



BIOR

PĀRTIKAS DROŠĪBAS, DZĪVNIEKU VESELĪBAS
UN VIDES ZINĀTNISKAIS INSTITŪTS

INSTITŪTA “BIOR”

ATSKAITE

**Deoksinivalenola (DON) un tā
metabolītu piesārņojuma izpēte
Latvijas lauksaimniecības izcelsmes
pārtikas produktos**

Izpildītājs:

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības
un vides zinātniskais institūts “BIOR”

RĪGA 2021

SATURA RADĪTĀJS

SATURA RADĪTĀJS.....	2
1. Ievads.....	3
2. Literatūras apskats	5
2.1. DON īpašības un izplatība pārtikas produktos.....	5
2.2. DON paraugu sagatavošanas metodes	8
2.3. DON detektēšanas metodes	11
3. Noteikšanas metode	14
3.1. Materiāli un izejvielas.....	14
3.2. Paraugu sagatavošana	14
3.3. AEŠH-MS/MS metodes apstākļi	15
3.4. Metodes raksturlielumi	16
4. Rezultāti un to izvērtējums	18
Secinājumi.....	22
Izmantotā literatūra	23

1. IEVADS

Mikotoksīni ir toksiski sekundārie metabolīti, ko producē dažādi mikroskopisko sēņu valsts pārstāvji. Tie kolonizē kultūraugus un piesārņo tos ar toksīniem gan uz lauka auga attīstības procesā, gan arī jau pēc ražas novākšanas. Tas ir būtisks veselības drauds cilvēkiem un dzīvniekiem, ja tie uzturā lieto produktus, kas ražoti no mikotoksīnu piesārņotām izejvielām, kā, piemēram, daudzveidīgie graudaugu produkti. Mikotoksīni var izraisīt hroniskas un akūtas slimības, kam var būt mutagēns, teratogēns, estrogēns, kancerogēns, nefrotoksisks un imūnsupresīvs raksturs. Latvijas teritorijas klimatiskajos apstākļos vislielāko draudu rada mikotoksīni, ko producē *Fusarium spp.*, kā, piemēram, deoksinivalenols (DON) un tā metabolīti. Šie savienojumi ir biežāk sastopamie mikotoksīnu pārstāvji plašā pārtikas produktu klāstā, kas potenciāli var negatīvi ietekmēt indivīda veselības stāvokli.

Nemot vērā DON izplatību lauksaimniecības produkcijā, Eiropas Savienībā ir paredzēts noteikt stingrākas normas šī mikotoksīna saturam. Iepriekš veiktie Institūta "BIOR" pētījumi norāda uz DON klātbūtni aptuveni 50% no visiem paraugiem ar koncentrācijām, kas dažos paraugos pārsniedz 0,5 mg/kg. Citu autoru pētījumi liecina, ka DON koncentrācija ir atkarīga no labības veida, kā arī no klimata apstākļiem un vairākiem citiem faktoriem. Tādējādi, šī pētījuma ietvaros bija nepieciešams iegūt informāciju par DON izplatību atkarībā no labības veida Latvijā audzētos rudzos, kviešos, miežos, auzās un salīdzināt ar ES plānoto likumdošanas aktu. Bez tam, svarīgi bija noteikt dažādu faktoru (augšnes sastāva, pesticīdu lietošanas, iepriekšējā lauka izmantošanas veida, kā arī klimata) ietekmi uz DON izplatību labībā. Bez tam, būtiski pamatot Latvijas viedokli par Latvijas ražotāju spēju ievērot EK apspriešanai piedāvātās normas. Pētījuma rezultāti ir svarīgi, lai nozares pārstāvji iegūtu aktuālo informāciju par DON satura atbilstību ES normu projektam, kā arī par mikotoksīnu izplatību veicinošajiem faktoriem.

Pētījuma uzdevumi:

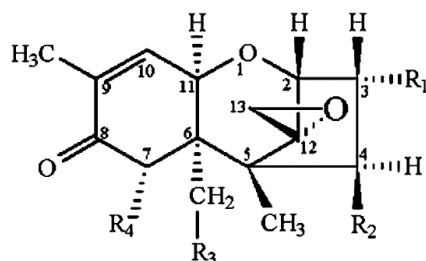
- Noteikt DON izplatību un piesārņojuma līmeņu atšķirības atkarībā no labības veida Latvijā audzētos rudzos, kviešos, miežos, auzās;
- Noteikt dažādu faktoru (augšnes sastāva, pesticīdu lietošanas, iepriekšējā lauka izmantošanas veida u. c.) ietekmi uz DON izplatību labībā;

- Noteikt klimata ietekmi uz DON izplatību labībā (ņemot vērā klimatiskas atšķirības dažādos Latvijas reģionos);
- Pamatot Latvijas viedokli par Latvijas ražotāju spēju ievērot EK apspriešanai piedāvātās normas.

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. DON īpašības un izplatība pārtikas produktos

Mikotoksīnu nosaukums radies no grieķu valodas *mykes*, *mukos* – sēnes un *toxicum* – inde. Tie ir *Aspergillus*, *Fusarium*, un *Penicillium* pelējuma sēnīšu sekundārie metabolīti, kas piesārņo dažādus pārtikas produktus. Mikotoksīnu piesārņojums jebkurā pārtikas vai barības produktā veidojas trijos soļos: (i) auga piesārņošana ar sēnīšu materiālu, (ii) sēnīšu piesārņojuma augšana un (iii) mikotoksīnu veidošanās. Vairāk nekā 400 dažādu mikotoksīnu ir izdalīti un aprakstīti, bet tiek lēsts, ka šis skaits pieaugs uzlabojoties analītiskajiem instrumentiem, kā arī pieaugošā mikroskopisko sēnīšu skaita dēļ. Pārsvārā piesārņojumam ir pakļauti graudaugi, rieksti, kukurūza, kafija, tēja un no tiem ražotie gala produkti, kā arī dzīvnieku barība. Piesārņojums var rasties gan pirms ražas novākšanas, gan pēc, proti, uzglabājot produktus. Pētījumi liecina, ka dažos gadījumos piesārņoti var būt līdz 50 % no produktiem. Var izdalīt 6 galvenās mikotoksīnu klases pēc to ķīmiskās struktūras un nelabvēlīgās ietekmes uz cilvēku un dzīvnieku veselību – aflatoksīni, ohratoksīni, trihotecēni, fumonizīni, zearalenoni un patulīns (PAT). Tos definē mazākās mikotoksīnu klasēs – ergota alkaloidi, citrinīns (CIT), ciklopiazonskābe (CPA), sterigmatocistīns (STC), moniliformīns (MON), gliotoksīns (GLT), citreoviridīns (CVD), penicilskābe (PA), rokfortīns (ROQ), BEA, ENN un citi.

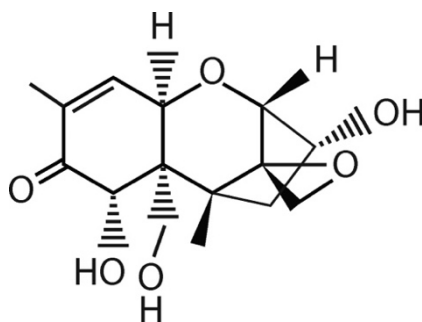


Galveno trihotecēnu molekulārā struktūra. R ir OH vai aciloksigrupa (visbiežāk acetoksi). B klases trihotecēnam DON, R₁ ir OH, R₂ ir H, R₃ ir OH un R₄ ir OH

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), deoksinivalenols (DON), u.c.; fumonizīniem – fumonizīns B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) un B₃ (FB₃); zearalenoniem – pats ZEA un tā α un β izomēri. A grupas trihotecēni ir T-2, HT-2. B grupas

trihotecēni ir DON, NIV, 3-acetildeoksinivalenols (3-ADON), 15-acetildeoksinivalenols (15-ADON), fusarenon-X (FUSX), T-2 tetraols.

DON arī pazīstams kā vomitoksīns un tas pieder pie trihotecēnu B grupas mikotoksīniem, kurš rodas galvenokārt *Fusarium graminearum* pelējuma sēnīšu ietekmē, taču dažos reģionos tas veidojas arī *Fusarium culmorum* pelējuma sēnīšu ietekmē. *F. graminearum* ir izplatītāks sēnīšu veids un parasti ir sastopams siltākās klimatiskajās zonās. DON parasti ir sastopams graudaugos, piemēram, kviešos, miežos, auzās, rudzos un kukurūzā. Nereti tas ir sastopams kopā ar citiem mikotoksīniem, piemēram, zearalenonu, nivalenolu un citiem trihotecēniem.

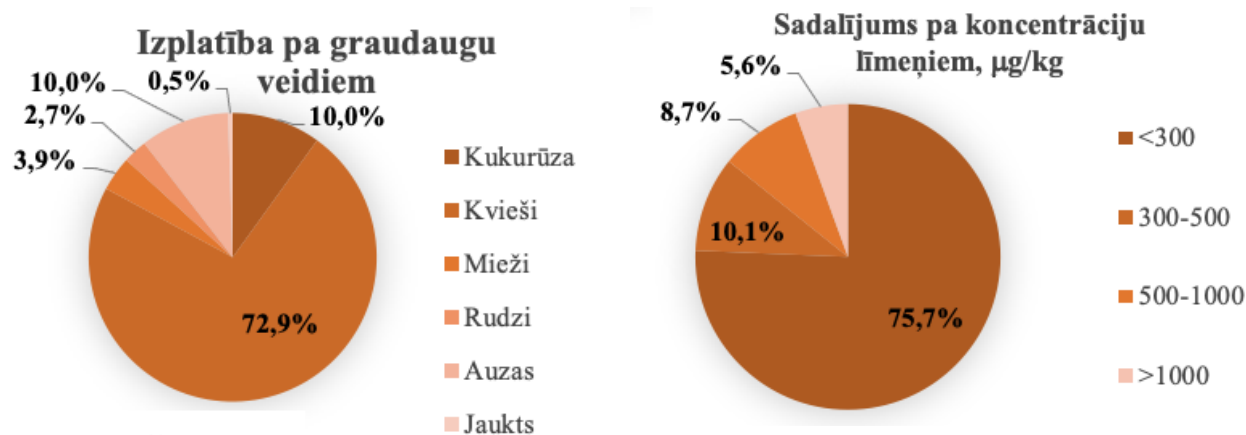


DON ķīmiskā struktūra

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

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). Citas blakusparādības ir caureja, sāpes vēderā, galvassāpes, reibonis un drudzis. Augstākās devās DON uzņemšana izraisa vemšanu, kad tas nonāk saskarē ar serotonīna un dopamīna receptoriem.

No visiem trihotecēniem DON ir visizplatītākais un visbiežāk sastopamais, to var konstatēt visā pasaulē, tādos pārtikas produktos un graudaugos kā kviešos, kukurūzā, miežos, auzās, rudzos un rīsos. DON izplatība Eiropā ir attēlota zemāk.



