

Determination of Mycotoxins in Wheat Grain by LC-MS/MS using Modified QuEChERS Sample Preparation

S.A. Senin^{†*}, S.V. Midyk[†], V.I. Korniyenko[†], O.Yu. Konovalova[‡], O.V. Berezovskyi[†], E.V. Ladohubets[§], I.V. Harkusha[§]

[†] National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroyiv Oborony Str, 15, Kyiv, 03041, Ukraine;

*e-mail: sergejsen@gmail.com

[‡] V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine;

[§] State Biotechnological University, St. Alchevsky, 44, Kharkiv, 61002, Ukraine

Received: November 29, 2022; Accepted: March 28, 2023

DOI: 10.17721/moca.2023.22-28

The procedure of the mycotoxins determination in wheat grain was developed by LC-MS/MS using modified QuEChERS sample preparation. The method of simultaneous determination of six mycotoxins (aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2, T-2 toxin and zearalenone) in wheat grain was validated according to the following criteria: specificity, linearity, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), accuracy, and precision. The chromatographic and mass spectrometric conditions for separation and determination of the mycotoxins were optimized during the study. It was established that the most optimal mobile phase for the separation of six mycotoxins is 5 mM ammonium formate solution in methanol : water : formic acid (5:94.9:0.1 by volume, eluent A and 95:4.9:0.1 by volume, eluent B). It was found that the correlation coefficients for six mycotoxins range from 0.9990 to 0.9998 ($R^2 > 0.995$). Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of the mycotoxins are below the maximum permitted levels set by the European Union (EU). Percent recovery in the range from 88 to 103% indicates the acceptability of the mycotoxin extraction procedure. The relative standard deviation (RSD, %) of the measurement results under conditions of repeatability ranged from 1.94 to 8.76%. The obtained data suitability evaluation of method (validation) corresponds to criteria European Commission Regulation (EC) No. 401/2006. The validation results showed that LC-MS/MS method with using of modified QuEChERS sample preparation is effective and suitable for the simultaneous quantitation of mycotoxins in wheat grain.

Keywords: aflatoxins, T-2 toxin, zearalenone, wheat, grain, QuEChERS, LC-MS/MS

Визначення мікотоксинів у зерні пшениці методом LC-MS/MS з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS

С.А. Сенін^{†*}, С.В. Мідик[†], В.І. Корнієнко[†], О.Ю. Коновалова[‡], О.В. Березовський[†], О.В. Ладогубець[§], І.В. Гаркуша[§]

[†] Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна; *e-mail: sergejsen@gmail.com

[‡] Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна;

[§] Державний біотехнологічний університет, вул. Алчевських, 44, м. Харків, 61002, Україна

Надійшла: 29 листопада 2022 р.; Прийнята: 28 березня 2023 р

DOI: 10.17721/moca.2023.22-28

Розроблена методика визначення мікотоксинів у зерні пшениці методом LC-MS/MS з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS. Оцінку придатності (валідацію) методики одночасного визначення шести мікотоксинів (афлатоксину В1, афлатоксину В2, афлатоксину G1, афлатоксину G2, Т-2 токсину та зеараленону) у зерні пшениці методом LC-MS/MS з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS здійснювали за наступними критеріями: специфічність, лінійність, межа детектування (LOD), межа кількісного визначення (LOQ), правильність та прецизійність. У процесі дослідження було підбрано хроматографічні та мас-спектрометричні умови. Встановлено, що найбільш оптимальна рухома фаза для розділення на колонці шести мікотоксинів – 5 мМ розчин форміату амонію у суміші метанол : вода : мурашина кислота (5:94.9:0.1, за об'ємом, елюент А та 95:4.9:0.1, за об'ємом, елюент В). Встановлено, що коефіцієнти кореляції для шести мікотоксинів знаходяться в діапазоні від 0.9990 до 0.9998 ($R^2 > 0.995$). Межі виявлення (LOD) та межі кількісного визначення (LOQ) мікотоксинів нижче максимально дозволених рівнів, встановлених Європейським Союзом (ЄС). Відсоток повернення в межах від 88 до 103% вказує на прийнятність процедури екстракції мікотоксинів. Відносне стандартне відхилення (RSD, %) результатів вимірювання в умовах збіжності склало від 1.94 до 8.76%. Отримані дані оцінки придатності методу (валідації) відповідають критеріям регламенту комісії ЄС № 401/2006. Результати валідації показали, що LC-MS/MS метод з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS – ефективний і придатний для одночасного кількісного визначення мікотоксинів у зерні пшениці.

