НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКА ЛАБОРАТОРІЯ ЯКОСТІ І БЕЗПЕКИ ПРОДУКЦІЇ АПК
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ

(МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ)

КИЇВ – 2026

УДК 632.4:632.9:543.544(072)

Рекомендовано до видання рішенням Вченої ради
Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК НУБіП України
(протокол № 2 від 11 червня 2026 р.)

Рецензенти:

Якубчак О.М., доктор ветеринарних наук, професор кафедри гігієни тварин і харчових продуктів ім. А.К. Скороходька Національного університету біоресурсів і природокористування України

Данчук В.В., доктор сільськогосподарських наук, професор, головний науковий співробітник Інституту кліматично орієнтованого сільського господарства НААН.

Визначення мікотоксинів хроматографічними методами (методичні вказівки)
С.В. Мідик, С.А. Сенін, В.І. Корнієнко, Т.В. Таран, А.Б. Альтанова,

К.: Видавництво «Наукова столиця», 2026. - 26 с.

У методичних вказівках висвітлено результати напрацювань згідно робочої програми науково-дослідної теми «Наукове обґрунтування концептуальних засад моніторингу хімічних чинників довкілля, викликаних мілітарним впливом», № держреєстрації 0125U001874.

Надано огляд щодо існуючих методів визначення мікотоксинів, зазначено їх переваги та недоліки. Описано техніку проведення (підготовку проб, умови хроматографування, методи обрахунку даних для методик, розроблених в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК НУБіП України, а саме для методик з визначення афлатоксину В1 та деоксиніваленолу в зерні і кормах методом високоефективної рідинної хроматографії, Т-2 та НТ-2 токсинів у зерні пшениці методом високоефективної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектуванням; визначення мікотоксинів у зерні пшениці методом LC-MS/MS з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS для одночасного визначення 6-ти та 9-ти мікотоксинів (дезоксиніваленол, афлатоксин В1, В2, G1, G2, Т-2 та НТ-2 токсин, зеараленон, охратоксин-А).

Зміст викладеного матеріалу впроваджено в навчальний процес для викладання дисциплін «Методика санітарних досліджень» та «Лабораторний аналіз харчових продуктів» для студентів ОС «Магістр» зі спеціальності 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза», а також у рамках підвищення кваліфікації для фахівців профільних хімічних лабораторій.

© Мідик С.В., Сенін С.А., Корнієнко В.І., Таран Т.В., Альтанова А.Б., 2026

© НУБіП України, 2026

ЗМІСТ

ВСТУП…….4

1. ОГЛЯД ІСНУЮЧИХ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ…..6

2. МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ, ЯКІ РОЗРОБЛЕНІ В УКРАЇНСЬКІЙ ЛАБОРАТОРІЇ ЯКОСТІ І БЕЗПЕКИ ПРОДУКЦІЇ АПК..10

2.1. Визначення афлатоксину В1 та деоксиніваленолу в зерні і кормах методом високоефективної рідинної хроматографії ……10

2.2. Визначення Т-2 та НТ-2 токсинів у зерні пшениці методом високоефективної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектуванням……13

2.3. Визначення мікотоксинів у зерні пшениці методом LC-MS/MS з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS……..14

2.4. Модифікація пробопідготовки QuEChERS з метою одночасного визначення 9-ти мікотоксинів…….....19

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ ……..23

ВСТУП

Мікотоксини є вторинними метаболітами мікроскопічних грибів (плісеней), здатними вражати кормові та сільськогосподарські культури як у період вегетації, так і під час їх зберігання. Зазначені токсичні сполуки належать до глобальних природних контамінантів зерна злакових і бобових культур, насіння соняшнику, а також овочевої та фруктової продукції [1].

Мікотоксини становлять суттєву загрозу для здоров'я людини та тварин, оскільки контамінація сировини та готової продукції можлива на всіх етапах технологічного ланцюга: від вирощування до реалізації. Результати численних вітчизняних і зарубіжних досліджень засвідчують високий рівень поширення та значний ступінь мікотоксичного ураження харчових продуктів і кормів. Наразі ідентифіковано близько 350 видів мікроміцетів, здатних продукувати понад 400 мікотоксинів, більшість з яких є етіологічними факторами аліментарних токсикозів. Окремі штами грибів можуть синтезувати декілька типів мікотоксинів одночасно. Значна кількість цих сполук виявляє імунодепресивну, мутагенну, алергенну, тератогенну та канцерогенну дію, що спричиняє зниження резистентності організму, розвиток інфекційної та соматичної патології, погіршення продуктивності й репродуктивної функції тварин [2–5].

Біохімічні механізми негативного впливу мікотоксинів на організм тварин і людини характеризуються високим різноманіттям. Основними ланками їхньої патогенетичної дії є пригнічення ферментативної активності, інгібування біосинтезу нуклеїнових кислот і білків, а також порушення обміну речовин та енергетичного метаболізму. На клітинному та системному рівнях мікотоксини виявляють мутагенні, онкогенні, тератогенні й ембріотоксичні властивості.

Ступінь токсичної дії мікотоксинів суттєво опосередковується метаболічною активністю мікробіоти шлунково-кишкового тракту. Зокрема, деоксиніваленол (DON), синтезований мікроміцетами роду Fusarium, піддається біотрансформації симбіотичною мікрофлорою рубця жуйних тварин, що призводить до значної детоксикації цієї сполуки.

Основним шляхом надходження мікотоксинів в організм є аліментарний – із контамінованими харчовими продуктами, кормами або сировиною. За наявності аерозольних форм токсинів можливе їх проникнення інгаляційним шляхом через дихальні шляхи, а також перкутанно й через слизові оболонки.

Більшість мікотоксинів володіють високою термостабільністю, зберігаючи свою токсичність та аналітичну структуральну цілісність у процесі стандартних кулінарних і технологічних обробок харчової та кормової сировини.

Розвиток національних і міжнародних нормативно-правових актів у сфері безпечності харчової продукції супроводжується розширенням переліку потенційно небезпечних сполук та підвищенням вимог до їхніх максимально допустимих рівнів (МДР) [6].

Систематичний лабораторний контроль вмісту мікотоксинів у продовольчій сировині та кормах є фундаментальним елементом забезпечення харчової й біологічної безпеки. Необхідність їх високоточного визначення зумовлена високою здатністю цих сполук кумулюватися в організмі та викликати гострі й хронічні аліментарні токсикози у людини і тварин. Моніторинг мікотоксичного стану дає змогу своєчасно виявляти приховану контамінацію сільськогосподарської продукції ще на етапах її заготовлення та первинної переробки. Це дозволяє запобігти значним економічним збиткам у животінництві, які виникають унаслідок зниження продуктивності тварин та погіршення якості отриманої сировини.