DON galvenais rašanās avots ir *Fusarium graminearum* un *Fusarium culmorum* sēnītes. Abu sēnīšu ģeogrāfiskā izplatība ir atkarīga no temperatūras, jo *F.graminearum* pārsvarā ir sastopama siltākos klimatiskajos apstākļos, savukārt *F.culmorum* nedaudz vēsākos. Abas šīs sēnīšu sugas kviešos, kukurūzā, auzās un citos graudaugos izraisa slimību, kas izpaužas kā graudu saraušanās, kļūšana baltiem kā krīts. Mikroorganismi izdzīvo uz lauka atstātajos labības pārpalikumos no iepriekšējās ražas sezonas, sniedzot jaunu sēnīšu koloniju veidošanās avotu. Kā jau minēts, dažas sēnīšu sugas labi izdzīvo vēsos un mitros apstākļos, un jaunā auga piesārņošana notiek, kad sēnīšu radītās sporas tiek ar vēju aiznestas uz jaunajiem graudiem to attīstības perioda sākumā. Noteikti klimatiskie apstākļi atļauj DON veidoties vēlāk ražas novākšanas periodā. Papildus tam sēnīšu ietekmē rodas DON, kas vēl vairāk samazina ražu un graudu kvalitāti. Starp *Fusarium* sēnīšu atrašanu graudos un to piesārņojumu ar DON ir novērota tieša sakarība. Lietainā laikā tieši lietus ilgums, nevis tā daudzums ir noteicošais DON rašanās faktors. Kā arī dzīvnieku barība un labība var tikt piesārņota ar citiem mikotoksīniem, kuri rodas *Fusarium* sēnīšu ietekmē. Papildus tam, pat ja graudi jau ir novākti un tie nav piesārņoti ar DON, nepareiza to uzglabāšana var izraisīt sēnīšu kolonijas veidošanos un DON piesārņojumu.

2.2. DON paraugu sagatavošanas metodes

Mūsdienu tendence, analizējot mikotoksīnus, ir izstrādāt multi-mikotoksīnu noteikšanas metodi, kas vienā analizē vienlaikus spēj noteikt pēc iespējas vairāk mikotoksīnu. Taču šādas metodes izstrādei ir vairāki šķēršļi, kas neļauj sasniegt vēlamo rezultātu. Pirmkārt, mikotoksīniem ir ļoti atšķirīgas fizikāli – ķīmiskās īpašības (pH stabilitāte, šķīdība, ķīmiskā uzbūve un molmasa). Otrkārt, mikotoksīniem ir ļoti dažādas maksimāli pieļaujamās normas pārtikā un barībā to dažādās toksicitātes dēļ un to sastopamības ļoti dažādos pārtikas un barības tipos. Un, visbeidzot, matrica, kurā ir jānosaka mikotoksīnu daudzums, ir sarežģīta un ļoti dažāda. Ņemot vērā visas šīs dažādās mikotoksīnu un matricas īpašības, viena no galvenajām problēmām, izstrādājot multi – mikotoksīnu noteikšanas metodi, ir paraugu sagatavošanas solis, precīzāk, ekstrakcija un attīrīšana. Turklāt ekstrakcijai un attīrīšanai būtu jābūt vienam solim, ekstrahējot visus mikotoksīnus vienlaicīgi un attīrot paraugu no matricas. Ekstrakcija un attīrīšana ir svarīgākais solis visā mikotoksīnu noteikšanas metodē, jo no tās ir atkarīga visu mikotoksīnu atgūstamība konkrētajā parauga matricā. Nosakot mikotoksīnus, izmanto dažādas paraugu sagatavošanas metodes, piemēram, šķīdums-cieta viela ekstrakcija, cietfāzes ekstrakcija, superkritiskā šķīduma ekstrakcija, dispersijas cietfāzes matricas ekstrakcija, dispersīvā šķīdums-šķīduma mikroekstrakcija, QuEChERS (no angļu valodas – «*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*»).

Cieta viela – šķīdums ekstrakcija – SLE. Dažādas ekstrakcijas un attīrīšanas metodes tiek pielietotas, lai iegūtu tīru un ar nosakāmo analīti piesātinātu ekstraktu. Metodi izvēlas, ņemot vērā nosakāmā komponenta ķīmiskās un fizikālās īpašības, matricas veidu, atdalīšanas (hromatogrāfisko) un detektēšanas metodi. SLE ir labi pazīstama ekstrakcijas metode, kuru vēl joprojām intensīvi pielieto paraugu sagatavošanā mikotoksīnu noteikšanai. Tās trūkumi ir zināmi, un no tiem var izvairīties, mainot un kontrolējot ekstrakcijas parametrus (šķīdinātāja daudzums, šķīdinātāju attiecība, temperatūra, spiediens). Lai gan tā ir viena no vecākajām ekstrakcijas metodēm, kas izmanto šķīdinātāju, to plaši pielieto, lai sagatavotu lielu skaitu paraugu.

SLE izmanto, lai ekstrahētu mikotoksīnus no dažādām matricām, piemēram, graudiem, labības, pārtikas produktiem un arī citām cietām vielām. Lielākā daļa mikotoksīnu ir šķīstoši polāros/vidēji polāros šķīdinātājos un ir nešķīstoši nepolāros šķīdinātajos. Ņemot vērā šo dažādo mikotoksīnu šķīdību, ekstrakcijai izmanto dažādus šķīdinātājus, pārsvarā organisko šķīdinātāju maisījumu ar

nelielu ūdens un skābes piedevu. Visbiežāk izmantotais šķīdinātāju maisījums SLE ir ACN/H₂O dažādās attiecībās.

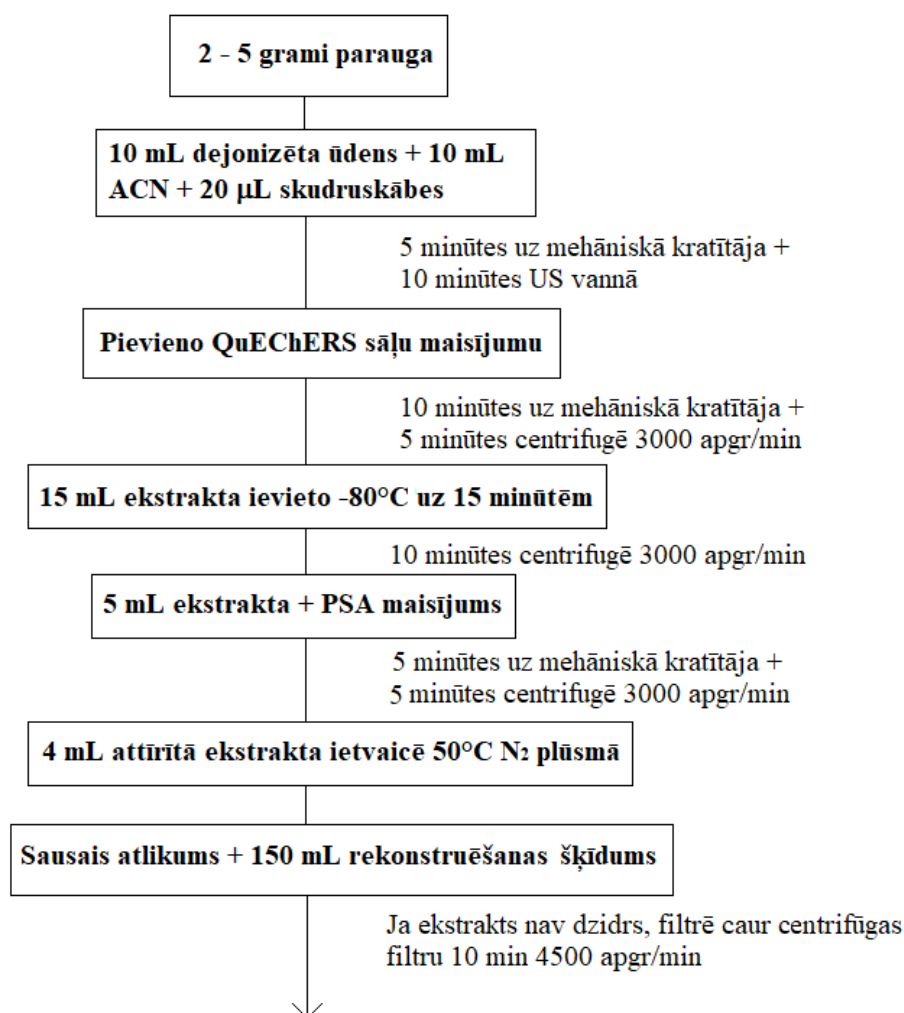
Cietfāzes ekstrakcija – SPE. Cietfāzes ekstrakcijas pamatā ir paraugā esošo nosakāmo un traucējošo komponentu atdalīšana, kustīgajai fāzei mijiedarbojoties ar SPE kolonnā esošo nekustīgo fāzi. Nekustīgā fāze jeb sorbents, kas atrodas kolonnā vai kārtīdžā, sastāv no cietfāzes adsorbenta, parasti silikagēla, un deaktivētas (saistītas) šķidrās fāzes. SPE izmanto dažādas saistītas šķidrās fāzes, piemēram, etil- (C2), oktil- (C8), oktadecil- (C18), cikloheksil- (CH), fenil- (PH), cianopropil-(CN), diol- (2OH), aminopropil- (NH₂), kā arī vairākas jonu apmaiņas fāzes. Oktadecilsilikagēla kolonna jeb C18 ir vispraktiskākā tieši mikotoksīnu noteikšanā, jo tā ir ātrāka, efektīvāka, ar labāku atkārtojamību un drošāka, salīdzinot ar tradicionālo SLE metodi, kā arī šī SPE metode ir ar plašu selektivitātes diapazonu.

Cietfāzes ekstrakciju var izmantot trim dažādiem mērķiem mikotoksīnu noteikšanas procesā: parauga attīrīšana, parauga sakoncentrēšana un matricas aizvākšana. Paraugu attīrīšanas procesā SPE kolonna aiztur nosakāmos mikotoksīnus, savukārt piemaisījumi tiek izskaloti no kolonnas. Veicot paraugu sakoncentrēšanu, caur kolonnu tiek izlaists liels parauga tilpums, no kura atkal tiek aizturēti nosakāmie mikotoksīni, kuri pēc tam tiek sakoncentrēti ar nelielu tilpumu eluenta, kas tos izskalo no kolonnas. Izmantojot SPE kolonnu, lai aizvāktu parauga matricu, SPE kolonna aiztur piemaisījumus un ļauj mikotoksīniem iziet cauri kolonnai. SPE ir iespējams izmantot arī tā saucamajā “online” režīmā, proti, SPE kolonnu vai kārtīdžu ievieto HPLC pirms analītiskās kolonnas. Paraugu injicē SPE kolonnā, kur, vienā virzienā laižot plūsmu, tiek izskaloti piemaisījumi, savukārt pārslēdzot vārstu, plūsmu ieslēdz pretējā virzienā un pa tiešo uz analītiskās kolonnas tiek eluēts attīrīts paraugs. “Online” SPE izmantošana paātrina metodes kopējo laiku, samazinot paraugu sagatavošanas laiku, kas savukārt palielina paraugu skaitu, ko iespējams analizēt. Kolonnas kondicionēšanu, skalošanu un eluēšanu ir iespējams veikt automātiski un dažās iekārtās ļauj vienu paraugu sagatavot, kamēr otrs jau tiek analizēts.

