

LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE
LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE

PĀRTIKAS TEHNOLOĢIJAS FAKULTĀTE
FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY

ĶĪMIJAS KATEDRA
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Mg.cib.hyg.
Aleksandrs Veršilovskis

**JUTĪGU ANALĪTISKO METOŽU IZSTRĀDE
KANCEROGĒNA MIKOTOKSĪNA – STERIGMATOCISTĪNA
NOTEIKŠANAI DAŽĀDĀS PĀRTIKAS SISTĒMĀS**

**DEVELOPMENT OF SENSITIVE ANALYTICAL
METHODS FOR DETERMINATION OF CARCINOGENIC
MYCOTOXIN – STERIGMATOCYSTIN IN FOOD SYSTEMS**

Promocijas darba kopsavilkums
Inženierzinātņu doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Pārtikas zinātnes nozarē, Pārtikas produktu kvalitātes apakšnozarē

Abstract of dissertation for the acquiring a
Doctor degree of engineering in Food Sciences,
In field of Food quality

Jelgava
2009

Promocijas darba zinātniskais vadītājs:
Scientific promoter:

Velga Miķelsone
Doc., Dr.sc.ing.

Oficiālie recenzenti / Official reviewers:

- Prof., Dr.sc.ing. **Daina Kārklīņa** – Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, Pārtikas tehnoloģijas fakultāte, Pārtikas tehnoloģijas katedra, Latvija / Professor of Department of Food Technology, Faculty of Food Technology, Latvia University of Agriculture, Latvia
- Asoc. prof., Dr.chem. **Pēteris Mekšs** – Latvijas Universitāte, Ķīmijas fakultāte, Fizikālās ķīmijas katedra, Latvija / Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, Latvia University, Latvia
- Prof., Dr.habil.chem. **Irīna Gorjačeva** – Saratovas Valsts Universitāte, Ķīmijas fakultāte, Vispārējās un Neorganiskās ķīmijas katedra, Saratova, Krievija / Professor of Department of Common and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, Saratov State University, Saratov, Russia

Darba izstrāde veikta ar ESF grantu atbalstu.

Doctoral thesis has been worked out with financial support of ESF.



Promocijas darba aizstāvēšana notiks LLU Pārtikas zinātnes promocijas padomes atklātajā sēdē 2009. gada 17. jūnijā plkst. 14⁰⁰, Jelgavā, Lielā ielā 2, Pārtikas tehnoloģijas fakultātē, 145. auditorijā.

The defence of the thesis will be held in an open session of the Promotional Council of Food Science of the Latvia University of Agriculture on 17 of June 2009, at 14⁰⁰ p.m. in room 145, Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology, Liela iela 2, Jelgava.

Ar promocijas darbu un kopsavilkumu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā, Lielā iela 2, Jelgava, LV3001 un <http://lluufb.llu.lv/llu-theses.htm>
Atsauksmes sūtīt Promocijas padomes sekretārei LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātes docentei Dr.phys. **L. Markevičai** Liela iela 2, Jelgava, LV3001 vai part@llu.lv

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Liela iela 2, Jelgava, LV3001 and <http://lluufb.llu.lv/llu-theses.htm>
References are welcome to be send to Dr.phys. **L. Markevica**, the Secretary of the Promotional Council of Food Science of the Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology, Liela iela 2, Jelgava, LV3001, Latvia, part@llu.lv

SATURS / CONTENT

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE	4
ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA	6
MATERIĀLI UN METODES	7
PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA	10
1. STC noteikšanas optimizēšana, izmantojot augstefektīvu šķidruma hromatogrāfiju tandēma masspektrometriju	10
2. Cietfāzes ekstrakcijas metodes optimizēšana sterigmatocistīna noteikšanai	13
3. Uzglabāšanas laika, temperatūras un šķīdinātāju ietekme uz sterigmatocistīna stabilitāti	15
4. Paaugstinātas temperatūras un laika ietekme uz STC standartšķīdumu stabilitāti	17
5. Ekstrakcijas šķīdinātāju efektivitātes pārbaude	18
6. Sterigmatocistīna noteikšanas metodes izstrāde graudos	19
7. Sterigmatocistīna stabilitāte maizes cepšanas procesā	23
8. Sterigmatocistīna saturs dažādos Latvijā ražotos maizes paraugos	25
9. Sterigmatocistīna noteikšanas metodes izstrāde alū, izmantojot augstefektīvu šķidrumu hromatogrāfiju ar ultravioleto detektēšanu un tā noteikšana Latvijā ražotos alus paraugos	26
10. Sterigmatocistīna noteikšanas metodes izstrāde sierā	30
KOPSAVILKUMS	34
SECINĀJUMI	37
ITEIKUMI PĒTNIEKIEM UN ANALĪTISKAJĀM LABORATORIJĀM	38
 ACTUALITY OF THE RESEARCH	 39
APPROBATION OF THE RESEARCH WORK	41
MATERIALS AND METHODS	42
RESULTS AND DISCUSSION	44
1. Optimization of the detection of STC using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry	44
2. Development of solid phase extraction method for the analysis of sterigmatocystin	44
3. Effect of storage time, solvents and temperature on the stability of STC standard solutions	45
4. Influence of high temperature and time on the stability of STC standard solutions	46
5. The efficiency of extraction solvents	46
6. Development of sterigmatocystin determination in grains	46
7. Stability of sterigmatocystin during bread baking	48
8. Determination of sterigmatocystin in bread	49
9. Development of analytical method for the determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its applying for the determination of STC in beer produced in Latvia	49
10. Determination of sterigmatocystin in cheese	51
SUMMARY	53
CONCLUSIONS	56
SUGGESTIONS TO RESEARCHERS AND ANALYTICAL LABORATORIES	57

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Mikotoksīni ir pelējumu metabolīti. To klātbūtne pārtikā un dzīvnieku barībā ir kaitīga gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem. Mikotoksīni ir atrodami vairākos pārtikas un dzīvnieku barības produktos un var veidoties ražas augšanas vai izejvielu uzglabāšanas laikā. Ir zināms, ka katru gadu pasaulē ap 25% pārtikas produktu (pārsvārā augu izcelsmes) piesārņojas ar mikotoksīniem, izraisot ekonomiskus zaudējumus.

Pašreiz ir zināmi ap 31000 dažādu pelējumu metabolītu, no tiem apmēram 300-400 ir mikotoksīni. Ir divi mikotoksīnu uzņemšanas veidi: to inhalācija vai uzņemšana ar pārtiku. No zināmajiem mikotoksīniem pārtikas izejvielās un pārtikā biežāk ir sastopami apmēram 20, un tie nereti ir tādos daudzumos, kas nelabvēlīgi ietekmē cilvēku un dzīvnieku veselību, izraisot mikotoksikozes, kā arī veicinot aknu un citu orgānu vēža attīstību, imūnsistēmas bojājumus utt. Vairākumu minēto mikotoksīnu veido *Fusarium* un *Alternaria spp.*, kas lielākoties piesārņo pārtiku pirms ražas novākšanas, un *Aspergillus*, *Penicillium spp.* – tie veido mikotoksīnus pārtikas glabāšanas laikā.

Divdesmitajā gadsimtā ir veikti intensīvi mikotoksīnu satura pētījumi pārtikā un tās izejvielās. Eiropā ir izstrādātas vairākas direktīvas un regulējošie akti dažādu mikotoksīnu (aflatoksīnu, ohratoksīna A, zearalenona, deoksinivalenona, fumonizīna) satura regulēšanai pārtikā un dzīvnieku barībā.