Впровадження сучасних аналітичних методів у лабораторну практику уможливлює надійну ідентифікацію ультрамікроконцентрацій токсикантів у складних біологічних матрицях. Точне визначення спектра мікотоксинів є обов'язковою умовою для сертифікації агропромислової продукції відповідно до жорстких міжнародних вимог і гармонізованих стандартів. Окрім того, регулярний аналітичний контроль унеможливлює потрапляння канцерогенних, мутагенних та імунодепресивних метаболітів мікроміцетів у трофічні ланцюги харчування. Отримані результати лабораторних досліджень слугують підґрунтям для обґрунтованого вибору методів детоксикації кормової бази та мінімізують ризики торгівлі некондиційною сировиною.

Визначення вмісту мікотоксинів є одним із ключових критеріїв оцінки безпечності харчових продуктів і кормової сировини. У зв’язку з цим актуальним напрямом сучасних аналітичних досліджень є оптимізація та спрощення процедур пробопідготовки, скорочення тривалості аналізу, зниження його собівартості, а також розробка методів одночасного скринінгу максимального спектра мікотоксинів [7-9].

Методичні рекомендації покликані уніфікувати підходи до пробопідготовки та аналітичного визначення мікотоксинів хроматографічними методами, забезпечуючи високу відтворюваність і достовірність результатів контролю. Орієнтовані на профільних спеціалістів (хіміків-аналітиків), а також аспірантів та студентів при викладанні дисциплін «Методика санітарних досліджень» та «Лабораторний аналіз харчових продуктів» факультету ветеринарної медицини.

1. ОГЛЯД ІСНУЮЧИХ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ

З метою здійснення випробувань зразків зерна, кормів та молока на вміст мікотоксинів застосовують скринінгові методи, найбільш поширеним з яких є твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА). Принцип методу полягає у високоспецифічній реакції антиген-антитіло, детектування якої здійснюється за рахунок введення ферментативної мітки з подальшим її виявленням за допомогою відповідного субстрату, що змінює свій колір. Твердою фазою в імуноферментному аналізі зазвичай слугує поверхня лунки мікропланшету. Високоспецифічні взаємодії антигену та антитіла визначають високу специфічність і чутливість імуноферментних методик вимірювань. Крім того, ІФА володіє такими перевагами як оперативність, висока продуктивність (одночасно на одному планшеті проводиться кілька десятків аналізів), простота пробопідготовки і проведення вимірювань, низька вартість аналізу, порівняно з традиційними хроматографічними методиками та використання невеликих об’ємів випробувальних зразків, наприклад, молока [10].

Попри всі переваги, імуноферментний аналіз, як правило, використовується лише для скринінгових аналізувань наявності мікотоксинів (вище певного рівня/відсутність у зразку) у випробовуваних зразках. З урахуванням результатів ІФА, зразки, наприклад, молока-сировини або зерна з завищеними МДР афлатоксинів повинні бути досліджені класичними хроматографічними методами з метою підтвердження/спростування встановленої кількості мікотоксину. Такий підхід пов'язаний із основним недоліком цього методу, а саме, з можливістю перехресної реактивності (крос-реактивності) з подібними сполуками. Тому з метою уникнення ризику отримання хибнопозитивних результатів, застосовують арбітражні хроматографічні та мас-спектрометричні методи [11, 12].

Провідні аналітичні лабораторії самостійно розробляють методики визначення мікотоксинів, адаптують їх відповідно під існуюче обладнання, імуноафінні колонки певного виробника, проводять валідацію методик. Практика розробки та валідації методик лабораторіями є досить поширеним явищем не тільки для визначення мікотоксинів.

Одним із основних арбітражних (підтверджуючих) методів кількісної оцінки мікотоксинів є метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Цей метод широко застосовується у випробувальних лабораторіях, оскільки має суттєві преваги у роздільній здатності, селективності та чутливості, і порівняно з тонкошаровою хроматографією [12].

Методи на основі ВЕРХ були розроблені для багатьох основних мікотоксинів не тільки в зернових культурах та інших сільськогосподарських

продуктів, а й для молока-сировини та молочних продуктів. Принцип методу ВЕРХ полягає у розділенні аналізованого екстракту у нерухомій фазі хроматографічної колонки з подальшою ідентифікацією та кількісному визначенні компонентів за допомогою відповідних аналітичних стандартів. Нині для визначення вмісту афлатоксинів у молоці-сировині застосовують рідинну хроматографію з флуоресцентним детектуванням. Межа чутливості методу ВЕРХ із застосуванням флуоресцентного детектору може досягати до 1 мкг/кг. Крім того, вже розроблено методики ВЕРХ для одночасного аналізу декількох мікотоксинів [13].

У літературі описана методика визначення метаболіту афлатоксину В1 – токсину М1 у молоці методом ВЕРХ з флуоресцентним детектуванням. Розбавлені водою зразки молока пропускають через імуноафінні колонки з метою виділення і очищення токсину від домішок. У якості рухомої фази використовують суміш ацетонітрилу і води (25:75), нерухома фаза – сорбент XDB C18, довжини хвиль збудження і детектування – 365 і 435 нм, відповідно. Межа виявлення токсину М1 у молоці складала 0,04 мкг/л. Основним обмеженням для методу ВЕРХ з флуоресцентним детектором є необхідність дотримання спеціальних умов хроматографічного розділення мікотоксинів. Крім того, з метою підвищення чутливості методики необхідно отримувати похідні мікотоксинів за допомогою додаткового етапу пробопідготовки – дериватизації [14].

Складність виявлення мікотоксинів звичайними хроматографічними методами пов'язана з їхніми фізико-хімічними особливостями, а також з присутністю великої кількості непередбачуваних домішок у молочних продуктах. Саме тому загальноприйняті методики їх визначення, зазвичай, стосуються тільки одного компонента або декількох одного класу [15].

З огляду на це, постає питання пошуку, розробки та впровадження у випробувальних лабораторіях хіміко-аналітичних методів, які б дозволяли кількісно визначати широкий спектр мікотоксинів однією пробопідготовкою та одним методом детектування.

Не викликає сумніву, що використання однієї уніфікованої пробопідготовки для екстракції широкого спектру мікотоксинів дозволяє скоротити за часом випробування, зменшити використання реактивів та інших витратних матеріалів, порівняно з традиційними методами.

Одним із сучасних методів, який дозволяє здійснювати багатокомпонентний аналіз в складних матрицях – є метод високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS/MS). Як відомо, багатокомпонентний аналіз є можливим завдяки тому, що розділення речовин відбувається у декількох площинах: з одного боку – розділення речовин

на хроматографічній колонці, а з іншого – розділення речовин за їх співвідношенням маси до заряду (m/z) [11].

