

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**ANALĪTISKĀS METODES IZSTRĀDE
MIKOTOKSĪNU NOTEIKŠANAI NOTEKŪDENS
PARAUGOS**

BAKALaura DARBS

Autors: **Romans Pavļenko**

Studenta apliecības Nr.: rp18054

Darba vadītājs: *Dr. chem.*, prof. Vadims Bartkevičs

RĪGA

2021

ANOTĀCIJA

Analītiskās metodes izstrāde mikotoksīnu noteikšanai notekūdens paraugos.
Pavļenko R., zinātniskais vadītājs Dr. ķīm., prof. Bartkevičs V. Bakalaura darbs, 49 lappuses, 27 attēli, 18 tabulas, 35 literatūras avoti, 1 pielikums. Latviešu valodā.

Mikotoksīni ir toksiskie pelējuma sēnīšu metabolisma produkti, kas rodas, sēnītēm augot pārtikā, kā arī apkārtējā vidē. Ir pierādīts, ka mikotoksīnu izplatība pārtikā var izraisīt negatīvu ietekmi uz cilvēku veselību.

Šī darba mērķis ir izstrādāt metodi mikotoksīnu noteikšanai notekūdens paraugos, lai turpmākajos pētījumos būtu iespēja aprēķināt, izmantojot 5-hidroksiindoletīkskābi (5-HIAA) kā populācijas biomarkieri, iedzīvotāju ekspozīciju ar mikotoksīniem. Analizējot dažus notekūdens paraugus, tika detektēti deoksivalenols (DON), beauvericīns (BEA), enniatīns A (ENNA), enniatīns A1 (ENNA1), enniatīns B (ENNB) un enniatīns B1 (ENNB1).

MIKOTOKSĪNI, CFE PROCEDŪRA, MASSPEKTROMETRIJA, HROMATOGRĀFIJA, NOTEKŪDENS.

ABSTRACT

Development of the analytical method for the determination of mycotoxins in wastewater samples. Pavļenko R., supervisor doc. Bartkevičs V. Bachelor's thesis, 49 pages, 27 figures, 18 tables, 35 literature references, 1 appendice. In Latvian.

Mycotoxins are toxic products of moulds that occur when fungi grow on human and animal food as well as the environment. The spread of mycotoxins in food has been shown to have adverse effects on human health.

The aim of this work is to develop a method for the determination of mycotoxins in wastewater samples, so that in future studies it will be possible to calculate the exposure of the population to mycotoxins using 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) as a population biomarker. Deoxynivalenol (DON), beauvericin (BEA), enniatin A (ENNA), enniatin A1 (ENNA1), enniatin B (ENNB) and enniatin B1 (ENNB1) were detected in some wastewater samples.

MYCOTOXINS, SPE PROCEDURE, MASSPECTROMETRY, CHROMATOGRAPHY, WASTEWATER.

SATURS

Apzīmējumu saraksts	4
Ievads	7
1. Literatūras apskats	8
1.1. Mikotoksīnu klasifikācija	8
1.2. Mikotoksīnu iedarbība uz organismu	10
1.3. Notekūdens daba, to piesārņojums	10
1.4. Mikotoksīnu izplatība	11
1.5. Mikotoksīnu biomarķieri	12
1.6. Mikotoksīnu analīzes metodes ūdeņos	13
2. Eksperimentālā daļa	18
2.1. Materiāli un izejvielas	18
2.2. Paraugu sagatavošana	19
2.3. Instrumentālā analīze	19
3. Rezultāti un to izvērtējums	22
3.1. LC-MS/MS parametru optimizācija	22
3.2. Analītiskās kolonnas izvēle	23
3.3. Paraugu sagatavošanas daļas optimizācija	28
3.4. Metodes validācija	34
3.5. Reālo paraugu analīze	43
Secinājumi	46
Izmantotā literatūra	47
Pielikumi	50
1. pielikums. LU 79. konferences tēzes	50

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

α -ZAL	α -Zearalanols
α -ZOL	α -Zearalenols
15-ACS	15-Acetoksiscirpenols
15-ADON	15-Acetildeoksinivalenols
3-ADON	3-Acetildeoksinivalenols
5-HIAA	5-Hidroksiindoletiķskābi
Abs	Absolūtā
ACN	Acetonitrils
ACS	Amerikas Ķīmijas biedrība
AFB1	Aflatoksīns B ₁
AFB2	Aflatoksīns B ₂
AFG1	Aflatoksīns G ₁
AFG2	Aflatoksīns G ₂
AFM1	Aflatoksīns M ₁
AFM2	Aflatoksīns M ₂
ALT	Altenuēns
am.ac.	Amonija acetāts
AME	Alternariola monometilēteris
AOH	Alternariols
BEA	Beauvericīns
CFE	Cietfāzes ekstrakcija
CIT	Citrinīns
CPA	Ciklopiazonskābe
CVD	Citreoviridīns
D15G	Deoksinivalenol-15-glikuronīds
D3G	Deoksinivalenol-3-glikuronīds
DAS	Diacetoksiscirpenols
DMFA	Dimetilformamīds
DOM-1	Deepoksi-deoksinivalenols
DON	Deoksinivalenols
ECY	Ergokriptīns
ECO	Ergokornīns
ENN	Enniatīni

ENNA	Enniatīns A
ENNA1	Enniatīns A ₁
ENNB	Enniatīns B
ENNB1	Enniatīns B ₁
EtAc	Etilacetāts
FB1	Fumonizīns B ₁
FB2	Fumonizīns B ₂
FB3	Fumonizīns B ₃
FUSX	Fusarenons X
GLT	Gliotoksīns
HT-2	HT-2 Toksīns
IDL	Instrumentālā detektēšanas robežas
LC	Šķidrums hromatogrāfija
LC-MS	Šķidrums hromatogrāfija masspektrometrija
LC-MS/MS	Šķidrums hromatogrāfija tandēma masspektrometrija
LD	Letālā deva
LOD	Kvalitatīvās noteikšanas robeža
LOQ	Kvantitatīvā noteikšanas robeža
ME	Matricas efekts
MeOH	Metanols
MON	Moniliformīns
MS	Masspektrometrija
MS/MS	Tandēma masspektrometrija
N/F	Nav atrasts
NBE	Notekūdeņu balstīta epidemioloģija
NEO	Neosolaniols
NIV	Nivalenols
OTA	Ohratoksīns A
OTB	Ohratoksīns B
OTC	Ohratoksīns C
PA	Penicilskābe
PAT	Patulīns
PFP	Pentafluorfenils

Rel	Relatīvā
ROQ	Rokfortīns
RP	Apgrieztā fāze (Reversed-phase)
SRM	Izvēlētais reakcijas monitorings
STC	Sterigmatocistīns
SUL	Sulohrīns
T-2	T-2 Toksīns
TET	Tentoksīns
THF	Tetrahidrofurāns
VERA	Verrucarīns A
ZAN	Zearalanons
ZEA	Zearalenons
β-ZAL	β-Zearalanols
β-ZOL	β-Zearalenols

IEVADS

Mikotoksīni ir pelējuma sēņu metabolīti, kas ir plaši izplatīti augu valsts izcelsmes objektos, piemēram, graudaugos, žāvētos augļos, riekstos un garšvielās. Lielākā daļa mikotoksīnu ir ķīmiski stabili, tie iztur uzglabāšanu un pārstrādi. Cilvēki galvenokārt uzņemt mikotoksīnus ar pārtiku un noteikts šo savienojumu daudzums nonāk notekūdeņu paraugos metabolisma rezultātā.¹

Galvenie mikotoksīnu izplatības avoti apkārtējā vidē ir noteces un drenāžas ūdens no laukiem, kas iet cauri inficētiem graudaugiem, lauksaimniecības dzīvnieku un cilvēku urīna un ekskrementu izvadīšana ar kanalizācijas sistēmām.² Notekūdeņos ir bieži sastopami sekojoši mikotoksīni – DON un tā metabolīti, nivalenols (NIV), BEA, zearalenons (ZEA) un tā metabolīti.³

Izmantojot notekūdeņu balstīto epidemioloģiju (NBE), ir iespējams aprēķināt iedzīvotāju ekspozīciju ar mikotoksīniem, kā arī novērtēt to rašanos pārtikas produktos, izmantojot 5-HIAA kā populācijas biomarķieri.⁴ Zinātniskajā literatūrā ir ierobežota informācija par mikotoksīnu noteikšanas metodēm notekūdeņos paraugos. Pārsvārā izmantotās metodes ir līdžīgas un iekļauj lielu parauga alikvotu, kas padara sagatavošanas metodi ļoti laiktietilpīgu. Savukārt instrumentālās metodes neiekļauj ENN, kā arī metodes kvalitatīvās noteikšanas robežas dažādiem savienojumiem, piemēram, BEA, ir salīdzinoši augstas.^{1,5-11} Tādēļ ir nepieciešams samazināt analizējamā parauga tilpumu līdz 500 mL, lai paātrinātu paraugu sagatavošanas procesu un samazinātu palīgmateriālu patēriņu. Turklāt ir nepieciešams izstrādāt instrumentālo metodi mikotoksīnu noteikšanai, sasniegt labāku mikotoksīnu analītisko signālu selektivitāti un jutību, lai turpmāk kontrolētu mikotoksīnu izplatību, un iegūtu informāciju notekūdeņu balstītā epidemioloģijā.

Bakalaura darba mērķis ir izstrādāt un validēt metodi mikotoksīnu noteikšanai notekūdeņos, pielietojot šķidrums hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas (LC-MS/MS) metodi.

Darba uzdevumi:

1. veikt zinātniskās literatūras izpēti par mikotoksīnu izplatību notekūdeņos;
2. izstrādāt un veikt validāciju LC-MS/MS metodei mikotoksīnu noteikšanai notekūdeņos;
3. optimizēt paraugu sagatavošanas metodi;
4. veikt reālu paraugu analīzi.

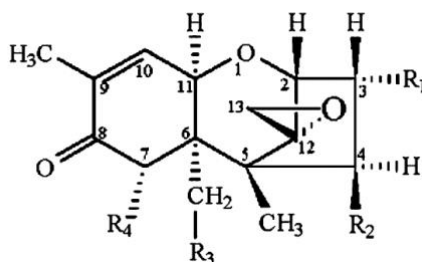
1. LITERATŪRAS APSKATS

Mikotoksīni ir toksiski sekundārie metabolīti, ko ražo noteiktas sēņu sugas, galvenokārt, *Aspergillus*, *Fusarium* un *Penicillium*. Šiem savienojumiem piemīt potenciāli kancerogēna, teratogēna un imūnsupresīva iedarbība.^{12,13} Pelējuma sēņu augšana un turpmākā mikotoksīnu veidošanās var notikt kultūraugos uz lauka, graudu uzglabāšanas laikā, barības transportēšanas laikā no fermas līdz galamērķim, kā arī pārtikas pārstrādes procesos.¹⁴

Paaugstināta mikotoksīnu izplatība ir novērojama valstīs, kurās nav attīstīta labas lauksaimniecības un pārtikas ražošanas prakse. Visbiežāk negatīvās sekas uz veselību, ko izraisījusi mikotoksīnu ietekme, novēro sabiedrībā, kur ir trūcīgi dzīves apstākļi un nav pieejama kvalitatīva pārtika.¹⁵

1.1. Mikotoksīnu klasifikācija

Kopumā ir identificēti vairāk nekā 300 mikotoksīnu veidi, kurus var izdalīt 6 galvenās mikotoksīnu klasēs pēc to nelabvēlīgās ietekmes uz cilvēku un dzīvnieku veselību – aflatoksīni, ohratoksīni, fumonizīni, zearalenoni, patulīns (PAT) un trihotecēni (sk. 1.1.1. att.).

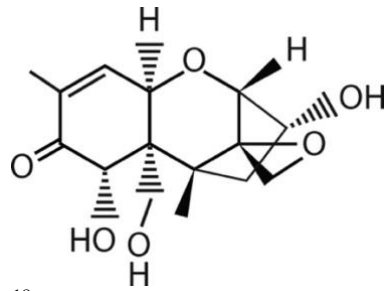


1.1.1. att. Galveno trihotecēnu molekulārā struktūra. R ir OH vai aciloksigrupa (visbiežāk acetoksi). B klases trihotecēnam DON, R₁ ir OH, R₂ ir H, R₃ ir OH un R₄ ir OH¹⁶

Tos definē mazākās mikotoksīnu klasēs – ergota alkoloīdi, citrinīns (CIT), ciklopiazonskābe (CPA), sterigmatocistīns (STC), moniliformīns (MON), gliotoksīns (GLT), citreoviridīns (CVD), penicilskābe (PA), rokfortīns (ROQ), BEA, ENN un citi.¹⁶

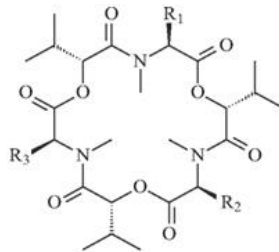
Pie aflatoksīniem pieder aflatoksīns B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) un G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁) un M₂ (AFM₂); ohratoksīniem – ohratoksīns A (OTA), B (OTB) un C (OTC); trihotecēniem – T-2 Toksīns (T-2), HT-2 Toksīns (HT-2), DON, u.c.; fumonizīniem – fumonizīns B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) un B₃ (FB₃); zearalenoniem – pats ZEA un tā metabolīti. A grupas trihotecēni ir T-2, HT-2. B grupas trihotecēni ir DON, NIV, 3-Acetildeoksinivalenol (3-ADON), 15-Acetildeoksinivalenol (15-ADON), fusarenon-X (FUSX), T-2 Tetraols.¹⁴

Deoksinivalenols. DON jeb vomitoksīns ir visizplatītākais mikotoksīns kultūraugos visā pasaulē, kuru galvenokārt ražo sēne *Fusarium* (sk. 1.1.2. att.).¹⁷



1.1.2. att. DON ķīmiskā struktūra¹⁸

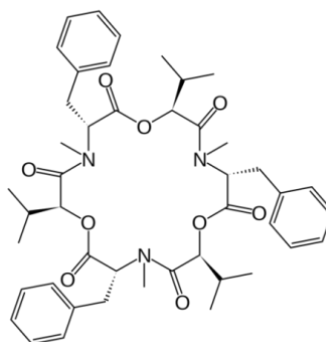
Enniatīni. ENN ir cikloheksadepsipeptīdi, kas sastāv no mainīgām trīs N-metilamīnoskābju atlikumiem, tādām kā valīna, leicīna un izoleicīna, un trīs hidroksi skābju atlikumiem, parasti hidroksiizovalerīnskābes. Ir zināmi vairāki ENN (A, A₁, B, B₁, B₂, B₃, B₄, D, E, F un G), bet starp tiem pasaulē visizplatītākie ir ENNA, ENNA1, ENNB un ENNB1 (sk. 1.1.3. att.).¹⁸



ENN	R1	R2	R3
A	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
A ₁	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
B	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
B ₁	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

1.1.3. att. ENN ķīmiskā struktūra¹⁸

Beauvericīns. BEA pieder pie ENN grupas, tas ir ciklisks heksadepsipeptīds, kuru ražo pelējumsēnes. Kā mikotoksīns BEA ir dabisks piesārņotājs daudzās labībās un labības produktos. Galvenā atšķirība BEA no ENN ir tam piemītošās N-metilamīnskābes īpašības (sk. 1.1.4. att.).¹⁹



1.1.4. att. BEA ķīmiskā struktūra¹⁹

1.2. Mikotoksīnu iedarbība uz organismu

Metabolisma rezultātā mikotoksīni uzkrājas dažādos orgānos vai audos.¹ Šie metabolīti veido toksigēnisko un ķīmiski neviendabīgu kopu, tāpēc ka var izraisīt cilvēku un citu mugurkaulnieku slimības dažādās pakāpēs vai pat nāvi. Ir zināms, ka toksigēnās sēnes ražo vienu vai vairākus no šiem toksiskajiem sekundārajiem metabolītiem, taču ir pierādīts, ka ne viss pelējums ir toksigēns un ne visi sekundārie metabolīti no veidnēm ir toksiski.²⁰

DON var iedarboties uz cilvēka veselību pēc piesārņotu pārtikas produktu – auzu, miežu, kviešu un citu graudu uzņemšanas. DON ir mazāk toksisks nekā citi trihotecēni, tomēr ārkārtīgi liela deva var izraisīt nāvi. LD50 pelēm svārstās no 49 līdz 70 mg/kg (intraperitoneāla DON injekcija) un 46 līdz 78 mg/kg (perorāla DON ievadīšana). Dažos gadījumos ir reģistrēta īslaicīga slikta dūša un vemšana. Citas blakusparādības ir caureja, sāpes vēderā, galvassāpes, reibonis un drudzis.²¹

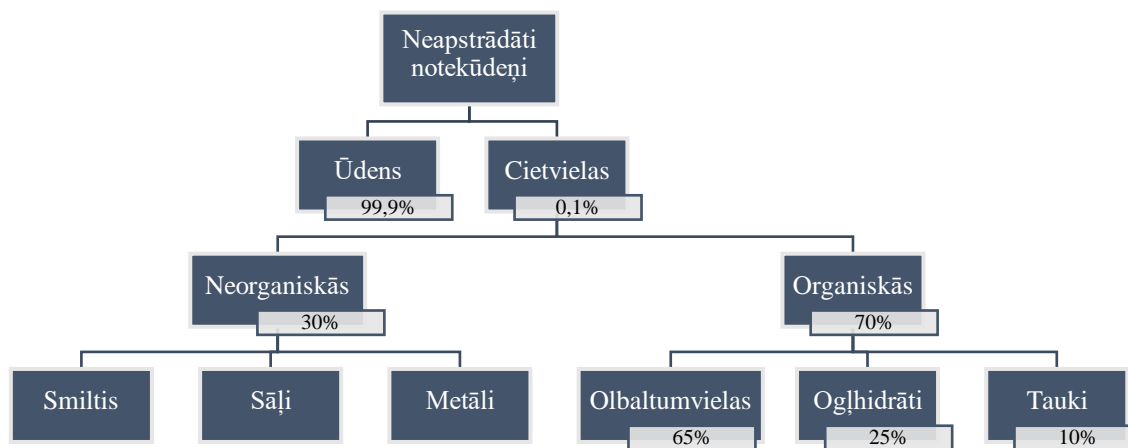
BEA ir genotoksisks savienojums. BEA un ENN darbības mehānismi ir saistīti ar tā aktivitāti, kas palielina jonu caurlaidību bioloģiskajās membrānās, tā rezultātā BEA un ENN izraisa citotoksicitāti un spēj radīt oksidatīvo stresu molekulārajā līmenī, tomēr vairāki antioksidantu mehānismi aizsargā šūnas pret BEA radīto oksidatīvo stresu. Neskatoties uz spēcīgo citotoksicitāti, joprojām nav veikts riska novērtējums toksicitātes datu trūkuma dēļ, tāpēc BEA toksikoloģiskās ietekmes pētījumi joprojām turpinās.^{22,23}

NBE ir jauna biomonitoringa pieeja, kas var sniegt tiešu informāciju par cilvēku uzņemto mikotoksīnu daudzumu. Tā ir balstīta uz specifisku cilvēka vielmaiņas izdalīšanās produktu (biomarķieru) analīzi pilsētu notekūdeņos, kas tieši atspoguļo piesārņotāju uzņemšanu visā sabiedrībā.¹

NBE var izmantot, lai paplašinātu informāciju par mikotoksīniem. Izmantojot NBE, var atvieglot un paātrināt monitoringu, lai pieņemtu lēmumus par pieļaujamām devām.¹

1.3. Notekūdens daba, to piesārņojums

Notekūdens ir sarežģīta matrica ar neorganisko un organisko savienojumu maisījumiem. Sastāvā ir viss kanalizācijā izvadītais materiāls, ieskaitot arī no ceļiem un jumtiem izskalotos materiālus un gruntsūdeņus. Notekūdeņus var sadalīt sanitārajos, rūpniecības un sadzīves notekūdeņos, kas, savukārt, sastāv no rūpniecības un sanitāriem notekūdeņiem. Notekūdeņu sastāvs ir ļoti nevienveidīgs, tas var mainīties katru stundu vai biežāk (sk. 1.3.1. att.).²⁴



1.3.1. att. Neapstrādātu notekūdeņu sastāvs²⁴

Notekūdeņi sastāv no 99,9% ūdens un no 0,1% cietvielām. Cietvielas sastāvā ir fekāliju un pārtikas daļiņas, tauki, eļļas, ziepes, sāļi, metāli, mazgāšanas līdzekļi, plastmasas un smiltis. Organisko daļu veido olbaltumvielas, ogļhidrāti un tauki.²⁴

Kā notekūdens piesārņotāji zinātniskajā literatūrā aprakstīti smagie metāli, antibiotikas, pesticīdi, ftalāti, policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži, halogenētie savienojumi. Notekūdeņos ir detektēti vairāk nekā 700 jauni piesārņotāji un to metabolīti.²⁵

1.4. Mikotoksīnu izplatība

Mikotoksīni ir sastopami graudaugos, žāvētos augļos, riekstos, garšvielās, tējās, sieros un daudzos citos pārtikas produktos. Tiek novērtēts, ka 25% no pasaules kultūru ir piesārņoti ar mikotoksīniem. Sagaidāms, ka šī proporcija nākotnē palielināsies, pieaugot globālajam pārtikas pieprasījumam un globālajām klimatiskajām un vides izmaiņām.^{1,15}

Publicētie zinātniskie raksti liecina par biežu mikotoksīnu izplatību notekūdeņos. Pieejamo analītisko metožu jutība ļauj detektēt vairākus mikotoksīnus. Tabulā ir apkopota informācija par veiktiem pētījumiem par mikotoksīnu izplatību notekūdeņos (sk. 1.4.1. tabulu).