QuEChERS. QuEChERS metode ir plaši pielietota, salīdzinoši lētāka nekā citas paraugu sagatavošanas metodes mikotoksīnu noteikšanai. Metodei ir vairākas priekšrocības, piemēram, vienkāršība, neliels soļu skaits, paraugu attīrīšanas efektivitāte. Visbiežāk izmantotais ekstrahents ir acetonitrils (ACN), jo ar to ir iespējams ekstrahēt plašu mikotoksīnu diapazonu un nelielu daudzumu nevēlamo matricas komponentu. Metode sastāv no diviem soļiem: (i) ekstrakcija, kas balstīta uz analizējamo komponentu izsāļošanu jeb nogulsnešanos augstas sāļu koncentrācijas klātbūtnē, (ii) paraugu

attīrīšana ar dispersīvo SPE. Dispersīvajā SPE par sorbentu parasti izmantojot PSA (primāro un sekundāro amīnu) maisījumu un/vai C18 sorbentu. Izmantojot abus šos paraugu attīrīšanas veidus, ir iespējams atbrīvoties no lielākās daļas nevēlamo piemaisījumu.

PSA labi aizvāc organiskās skābes, ogļhidrātus un polāros matricas savienojumus, savukārt C18 sorbents efektīvi aizvāc lipīdus un citus lipofilus matricas savienojumus. Ja metodē ir iekļauti arī skābie savienojumi, tad parauga pH jābūt gana zēmam, lai šie savienojumi netiktu aizturēti PSA sorbentā. Lai regulētu parauga pH pievieno nelielu daudzumu skudrskābi, vai izmanto jau gatavu ~2% skudrskābes šķīdumu acetonitrilā. Lai izvairītos no parauga pH paaugstināšanās, izmanto nebuferētus QuEChERS sāļus, piemēram, $MgSO_4$ un $NaCl$, savukārt buferētus sāļus, piemēram, acetātus vai citrātus, izmanto, ja paraugā ir pret bāzisku vidi jutīgi savienojumi.



Paraugu sagatavošanas shēma atbilstoši QuEChERS metodei

2.3. DON detektēšanas metodes

Līdz šim brīdim ir reģistrēti un atklāti vairāk nekā 400 dažādi pelējumsēnīšu metabolīti jeb mikotoksīni, tāpēc to noteikšana nav viegls uzdevums. Lai gan tikai dažiem mikotoksīniem ir noteiktas maksimāli pieļaujamās normas, daudzi atrodas tā saucamajā jauno mikotoksīnu sarakstā. Par šo mikotoksīnu veidošanos pārtikā vai barībā ir nepieciešams iegūt maksimāli daudz informācijas, ņemot vērā, ka šie savienojumi rada draudu cilvēku un dzīvnieku veselībai un to riska novērtējums vēl joprojām nav pilnīgs. Šī iemesla dēļ mūsdienās ir izstrādāts plašs mikotoksīnu noteikšanas metožu klāsts, kas pārsvarā balstās uz šķidrums hromatogrāfijas-masspektrometrijas (LC – MS) procedūru un spēj vienlaikus noteikt līdz pat vairākiem simtiem savienojumu. Lai gan tiek izmantotas arī vienkāršākas metodes, piemēram, šķidrums hromatogrāfija par detektoru pielietojot diožu matricas detektoru (DAD). Mūsdienās pieņemtais “zelta” standarts, rutīnas mikotoksīnu analīzei pārtikas drošības kontroles nolūkos, ir šķidrums hromatogrāfija savienojumā ar tandēma masspektrometriju (LC – MS/MS), piemēram, trīskāršais kvadrupols (*triple quadrupole*) tā augstās jutības un specifiskuma dēļ. Taču tādēļ, ka MS/MS sistēma monitorē tikai konkrētas jonu pārejas, nav iespējams veikt datu atkārtotu pārskatīšanu un nav iespējams nezināmu savienojumu skrīnings. Šī ierobežojuma dēļ aizvien vairāk laboratoriju sāk izmantot augstas izšķirtspējas masspektrometrus, piemēram, nolidojuma laika (TOF) un orbitālā jonu slazda (Orbitrap). Galvenā šo sistēmu priekšrocība ir spēja uzticami un precīzi analizēt pat ļoti sarežģītas matricas. Vēl viens parametrs, kas ir svarīgs precīzu rezultātu iegūšanai, ir izšķirtspēja. Lidojuma laika masas analizatori spēj sasniegt masas izšķirtspēju līdz 10000 – 20000 FWHM (no angļu valodas «*Full Width at Half Maximum*») vienības, savukārt pat ar neliela izmēra Orbitrap masas analizatoru ir iespējams sasniegt 100000 FWHM vienību un pat līdz 1 miljonam FWHM vienību. Augstas izšķirtspējas masspektrometru priekšrocības ir kvantitatīva analīze, konkrētu jonu skrīnings, kā arī spēja analizēt un noteikt nezināmus savienojumus. Taču pēdējos gados masspektrometrija ir attīstījusies vēl vairāk, un laboratoriju rīcībā ir nonākušas hibrīda iekārtas, kur vienā sistēmā ir gan tandēma masspektrometrijas daļa (trīskāršais kvadrupols), gan augstas izšķirtspējas masspektrometrs (TOF, Orbitrap) un kolīzijas šūna. Šādu iekārtu pieejamība ir pavērusi jaunas iespējas pesticīdu un mikotoksīnu noteikšanai pārtikā un barībā.

Šķidrums hromatogrāfija ar diožu matricas detektoru – HPLC-DAD. Kā jau minēts iepriekš, lai noteiktu mikotoksīnus, vēl joprojām izmanto šķidrums hromatogrāfiju, par detektoru izmantojot diožu matricas detektoru (DAD/PDA). Kādreiz šī metode bija visplašāk izmantotā, lai noteiktu un

kvantificētu mikotoksīnu saturu paraugos, taču tagad to ir aizstājušas masspektrometriskās metodes. HPLC-DAD metodi izmanto kā skrīninga metodi, proti, no visiem paraugiem atlasa tos, kuros vispār ir detektēti un kvantificēti mikotoksīni. Pēc tam pozitīvos paraugus analizē, izmantojot kādu no masspektrometriskajām metodēm (LC – MS/MS, UHPLC – HRMS). Mikotoksīnu atdalīšanai parasti pielieto C18 apgrieztās fāzes kolonnu, par kustīgo fāzi izmantojot acetonitrila – ūdens maisījumu noteiktā attiecībā, kas parasti ir ap 65:35 (ACN:H₂O).

Masspektrometriskās mikotoksīnu noteikšanas metodes. Kā jau minēts iepriekš, mūsdienās mikotoksīnu analīzes veikšanai plaši pielieto masspektrometriskās metodes. Tās ir visizplatītākās un tiek uzskatītas kā standartmetodes, lai analizētu mikotoksīnus un citas līdzīgas savienojumu grupas, piemēram, pesticīdus. Visu metožu pamatā ir mikotoksīnu detektēšana un atdalīšana pēc to masām jeb, precīzāk, to masas un lādiņa attiecības – m/z .

- HPLC – MS/MS – šķidruma hromatogrāfs savienojumā ar tandēma masspektrometru. Iekārta sastāv no augstefektīva šķidruma hromatogrāfa un trīskāršā kvadrupola masas detektora. Šis detektors sastāv no trim kvadrupola sekcijām, kas novietotas viena aiz otras horizontālā virzienā. Pirmajā un trešajā pēc skaita kvadrupolā notiek masu analizēšana, savukārt otrais kvadrupols darbojas kā sadursmju šūna;
- LC-QqTOF-MS – šķidruma hromatogrāfs savienojumā ar tandēma kvadrupolu un nolidojuma laika masas analizatoru. Iekārta tāpat kā iepriekš sastāv no augstefektīva šķidruma hromatogrāfa un trīskāršā kvadrupola masas detektora. Taču atšķirībā no LC-MS/MS šajā iekārtā tikai viens no kvadrupoliem darbojas kā masas analizators, savukārt pārējie divi darbojas kā sadursmju šūnas. Taču šai iekārtai ir vēl viens masas analizators – nolidojuma laika jeb TOF. Joni tajā tiek sadalīti pēc to nolidotā laika, proti, smagākie joni to pašu distanci veic ilgākā laikā;
- LC-MS/MS (qTrap) - šķidruma hromatogrāfs savienojumā ar tandēma masspektrometru. Iekārta sastāv no augstefektīva šķidruma hromatogrāfa un trīskāršā kvadrupola masas detektora. Taču atšķirībā no parastā trīskāršā kvadrupola, šajā iekārtā trešais kvadrupols var darboties arī kā lineārais jonu slazds jeb LIT (*linear ion trap*). Tas spēj jonus aizturēt un pēc lietotāja vēlmes izlaist ārā tikai noteiktas masas jonus;
- UHPLC-HRMS (Orbitrap) - šķidruma hromatogrāfs savienojumā ar augstas izšķirtspējas masas spektrometru jeb Orbitrap. Šis masas analizators sastāv no diviem elektrodiem – ārējais un iekšējais. Jonu atdalīšanas pamatā ir eliptiskas kustības ap iekšējo elektrodu

elektrostatiskās pievilkšanās ietekmē. Kustoties ap elektrodu, gan eliptiski, gan elektroda garenvirzienā joni rada aksiālās oscilācijas, kuru radītā strāva tiek detektēta uz ārējā elektroda un vēlāk iegūtais signāls tiek pārveidots izmantojot Furjē transformāciju.

Par visizplatītākajām uzskata HPLC-MS/MS un LC-MS/MS (QTRAP) metodes, lai gan plaši izmanto arī nolidojuma laika masspektrometrisko detektoru, kā arī Orbitrap.

3. NOTEIKŠANAS METODE

Institūtā "BIOR" pielietotā metode DON un tā metabolītu noteikšanai ar šķidruma hromatogrāfiju un masspektrometriju

Metode ietver parauga ekstrakciju ar acetonitrilu, paraugu attīrīšanu ar QuEChERS sāļu maisījumu, izsaldēšanu, ietvaicēšanu slāpekļa klātbūtnē, rekonstituēšanu, filtrēšanu un mikotoksīnu noteikšanu ar šķidruma hromatogrāfiju un elektroizsmidzināšanas jonizācijas augstas izšķirtspējas masspektrometriju, izmantojot procedurālo metodi kalibrēšanai.

