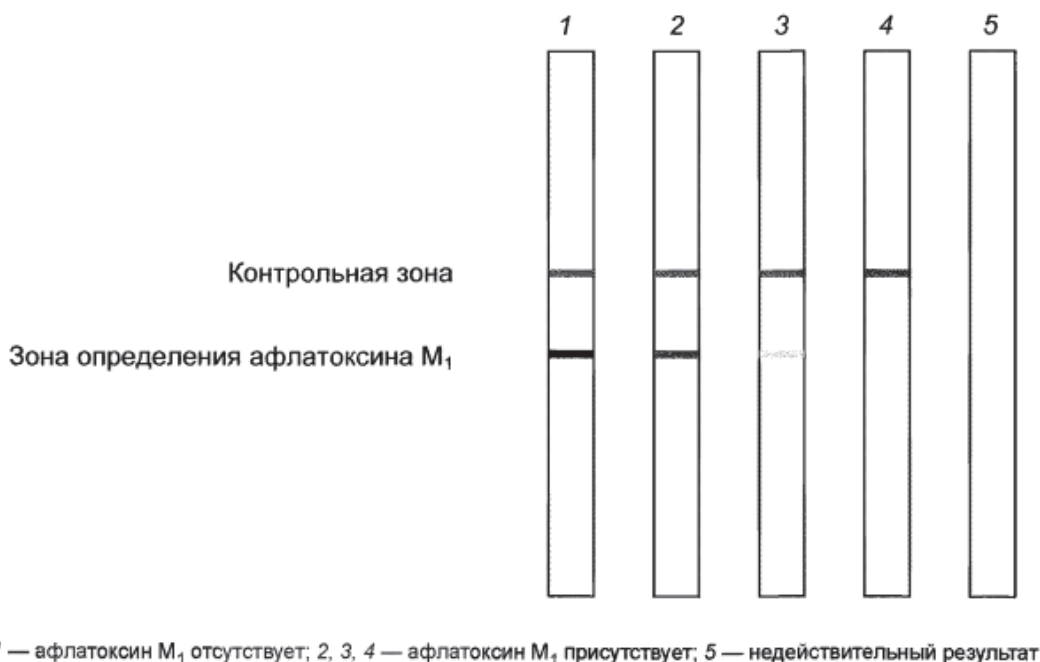


Рис. 1. Пример оценки результатов определения наличия афлатоксина M_1 с применением тест-набора Aflasensor

Fig. 1. An example of evaluating the results of determining the presence of aflatoxin M_1 using the Aflasensor test kit

Результаты теста обрабатываются путем сравнения интенсивности окрашивания зоны определения афлатоксина M_1 в красный цвет с контрольной линией (в области контрольной зоны), появившейся на индикаторной полоске после измерения.

На рис. 2 представлен тест-набор «IDEXX SNAP Афлатоксин M_1 », работа которого основана на визуальном оценивании изменения окраски тестовых пятен реакции по комплексообразованию афлатоксина M_1 со специфическим реагентом [5].

Анализ заключается в визуальном считывании тестового пятна и его сравнении с контрольным пятном. Тестовое пятно светлее контрольного дает положительный результат, темное или такое же по цвету – отрицательный [5].



Рис. 2. Компонентный состав теста «IDEXXSNAP Афлатоксин M₁»
 Fig. 2. Component composition of the test «IDEXX SNAP Aflatoxin M₁»

Заключение

Борьба с афлатоксинами требует комплексного подхода, при котором контроль производится на всех этапах производства молока. Наиболее эффективным способом предотвращения загрязнения молока афлатоксином M₁ является снижение его содержания в кормах и добавках, используемых в молочном скотоводстве.

Афлатоксины – опасные органические соединения, которые при попадании в организм даже в незначительном количестве оказывают негативное влияние. При потреблении зараженного корма коровами токсин уже через пару часов обнаруживается в молоке (максимальную концентрацию можно обнаружить через 24 ч). Потребляя зараженное молоко, человек получает дозу яда, который в большом количестве вызывает смерть из-за серьезного поражения печени. Для разрешения проблемы необходимо систематически исследовать все процессы от сбора сырья для изготовления корма животным до распределения продукции, с целью выявления этапов, на которых происходит загрязнение микотоксинами, чтобы своевременно принимать профилактические или контрольные меры.

Учитывая, что качество получаемого от коров молока является наиболее важным фактором, влияющим на уровень загрязнения молочных продуктов афлатоксином M₁, и процессы, происходящие на молокоперерабатывающем заводе, не играют никакой роли в появлении этого микотоксина, производители должны избегать приема зараженного молока на переработку, чтобы улучшить качество и безопасность своей продукции.