Viens no *Aspergillus* mikotoksīniem ir **sterigmatocistīns** (STC), kas ir aflatoksīna B₁ (AFB) prekursors bioloģiskajos transformācijas procesos.

STC ir akūti toksisks, mutagēns, citotoksisks, kancerogēns un teratogēns. STC var inhibēt DNS un RNS sintēzi, kā arī ietekmēt ogļhidrātu metabolismu (STC dažus enzīmus inhibē, bet vairākus citus – aktivē). STC inhibē arī ATF sintēzi mitohondrijos, tas ir hepatotoksisks, hepatokancerogēns un nieru toksīns. Vienreizēja lielas STC devas uzņemšana var izraisīt aknu mazspēju, bet ilgstoša mazu devu uzņemšana - aknu cirozi un vēzi. STC veicina aknu tauku oksidēšanos, kas var izraisīt aknu nekrozi, un uz eksperimentālo dzīvnieku ādas jau pēc 70 nedēļām rada audzējus. STC mutagēnā aktivitāte ir daudz lielāka, nekā policikliskajiem ogļūdeņražiem. Toksiskā STC iedarbība lielākoties ir tāda pat kā AFB. Vadoties no veiktajiem pētījumiem ar dzīvniekiem, STC uzskata par 10 reizes mazāk akūti toksisku, bet tikpat kancerogēnu kā AFB. STC toksiskā iedarbība uz dzīvniekiem izpaužas kā diareja, nieru un aknu bojājumi. Starptautiskā Vēža Izpētes Organizācija (SVIO) STC klasificē kā 2B grupas kancerogēnu vielu (iespējamais cilvēku kancerogēns).

Atšķirībā no AFB, informācija par STC sastopamību pārtikā ir nepietiekama. Literatūrā aprakstītās analītiskās STC noteikšanas metodes ir novecojušas, nav pietiekami jutīgas un selektīvas.

Promocijas darbā izstrādātas jutīgas analītiskās metodes kancerogēna mikotoksīna – sterigmatocistīna (STC) noteikšanai dažādās pārtikas sistēmās, izmantojot šķidrums hromatogrāfijas un tandēma maspektrometrijas metodes. Darbā ir apskatīti zinātniskās literatūras avoti par STC kancerogenitāti, toksiskumu, iedarbību uz cilvēka veselību, sastopamību pārtikā, kā arī par STC noteikšanu pārtikas produktos, izmantojot dažādas analītiskās metodes. Veikta līdz

šim izmantoto STC noteikšanas metožu analīze un iegūtā informācija izmantota jaunu, jutīgu metožu izstrādei, kas atbilst šodienas prasībām, un ar kuru palīdzību var precīzāk noteikt STC dažādās pārtikas sistēmās. Izstrādātās metodes var ieteikt oficiālai STC kontrolei pārtikā, līdz ar to samazinot cilvēku veselības risku. Veicot šo pētījumu, ir izstrādāta STC cietfāzes ekstrakcijas metode, kas ļauj labāk attīrīt un koncentrēt paraugu tā sagatavošanas stadijā. Uzņemti STC masspektometri un izstrādāta augstefektīvas šķidruma hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas metode STC noteikšanai dažādos graudos, sierā un maizē, kā arī izstrādāta augstefektīvas šķidruma hromatogrāfijas noteikšanas metode STC noteikšanai alū. Metodes tika validētas saskaņā ar Eiropas Komisijas Regulas (EK) Nr. 401/2006, IUPAC un CEN (Eiropas Standartizācijas Komiteja / European Committee of Standardization) rekomendācijām. Izmantojot izstrādātās metodes, pārbaudīts STC saturs Latvijā ražotos 2006. un 2007. gada ražu graudos (kopā 215 paraugi) un daļā paraugu konstatēta STC klātbūtne. Izpētīta STC stabilitāte maizes cepšanas procesā un pierādīts, ka tas saglabājas no dabiski STC saturošiem graudiem izceptā maizē. Tāpēc, lai samazinātu STC nokļūšanas risku maizē, ir nepieciešams kontrolēt tā saturu graudos. Izpētīts un daļā paraugu konstatēts STC Latvijā ražotā dažādu šķirņu maizē, analizēts un daļā paraugu atrasts STC Latvijā ražotā gaišajā un tumšajā alū. Noteikts STC saturs Latvijā un Beļģijā ražotā sierā un daļā paraugu konstatēts STC.

Pētījuma objekts – graudi, maize, alus, siers, sterigmatocistīna stabilitāte standartšķīdumos un maizes cepšanas procesā.

Promocijas darba mērķis – jutīgu analītisko metožu izstrāde sterigmatocistīna noteikšanai pārtikā un šo metožu lietošana sterigmatocistīna satura pētīšanai dažādās pārtikas sistēmās, kā arī sterigmatocistīna stabilitātes pētījumi.

Darba mērķa sasniegšanai tika izvirzīti šādi **uzdevumi**:

- 1) izstrādāt šķidruma hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas metodi sterigmatocistīna (STC) noteikšanai: optimizēt kustīgo fāzi un masspektrometrijas parametrus;
- 2) izstrādāt un optimizēt STC cietfāzes ekstrakcijas metodi;
- 3) noteikt STC stabilitāti dažādos šķīdinātājos atšķirīgā temperatūrā uzglabāšanas laikā;
- 4) izstrādāt metodi STC noteikšanai graudos un noteikt tā saturu dažādos Latvijā ražotos graudos (kviešos, rudzos, miežos, auzās un griķos);
- 5) izpētīt STC stabilitāti maizes cepšanas procesā;
- 6) izpētīt STC saturu Latvijā ražotos maizes paraugos;
- 7) izstrādāt metodi STC noteikšanai alū un veikt STC analīzi Latvijā ražotu alus šķirņu paraugos;
- 8) izstrādāt jutīgāku metodi STC noteikšanai sierā un veikt STC analīzi dažos Latvijā un Beļģijā ražotu sieru paraugos.

Darbs strukturēts 3 nodaļās:

1. nodaļa. Literatūras apskats par STC ķīmiskajām un fizikālajām īpašībām, stabilitāti, toksiskumu, sastopamību pārtikā, analīzes metodēm, pieļaujamo saturu.

2. nodaļa. Pētījumos lietoto aparātu un metožu apraksts.

3. nodaļa. STC noteikšanas metožu izstrāde pārtikas sistēmās. Masspektrometriskās un cietfāzes ekstrakcijas metodes izstrādāšana. STC stabilitātes izpēte (standartšķīdumos un maizes cepšanas procesā) utt. STC satura noteikšana pārtikas sistēmās (graudos, maizē, alū un sierā), izmantojot izstrādātās metodes. Pētījumu rezultāti un diskusija.

Promocijas darba **novitāte un zinātniskais nozīmīgums:**

1. Izstrādātas jaunas jutīgas analītiskās metodes STC noteikšanai dažādos graudos, maizē, alū un sierā. Izstrādāto metožu jutība un selektivitāte ir vairākas (12-80) reizes lielāka, nekā līdzšinējās STC noteikšanas metodēs, tāpēc tās var ieteikt STC oficiālai kontrolei pārtikā un izmantot dažādiem STC satura pētījumiem.
2. Pirmo reizi veikti pētījumi par STC izplatību un saturu dažādos Latvijā audzētos graudos, maizē, alū, kā arī Latvijā un Beļģijā ražotos sieros.