1.4.1. tabula

Pilsētas notekūdeņos izmērīto mikotoksīnu koncentrācija ng/L un noteikšanas biežums (iekavās)¹

	Milāna, Itālija (7 paraugi)	Mocanika, Itālija (8 paraugi)	Kastelons, Spānija (7 paraugi)	Centrālā Spānija (7 paraugi)
DON	34,6 ± 4,2 (100%)	32,8 ± 11,2 (100%)	46,6 ± 16,3 (100%)	32,2 ± 9,3 (100%)
FB1	5,9 ± 0,7 (100%)	104,1 ± 52,6 (100%)	< 2,0 (0%)	< 2,0 (0%)
FB2	1,4 ± 0,1 (100%)	7,8 ± 3,0 (100%)	< 0,5 (0%)	< 0,5 (0%)
FB3	< 3,3 (100%)	5,5 ± 2,6 (100%)	2,3 ± 1,7 (100%)	< 3,3 (0%)

Gracia-Lor pētījumā tika detektēti 4 mikotoksīnu savienojumi Itālijas un Spānijas pilsētas notekūdeņos (DON un fumonizīni) no 11 analizētiem savienojumiem.¹ Tika analizēti 29

notekūdeņu paraugi, no tiem visos ir detektēts DON. Vislielākā koncentrācija paraugos tika detektēta FB1 Moccanikā, Itālijā, kas ir $104,1 \pm 52,6$ ng/L. Schenzel pētījumā tika detektēti DON, 3-ADON, BEA visos notekūdeņos no 34 analizētiem mikotoksīniem Rekenholcā, Šveicē.⁵ 3-ADON un BEA tika detektēti zemāk par LOQ vērtību, kas attiecīgi ir 6 un 3,4 ng/L. DON koncentrācija tika detektēta diapazonā 16,4 – 38,8 ng/L. Citā Schenzel pētījumā tika detektēti 3-ADON, DON, NIV un BEA, koncentrācijās attiecīgi 6,0 – 42,0 ng/L, 19,2 – 73,4 ng/L, 1,6 – 38,8 ng/L un zemāk par LOQ, kas ir 3,4 ng/L, Šveicē.² Wettstein publikācijā tika detektēts DON visos paraugos diapazonā 37 – 122 ng/L Šveicē.¹¹ Kolpin rakstā notekūdeņos Ņujorkā tika kvantificēti sekojoši mikotoksīni – 3-ADON, DON, α -Zearalenols (α -ZOL) un β -Zearalenols (β -ZOL), kuru ar maksimālās koncentrācijas ir attiecīgi 44,8 ng/L, 75,4 ng/L, 1701 ng/L, 1828 ng/L.³

Kā ir redzams, detektēto mikotoksīnu koncentrācijas ir ļoti atkarīgas no ģeogrāfiskās atrašanās vietas, ūdens sastāva, vides apstākļiem un daudziem citiem faktoriem.

1.5. Mikotoksīnu biomarķieri

Biomarķieri ļauj kvalitatīvi un kvantitatīvi novērtēt iedarbību, iekšējo devu jeb mikotoksīnu un to metabolītu līmeni organismā, toksikoloģisko iedarbību un jutīgumu. Toksiskās iedarbības biomarķieri var būt specifiski pievienojumi vai citi ķīmiski produkti, kas parāda kritiskā ķīmiskā produkta izmaiņas vai fermentu sistēmas izmaiņas.²⁶

Deoksinivalenols. Cūkas absorbē 54 – 89% no uzņemtā DON. DON toksikokinētika cūkām ir labs cilvēka aizstājēja modelis. 10% no DON asinīs ir saistīti ar plazmas olbaltumvielām. Zarnas, aknas un nieres pārveido absorbēto DON, veidojot deoksinivalenolaglikuronīdus, kuri ātri izdalās, galvenokārt, ar urīnu, ar nelielu daudzumu žults. Arī brīvais DON tiek izvadīts ar urīnu.²⁶ *In vitro* pētījumi parādīja, ka liela daļa DON tiek pārveidota par DON metabolītiem, starp kuriem deoksinivalenol-15-glikuronīds (D15G) bija dominējošais DON metabolīts cilvēka aknās. Otrs dominējošais DON metabolīts ir deoksinivalenol-3-glikuronīds (D3G), kas tika novērots zemākos līmeņos D3G cilvēkiem. Cilvēka aknu mikrosomas spēj veidot tikai divus DON metabolītus, savukārt, dzīvnieku aknu mikrosomas spēj veidot dažādus DON metabolītus: D3G, DON-8,15-hemiketal-8-glikuronīdu, D15G, izo-DON-3-G un izodeoksinivalenol-8-glikuronīdus.²⁷

Lielākā daļa izdalītā DON bija glikuronidētā stāvoklī (> 75%) un D15G bija dominējošā urīna izdalīšanās forma cilvēkiem. DON, D3G un D15G ir uzskatāmi par DON biomarķieriem urīnā.^{26,27}

Beauvericīns un enniatīni. *In vivo* pētījumi tika veikti ar cūkām un broileru cāļiem, kuri baroti ar ENNB1 piesārņotu barību, tika detektēti 11 provizorisks galveno ENNB1 metabolīti

urinā. Tie paši provizoriskie metabolīti tika atklāti *in vitro* pēc cilvēka aknu mikrosomu inkubācijas ar ENNB1.²⁸ *In vitro* un *in vivo* dati liecina, ka pēc absorbcijas BEA un ENN ātri metabolizējas par dažādiem neraksturīgiem metabolītiem. Ātra metabolisma dēļ būtiska ir tikai 1. fāzes vielmaiņa, kas ietver hidroksilēšanas, karboksilēšanas un N-demetilēšanas reakcijas. Šos procesus vislabāk var aprakstīt ENNB. Hidroksilētie un karbonilētie produkti un pats ENNB1 ir visizplatītākie ENNB1 metabolīti cilvēka urīnā.²⁸

1.6. Mikotoksīnu analīzes metodes ūdeņos

Mikotoksīnu noteikšanai notekūdeņos ir aprakstītas dažādas metodes, kuru pamatā ir LC-MS/MS. Veicot literatūras izpēti, tika apkopotas 6 noteikšanas metodes atbilstoši instrumentālās analīzes procedūrai, validācijas parametriem un paraugu sagatavošanas veidam (sk. 1.6.1. tabulu).

1.6.1. tabula

Mikotoksīnu paraugu sagatavošanas metodes salīdzināšana

Nr.	Analīti	IS	Parauga tilpums, L	pH	Filtrēšana	CFE kolonnas	Eluēšanas šķīdums	Rekonstruēšanas šķīdums	Lit.
1.	34	Ir	1,0	6,6–7,0	Stikla šķiedras filtrs 1,2 μm	Oasis HLB (200 mg/6 mL)	MeOH	H ₂ O/MeOH (9:1)	5
2.	11	Ir	0,025	2,5–3,0	Stikla šķiedras filtrs 1,6 μm	Oasis HLB PRiME	MeOH	H ₂ O/MeOH (8:2)	1
3.	ZEA	N/F	0,50 – 1,0	Nē	Nr. 5 filtrpapīrs, stikla šķiedras filtri	ZearalaTest afinitāte kolonna	MeOH	H ₂ O/MeOH/ACN (7:2:1)	6-8
4.	DON ZEA ZEA ZAN	Ir	1,0	Nē	Stikla šķiedras filtrs 1,2 μm	Oasis HLB (200 mg/6 mL)	EtAc	H ₂ O/MeOH (9:1)	9
5.	α-ZOL α-ZAL β-ZOL β-ZAL	Ir	1,0	Nē	Stikla šķiedras filtrs 1,2 μm	Supelclean Envi-18 (500 mg/6 mL)	ACN	H ₂ O/ACN (8:2)	10
6.	DON	Ir	1,0	Nē	Stikla šķiedras filtrs 1,4 μm	Oasis HLB (200 mg/6 mL)	EtAc	H ₂ O/MeOH (9:1)	11

Vislielākais analizētais analītu skaits ir 1. metodē, kurā tiek analizēti 34 mikotoksīni: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 un AFM1, altenuēns (ALT), alternariols (AOH) un to monometilēteris (AME), tentoksīns (TET), ergokornīns (ECO), ergokriptīns (ECY), FB1, FB2 un FB3, OTA un OTB, BEA, STC, sulohrīns (SUL), CIT, PAT, ZEA un to α- un β- metabolīti, diacetoksiscirpenols (DAS), HT-2 un T-2, neosolaniols (NEO), verrucarīns A (VERA), 3-ADON, 15-ADON, DON, FUSX un NIV. 2. metodē analizē tikai 11 mikotoksīnus: DON, deepoksi-deoksinivalenols (DOM-1), 3-ADON, 15-ADON, NIV, T-2, ZEA, β-ZOL, FB1, FB2, FB3.

Mikotoksīnu noteikšanai izmanto paraugu tilpumu no 25 līdz 1000 mL. Gandrīz visās metodes izmanto 1,0 L parauga, to iekonzentrēt ar CFE kolonnas, kā arī Oasis HLB kolonnām ir rekomendētais tilpums ir 1,0 L ūdens paraugiem. Oasis HLB papildus tika izvēlēts tā spējas efektīvi saglabāt lielu skaitu bāzes, neitrālu un skābu savienojumu un plašā pielietojuma diapazona dēļ. Salīdzinot metodes, ir redzams, ka paraugus parasti nepaskābina, tomēr tas ir atkarīgs no savienojuma, kuru analizē dotajā paraugā. 1. metodē ir parādīts, ka paraugu nedaudz paskābina ar etiķskābi, tomēr rezultātā netika novērotas būtiskas atšķirības CFE atgūstamībā starp pH 5 un 7.⁵

2. metodē izmanto Oasis HLB PRiME kolonnas. Saskaņā ar ražotāja ieteikumiem kolonnām nav nepieciešama kondicionēšana, tādējādi ir iespējams saīsināt paraugu sagatavošanas laiku.¹ Supelclean Envi-18 CFE kolonnas, kas ir minētas 5. metodē, izmanto ūdens paraugu labākai attīrīšanai.¹⁰ ZearalaTest kolonnas izmanto tieši ZEA izolēšanai no ūdens paraugiem.⁶⁻⁸

Visās aprakstītajās metodēs tiek izmantots iekšējais standarts. Šādu pieeju izmanto, lai kompensētu zudumus parauga sagatavošanas laikā, kā arī, lai samazinātu matricas efektu.

Kolonnas skalošana notiek tikai 3 metodēs ar 5 mL ūdeni, tomēr citās metodēs ir aprakstīts, ka CFE kolonnas skalošanas dēļ notiek nejauša analītu eluēšana no kolonnām uz atkritumiem.^{5,9-11}

Kā eluēšanas šķīdumu pārsvarā izmanto metanolu, tomēr dažās metodēs izmanto arī acetonitrilu un etilacetātu. Metanolu izmanto, jo tā ir paredzēts CFE kolonnu instrukcijās par paraugu sagatavošanu ar CFE procedūru, kā arī augstāk minētos šķīdinātājus viegli var ietvaicēt slāpekļa plūsmā un izvēlēto mikotoksīnu savienojumu šķīdība ir pieteikama.²⁹

Kā rekonstruēšanas šķīdumu izmanto ūdens un metanola maisījumu, jo tie ir polāri šķīdinātāji, kuros šķīst daudzi mikotoksīni. Svarīgi, lai rekonstruēšanas šķīdumu sastāvs nebūtu ļoti atšķirīgs no fāzes sastāva injekcijas sākumā.

Metodes salīdzināšana atbilstoši instrumentālās analīzes procedūrai tika attēlota tabulā (sk. 1.6.2. tabulu).

Mikotoksīnu instrumentālo analīzes salīdzināšana

Nr.	Detektors	Analītiskā kolonna	Gradients	Injekcijas tilpums, μL	Plūsmas ātrums, mL/min	Lit
1.	MS/MS	Pyramide C18 (125 x 2 mm, 3 μm) + C18 (2,1 x 20 mm, 3 μm)	A: H ₂ O/MeOH/etiķsk. (89:10:1) + 5 mM am.ac B: H ₂ O/MeOH/etiķsk. (2:97:1) + 5 mM am.ac	40	0,20	⁵
2.	MS/MS	Xselect CSH C18 (2,1 x 100 mm, 2,5 μm)	A:H ₂ O + 0,1% HCOOH B: ACN	4	0,18	¹
3.	Fluorescences detektors	C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)	A: ACN/H ₂ O/MeOH (46:46:8)	20	0,50	⁶⁻⁸
4.	MS/MS	Polaris C18 (50 x 2 mm, 3 μm)	A: H ₂ O/MeOH (95:5) + 5 mM am.ac. B: H ₂ O/MeOH (5:95) + 5 mM am.ac.	20	0,25	⁹
5.	MS/MS	Polaris Amide C18 (150 x 2 mm, 3 μm)	A: H ₂ O/ACN (95:5) + 10 mM am.ac. B: H ₂ O/ACN (5:95) + 10 mM am.ac.	50	0,20	¹⁰
6.	MS/MS	Polaris C18 (50 x 2 mm, 3 μm)	A: H ₂ O/MeOH (95:5) + 5 mM am.ac. B: H ₂ O/MeOH (5:95) + 5 mM am.ac.	20	0,25	¹¹

1.6.2. tabulā ir redzams, ka mikotoksīnu noteikšanai izmanto MS/MS detektoru un tikai analītiskās kolonnas ar C18 sorbentu ar dažādiem parametriem. Kā fāzes šķīdumus izmanto gan tīrus šķīdinātājus, gan ar sāļu piedevām, tādām kā piemēram, amonija acetāts (am.ac.) un amonija formiāts. Mikotoksīnu noteikšanas metodes tika optimizētas attiecībā pret analītisko kolonnas tipu, kustīgo fāzi un gradienta programmu, lai panāktu pēc iespējas lielāku selektivitāti un jutību. C18 kolonna tika izvēlēta kā stacionārā fāze, jo daudziem mikotoksīniem piemīt labas smailes formas.⁵ Dažus savienojumus ir ļoti grūti atdalīt vienu no otra, piemēram, ergota alkaloīdu epimērus, taču atdalīšana tika uzlabota, eluentu šķīdumos pievienojot 1% etiķskābi.⁵

Sāļu piedevu izmanto labākai savienojumu jonizācijai, jo mikotoksīnus jonizēja [M-H]⁻, vai [M+H]⁺ formā, vai attiecīgajos amonjaka un acetāta aduktos. Dažiem mikotoksīnu savienojumiem nav redzami MS signāli, ja fāzēs nav izmantoti amonija sāļi.^{1,5}

Injekcijas tilpumi tika izvēlēti pēc kolonnas tipiem un iekonzentrēšanas faktoriem, jo dažādām metodēm ir dažāds rekonstruēšanas šķīduma tilpums, kuru attiecīgi pievieno pēc ietvaicēšanas slāpekļa plūsmā.

Metodes salīdzināšana atbilstoši validācijas parametriem tika attēlota tabulā (sk. 1.6.3. tabulu).

Mikotoksīnu validācijas parametru salīdzināšana

Metodes Nr., [literatūra]	Savienojumi	Abs. R., %	Rel. R., %	U, %	LOD, ng/L	Jonu nomākšana, %
1 ⁵	3-ADON	79-85	94-104	5,5	6,0	-42
	DON	33-72	96-106	11	1,2	-61
	FB1	22-29	72-96	21	6,5	51
	FB ₂₊₃	15	N/F	12	6,0	-48
	OTA	77-89	90-105	4,3	0,80	-7
	BEA	76-104	N/F	6,3	3,4	18
	α-ZOL	14	N/F	24	22	88
	β-ZOL	21-29	N/F	34	31	84
	ZEA	74-80	86-103	13	13	57
	HT-2	74-90	86-90	4,5	4,8	-16
	T-2	80-94	94-102	5,7	1,2	-4
2 ¹	DON	N/F	108	4,0	3,1	
	DOM-1	N/F	116	4,0	3,5	
	3-ADON	N/F	104	3,0	6,0	
	15-ADON	N/F	88	7,0	7,6	
	NIV	N/F	47	11	29	
	T-2	N/F	105	1,0	0,30	N/F
	FB1	N/F	91	7,0	0,60	
	FB2	N/F	130	9,0	0,15	
	FB3	N/F	75	10	0,99	
	ZEA	N/F	94	2,0	2,3	
	β-ZEA	N/F	121	4,0	2,7	
3 ⁶⁻⁸	ZEA	74	N/F	6,2	1,7	N/F
4 ⁹	DON	85	91	9,0	1,4	18
	ZEA	94-109	104-115	4,0	0,80	5,0
5 ¹⁰	ZEA	94-109	104-115	5,0	0,80	58
	Zearalanons	88	101-102	6,0	3,7	56
	a-Zearalanol	92-99	113-121	14	12	57
	b-Zearalanol	84-88	90-99	10	6,3	66
	a-Zearalenol	94-98	98-118	9,0	2,3	67
	b-Zearalenol	86-93	94-103	7,0	4,8	68
6 ¹¹	DON	85	91	12	1,4	18

Tika salīdzināti mikotoksīnu validācijas parametri dažādās metodēs. 1. metodei no 34 savienojumiem tika izvēlēti ne tikai tie savienojumi, kurus var salīdzināt ar citām metodēm, kā arī tie (DON un BEA), kas turpmāk tiks iekļauti metodes izstrādē.

Jonu nomākšana raksturo nelabvēlīgo ietekmi uz detektora reakciju, ko rada samazināta interesējošā mērķanalīta jonizācijas efektivitāte. Efekts rodas no parauga matricas, kas konkurē ar jonizāciju vai citādi kavē efektīvu jonizāciju. Ir redzams, ka 1. metodē jonu nomākšana ļoti svārstās atkarībā no savienojuma no -61% līdz 88%. Apskatot atsevišķi DON, kuram jonu nomākšana ir attiecīgi -61%, var secināt, ka paraugs pēc sagatavošanas tika iegūts ar ļoti stipru matricas efektu. BEA gadījumā, jonu nomākšana ir tikai 18%, kas norāda uz to, ka paraugs ir diezgan tīrs un matrica neietekmē jonizāciju tik stipri. 4. – 6. metodei ir parādītas ļoti augstas jonu nomākšanas vērtības, kuras svārstās no 5,0% – 68%, kas secina par to, ka paraugi ir iegūti ļoti netīri, izņemot DON, jo 4. un 6. metodēs, DON jonu nomākšana ir tikai 18%.

