

Determination of T-2 and HT-2 Toxin in Wheat Grain by HPLC with Fluorescence Detection

O.A. Laposha[†], S.A. Senin[†], S.V. Midyk^{†*}, O.M. Iakubchak[†], T.V. Taran[†], I.V. Zabarna[‡], L.M. Ishchenko[†], V.D. Ishchenko[†], V.O. Ushkalov[†]

[†] National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Potechina Str, 16, Kyiv, 03041;

*e-mail: svit.mid@gmail.com

[‡] The State Agrarian and Engineering University in Podilia, 13 Shevchenko Str, Kamianets-Podilskyi, 32300, Ukraine

Received: July 11, 2019; Accepted: December 09, 2020

DOI: 10.17721/moca.2020.137-143

The procedure of the T-2 and HT-2 toxins determination in wheat grain was developed by high performance liquid chromatography according to the following criteria: specificity, linearity, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), trueness (recovery), precision, stability. It was found that the correlation coefficient (R^2) for T-2 and HT-2 toxin was 0.9999. Mean recoveries from (R, %) for T-2 and HT-2 toxin at the level of 50–150 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ from wheat (sample blank) were 91 and 87%, respectively. The relative standard deviation (RSD, %) of the measurement results under conditions of repeatability and intra-laboratory precision ranged from 0.23 to 3.93%. The limits of quantification of the method for T-2 and HT-2 toxin was 2.2 and 1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. These data are within the range of acceptable minimum levels in accordance with Commission Regulation (EC) No 401/2006. It is confirmed that the standards of T-2, HT2 toxins in solutions can be stored up to 7 days in a freezing chamber, a refrigerator and at room temperature in a tightly closed container without actual loss of concentration. It was found that T-2 and HT-2 in a solution cannot be stored in a lit place, because according to the data obtained, sunlight leads to the destruction of these mycotoxins by 52% and 59%, respectively.

Keywords: mycotoxins, T-2 toxin, HT-2 toxin, wheat, grain, high-performance liquid chromatography

Визначення Т-2 та НТ-2 токсинів у зерні пшениці методом ВЕРХ з флуоресцентним детектуванням

О. А. Лапоша[†], С.А. Сенін[†], С.В. Мідик^{†*}, О.М. Якубчак[†], Т.В. Таран[†], І.В. Забарна[‡], В.Д. Іщенко[†], Л.М. Іщенко[†], В.О. Ушкалов[†]

[†] Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Полковника Потехіна, 16, м. Київ, 03041,

*e-mail: svit.mid@gmail.com

[‡] Подільський державний аграрно-технічний університет, вул. Шевченка 13, м. Кам'янець-Подільський, Україна, 32300

Надійшла: 11 липня 2019 р; Прийнята: 09 грудня 2020 р

DOI: 10.17721/moca.2020.137-143

Розроблена методика визначення Т-2 та НТ-2 токсинів у зерні пшениці методом високоефективної рідинної хроматографії. Встановлено, що коефіцієнт кореляції (R^2) для Т-2 та НТ-2 токсину складає 0.9999. Середнє значення ступеня вилучення (R, %) для Т-2 та НТ-2 токсину на рівні 50–150 мкг/кг з пшениці (холоста проба) було 91 і 87%, відповідно. Відносне стандартне відхилення результатів вимірювання в умовах збіжності та внутрішньолaborаторної прецизійності склало від 0.23 до 3.93%. Межа кількісного визначення (LOQ) методики для Т-2 та НТ-2 мікотоксину, відповідно, становить 2.2 та 1.2 мкг/кг. Значення LOQ розробленої методики відповідають мінімально допустимим рівням згідно регламенту комісії ЄС №401/2006. Показано, що стандарти Т-2 та НТ-2 мікотоксинів у розчинах можна зберігати до 7 діб у морозильній камері, холодильнику та за кімнатної температури в щільно закритому посуді без фактичних втрат концентрації. Встановлено, що Т-2 та НТ-2 токсин у розчині не можна зберігати в освітленому місці, оскільки згідно отриманих даних сонячне світло призводить до руйнації даних мікотоксинів на 52% та 59% відповідно.