За допомогою методу LC-MS/MS можна розділити та кількісно визначити більшість водорозчинних речовин, що присутні у випробувальному зразку, і в тому числі мікотоксини після їх специфічної фрагментації. Детектування мікотоксинів здійснюється за допомогою режиму – моніторингу множинних реакцій (MRM) іонів у процесі хроматографічного елюювання. Кількісно мікотоксини визначають за методом внутрішнього стандарту або за методом абсолютного градуювання.

Важливо, що LC-MS/MS метод дає можливість працювати безпосередньо з неочищеними екстрактами, що значно прискорює аналіз. Даний метод дозволяє кількісно визначити одночасно декілька мікотоксинів незалежно від їхньої хімічної структури або біологічної активності [16].

У літературі описані методи визначення мікотоксинів за допомогою методу LC-MS/MS високої роздільної здатності у поєднанні з модифікованою пробопідготовкою QuEChERS.

Отже, авторами описаний метод детектування, який здатний визначити декілька мікотоксинів у молоці-сировині, а з іншого боку застосовується уніфікована методика екстракції мікотоксинів та очистки QuEChERS, яка може бути задіяна для екстракції також інших мікотоксинів різних класів.

На відміну від стандартної методики для екстракції пестицидів, у модифікованому методі QuEChERS на етапі екстракції використовується 3,35 % розчин мурашиної кислоти в ацетонітрилі, а замісить магнію сульфату – натрію сульфат (рис 1). Для афлатоксину М1 та В1 у молоці-сировині авторами були встановлені основні валідаційні характеристики цієї методики: повернення – 75–96 %; відносне стандартне відхилення збіжності – менше 7 %; відносне стандартне відхилення відтворюваності – менше 16 %; межа детектування – 0,001 мкг/кг та межа кількісного визначення – 0,002 мкг/кг.

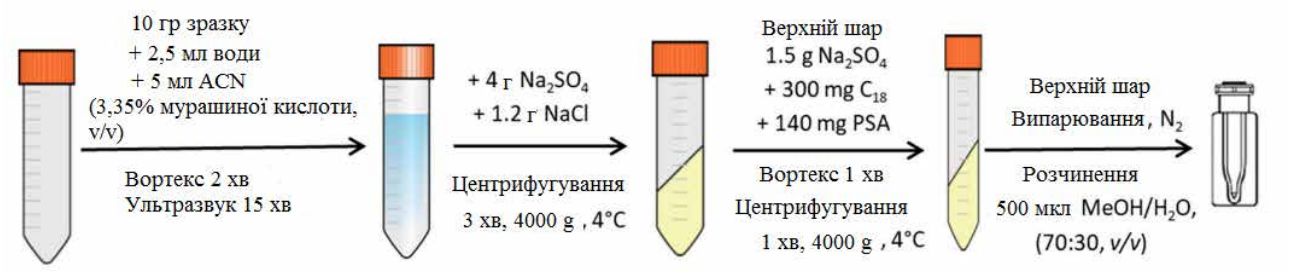


Рис.1. Етапи модифікованої підготовки зразків QuEChERS для визначення мікотоксинів у молоці-сировині методом LC-MS/MS [17].

Варто зазначити, що для проведення точного кількісного визначення мікотоксинів, необхідно приймати до уваги 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 [18].

З метою усунення матричних ефектів використовують для побудови градуювальної кривої не чистий розчинник, а екстракт з матриці (наприклад, молока). Таким чином, використання матричних градуювальних кривих для кількісної оцінки мікотоксинів дасть більш точніші результати аналізу оскільки враховується матричний ефект [12, 19].

2. МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ, ЯКІ РОЗРОБЛЕНІ В УКРАЇНСЬКІЙ ЛАБОРАТОРІЇ ЯКОСТІ І БЕЗПЕКИ ПРОДУКЦІЇ АПК

У цьому розділі описані методики, які розроблені та валідовані в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК (УЛЯБП АПК) Національного університету біоресурсів і природокористування (НУБіП) України. Система управління якістю в УЛЯБП АПК побудована відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019 (EN ISO/IEC 17025:2017, IDT; ISO/IEC 17025:2017, IDT), що підтверджено Атестатом Національного агентства з акредитації України.

2.1. Визначення афлатоксину B1 та деоксиніваленолу в зерні і кормах методом високоефективної рідинної хроматографії

Для аналізування при визначенні вмісту афлатоксину B1 у зернових культурах методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) використовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-20A з флуоресцентним детектором. Для аналізу застосовували аналітичні обернено-фазні колонки C18: Supelco Ascentis™, довжиною 150 мм, внутрішнім діаметром 4,6 мм, сорбентом з розміром часток 5,0 мкм та передколонку хроматографічну обернено-фазну Supelguard™ Ascentis™, довжиною 20,0 мм, внутрішнім діаметром 4,0 мм, сорбентом з розміром часток 5,0 мкм, 5 um kit.

Для оцінки придатності методики з визначення вмісту деоксиніваленолу (ДОН) в зернових культурах методом HPLC з очисткою на імуноафінних колонках використовували рідинний хроматограф Ultimate 3000 з діодно-матричним детектором. Для аналізу застосовували колонку хроматографічну Supelco Discovery C18, довжиною 250,0 мм, внутрішнім діаметром 4,6 мм, розміром часток 5,0 мкм.

Рухома фаза для визначення афлатоксину B1 – ацетонітрил:вода:метанол (2:6:2), яка містить калію бромід у концентрації 0,12 г/л та 200 мкл/л азотної кислоти; для визначення деоксиніваленолу використовували рухому фазу ацетонітрил:вода:метанол (3:94:3).

Умови хроматографічного аналізу для визначення афлатоксину B1:

1) швидкість потоку: 1 $см^3$/хв;
2) об'єм уведення: 20 мкл;
3) температура термостата колонки: 40°C;
4) довжини хвиль: λex = 362 нм; λem = 440 нм.

Умови хроматографічного аналізу для визначення деоксиніваленолу:

1) швидкість потоку: 1 $см^3$/хв;

2) об'єм уведення: 20 мкл;

3) температура термостата колонки: 30°С;

4) температура автосамплера: + 13°С

5) довжина хвилі: 218 нм.

Контролем слугували проби зерна злакових культур (пшениця, ячмінь), які попередньо були проконтрольовані на відсутність у них цільових аналітів. Внесення мікотоксинів у контрольні зразки до рівня необхідної концентрації проводили стандартними розчинами. Використовували стандартний сертифікований зразок афлатоксину В1 із концентрацією 25 мкг/мл виробництва Trilogy та стандартний зразок деоксиніваленолу з концентрацією 1000 мкг/мл виробництва Sigma-aldrich. Стандартні зразки та дослідні проби зберігали за відповідних умов мікроклімату приміщень з підготовки проб: температура – 20±5°С, вологість – до 80 %. Паралельно готували зразки з додаванням відповідних мікотоксинів та проводили контроль чистоти реактивів.