Ключові слова: афлатоксини, Т-2 токсин, зеараленон, пшениця, зерно, QuEChERS, LC-MS/MS

Розвиток нормативної бази харчової безпеки, як на національному, так і на міжнародному рівні розширює ряд потенційно небезпечних речовин і створює жорсткіші вимоги до їх гранично допустимого вмісту [1]. Серед об'єктів контролю особливе місце займають мікотоксини – низькомолекулярні вторинні метаболіти цвілевих грибів. Забруднення продуктів мікотоксинами – серйозна проблема для сільського господарства та охорони здоров'я практично всіх країн світу. Маючи високу токсичність, дані сполуки при попаданні у продукти харчування та кормів можуть завдати значної шкоди здоров'ю людини та сільськогосподарських тварин [2,3].

Як відомо, мікотоксини стійкі до нагрівання і обробки хімічними агентами. Потрапляючи у сировину, вони не розкладаються під час технологічних процесів, а зберігаються до кінцевого продукту виробництва. У зв'язку з цим, необхідний постійний моніторинг вмісту таких токсичних речовин на всіх стадіях виробництва, транспортування та зберігання продукції. Для вирішення цих завдань необхідні швидкі та ефективні хіміко-аналітичні методи визначення мікотоксинів у харчових продуктах [4].

Згідно нормативних документів визначення мікотоксинів здійснюється методами високоефективної рідинної та тонкошарової хроматографії. Аналіз мікотоксинів включає в себе тривалу пробопідготовку: екстракцію, очищення отриманих екстрактів за допомогою імуноафінних колонок, концентрування тощо [5]. Складність виявлення мікотоксинів звичайними хроматографічними методами пов'язана з їхніми фізико-хімічними особливостями, а також з присутністю великої кількості непередбачуваних домішок у продуктах рослинного і тваринного походження. Саме тому загальноприйняті методики їхнього визначення зазвичай стосуються тільки одного компонента [6].

Останнім часом все більше уваги привертає метод високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS/MS), який дає можливість проводити селективне та високочутливе визначення одночасно всіх мікотоксинів в одній пробі [7,8]. Крім того, у сучасній літературі останніх років все частіше можна зустріти використання пробопідготовки QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe – Швидко, Просто, Дешево, Ефективно, Надійно і Безпечно), яка дозволяє швидко та ефективно проводити екстракцію залишкових кількостей цільових компонентів та очищення екстракту від інших речовин таких, як органічні кислоти, ліпіди, пігменти, цукри, що заважають кількісному визначенню [9].

Традиційно пробопідготовка QuEChERS використовується для визначення залишкових кількостей пестицидів різних класів методом газової або рідинної хромато-мас-спектрометрії,

проте, як свідчать останні дані, пробопідготовка QuEChERS в тій чи іншій модифікації може застосовуватися також для визначення багатьох мікотоксинів [10–14].

Метою даної роботи було провести оцінку придатності (валідацію) методики вимірювання вмісту мікотоксинів у зерні за методом LC-MS/MS з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS.

Матеріали та методи досліджень

Реактиви. У роботі використовували такі аналітичні стандартні зразки: афлатоксин B1 (25 мкг/мл); афлатоксин B2 (25 мкг/мл); афлатоксин G1 (25 мкг/мл); афлатоксин G2 (25 мкг/мл); T-2 токсин (100 мкг/мл) виробництва Trilogy (США) та зеараленон (100 мкг/мл) виробництва Sigma (США). Для пробопідготовки QuEChERS використовували сульфат магнію безводний (виробництва Sigma-Aldrich, США), натрію хлорид (виробництва Merck, Німеччина), ацетонітрил HPLC якості (виробництва Carlo Erba, Франція) та сорбенти для очищення ацетонітрильного екстракту SupelTM QuE PSA/C18 (EN) Tube (900 mg MgSO₄, 150 mg PSA, 150 mg DSC-18). Для приготування рухомої фази для високоефективної рідинної хроматографії використовували: воду (отримана після очищення на приладі Millipore, Direct-QTM), метанол HPLC якості (виробництва Honeywell, США), мурашину кислоту 98.0-100% (виробництва Sigma-Aldrich, США) та форміат амонію (виробництва Sigma-Aldrich, США).