Ключові слова: мікотоксини, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, пшениця, зерно, високоефективна рідинна хроматографія

Мікотоксини — токсичні речовини складної хімічної будови, в основному, ароматичні, поліциклічні сполуки першого класу токсичності. Ураження мікотоксинами сільськогосподарських

продуктів відбувається на всіх широтах світу і не залежить від країни-виробника кормових чи харчових продуктів. Причому такі продукти можуть бути уражені декількома видами мікотоксинів, серед

яких досить часто реєструють одночасне ураження охратоксином А, Т-2 та НТ-2 токсинами [1–5]. Необхідно зазначити, що мікотоксини є природними контамінантами сільськогосподарських культур таких як кукурудза, ячмінь, овес, пшениця, сорго, арахіс тощо. Використання цих культур у вигляді складових для кормів сільськогосподарської птиці та тварин знижує їх продуктивність та імунітет, а через харчовий ланцюг має негативний вплив і на здоров'я людини [6].

Крім того вторинні метаболіти грибів – мікотоксини – потрапляють у кормові та харчові продукти на всіх етапах їх виробництва. Хоча є дані про те, що у продуктах, технологія виготовлення яких передбачає тривалу технологічну обробку їх виявляють у меншій кількості [2]. Особливістю мікотоксинів є те, що вони мають віддалені тератогенний, канцерогенний, ембріотоксичний ефекти за умови потрапляння в організм тварин і людини у дуже низьких концентраціях, які виявляють тільки високочутливими сучасними методами [7, 8].

З метою здійснення випробувань зразків зерна пшениці на вміст мікотоксинів застосовують скринінгові методи, найбільш поширеним з яких є твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА). Високоспецифічні взаємодії антигену та антитіла визначають високу специфічність і чутливість імуоферментних методик вимірювань [9, 10]. Незважаючи на всі переваги, імуоферментний аналіз, як правило, використовується лише для скринінгових досліджень мікотоксинів у зерні пшениці. Зразки пшениці з завищеними рівнями Т-2 та НТ-2 токсинів повинні бути досліджені чутливими методами аналізу з метою кількісного визначення кількості мікотоксинів та інших ксенобіотиків через можливість в ІФА перехресної реактивності (крос-реактивності) з подібними сполуками [7, 11–16]. З метою уникнення ризику отримання хибних результатів, застосовують хроматографічні методи аналізу з різними видами детектування та пробопідготовкою [17–19]. Одним із основних арбітражних методів кількісної оцінки мікотоксинів у зерні пшениці є метод вискоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) з флуоресцентним детектуванням. Використання імуоафінних колонок (EASI-EXTRACT® Т-2 & НТ-2) при проведенні пробопідготовки зерна пшениці дозволяє ефективно вилучити досліджувані мікотоксини за рахунок специфічного зв'язування з антитілами. Ступінь вилучення для Т-2 та НТ-2 токсину на рівні 10–200 мкг/кг з холостих проб злакових продуктів становив 74–120%, а відносне стандартне відхилення в межах від 0.5 до 20%. Також дослідниками було показано, що середнє значення межі кількісного визначення для Т-2 та НТ-2 токсину становило 8.0 мкг/кг [20]. Це, в свою чергу, зменшує вплив матричних компонентів і, таким чином, значно підвищується селективність

методу [20, 21]. В роботі [21] показано, що ступінь вилучення для Т-2 токсину на рівні 0.05–1.50 мкг/г з різних чистих (холостих) проб злаків становив від 80 до 99% з відносним стандартним відхиленням до 6%. Межа виявлення (LOD) методики складала 0.005 мкг/г. Варто зазначити, що використання 1-антроїлнітрилу для дериватизації Т-2, НТ-2 токсинів значно знижує межу кількісного визначення методики і розширює діапазон її застосування для аналізування матриць з низькими гранично-допустимими концентраціями вищезазначених мікотоксинів [22].