Promocijas darba **tautsaimnieciskā nozīmība:**

Izstrādātās metodes var lietot kvantitatīvai un kvalitatīvai STC kontrolei, kā arī dažādiem pētījumiem pārtikas sistēmās. Tādejādi var daļēji novērst STC saturošās pārtikas nokļūšanu cilvēku un mājdzīvnieku barības ķēdē.

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

Pētījumu rezultāti apkopoti un publicēti astoņos vispārārtzītos recenzējamos zinātniskos izdevumos angļu valodā, no tiem septiņos LZP atzītos izdevumos.

1. **Veršilovskis A.**, Bartkevičs V., Miķelsone V. Analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry with electrospray positive ionization. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1157, 2007, p. 467-471.
2. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Sterigmatocystin stability and presence in Latvian grains. In: *Consumer Protection through Food Process Improvement & Innovation in the Real World: Proceedings of 5th International Congress on Food technology*, 9-11 March, 2007, Thessaloniki, Greece: Hellenic Association of Food Technologists, North Greece Branch, Vol. 1, 2007, p. 411-415.
3. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Elaboration of solid phase extraction method for analysis of sterigmatocystin. In: *Research for rural development 2007: International Scientific Conference Proceedings*, 16-18 May, Jelgava, Latvia. Jelgava: LLU, 2007, pp. 107-111.
4. **Veršilovskis A.**, Bartkevičs V., Miķelsone V.. Sterigmatocystin presence in typical Latvian grains. *Food Chemistry*, Vol. 109, 2008, p. 243-248.
5. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Sterigmatocystin presence in different Latvian bread samples. In: *FoodBalt – 2008: 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology proceedings*, 17-18 April, Jelgava, Latvia. Rīga: Drukātava, 2008, p. 156-160.

6. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Effect of time, temperature and solvent on the stability of sterigmatocystin standard solutions. **In: Research for rural development 2008: Annual 14th International Scientific Conference Proceedings**, Jelgava, Latvia. Jelgava: LLU, 2008, p. 291-295.
7. **Veršilovskis A.**, De Saeger S., Miķelsone V. Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **World Mycotoxin Journal**, Vol. 1, No. 2, 2008, p. 161-166.
8. **Veršilovskis A.**, van Peteghem C., De Saeger S. Determination of sterigmatocystin in cheese by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants: Part A**, Vol. 26, No. 1, 2009, p. 127-133.

Par rezultātiem ziņots piecās starptautiskās zinātniskajās un zinātniski praktiskajās konferencēs Latvijā (LLU), Grieķijā un Spānijā.

1. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Sterigmatocystin stability and presence in Latvian grains. **5th International Congress on Food Technology**. Thessaloniki, Greece, 9-11 March, 2007 (*stenda referāts*)
2. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Elaboration of solid phase extraction method for analysis of sterigmatocystin. **International Scientific Conference: Research for rural development 2007**. Latvia university of Agriculture, Jelgava, Latvia, 16-18 May, 2007 (*referāts*)
3. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Sterigmatocystin presence in different Latvian bread samples. **3rd Baltic Conference on Food Science and Technology proceedings: FoodBalt – 2008**. Latvia university of Agriculture, Jelgava, Latvia, 17-18 April, 2008 (*stenda referāts*)
4. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Effect of time, temperature and solvent on the stability of sterigmatocystin calibrants. **International Scientific Conference: Research for rural development 2008**. Latvia university of Agriculture, Jelgava, Latvia, 21-23 May, 2008 (*referāts*)
5. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Stability of sterigmatocystin during bread baking. **13th ICC (International Association for Cereal Science and Technology) Cereal and Bread congress**. Madrid, Spain, 15-18 June, 2008 (*stenda referāts*)

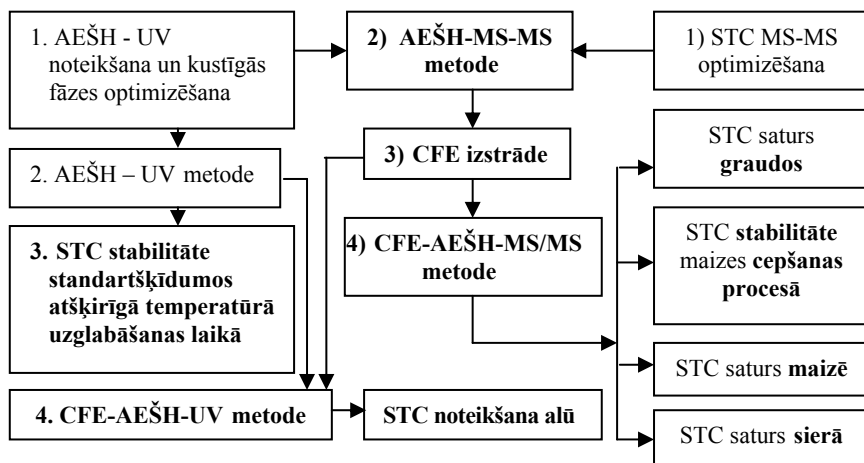
MATERIĀLI UN METODES

Pētījumi veikti laikā no 2006. līdz 2009. gadam:

- **Latvijas Lauksaimniecības universitātes** Pārtikas tehnoloģijas fakultātes Ķīmijas katedrā;
- **Latvijas Lauksaimniecības universitātes** Pārtikas tehnoloģijas fakultātes Pārtikas tehnoloģijas katedrā;
- **Latvijas Republikas Pārtikas un veterinārā dienesta** Nacionālā diagnostikas centra Pārtikas un vides izmeklējumu laboratorijas Instrumentālo analīžu daļā;

- *Gentes universitātes* Farmācijas zinātņu fakultātes Bioanalīžu katedras Pārtikas analīžu laboratorijā;
- Kā arī sadarbībā ar *Zemkopības ministrijas Latvijas augu aizsardzības pētniecības centru*.

Promocijas darba pētījumi veikti saskaņā ar iepriekš izstrādātu shēmu, kas vienkāršotā veidā parādīta **1. attēlā**.



1. att. Pētījumu veikšanas shēma

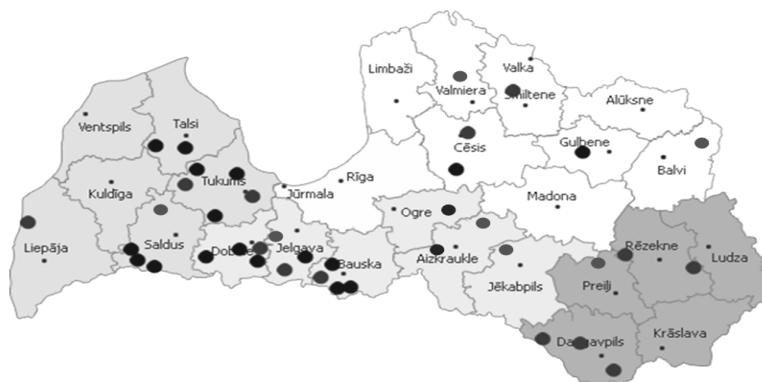
Fig. 1. Research scheme

Vispirms optimizēja kustīgo fāzi, līdz ar to ir iespējams izvēlēties optimālo STC izdalīšanas laiku. Pēc tam optimizēja STC jonizācijas un fragmentācijas parametrus. Tālāk izstrādāja cietfāzes ekstrakcijas metodes, pārbaudīja jaunas CFE kolonnas, kā arī STC stabilitāti dažādos šķīdinātājos, dažādā temperatūrā atkarībā no laika. Iegūto informāciju izmantoja AEŠH un AEŠH-MS-MS metožu izstrādei dažādās pārtikas sistēmās – graudos, maizē, alū un sierā. Izstrādātās STC noteikšanas metodes pielietoja STC satura analīzei maizē, graudos, alū un sierā.