Підготовка зразків зерна за модифікованою методикою QuEChERS. Для визначення придатності запропонованої методики використовували зразки зерна пшениці, надані згідно замовлення № 9959.

5 грам подрібненого випробувального зразку поміщали у центрифужну пробірку місткістю 50 мл. Додавали 10 мл води та перемішували на вортексі протягом 1 хв. До отриманої суміші додавали 10 мл 1% розчину мурашиної кислоти в ацетонітрилі, перемішували на вортексі протягом 1 хвилини та додавали 4 г безводного сульфату магнію, 1 г хлориду натрію, після чого інтенсивно струшували впродовж 1 хв. Отриману суміш центрифугували протягом 10 хв при 8000 об/хв. Після цього переносили 5 мл екстракту у центрифужну пробірку місткістю 12 мл, яка містила 1.2 г сорбенту SupelTM QuE PSA/C18 та інтенсивно струшували впродовж 2 хв. Отриману суміш центрифугували протягом 10 хв при 8000 об/хв. Отриманий супернатант пропускали через шприцевий фільтр із середнім діаметром пор 0.45 мкм, після чого 1.5 мл ацетонітрильного екстракту переносили у віали та аналізували методом LC-MS/MS.

Хроматографічні та мас-спектрометричні умови. Для визначення вмісту мікотоксинів у зерні використовували рідинний хроматограф Dionex

Ultimate 3000 (США) з мас-спектрометричним детектором AB SCIEX QTRAP 3200 (США).

Розділення мікотоксинів здійснювали на колонці C18 (50×4.6 мм, виробництва Phenomenex). Елюювання мікотоксинів проводили в режимі бінарного градієнту. Обидві рухомі фази містили 5 мМ форміату амонію і складалися з суміші метанол : вода : мурашина кислота у співвідношенні 5:94.9:0.1 (за об'ємом; елюент А) та 95:4.9:0.1 (за об'ємом; елюент В) відповідно. Об'ємна швидкість рухомої фази на колонку складала 0.5 мл/хв. Елюювання здійснювали у градієнтному режимі. Об'єм інжекції складав 10 мкл.

Параметри іонізування мас-спектрометричного детектору: метод іонізації – ESI (електро-розпилення, позитивний та негативний режим), режим роботи – MRM (моніторинг множинних реакцій), температура блоку нагрівання 500 °С, напруга електророзпилення (±4500 V), газ для MS/MS фрагментації – азот.

Масову частку кожного мікотоксину розраховували за методом зовнішнього стандарту (методом абсолютного градування). Виражали у мг/кг.

Оцінювання придатності методики проводили відповідно до Commission Decision 2002/657/EC [15], що забезпечує виконання директиви ЕО 1831/2003/EC, яка стосується ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів [16].

Результати досліджень та їх обговорення

Оптимізація хроматографічних та мас-спектрометричних умов. Зазвичай, як рухомі фази для визначення мікотоксинів використовують метанол, ацетонітрил та воду. У дослідженні нами було використано дві рухомі фази. На першому етапі оптимізації використовували рухому фазу складу 5 мМ форміату амонію в суміші вода : мурашина кислота у співвідношенні 99.9:0.1 (за об'ємом;

елюент А) та 5 мМ форміату амонію в суміші ацетонітрил : мурашина кислота у співвідношенні 99.9:0.1 (за об'ємом; елюент В). Друга рухима фаза мала склад: 5 мМ розчин форміату амонію в суміші метанол:вода:мурашина кислота у співвідношенні 5:94.9:0.1 (за об'ємом; елюент А) та 5 мМ розчин форміату амонію в суміші метанол : вода : мурашина кислота у співвідношенні 95:4.9:0.1 (за об'ємом; елюент В).