Visās metodēs tika iegūti ļoti labi atgūstamības rezultāti, 1. metodei izvēlētiem savienojumiem relatīvās atgūstamības diapazons ir 72 – 106%, bet tas ir atkarīgs no paša savienojuma un tā spējas jonizēties. Visās metodēs DON relatīvā atgūstamība ir ļoti laba, diapazonā 91 – 108%. Absolūtā atgūstamība DON ir diapazonā 33 – 85% visos metodēs.

LOD jeb metodes kvalitatīvās noteikšanas robeža 1. metodē DON gadījumā ir 1,2 ng/L, BEA 3,4 ng/L, kas secina par to, ka parauga sagatavošanas metode un instrumentālā metode ir labi izstrādātas. 1. metodei DON ir viszemākā LOD vērtība, tomēr 1. metodes precizitāte jeb nenoteiktība ir 11%, kas ir vislielākā no visām salīdzinātām metodēm.

Apkopojot visu salīdzināto informāciju, var secināt, ka DON noteikšanas metodes ir izstrādātas ar ļoti labiem parametriem, taču BEA LOD vērtība izstrādātā metodē ir diezgan liela – 3,4 ng/L. LOD vērtību ir iespējams samazināt, izmantojot citu paraugu sagatavošanu un instrumentālo metodi. Nevienā no metodēm nav analizēti ENN, ir iespējams iekļaut tos instrumentālā metodē un detektēt notekūdeņos. Metodēs bieži izmanto 1,0 L notekūdens parauga, ir iespēja to samazināt līdz 500 mL, lai paātrinātu paraugu sagatavošanu un samazinātu palīgmateriālu patēriņu.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Metode ietver notekūdeņu parauga filtrēšanu ar stikla šķiedru filtriem, iekonzentrēšanu ar CFE kolonnām, paraugu rekonstruēšanu, filtrēšanu ar centrifūgas filtriem un mikotoksīnu noteikšanu ar šķidrums hromatogrāfiju un elektroizsmidzināšanas jonizācijas tandēma masspektrometriju, izmantojot standartpiedevu un iekšējo standartpiedevu metodi kalibrēšanai.

2.1. Materiāli un izejvielas

Paraugu paskābināšanai un eluēšanai izmantoja skudrskābi (reaģenta tīrība atbilst ACS kritērijiem) un 2-propanolu (LC-MS piemērotas tīrības).

CFE kolonnas kondensēšanai izmantoja metanolu (LC piemērotas tīrības) un dejonizētu ūdeni no Milli-Q attīrīšanas iekārtas.

Paraugu filtrēšanai izmantoja stikla šķiedras filtrus ar 0,60 μm poru izmēru. Rekonstruēšanai izmantoja metanolu, dejonizētu ūdeni, etiķskābi un am.ac. (LC-MS piemērotas tīrības).

Rekonstruēšanas šķīdumu pagatavoja 250 mL mērkolbā: iesvēra $4,82 \pm 0,01$ g am.ac. mērkolbā, pievienoja 2,525 mL 99% etiķskābes un atšķaidīja ar 50% metanola šķīdumu ūdenī līdz atzīmei.

Atšķaidīšanas šķīdumu pagatavoja 250 mL mērkolbā: iesvēra $4,82 \pm 0,01$ g am.ac., pievienoja 2,525 mL 99% etiķskābes un atšķaidīja ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei.

Kalibrēšanai ar standartpiedevu metodi izmantoja mikotoksīnu standartšķīdumus, kas pagatavoti no tīrām vielām (ar vismaz 95% tīrības): BEA, ENNA, ENNA1, ENNB un ENNB1. Kalibrēšanai ar iekšējo standartpiedevu metodi izmantoja mikotoksīnu standartšķīdumus, kas pagatavoti no tīrām vielām (ar vismaz 98% tīrību): DON un U-[¹³C₁₅]-DON.

Pamatšķīdumus ar koncentrāciju 1000 ng/μL pagatavoja 5 mL mērkolbā. Iesvēra nepieciešamo standartvielas daudzumu, izšķīdināja dimetilformamīdā (DMFA) vai acetonitrilā un atšķaidīja līdz atzīmei. Šķīdums derīgs 12 mēnešus, glabājot -20 °C temperatūrā. Aprēķinot nepieciešamo iesvaru vērtības, ņem vērā gan standartvielu tīrības pakāpi, gan veidu, kādā mērķa savienojums atrodams standartvielā.

Paraugu sagatavošanas gaitā standartpiedevas pievienošanai izmantoja mikotoksīnu darba šķīdumu. Attiecīgo darba šķīdumu ar koncentrāciju 0,125 ng/μL pagatavoja 10 mL mērkolbā, pievienojot 1,25 μL pamatšķīduma un atšķaidot līdz atzīmei ar acetonitrilu. Šķidro iekšējo standartu U-[¹³C₁₅]-DON ar koncentrāciju 0,50 ng/μL pagatavoja 5 mL mērkolbā, pievienojot 100 μL pamatšķīduma un atšķaidot līdz atzīmei ar acetonitrilu.

Paraugu sagatavošanai un analīzes veikšanai nepieciešamie trauki un aparātūra: laboratorijas svāri ar precizitāti $\pm 0,01$ g, analītiskie svāri ar precizitāti $\pm 0,0001$ g,

termostatējama centrifūga, termostatējama ūdens vanna, slāpekļa ietvaicēšanas sistēma, vakuuma manifolds, vakuuma sūkņi, CFE rezervuāri, mērcilndri (A klase, dažādi tilpumi), vārglāzes (dažādi tilpumi) , mērkolbas (A klase, dažādi tilpumi), 15 un 50 mL polipropilēna centrifūgu stobriņi, automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu 20, 200, 1000 un 5000 μL , centrifūgas filtri ar poru izmēru 0,22 μm , indikatorpapīrs, Strata X kolonnas 33 μm 500 mg/6 mL, orbitālās vibrācijas kratītājs, FilterSys vakuuma filtrēšanas sistēma, kas aprīkota ar porainu atbalstu bāzi, piltuve, 1L filtrēšanas kolba, autosamplera stikla pudelītes ar ieliktniem 32 mm, 250 μL .

2.2. Paraugu sagatavošana

Katru notekūdens paraugu labi samaisīja un iemērīja divreiz pa $500,0 \pm 2,5$ mL. Visiem paraugiem pievienoja skudrskābi līdz pH 5 un filtrēja caur stikla šķiedru filtriem, izmantojot FilterSys vakuuma filtrēšanas sistēmu, kas aprīkota ar porainu atbalstu bāzi, piltuvi, 1L filtrēšanas kolbu un vakuuma sūkņi. Katram paraugam pievienoja 10 μL DON iekšējā standartu, lai beigu koncentrācija paraugā ir 10 ng/L, un kalibrēšanai atkārtotajiem tilpumiem pievienoja mikotoksīnu standartpiedevas (piemēram, 5 ng/L, atkarībā no gaidāmās koncentrācijas paraugā un kalibrēšanas punktu skaita).

CFE kolonnas secīgi aktivizēja ar 10 mL dejonizētā ūdens, 10 mL metanola un 10 mL dejonizēto ūdeni. Salika iekārtu CFE procedūrai: virs kolonnām uzlika rezervuārus un uznesa notekūdeņu paraugus, plūsmas ātrumu regulēja ar vakuuma sūkni ap 2 – 3 pilieni/sekundē. Pēc parauga uznešanas, kolonnas žāvēja 30 minūtes un eluēja ar 10 mL 1% skudrskābes šķīdumu 2-propanolā. Iztvaicēja zem slāpekļa plūsmas pie 65°C līdz sausam atlikumam.

Paraugus rekonstruēja 120 μL rekonstruēšanas šķīduma un maisīja uz orbitālā vibrācijas kratītāja. No iegūtā šķīduma paņēma 20 μL alikvotu BEA un ENN noteikšanai, kurai klāt pievienoja 30 μL rekonstruēšanas šķīdumu un filtrēja caur centrifūgas filtriem, filtrātus iepildīja stikla pudelītēs hromatogrāfijai. Atlikušai daļai pievienoja 200 μL atšķaidīšanas šķīduma, maisīja uz orbitālā vibrācijas kratītāja un filtrēja caur centrifūgas filtriem. Iepildīja stikla pudelītēs hromatogrāfijai DON noteikšanai.

2.3. Instrumentālā analīze

Mikotoksīnu noteikšanu veica, injicējot filtrētos ekstraktus šķidrums hromatogrāfā Thermo Scientific Ultimate 3000, kas aprīkots ar pentafluorfenila reversās fāzes analītisko kolonnu vai ar grafēto oglekļa reversās fāzes analītisko kolonnu atkarībā no analīta noteikšanas (skatīt 2.3.1. tabulu un 2.3.2. tabulu).

Šķidrums hromatogrāfijas parametri BEA un ENN grupas mikotoksīnu atdalīšanai

Analītiskā kolonna	Kinetex 1,7 μm PFP 100 Å, 100 x 3 mm					
Temperatūra kolonnai	40°C					
Temperatūra autosamplerī	15°C					
Kustīgā fāze "A"	Dejonizēts ūdens + 5 mM am.ac. + 0,2% etiķskābe					
Kustīgā fāze "B"	50% metanols ūdenī					
Kustīgā fāze "C"	LC-MS tīrības metanols + 5 mM am.ac. + 0,2% etiķskābe					
Kustīgā fāze "D"	LC-MS tīrības 2-propanols					
Injekcijas tilpums un sastāvs	25 μL (50% metanols ūdenī + 250 mM am.ac. + 1% etiķskābe)					
Gradianta programma						
	Laiks, min	Plūsmas ātrums	A, %	B, %	C, %	D, %
	-6,250	0,800	100	0	0	0
	-0,010	0,800	100	0	0	0
	-0,009	0,250	100	0	0	0
	0,000	0,250	100	0	0	0
	15,000	0,250	1	0	99	0
	20,000	0,250	1	0	99	0
	24,000	0,250	1	0	99	0
	24,150	0,800	1	0	99	0
	25,000	0,800	1	0	99	0
	25,010	0,800	0	85	5	10
	29,990	0,800	0	85	5	10
	30,000	0,800	50	0	50	0
	32,500	0,800	1	0	99	0
	35,000	0,800	1	0	99	0

Šķidrums hromatogrāfijas parametri DON atdalīšanai

Analītiskā kolonna	Hypercarb 5 μm, 100 x 2,1 mm			
Temperatūra kolonnai	60 °C			
Temperatūra autosamplerī	15 °C			
Kustīgā fāze "A"	Dejonizēts ūdens + 5 mM am.ac. + 0,2% etiķskābe			
Kustīgā fāze "B"	LC-MS tīrības metanols + 5 mM am.ac. + 0,2% etiķskābe			
Kustīgā fāze "C"	THF (atbilstoši ACS kritērijiem)			
Plūsmas ātrums	0,500 mL/min			
Injekcijas tilpums un sastāvs	100 μL (33% metanols ūdenī + 250 mM am.ac. + 1% etiķskābe)			
Gradianta programma				
	Laiks, min	A, %	B, %	C, %
	-15,000	100	0	0
	0,000	100	0	0
	40,000	70	30	0
	40,100	50	50	0
	42,500	50	50	0
	42,500	0	0	100
	52,950	0	0	100
	53,000	0	100	0
	58,000	0	100	0
	58,000	50	50	0
	65,000	50	50	0

Hromatogrāfs savienots ar Thermo Scientific TSQ Quantiva kvadropolu tandēma masspektrometram, ar apsildāmo elektroizsmidzināšanas jonizācijas avotu.

Labākai savienojumu atdalīšanai uz kolonnu padotas kustīgās fāzes (dejonizēts ūdens un metanols ar 0,2% etiķskābes un 5 mM am.ac. saturu) pēc gradienta programmas, kuras ilgums ir 41,25 minūtes BEA un ENN grupas gadījumā, un 80 minūtes DON gadījumā. Tetrahidrofurānu (THF) un 2-propanolu izmanto kolonnas skalošanai. Abām metodēm tika ieprogrammēts laiks optimāla kolonnas kondensēšanai.

MS jonizācijas avots konfigurēts apsildāma elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā. Tika veikta prekursora jonu izolēšana, fragmentācija un fragmentu vienlaicīgā detektēšana pie maksimālās izšķirtspējas.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Pamatojoties uz zinātniskajā literatūrā publicētajiem datiem par mikotoksīnu izplatību notekūdeņos, instrumentālajā metodē iekļāva 23 mikotoksīnu noteikšanas pārejas, taču ne visus savienojumus izdevās detektēt, kad dažādas izcelsmes notekūdeņiem veica analīzi. Liela analītu skaita dēļ, samazinās jutība un selektivitāte attiecībā uz citiem analītiem.

3.1. LC-MS/MS parametru optimizācija

Šī pētījumā ietvaros sākotnēji tika plānots analizēt 23 mikotoksīnus notekūdeņos: BEA, ENNA, ENNA1, ENNB un ENNB1, ZEA, FB1, FB2 un FB3, DON, T-2, TET, OTA, NEO, FUSX, AOH, HT-2, 15-acetoksiscirpenols (15-ACS), alvertoksīns I, T-2 Triols, 15-ADON, 3-ADON un AFB1. Tomēr, analizējot 12 notekūdeņu paraugus, virs LOD tika detektēti tikai DON, BEA, ENNA, ENNA1, ENNB, ENNB1, savukārt citi mikotoksīnu savienojumi, kas ir minēti augstāk, netika detektēti. Tālākiem pētījumiem instrumentālā metode tika optimizēta tikai DON, BEA, ENNA, ENNA1, ENNB un ENNB1.

Pēc standartšķīdumu pagatavošanas automātiski tika veikta savienojumu fragmentācijas jonu skenēšana un kolīzijas enerģiju optimizēšana, iegūtie dati apkopoti tabulā (skatīt 3.1.1. tabulu).

3.1.1. tabula

Isolēto prekursora jonu un galveno detektēto fragmenta jonu m/z

Nosaukums	Prekursora jona m/z	Fragmenta jona m/z	Kolīzijas enerģija, V
Deoksivalenols	294,940	264,982	10,25
	355,053	247,018	14,90
U-[¹³ C ₁₅]-Deoksivalenols	310,350	279,325	10,25
	370,286	261,286	16,37
Beauvericīns	784,365	134,040	52,67
	784,368	244,071	25,83
	801,392	262,071	29,16
Enniatīns A	683,702	211,375	25,37
	683,705	200,236	39,48
	700,702	210,111	30,68
Enniatīns A1	669,701	210,040	24,16
	691,40	351,111	51,06
	691,404	232,143	55,00
Enniatīns B	641,401	196,040	24,36
	658,702	196,040	29,82
	658,705	186,111	44,43
Enniatīns B1	655,455	197,071	23,80
	672,701	542,276	27,60
	672,705	210,183	29,72

MS detektora parametri mikotoksīnu noteikšanai tika optimizēti, izmantojot optimālas parametrus no mikotoksīnu noteikšanas metodēm (skatīt 3.1.2. tabulu).

3.1.2. tabula

Masspektrometriskā detektora parametri mikotoksīnu noteikšanai

Jonizācijas veids	Apsildāmais elektroizsmidzināšanas avots (H-ESI)
Spriegums	4,0 kV (pozitīvajā režīmā)
	2,5 kV (negatīvajā režīmā)
Jonu pārneses caurules temperatūra	325°C
Iztvaicētāja temperatūra	300°C
Quantiva darbības režīms	SRM
Izšķirtspēja	1,2 FWHM

3.2. Analītiskās kolonnas izvēle

Analītisko kolonnu salīdzināšana. Tika salīdzinātas 13 analītiskās kolonnas ar C18, fenil-, C12, pentafluorfenil-, fenilheksil- un grafīta oglekli sorbentiem no populārajiem ražotājiem – Phenomenex un ThermoFischer (sk. 3.2.1. tabulu).

3.2.1. tabula

Analītisko kolonnu salīdzinājumu saraksts

Nr.	Kolonna	Izmērs, mm	Sorbcijas koeficients	Teorētisko šķīvju skaits
1.	Luna C18 3 μm	150 x 4,6	-	-
2.	Kinetex C18 1,7 μm	50 x 3,0	7,6	411
3.	Hypercarb 5 μm (lietota)	100 x 2,1	18	905
4.	Kinetex C18 1,7 μm	100 x 3,0	7,3	2004
5.	Synergi Polar-RP 4 μm	150 x 3,0	7,8	1080
6.	Kinetex PFP 1,7 μm ar UHPLC filtru	100 x 3,0	4,4	4774
7.	Omega Polar C18 1,6 μm	100 x 1,0	18	1947
8.	Omega Polar C18 3,0 μm	100 x 3,0	8,8	1838
9.	Kinetex Phenyl-Hexyl 2,6 μm	100 x 2,1	6,7	958
10.	Synergi Hydro-RP 4,0 μm	150 x 3,0	12	1171
11.	Synergi Max-RP 4,0 μm	150 x 3,0	14	633
12.	Hypercarb 5,0 μm (lietota)	100 x 2,1	1,4	58
13.	Hypercarb 5,0 μm (jauna)	100 x 2,1	45	804

Eksperimentāli salīdzināja pilnīgi jaunas un lietotas kolonnas, ar dažādiem garumiem, diametriem un poru izmēriem. Analītiskās kolonnas tika salīdzinātas pēc sorbcijas koeficienta un teorētisko šķīvju skaita, jo lielāks ir teorētisko šķīvju skaits un sorbcijas koeficients, jo efektīvāka un selektīvāka būs kolonna. Laiks, kad no kolonnas izdalās kustīgā fāze, var aprēķināt pēc vienādojuma (3.2.1. vienādojums). 0,49 izmanto kā koeficientu, tāpēc ka kolonnas ir ar virspusēji porainiem iepakojumiem.

$$t_0 = \frac{0,49 \cdot d^2 \pi L}{4000F} \quad (3.2.1.)$$

, kur t_0 – laiks, kad no kolonnas izdalās kustīgā fāze, min;
 d – kolonnas diametrs, mm;
 L – kolonnas garums, mm;
 F – plūsmas ātrums, mL/min.

Sorbcijas koeficientu var aprēķināt pēc vienādojuma (3.2.2. vienādojums).

$$k = \frac{t_{RT} - t_0}{t_0} \quad (3.2.2.)$$

, kur k – sorbcijas koeficients;
 t_{RT} – signāla aizturēšanas laiks, min;
 t_0 – laiks, kad no kolonnas izdalās kustīgā fāze, min.