3.1. Materiāli un izejvielas

Ekstrakcijai izmantots acetonitrils (šķidruma hromatogrāfijai piemērotas tīrības), dejonizēts ūdens (no *Milli-Q* attīrīšanas iekārtas), skudrskābe (reaģenta tīrības, atbilstoši ACS kritērijiem), QuEChERS EN 15562 sāļu maisījums (4,0 g bezūdens magnija sulfāta, 1,0 g nātrija hlorīda, 1,0 g trinātrija citrāta dihidrāta, 0,5 g dinātrija citrāta seskvihidrāta). Ekstraktu rekonstituēšanai izmantots acetonitrils un dejonizēts ūdens, kam pievienota skudrskābe (šķidruma hromatogrāfijai un masspektrometrijai piemērotas tīrības). Ekstraktu filtrēšanai izmantoti PVDF centrifūgas membrānas filtri ar 0,22 µm poru izmēru.

Kalibrēšanai ar standartpiedevu metodi izmantoti mikotoksīnu standartšķīdumi, kas pagatavoti no tīrām vielām (ar vismaz 95% tīrību): deoksinivalenols (DON), nivalenols (NIV), deoksinivalenola-3-glikozīds (D3G), 15-acetildeoksinivalenols (15-ADON), 3-acetildeoksinivalenols (3-ADON), T2 toksīns (T-2) un HT2 toksīns (HT-2), zearalenons (ZEN).

3.2. Paraugu sagatavošana

Visus paraugus homogenizēja un iesvēra 50 mL polipropilēna stobriņā $5,00 \pm 0,05$ g, katrā paraugu sērijā ietverot viena parauga atkārtotus 6 iesvarus kalibrēšanas taisnes konstruēšanai un 3-6 dažādus paralēlos paraugu iesvarus kā kontrolparaugus. Kalibrēšanas taisnes konstruēšanai pievienoja standartpiedevu 6 dažādos līmeņos: 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/kg deoksinivalenola-3-glukozīda kvantificēšanai, bet 10, 50, 100, 250, 500 un 1000 µg/kg pārējo mikotoksīnu kvantificēšanai.

Kontrolparaugiem pievienoja standartpiedevas 1 vai 3 līmeņa kalibrēšanas punktu koncentrācijās. Visiem iesvariem pievienoja 10 mL dejonizēta ūdens, kas paskābināts ar skudrskābi (0,2%) un 10 mL

acetonitrila. Paraugus ievietoja mehāniskajā kratītājā uz 10 min un pēc tam ultraskaņas vannā uz 10 min. Ekstraktiem pievienoja QuEChERS EN 15562 sāļu maisījumu un ievietoja mehāniskajā kratītājā uz 10 min. Pēc tam ekstraktus centrifugēja pie 4500 apgr./min. 8 mL ekstrakta augšējo šķidro slāni pārnesa tīros 15 mL polipropilēna stobriņos un ievietoja saldētavā (-80 °C) uz 30 min. Saldētos ekstraktus ievietoja centrifūgā 15 °C, un centrifugēja 15 min pie 4000 apgr./min. 3 mL augšējā šķidrā slāņa pārnesa 15 mL polipropilēna stobriņos un iztvaicēja zem slāpekļa plūsmas pie 40 °C līdz sausam atlikumam.

Iztvaicētos sausos atlikumus rekonstituēja 100 µL 50% acetonitrila-ūdens šķīdumā ar 0,1% skudrskābes piedevu. Stobriņus ievietoja rotācijas maisītājā uz 5 min un pēc tam pievienoja vēl 250 µL ūdens šķīdumu ar 0,1% skudrskābes piedevu. Stobriņus ievietoja rotācijas maisītājā uz 10 min un nepieciešamības gadījumā filtrēja ar PVDF centrifūgas membrānas filtriem (0,22 µm). 200 µL ekstrakta iepildīja stikla pudelītēs hromatogrāfijai.

3.3. AEŠH-MS/MS metodes apstākļi

Instrumentālo analīzi veica ar šķidrumu hromatogrāfu Thermo Scientific Ultimate 3000, kas ir savienots ar Thermo Scientific TSQ Quantiva MS/MS. Hromatogrāfiskai atdalīšanai izmantoja Luna 3µm C18 kolonnu (150x2.0mm) (Phenomenex) ar kustīgās fāzes sistēmu – ūdens ar 0,1% skudrskābes un 0,5mM amonija acetāta piedevu un metanols ar 0,1% skudrskābes un 0,5mM amonija acetāta piedevu.

ŠH un MS detektora parametri optimizēti metodes izstrādes laikā. Analizējamo savienojumu skenēšanas parametri ir iegūti veicot individuālu mikotoksīnu standartšķīdumu skenēšanu un kolīzijas enerģijas optimizēšanu, iegūtie dati apkopoti tabulā.

Šķidruma hromatogrāfijas metodes parametri mikotoksīnu atdalīšanai

Kolonna:	Luna C18, 3,0 µm, 100 A, 150 x 2,0 mm (Phenomenex)		
Kolonnas telpas temperatūra:	40 °C		
Autosamplera paraugu statīva temperatūra:	15 °C		
Kustīgā fāze A:	Ūdens ar 0,1% skudrskābes un 0,5mM amonija acetāta piedevu		
Kustīgā fāze B:	Metanols ar 0,1% skudrskābes un 0,5mM amonija acetāta piedevu		
Plūsmas ātrums:	0,50 mL/min		
Injekcijas tilpums:	40 µL		
Gradienta programma:			
	<i>Laiks, min</i>	<i>A, %</i>	<i>B, %</i>
	-8,0	95	5
	0,0	95	5
	30,0	1	99
	36,0	1	99

Masspektrometriskā detektora parametri

Jonizācijas veids:	Elektroizsmidzināšanas interfeiss pozitīvajā un negatīvajā jonizācijas režīmā
Skenēšanas tips:	SRM
Sheath Gas (N ₂):	55 arb
Aux Gas (N ₂):	25 arb
Sweep Gas (N ₂):	5 arb
Kapilāra spriegums:	3500 V (H-ESI(+)); 2500 V (H-ESI(-))
Kolizijās gāzes (N ₂) spiediens:	1,5 mTorr
Jonizācijas temperatūra:	300°C
Ietvaicēšanas temperatūra:	350°C

Izolēto prekursora jonu un galveno detektēto fragmenta jonu m/z

Savienojums	Režīms	Prekursora jona m/z	Fragmenta jona m/z	Kolizijas enerģija
Nivalenols (NIV)	+	313	125	16
			175	13
Deoksinivalenols (DON)	+	297	231	12
			249	11
Deoksinivalenola-3-glikozīds (D3G)	-	503	427	15
			457	15
15-Acetildeoksinivalenols (15-ADON)	+	339	137	15
			321	5
3-Acetildeoksinivalenols (3-ADON)	+	339	203	15
			231	13
T-2	+	489	327	23
			387	21
HT-2	+	442	215	10
			263	10
Zearalenons (ZEN)	-	317	273	18
			157	24

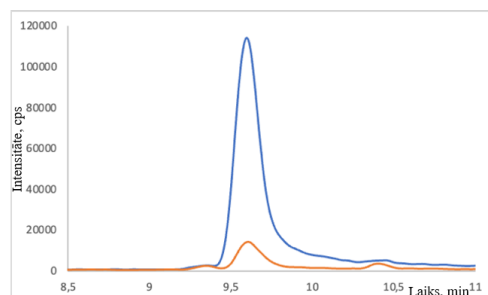
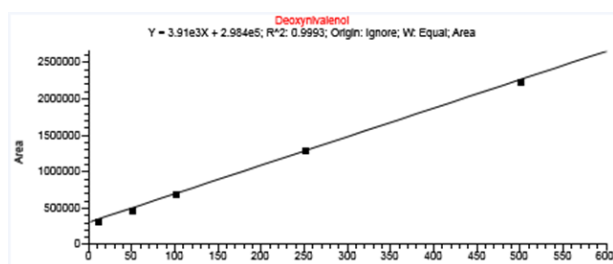
3.4. Metodes raksturlielumi

Detektētajām smailēm veikta fragmentācijas spektra izvērtēšana, salīdzinot fragmentācijas spektrus ar spektriem, kas iegūti tīru standartvielu analīzē.

LOQ (kvantitatīvās noteikšanas robeža) tika definēta, kā koncentrācija paraugā, pie kuras smailes signāla un trokšņa attiecība ≥ 10 , un tā tika novērtēta, veicot atkārtotu tukšo paraugu analīzi ar dažādu koncentrāciju standartpiedevām un tajā izpildās metodes raksturlielumi – atkārtojamība un ticamība.

Metodes linearitāte ($R^2 > 0,95$) tika pārbaudīta, konstruējot kalibrēšanas taisnes no paraugiem, kas sagatavoti atbilstoši standartpiedevu kalibrēšanas metodei. Piemērs redzams attēlā. Kvalitātes

kontrolei paraugu sagatavošanas sērijā iekļāva 1-3 paraugu atkārtojumus, kam pievienota standartpiedeva 1 vai 3 kalibrēšanas līmeņa koncentrācijā. No kvalitātes kontroles paraugiem pēc tam ir aprēķināta metodes raksturlielumi.



DON kalibrēšanas taisne un hromatogramma ar oranžo – paraugs, ar zilo – paraugs ar standartpiedevu 3 līmeņa kalibrēšanas punktā (100 µg/kg).

Savienojums	LOD, µg/kg	LOQ, µg/kg	RSD, %	Linearitātes apgabals, µg/kg	Nenoteiktība, %
Nivalenols	3,5	10	12	10 - 1000	24
Deoksinivalenols	2,9	10	10	10 - 1000	24
Deoksinivalenola-3- glukoziīds	1,2	5	4,2	5 - 200	9
15-Acetildeoksinivalenols	1,7	10	5	10 - 1000	10
3-Acetildeoksinivalenols	1,8	10	7	10 - 1000	15
T-2	1,4	5	6	5- 100	37
HT2	2,3	5	8	5 - 100	18
Zearalenons	3,1	10	5	10 - 200	33

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

4. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Šajā pētījumā tika analizēti 115 Latvijas izcelsmes graudaugi, kas ievākti 2020./2021. gada sezonā. Paraugi ietvēra četras Latvijā audzētu graudaugu sugas: rudzus (n =4), miežus (n =12), auzas (n =28) un kviešus (n =71).

Paraugi ievākti no dažādām vietām Latvijas teritorijā un vienlīdz plaši raksturoja DON un citu *Fusarium* mikotoksīnu izplatību graudaugos, kas ievākti atšķirīgos Latvijas reģionos: Kurzemē (n =27), Zemgalē (n =21), Vidzemē (n =30) un Latgalē (n =37).