Використовуючи 5 мМ розчин форміату амонію в суміші ацетонітрил : мурашина кислота 99.9 : 0.1 (за об'ємом; елюент В) як сильний елюент було виявлено певні недоліки: погана розчинність форміату амонію та низька чутливість методу.

Застосування 5 мМ розчину форміату амонію в суміші метанол : вода : мурашина кислота 5:94.9:0.1 (за об'ємом; елюент А) та 5 мМ розчину форміату амонію в суміші метанол : вода : мурашина кислота 95 : 4.9 : 0.1 (за об'ємом; елюент В) для одночасного розділення мікотоксинів, призвело до усунення всіх перерахованих вище недоліків першої рухомої фази. Додавання форміату амонію в обидві рухомі фази, значно покращило чутливість до Т-2 токсину за рахунок утворення ним амонійного аддукту $[M+NH_4]^+$.

При оптимізації умов мас-спектрометричного детектування встановлено, що афлатоксини (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) та Т-2 токсин схильніші утворювати протоновані іони $[M+H]^+$ у позитивному режимі (ESI⁺). На відміну від афлатоксинів та Т-2 токсину, зеараленон має більшу спорідненість до утворення депротонованого іону $[M-H]^-$. Мас-хроматограми мікотоксинів аналітичних стандартних зразків наведено на рисунку 1.

Для всіх досліджуваних мікотоксинів встановлено часи утримування (RT), молекулярні іони (прекурсор іони), дочірні іони (продукт іони) та параметри енергії колізії (CE) (табл. 1).

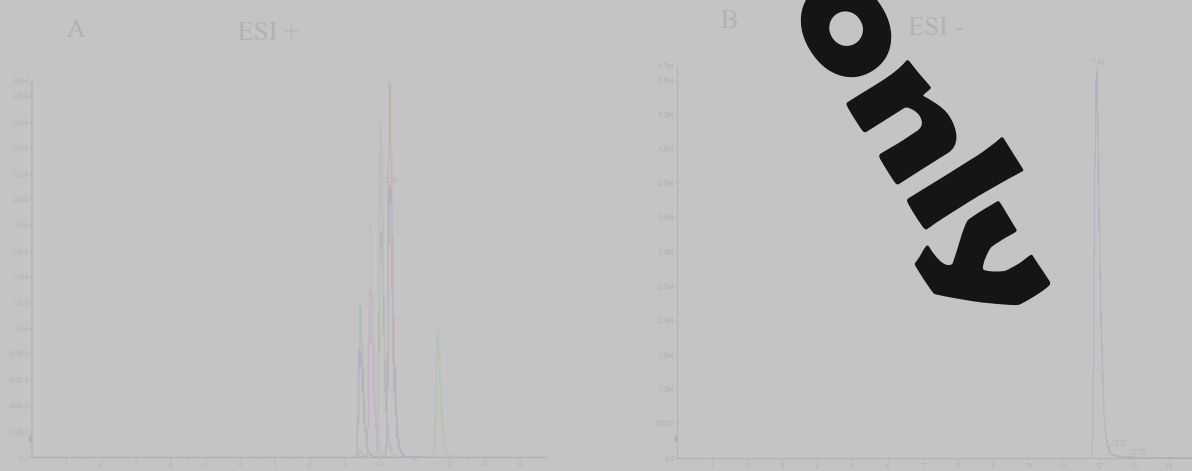


Рис. 1. Мас-хроматограми стандартних зразків мікотоксинів: А – афлатоксинів (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) з концентрацією 0.040 мг/кг та Т-2 токсину з концентрацією 0.5 мг/кг (позитивний режим, ESI⁺); В – зеараленону з концентрацією 1.0 мг/кг (негативний режим, ESI⁻).

Таблиця 1. Оптимізовані MS/MS параметри для мікотоксинів.