Pētījumiem izmantotie graudu, maizes, alus un siera paraugi

Graudu paraugi. 50 kviešu, 15 auzu, 10 rudzu, 10 miežu un 10 griķu graudu paraugi savākti 2006. gada rudenī, un 20 kviešu, 25 auzu, 25 rudzu, 25 miežu un 25 griķu graudu paraugi savākti 2007. gada rudenī dažādos Latvijas novados. Paraugu ņemšanas vietas: Aizkraukles, Bauskas, Balvu, Cēsu, Daugavpils, Dobeles, Gulbenes, Jelgavas, Jēkabpils, Liepājas, Ogres, Preiļu, Rēzeknes, Saldus, Smiltenes, Talsu, Tukuma, Valkas un Valmieras rajoni (**2. attēls**).

Paraugi vākti ar Latvijas Augu Aizsardzības Pētniecības Centra palīdzību, to ņemšanas procedūra notika saskaņā ar Eiropas Komisijas regulu (EC) No 401/2006.



2. att. Graudu paraugu ņemšanas vietas

Fig. 2. Grain sampling places

Maizes paraugi. Analizēti 29 dažādās Latvijas maiznīcās ražoti vairāku maizes šķirņu paraugi, kas iegādāti dažādos Latvijas veikalos 2007. gada decembrī.

Alus paraugi. Pētījumā izmantoti 26 dažādu Latvijas alus darītavu alus šķirņu (9 tumšā un 17 gaišā alus) paraugi. Gaišā *Plostnieku alus* un tumšā *Mārtiņa tumšais alus* (iepriekš analizēts STC saturs un konstatēts, ka tie nesatur STC) paraugi tika izmantoti nepiesārņota alus matricas metodes izstrādei. Visus paraugus glabāja ledusskapī +5 °C temperatūrā līdz analīžu veikšanai.

Siera paraugi. Astoņi Latvijā un 13 Beļģijā ražotu sieru paraugi tika iegādāti dažādos Latvijas un Beļģijas veikalos (2008. gada janvārī Latvijas veikalos: Rimi, Maxima, Iki un Super Netto; un 2008. gada februārī Beļģijas veikalos: Delhaize, Aldi, Match). Sieru paraugi tika sasmalcināti, homogenizēti un uzglabāti saldētavā –20 °C temperatūrā.

Pētījumos izmantotās metodes

1. STC ekstrakcijai no bioloģiskajām matricām (graudi, maize, siers) izmantoja organisko šķīdinātāju maisījumus (acetonitrils: ūdens, 84:16 un 90:10, v/v).
2. Ekstraktu attīrīšanai lietoja cietfāzes ekstrakciju (izmantoja Strata X un Strata C₁₈ cietfāzes ekstrakcijas kolonnas).
3. Eluēto ekstraktu koncentrēšanai izmantoja ietvaicēšanu slāpekļa plūsmā.
4. STC noteikšanai lietoja augstefektīvu šķidrumu hromatogrāfiju ar ultravioletās gaismas fotodiožu skenēšanas detektoru (*Waters Alliance 2695* – šķidrumu hromatogrāfs ar *PAD 2898* detektoru) un augstefektīvu šķidrumu hromatogrāfiju – tandēma masspektrometriju (*Waters Alliance 2695* šķidruma hromatogrāfs ar *Micromass Quattro LC* trīskāršo kvadrupolu).
5. Metodes validēja saskaņā ar Eiropas Komisijas Regulas (EK) Nr. 401/2006, IUPAC un CEN rekomendācijām. Validācijas laikā noteica šādus parametrus: selektivitāti, atgūstamību, atkārtojamību, reproducējamību, zemāko noteikšanas robežu (ZNR), zemāko rēķināšanas robežu (ZRR) un metodes linearitāti.

Datu matemātiskā apstrāde

Iegūto rezultātu salīdzināšanai izmantoja *Microsoft Office Excel 2003* integrētās statistiskās funkcijas: ("t-tests divu saistītu paraugu vidējo lielumu

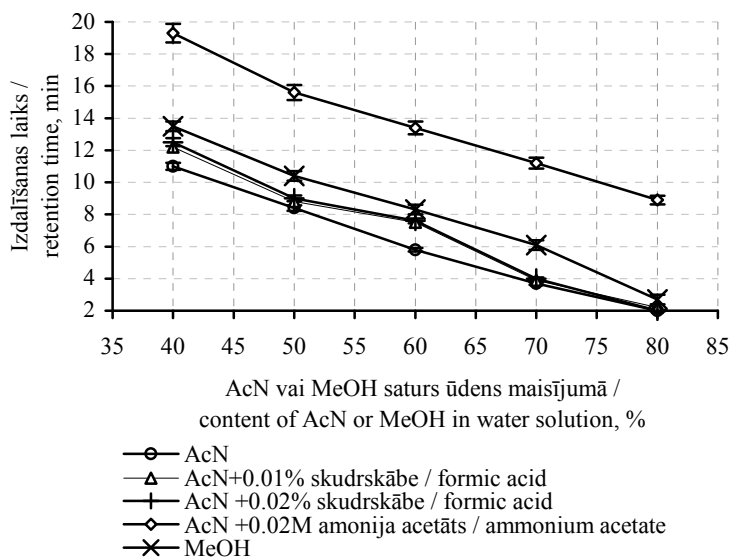
salīdzināšanai” un “t-tests divu paraugu ar ekvivalentām dispersijām salīdzināšanai”, „ANOVA” – vienfaktora dispersijas analīzi), datu standartnovirzes aprēķināja, izmantojot integrēto „STDEV” funkciju, lineāro un nelineāro regresiju (analīta koncentrācijas atkarībai no signāla), kā arī dažādas matemātiskās funkcijas (piem., vidējā aritmētiskā aprēķināšana, izmantojot funkciju – „AVERAGE”). Eksperimenti veikti 6–8 neatkarīgos atkārtojumos.

PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA

1. STC noteikšanas optimizēšana, izmantojot augstefektīvu šķidruma hromatogrāfiju tandēma masspektrometriju

Eksperimenti STC noteikšanas optimizēšanai, izmantojot augstefektīvu šķidruma hromatogrāfiju tandēma masspektrometriju, tika veikti divos posmos.

Pirmajā posmā veikti eksperimenti par kustīgās fāzes sastāva ietekmi uz STC izdalīšanas (aiztures) laiku no Phenomenex Luna (2) C₁₈ AEŠH kolonnas (**3. attēls**).

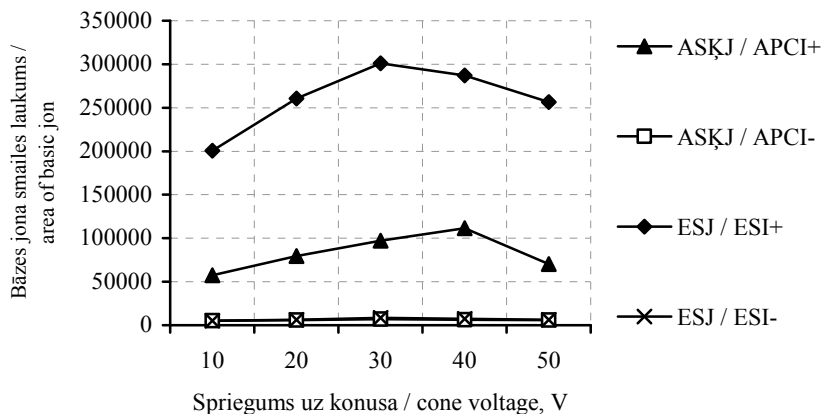


3. att. Kustīgās fāzes ietekme uz STC aiztures laiku Phenomenex Luna(2) C₁₈ AEŠH kolonnā

Fig. 3. Influence of mobile phase content on the STC retention time on Phenomenex Luna(2) C₁₈ HPLC column

Iegūtie rezultāti rāda, ka STC ilgāk aizturas uz kolonnas, ja kā kustīgo fāzi lieto acetoniitrila-0.02M amonija acetāta šķīdumu. Metanola-ūdens un acetoniitrila-0.01-0.02% skudrskābes šķīdumiem ir vidējs eluēšanas laiks, un visātrāk STC eluējas no kolonnas ar acetoniitrila-ūdens šķīdumiem. Iegūto informāciju var izmantot STC izdalīšanas (aiztures) laika regulēšanai, lai mainītu (paātrinātu vai kavētu) analīzes laiku.