Paraugi ietvēra gan vasarājus (auzas, mieži, vasaras kvieši), gan ziemājus (rudzi, ziemas kvieši). Atsevišķiem paraugiem, kas ietvēra kviešus (n =51) bija pieejama informācija par kvalitātes rādītājiem, pēc kuriem kviešus iedala 1. šķiras jeb 1. grupas, 2. grupas, 3. un 4. grupas kviešos, kur 4. grupa ir uzskatāma kā nepiemērota pārtikā un ir pielietojama lopbarībā. Attiecīgi lopbarībā izmantojamiem graudiem ir arī citas prasības: būtiski augstāki pieļaujamie koncentrācijas līmeņi DON un citiem regulējamiem mikotoksīniem atbilstoši Komisijas Ieteikuma 2016/1319 prasībām.

Daļa no graudaugiem (n = 63) tika ievākti, lai novērtētu sezonas apstākļus: ziemāji /vasarāji, audzēšanas apstākļi – no testētajiem paraugiem daļa bija audzēta pēc bioloģiskās lauksaimniecības metodēm (BIO) un neietvēra slāpekļa minerālmēsli, augšanas veicinātāju, pesticīdu vai fungicīdu piedevu lietošanu, bet citi salīdzināmie paraugi no vienādām sugām un šķirnēm ietvēra paraugus, kur lietoti slāpekļa minerālmēsli un pesticīdi (KONV – Konvencionāla audzēšana). Salīdzināts, vai atšķirīgie audzēšanas apstākļi un augšanas reģions būtiski ietekmē DON un citu mikotoksīnu izplatību. Rezultāti mikotoksīnu novērtējumam atkarība no atšķirīgiem parametriem dažādam graudu sugām ir apkopoti 1. pielikumā.

DON izplatība un citu mikotoksīnu klātbūtne. Novērtējot mikotoksīnu izplatību analizētajos 115 graudu paraugos, konstatēts, ka DON un tā metabolīti (15-ADON, 3-ADON, D3G) ir izplatīti graudaugos samērā nelielā koncentrācijā.

Sākotnēji tika novērtēts kopējais mikotoksīnu sadalījums graudaugos un salīdzināts, vai ir novērojamas atšķirības starp DON, DON metabolītu, NIV u.c. testēto *Fusarium* mikotoksīnu izplatību (1.pielikuma 1. att.).

Noteikts, ka DON ir sastopams vairāk nekā 43% (n = 49) no testētajiem graudaugiem.

Salīdzinājumam 1. pielikuma 2. att. parādīta DON izplatība dažādās graudaugu sugās. Noteikts, ka visbiežāk DON sastopams tieši kviešos.

Ņemot vērā pieejamo informāciju par kviešu sastāvu, salīdzināts DON saturs atkarībā no kviešu kvalitātes rādītājiem, kas daļai no paraugiem bija pieejami (1. grupa – 4. grupa, kas atbilst lopbarības kviešiem pēc kvalitātes parametriem) (skat. 2. B attēlu). Var redzēt, ka pārtikas kviešos ir ievērojami zemāki DON un citu mikotoksīnu līmeņi, kas ir loģiski izskaidrojams ar zemākiem pieļaujamiem līmeņiem un korekti veiktu graudu šķirošanu atbilstoši kvalitātes prasībām.

Salīdzinoši DON metabolīti 15-ADON un 3-ADON (katrs 13.70 µg/kg) kopā ar DON un D3G tika konstatēti tikai vienā lopbarības kvalitātes (4. grupa) kviešu paraugā. D3G tika konstatēts tikai 16 kviešu paraugos, kas atbilda lopbarības kviešiem, bet netika identificēts citās graudaugu sugās. Novērtējot savstarpēju korelāciju, varēja ievērot, ka D3G saturs un izplatība šajos kviešu graudos pieaug proporcionāli DON (skat. 1. pielikuma 3. att.), kas liecina par to, ka D3G varētu būt veidojies kā DON metabolīts (Berthiller et al. 2009). D3G koncentrācijas paraugos variēja robežās no 5.11 līdz 67,64 µg/kg.

NIV koncentrācija bija robežās starp 9,65 un 257 µg/kg. Nivalenols (NIV) ir ar ļoti līdzīgu struktūru kā DON, tā vienīgā atšķirība ir, ka trihotecēnu ceturtais oglekļa atoms satur aizvietotu ūdeņraža atomu ar -OH hidroksilgrupu. Taču neskatoties uz šo līdzību, NIV producēšanā ir iesaistīts atšķirīgs *Fusarium graminearum* ģenētiskais hemotips (Lee et al., 2020), tādēļ nav sagaidāma korelācija starp DON un NIV izplatību graudos. To apstiprināja arī šī pētījuma rezultāti, kas parādīja, ka nav sakarības starp DON un NIV klātesamību analizētajos graudos. Tikai 8 no analizētajiem paraugiem bija novērojama gan DON, gan NIV saturs. Taču netika novērota korelācija starp šiem mikotoksīniem.

Citi *Fusarium* mikotoksīni kā T-2 un HT-2 un ZEN, kuriem normatīvajos aktos ir noteikti maksimāli pieļaujamie līmeņi graudos, tika konstatēti attiecīgi 40, 53 un 25% no testētajiem graudaugiem. T-2 un HT-2 toksīniem parasti tiek regulēts summārais saturs, kas bija robežās starp 3.98 un 144 µg/kg un nepārsniedza nevienā no graudaugu šķirnēm noteiktos pieļaujamo koncentrāciju līmeņus (1000 µg/kg auzām un 100-200 µg/kg citām graudaugu sugām), kas pieļautas Eiropas Savienības neapstrādātā labībā atbilstoši 2013. g. 27.marta Komisijas lēmumam par T-2 un HT-2 toksīnu klātbūtni labībā un graudaugu produktos (Eiropas Komisija, 2013).

ZEN koncentrācija analizētajos graudaugos bija robežās no 5.24 līdz 524 µg/kg. Astoņos paraugos ZEN koncentrācija pārsniedza 100 µg/kg robežu, kas noteikta Eiropas Komisijas Regulā 1881/2006, ar ko nosaka konkrētu piesārņotāju maksimāli pieļaujamo koncentrāciju pārtikas produktos.

DON saturu ietekmējošie faktori. Plašāk neapskatīsim citus mikotoksīnus kā tikai DON saturu un to ietekmējošos faktoros.

DON koncentrācijas līmeņi analizētajos graudaugu paraugos variēja robežās no 10.4 līdz 1805 µg/kg.

1. pielikuma 4. attēlā parādīts kopējais DON saturs atšķirīgos graudaugos un raksturoti izvērsti kviešu paraugi atbilstoši to kvalitātes rādītājiem (grupai). Rudzu paraugos netika konstatēts DON, bet tikai vienā no analizētajiem miežu paraugiem tika konstatēts DON (38 µg/kg). Šie dati ir līdzīgi, kā Institūta BIOR iepriekšējo gadu pētījumā, kur 2019.gada sezonas Latvijas audzētāju paraugos arī DON netika konstatēts rudzos un galvenokārt tika identificēts kviešos (Reinholds et al. , 2021).

DON tika konstatēts tikai divos auzu paraugos (līmeņi bija ļoti zemi: 13.9 un 19.1 µg/kg). Pārsvārā augstākās koncentrācijas DON piesārņotajiem paraugiem konstatētas 4. grupas kviešos, kas atbilst lopbarībai (šādos graudos DON pieļaujamie līmeņi ir 8000 µg/kg atbilstoši ES Komisijas Ieteikumam Nr. 2016/1319). Arī paraugs ar augstāko DON saturu atbilda lopbarības kviešiem.

Pētījuma ietvaros daļa no audzētajiem graudiem tika ievākti no triju Latvijas reģionu saimniecībām Kurzemē, Vidzemē un Latgalē, kur bija pieejama informācija par audzēšanas apstākļiem – kā konvencionāla audzēšana (KONV) bija izvēlēta audzēšana, kas paredz slāpekļa minerālmēslu un fungicīdu dozēšanu atbilstoši audzētāju izstrādātajām metodēm.

Faktiskās DON koncentrācijas bioloģiskās audzēšanas apstākļos iegūtajos graudos un konvencionālās audzēšanas apstākļos, novērtējot identiskas graudu šķirnes un parējos apstākļus neliecināja par būtiskām atšķirībām. Tas galvenokārt saistīts ar to, ka analizētajos dažādu graudu šķirņu paraugos bija samērā zemi DON līmeņi. Salīdzinājums parādīts 1. pielikuma 5. attēlā.

Faktiski šie ir paraugi, kas ietvēra auzas un kviešus, kuri atbilda 1. pārtikas kviešu grupai (skat. 4. att.)

Salīdzinot visus graudus, kuros tika konstatēta DON klātbūtne, tika novērtēts, vai reģionam ir ietekme uz DON saturu pārtikas produktos. Lai korektāk raksturotu paraugus. 6. attēlā demonstrēti rezultāti kopējam DON saturam dažādos paraugos, iekļaujot arī 4. kviešu grupu, bet 6.b attēlā ir demonstrēti tikai 1. -3. grupas kvieši un citas šķirnes (divi auzu un viens miežu paraugs), kas saturēja pozitīvus DON līmeņus.

Šie dati parāda tikai būtiski atšķirīgas – paaugstinātas DON koncentrācijas Latgales reģiona paraugos: vidējās DON koncentrācijas Zemgales, Vidzemes un Latgales pārtikas graudos, neiekļaujot lopbarības kviešus, bija sekojošas: 0 (Kurzemē netika konstatēts DON 1.-3. grupas kviešos vai citās sugās), 52,5; 29,5 un 95,8 µg/kg. Atšķirības Latgalē varētu saistīt ar mikroklimatu. To apstiprina

kopējais DON saturs, izvērtējumā iekļaujot arī 4. grupas (lopbarības) kviešus. Salīdzinājumam jāatzīmē, ka augstāks mikotoksīna saturs konstatēts ziemājos, kas varētu būt saistīts arī ar klimata faktoriem (skat. 7. att.)