Аналіт	Час утримування, хв	Молекулярний іон (m/z)	Дочірні іони (m/z)	Енергія колізії, V
Афлатоксин B ₁	9.84	313.0 [M+H] ⁺	285.1 ^q	30
			241.0 ^q	50
Афлатоксин B ₂	9.56	315.0 [M+H] ⁺	287.1 ^q	40
			259.1 ^q	40
Афлатоксин G ₁	9.24	329.0 [M+H] ⁺	243.0 ^q	40
			215.1 ^q	40
Афлатоксин G ₂	8.91	331.0 [M+H] ⁺	189.0 ^q	50
			257.0 ^q	40
T-2 токсин	11.36	484.3 [M+NH ₄] ⁺	215.1 ^q	20
			185.1 ^q	30
Зеараленон	12.01	317.3 [M-H] ⁻	131 ^q	-40
			175 ^q	-30

^q – Іон кількісного аналізу; ^q – Іон якісного аналізу

Оцінка придатності методу. Валідацію методу проводили за критеріями згідно Commission Decision 2002/657/EC: селективність, лінійність, межа виявлення (LOD), межа кількісного визначення (LOQ), правильність (повернення) та прецизійність.

Селективність. Для підтвердження селективності методики аналізували зразки зерна пшениці, що не містять мікотоксинів (холості проби) та зразки, що містять мікотоксини у таких концентраціях: 0.020 мг/кг – сума афлатоксинів (B₁, B₂, G₁, G₂), 0.2 мг/кг – T-2 токсин та 0.5 мг/кг – зеараленон. 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.

Лінійність. Для побудови градувальної залежності було взято 5 стандартних розчинів із заданою концентрацією мікотоксинів. Для кожного із стандартних розчинів було отримано 2 значення аналітичного сигналу (площі хроматографічного піку) з використанням однієї партії реактивів та обладнання. Регресійний аналіз отриманих даних проводили методом найменших квадратів з використанням лінійної моделі.

Встановлено, що градувальні криві для всіх мікотоксинів показали значення R² від 0.9990 до 0.9998, що відповідає необхідному рівню ≥ 0.995 (табл. 2). Таким чином, можна зробити висновок, що стандартні криві у діапазоні від 0.0025 до 0.04 мг/кг для афлатоксинів (B₁, B₂, G₁, G₂), від 0.025 до 0.5 мг/кг для T-2 токсину та від 0.05 до 1.0 мг/кг для зеараленону лінійні.

Межа виявлення (LOD). Встановлено межу виявлення для кожного мікотоксину, що визначається як масова концентрація компоненту, яка дає сигнал (площу піку), що у 3 рази перевищує сигнал холостої проби (матриці).

Результати досліджень показали, що межа виявлення мікотоксинів у зерновій матриці на обладнанні, що використовувалось, становить: для афлатоксину B₁ – 0.0002 мг/кг, афлатоксину B₂ – 0.0003 мг/кг, афлатоксину G₁ – 0.0004 мг/кг, афлатоксину G₂ – 0.0003, T-2 токсину – 0.008 мг/кг та для зеараленону – 0.002 мг/кг (табл. 2).

Межа кількісного визначення (LOQ). Розраховано межу кількісного визначення (LOQ) для кожного мікотоксину, що визначається як масова частка компоненту, яка дає сигнал (площу піку), що у 10 разів перевищує сигнал проби контролю аналізованої матриці.

Таблиця 2. Результати оцінки лінійності, межі виявлення та межі кількісного визначення розробленої методики.

Назва	Лінійний діапазон, мг/кг	R ²	LOD, мг/кг	LOQ, мг/кг
Афлатоксин B ₁	0.0025 – 0.04	0.9998	0.0002	0.0007
Афлатоксин B ₂	0.0025 – 0.04	0.9998	0.0003	0.001
Афлатоксин G ₁	0.0025 – 0.04	0.9997	0.0004	0.001
Афлатоксин G ₂	0.0025 – 0.04	0.9995	0.0003	0.001
T-2 токсин	0.025 – 0.5	0.9995	0.008	0.02
Зеараленон	0.05 – 1.0	0.9990	0.002	0.006

У процесі експерименту було виявлено, що межа кількісного визначення для мікотоксинів у зерновій матриці становить: для афлатоксину B_1 – 0.0007 мг/кг; афлатоксину B_2 – 0.001 мг/кг; афлатоксину G_1 – 0.001 мг/кг; афлатоксину G_2 – 0.001 мг/кг; Т-2 токсину – 0.02 мг/кг та для зеараленону – 0.006 мг/кг (табл. 2).