Teorētisko šķīvju skaits jeb kolonnas efektivitāte var aprēķināt pēc vienādojuma (3.2.3. vienādojums):

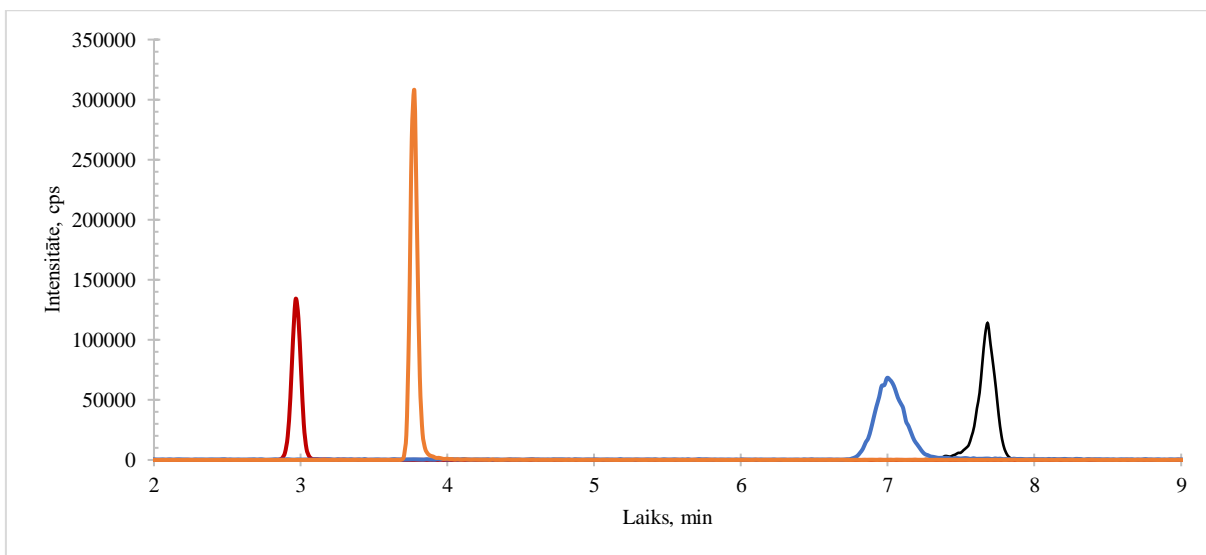
$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_{RT}}{t_{beig} - t_{sāk}} \right)^2 \quad (3.2.3.)$$

, kur N – teorētisko šķīvju skaits jeb kolonnas efektivitāte;
 t_{RT} – signāla aizturēšanas laiks, min;
 t_{beig} – signāla laiks beigās, min;
 $t_{sāk}$ – signāla laiks sākumā, min;

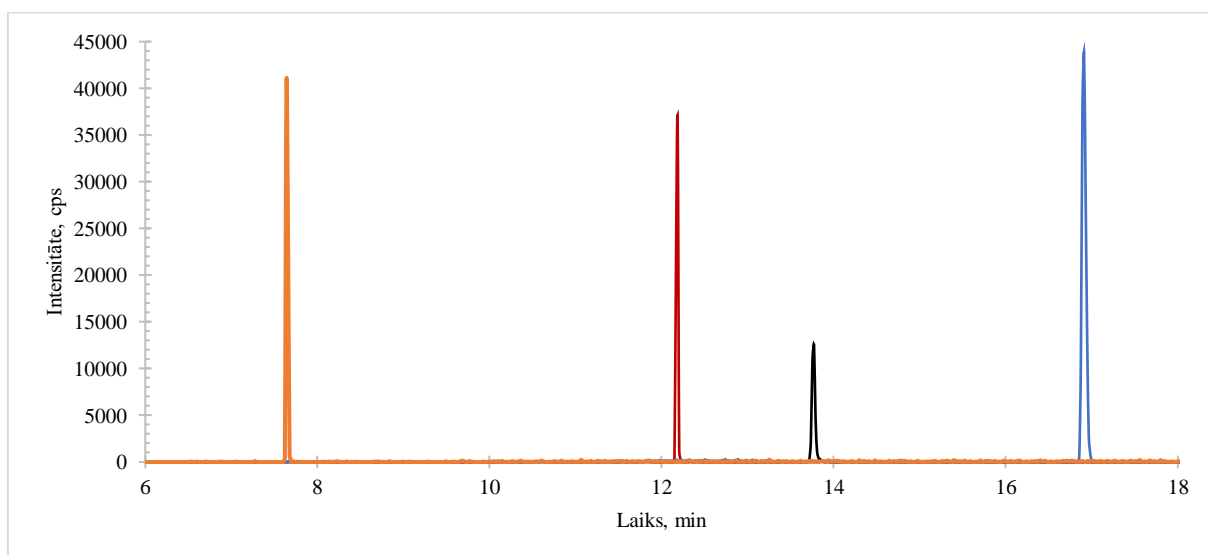
Vislielākais teorētisko šķīvju skaits tika novērots Kinetex PFP 1,7 μ m kolonnai, kas ir 4774, un sorbcijas koeficients ir 4,4. Neskatoties uz to, ka kolonnai nav vislielākais sorbcijas koeficients, tā tika izvēlēta kā prioritārā kolonna tālākajai salīdzināšanai. Vislielākais sorbcijas koeficients ir Hypercarb 5,0 μ m kolonnai, kas ir 45, šī kolonna tika izvēlēta kā prioritārā kolonna tālākajai salīdzināšanai.

Omega Polar C18 1,6 μ m kolonnai ir viens no lielākajiem sorbcijas koeficientiem, tomēr šī kolonna netika izvēlēta tālākajai salīdzināšanai, jo tā ir ļoti šaura, kas samazina gradienta attiecību maiņas ātrumu un samazina analīzes ātrumu, tādēļ pazūd signāla simetriskums. Synergi Max-RP 4,0 μ m kolonna tika izvēlēta tālākajai salīdzināšanai, jo tai ir labs sorbcijas koeficients.

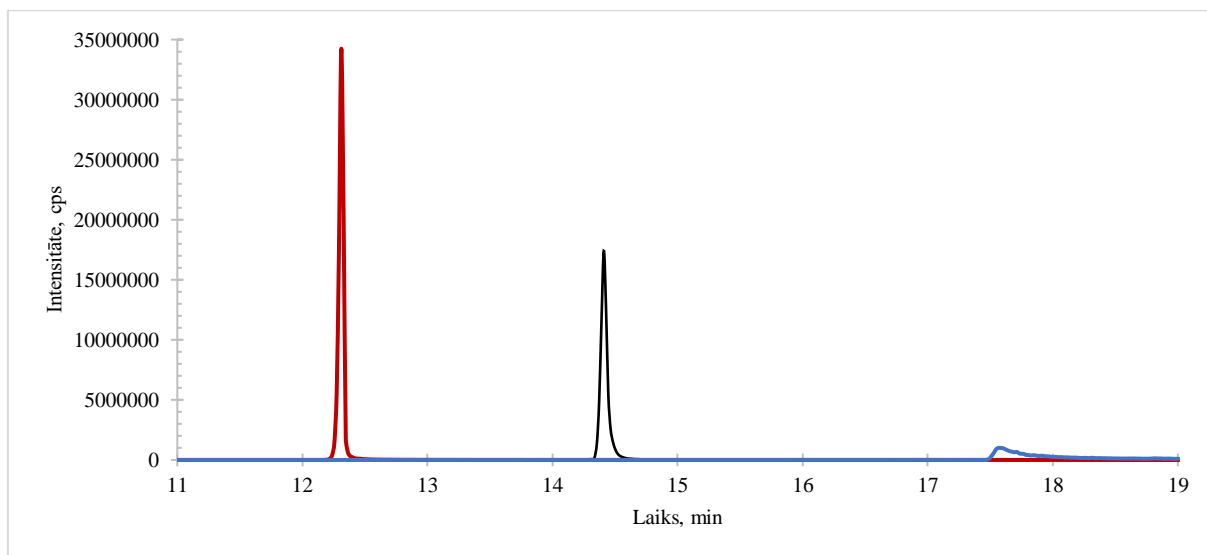
Analītiskās kolonnas tika salīdzināti pēc intensitātes un smailes formas (sk. 3.2.1. – 3.2.3. att.).



3.2.1. att. DON hromatogramma ar dažādām kolonnām (sarkanā līnija ir Kinetex PFP, oranžā līnija ir Hypercarb, zilā līnija ir Omega Polar un melnā līnija ir Synergi Max-RP)



3.2.2. att. HT2 hromatogramma ar dažādām kolonnām (oranžā līnija ir Hypercarb, sarkanā līnija ir Kinetex PFP, melnā līnija ir Synergi Max-RP un zilā līnija ir Omega Polar)



3.2.3. att. OTA hromatogramma ar dažādām kolonnām (sarkanā līnija ir Kinetex PFP, zilā līnija ir Omega Polar un melnā līnija ir Synergi Max-RP)

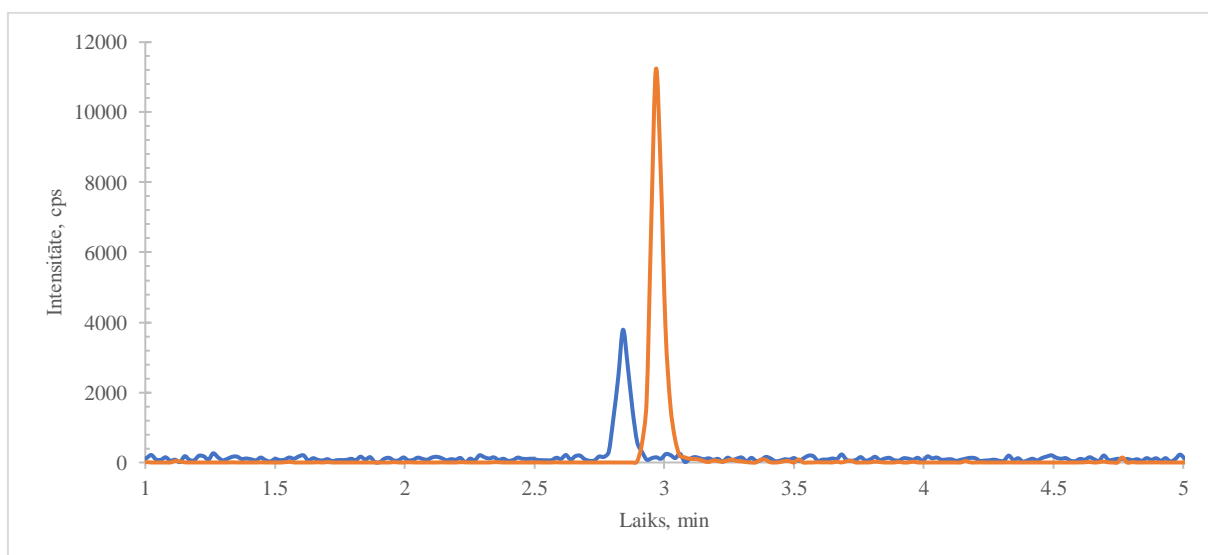
3.2.1. attēlā ir redzams, ka, izmantojot Omega Polar kolonnu, DON signāls ir platāks salīdzinājumā ar citām kolonnām. Izmantojot Hypercarb kolonnu, DON signāls ir ļoti intensīvs un šaurs. 3.2.2. attēlā ir redzams, ka HT-2 gadījumā visās 4 kolonnās, signāli ir ļoti šauri. Omega Polar un Hypercarb kolonnu gadījumā signāli ir ar līdzīgu intensitāti, bet signāla intensitāte Kinetex PFP kolonnas gadījumā ir nedaudz zemāka. OTA gadījumā, visintensīvākais un visšaurākais signāls ir Kinetex PFP kolonnai, ar Omega Polar kolonnu OTA signāls ir ar garo “asti” un ar ļoti sliktu intensitāti, ar Hypercarb kolonnu signāls nav detektēts (sk. 3.2.3. att.).

Rezultātā, tālākai metodes izstrādei tika izmantotas Hypercarb 5,0 μm kolonna DON detektēšanai un Kinetex PFP 1,7 μm kolonna BEA, ENNA, ENNA1, ENNB un ENNB1. Tā kā Hypercarb kolonnai ir liels sorbcijas koeficients attiecībā uz DON, ir iespējams, nebojājot signāla formu, uz tās uznest vairāk ekstrakta jeb palielināt injekcijas tilpumu.

Izaicinājumi. Metodes izstrādēs laikā tika novērotas dažas problēmas, kas ir saistītas ar analītiskām kolonnām. Hypercarb kolonnai par mobilo fāzi izvēlējās tīru ūdens. Palaižot plūsmu, spiediens uz kolonnas bija pārāk augsts, tādēļ no kolonnas sāka tecēt arī grafitā sorbents, kas atrodas kolonnā. Tika secināts, ka maksimālais spiediens Hypercarb kolonnai nedrīkst pārsniegt 400 bar, citādāk var piesārņot un aizblīvēt visu sistēmu. Tika izvēlēts izmantot citās mobilās fāzes – ūdens un metanols, samazinot plūsmas ātrumu un palielināt kolonnas temperatūru līdz 60 °C. Visticamāk, tas ir saistīts ar to, ka kolonna ir pilnīgi aizpildīta ar sorbentu ar porainību ap 75%.³⁰ PFP kolonnas izmantošanas laikā tika novērota smailes formas pasliktināšanās – tā dubultojas. Visticamāk tās ir saistīts ar to, ka BEA un ENN ir citi struktūras izomēri, kurus ar to kolonnu var atdalīt viens no otra.^{31,32} Pentafluorfenilfāze piedāvā

augstu sterisko mijiedarbības pakāpi, lai uzlabotu strukturālo izomēru atdalīšanu, un elektronegatīvās fluora grupas var piedāvāt lielāku polāro bāzes savienojumu aizturi.³³ Lai atrisinātu šo problēmu, kolonnu apgriezta pretēji un skaloja ar mobilām fāzēm. Omega Polar C18 kolonnas gadījumā tika novērots, ka, izmantojot dejonizētu ūdeni bez piedevām kā mobilo fāzi DON noteikšanai, nebija izteikta savienojuma selektivitāte. Standartšķīdumā tika novērots DON signāls, bet paraugos nav.

Gradientu sistēmu optimizācija. Tika salīdzinātas sekojošas kustīgas fāzes: tīrs ūdens un acetonitrils; ūdens un acetonitrils, kam tika pievienots 0,1% skudrskābes; ūdens un metanols, kam tika pievienoti 0,2% etiķskābes un am.ac. Mobilās fāzes tika izvēlētas, balstoties uz literatūras avotiem.^{1,5-11} Pārsvārā mikotoksīnu detektēšanai ir nepieciešams izmantot paskābinātas fāzes ar sāļu piedevu, izņemot patulīnu, kuram nepieciešami tīri šķīdinātāji. Sāļu piedeva palielina mikotoksīnu jonizāciju, jo tiem veidojās ļoti labi adukti, kas savukārt uzlabo metodes jutību (sk. 3.2.4. att.).



3.2.4. att. DON hromatogramma ar Kinetex PFP kolonnu dažādos fāzēs (oranžā līnija ir smaile, kas iegūta ar am.ac. piedevu fāzē, zilā līnija ir smaile, kas iegūta ar skudrskābi fāzē)

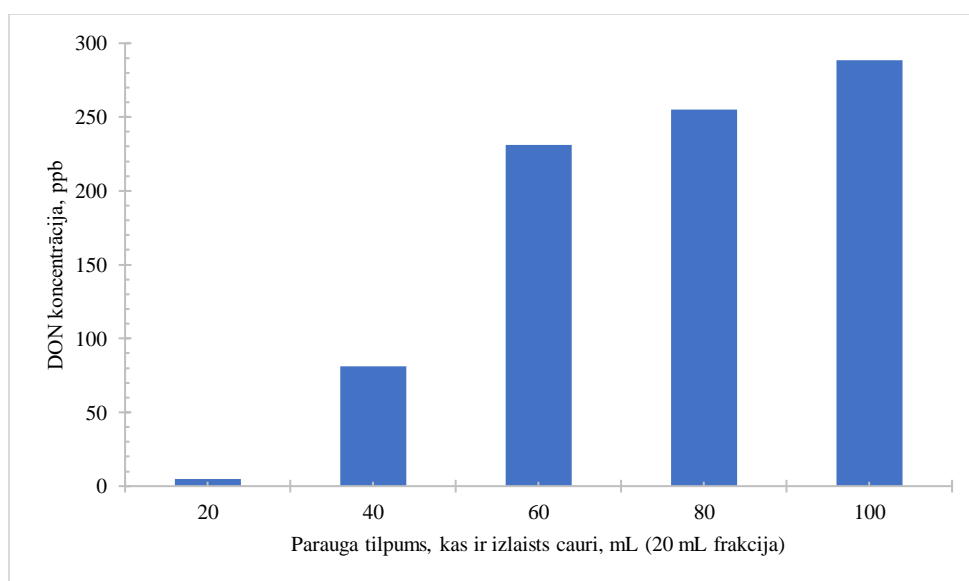
Tika novērots, ka, izmantojot dejonizētu ūdeni un acetonitrilu, samazinās metodes jutība – paraugos netika novērotas analītu smailes. Izmantojot ūdeni un acetonitrilu, kam tika pievienota 0,1% skudrskābe neizvēlējās turpmākai metodes izstrādei, jo adukti, kas veidojās ar šo fāžu sistēmu bija nestabili un paraugiem bija novērota slikta atkārtojamība.

DON signāla intensitāte negatīvajā režīmā bija ļoti vāja. Fāžu sistēma, kas atrisināja jutības un fragmentu stabilitātes problēmas bija dejonizēts ūdens un metanols, kam tika pievienotas 0,2% etiķskābes un am.ac. piedevas, jo smailes intensitāte un forma bija apmierinoša.

3.3. Paraugu sagatavošanas daļas optimizācija

CFE kolonnu izvēle. Paraugu attīrīšanai un iekonzentrēšanai tika izmantotas CFE kolonnas. Salīdzināja CFE kolonnas Strata C18-E, Strata X, Oasis HLB, Strata Basic Screen un Strata ABW. Izmantojot Strata ABW un Basic Screen kolonnas tika konstatēts, ka tās nav piemērotas DON noteikšanai.

CFE salīdzināšanai tika ņemts 100 mL mākslīgi kontaminēts dejonizēts ūdens. Paraugs pa daļām tika uznest uz kolonnām, ik pa 20 mL parauga tika savākta viena frakcija, lai novērotu analīta zudumus. Frakcijas tika analizēti un konstatēja, ka, izmantojot Strata C18-E kolonnas, DON izskalojas no sorbenta liela parauga tilpumu pievienošanas dēļ, DON zudumi ir 53% (sk. 3.3.1. att.).



3.3.1. att. DON eluēšanas profils, izmantojot Strata C18-E kolonnas

Tika secināts, ka tās kolonnas nav piemērotas DON iekonzentrēšanai. Izmantojot Strata X un Oasis HLB kolonnas, DON analīta zudumi netika konstatēti.

Tika salīdzināta absolūtā CFE atgūstamība Strata C18-E, Strata X un Oasis HLB kolonnām, izmantojot 500 mL Milli-Q ūdens. Tika veikti 3 atkārtojumi katram punktam, BEA un ENN gadījumā standartpiedevas koncentrācija ir 5 ng/L, DON gadījumā standartpiedevas koncentrācija ir 25 ng/L (sk. 3.3.1. tabulu).

**Mikotoksīnu absolūtā CFE atgūšana Milli-Q ūdens standarta pievienošanas koncentrācijā
5 ng/L ENN grupai un BEA, 25 ng/L DON**

	Strata C18-E, %	Strata X, %	Oasis HLB, %
DON	9,0	94	94
BEA	59	90	75
ENNA	67	104	92
ENNA1	71	103	82
ENNB	72	106	76
ENNB1	72	106	78
Vidēji:	FFP metode	68	81
	Hypercarb metode	9,0	94

Tika konstatēts, ka izmantojot Strata C18-E kolonnas DON absolūtā atgūstamība ir 9,0%. BEA un ENN gadījumos, kolonnas atgūstamība ir diapazonā 59 – 72%. Strata X kolonnas absolūta atgūstamība ar visiem savienojumiem ir teicams, diapazonā 94 – 106%. Oasis HLB kolonnu absolūtā atgūstamība ir līdzīga Strata X kolonnām.

Kā iepriekš minēts, notekūdeņu sastāvs ir ļoti mainīgs un dažāds, tāpēc nepieciešams pārliecināties par izvēlētas ekstrakcijas piemērotību šīs sarežģītās matricas analīzē. Tika pārbaudīta ekstrakcijas efektivitāte Strata X kolonnām, ja veic iekonzentrēšanu 500 mL notekūdens parauga. Krāna ūdeni izmantoja kā kontrolparaugu. Paraugu sagatavošana tika veikta pēc aprakstītas metodes eksperimentālajā daļā (sk. 3.3.2. tabulu).