Идеального метода определения содержания афлатоксина M₁ в молоке, который отвечал бы требованиям экономичности, доступности оборудования и реактивов, простоты выполнения работ, не существует. Каждому методу присущи свои преимущества и недостатки. Определение того, какую технологию использовать, зависит от требуемого уровня чувствительности и от того, где предполагается проводить анализ токсинов. Для скрининга афлатоксинов в «полевых» условиях экспресс-метод является предпочтительным вариантом. Для высокоточных лабораторных анализов можно использовать как ИФА, так и ТСХ, ВЭЖХ. Для

количественного определения микотоксинов в широком диапазоне метод тонкослойной хроматографии является идеальной технологией.

До тех пор, пока существуют условия, благоприятные для загрязнения афлатоксином М₁ продуктов питания и животных кормов, его содержание в молочной продукции будет оставаться проблемой, требующей постоянного мониторинга из-за серьезных последствий, которые он может вызвать для здоровья человека, особенно подрастающего поколения.

Молочным предприятиям необходимо разрабатывать и внедрять правила и системы контроля, основанные на современных методах, которые будут регулировать содержание микотоксинов в молоке и продуктах молочного происхождения, обеспечивая тем самым качество и безопасность продуктов питания.

Список источников

1. Абдуллаева Л.В. Контроль показателей безопасности молока и молочной продукции // Молочная промышленность. 2013. № 9. С. 53–54.
2. Аспандиярова М. Афлатоксин М₁: контролируем просто // Животноводство России. 2016. № S3. С. 28–30.
3. ГОСТ 34049-2017. Молоко и кисломолочные продукты. Определение содержания афлатоксина М₁ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим (спектрофлуориметрическим) детектированием. Введ. 2020-07-01. М.: Стандартиформ, 2020. 19 с.
4. ГОСТ ISO 14675-2014. Молоко и молочные продукты. Руководящие указания по стандартизованному описанию конкурентоспособных иммуноферментных анализов. Определение содержания афлатоксина М₁. Введ. 2022-01-01. М.: Российский институт стандартизации, 2021. 7 с.
5. ГОСТ 33601-2015. Молоко и молочная продукция. Экспресс-метод определения афлатоксина М₁. Введ. 2016-07-01. М.: Стандартиформ, 2019. 7 с.
6. ГОСТ 30711-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В₁ и М₁. Введ. 2002-07-01. М.: Издательство стандартов, 2019. 13 с.
7. Науменко Н.В., Ботвинникова В.В., Сотникова В., Грживна Л., Белоглазова Н.В. Микотоксины и безопасность продуктов питания: явные и скрытые угрозы // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2020. № 1. С. 105–111.

References

1. Abdullayeva L.V. Control of safety indicators of milk and dairy products // Dairy industry. 2013. No. 9. pp. 53-54.
2. Aspandiyarova M. Aflatoxin M₁: we control simply // Animal Husbandry of Russia. 2016. No. S3. P. 28–30.
3. GOST 34049-2017. Milk and fermented milk products. Determination of the content of aflatoxin M₁ by high-performance liquid chromatography with fluorimetric (spectrofluorimetric) detection. Introduction. 2020-07-01. M.: Standartinform, 2020. 19 p.
4. GOST ISO 14675-2014. Milk and dairy products. Guidelines for the standardized description of competitive enzyme immunoassays. Determination of aflatoxin M₁ content. Introduction. 2022-01-01. M.: Russian Institute of Standardization, 2021. 7 p.
5. GOST 33601-2015. Milk and dairy products. Express method for determining aflatoxin M₁. Introduction. 2016-07-01. M.: Standartinform, 2019. 7 p.

6. GOST 30711-2001. Food products. Methods for detecting and determining the content of aflatoxins B1 and M1. Introduction. 2002-07-01. М.: Publishing House of Standards, 2019.13 p.

7. Naumenko N.V., Botvinnikova V.V., Sotnikova V., Grzhivna L., Beloglazova N.V. Mycotoxins and food safety: obvious and hidden threats // Bulletin of the South Ural State University. Series: Food and Biotechnology. 2020. No. 1. P. 105–111.

Информация об авторах

А.В. Чернова – старший преподаватель кафедры «Управление техническими системами», SPIN-код: 7330-0188, AuthorID: 1015935;

А.В. Петроченкова – студент.

Information about the authors

A.V. Chernova – Senior Lecturer of the Department of Management of Technical Systems;

A.V. Petrochenkova – Student.

Статья поступила в редакцию 21.11.2022, одобрена после рецензирования 23.11.2022, принята к публикации 02.12.2022.

The article was submitted 21.11.2022, approved after reviewing 23.11.2022, accepted for publication 02.12.2022.