Згідно чинних в Україні нормативних документів гранично допустима концентрація (ГДК) мікотоксинів у зернових культурах та у продуктах, що отримані з зерна (зернових культур), становить: для афлатоксину B_1 – 0.001 мг/кг, сума афлатоксинів (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) – 0.004 мг/кг, зеараленон – 0.075 мг/кг [17] та для Т-2 токсину – 0.1 мг/кг [18].

Отже, межа виявлення та межа кількісного визначення для мікотоксинів за розробленою методикою прийнятні для їхнього визначення у зерні пшениці згідно нормативної документації України.

Правильність. Оцінку правильності визначення мікотоксинів у зерні пшениці здійснювали методом «введено–знайдено». Для експерименту вибрано зразки пшениці, що не містять залишків мікотоксинів.

Для того, щоб оцінити правильність методики, 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 або ж зростання аналітичного сигналу.

З метою зниження впливу матричних ефектів готували аналітичні стандартні зразки в ацетонітрильному екстракті пшениці та будували градувальні криві у різних діапазонах концентрацій: для афлатоксину B_1 , B_2 , G_1 та G_2 – від 0.0025 до 0.040 мг/кг; для Т-2 токсину – від 0.025 до 0.5 мг/кг та зеараленону – від 0.05 до

1.0 мг/кг. Отримані градувальні криві використовували для визначення правильності методики – ступеня вилучення мікотоксинів (R , %).

Результати досліджень свідчать про те, що ступінь вилучення (R , %) афлатоксинів складає: для B_1 – 101%; B_2 – 92%; G_1 – 102%; та для G_2 – 103%. Ступінь вилучення для зеараленону та для Т-2 токсину складає відповідно 88% та 98% (табл. 3). Таким чином, отримані результати ступеня вилучення мікотоксинів відповідають діапазону допустимих значень (70–110%), які наведені в регламенті комісії ЄС № 401/2006 [19].

З метою додаткової оцінки правильності запропонованої методики та участі у міжлабораторних порівняннях, нами було проаналізовано стандартний зразок розмелу сої з відомим вмістом зеараленону (PT.UA.6.1.2017.2-15, раунд 2) із застосуванням основного стандартного HPLC методу з попереднім очищенням екстрактів на імуноафінних колонках згідно ДСТУ EN 12955-2001 та допоміжного (підтверджуючого) розробленого LC-MS/MS методом з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS. Взявши участь у міжлабораторному порівнянні, ми отримали задовільні результати за основним HPLC методом з попереднім очищенням екстрактів на імуноафінних колонках і підтверджені розробленим LC-MS/MS методом з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS. Відносне стандартне відхилення (RSD , %) між значеннями, що отримані двома методами, становило менше 14%.

Отже, застосування трьох принципів перевірки правильності розробленої методики (метод «введено–знайдено», аналіз стандартного зразка з відомого складу та порівняння з іншою стандартною методикою) дає підстави вважати, що розроблена методика придатна для аналізу вмісту мікотоксинів у зерні пшениці методом LC-MS/MS з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS.

Таблиця 3. Результати оцінки правильності та прецизійності результатів визначення мікотоксинів ($n=10$).

Мікотоксин	Введено, мг/кг	Знайдено, мг/кг	¹ R , %	² RSD , %
Афлатоксин B_1	0.005	0.00505	101	2.47
Афлатоксин B_2	0.005	0.00460	92	2.79
Афлатоксин G_1	0.005	0.00510	102	8.76
Афлатоксин G_2	0.005	0.00515	103	1.94
Зеараленон	0.5	0.439	88	3.31
Т-2 токсин	0.2	0.196	98	4.58

¹ R – ступінь вилучення; ² RSD – відносне середнє квадратичне відхилення.

Прецизійність

LC-MS/MS аналізу мікотоксинів у зерні пшениці визначали за збіжністю результатів вимірювання. Оцінку збіжності виконували за схемою:

- до зразків пшениці (холоста матриця) додали мікотоксини у таких концентраціях: для афлатоксинів B₁, B₂, G₁ та G₂ – на рівні 0.005 мг/кг; для зеараленону – на рівні 0.5 мг/кг та для Т-2 токсину на рівні 0.2 мг/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);
- для отриманих значень концентрацій розраховували величини відносного стандартного відхилення (RSD,%).