Враховуючи, що український експорт зерна та інших сільськогосподарських продуктів на ринки країн Європи постійно зростає, нині є актуальним відповідність кормових та харчових продуктів вимогам Європейського Союзу [23, 24]. Випробувальні лабораторії, які займаються контролем безпечності кормів та харчових продуктів використовують ряд сучасних методів для даних визначень. Проте, існує різноманіття обладнання та методів для тих чи інших визначень, а також той факт, що відбувається активна гармонізація українського законодавства, яка потребує валідації багатьох методик відповідно до європейських норм [25]. У зв'язку з тим, що ГОСТ 28001-88 та ГОСТ 33682-2015 втратили чинність в Україні, для визначення Т-2 мікотоксину у зерні та кормах був розроблений метод тільки для рідинної хроматомас-спектрометрії (HPLC-MS) [26]. Нині в Україні відсутні ДСТУ для методик HPLC з визначення Т-2 та НТ-2 мікотоксинів взагалі, тому для випробувальних лабораторій актуальним є розробка, апробація та оцінка придатності методики з визначення Т-2 й НТ-2 мікотоксинів у зерні та кормах методом вискоєфективної рідинної хроматографії з використанням імуоафінних колонок в якості очистки екстрактів від компонентів матриці.

Метою роботи було розробити методику визначення вмісту Т-2 та НТ-2 токсину у зерні пшениці методом вискоєфективної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектуванням з попереднім очищенням екстрактів на імуоафінних колонках. Перевірити відповідність метрологічних параметрів розробленої методики вимогам ЄС, щодо вмісту мікотоксинів у зерні.

Матеріали і методи досліджень

Реактиви. У роботі було використано стандартні зразки Т-2 та НТ-2 токсинів виробництва LGC Standards (Germany). Робочі розчини Т-2 та НТ-2 готували розчиненням порошку токсину в ацетонітрилі (99.9%, HPLC, Honeywell) до концентрації 100 мкг/мл. Стокові розчини стандартів зберігалися в посуді з темного скла (не допускаючи потрапляння на них ультрафіолетового світла). Для дериватизації Т-2 та НТ-2 токсину в стандартних та дослідних

зразках використовували 1-антроїлнітрил (Wako Pure Chemical Industries) та 4-диметиламінопіридин (Merck), розчини яких готували у толуолі (99.7 %, HPLC, Fluka) у концентраціях 325 мкг/см³ та 300 мкг/см³ відповідно.

Підготовка зразків стандартних розчинів Т-2 та НТ-2 токсину. Для приготування робочих розчинів відповідно до градуовального графіку переносили стандартний розчин в серцевидну колбу. Висушували елюат стандарту під потоком повітря за температури 50°C. До сухого залишку додавали 50 мкл 4-диметиламінопіридин (325 мкг/см³) та 50 мкл 1-антроїлнітрил (300 мкг/см³) реактиву. Закривали віалу та перемішували на вортексі протягом 1 хв. Висушували 15 хв за температури 50°C у сушильній шафі. Суміш охолоджували протягом 15 хв, висушували під струменем повітря за температури 50°C, відновлювали у 2 см³ 70% ацетонітрилу та перемішували на вортексі протягом 30 сек. З отриманого розчину проводили підготовку робочих розчинів шляхом розведення.

Підготовка зразків зерна. До 50 г подрібненої проби додавали 5 г натрію хлориду. Після цього додавали 250 см³ 90% розчину метанол/вода. Екстрагували пробу на шейкері протягом 30 хв. Досліджувану пробу фільтрували через фільтрувальний папір (червона стрічка). Після цього відбирали 7 см³ фільтрату і розбавляли в 28 см³ деіонізованої води (HPLC якості). Якщо після розбавлення випадав осад, пробу ще раз фільтрували або центрифугували, щоб переконатися, що фільтрат прозорий перед пропусканням через імуноафінну колонку. 25 см³ розведеного розчину (еквівалентно 1 г зразка) одержаного екстракту очищували від надлишків матриці методом імуноафінної хроматографії із застосуванням колонок (EASI-EXTRACT T-2 & НТ-2®, виробництва компанії R-BIOPHARM RHÔNE LTD), які містили антитіла до Т-2, НТ-2 токсинів на поверхні стаціонарної фази. Очищені екстракти випаровували в потоці азоту та додавали реагенти для утворення флуоресцюючого комплексу з Т-2 та НТ-2 токсином. Суміш висушували під струменем повітря за температури 50°C, відновлювали у 1 см³ 70% ацетонітрилу та перемішували на вортексі протягом 30 сек.