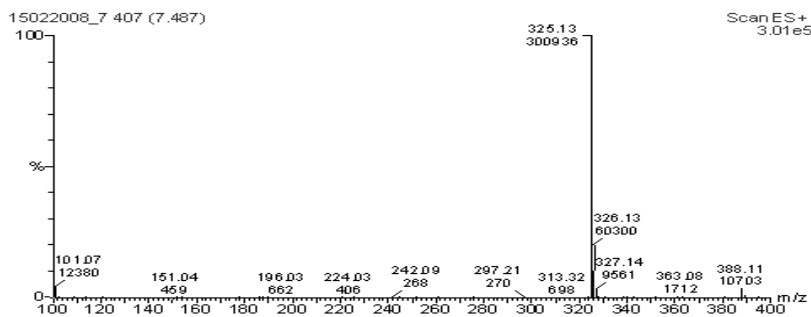
Otrais augstefektīvas šķidrumu hromatogrāfijas tandēma masspektrometrijas metodes izstrādes etaps ir stabilu molekulāro jonu iegūšana STC identifikācijai un kvantitatīvai noteikšanai. Eksperimenti tika veikti, izmantojot STC standartšķīdumu, kas tika ievadīts ar ASĶJ un EIJ aprīkotā tandēma masspektrometrā. To veica pozitīvajos un negatīvajos režīmos, lietojot dažādu konusa spriegumu (**4. attēls**) un dažādu fragmentācijas enerģiju.



4. attēls. STC bāzes smailes laukuma atkarība no sprieguma potenciāla

Fig. 4. Dependence of STC base peak intensity from cone voltage

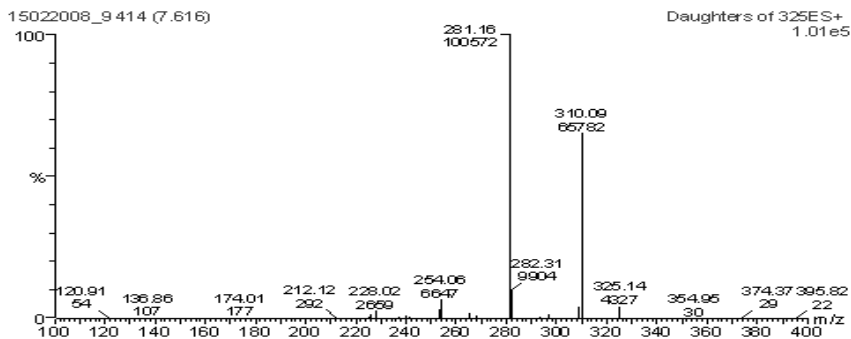
Rezultāti rāda, ka optimālākais režīms STC detektēšanai ir AEŠH-EIJ⁺-MS-MS ar konusa spriegumu 30 V un fragmentācijas enerģiju 30 eV, kuru rezultātā tika iegūts protonētais molekulārais jons ar molmasu 325 g mol⁻¹ (**5. attēls**).



5. att. MS skenēšanas hromatogramma pozitīvā EIJ (konusa spriegums 30 V)

Fig. 5. MS scan chromatogram of STC in ESI positive mode using cone voltage of 30 V

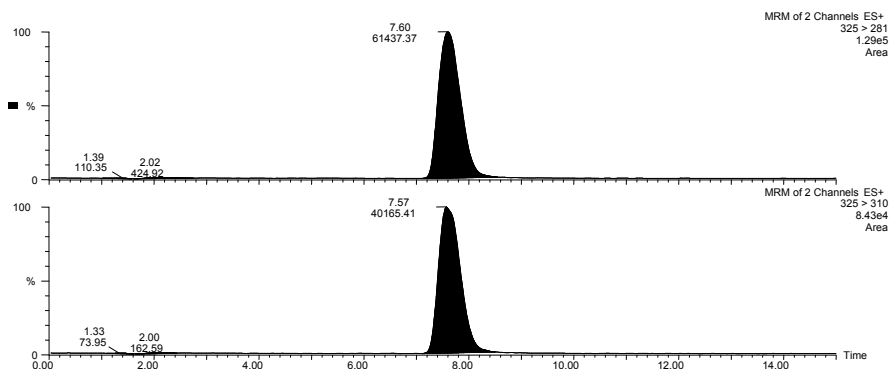
Šis jons tālāk tika fragmentēts līdz tā šķembu joniem ar molmasām 281 g mol⁻¹ un 310 g mol⁻¹ (**6. attēls**).



6. att. 325 molekulārā jona veidoto šķembu jonu skenēšanas hromatogramma 30 eV fragmentācijas enerģijā

Fig. 6. The scan chromatogram of daughter's ions of 325 ion using collision energy of 30 eV

Jonu ar molmasu 281 g mol⁻¹ izmantoja STC koncentrācijas rēķināšanai, bet jonu ar molmasu 310 g mol⁻¹ – STC kvalitatīvai noteikšanai. Hromatogramma, kas iegūta ievadot standartšķīdumu AEŠH-MS-MS sistēmā ESJ pozitīvajā režīmā, redzama 7. attēlā.



7. att. STC standartšķīduma (0.2 μg ml⁻¹) SRM (MRM) hromatogramma

Fig. 7. SRM (MRM) chromatogram of STC standard solution (0.2 μg ml⁻¹)