У роботі було використано імуноафінні колонки AFLAPREP® та DONPREP®, призначені для виділення афлатоксинів В1, В2, G1 і G2 і деоксиніваленолу зі злаків, виробництва компанії R-BIOPHARM RHONE LTD. Дослідження проводили згідно методичних рекомендацій щодо використання зазначених колонок [20, 21].

Методика визначення афлатоксину В1. Оскільки в ДСТУ EN 12955-2001 [22] чітко не зазначено вид та виробників імуноафінних колонок, які необхідно застосовувати під час аналізу, нами для постановки методики було використано колонки AFLAPREP®, які роблять процедуру очищення зразків більш зручною. При цьому підвищується чутливість методу за рахунок збагачення аналізу та очищення його від компонентів матриці, збільшується швидкість аналізування. Тому запропонована нами робоча методика випливає із використаної нами колонки AFLAPREP®. Для цього зважували 50 г гомогенізованої проби і додавали 5 г натрію хлористого та 100 см3 80 % метанолу.

Для підтвердження наявності афлатоксину В1 у зразку методом HPLC необхідно проводити дериватизацію, котра підвищує природну флуоресценцію токсину під УФ-світлом і робить їх детекцію більш легкою. Традиційно для цієї мети використовують складну хімічну дериватизацію. Однак вона має суттєві обмеження, котрі можливо подолати за допомогою лунки KOBRA.

Під час електрохімічної дериватизації афлатоксину В1 на лунці KOBRA виникає реакція зв'язування з бромідом (час реакції 4 сек за кімнатної температури). При цьому не потрібно додаткового обладнання і щоденної підготовки реагентів, на відміну від застосування йоду [22] в якості деривату.

Отже, оцінку придатності та валідацію робочої методики проводили з урахуванням використовуваних нами вищезазначених імуноафінних колонок і лунки КОБРА. Згідно методичних рекомендацій щодо використання імуноафінних колонок AFLAPREP® та ДСТУ EN 12955-2001 процедура оцінки продатності методики включає такі основні етапи: екстракція метанолом, фільтрація, утримання афлатоксинів, відмивання, елюювання, визначення афлатоксинів за допомогою високоефективної хроматографії. Подальша валідація показала, що запропонована нами робоча методика є оптимальною для рідинного хроматографа Shimadzu (Японія) в умовах цієї лабораторії.

Визначення деоксиніваленолу згідно розробленої нами методики включає такі основні етапи: екстракція деіонізованою водою, фільтрація (центрифугування), утримання деоксиніваленолу в імуноафінній колонці DONPREP®, відмивання імуноафінної колонки DONPREP®, елюювання деоксиніваленолу з імуноафінної колонки DONPREP®, випаровування елюату, розведення рухомою фазою, визначення деоксиніваленолу за допомогою високоефективної хроматографії. При цьому відбирали 25 г дрібно перемеленої проби ячменю, додавали 5 г натрію хлориду, додавали 200 $см^3$ дистильованої води та екстрагували 30 хв на шейкері. Екстракт відфільтровували та пропускали через імуноафінну колонку DONPREP®. Методику відпрацьовували на рідинному хроматографі Dionex ICS 3000 (США).

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

Отже, проведено оцінку придатності методик для визначення залишкових кількостей афлатоксину В1 та деоксиніваленолу в зерні, продуктах і кормах із зерна методом високоефективної рідинної хроматографії за валідаційними критеріями: лінійність, межа виявлення, специфічність, внутрішньолабораторна відтворюваність, правильність (повернення). Встановлено, що методики з визначення у зернових культурах вмісту афлатоксину В1 та деоксиніваленолу з очисткою на імуноафінних колонках методом високоефективної рідинної хроматографії є придатними для дослідження зерна, продуктів і кормів із зерна та можуть використовуватися лабораторіями для проведення аналогічних досліджень. Адаптовані методики з визначення мікотоксинів є високочутливими та за своїми параметрами відповідають європейським вимогам. Для всіх проаналізованих концентрацій афлатоксину В1 відсоток повернення складає 85,8±3,65%, що відповідає мінімально допустимим значенням згідно Commission Decision 2002/657/EC, при цьому коефіцієнт варіації (CV, %) складає 2,13±0,67 і є відповідним згідно Commission Decision 2002/657/EC. Для всіх

проаналізованих концентрацій деоксиніваленолу відсоток повернення складає 89,2±5,3 %, що відповідає мінімально допустимим значенням згідно Commission Decision 2002/657/EC, коефіцієнт варіації (CV, %) складає 9,4±1,65 і є відповідним.

2.2. Визначення Т-2 та НТ-2 токсинів у зерні пшениці методом високоефективної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектуванням

У роботі було використано стандартні аналітичні зразки Т-2 та НТ-2 токсинів виробництва LGC Standards Germany з концентрацією 5 мг. Т-2 та НТ-2 робочі розчини готували розчиненням порошку токсину в ацетонітрилі (99,9 %, HPLC, Honeywell) до концентрації 100 мкг/мл. Стокові розчини стандартів зберігали в посуді з темного скла (не допускаючи потрапляння на них ультрафіолетового світла). Для дериватизації Т-2 та НТ-2 токсину в стандартних та дослідних зразках використовували 1-антроїлнітрил (Wako Pure Chemical Industries) та 4-диметиламінопіридин (Merk), розчини яких готували у толуолі (99,7 %, HPLC, Fluka) у концентраціях 325 мкг/см^3 та 300 мкг/ см^3 відповідно.

Підготовка зразків стандартних розчинів Т-2 та НТ-2 токсину. Для приготування робочих розчинів відповідно до калібрувального графіку переносили стандартний розчин в серцевидну колбу. Висушували елюат стандарту під потоком повітря за температури 50^{o}С. До сухого залишку додавали 50 мкл 4-диметиламінопіридин (325 мкг/см^3) та 50 мкл 1-антроїлнітрил (300 мкг/см^3) реактиву. Закривали віалу та перемішували на вортексі протягом 1 хв. Висушували 15 хв за температури 50°С у сушильній шафі. Суміш охолоджували протягом 15 хв, висушували під струменем повітря за температури 50°С, відновлювали у 2 см^3 70% ацетонітрилу та перемішували на вортексі протягом 30 сек. З отриманого розчину проводили підготовку робочих розчинів шляхом розведення.