Strata X kolonnas ekstrakcijas efektivitāte

	Strata X			
	Krāna ūdens	1. notekūdens	2. notekūdens	3. notekūdens
DON	97%	98%	96%	98%
BEA	56%	187%*	84%	92%
ENNA	69%	166%*	84%	97%
ENNA1	74%	104%	88%	98%
ENNB	72%	101%	89%	109%
ENNB1	82%	103%	96%	95%

* Rupja kļūda pēc Diksona kritērija

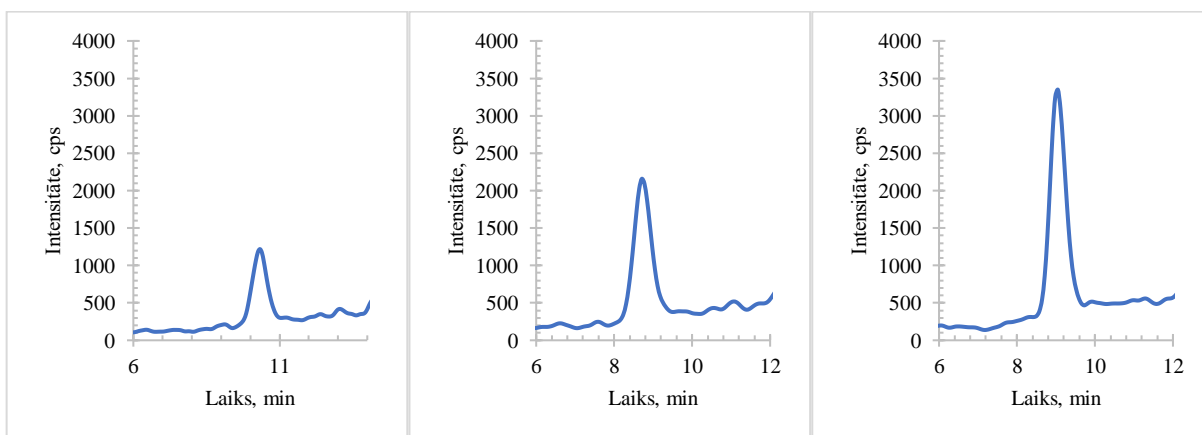
Tika novērots, ka Strata X kolonnas DON gadījumā ar krāna ūdeni ir 97%, ar notekūdens matricu ir 96 – 98%. BEA un ENN gadījumā, rezultāti ar Strata X kolonnu arī ir apmierinoši-ekstrakcijas efektivitāte ir robežās 84 – 109%.

3.3.1. un 3.3.2. tabulās ir redzamas ekstrakcijas efektivitātes un absolūtas atgūstamības, kas ir lielākas par 100%, tas varētu būt skaidrots ar to, ka varētu būt eksogēnās vielas no ārējiem avotiem parauga sagatavošanas laikā, piemēram, atlikumi, kas izdalījušies no CFE kārtidžiem.⁵

Var redzēt, ka izmantojot Strata X kolonnas krāna ūdens matricā ekstrakcijas efektivitāte ir mazāka attiecībā pret ekstrakcijas efektivitāti ar notekūdens matricu. Krāna ūdens ir tīrāka matrica nekā notekūdens, kas var saturēt dažādus organiskus un neorganiskus savienojumus dažādās koncentrācijās. Iespējams notiek kolonnas piesārņošana ar šiem savienojumiem un analizējamie savienojumi labāk aizturas sorbentā nekā tīro krāna ūdenī, lai gan tas ir tikai pieņēmums un būtu nepieciešami papildus mērījumi, lai apliecinātu šādu sakarību.

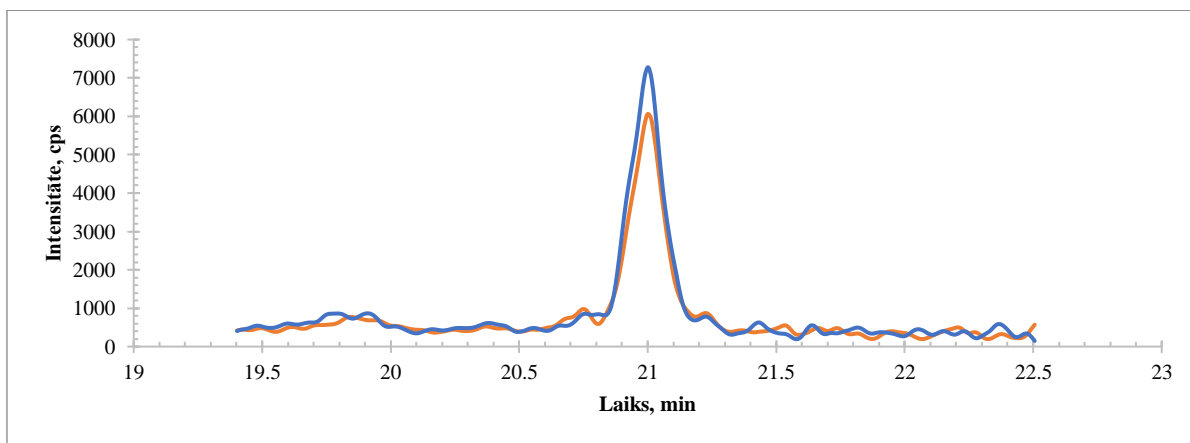
Tālākai paraugu sagatavošanai izvēlējās izmantot Strata X kolonnas. Oasis HLB kolonnas ir laba alternatīva DON, BEA un ENN noteikšanai, taču kolonnas cena ir salīdzinoši augstāka nekā Strata X.

Parauga tilpums. Parauga tilpums tika izvēlēts pēc eksperimentāliem datiem, analizējot mākslīgi kontaminētu paraugu ar mikotoksīnu standartvielām. Salīdzināšanai tika izvēlēti sekojoši parauga tilpumi: 333 mL, 666 mL, 1000 mL (sk. 3.3.2. att.).

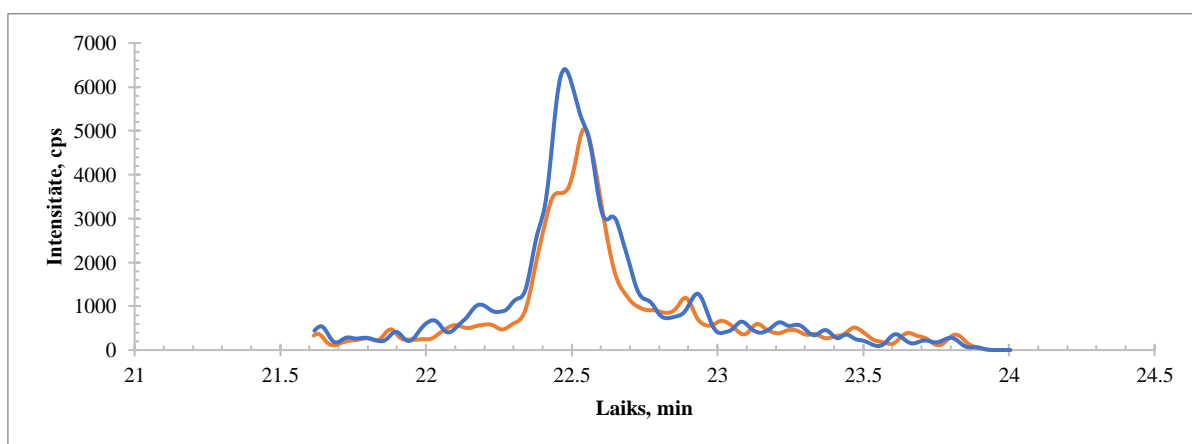


3.3.2. att. DON hromatogrammas 333 mL, 666 mL un 1000 mL parauga apjomiem ar Hypercarb kolonnu

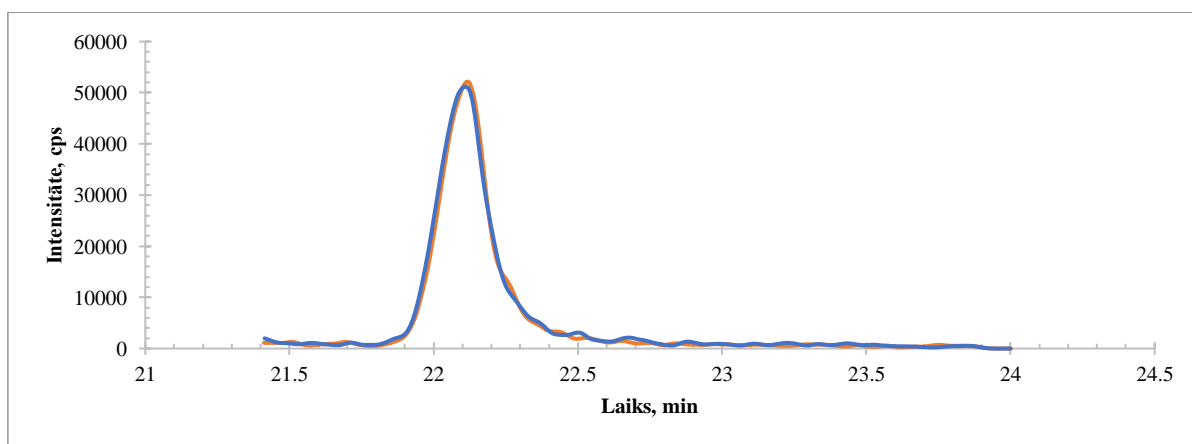
3.3.2. attēlā var redzēt, ka, jo vairāk ir parauga tilpums, jo lielāk ir signāla intensitāte. BEA un ENN salīdzināšanai tika izvēlēti 666 mL un 1000 mL (sk. 3.3.2. – 3.3.7. att.).



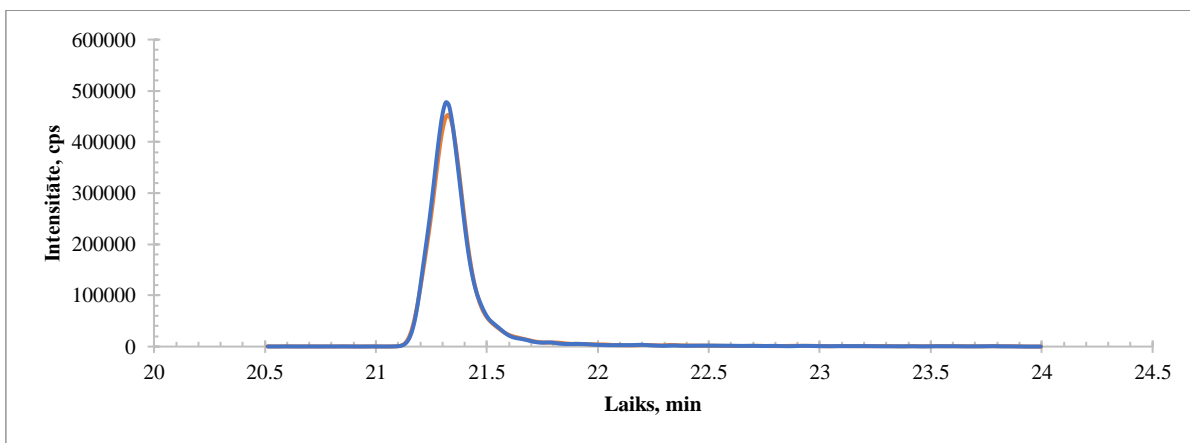
3.3.3. att. BEA hromatogrammas ar Kinetex PFP kolonnu (oranžā līnija – 1000 mL un zilā līnija – 666 mL)



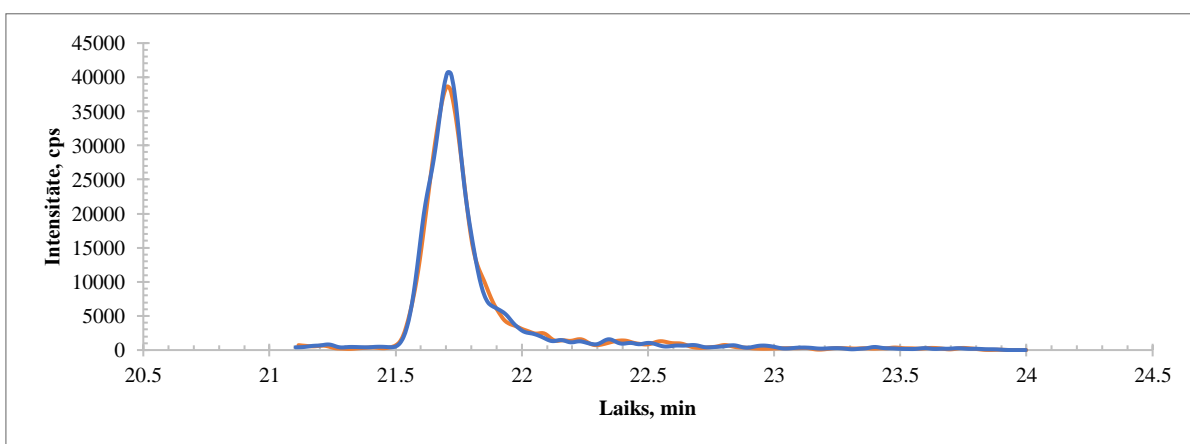
3.3.4. att. ENNA hromatogrammas ar Kinetex PFP kolonnu (oranžā līnija – 1000 mL un zilā līnija – 666 mL)



3.3.5. att. ENNA1 hromatogrammas ar Kinetex PFP kolonnu (oranžā līnija – 1000 mL un zilā līnija – 666 mL)



3.3.6. att. ENNB hromatogrammas ar Kinetex PFP kolonnu (oranžā līnija – 1000 mL un zilā līnija – 666 mL)



3.3.7. att. ENNB1 hromatogrammas ar Kinetex PFP kolonnu (oranžā līnija – 1000 mL un zilā līnija – 666 mL)

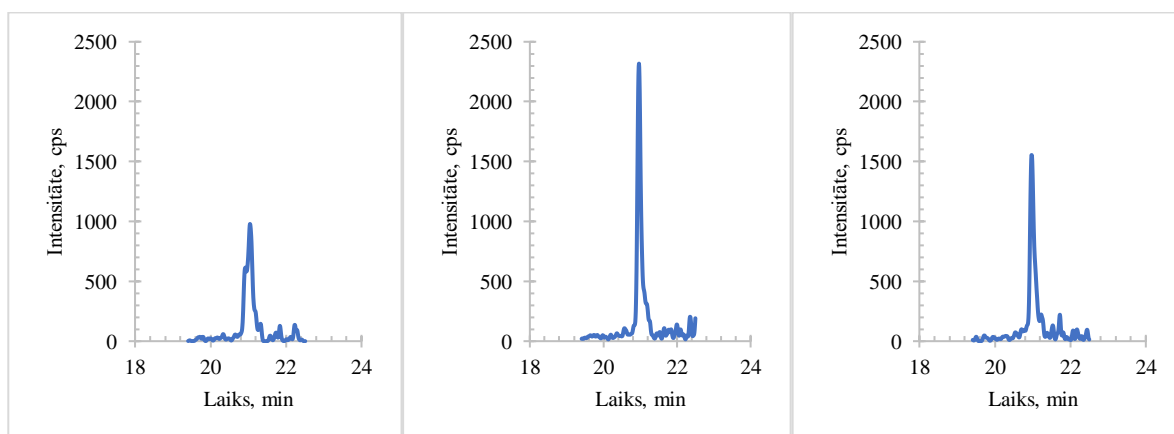
Attēlos ir parādītas BEA un ENN grupas mikotoksīnu signāli, izmantojot 666 mL un 1000 mL parauga. Tika novērots, ka, izmantojot 666 mL parauga tilpuma, signāli ir intensīvāki nekā ar 1000 mL, izņemot ENNA1 gadījumu, taču starpība nav ievērojama. Iegūtie rezultāti ir pretēji sagaidājamiem, kas varētu būt skaidrojams ar CFE kolonnu kapacitāti. Palielināts parauga tilpums teorētiski pēc iekonzentrēšanas nodrošina augstāku analītu koncentrāciju, taču, kā redzams pēc rezultātiem, ir vērojami zudumi un lielāki matricas efekti nevis intensitātes pieaugumi. Palielinot parauga tilpumu līdz 1000 mL, palielinās signālu intensitāte DON un ENNA1 gadījumā, bet pasliktinās – BEA, ENNA, ENNB un ENNB1. DON metodei optimālais tilpums ir 500 mL parauga. Tilpums lielāks par 1000 mL stipri ietekmē hromatogrāfisko noteikšanu, palielina slodzi CFE kolonnām, palielina matricas efektu, palielina paraugu sagatavošanas laiku.

Atšķirība starp 500 mL un 666 mL nav būtiska. Tika secināts, ka paraugu sagatavošanai nepieciešamais tilpums ir 500 mL.

Rekonstruēšanas šķīdums. Tika veikti dažādi eksperimenti, lai atrastu optimālo rekonstruēšanas šķīdumu. Tika novērots, ka, izmantojot rekonstruēšanas šķīdumu ar augstu ūdens saturu, savienojumiem ar labāku aizturi novēroja sliktas absolūtās atgūstamības, bet palielinot organisko saturu šķīdumā, šie rādītāji uzlabojās. Notekūdens paraugos šāds efekts pastiprinās. Mērķis bija izvēlēties tādu rekonstruēšanas šķīdumu, kurš labi izšķīdina sauso ekstraktu, un injicējot, nepasliktina smailes formu. Tika izvēlēts tāds minimālais injekcijas tilpums, pie kura visas smailes formas ir apmierinošas. Kā arī ļoti svarīgi, lai izvēlēta rekonstruēšanas šķīdumā savienojumi būtu stabili.

Rezultātā DON gadījumā par rekonstruēšanas šķīdumu izvēlējās 17% metanola šķīdumu ūdenī ar 1% etiķskābi un 250 mM am.ac. piedevu, BEA un ENN gadījumā – 50% metanola šķīdums ūdenī ar 1% etiķskābi un 250 mM am.ac. piedevu.

Injekcijas tilpums tika optimizēts, salīdzinot dažādus injekcijas tilpumus 30 un 25 μL . Viens no svarīgiem metodes izstrādes posmiem ir pārlicināties, par gradienta cikla efektivitāti ne tikai panākot labu aizturi izvēlētajiem savienojumiem, bet arī pārlicināties, ka nav novērojama pārnese no vienas injekcijas uz citu, tādējādi, radot nepatiesus signālus (sk. 3.3.8. att.).



3.3.8. att. Tīra šķīdinātāja hromatogramma, kuros detektēts BEA, izmantojot Kinetex PFP kolonnu (1. un 2. hromatogrammas injekcijas tilpums ir 30 μL , 3. hromatogrammā ir 25 μL)

Sākotnēji šāda problēma tika novērota. Kā redzams 3.3.8. attēlā 3 hromatogrammas tīram šķīdinātājam. 1. un 2. hromatogrammās injekcijas tilpums ir 30 μL , 3. hromatogrammā – 25 μL . 1. hromatogrammā, kura tika uzņemta pirms standartšķīduma injekcijas ar koncentrāciju 10 ppb, var novērot ļoti mazu BEA smaile, kas visticamāk paliek sistēmā no iepriekšējas injekcijas. 2. un 3. hromatogramma tika iegūta pēc standartšķīduma injekcijas.

Salīdzinot 1. un 2. hromatogrammas, var novērot, ka BEA signāla intensitāte palielinājās 2,4 reizēs, kas liecina par to, ka injekcijas tilpums 30 μL ir pārāk liels BEA gadījumā, kā arī jāpievērš uzmanība adatas mazgāšanai, kolonnas skalošanai gan pirms injekcijas, gan pēc

signāla parādīšanas hromatogrammā. Salīdzinot 2. un 3. hromatogrammas, kurām injekcijas tilpumi ir dažādi, var novērot, ka signāls samazinās, un attiecība starp 2. hromatogrammas intensitāti un BEA standartšķīduma hromatogrammas intensitāti ir 0,032%, savukārt attiecība starp 3. hromatogrammas intensitātes un BEA standartšķīduma hromatogrammas intensitātes ir 0,026%.