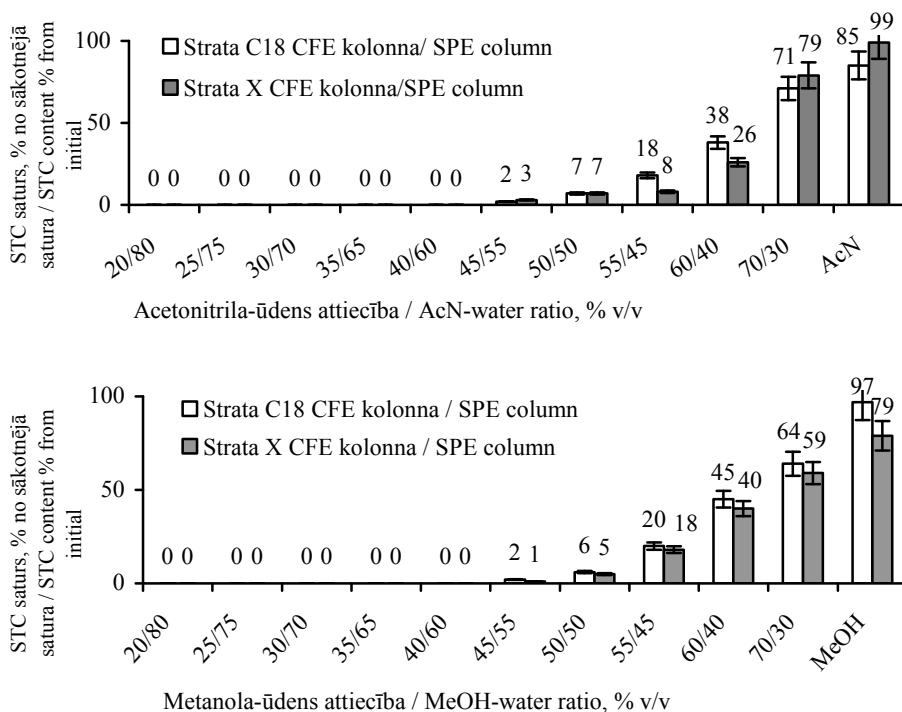
STC kvalitatīvai pierādīšanai jonu attiecībai (281/310) jābūt 0.7 ± 0.1 . *AEŠH-MS-MS analīžu parametri*: pozitīvajā EIJ kustīgās fāzes sastāvs: 0.01% skudrskābe acetonitrilā un 0.01% skudrskābe ūdenī attiecībās 60:40 (% v/v), izokrātiskais režīms. AEŠH kolonna Luna C₁₈(2) (5 μm), 3.0 x 150 mm, kustīgās fāzes plūsmas ātrums 0.3 (ml min⁻¹), injekcijas tilpums – 50 μl. *Masspektrometra parametri*: konusa spriegums – 30 V, kapilārais spriegums – 3.5 kV, ekstraktora spriegums – 2 V, radiofrekvenču lēcu spriegums – 0.2 V, avota temperatūra – 120 °C, desolvatācijas temperatūra – 350 °C, konusa gāzes plūsmas ātrums – 63 (l h⁻¹), desolvatācijas gāzes plūsmas ātrums – 553 (l h⁻¹), fragmentācijas enerģija – 30 eV.

2. Cietfāzes ekstrakcijas metodes optimizēšana sterigmatocistīna noteikšanai

Vairāku mikotoksīnu noteikšanai, ekstrakta attīrīšanai un koncentrēšanai ļoti plaši pielieto cietfāzes ekstrakciju (CFE). Kaut gan kopumā STC molekula ir nepolāra (tai ir gan hidrofilas, gan hidrofobas funkcionālās grupas), nav izslēgts, ka STC molekula labāk piesaistīsies pie Strata X, nekā pie C₁₈ sorbenta. Līdz ar to iespējams izmantot efektīvāku skalošanas šķīdinātāju un izskalo vairāk piemaisījumu no parauga ekstrakta.

Šī pētījuma laikā pārbaudīja STC eluēšanas iespējas no Strata X un Strata C₁₈ CFE kolonnām, izmantojot dažādus acetonitrila-ūdens un metanola-ūdens maisījumus, kā arī kolonnu piemērotību STC CFE veikšanai.

Ieguva šādus rezultātus: izmantojot gan acetonitrila, gan metanola ūdens šķīdumus, STC sāk eluēties no abām kolonnām 45% acetonitrila (un metanola) ūdens šķīdumā. Kopējie STC eluēšanas rezultāti no Strata X un Strata C₁₈ kolonnām ir redzami **8. attēlā**.



8. att. STC saturs dažādās acetonitrila-ūdens un metanola-ūdens frakcijās no Strata X un C₁₈ CFE kolonnām

Fig. 8. STC content in different methanol-water and acetonitrile-water fractions on Strata X and C₁₈ SPE columns

Kolonnu, eluēšanas šķīdumu un CFE kolonnu salīdzināšanas matrica ir redzama **1. tabulā**.

**Kolonnu, eluēšanas šķīdumu un CFE kolonnu salīdzināšanas matrica /
Eluting solutions and SPE column comparing matrix**

Eluēšanas procedūra / eluting procedure	Strata C ₁₈ CFE kolonna / Strata C ₁₈ SPE column	Strata X CFE kolonna / Strata X SPE column
AcN/H ₂ O	a	c
MeOH/H ₂ O	b	d
Salīdzināšanas kombinācijas / comparing combinations		
a-b*		c-d
a-c		c-b
a-d		b-d

*- piem., a ir salīdzināts ar b utt.

(a-b) Dažādu šķīdinātāju maisījumu STC eluēšanas efektivitātes pārbaudei, izmantojot **Strata C₁₈** CFE kolonnu, tika lietots t-tests divu saistītu paraugu kopu vidējo lielumu salīdzināšanai. Testa rezultāti rāda, ka nav būtiskas atšķirības starp eluēšanas procedūrām, izmantojot acetnitrila-ūdens un metanola-ūdens maisījumus ($t_{apr} (0.8) < t_{krit} (1.8)$, $p > 0.05$).

(a-c) Dažādu šķīdinātāju maisījumu STC eluēšanas efektivitātes pārbaudei, izmantojot **Strata C₁₈** un **Strata X** CFE kolonnas un acetnitrila – ūdens eluēšanas procedūru, tika lietots t-tests divu saistītu paraugu kopu vidējo lielumu salīdzināšanai. Testa rezultāti rāda, ka nav būtiskas atšķirības starp abām kolonnām, izmantojot šo eluēšanas procedūru ($t_{apr} (0.04) < t_{krit} (1.8)$, $p > 0.05$).

(a-d) Salīdzinot STC eluēšanu no **Strata C₁₈** kolonnas ar acetnitrilu un to ūdens šķīdumiem ar STC eluēšanu no **Strata X** kolonnas ar metanolu un tā ūdens šķīdumiem, tika lietots t-tests divu paraugu kopu ar līdzīgām dispersijām, salīdzināšanai. Testa rezultāti rāda, ka nav būtiskas atšķirības starp rezultātiem ($t_{apr} (0.1) < t_{krit} (1.7)$, $p > 0.05$).

(c-d) Dažādu šķīdinātāju maisījumu STC eluēšanas efektivitātes pārbaudei, izmantojot **Strata X** CFE kolonnu, tika lietots t-tests divu saistītu paraugu kopu vidējo lielumu salīdzināšanai. Testa rezultāti rāda, ka nav būtiskas atšķirības starp skalošanas procedūrām, izmantojot acetnitrila-ūdens un metanola-ūdens maisījumus ($t_{apr} (0.6) < t_{krit} (1.8)$, $p > 0.05$).

(c-b) Salīdzinot STC eluēšanu no **Strata X** kolonnas ar acetnitrilu un to ūdens šķīdumiem ar STC eluēšanu no **Strata C₁₈** kolonnas ar metanolu un tā ūdens šķīdumiem, tika lietots t-tests divu paraugu kopu ar līdzīgām dispersijām, salīdzināšanai. Testa rezultāti rāda, ka nav būtiskas atšķirības starp rezultātiem ($t_{apr} (0.1) < t_{krit} (1.7)$, $p > 0.05$).

(b-d) Dažādu šķīdinātāju maisījumu STC eluēšanas efektivitātes pārbaudei, izmantojot **Strata C₁₈** un **Strata X** CFE kolonnas un metanola – ūdens eluēšanas procedūru, tika lietots t-tests divu saistītu paraugu kopu vidējo lielumu salīdzināšanai. Testa rezultāti rāda, ka nav būtiskas atšķirības starp abām kolonnām, izmantojot šo eluēšanas procedūru ($t_{apr} (1.80) < t_{krit} (1.82)$, $p > 0.05$).