Підготовка зразків зерна. До 50 г подрібненої проби додавали 5 г натрію хлориду. Після цього додавали 250 см^3 90 % розчину метанол/вода. Екстрагували пробу на шейкері протягом 30 хв. Досліджувану пробу фільтрували через фільтрувальний папір (червона стрічка). Після цього відбирали 7 см3 фільтрату і розбавляли в 28 см^3 деіонізованої води (HPLC якості). Якщо після розбавлення випадав осад, пробу ще раз фільтрували або центрифугували, щоб переконатися, що фільтрат прозорий перед пропусканням через імуноафінну колонку. 25 см^3 розведеного розчину (еквівалентно 1 г зразка) одержаного екстракту очищували від надлишків матриці методом імуноафінної хроматографії із застосуванням колонок (EASI-EXTRACT Т-2 & НТ-2®, виробництва компанії R-BIOPHARM RHÔNE LTD), які містили антитіла до Т-2, НТ-2 токсинів на поверхні

стаціонарної фази. Очищені екстракти випаровували в потоці азоту та додавали реагенти для утворення флуоресціюючого комплексу з Т-2 та НТ-2 токсином. Суміш висушували під струменем повітря за температури 50°С, відновлювали у 1 см3 70% ацетонітрилу та перемішували на вортексі протягом 30 сек.

Параметри хроматографічної системи. Для оцінки придатності методики з визначення вмісту Т-2, НТ-2 мікотоксинів використовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-20 з флуоресцентним детектором, хроматографічну колонку Supelco Discovery® C18 – довжина колонки 150 мм; внутрішній діаметр 4,6 мм; розмір часток 5,0 мкм. Рухома фаза для визначення Т-2, НТ-2: ацетонітрил/вода зі змінним градієнтом.

Умови хроматографування: довжина хвиль: λex = 381 нм; λem = 470 нм; об'єм проби: 20 мкл; температура термостата: 40°С; швидкість потоку: 1 $см^3$/хв. Кількісне визначення концентрації Т-2 та НТ-2 токсинів відбувалося шляхом порівняння площ піків проби за калібрувальною кривою стандарту. Отримані результати виражали в мкг/кг.

Оцінювання придатності методики проводили відповідно до Commission Decision 2002/657/ЕС [23], що забезпечує виконання Директиви Ради ЕС 96/23/ЄС, яка стосується ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів [24].

За результатами валідації встановлено, що коефіцієнт кореляції (R^2) для Т-2 та НТ-2 токсину складав 0.9999. Середнє значення повернення (R,%) для Т-2 та НТ-2 токсину на рівні 50–150 мкг/кг з пшениці (холоста проба) було 91 і 87% відповідно. Відносне стандартне відхилення (RSD,%) результатів вимірювання в умовах збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності склало від 0.23 до 3.93%. Межа кількісного визначення методу для Т-2 та НТ-2 токсину становила 2.2 та 1.2 мкг/кг відповідно. Ці значення відповідають мінімально допустимим рівням згідно регламенту комісії ЄС №401/2006. Доведено, що стандарти Т-2, НТ-2 токсинів у розчинах можна зберігати до 7 діб у морозильній камері, холодильнику та за кімнатної температури в щільно закритому посуді без фактичних втрат концентрації. Встановлено, що Т-2 та НТ-2 токсин у розчині не можна зберігати в освітленому місці, оскільки згідно отриманих даних сонячне світло призводить до руйнації даних мікотоксинів на 52% та 59 % відповідно.

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

У роботі були використані наступні аналітичні стандартні зразки: афлатоксин B1 (25 мкг/мл); афлатоксин B2 (25 мкг/мл); афлатоксин G1 (25 мкг/мл); афлатоксин G2 (25 мкг/мл); Т-2 токсин (100 мкг/мл) виробництва

Trilogy (США) та зеараленон (100 мкг/мл) виробництва Sigma (США). Для пробопідготвки QuEChERS були використані сульфат магнію безводний (виробництва Sigma-Aldrich, США), натрію хлорид (виробництва Merck, Германія), ацетонітрил HPLC якості (виробництва Carlo Erba, Франція) та сорбенти для очищення ацетонітрильного екстракту SupelTM QuE PSA/C18 (EN) Tube (900 mg $MgSO_4$, 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.

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 протягом 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 протягом 2 хв. Отриману суміш центрифугували протягом 10 хв при 8000 об/хв. Отриманий супернатант пропускали через шприцевий фільтр із середнім діаметром пор 0.45 μm, 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, виробництва США) з мас-спектрометричним детектором (AB SCIEX QTRAP 3200, виробництва 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 співвідношені 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 були наступні: метод іонізації – ESI (електророзпилення, позитивний та негативний режим), режим роботи – MRM (моніторинг множинних реакцій), температура блоку

нагрівання 500 ºС, напруга електророзпилення (±4500 V) та газ для MS/MS фрагментації – азот.

Масову частку кожного мікотоксину розраховували за методом зовнішнього стандарту (методом абсолютного градуювання) і виражали у мг/кг.

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

Оптимізація хроматографічних та мас-спектрометричних умов.

Зазвичай, у якості рухомих фаз для визначення міктоксинів використовують метанол, ацетонітрил та воду. У нашому дослідженні ми використовували 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 рухома 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) в якості сильного елюенту було виявлено певні недоліки: погана розчинність форміату амонію та більш 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 вищеперерахованих недоліків першої рухомої фази. Додавання форміату амонію в обидві рухомі фази, значно покращило чутливість до Т-2 токсину за рахунок утворення цим токсином амонійного аддукту $[M+NH_4]^+$.

При оптимізації умов мас-спектрометричного детектування було встановлено, що афлатоксини (B_1 B_2 G_1 G_2) та Т-2 токсин більш схильні утворювати протоновані іони $[M+H]^+$ у позитивному режимі (ESI+). На відміну від афлатоксинів та Т-2 токсину, зеараленон більш споріднений утворювати депротонований іон $[M-H]^-$. Мас-хроматограми мікотоксинів аналітичних стандартних зразків представлено на рисунку 1.