5. SECINĀJUMI

1. DON izplatības līmeņi Latvijas graudaugos nerada būtiskas bažas par pārāk augstiem koncentrāciju līmeņiem. Tikai vienā graudu paraugā DON koncentrācija pārsniedz 1000 µg/kg, kas tiek piedāvāts kā pieļaujamais DON līmenis graudaugos. Tādējādi, Latvijai nebūtu nepieciešamas atkāpes, lai nodrošinātu Latvijas graudaugu atbilstību jaunajām normām.
2. No literatūras datiem var spriest, ka NIV varētu būt raksturīgs vairāk Āzijas valstu reģioniem, taču šī mikotoksīna izplatība graudos liecina, ka iespējams klimata maiņas varētu nākotnē būt par pamatu arī citu Eiropas klimatam neraksturīgu trihotecēnu satura pieaugumam un to monitoringa nepieciešamībai. To varētu ietekmēt nākotnes prognozes par globālās sasilšanas ietekmi uz vides transformācijām un ietekmi uz pelējumsēņu veidošanos labības kultūrās.
3. Pētījuma rezultāti parāda, ka audzēšanas metode ietekmē mikotoksīnu saturu, taču visumā DON līmeņi nav augsti Latvijas lauksaimniecības kultūrās. Vienlaikus rezultāti apstiprina, ka vides apstākļiem ir noteiktā loma mikotoksīnu izplatībā - Latgalē DON koncentrācijas ir atšķirīgas no citiem LV reģioniem, kas iespējams ir saistīts ar atšķirīgu klimatu, īpaši mitrumu un augsnes īpatnībām.
4. Lai gan pētījumā uzmanība netika vērsta uz T-2 un HT-2 mikotoksīniem un netika atrasta korelācija starp DON un T-2/HT-2 toksīniem, ir būtiski turpmākajos pētījumos pievērst uzmanību arī šiem mikotoksīniem dēļ to augstā toksiskuma, salīdzinot ar DON un DON metabolītiem.

5. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

Berthiller, F., Dall'Asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., ... & Schuhmacher, R. (2009). Occurrence of deoxynivalenol and its 3- β -D-glucoside in wheat and maize. *Food Additives and Contaminants*, 26(4), 507-511.

Lee, S. Y., Woo, S. Y., Tian, F., Song, J., Michlmayr, H., Kim, J. B., & Chun, H. S. (2020). Occurrence of deoxynivalenol, nivalenol, and their glucosides in Korean market foods and estimation of their population exposure through food consumption. *Toxins*, 12(2), 89.

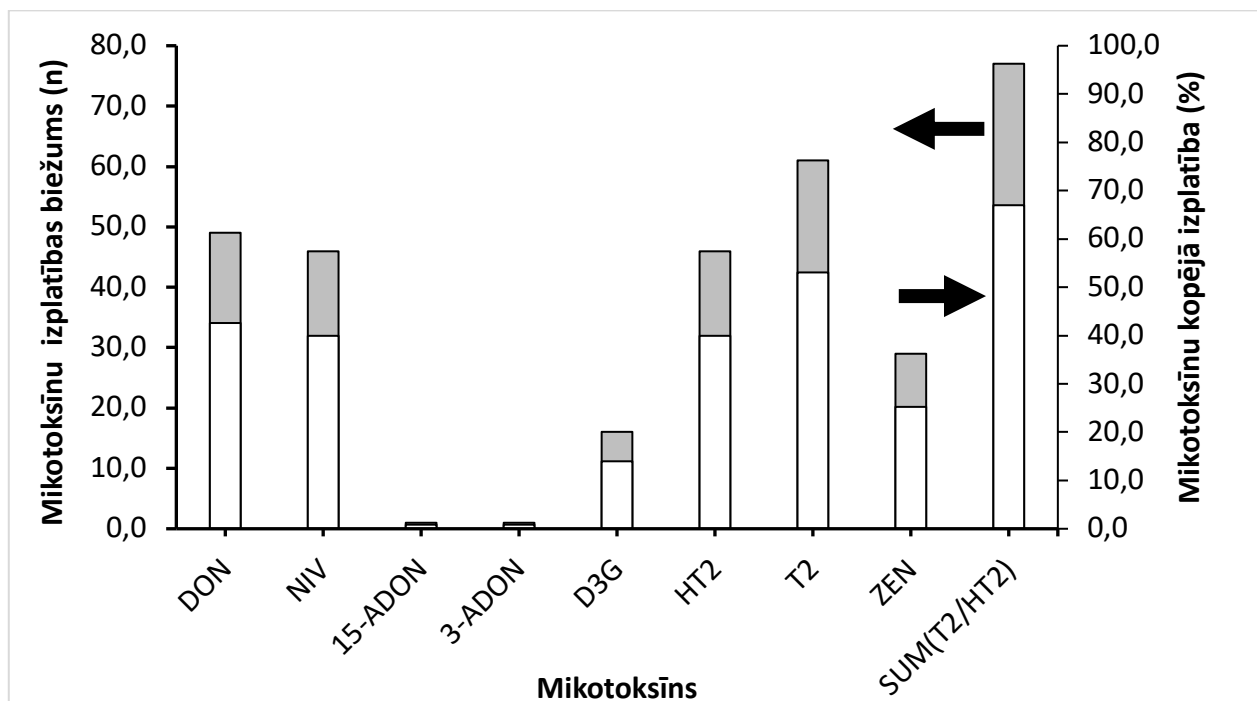
Eiropas Komisija (2013). Komisijas ieteikums (2013. gada 27. marts) par T-2 un HT-2 toksīnu klātbūtni labībā un graudaugu produktos. Eiropas Komisijas Oficiālais vēstnesis 91, 1-15.

Reinholds, I., Jansons, M., Fedorenko, D., Pugajeva, I., Zute, S., Bartkiene, E., & Bartkevics, V. (2021). Mycotoxins in cereals and pulses harvested in Latvia by nanoLC-Orbitrap MS. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 1-9.

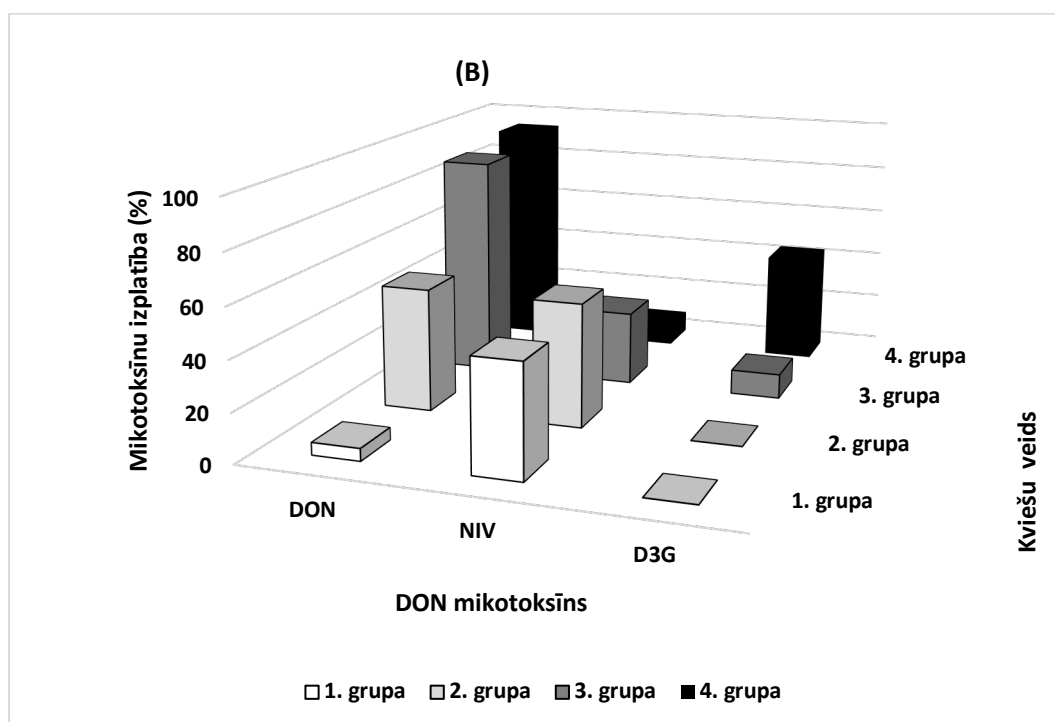
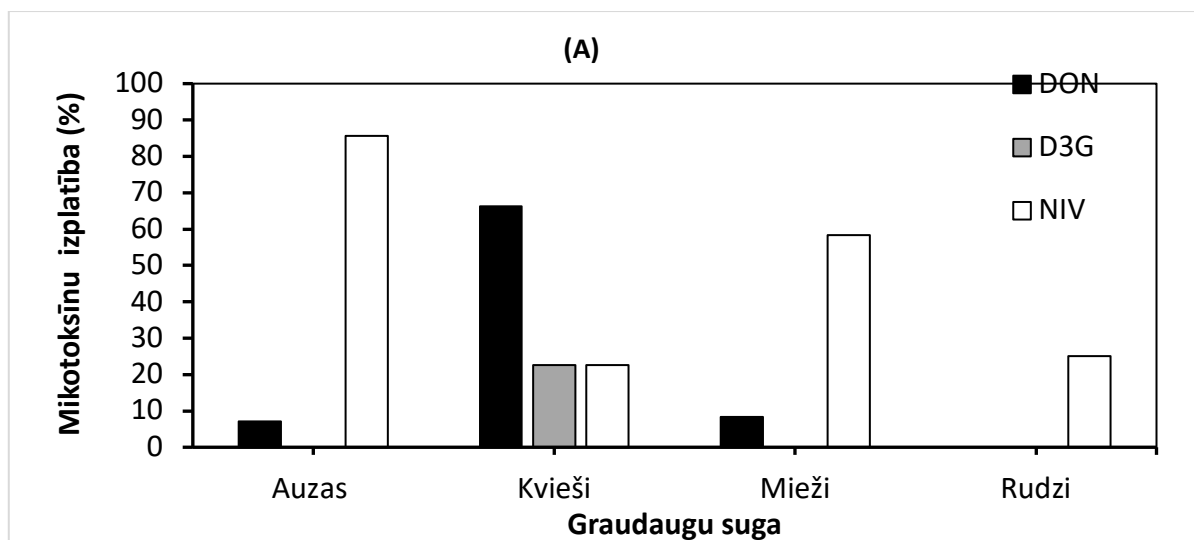
6. PIELIKUMI