Var secināt, ka optimālais injekcijas tilpums ir 25 μL . Šāds tilpums nemaina smailes formu, un intensitāte stipri nesamazinās. Metodēs uzstādījumos tika uzdots adatas mazgāšana gan pirms, gan pēc injekcijas, tika pārslēgts vārsts no MS uz atkritumiem, uzlikta skalošana ar 2-propanolu hromatogrammas beigās un kolonnas kondensēšana pirms injekcijas. Pēc metodes uzlabošanas tika panākts, ka signāla pārnese uz citām injekcijām nenotiek, taču tas būtiski palielināja instrumentālās analīzes ilgumu.

Tā kā Hypercarb kolonnai ir liels sorbcijas koeficients attiecība uz DON, ir iespēja uznest vairāk ekstrakta jeb palielināt injekcijas tilpumu līdz 100 μL , jo tas netraucē smailes formu un intensitāte DON signālam ir apmierinoša. Metodes izstrādes eksperimentos netika novērota DON analītiskā signāla pārnese vai piesārņošanās.

Parauga stabilitāte. Parauga stabilitāte tika pārbaudīta, veicot mākslīgi piesārņotu paraugu testēšanu pēc noteikta laika, kurš glabājas dažādās temperatūrās.

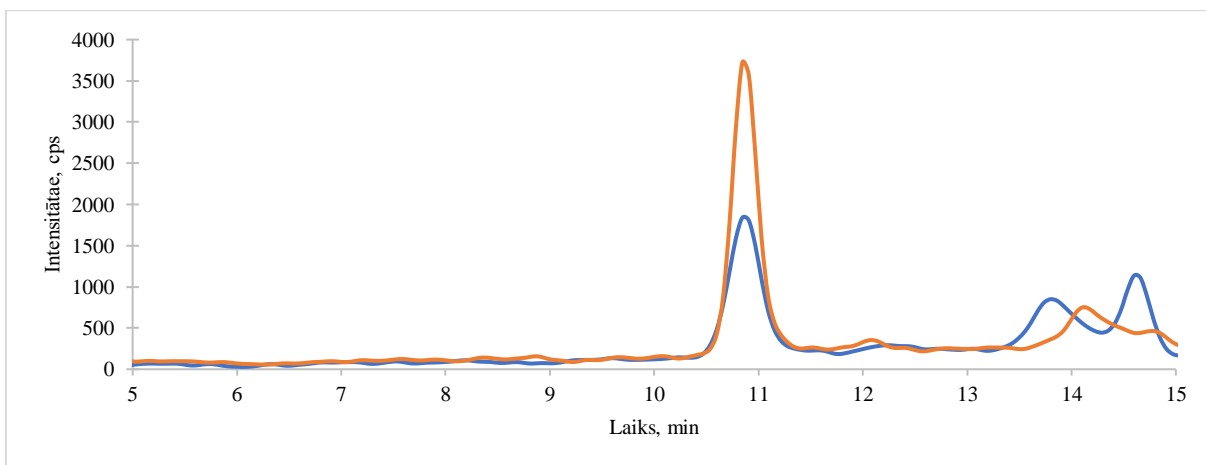
Izmantoja 5,0 L notekūdeņu parauga, kuru sākumā analizēja sērijā ar tukšu paraugu un paraugu ar standartpiedevu koncentrāciju līmenī 5,0 ng/L. Pēc parauga analizēšanas, atlikumam tika pievienota mikotoksīnu standartpiedeva ar koncentrāciju 5,0 ng/L. 4L parauga tika sadalīti pa 2L un uzglabāti attiecīgi -20°C un $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūrā. Tika veikta atkārtota parauga testēšana pēc 1 nedēļas un pēc 2 nedēļām.

Eksperimenta laikā tika pierādīts, ka 2 nedēļu laikā savienojumi paraugā ir stabili, glabājot gan saldētavā, gan ledusskapī, tāpēc paraugu analīze būtu jāveic 2 nedēļu laikā no saņemšanas brīža.

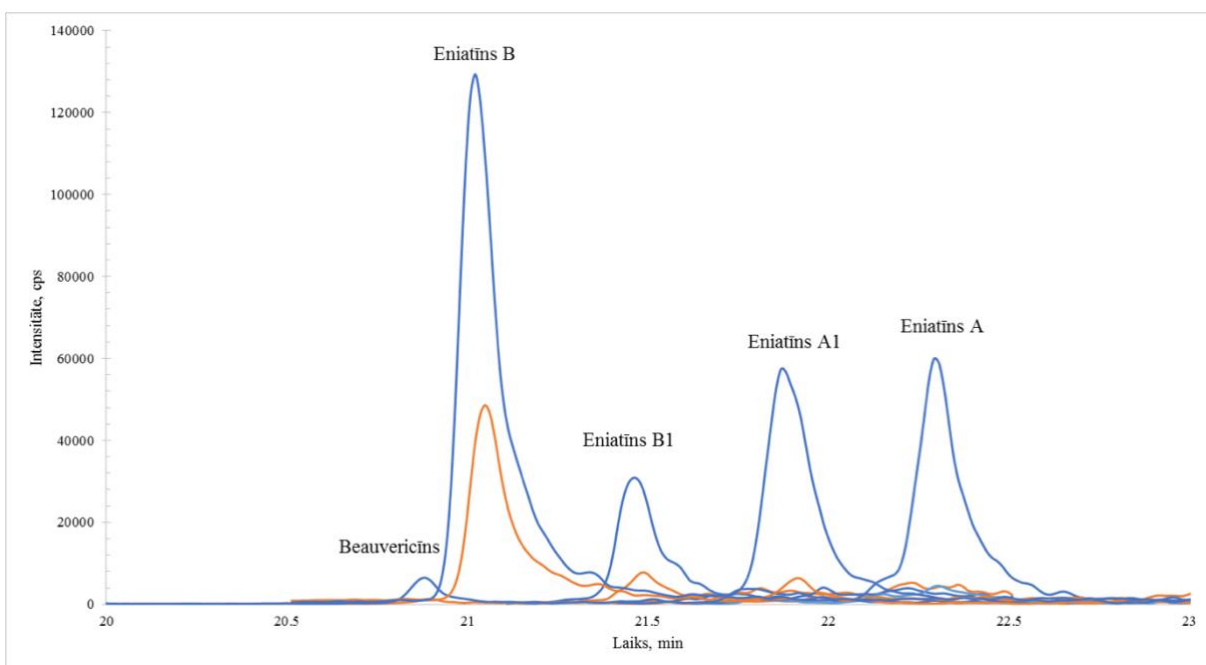
3.4. Metodes validācija

Selektivitāte. Metodes selektivitāte tika pierādīta, pagatavojot tukšu matricas paraugu un salīdzinot to ar analogu matricas paraugu, kuram pievienota mikotoksīnu standartpiedeva kvantificēšanas limita (LOQ) koncentrāciju līmenī.

Metode uzrāda labu selektivitāti, tomēr ir novērojamas dabiskā piesārņojuma signāls DON un ENNB gadījumos. Darba izstrādes laikā visos analizētajos paraugos vienmēr tika konstatēts DON un ENNB dabisks piesārņojums dažādos līmeņos, tāpēc turpinot validācijas izstrādi tas bija jāņem vērā (sk. 3.4.1. un 3.4.2. att.).

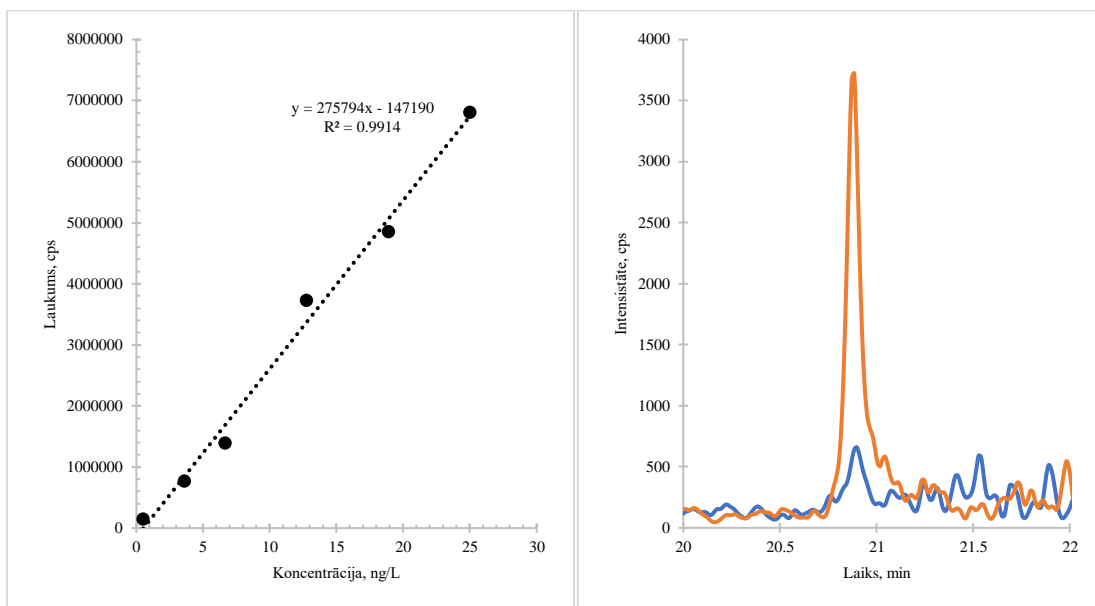


3.4.1. att. DON hromatogramma (zilā līnija ir tukšā parauga signāls, oranžā līnija ir paraugs ar standartpiedevu koncentrācijā 50 ng/L)

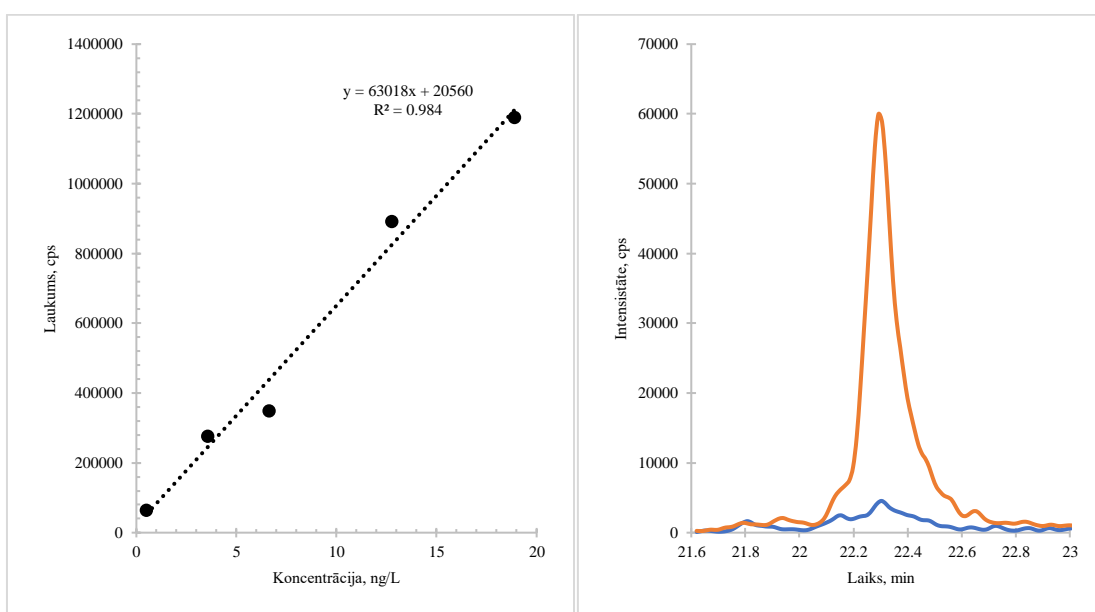


3.4.2. att. BEA un ENN hromatogramma (oranžā krāsa ir tukšā parauga signāls, zilā līnija ir paraugs ar standartpiedevu koncentrācijā 5 ng/L)

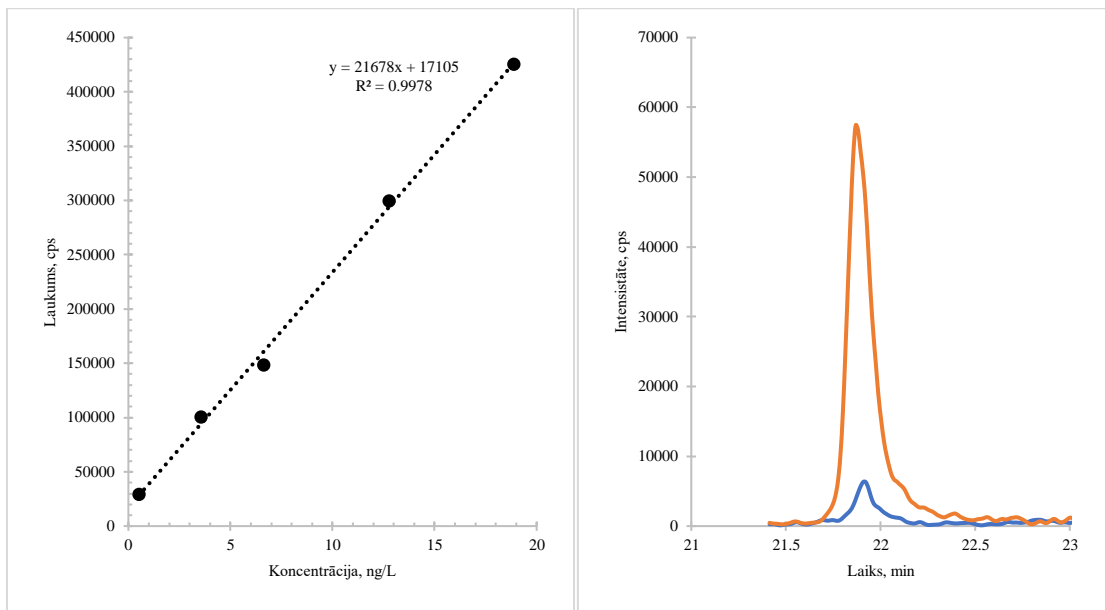
Linearitāte. Metodes linearitāte ($R^2 > 0,95$) tika pārbaudīta, konstruējot kalibrēšanas taisnes no standartšķīdumiem DON gadījumā, jo ir iespējams izmantot iekšējo standartu metodi un matricas kalibrēšanas BEA un ENN gadījumā, kas sagatavoti atbilstoši standartpiedevu kalibrēšanas metodei. BEA un ENN grupas gadījumā, mikotoksīnu koncentrācija paraugos noteikta ar viena punkta kalibrēšanu katram paraugam (skrīnings), ko drīkst izmantot, jo tika pierādīta savienojumu linearitāte dažādos matricās. Ja koncentrācija tika noteikta virs pirmā kalibrēšanas punkta, tad veica atkārtotu analīzi ar 5-līmeņu kalibrēšanu ar standartpiedevu metodi (3.4.3. – 3.4.7. att.).



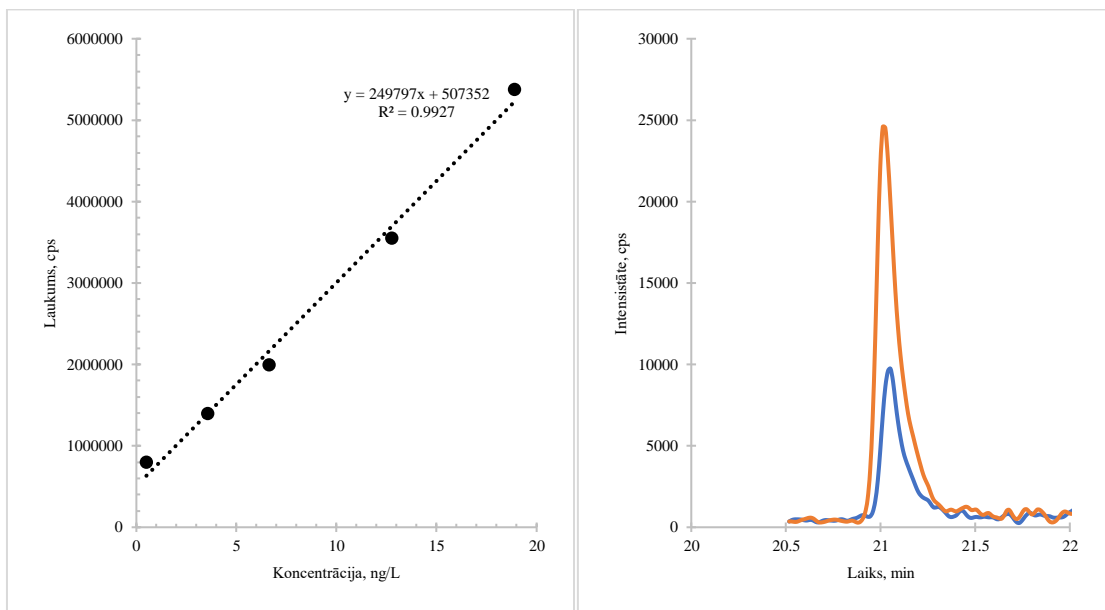
3.4.3. att. BEA hromatogramma un kalibrēšanas taisne diapazonā 0,50 – 25 ng/L (oranžā līnija ir BEA signāls paraugā ar standartpiedevu 5,0 ng/L, zilā līnija ir BEA signāls tīra paraugā)



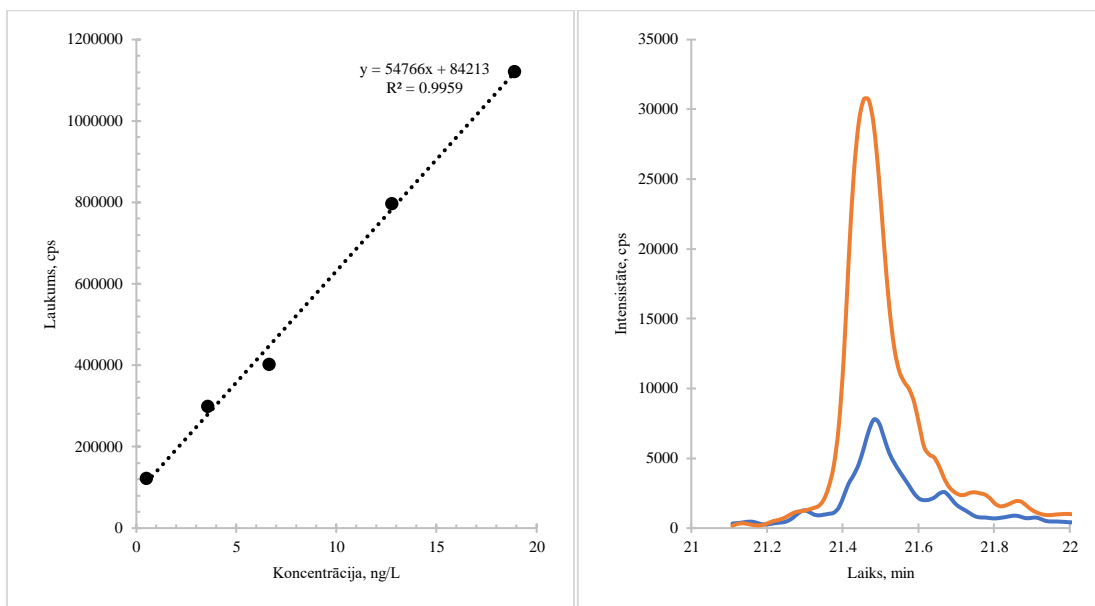
3.4.4. att. ENNA hromatogramma un kalibrēšanas taisnes diapazonā 0,50 – 18,875 ng/L (oranžā līnija ir ENNA signāls paraugā ar standartpiedevu 5,0 ng/L, zilā līnija ir ENNA signāls tīra paraugā)