Параметри хроматографічної системи. Для оцінки придатності методики з визначення вмісту Т-2, НТ-2 мікотоксинів використовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-20 з флуоресцентним детектором, хроматографічну колонку Supelco Discovery® C18 – довжина колонки 150 мм; внутрішній діаметр 4.6 мм; розмір часток 5.0 мкм. Рухома фаза - ацетонітрил/вода в режимі градієнту. Умови хроматографування: довжина хвиль: $\lambda_{ex} = 381$ нм; $\lambda_{em} = 470$ нм; об'єм проби: 20 мкл; температура термостата: 40°C; швидкість потоку: 1 см³/хв. Кількісне визначення концентрації Т-2

та НТ-2 токсинів відбувалося шляхом порівняння площ піків проби за градуовальним графіком.

Оцінювання придатності методики проводили відповідно до Commission Decision 2002/657/EC [25], що забезпечує виконання директиви ЕС 96/23/ЄС, яка стосується ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів [27].

Результати досліджень та їх обговорення

Проводили валідацію методу за критеріями згідно Commission Decision 2002/657/EC: селективність, лінійність, межа виявлення (LOD), межа кількісного визначення (LOQ), правильність, прецизійність та стабільність.

Селективність. З метою визначення селективності методики аналізували зразки зерна пшениці, що не містять мікотоксинів (холості проби) та зразки, що містять Т-2 токсин і НТ-2 токсин з концентрацією 50 мкг/кг. Порівнюючи отримані хроматограми нами було встановлено, що визначенню вмісту мікотоксинів не заважають інші компоненти проби: пігменти, органічні кислоти, амінокислоти, органічні речовини ліпідної природи, пестициди тощо (рис. 1, 2). Селективність виявлення в умовах інструментального дослідження забезпечена специфічними для Т-2 та НТ-2 токсинів довжинами хвиль детектування.

Лінійність. Використовуючи модельну суміш стандартних розчинів Т-2 та НТ-2 токсинів готували розчини різних концентрацій: 0 (екстракт чистої матриці); 15.6; 31.25; 62.5; 125; 250; 500 нг/см³ (не менше ніж у трьох паралелях). Регресійний аналіз отриманих даних проводили методом найменших квадратів з використанням лінійної моделі.

Встановлено, що коефіцієнт кореляції R^2 для Т-2 та НТ-2 токсину становить 0.9999, що відповідає необхідному рівню ≥ 0.995 (табл.1). Таким чином, можна зробити висновок, що стандартні криві в діапазоні від 15.6 нг/см³ до 500 нг/см³ для Т-2 та від 15.6 нг/см³ до 250 нг/см³ для НТ-2 токсину є лінійними.

Таблиця 1. Результати оцінки лінійності розробленої методики.

Міко-токсин	Апроксимаційне рівняння	R^2	Лінійність, нг/см ³
Т-2	$y = 18998x + 14412$	0.9999	15.6-500
НТ-2	$y = 26915x - 11578$	0.9999	15.6-250

Межа виявлення. За результатами досліджень модельної суміші аналітичних стандартів межа виявлення Т-2 та НТ-2 токсинів у зерновій матриці на обладнанні, що використовувалось, становить для Т-2 токсину – 0.7 нг/см³ (або 0.7 мкг/кг) та для НТ-2 токсину – 0.4 нг/см³ (або 0.4 мкг/кг), що відповідає його вмісту у продукції (табл. 2).

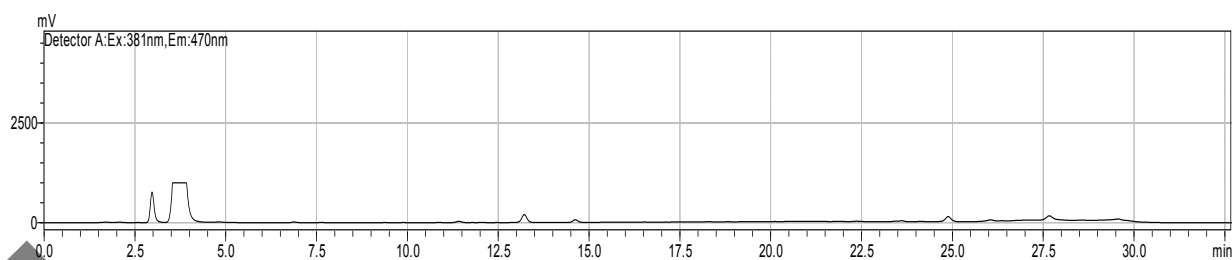


Рис. 1. Хроматограма холостої проби зерна пшениці.