1. Pielikums

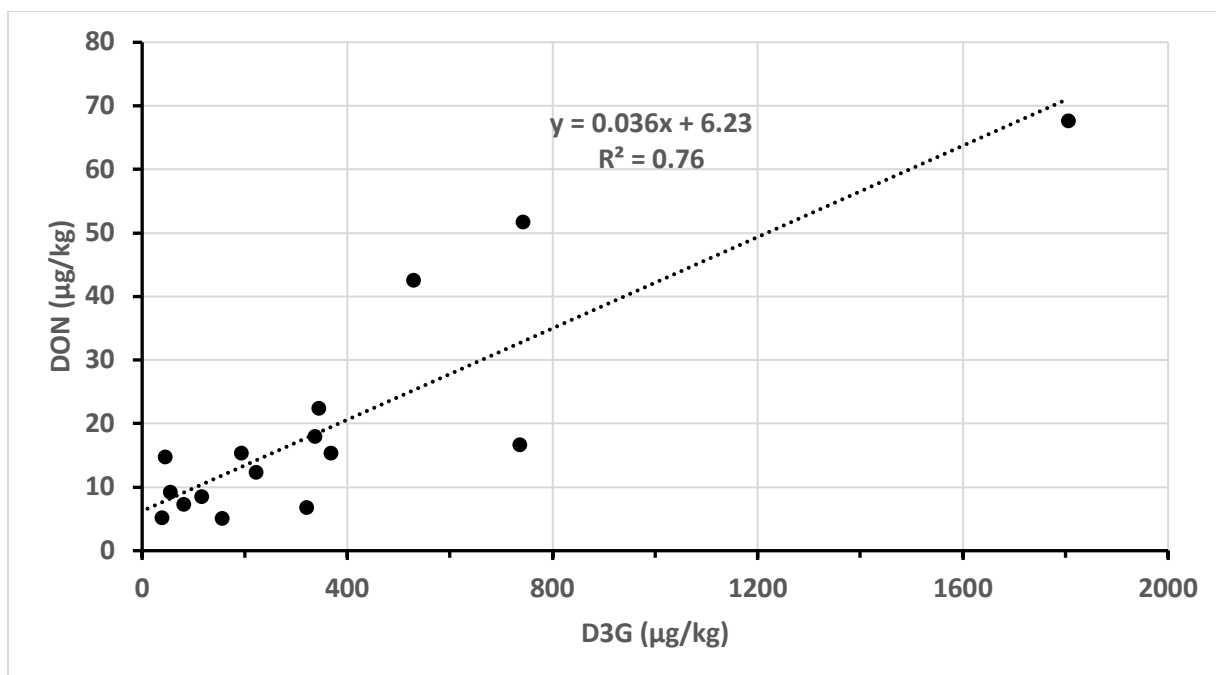
Rezultātu attēli



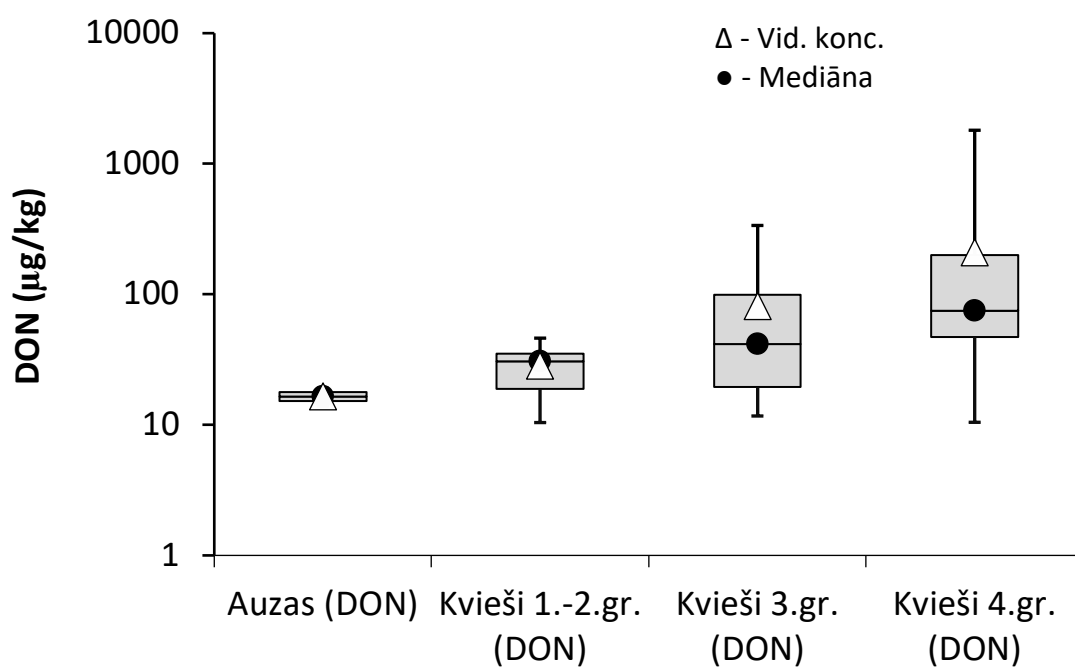
1. attēls. Mikotoksīnu (DON), 15- un 3-acetilēto DON metabolītu: 15-ADON, 3-ADON, deoksinivalenola-3-glikuronīda (D3G), T-2 un HT-2 toksīnu un zearalenona (ZEN) izplatības biežums analizētajos graudaugos



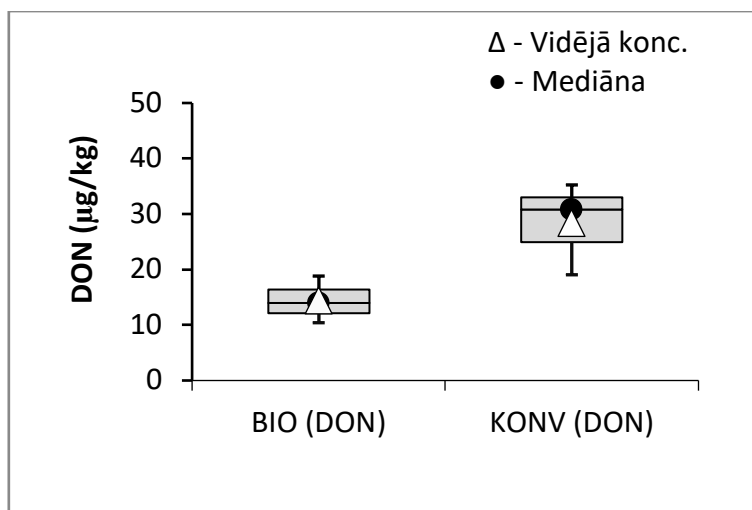
2. attēls. DON, D3G un NIV izplatība graudaugu paraugos atkarībā no graudaugu sugas (A), salīdzinājums par DON izplatību kviešos atkarībā no to grupas (1. -4. grupa) (B)



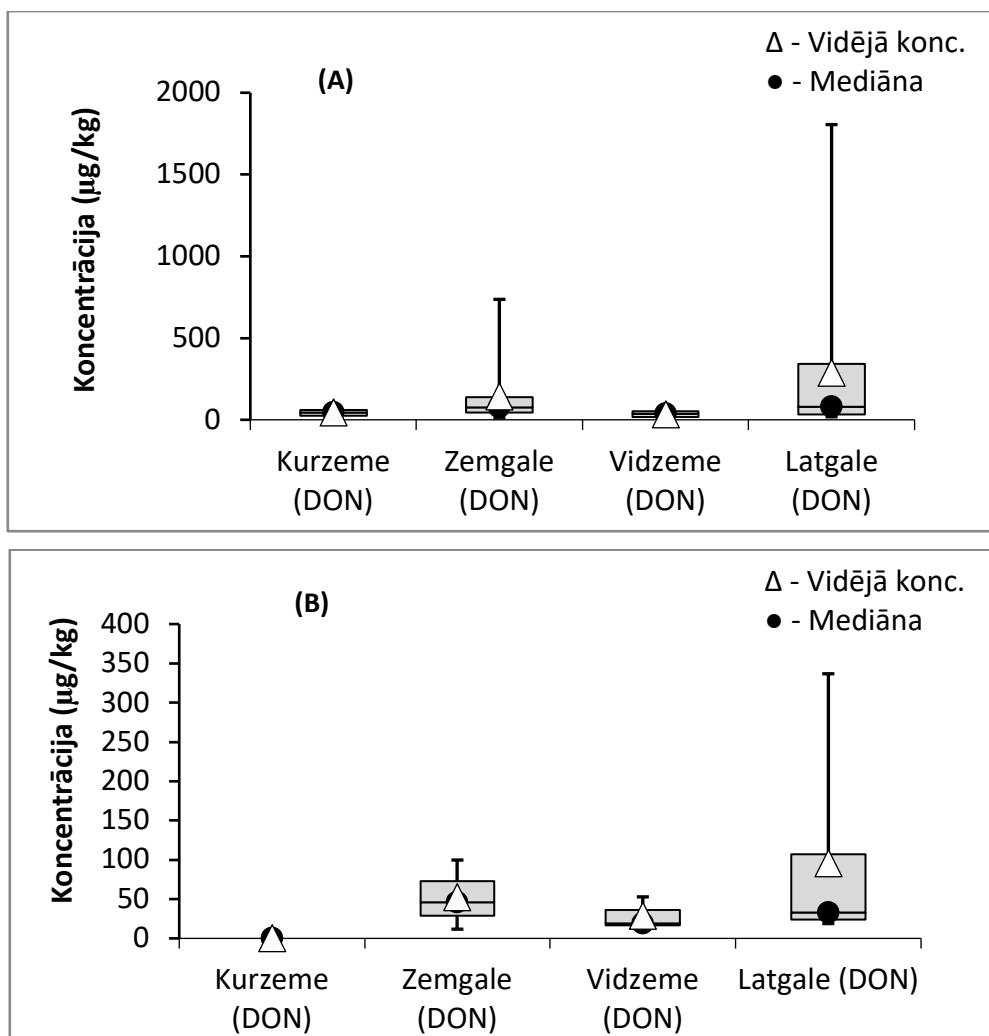
3. attēls. DON un D3G metabolītu korelācija kviešu paraugos



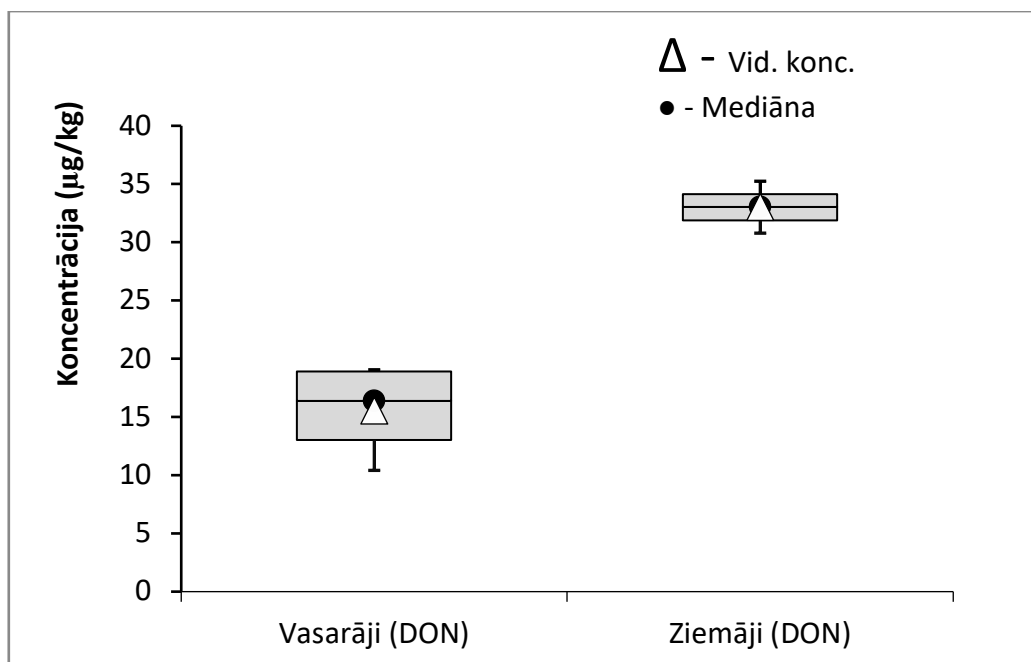
4. attēls. DON koncentrācijas līmeņi analizētajos graudos (auzās un 1. – 4. grupas kviešos)