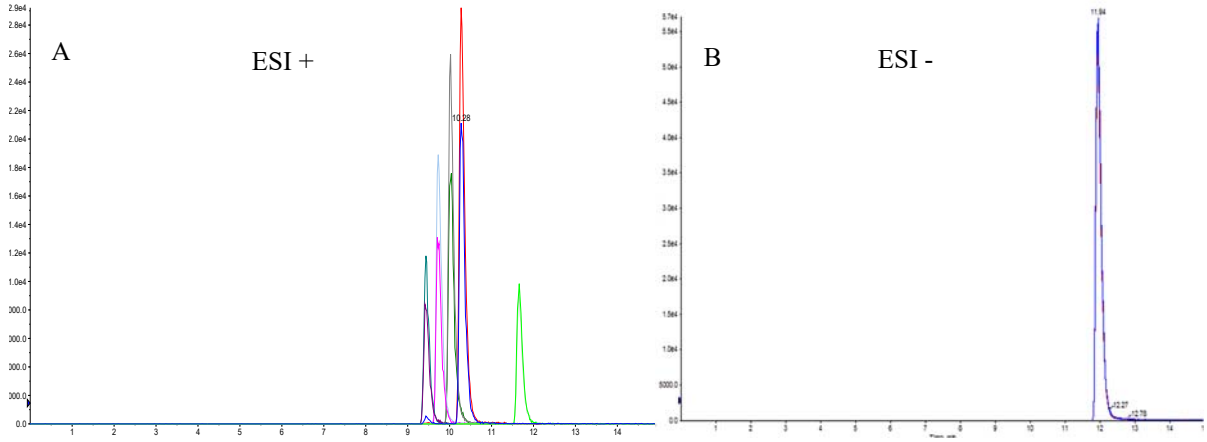


Рис. 1. Мас-хроматограми стандартних зразків мікотоксинів: А – афлатоксинів (B_1 B_2 G_1 G_2) з концентрацією 0.040 мг/кг та Т-2 токсину з концентрацією 0.5 мг/кг (позитивний режим, ESI+); В – зеараленону з концентрацією 1.0 мг/кг (негативний режим, ESI-).

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

Таблиця 1. Оптимізовані MS/MS параметри для мікотоксинів.

Аналіт	**Час утриму-вання, хв**	**Молекулярний іон (m/z)**	**Дочірні іони (m/z)**	**Енергія колізії, V**
Афлатоксин B_1				
Афлатоксин B_2				
Афлатоксин G_1				
Афлатоксин G_2				
Т-2 токсин				
Зеараленон				

^{Q} – Іон кількісного аналізу; ^{q} – Іон якісного аналізу.

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

Для побудови градуювальної 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 градуювальні криві для всіх мікотоксинів показали значення R^2 від 0.9990 до 0.9998, що відповідає необхідному рівню ≥ 0,995 (табл.1). 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 Т-2 токсину та від 0.05 до 1.0 мг/кг для зеараленону є лінійними.

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

У процесі експерименту було виявлено, що межа кількісного визначення для мікотоксинів у зерновій матриці становить: для афлатоксину B1 – 0.0007 мг/кг; афлатоксину B2 – 0.001 мг/кг; афлатоксину G1 – 0.001 мг/кг; афлатоксину G2 – 0.001 мг/кг; Т-2 токсину – 0.02 мг/кг та для зеараленону – 0.006 мг/кг (табл.1).

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 B1 – 0.002 мг/кг, сума афлатоксинів (B1, B2, G1, G2) – 0.004 мг/кг, зеараленон – 0.075 мг/кг [25] та для Т-2 токсину – 0.1 мг/кг [26].

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

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 приймати до уваги 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 може спостерігатися і ріст аналітичного сигналу.

З метою зниження впливу матричних ефектів були приготовані аналітичні стандартні зразки в ацетонітрильному екстракті пшениці та побудовані градуювальні криві у різних діапазонах концентрацій: для афлатоксину B1, B2, G1 та G2 – 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 градуювальні криві були використані для визначення правильності методики – ступеня вилучення мікотоксинів (R,%). Результати досліджень показали, що ступінь вилучення (R,%) афлатоксинів складає: для B1 – 101%; B2 – 92% ; G1 – 102%; та для G2 – 103%. Ступінь вилучення для зеараленону та для Т-2 токсину складає 88% та 98% відповідно (табл. 2).

Таблиця 2. Результати оцінки правильності та прецизійності результатів визначення мікотоксинів (n=10).

Мікотоксин	**Введено, мг/кг**	**Знайдено, мг/кг**		
Афлатоксин B_1				
Афлатоксин B_2				
Афлатоксин G_1				
Афлатоксин G_2				
Зеараленон				
Т-2 токсин				

R – ступень вилучення;
RSD – відносне середнє квадратичне відхилення.

Таким чином, отримані результати ступеня вилучення мікотоксинів відповідають діапазону допустимих значень (70–110%), що наведені в регламенті комісії ЄС №401/2006 [27].

2.4. Модифікація пробопідготовки QuEChERS з метою одночасного визначення 9-ти мікотоксинів

Модифікація протоколу пробопідготовки QuEChERS дозволила забезпечити визначення охратоксину А на рівнях, нижчих за гранично допустиму концентрацію – 0,005 мг/кг. Крім того, переведення екстракту у метанольно-водну систему сприяє суттєвому підвищенню ефективності іонізації дезоксиніваленолу у режимі ESI+.

На першому етапі дослідження було проведено оптимізацію хроматографічних параметрів. Встановлено, що застосування градієнтного елюювання з використанням фази А (5 мМ ацетат амонію у суміші H_2O :

HCOOH, 99.9 : 0.1, v/v) та фази B (5 мМ ацетат амонію у суміші CH_3OH : HCOOH, 99.9 : 0.1, v/v) є оптимальним для ефективного розділення усіх дев'яти мікотоксинів. Додавання ацетату амонію до обох компонентів рухомої фази забезпечило суттєве підвищення чутливості методу. Це дозволило змістити процес іонізації Т-2 та НТ-2 токсинів у бік переважного утворення стабільних амонійних аддуктів $[M+NH_4]^+$. Порівняно з протонованими молекулами $[M+H]^+$, аддукти з амонієм $[M+NH_4]^+$ демонстрували значно вищу інтенсивність прекурсор-іона та кращу відтворюваність спектрів фрагментації в умовах тандемної мас-спектрометрії.

Умови проведення мас-спектрометричного детектування.