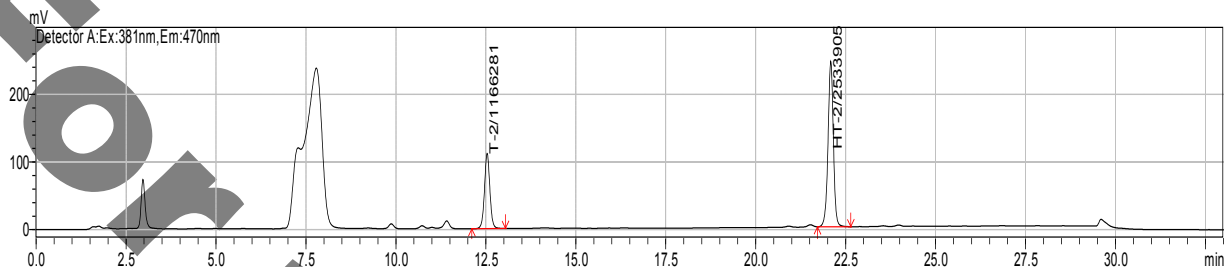


Рис. 2. Хроматограма внесеного в пробу зерна пшениці Т-2 та НТ-2 токсину в концентрації 50 мкг/кг.

Межа кількісного визначення. У процесі експерименту було виявлено, що межа кількісного визначення для Т-2 та НТ-2 токсину у пробі пшениці становить 2.2 мкг/кг та 1.2 мкг/кг, відповідно (табл. 2).

Таблиця 2. Результати оцінки LOD та LOQ розробленої методики.

Міко-токсин	LOD, мкг/кг	LOQ, мкг/кг	¹ ГДК, мкг/кг
Т-2	0.7	2.2	100
НТ-2	0.4	1.2	-

¹ГДК – гранично допустима концентрація.

Згідно чинних в Україні нормативних документів [28] ГДК Т-2 токсину у зерні становить 0.1 мг/кг (100 мкг/кг), НТ-2 токсин в Україні не нормується. Отже, LOD та LOQ для Т-2 та НТ-2 токсинів за розробленою методикою є прийнятними для їх визначення у зерні згідно нормативної документації України.

Правильність. Оцінку правильності визначення мікотоксинів у зерні пшениці здійснювали методом «введено-знайдено». З метою оцінки придатності методики з визначення Т-2 та НТ-2 токсинів ступінь вилучення (або recovery) визначали за наступною схемою: для того, щоб перевірити вплив матриці проаналізовано 20 холостих проб та збагачували 20 аліквот токсинами на рівні 50; 100 та 150 мкг/кг. Визначали концентрацію токсинів у кожній пробі й розраховували ступінь вилучення (R, %) для кожної проби (табл. 3).

Результати досліджень показали, що ступінь вилучення токсинів зростає зі збільшенням концентрації аналіту (табл. 3). Таким чином, отримані результати ступеню вилучення відповідають діапазону допустимих значень (70–110 %), що наведені в регламенті комісії ЄС

№401/2006 [29]. Отже, розроблена методика придатна для аналізу вмісту мікотоксинів у зерні пшениці методом вискоєфективної рідинної хроматографії з попереднім очищенням екстрактів на імуноафінних колонках.

Таблиця 3. Результати оцінки правильності результатів визначення мікотоксинів методом «введено-знайдено» (n=20).

Міко-токсин	Введено, мкг/кг	Знайдено, мкг/кг	R, %
Т-2	50	44.45	88.90
	100	90.40	90.40
	150	142.01	94.67
НТ-2	50	42.15	84.30
	100	85.68	85.68
	150	137.72	91.81

Прецизійність. Прецизійність методики хроматографічного аналізу мікотоксинів у зерні пшениці визначали за збіжністю результатів вимірювання та за внутрішньолабораторною прецизійністю.