Apkopojot iegūtos rezultātus varam secināt, ka acetnitrilu un tā ūdens šķīdumus, gan metanolu un tā ūdens šķīdumus var izmantot STC eluēšanai no Strata X un Strata C₁₈ CFE kolonnām, iegūstot statistiski vienādus rezultātus.

Ekonomisko apsvērumu dēļ tālākiem eksperimentiem izvēlēta Strata X CFE kolonna un CFE procedūru realizēšanai acetnitrils un tā ūdens šķīdumi.

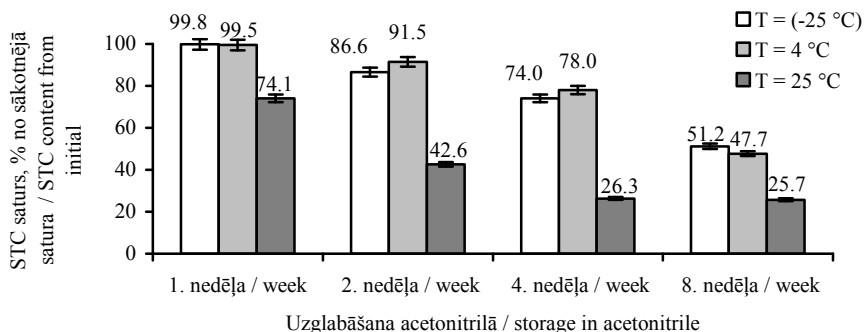
3. Uzglabāšanas laika, temperatūras un šķīdinātāju ietekme uz sterigmatocistīna stabilitāti

Precīzām hromatogrāfiskām analīzēm nepieciešams veikt aparātūras kalibrēšanu ar analīta standartšķīdumiem. STC standartviela ir kristālisks pulveris, tā standartšķīdumu gatavošanai izmanto dažādus organiskus šķīdinātājus, un tos parasti glabā saldētavā. Vispiemērotākais šķīdinātājs STC standartšķīdumu gatavošanai un uzglabāšanai ir hloroforms. Acetonitrilu un metanolu galvenokārt lieto dažādu mikotoksīnu ekstrakcijai no pārtikas, jo tie ļoti sajaukas ar ūdeni, tiem piemīt laba UV gaismas caurlaidība, tie nedod signālu pie vajadzīgajiem viļņu garumiem (mūsu gadījumā 245 un 325 nm, kuros ir redzams STC), un tie ir vispiemērotākie šķīdinātāji AEŠH analīžu veikšanai.

Šī pētījuma laikā noteica parametrus, kuros STC standartšķīdumi, kas gatavoti acetnitrilā, metanolā un to maisījumā 50:50 (% v/v), uzglabājas bez sadalīšanās. STC standartšķīdumus glabāja tumša stikla pudelītēs -25°C , $+4^{\circ}\text{C}$ un $+25^{\circ}\text{C}$ temperatūrā astoņas nedēļas. Pēc pirmās, otrās, ceturtās un astotās nedēļas paraugos noteica STC koncentrāciju, izmantojot AEŠH-UV.

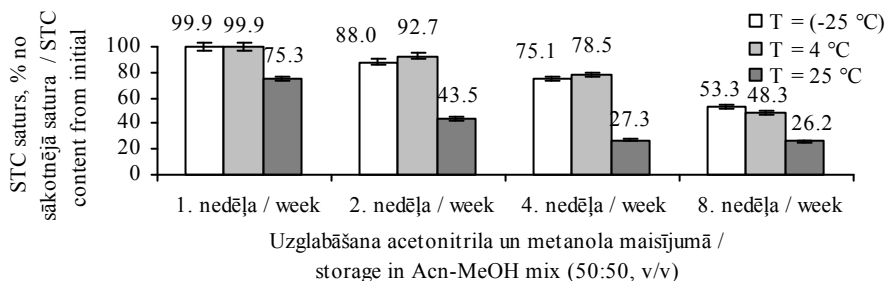
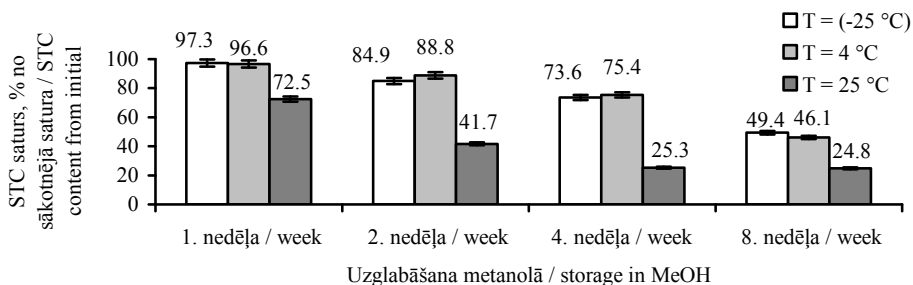
STC kontrolskaitlis katrā šķīdinātājā tika aprēķināts no trim standartšķīdumu injekciju atkārtojumiem, ko veica pirmajā dienā. STC stabilitāti rēķināja, salīdzinot iegūtos rezultātus ($n=3$) ar kontrolskaitli.

Rezultāti, kas iegūti, uzglabājot dažādā temperatūrā STC acetnitrila, metanola un acetnitrila un metanola maisījuma 50:50 (% v/v) standartšķīdumus, redzami **9. attēlā**.



9. att. STC stabilitāte acetnitrilā, metanolā, acetnitrila un metanola maisījumā (50:50, v/v) dažādā temperatūrā

Fig. 9. Stability of STC at different temperature in acetonitrile, methanol and mixture of acetonitrile and methanol (50:50, v/v)



9. att. STC stabilitāte acetonitrilā, metanolā, acetonitrila un metanola maisījumā (50:50, v/v) dažādā temperatūrā

Fig. 9. Stability of STC at different temperature in acetonitrile, methanol and mixture of acetonitrile and methanol (50:50, v/v)

STC stabilitātes pārbaudes rezultātu apstiprināšanai tika pieņemta tolerance $\pm 5.0\%$ no sākuma STC koncentrācijas (100%). Rezultātu salīdzināšanai izmantoja mērījumus, ko ieguva pēc pirmās uzglabāšanas nedēļas -25 °C un $+4\text{ °C}$ temperatūrā. Tātad, rezultāti, kas iegūti, uzglabājot STC $+25\text{ °C}$ temperatūrā ilgāk par vienu nedēļu, netika ņemti vērā, jo STC šādos apstākļos nav stabils nevienā no šķīdinātājiem.

Apkopojot statistiskos rezultātus, kas iegūti, uzglabājot STC dažādos šķīdinātājos -25 °C un $+4\text{ °C}$ temperatūrā, var izdarīt secinājumus:

- 1) -25 °C temperatūrā STC ieteicams uzglabāt acetonitrilā vai acetonitrila un metanola maisījumā (50:50, v/v);
- 2) $+4\text{ °C}$ temperatūrā STC ieteicams uzglabāt acetonitrila un metanola maisījumā (50:50, v/v).