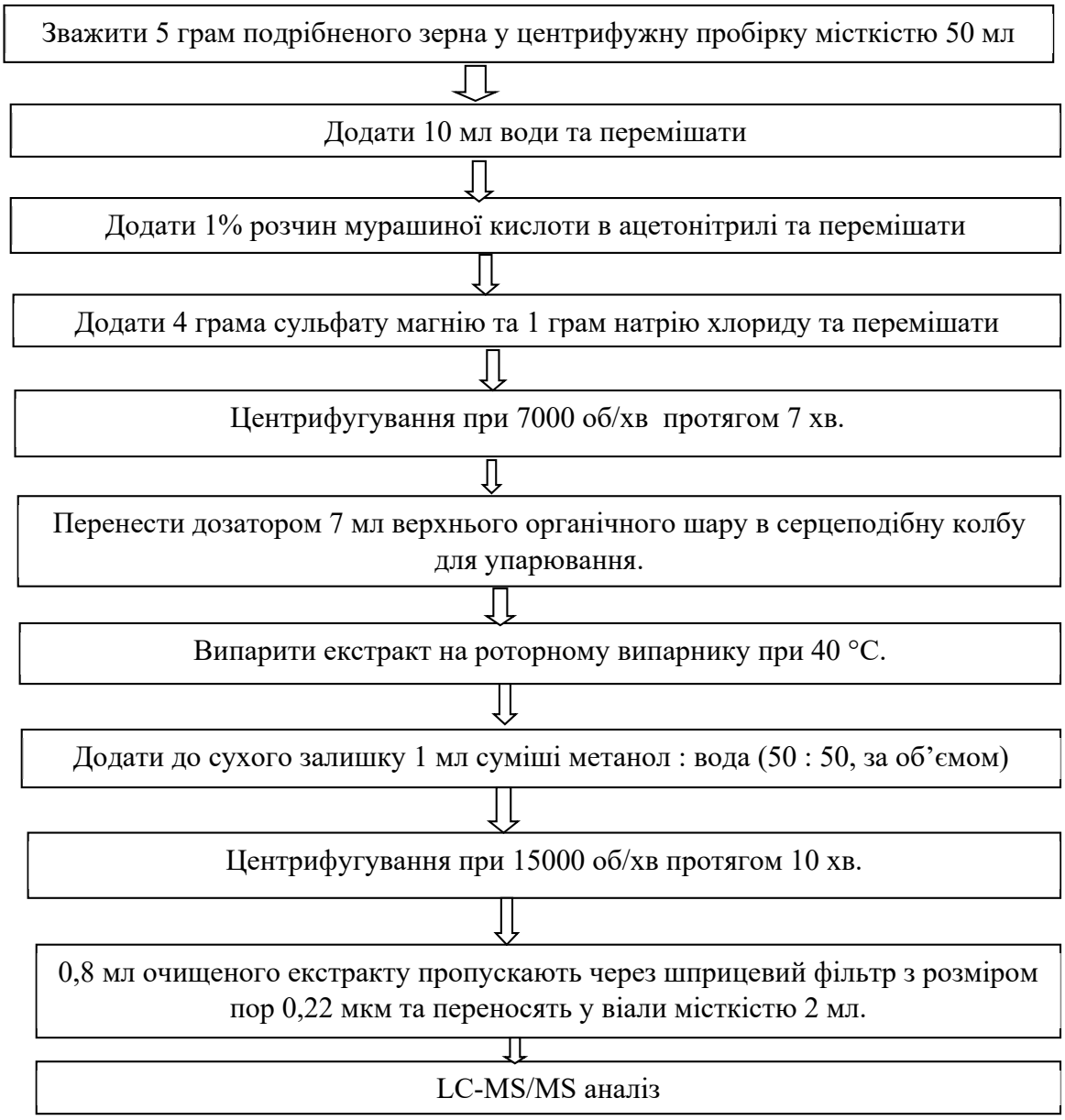
Під час оптимізації параметрів мас-спектрометричного детектування було детально вивчено особливості іонізації цільових аналітів у режимі електроспрею (ESI). Встановлено, що афлатоксини (B1, B2, G1, G2), охратоксин А та дезоксиніваленол (ДОН) демонструють стабільну іонізацію у позитивному режимі (ESI+), утворюючи інтенсивні протоновані молекулярні іони $[M+H]^+$. Для трихотеценів типу А (Т-2 та НТ-2 токсинів) найбільш ефективним виявилося детектування у формі амонійних аддуктів $[M+NH_4]^+$, що забезпечило значне зниження межі виявлення порівняно з іонами $[M+H]^+$. Особливу увагу було приділено зеараленону, який здатний до іонізації як у позитивному (ESI+), так і у негативному (ESI–) режимах. Попри можливість детектування зеараленону в позитивному режимі (ESI+), що дозволяє проводити скринінг усіх дев'яти мікотоксинів в одному циклі, для забезпечення максимальної чутливості було обрано негативний режим іонізації (ESI^-, формування $[M-H]^-$). Перехід до режиму негативної електроспрей-іонізації ($ESI^–$) дозволив знизити межу кількісного визначення (LOQ) зеараленону з 0,020 мг/кг (при ESI^+) до 0,005 мг/кг. Це забезпечує можливість надійного виявлення мікотоксину на слідових рівнях та гарантує відповідність методики найсуворішим міжнародним вимогам безпечності харчової продукції.

У роботі використовували такі аналітичні стандартні зразки: дезоксиніваленол (100 мкг/мл), афлатоксин B1 (25 мкг/мл); афлатоксин B2 (25 мкг/мл); афлатоксин G1 (25 мкг/мл); афлатоксин G2 (25 мкг/мл); Т-2 та НТ-2 токсин (100 мкг/мл) виробництва Trilogy (США). Зеараленон (100 мкг/мл) та Охратоксин-А (10 мкг/мл) виробництва Sigma-Aldrich (Австрія). Для пробопідготовки QuEChERS використовували сульфат магнію безводний (виробництва Sigma-Aldrich, Німеччина), натрію хлорид (виробництва Merck, Німеччина), ацетонітрил HPLC якості (виробництва Sigma-Aldrich, Франція).

Для приготування рухомої фази для високоефективної рідинної хроматографії використовували: воду (отримана після очищення на приладі Millipore, Direct-QTM), метанол HPLC якості (виробництва Honeywell, Франція),

мурашину кислоту 98,0-100% (виробництва Sigma-Aldrich, Німеччина) та ацетат амонію (виробництва Sigma-Aldrich, Нідерланди).

Підготовка зразків зерна за модифікованою методикою QuEChERS



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: Kinetex C18, 100 × 3,00 mm (виробництва Phenomenex).Елюювання мікотоксинів проводили в режимі бінарного градієнту. Рухома фаза: А – вода : мурашина кислота (99,9 : 0,1 за об'ємом) та В – метанол : мурашина кислота (99,9 : 0,1 за об'ємом). Обидві рухомі фази містили 5 мМ ацетату амонію. Об'ємна швидкість рухомої фази на

колонку складала 0.3 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 425 °С, напруга електророзпилення (± 5500 V), газ для MS/MS фрагментації – азот.

Масову частку кожного мікотоксину розраховували за методом зовнішнього стандарту (методом абсолютного градуювання) і виражали у мг/кг.