Оцінку збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності виконували за наступною схемою:

- зразки пшениці (холосту матрицю) збагачили Т-2 та НТ-2 токсинами у концентраціях 50, 100 та 150 мкг/кг. Кожна концентрація була проаналізована в 10-ти повторях;

- провели даний експеримент в умовах збіжності (в однакових умовах з використанням одного і того ж обладнання, одним і тим же дослідником, за короткий проміжок часу);

- повторили даний експеримент в умовах внутрішньолабораторної прецизійності (різний час, різні аналітики, різні партії реактивів одного типу);

- для отриманих значень концентрацій були розраховані величини відносного стандартного відхилення (RSD, %).

Встановлено, що відносне середнє квадратичне відхилення результатів вимірювання зразків пшениці в умовах збіжності для Т-2 токсину становить: для вмісту 50 мкг/кг – 1.19%; для вмісту 100 мкг/кг – 1.75%; для вмісту 150 мкг/кг – 0.23%. Відносне середнє квадратичне відхилення для НТ-2 токсину для рівня 50 мкг/кг, 100 мкг/кг та 150 мкг/кг становить 2.29%, 2.35% та 0.73% відповідно.

У результаті проведених досліджень встановлено, що відносне середнє квадратичне відхилення результатів вимірювання зразків пшениці в умовах внутрішньолабораторної прецизійності для Т-2 токсину становить: для вмісту 50 мкг/кг – 2.06%; для вмісту 100 мкг/кг – 1.45%; для вмісту 150 мкг/кг – 0.86 %. Відносне середнє квадратичне відхилення для НТ-2 токсину для рівня 50 мкг/кг, 100 мкг/кг та 150 мкг/кг становить 3.93%, 2.16% та 0.55% відповідно.

Отже, відносне середнє квадратичне відхилення результатів вимірювання в умовах збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності знаходиться в межах від 0.23% до 3.93%, що не перевищує встановлених значень наведених в регламенті комісії ЄС №401/2006 [29].

Таким чином, отримані результати оцінки збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності свідчать про відсутність систематичних помилок в розробленій методиці.

Визначення стабільності досліджуваних речовин у розчині проводили наступним чином:

а) готували 40 проб з однаковим вмістом модельної суміші Т-2 та НТ-2 токсинів, яка має бути близькою до встановленого гранично допустимої концентрації (ГДК), яка становить 100 мкг/кг. У дослідженнях використано розчини

з концентрацією токсинів на рівні 125 мкг/кг. Визначали вміст у всіх пробах;

б) зберігали розчини у щільно закритому посуді протягом 1 тижня за наступною схемою (n=10):

– темне місце (за мінус 20 °С, за 4 °С, за 20 °С);

– освітлене місце (сонячне світло) за 20 °С.

в) вираховували вміст досліджуваних речовин у кожній аликвоті шляхом використання для порівняння свіжоприготовленого розчину модельної суміші досліджуваних речовин.

Стабільність (СТ, %) досліджуваних розчинів розраховували за формулою:

$$СТ(\%) = \frac{C_i}{C_{\text{fresh}}} \times 100\% \quad (1)$$

де C_i – концентрація токсину на момент визначення, нг/см³; C_{fresh} – концентрація токсину у свіжоприготовленому розчині, нг/см³.

Результати визначення стабільності Т2 та НТ-2 токсинів у розчині представлені у табл. 4.

Згідно отриманих даних Т-2 та НТ-2 токсини у розчині можна зберігати до 7 діб у морозильній камері, холодильнику та за кімнатної температури у щільно закритому посуді без фактичних втрат. Розчини досліджених мікотоксин не можна зберігати в освітленому місці, оскільки їх стабільність різко падає (табл. 4).

Таким чином, розроблена HPLC методика визначення Т-2 та НТ-2 токсину у зерні на імуноафінних колонках EASI-EXTRACT® Т-2 & НТ-2 характеризується задовільними метрологічними параметрами. Загалом отримані результати узгоджуються з результатами дослідження визначення Т-2 та НТ-2 токсину у зерні і зернових кормах з попереднім очищенням екстрактів [20-22].

Таблиця 4. Визначення стабільності розчинів Т-2, НТ-2 токсинів (нг/см³) при зберіганні впродовж 7 днів.