3.4.5. att. ENNA1 hromatogramma un kalibrēšanas taisnes diapazonā 0,50 – 18,875 ng/L (oranžā līnija ir ENNA1 signāls paraugā ar standartpiedevu 5,0 ng/L, zilā līnija ir ENNA1 signāls tīra paraugā)

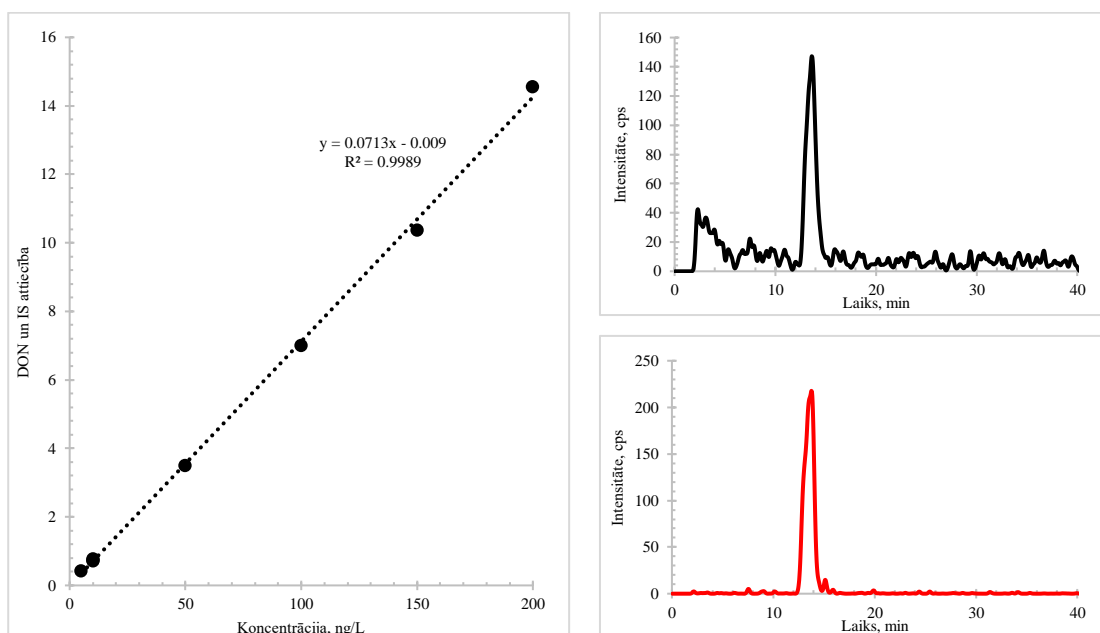


3.4.6. att. ENNB hromatogramma un kalibrēšanas taisnes diapazonā 0,50 – 18,875 ng/L (oranžā līnija ir ENNB signāls paraugā ar standartpiedevu 5,0 ng/L, zilā līnija ir ENNB signāls tīra paraugā)



3.4.7. att. ENNB1 hromatogrammas un kalibrēšanas taisnes diapazonā 0,50 – 18,875 ng/L (oranžā līnija ir ENNB1 signāls paraugā ar standartpiedevu 5,0 ng/L, zilā līnija ir ENNB1 signāls tīra paraugā)

DON gadījumā, mikotoksīnu koncentrācija tika noteikta ar kalibrēšanas taisni, izmantojot standartšķīdumus un iekšējo standartu (sk. 3.4.8. att.).



3.4.8. att. DON hromatogrammas un kalibrēšanas taisnes diapazonā 5 – 200 ng/L (melnā līnija ir DON standartšķīdums ar koncentrāciju 10 ng/L, sarkanā līnija ir DON iekšējais standarts ar koncentrāciju 10 ng/L)

BEA un ENN gadījumā kvantificēšanai nav iespējams izmantot kalibrēšanu ar standartšķīdumiem, jo ir liels matricas efekts un ir nepieciešams iekšējais standarts, lai mazinātu

to. Tāpēc izmantoja standartpiedevas metodes kalibrēšanu uz katra parauga atsevišķi, lai mazinātu matricas efekta radītās kļūdas.

Detektēšanas robežas. LOD (kvalitatīvās noteikšanas robeža) tika definēta, kā koncentrācija paraugā, pie kuras signāla un trokšņa attiecība ≥ 3 (3.4.1. vienādojums), un tā tika novērtēta, veicot atkārtotu tukšo paraugu analīzi ar dažādu koncentrāciju standartpiedevām.

$$LOD = \frac{3 \cdot C}{S/N} \cdot 100\% \quad (3.4.1.)$$

, kur LOD – kvalitatīvās noteikšanas robeža, ng/L;

S/N – signāla un trokšņa attiecība;

C – standartpiedevas koncentrācijas gaidāmās pierādīšanas robežas tuvumā, ng/L.

Kvantificēšanas robežas. LOQ (kvantitatīvā noteikšanas robeža) tika definēta, kā koncentrācija paraugā, pie kuras signāla un trokšņa attiecība ≥ 10 (3.4.2. vienādojums), un tā tika novērtēta, veicot atkārtotu tukšo paraugu analīzi ar dažādu koncentrāciju standartpiedevām.

$$LOQ = \frac{10 \cdot C}{S/N} \cdot 100\% \quad (3.4.2.)$$

, kur LOQ – kvantitatīvās noteikšanas robeža, ng/L;

S/N – signāla un trokšņa attiecība;

C – standartpiedevas koncentrācijas gaidāmās kvantificēšanas robežas tuvumā, ng/L.

Tika apkopoti dati par IDL, LOD un LOQ (sk. 3.4.1. tabulu).

3.4.1. tabula

Instrumentālā detektēšanas robežas (IDL), LOQ un LOD

Savienojums	IDL, ng/L	LOD, ng/L	LOQ, ng/L
Deoksivalenols	0,18	1,9	6,4
Beauverciņš	0,0025	0,039	0,13
Enniatīns A	0,010	0,12	0,40
Enniatīns A1	0,0089	0,14	0,47
Enniatīns B	0,0055	0,044	0,15
Enniatīns B1	0,017	0,13	0,43

BEA LOD ir zemāk noteikts nekā citos publikācijās. DON LOD tika noteikts līdzīgi ar citiem publikācijām. Schenzel publikācija LOD DON tika sasniegts 1,2 ng/L.⁵ Tā ir vienīga publikācija, kurā DON LOD ir tik zems attiecība pret šo pētījumu. Citos publikācijās DON LOD tika sasniegts lielāks nekā 1,9 ng/L. Gracia-Lor pētījumā DON LOD tika sasniegts 3,1 ng/L.¹ Bucheli un Wettstein pētījumos – 1,4 ng/L.^{9,11} BEA tika analizēts Schenzel publikācijā, BEA LOD tika sasniegts daudz lielāks (3,4 ng/L) nekā šajā pētījumā.⁵

Tika secināts, ka izstrādāta metode ir piemērota DON, BEA un ENN grupas mikotoksīnu noteikšanai, tika sasniegti zemākie un optimālie LOD to detektēšanai.

Metodes atgūstamība. Metodes relatīvā atgūstamība tika definēta kā pirms ekstrakcijas pievienotās standartpiedevas un iekšējais standarts izmērītā laukuma attiecība, kas dalīta ar tīro standartpiedevas un iekšējais standarta izmērītā laukuma attiecību (3.4.3. vienādojums).⁵ Relatīvā atgūstamība tika piemērota DON savienojumam, kam bija izmantots iekšējais standarts.

$$R_{rel}, \% = \frac{S_{p+IS}}{S_{s+IS}} \cdot 100\% \quad (3.4.3.)$$

, kur $R_{rel}, \%$ – relatīvā atgūstamība, %;

S_{p+IS} – standartpiedevas un iekšējais standarts izmērītā laukuma attiecība paraugā;

S_{s+IS} – tīra standartpiedevas un iekšējais standarts izmērītā laukuma attiecība.

Metodes absolūtā atgūstamība tika definēta kā izmērīta parauga ar standartpiedevu koncentrācijas attiecība ar izmērīto standartšķīdumu atbilstošo koncentrāciju (3.4.4. vienādojums).⁵ Absolūtā atgūstamība tika piemērota visiem savienojamām.

$$R_{abs}, \% = \frac{C_{sp} - C_{Bl}}{C_{solv.sp}} \cdot 100\% \quad (3.4.4.)$$

, kur $R_{abs}, \%$ – absolūtā atgūstamība, %;

$C_{solv.sp}$ – atbilstošā koncentrācija standartšķīdumā, ng/L;

C_{sp} – kvalitātes kontroles paraugu koncentrācija, ng/L;

C_{Bl} – vidējā koncentrācija kvalitātes kontroles paraugam bez standartpiedevas, ng/L.

Metodes relatīvā atgūstamība DON tika attēlota tabulā (sk. 3.4.2. tabulu).

3.4.2. tabula

Metodes relatīvā atgūstamība DON

Savienojums	Vidējā relatīvā atgūstamība, %	Min. – max. relatīvā atgūstamība, %
Deoksivalenols	102	92 – 110

Ekspierimenta rezultātā ieguva, ka relatīvā atgūstamība DON ir diapazonā 92 – 110%, vidēji 102%. Iegūta relatīvā atgūstamība ir ļoti līdzīga ar citiem publikācijām. Schenzel publikācijā tika iegūta DON relatīvā atgūstamība 96 – 106%, Gracia-Lor publikācijā – 108%, Bucheli un Wettstein publikācijās – 91%.^{1,5,9,11}

Metodes absolūtā atgūstamība tika attēlota tabulā (sk. 3.4.3. tabulu).

Metodes absolūtā atgūstamība DON, BEA un ENN

Savienojums	Vidējā absolūtā atgūstamība, %	Min. – max. absolūtā atgūstamība, %
Deoksinivalenols	105	84 – 118
Beauvericīns	91	66 – 115
Enniatīns A	94	63 – 126
Enniatīns A ₁	104	82 – 131
Enniatīns B	89	59 – 113
Enniatīns B ₁	89	64 – 109

Ekspierimenta rezultātā ieguva, ka absolūta atgūstamība ir diapazonā 59 – 131% atkarība no savienojuma. DON gadījumā ir 84 – 118%, BEA gadījumā ir 66 – 115%, ENNA gadījumā ir 63 – 126%, ENNA1 gadījumā ir 82 – 131%, ENNB gadījumā ir 59 – 113% un ENNB1 gadījumā ir 64 – 109%. Tika iegūta līdzīgs BEA diapazons kā Schenzel publikācija, kas ir 76 – 104%.⁵ ENN grupu nav iespējams salīdzināt ar citām publikācijām, jo tie nav nekur analizēti.

Matricas efekts. Matricas efekts (ME) tika novērtēts kā kalibrēšanas grafika slīpuma, kas veikta uz matricas, un kalibrēšanas grafika slīpuma, kas veikta uz standartšķīdumiem, dalījums (3.4.5. vienādojums)

$$ME, \% = \left(\frac{a_1}{a_2} - 1 \right) \cdot 100\% \quad (3.4.5.)$$

, kur ME – matricas efekts, %;

a_1 – kalibrēšanas grafika slīpums, kas veikta uz matricas;

a_2 – kalibrēšanas grafika slīpums, kas veikta uz standartšķīdumiem.

Ekspierimentā tika izmantoti 3 dažādus notekūdeņu paraugus ar nezināmo izcelsmi, noteica matricas efektu atkarībā no parauga (sk. 3.4.4. tabulu).

Matricas efekts notekūdeņu paraugiem

	1. notekūdens	2. notekūdens	3. notekūdens	Vidējā vērtība
DON	8%	–	–	8%
BEA	-96%	-78%	-91%	-88%
ENNA	-40%	-24%	-51%	-38%
ENNA1	-75%	-51%	-56%	-61%
ENNB	-65%	-49%	-70%	-61%
ENNB1	-67%	-38%	-64%	-56%

Ekspierimenta rezultātā ieguva, ka visiem savienojumiem gandrīz visos paraugos ir novērojams negatīvs matricas efekts – jonizācijas laikā notiek savienojuma jonu nomākšana. Ekspierimentam ar DON tika testēts viens vidējais paraugs (paraugs iegūts apvienojot dažādus notekūdeņus vidējā paraugā, iegūstot reprezentatīvu notekūdeņu paraugu) un kvantificēšana

tika veikta ar standartšķīdumiem izmantojot iekšējo standartu. Pārējiem tika veikti vairāki eksperimenti, lai iegūtu skaidrību par ME dažādību starp paraugiem.

Matricas efekta līmenis starp paraugiem variē, tas nozīmē, ka matricas kalibrēšanas pēc viena parauga principa lietot nav korekti. Lai veiktu korektu kvantificēšanu bez iekšējā standarta, jāveic vismaz viena punkta kalibrēšana katram paraugam. Ja sagaidāmi vienveidīgi paraugi (iegūti no vienas un tās pašas vietas ar līdzīgu sastāvu), pirms tam veicot eksperimentu, varēs izmantot matricas kalibrēšanu no viena parauga ar standartpiedevu.

Metodes nenoteiktība. Paplašinātā mērījumu nenoteiktība (pie 95% ticamības intervāla) tika novērtēta, veicot atkārtotus mērījumus paraugiem ar standartpiedevu kvantificēšanas robežas tuvumā (kvalitātes kontroles paraugi) un aprēķinot relatīvo standartnovirzi no mērījumu rezultātu atgūstamības (3.4.6. – 3.4.8. vienādojumi). Paplašinājuma koeficients $k = 2$.

$$u_{gadījuma} = \frac{Sn}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (3.4.6.)$$

, kur $u_{gadījuma}$ – standartnenoteiktība gadījuma kļūdu dēļ (precizitāte), %;
 Sn – standartnovirze starp kvalitātes kontroles paraugiem, ng/L;
 \bar{x} – kvalitātes kontroles parauga vidējā koncentrācija, ng/L.

$$u_{sistemātiskās} = \left| \frac{\overline{C_{sp}} - \overline{C_{bl}}}{C_{teor.sp}} - 1 \right| \cdot 100\% \quad (3.4.7.)$$

, kur $u_{sistemātiskās}$ – standartnenoteiktība sistemātisko kļūdu dēļ (ticamība), %;
 $C_{teor.sp}$ – kvalitātes kontroles parauga teorētiskā koncentrācija, ng/L;
 $\overline{C_{sp}}$ – kvalitātes kontroles paraugu vidējā koncentrācija, ng/L;
 $\overline{C_{bl}}$ – vidējā koncentrācija kvalitātes kontroles paraugam bez standartpiedevas, ng/L.

$$U_C = k \cdot \sqrt{u_{gadījuma}^2 + u_{sistemātiskās}^2} \quad (3.4.8.)$$

, kur U_C – metodes kombinētā paplašinātā nenoteiktība pie 95% ticamības intervāla, %;
 k – pārklāšanās koeficients (95% ticamības intervāls, $k = 2$);
 $u_{gadījuma}$ – standartnenoteiktība gadījuma kļūdu dēļ (precizitāte), %;
 $u_{sistemātiskās}$ – standartnenoteiktība sistemātisko kļūdu dēļ (ticamība), %.

Visu nosakāmo savienojumu novērtētās provizoriska nenoteiktības bija robežās – no 17% līdz 44%. Nenoteiktības aprēķināšanai dati tika apkopoti kontrolkartēs un parādītas tabulā (sk. 3.4.5. tabulu).

Metodes nenoteiktība

Savienojums	U, %
Deoksinivalenols	17
Beauvericīns	44
Enniatīns A	43
Enniatīns A1	36
Enniatīns B	44
Enniatīns B1	42

Līdz šīm metodes izstrādes posmam nenoteiktības novērtēšanai tika iegūts ierobežots datu apjoms un metodes izstrādes laikā izmantotie paraugi ir nezināmas izcelsmes un dažāda sastāva, tāpēc aprēķinātā nenoteiktība, analizējot citas izcelsmes paraugus, atšķirsies un būs jāaprēķina, izmantojot kontrolparaugus. Tālākajā paraugu analizēšanai jāizveido kontrolkartes DON, BEA un ENN grupai, kas apliecinās validācijas atbilstību analizējamiem paraugu matricai.

3.5. Reālo paraugu analīze

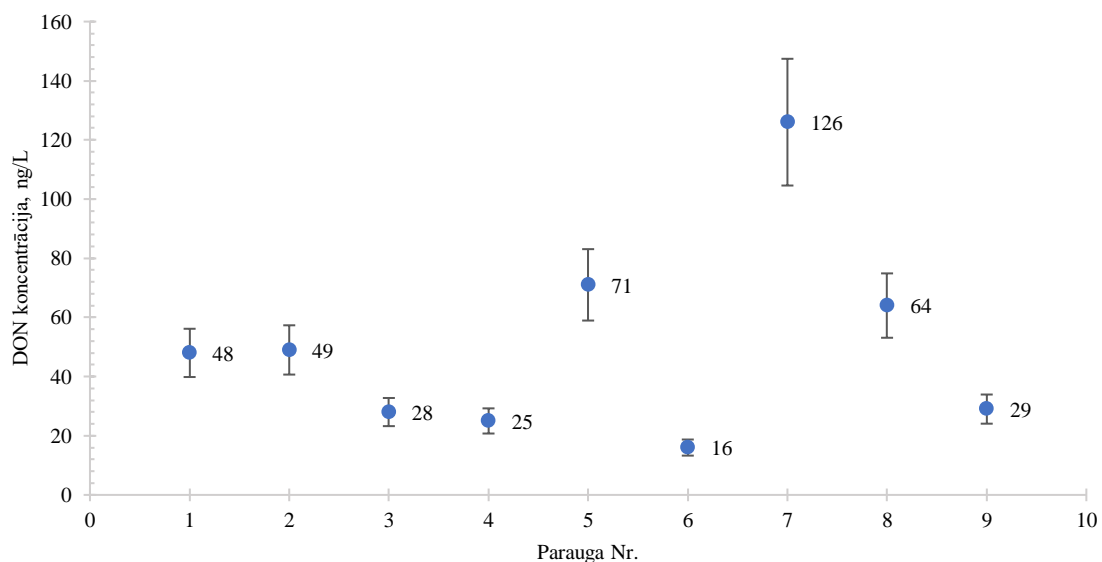
Tika izanalizēti 12 notekūdens paraugu no Rīgas pilsētas attīrīšanas sistēmas (sk. 3.5.1. tabulu).