Встановлено, що відносне середнє квадратичне відхилення результатів вимірювання для зразків пшениці в умовах збіжності для мікотоксинів становить: для афлатоксину B₁ – 2.77%; для афлатоксину B₂ – 2.79%; для афлатоксину G₁ – 8.76% та для афлатоксину G₂ – 1.94%.

Відносне середнє квадратичне відхилення для зеараленону та для Т-2 токсину становить відповідно 3.31% та 4.58% відповідно (табл. 3).

Отже, відносне середнє квадратичне відхилення результатів вимірювання в умовах збіжності знаходиться у межах від 1.94% до 8.76%, що не перевищує встановлених значень, наведених у регламенті комісії ЄС №401/2006 [19]. Таким чином, отримані результати оцінки збіжності свідчать про відсутність систематичних помилок у розробленій методиці.

Отримані результати узгоджуються з результатами дослідження інших авторів де було показано, що визначення мікотоксинів у зерні за методом LC-MS/MS з використанням прободіготовки QuEChERS в тій чи іншій її модифікації показує задовільні результати точності методики (повернення мікотоксинів в середньому становить 70 – 110% та RSD ≥ 20%) [13, 14].

Проте, аналіз літератури свідчить про наявність досить суперечливих даних щодо ефективності використання різних типів розчинників (100%

ацетонітрил, вода : ацетонітрил у різних співвідношеннях з додаванням або без оцтової кислоти) для екстракції мікотоксинів на першому етапі прободіготовки QuEChERS [11–14]. Отримані нами результати показують задовільні результати екстракції 6-ти мікотоксинів із зернових продуктів використовуючи 1% мурашину кислоту в ацетонітрилі на першому етапі прободіготовки.

Отже, отримані результати дають підґрунтя для подальших досліджень різних варіантів модифікації прободіготовки QuEChERS з метою одночасного LC-MS/MS визначення більшої кількості мікотоксинів у зернових продуктах.

Висновки

Розроблена методика одночасного визначення шести мікотоксинів (афлатоксинів B₁, B₂, G₁, G₂, Т-2 токсину та зеараленону) у зерні пшениці методом LC-MS/MS з використанням модифікованої прободіготовки QuEChERS характеризується задовільними метрологічними параметрами. Оптимальною рухомою фазою для розділення шести мікотоксинів є 5 мМ розчин формиату амонію у суміші метанол : вода : мурашина кислота (5:94.9:0.1 елюент А та 95:4.9:0.1 елюент В). Встановлено, що коефіцієнти кореляції (R²) для мікотоксинів значно більші, ніж 0.995. Межі виявлення (LOD) та межі кількісного визначення (LOQ) шести мікотоксинів нижчі максимально дозволених рівнів, встановлених Європейським Союзом (ЄС). Ступінь вилучення у межах від 88% до 103%. Це вказує на прийнятність запропонованої модифікованої прободіготовки QuEChERS з метою одночасної екстракції всіх шести мікотоксинів. Відносне стандартне відхилення результатів збіжності знаходиться у межах від 1.94% до 8.77%, що не перевищує встановлених норм, зазначених у регламенті ЄС № 401/2006. Результати проведених досліджень дають підстави стверджувати, що розроблена LC-MS/MS методика одночасного визначення мікотоксинів у зерні пшениці з використанням модифікованої прободіготовки QuEChERS відповідає вимогам ЄС і придатна для використання у лабораторіях хіміко-аналітичного та ветеринарного профілю.