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

У процесі валідації встановлено, що розроблена методика одночасного визначення дев’яти мікотоксинів (афлатоксинів (B1, B2, G1, G2), охратоксину А, Т-2 токсину, НТ2-токсину, дезоксиніваленолу та зеараленону) у зерні пшениці методом LC-MS/MS з використанням модифікованої пробопідготовки QuEChERS характеризується задовільними метрологічними параметрами та відповідає вимогам Регламенту Комісії ЄС № 401/2006, що підтверджує можливість її використання у рутинному хіміко-аналітичному аналізі якості сільськогосподарської продукції.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Slobodchikova, I., & Vuckovic, D. Liquid chromatography – high resolution mass spectrometry method for monitoring of 17 mycotoxins in human plasma for exposure studies. *Journal of Chromatography A*. 2018, 1548, 51–63. doi:10.1016/j.chroma.2018.03.030

2. Huang, S., Zheng, N., Fan, C. Y., Cheng, M., Wang, S., Jabar, A., Cheng, J. B. Effects of aflatoxin B1 combined with ochratoxin A and/or zearalenone on metabolism, immune function, and antioxidant status in lactating dairy goats. Asian-Australasian *Journal of Animal Sciences*. 2018, 31 (4), 505-513. doi:10.5713/ajas.17.0279

3.Sieger, M., Kos, G., Sulyok, M., Godejohann, M., Krska, R., & Mizaikoff, B. Portable Infrared Laser Spectroscopy for On-site Mycotoxin Analysis. *Scientific Reports*. 2017, 7. doi:10.1038/srep44028

4. da Silva, E. O., Bracarense, A., & Oswald, I. P. Mycotoxins and oxidative stress: where are we? *World Mycotoxin Journal*. 2018, 11(1), 113–133. doi:10.3920/wmj2017.2267

5. Adekoya, I., Obadina, A., Phoku, J., De Boevre, M., De Saeger, S., & Njobeh, P. Fungal and mycotoxin contamination of fermented foods from selected south african markets. *Food Control*. 2018, 90, 295–303. doi:10.1016/j.foodcont.2018.02.040

6. Kovač, M.; Bulaić, M.; Jakovljević, J.; Nevistić, A.; Rot, T.; Kovać, 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

7. Huang, X. J., Wang, S. M., Mao, D., Miao, S., Hu, Q., & Ji, S. Optimized QuEChERS Method Combined with UHPLC-MS/MS for the Simultaneous Determination of 15 Mycotoxins in Liquorice. *Journal of Aoac International*. 2018, 101 (3), 633–642. doi:10.5740/jaoacint.17-0365

8. Soares, R. R. G., Azevedo, A. M., Fernandes, P., Chu, V., Conde, J. P., & Aires-Barros, M. R. A simple method for point-of-need extraction, concentration and rapid multi-mycotoxin immunodetection in feeds using aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*. 2017, 1511, 15–24. doi:10.1016/j.chroma.2017.07.004

9. Sun, W. S., Han, Z., Aerts, J., Nie, D., Jin, M. T., Shi, W., Wu, A. B. A reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of multiple mycotoxins in fresh fish and dried seafoods. Journal of Chromatography A. 2015, 1387, 42–48. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.071

10. Блінова, Г. А. Скринінговий метод визначення мікотоксинів в харчових продуктах / Г. А. Блінова, Є. І. Шеманська // Якість і безпека харчових продуктів: збірник тез VI Міжнародної науково-практичної конференції, 9–10 листопада 2023 р. – Київ : НУХТ, 2023. С. 71–72.

11. Kos J., Hajnal Elizabet J., Jajic I., Krstovic S., Mastilovic J., Saric B., Jovanov P. Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS methods for determination of Aflatoxin M1 in natural contaminated milk samples. *Acta Chim. Slov*. 2016. Vol. 63. P 747–756.

12. Carballo D., Font G., Ferrer E., Berrada H. Evaluation of Mycotoxin Residues on Ready-to-Eat Food by Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry in Tandem. *Toxins*. 2018. V. 10. P. 1-13.

13. Deng, J., Zhao, M., & Jiang, H. (2025). Research Progress in the Detection of Mycotoxins in Cereals and Their Products by Vibrational Spectroscopy. *Foods*, 14(15), 2688. https://doi.org/10.3390/foods14152688

14. Ben Hassouna, K., Hamed, A. M., Salah-Abbès, J. B., Chaieb, K., Abbès, S., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2023). Mycotoxin Occurrence in Milk and Durum Wheat Samples from Tunisia Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Toxins*, 15(11), 633. https://doi.org/10.3390/toxins15110633

15. Kim, D.-H., Hong, S.-Y., Kang, J. W., Cho, S. M., Lee, K. R., An, T. K., Lee, C., & Chung, S. H. (2017). Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins*, 9(3), 106. https://doi.org/10.3390/toxins9030106

16. Geary P.A., Chen G., Kimanya M.E., Shirima C.P., Oplatowska-Stachowiak M., Eliott C.T., Routledge M.N., Gong Y.Y. Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study. *J. Food Control*. 2016. Vol. 68. P. 337–343.

17. Rodríguez-Carrasco, Yelko, Izzo, Luana, Gaspari, Anna, Graziani, Giulia, Mañes, Jordi, Ritieni, Alberto (2018). Simultaneous Determination of AFB1 and AFM1 in milk samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. *Beverages*, vol. 4 (43), pp. 1-9.

18. Muñoz-Solano, B., & González-Peñas, E. (2020). Mycotoxin Determination in Animal Feed: An LC-FLD Method for Simultaneous Quantification of Aflatoxins, Ochratoxins and Zearelanone in This Matrix. Toxins, 12(6), 374. https://doi.org/10.3390/toxins12060374

19. Azaiez, I., Giusti, F., Sagratini, G., Mañes, J., Fernández-Franzón, M. (2014). Multi-mycotoxins analysis in dried fruit by LC/MS/MS and a modified QuEChERS procedure. Food Anal. Methods, vol. 10, pp.1-12.

20. AFLAPREP®. Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC or LC-MS/MS. For in vitro use only. R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2016, 23 p.

21. DONPREP® Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC or LC-MS/MS. For in vitro use only. R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2016, 23 p.

22. ДСТУ EN 12955-2001 Продукти харчові. Визначення афлатоксину-В1 та суми афлатоксинів В1, В2, G1 та G2 у зернових культурах, фруктах із твердою шкіркою та похідних від них продуктах. Метод високоефективної рідинної хроматографії за допомогою постколонкової дериватизації та очищання на імунній колонці (EN 12955:1999, IDT).

23. 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. // Official Journal of the European Union. – 17.08.2002. – L 221. – P. 8.

24. 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

25. Державні санітарні правила і норми «Максимально допустимі рівні окремих забруднювальних речовин у харчових продуктах». Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 13 травня 2013 року № 368 https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0774-13#Text

26. ДСТУ 3768:2019 Пшениця. Технічні умови. 2019.

27. 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.

Науково-методичне видання

Мідик Світлана Вікторівна
Сенін Сергій Андрійович
Корнієнко Валентина Іванівна
Таран Тетяна Володимирівна
Альтанова Альона Борисівна

ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ (МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ)

Підписано до друку 02.10.2026р.
Ум. др. арк.1,5. Формат 60х84/16
Тираж 100 прим. Папір офсетний. Зам. №0210/2026
Свідотство ДК 5941 від 11.01.2018 р.
м. Київ, вул. Героїв Оборони, 8. Тел.: (050)411-66-51, (044)22-99-569
Видавництво
ДРУК НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ
www.science.org.ua