Mikotoksīnu koncentrācijas (ng/L) notekūdeņos

Parauga Nr.	Deoksinivalenols	Beauvericīns	Enniatīns A	Enniatīns A ₁	Enniatīns B	Enniatīns B ₁
1.	48 ± 8	0,4 ± 0,2	< 0,40 ^d	< 0,47 ^d	3,3 ± 1,5	1,6 ± 0,7
2.	49 ± 8	1,6 ± 0,7	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	7 ± 3	4 ± 2
3.	28 ± 5	1,8 ± 0,8	< 0,40 ^d	< 0,47 ^d	7 ± 3	2,4 ± 1,0
4.	< 6,4	0,30 ± 0,13	< 0,40	< 0,47	1,1 ± 0,5	0,5 ± 0,2
5.	< 6,4	2,1 ± 0,9	< 0,40 ^d	< 0,47	0,8 ± 0,4	0,5 ± 0,2
6.	25 ± 4	< 0,13	< 0,40	< 0,47	1,2 ± 0,5	1,4 ± 0,6
7.	< 6,4	4 ± 2	0,4 ± 0,2	< 0,47 ^d	4 ± 2	2,3 ± 1,0
8.	71 ± 12	0,8 ± 0,4	0,4 ± 0,2	1,1 ± 0,4	10 ± 4	7 ± 3
9.	16 ± 3	< 0,13	< 0,40	< 0,47 ^d	2,5 ± 1,1	1,1 ± 0,5
10.	126 ± 21	< 0,13	< 0,40	< 0,47	3,4 ± 1,5	1,3 ± 0,5
11.	64 ± 11	0,8 ± 0,4	< 0,40	< 0,47 ^d	0,5 ± 0,2	< 0,43 ^d
12.	29 ± 5	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	< 0,47 ^d	2,2 ± 1,0	1,5 ± 0,6

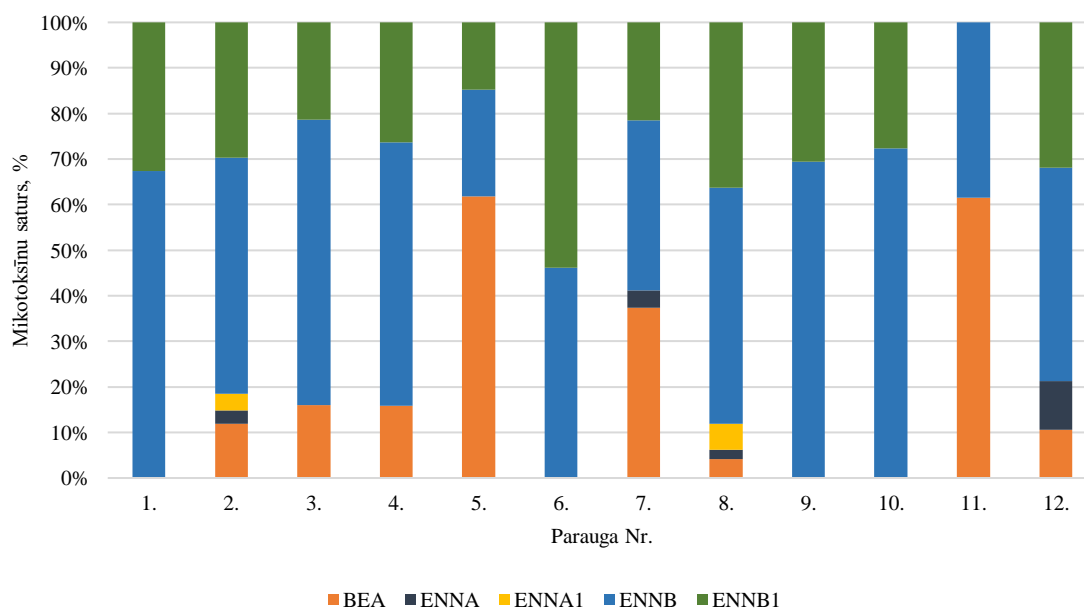
^d – ir detektēts zem LOQ

No 12 notekūdens paraugiem, DON tika detektēts 75% paraugos virs LOQ vērtības. Vislielākā DON koncentrācija paraugā ir 126 ± 21 ng/L (sk. 3.5.1. att.).



3.5.1. att. Iegūtie rezultāti DON notekūdeņos ar nenoteiktībām

No 12 notekūdens paraugiem, BEA tika detektēts 75% paraugos virs LOQ vērtības. Vislielākā BEA koncentrācija paraugā ir 4 ± 2 ng/L, ENNA – $0,5 \pm 0,2$ ng/L, ENNA1 – $1,1 \pm 0,4$ ng/L, ENNB – 10 ± 4 ng/L un ENNB1 – 7 ± 3 ng/L (sk. 3.5.2. att.).



3.5.2. att. Procentuālā attiecība BEA un ENN grupas mikotoksīniem notekūdeņos

DON, BEA, ENNB un ENNB1 tika detektēti ļoti bieži virs LOQ vērtības. Tika secināts, ka DON, BEA, ENNB un ENNB1 ir bieži sastopamie mikotoksīni notekūdeņos Latvijas teritorijā.

Tika pētīti notekūdens paraugi 5 publikācijās dažādos diapazonos. Šobrīd pasaulē ir ļoti maz datu par mikotoksīniem notekūdeņos, lai uztaisītu detalizētu salīdzināšanu. Tika apkopoti rezultāti no citiem publikācijām (sk. 3.5.2. tabulu).

3.5.2. tabula

Mikotoksīnu koncentrācijas (ng/L) notekūdeņos

Lit.	Mikotoksīns	Paraugu skaits	Vidējā koncentrācija, ng/L	Min. – Max. saturs, ng/L
Gracia-Lor ¹	DON	29	36,6	32,2 – 46,6
	BEA	29	NA	< 11,3 ^d
Schenzel ²	DON	6	41,1	19,2 – 73,4
	BEA	6	NA	< 11,3 ^d
Kolpin ³	DON	3	NA	1,2 – 75,4
	BEA	3	NA	< 3,4 ^d
Schenzel ⁵	DON	4	26,1	16,4 – 38,8
	BEA	4	NA	< 3,4 ^d
Wettstein ¹¹	DON	14	82	37 – 122
Bakalaura darbs	DON	12	51 ± 9	< LOQ – 126 ± 21
	BEA	12	1,4 ± 0,6	< LOQ – 4 ± 2

^d – ir detektēts zem LOQ; NA – nav atrasts

Salīdzināšanai tika izvēlēti 2 mikotoksīni – DON un BEA, tāpēc kā tikai tie bijī atrasti šajā pētījumā. Tika salīdzināti dati no 3.5.2. tabulas par mikotoksīnu izplatību reālos notekūdens paraugos. Ir zināms, ka citos pētījumos tika detektēti citi mikotoksīni, piemēram, fumonizīni, tomēr tie nav detektēti šajā pētījumā, jo ir neatbilstošs klimats.³⁴

Vislielākā DON koncentrācija no visiem salīdzinātiem datiem tika detektēta paraugā no Rīgas pilsētas attīrīšanas sistēmas, kas ir 126 ± 21 ng/L. Vidējā DON koncentrācija 82 ng/L ir vislielākā Wettstein publikācijā. Šajā pētījuma iegūtie rezultāti ir lielāk pēc koncentrācijas nekā citos publikācijās, visticamāk, tas ir saistīts ar to, ka DON un BEA ir raksturīgs mūsu klimatam.³⁵ BEA tika detektēts virs LOQ vērtības tikai šajā pētījumā. Maksimāla BEA koncentrācijas ir 4 ± 2 ng/L. Citos publikācijās BEA netika detektēts virs LOQ vērtības.

SECINĀJUMI

1. Tika izstrādāta analītiskā metode, kas ir piemērota deoksinivalenola, beauvericīna un enniatīnu noteikšanai notekūdeņos, izmantojot šķidrums hromatogrāfiju un kvadrupolu tandēma masspektrometriju. Ir sasniegti sekojoši metodes raksturparametri – linearitāte $\geq 0,95$, precizitātes diapazons 84 – 94%, LOD no 0,039 ng/L līdz 1,9 ng/L, LOQ no 0,13 ng/L līdz 6,4 ng/L un metodes nenoteiktība no 17% līdz 44%.
2. Nebija iespējams apvienot DON, BEA un ENN noteikšanu viena instrumentālajā metodē, jo tiem ir dažāda polaritāte, tāpēc tika piedāvātas divas dažādas instrumentālās metodes, izmantojot vienu paraugu sagatavošanas procedūru.
3. Izstrādātā metode dod iespēju analizēt beauvericīnu un enniatīnus zemos koncentrāciju līmeņos. Šajā bakalaura darbā apskatītajā zinātniskajā literatūrā nav informācijas par enniatīnu detektēšanu notekūdeņos paraugos, tāpēc šis ir pirmais pētījums, kas norāda uz šī mikotoksīna noteikšanas iespējām.
4. Notekūdens paraugos no Rīgas pilsētas attīrīšanas sistēmas tika konstatētas šādas mikotoksīnu koncentrācijas: DON diapazonā no LOQ līdz 126 ± 21 ng/L, BEA diapazonā no LOQ līdz 4 ± 2 ng/L, ENNA diapazonā no LOQ līdz $0,5 \pm 0,2$ ng/L, ENNA1 diapazonā no LOQ līdz $1,1 \pm 0,4$ ng/L, ENNB diapazonā no LOQ līdz 10 ± 4 ng/L, ENNB1 diapazonā no LOQ līdz 7 ± 3 ng/L.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- (1) Gracia-Lor, E.; Zuccato, E.; Hernández, F.; Castiglioni, S. Wastewater-based epidemiology for tracking human exposure to mycotoxins. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *382*, 1–7. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121108.
- (2) Schenzel, J.; Hungerbühler, K.; Bucheli, T. D. Mycotoxins in the environment: ii. occurrence and origin in swiss river waters. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 13076–13084. DOI: 10.1021/es301558v.
- (3) Kolpin, D. W.; Schenzel, J.; Meyer, M. T.; Phillips, P. J.; Hubbard, L. E.; Scott, T.-M.; Bucheli, T. D. Mycotoxins: Diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. *Sci. Total Environ.* **2014**, *470–471*, 669–676. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.09.062.
- (4) Chen, C.; Kostakis, C.; Gerber, J. P.; Tschärke, B. J.; Irvine, R. J.; White, J. M. Towards finding a population biomarker for wastewater epidemiology studies. *Sci. Total Environ.* **2014**, *487*, 621–628. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.075.
- (5) Schenzel, J.; Schwarzenbach, R. P.; Bucheli, T. D. Multi-residue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11207–11217. DOI: 10.1021/jf102737q.
- (6) Gromadzka, K.; Waskiewicz, A.; Golinski, P.; Swietlik, J.; Bocianowski, J. Dissolved organic carbon as an indicator of the presence of zearalenone in the aquatic environment. *World Mycotoxin J.* **2012**, *5*, 357–364. DOI: 10.3920/WMJ2011.1355.
- (7) Gromadzka, K.; Waśkiewicz, A.; Świetlik, J.; Bocianowski, J.; Goliński, P. The role of wastewater treatment in reducing pollution of surface waters with zearalenone. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **2015**, *66*, 159–164. DOI: 10.1515/aiht-2015-66-2606.
- (8) Gromadzka, K.; Waśkiewicz, A.; Goliński, P.; Świetlik, J. Occurrence of estrogenic mycotoxin – Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. *Water Res.* **2009**, *43*, 1051–1059. DOI: 10.1016/j.watres.2008.11.042.
- (9) Bucheli, T. D.; Wettstein, F. E.; Hartmann, N.; Erbs, M.; Vogelgsang, S.; Forrer, H.-R.; Schwarzenbach, R. P. Fusarium mycotoxins: Overlooked aquatic micropollutants? *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1029–1034. DOI: 10.1021/jf073082k.
- (10) Hartmann, N.; Erbs, M.; Wettstein, F. E.; Schwarzenbach, R. P.; Bucheli, T. D. Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1138*, 132–140. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.10.045.

- (11) Wettstein, F. E.; Bucheli, T. D. Poor elimination rates in waste water treatment plants lead to continuous emission of deoxynivalenol into the aquatic environment. *Water Res.* **2010**, *44*, 4137–4142. DOI: 10.1016/j.watres.2010.05.038.
- (12) Alshannaq, A.; Yu, J.-H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2017**, *632*, 1–20. DOI: 10.3390/ijerph14060632.
- (13) Rebellato, A. P.; dos Santos Caramês, E. T.; Pallone, J. A. L.; de Oliveira Rocha, L. Mycotoxin bioaccessibility in baby food through in vitro digestion: An overview focusing on risk assessment. *Curr. Opin. Food Sci.* **2021**, *41*, 107–115. DOI: 10.1016/j.cofs.2021.03.010.
- (14) Mostrom, M. Mycotoxins: classification; Academic Press: Oxford, 2016; 29–34.
- (15) Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. DOI: 10.1128/cmr.16.3.497-516.2003.
- (16) Brera, C.; De Santis, B.; Debegnach, F.; Miraglia, M. Chapter 12 mycotoxins. *Compr. Anal. Chem.* **2008**, *51*, 363–427. DOI: 10.1016/S0166-526X(08)00012-3.
- (17) Wang, T.; Yang, J.; Lin, G.; Li, M.; Zhu, R.; Yiannikouris, A.; Wang, R.; Zhang, Y.; Mai, K. Evaluation of the mitigation efficacy of a yeast cell wall extract toward deoxynivalenol contaminated diet fed to turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *216*, 1–11. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112221.
- (18) Prosperini, A.; Berrada, H.; Ruiz, M. J.; Caloni, F.; Coccini, T.; Spicer, L. J.; Perego, M. C.; Lafranconi, A. A Review of the Mycotoxin Enniatin B. *Public Health Front.* **2017**, *304*, 1–11. DOI: 10.3389/fpubh.2017.00304.
- (19) Wu, Q.; Patocka, J.; Nepovimova, E.; Kuca, K. A review on the Synthesis and Bioactivity Aspects of Beauvericin, a Fusarium Mycotoxin. *Front. pharmacol.* **2018**, *1338*, 1–12. DOI: 10.3389/fphar.2018.01338.
- (20) Zain, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* **2011**, *15*, 129–144. DOI: 10.1016/j.jscs.2010.06.006.
- (21) Sobrova, P.; Adam, V.; Vasatkova, A.; Beklova, M.; Zeman, L.; Kizek, R. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip. Toxicol.* **2010**, *3*, 94–99. DOI: 10.2478/v10102-010-0019-x.
- (22) Mallebrera, B.; Prosperini, A.; Font, G.; Ruiz, M. J. In vitro mechanisms of beauvericin toxicity: a review. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *111*, 537–545. DOI: 10.1016/j.fct.2017.11.019.
- (23) Fraeyman, S.; Croubels, S.; Devreese, M.; Antonissen, G. Emerging fusarium and alternaria mycotoxins: occurrence, toxicity and toxicokinetics. *Toxins* **2017**, *9*, 1–26. DOI: 10.3390/toxins9070228.

- (24) Gray, N. F. Chapter 13 - Nature of Wastewater. *Water Technology*; Butterworth-Heinemann: Oxford, 2005; 349–367.
- (25) Bartolomeu, M.; Neves, M. G. P. M. S.; Faustino, M. A. F.; Almeida, A. Wastewater chemical contaminants: remediation by advanced oxidation processes. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17*, 1573–1598. DOI: 10.1039/c8pp00249e.
- (26) Coppock, R. W.; Dziwenka, M. Chapter 32 - mycotoxins. *Mycotoxins*; Academic Press: Boston, 2014; 549–562.
- (27) Vidal, A.; Mengelers, M.; Yang, S.; De Saeger, S.; De Boevre, M. Mycotoxin biomarkers of exposure: a comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 1127–1155. DOI: 10.1111/1541-4337.12367.
- (28) Rodríguez-Carrasco, Y.; Narváez, A.; Izzo, L.; Gaspari, A.; Graziani, G.; Ritieni, A. Biomonitoring of Enniatin B1 and Its Phase I Metabolites in Human Urine: First Large-Scale Study. *Toxins*. **2020**, *12*, 1–11. DOI: 10.3390/toxins12060415.
- (29) Waters corporation. Oasis HLB cartridges and 96-well plates. *Care Use Man.* 2014, 1–4. <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>. (skatīts 16.04.2021).
- (30) Thermo Scientific. Thermo Scientific Hypercarb columns: Applications Notebook;2009. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/ANGSCHYPERCARB0609-hypercarb_appnotebook.pdf (skatīts 07.05.2021).
- (31) Urbaniak, M.; Stępień, Ł.; Uhlig, S. Evidence for naturally produced beauvericins containing n-methyl-tyrosine in hypocreales fungi. *Toxins*. **2019**, *11*, 182. DOI: 10.3390/toxins11030182.
- (32) Audhya, T. K.; Russell, D. W. Natural enniatin a, a mixture of optical isomers containing both erythro-and threo-n-methyl-l-isoleucine residues. *J. Chem. Soc. Perkin 1.* **1974**, *0*, 743–746. DOI: 10.1039/P19740000743.
- (33) Kinetex core-shell technology. New Kinetex F5: HPLC/UHPLC Core-Shell Columns. Phenomenex, 2018. <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/dd27011c-d610-4fd4-93ee-7d892c4058f8.pdf>. (skatīts 21.03.2021).
- (34) Kamle, M.; Mahato, D. K.; Devi, S.; Lee, K. E.; Kang, S. G.; Kumar, P. Fumonisin: impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins*. **2019**, *11*, 328. DOI: 10.3390/toxins11060328.
- (35) Van Der Fels-Klerx, H. J.; Olesen, J. E.; Madsen, M. S.; Goedhart, P. W. Climate change increases deoxynivalenol contamination of wheat in north-western europe. *Food Addit. Contam. Part A.* **2012**, *29*, 1593–1604. DOI: 10.1080/19440049.2012.691555.

PIELIKUMI

1. pielikums

LU 79. starptautiskā zinātniskā konference: Tēžu krājums

OPTIMISATION OF THE SAMPLE PREPARATION STRATEGY FOR THE ANALYSIS OF MYCOTOXINS IN WASTEWATER SAMPLES

PARAUGU SAGATAVOŠANAS PROCEDŪRU OPTIMIZĀCIJA MIKOTOKSĪNU NOTEIKŠANAI NOTEKŪDENS PARAUGOS

Romans Pavļenko^{1,2}, Zane Bērziņa^{1,2}, Estefanija Bogdanova^{1,2}, Mārtiņš Jansons², Vadims Bartkevičs^{1,2}

¹*University of Latvia, Faculty of Chemistry, Jelgavas iela 1, Rīga, Latvia*

²*Institute of Food Safety, Animal Health and Environment "BIOR", Leļupes iela 3, Rīga LV-1076, Latvia*

e-mail: romans.pavlenko@bior.lv

Mycotoxins are toxic compounds naturally produced by a certain type of fungi that grow on foodstuffs such as cereals, dried fruits, nuts, and spices. Most mycotoxins are chemically stable, they survive storage and processing, and could even remain in cooked food, so humans are mainly exposed through direct ingestion of contaminated foods and, therefore, certain amounts of mycotoxins are transferred to the samples of wastewater (WW) as a result of excretion [1]

Within the current study the main parameters of the analysis were optimised for the determination of 13 main regulated mycotoxins in WW samples. Quadrupole tandem mass spectrometry was selected for the quantification of these compounds. 0.1% formic acid solutions in water and methanol were selected as a mobile phase for liquid chromatography. Our results showed that additional salts in the mobile phases did not significantly improve the determination of the selected compounds.

Five solid phase extraction (SPE) columns (Strata X, Strata-C18, Oasis HLB, Strata Basic Screen, and Strata ABW) were compared. The best recovery for deoxynivalenol (DON) was achieved using the Oasis HLB phase, however, recoveries for the other compounds were much lower. Strata Basic Screen and Strata X SPE columns showed the acceptable results for other mycotoxins, however, using Strata Basic Screen it was impossible to retain DON and C18 indicated better recoveries for less polar compounds. Strata X SPE columns showed better retention for more polar ones but also being usable for non-polar compounds. The detectable concentrations are in the range of 1,25 - 5 ng/L for different mycotoxins. SPE activation, concentration, and equilibration steps were optimised. For polar mycotoxins, it was concluded that acetonitrile is provided better elution efficiency and for non-polar compounds MeOH was preferable.

The final version of the analytical procedure provided the limits of detection in the range of 1 - 5 ng/L for different mycotoxins.

Acknowledgement

Project No. lzp-2020/2-0128 funded by the Latvian Council of Science.

References:

- [1] Gracia-Lor, E.; Zuccato, E.; Hernández, F.; Castiglioni, S. Wastewater-Based Epidemiology for Tracking Human Exposure to Mycotoxins. *J. Hazard. Mater.* **2020**, 382121108.

Bakalaura darbs „**Analītiskās metodes izstrāde mikotoksīnu noteikšanai noteikūdēns paraugos**” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____
(personiskais paraksts) _____
(paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs, prof., *Dr. chem.* Vadīms Barkevičs: _____
(personiskais paraksts) _____
(datums)

Recenzente, *Mg. chem.* Laura Elīna Ikkere: _____
(personiskais paraksts) _____
(datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____
(datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Ilze Gaile
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____ (ieraksta sekretārs)
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: _____
(personiskais paraksts) _____
(paraksta atšifrējums)