Література

1. Kovač, M.; Bulaić, M.; Jakovljević, J.; Nevistić, A.; Rot, T.; Kovač, T.; Šarkanj, I.D.; Šarkanj, B. Mycotoxins, pesticide residues, and heavy metals analysis of croatian cereals. *Microorganisms* **2021**, *9*(2), 216. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020216>
2. Janik, E.; Niemcewicz, M.; Ceremuga, M.; Stela, M.; Saluk-Bijak, J.; Siadkowski, A.; Bijak, M. Molecular Aspects of Mycotoxins - A Serious Problem for Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(21), 8187. <https://doi.org/10.3390/ijms21218187>

3. Ülger, T.G.; Ucar, A.; Çakiroğlu, F.P.; Yilmaz, S. Genotoxic effect of mycotoxins. *Toxicon* **2020**, *185*, 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.004>
4. García, C.J. Mycotoxins: Toxicology, Identification and Control. *Toxins* **2021**, *13*(4), 242. <https://doi.org/10.3390/toxins13040242>
5. Laposha, O.A.; Senin, S.A.; Midyk, S.V.; Iakubchak, O.M.; Taran, T.V.; Zabarna, I.V., Ishchenko, L.M., Ishchenko, V.D., Ushkalov, V.O. Determination of T-2 and HT-2 Toxin in Wheat Grain by HPLC with Fluorescence Detection. *Methods Objects Chem.*

Anal. **2020**, 15(3), 137-143. <https://doi.org/10.17721/moca.2020.137-143>

6. Yakubchak, O.M.; Laposha, O.A.; Midyk, S.V.; Taran, T.V.; Zabarna, I.V. 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>

7. Zhang, K.; Tan, S.; Xu, D. Determination of Mycotoxins in Dried Fruits Using LC-MS/MS-A Sample Homogeneity, Troubleshooting and Confirmation of Identity Study. *Foods* **2022**, 11(6), 894. <https://doi.org/10.3390/foods11060894>

8. Ouahssase, A.; Adil, E.A. Mycotoxins in food: a review on liquid chromatographic methods coupled to mass spectrometry and their experimental designs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2022**; 62(10), 2606-2626. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1856034>

9. González-Curbelo, M.Á.; Vique-Martínez, D.A.; Riaño-Herrera, D.A. Pesticide-Residue Analysis in Soils by the QuEChERS Method: A Review. *Molecules* **2022**, 27(13), 4323. <https://doi.org/10.3390/molecules27134323>

10. Facorro, R.; Llompарт, M.; Dagnac, T. Combined (d)SPE-QuEChERS Extraction of Mycotoxins in Mixed Feed Rations and Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxins* **2020**, 12(3), 206. <https://doi.org/10.3390/toxins12030206>

11. Soares Mateus, A.R.; Barros, S.; Pena, A.; Silva, A.S. Development and Validation of QuEChERS Followed by UHPLC-ToF-MS Method for Determination of Multi-Mycotoxins in Pistachio Nuts. *Molecules* **2021**, 26(19), 5754. <https://doi.org/10.3390/molecules26195754>

12. Seo, H.; Jang, S.; Jo, H.; Kim, H.; Lee, S.; Yun, H.; Jeong, M.; Moon, J.; Na, T.; Cho, H. Optimization of the QuEChERS-Based Analytical Method

for Investigation of 11 Mycotoxin Residues in Feed Ingredients and Compound Feeds. *Toxins* **2021**, 13(11), 767. <https://doi.org/10.3390/toxins13110767>

13. Pantano, L.; La Scala, L.; Olibrio, F.; Galluzzo, F.G.; Bongiorno, C.; Buscemi, M.D.; Macaluso, A.; Vella, A. QuEChERS LC-MS/MS Screening Method for Mycotoxin Detection in Cereal Products and Spices. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, 18(7), 3774. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073774>

14. Santos, A.R.; Carreiró, F.; Freitas, A.; Barros, S.; Brites, C.; Ramos, F.; Sanches Silva, A. Mycotoxins Contamination in Rice: Analytical Methods, Occurrence and Detoxification Strategies. *Toxins* **2022**, 14(9), 647. <https://doi.org/10.3390/toxins14090647>

15. 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.

16. 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.

17. Derzhavni sanitarni pravyla i normy «Maksymalno dopustymi rivni okremykh zabrudniuiuchykh rehovyn u kharchovykh produktakh». Nakaz ministerstva okhorony zdorovia Ukrainy vid 13 travnia 2013 roku №368 (u redaktsii nakazu Ministerstva okhorony zdorovia Ukrainy vid 22 travnia 2020 roku № 1238). (in Ukr.).

18. DSTU 3768: 2019 Pshenytsia. Tekhnichni metody K.: Derzhstandart Ukrainy, 2019 (in Ukr.).

19. 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.