Мікотоксин	Критерій	Вихідний розчин	Досліджуваний розчин			
			20°С	4-6°С	ТМ*	СМ**
Т-2	С, нг/см ³	125.14	123.35	124.06	121.91	60.24
	СТ, %	100.11	98.68	99.25	97.53	48.19
НТ-2	С, нг/см ³	125.08	123.53	123.00	121.57	51.23
	СТ, %	100.06	98.82	98.40	97.26	40.98

* – темне місце за кімнатної температури, ** – освітлене місце за кімнатної температури.

Висновки

Розроблена методика визначення вмісту Т-2 та НТ-2 токсину у зерні пшениці методом HPLC з флуоресцентним детектуванням та з попереднім очищенням екстрактів на імуноафінних колонках (EASI-EXTRACT® Т-2 & НТ-2) і дериватизацією 1-антроїлнітрилом характеризується задовільними метрологічними параметрами. Встановлено, що коефіцієнти кореляції (R^2) для Т-2 та НТ-2 токсинів значно більші, ніж 0.995. Величина LOD для Т-2 та НТ-2 токсину становить 0.7 мкг/кг та 0.4 мкг/кг, відповідно. Величина LOQ становить

для Т-2 токсину – 2.2 мкг/кг, для НТ-2 токсину – 1.2 мкг/кг. Ступінь вилучення в межах від 84 до 94 %, що вказує на прийнятність запропонованої процедури екстракції мікотоксинів. Відносне стандартне відхилення внутрішньолабораторної відтворюваності нижче встановлених норм у регламенті ЄС №401/2006. Результати проведених досліджень дають підстави стверджувати, що розроблена HPLC методика визначення Т-2 та НТ-2 токсинів у зерні пшениці відповідає вимогам ЄС і придатна для використання в лабораторіях хімічного, біологічного та ветеринарного профілю, оснащених відповідно до вимог методу.