5. attēls. DON koncentrācijas līmeņi graudos, kas ievākti bioloģiskās audzēšanas laukos (BIO) un konvencionālajos laukos (KONV)



6. attēls DON koncentrācijas graudu paraugos atšķirībā no statistiskā reģiona (Zemgale, Vidzeme, Latgale)- visi paraugi (A), paraugi, neskaitot lopkopības kviešus – (B)



7. att. Atšķirības DON saturā vasarāju un ziemāju paraugos

Analizēto graudu raksturojums un novērtētās mikotoksīnu koncentrācijas

Nr.	Mikotoksīna koncentrācija (µg/kg)								Graudu suga	Lauks	Periods	Reģions
	DON	NIV	15-ADON	3-ADON	D3G	HT-2	T-2	ZEN				
1	< 10	32.60	< 10	< 10	< 5	12.62	5.91	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Kurzeme
2	< 10	31.94	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Kurzeme
3	< 10	44.89	< 10	< 10	< 5	< 5	6.88	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Kurzeme
4	< 10	38.41	< 10	< 10	< 5	18.89	7.22	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Kurzeme
5	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Kurzeme
6	< 10	72.61	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Mieži	BIO	Vasarāji	Kurzeme
7	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	9.15	< 5	< 5	Mieži	BIO	Vasarāji	Kurzeme
8	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	19.16	< 5	< 5	Mieži	BIO	Vasarāji	Kurzeme
9	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Kurzeme
10	< 10	14.44	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Kurzeme
11	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	6.41	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Kurzeme
12	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Kurzeme
13	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Ziemas rudzi	BIO	Ziemāji	Kurzeme
14	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Ziemas rudzi	BIO	Ziemāji	Kurzeme
15	< 10	89.09	< 10	< 10	< 5	8.33	< 5	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Latgale
16	< 10	56.69	< 10	< 10	< 5	39.36	18.07	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Latgale
17	< 10	220	< 10	< 10	< 5	6.23	< 5	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Latgale
18	13.91	257	< 10	< 10	< 5	80.81	28.60	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Latgale
19	< 10	52.94	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	9.18	Auzas	BIO	Vasarāji	Latgale
20	< 10	31.39	< 10	< 10	< 5	15.06	< 5	< 5	Mieži	BIO	Vasarāji	Latgale
21	< 10	101	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Mieži	BIO	Vasarāji	Latgale
22	< 10	23.08	< 10	< 10	< 5	9.34	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Latgale
23	< 10	27.43	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Latgale
24	< 10	39.63	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Latgale

1. tabulas turpinājums

Nr.	Mikotoksīna koncentrācija (µg/kg)								Graudu suga	Lauks	Periods	Reģions
	DON	NIV	15-ADON	3-ADON	D3G	HT-2	T-2	ZEN				
25	18.82	26.49	< 10	< 10	< 5	9.42	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Latgale
26	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Ziemas rudzi	BIO	Ziemāji	Latgale
27	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Ziemas rudzi	BIO	Ziemāji	Latgale
28	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	9.93	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Kurzeme
29	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	3.98	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Kurzeme
30	< 10	13.31	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Kurzeme
31	< 10	108	< 10	< 10	< 5	16.68	8.11	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Kurzeme
32	< 10	10.93	< 10	< 10	< 5	9.66	7.12	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Kurzeme
33	< 10	39.11	< 10	< 10	< 5	14.07	7.07	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Kurzeme
34	< 10	137	< 10	< 10	< 5	21.32	< 5	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Kurzeme
35	< 10	11.80	< 10	< 10	< 5	21.01	15.13	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Kurzeme
36	< 10	127	< 10	< 10	< 5	64.83	78.98	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Kurzeme
37	35.24	109	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Latgale
38	< 10	58.61	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Latgale
39	30.78	42.09	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Latgale
40	19.05	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Latgale
41	< 10	12.23	< 10	< 10	< 5	6.51	< 5	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Latgale
42	< 10	13.97	< 10	< 10	< 5	79.24	23.39	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Latgale
43	< 10	54.76	< 10	< 10	< 5	18.81	< 5	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Latgale
44	< 10	30.95	< 10	< 10	< 5	64.30	14.87	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Latgale
45	< 10	75.17	< 10	< 10	< 5	72.09	18.25	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Latgale
46	< 10	37.18	< 10	< 10	< 5	14.03	< 5	7.52	Mieži	KONV	Vasarāji	Vidzeme
47	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	6.84	Mieži	KONV	Vasarāji	Vidzeme
48	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	10.57	Mieži	KONV	Vasarāji	Vidzeme
49	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Vidzeme
50	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Vidzeme

1. tabulas turpinājums

Nr.	Mikotoksīna koncentrācija (µg/kg)								Graudu suga	Lauks	Periods	Reģions
	DON	NIV	15-ADON	3-ADON	D3G	HT-2	T-2	ZEN				
51	< 10	31.84	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Auzas	KONV	Vasarāji	Vidzeme
52	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Vidzeme
53	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	5.21	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Vidzeme
54	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	KONV	Ziemāji	Vidzeme
55	< 10	87.42	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Vidzeme
56	< 10	62.09	< 10	< 10	< 5	5.62	< 5	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Vidzeme
57	< 10	80.69	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Auzas	BIO	Vasarāji	Vidzeme
58	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	14.29	Mieži	BIO	Vasarāji	Vidzeme
59	< 10	89.53	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Mieži	BIO	Vasarāji	Vidzeme
60	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Mieži	BIO	Vasarāji	Vidzeme
61	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Vidzeme
62	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Vidzeme
63	10.41	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 1. grupa	BIO	Vasarāji	Vidzeme
64	54.99	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	14.60	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Vidzeme
65	12.65	< 10	< 10	< 10	< 5	10.86	< 5	12.47	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
66	367.92	< 10	< 10	< 10	15.32	< 5	23.82	24.93	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
67	321.12	< 10	< 10	< 10	6.75	23.92	12.44	159.93	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
68	736.51	< 10	< 10	< 10	16.64	5.98	13.19	173.02	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
69	46.15	< 10	< 10	< 10	< 5	7.25	29.39	< 5	Kvieši 2.grupa	N/A	N/A	Zemgale
70	17.30	< 10	< 10	< 10	< 5	13.51	15.75	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
71	31.83	14.08	< 10	< 10	< 5	20.03	12.95	< 5	Mieži	N/A	N/A	Zemgale
72	< 10	9.65	< 10	< 10	< 5	8.35	11.43	< 5	Kvieši 3.grupa	N/A	N/A	Vidzeme
73	< 10	44.69	< 10	< 10	< 5	5.54	10.73	< 5	Kvieši 2.grupa	N/A	N/A	Vidzeme
74	156.43	< 10	< 10	< 10	5.11	< 5	13.84	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
75	115.62	< 10	< 10	< 10	8.50	12.91	17.84	10.87	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
76	73.56	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	8.13	7.68	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale

1. tabulas turpinājums

Nr.	Mikotoksīna koncentrācija (µg/kg)								Graudu suga	Lauks	Periods	Reģions
	DON	NIV	15-ADON	3-ADON	D3G	HT-2	T-2	ZEN				
77	18.13	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	5.32	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
78	45.11	< 10	< 10	< 10	14.73	< 5	5.56	28.57	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
79	< 10	12.05	< 10	< 10	< 5	< 5	15.45	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Kurzeme
80	24.25	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	10.69	9.66	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
81	1805.27	< 10	< 10	< 10	67.64	10.63	14.51	161.40	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
82	74.32	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	17.12	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
83	54.19	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	8.90	6.51	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
84	52.71	< 10	< 10	< 10	< 5	7.14	16.81	20.42	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Vidzeme
85	38.32	< 10	< 10	< 10	5.15	< 5	6.96	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Vidzeme
86	< 10	29.76	< 10	< 10	< 5	26.25	7.90	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
87	13.15	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	5.44	< 5	Kvieši 3.grupa	N/A	N/A	Vidzeme
88	11.69	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	6.02	< 5	Kvieši 3.grupa	N/A	N/A	Zemgale
89	81.50	< 10	< 10	< 10	7.26	< 5	14.63	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
90	742.36	< 10	13.70	13.70	51.77	< 5	< 5	524.94	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
91	21.98	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	12.41	< 5	Kvieši 3. grupa	N/A	N/A	Latgale
92	99.70	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	34.68	< 5	Kvieši 3.grupa	N/A	N/A	Zemgale
93	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	< 5	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Kurzeme
94	221.82	< 10	< 10	< 10	12.30	< 5	13.67	102.19	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
95	123.47	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	8.94	35.50	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
96	10.46	< 10	< 10	< 10	< 5	12.35	15.01	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Kurzeme
97	336.75	< 10	< 10	< 10	18.01	< 5	12.55	275.42	Kvieši 3.grupa	N/A	N/A	Latgale
98	54.53	< 10	< 10	< 10	9.21	< 5	15.38	24.74	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
99	74.50	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	10.29	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Kurzeme
100	41.66	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	12.71	5.36	Kvieši 3.grupa	N/A	N/A	Kurzeme
101	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	38.06	12.74	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Kurzeme
102	193.62	< 10	< 10	< 10	15.32	71.74	13.22	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Kurzeme

1. tabulas turpinājums

Nr.	Mikotoksīna koncentrācija (µg/kg)								Graudu suga	Lauks	Periods	Reģions
	DON	NIV	15-ADON	3-ADON	D3G	HT-2	T-2	ZEN				
103	36.49	117.90	< 10	< 10	< 5	10.27	10.22	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Kurzeme
104	96.36	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	11.15	64.78	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
105	51.33	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	20.13	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
106	47.96	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	17.46	22.58	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
107	118.94	< 10	< 10	< 10	< 5	7.85	25.93	24.43	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale
108	52.86	14.94	< 10	< 10	< 5	13.48	7.51	< 5	Kvieši 3 grupa	N/A	N/A	Vidzeme
109	19.47	29.17	< 10	< 10	< 5	< 5	6.89	< 5	Kvieši 3 grupa	N/A	N/A	Vidzeme
110	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	9.95	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
111	344.34	< 10	< 10	< 10	22.38	6.96	12.71	124.82	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
112	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	8.37	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
113	131.36	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	10.60	< 5	Kvieši 3 grupa	N/A	N/A	Latgale
114	528.62	< 10	< 10	< 10	42.53	< 5	6.98	124.17	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Latgale
115	< 10	< 10	< 10	< 10	< 5	< 5	15.22	< 5	Kvieši 4. grupa	N/A	N/A	Zemgale