Література

- De Santis B.; Debegnach F.; Gregori E. et al. Development of a LC-MS/MS Method for the Multi-Mycotoxin Determination in Composite Cereal-Based Samples. *Toxins*. **2017**, 9(5), 1-12. <https://dx.doi.org/10.3390/toxins9050169>
- Flores-Flores, M.E.; Gonzalez-Penas, E. An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. *Food Chem.* **2017**, 218, 378-385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.101>
- Nichea M.J.; Palacios, S.A.; Chiacchiera, S.M. et al. Presence of Multiple Mycotoxins and Other Fungal Metabolites in Native Grasses from a Wetland Ecosystem in Argentina Intended for Grazing Cattle. *Toxins*. **2015**, 7(8), 3309-3329. <https://doi.org/10.3390/toxins7083309>
- Zinedine, A.; Fernandez-Franzon, M.; Manes, J. et al. Multi-mycotoxin contamination of couscous semolina commercialized in Morocco. *Food Chem.* **2017**, 214, 440-446. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.098>
- Ushkalov, V.; Danchuk, V.; Midyk, S. et al. Mycotoxins in milk and in dairy products. *FST*. **2020**, 14(3), 137-149. <https://doi.org/10.15673/fst.v14i3.1786>
- Pleadin, J.; Frece, J.; Markov, K. Mycotoxins in food and feed. *Adv Food Nutr Res.* **2019**, 89, 297-345. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>
- Pereira C.S.; Cunha S.C.; José O. Fernandes Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*. **2019**, 11(5), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>
- Ge, B.; Zhao, K.; Wang, W. et al. Determination of 14 mycotoxins in Chinese herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with immunoaffinity purification. *Se Pu*. **2011**, 29(6), 495-500. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1123.2011.00495>
- Arola, H.O.; Tullila, A.; Nathanail, A.V. et al. A simple and specific noncompetitive ELISA method for HT-2 toxin detection. *Toxins*. **2017**, 9(4), 145. <https://doi.org/10.3390/toxins9040145>
- Oplatowska-Stachowiak, M.; Kleintjens, T.; Sajic, N.; et al. T-2 Toxin/HT-2 Toxin and Ochratoxin A ELISAs Development and In-House Validation in Food in Accordance with the Commission Regulation (EU) No 519/2014. *Toxins*. **2017**, 9(12), 388. <https://doi.org/10.3390/toxins9120388>
- Mohamadi H.; Abbaspour H.; Hassanshahian M. Comparisons of Different Methods for Detection of Aflatoxin in Grain and Grain Products. *I International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits*. **2012**, 963, 275-280. <https://doi.org/10.17660/Acta-Hortic.2012.963.45>
- Peters J.; Cardall A.; Haasnoot W. et al. 6-Plex microsphere immunoassay with imaging planar array detection for mycotoxins in barley. *Analyst*. **2014**, 139(16), 3968-3976. <https://doi.org/10.1039/C4AN00368C>
- Burmistrova, N.A.; Rusanova, T.Y.; Yurasov, N.A. et al. Simultaneous determination of several mycotoxins by rapid immunofiltration assay. *J Anal Chem.* **2014**, 69, 525-534. <https://doi.org/10.1134/S1061934814060045>
- Aberg, A.T.; Solyakov, A.; Bondesson, U. Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the quantification of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxin, ochratoxin A and fumonisin B1 and B2 in vegetable animal feed. *Food Add Cont.* **2013**, 30(3), 541-549. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.760208>
- Yakubchak, O.M.; Laposha, O.A.; Midyk, S.V. et al. 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.* **2018**, 13(3), 121-130. <https://doi.org/10.17721/moca.2018.121-130>
- Bayer, O.V.; Kaminska, O.V.; Bondarets, O.V., et al. Evaluation of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Determination of Avermectin Residues in Milk. *Ukrainian Journal of Ecology*. **2019**, 9(4), 521-526. https://doi.org/10.15421/2019_784
- Nakagawa H.; Matsuo Y.; McCormick S. et al. Development of an LC-MS/MS Determination Method for T-2 Toxin and Its Glucoside and Acetyl Derivatives for Estimating the Contamination of Total T-2 Toxins in Staple Flours. *J AOAC Int.* **2018**, 101(3), 658-666. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0362>
- Solfrizzo M.; Gambacorta L.; Bibi R. et al. Multimycotoxin Analysis by LC-MS/MS in Cereal Food and Feed: Comparison of Different Approaches for Extraction, Purification, and Calibration. *J AOAC Int.*, **2018**, 101(3), 647-657. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0339>
- Bessaire T.; Mujahid C.; Mottier P. et al. Multiple mycotoxins determination in food by LC-MS/MS: an international collaborative study. *Toxins*. **2019**, 11(11), 658. <https://doi.org/10.3390/toxins11110658>
- Anke Trebstein; Walburga Seefelder; Uwe Lauber et al. Determination of T-2 and HT-2 Toxins in Cereals Including Oats after Immunoaffinity Cleanup by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56(13), 4968-4975. <https://doi.org/10.1021/jf800316m>
- Pascale, M.; Haidukowski, M.; Visconti, A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthrolynitrile. *J Chrom A.* **2003**, 989(2), 257-264. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00081-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00081-5)
- Pascale, M.; Panzarini, G.; Visconti, A. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta*. **2012**, 89, 231-236. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.017>
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for cer-

tain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union. 20.12.**2006**. L 364/5.

24. Bayer, O.V.; Kaminska, O.V.; Shevchenko, L.V. et al. Development and Evaluation of the Suitability of the Method for Determining the Content of Egg Cocciostatics using Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Methods Objects Chem. Anal.* **2019**, 14(1), 43-51. <https://doi.org/10.17721/moca.2019.43-51>

25. Commission Decision of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C (2002) 3044), text with EEA relevance 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Union*. 17.08.**2002**. L 221, 8-36.

26. DSTU 4987:2008. Zerno, zernobobovi ta

produkty yikh pereroblennia. Vyznachennia vmistu T2 toksynu metodom ridynnoi khromatomas-spektrometrii. Chynnyi vid 2009-01-01. K.: Derzhstandart Ukrainy, **2009** (in Ukr.).

27. Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC.

28. DSTU 3768:2010 Pshenytsia. Tekhnichni umovy K.: Derzhstandart Ukrainy, **2009** (in Ukr.).

29. Commission Regulation (EC) No 401, 2006. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*. **2006**, 70, 12-34.