Tā kā STC stabilitātes apstiprināšanai tika pieņemta tolerance $\pm 5.0\%$ no sākuma STC koncentrācijas (100%), apkopojot kopīgos stabilitātes pētījumu rezultātus, var izdarīt šādus secinājumus:

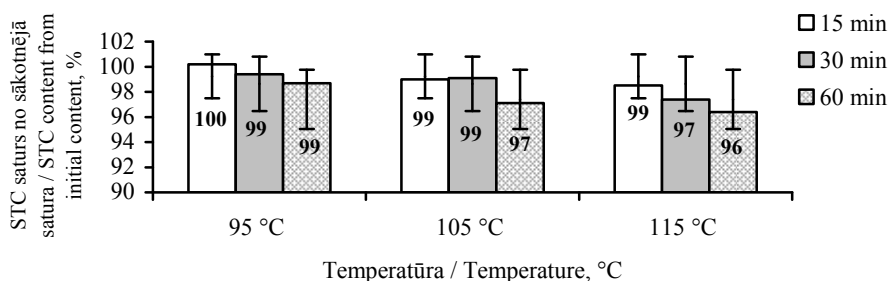
- 1) STC ir nestabils, uzglabājot $+25\text{ °C}$ temperatūrā, jebkurā no pētījumā izmantotajiem šķīdinātājiem;
- 2) STC ir stabils vienu nedēļu, uzglabājot to temperatūras intervālā no -25 °C līdz $+4\text{ °C}$, jebkurā no pētījumā izmantotajiem šķīdinātājiem.

Par piemērotiem šķīdinātajiem STC darba standartšķīdumu uzglabāšanai temperatūras intervālā no $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ līdz $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ var uzskatīt visus pētījumā izmantotos šķīdinājumus, bet to stabilitāte saglabājas ne ilgāk par vienu nedēļu.

4. Paaugstinātas temperatūras un laika ietekme uz STC standartšķīdumu stabilitāti

Lai novērtētu STC termisko stabilitāti, STC standartšķīdumi tika uzglabāti dažādos laika periodus temperatūrā, kas ir maizes izstrādājumos to cepšanas laikā.

Pagatavotos STC standartšķīdumus ($0.25\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) uzglabāja slēgtās tumša stikla pudelītēs $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+105\text{ }^{\circ}\text{C}$ un $+110\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 15, 30 un 60 minūtes. Paralēlo paraugu skaits – trīs (katrā temperatūrā un laikā, kopā deviņi paralēlie paraugi). Pēc uzglabāšanas paraugus atdzesēja līdz istabas temperatūrai un analizēja, izmantojot AEŠH-UV. Iegūtie rezultāti redzami **10. attēlā**.



10. att. STC stabilitāte, uzglabājot STC standartšķīdumu dažādā temperatūrā, dažādos laika periodus

Fig. 10. Results obtained during storage of STC standard solution under different temperatures different periods of time

Iegūtie rezultāti rāda, ka STC dotajos apstākļos ir termiski stabils.

Iegūto rezultātu salīdzināšanai tika pielietota vienfaktora dispersijas analīze:

- Salīdzinot temperatūras ietekmi uz STC stabilitāti, dispersijas analīzes rezultāti rāda, ka nav būtisku atšķirību starp iegūtajiem rezultātiem ($F_{\text{fakt}} (3.06) < F_{\text{krit}} (5.14)$, $p > 0.05$), jeb temperatūra līdz $+115\text{ }^{\circ}\text{C}$ neietekmē STC stabilitāti;
- Salīdzinot laika ietekmi uz STC stabilitāti, dispersijas analīzes rezultāti rāda, ka nav būtisku atšķirību starp iegūtajiem rezultātiem ($F_{\text{fakt}} (2.37) < F_{\text{krit}} (5.14)$, $p > 0.05$), jeb karsēšanas laiks līdz 60 minūtēm neietekmē STC stabilitāti.

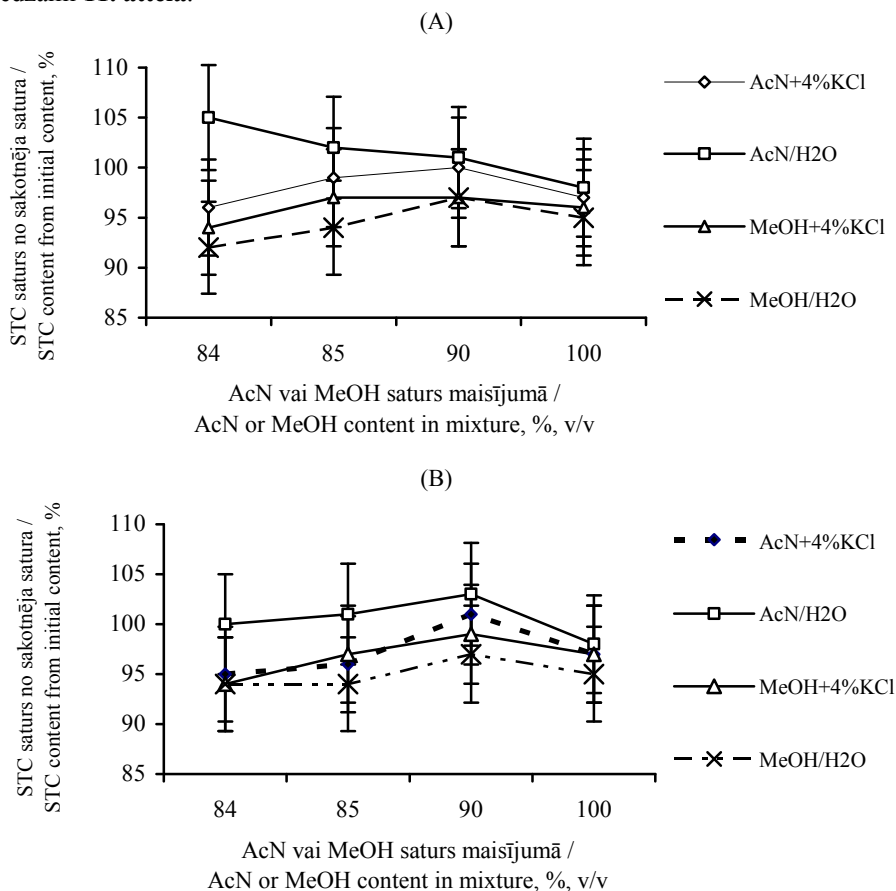
Apkopojot iegūtos rezultātus, varam secināt, ka STC ir termiski stabils vismaz līdz $+115\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai vismaz 60 minūtes. Tātad STC varētu būt termiski stabils arī cepot maizi vai citus miltu izstrādājumus, ja šo izstrādājumu izejvielas saturēs STC.

5. Ekstrakcijas šķīdinātāju efektivitātes pārbaude

STC ekstrakcijai no dažādām pārtikas sistēmām biežāk lieto AcN/4%KCl (85/15 vai 90/10, v/v) un MeOH/4% KCl (85/15 vai 90/10, v/v) maisījumus. Šī pētījuma laikā pārbaudīja AcN/H₂O un AcN/4%KCl, MeOH/H₂O un MeOH/4%KCl maisījumu efektivitāti STC ekstrakcijai no graudu un siera matricēm. Maisījumu attiecības bija 84/16, 85/15, 90/10 un 100 (%) (v/v).

Eksperimenta gaita: 25 g graudu vai siera parauga pievieno 500 µl STC standartšķīduma ar koncentrāciju – 5 µg ml⁻¹ (ekvivalents 100 µg kg⁻¹). Katrā šķīdinātāju maisījuma attiecībā ekstrahēja trīs paralēlos paraugus.

Iegūtiem rezultātiem rēķināja atgūstamību. Kā kontroli izmantoja rezultātus, kas iegūti, veicot ekstrakciju ar AcN/4%KCl (90/10, v/v). Rezultāti redzami 11. attēlā.



11. att. STC atgūstamība, lietojot dažādus ekstrakcijas šķīdinātājus
(A – graudu matrica; B – siera matrica)

Fig. 11. Recovery of STC using different extraction solvents
(A – grain matrix; B – cheese matrix)

Rezultātus izvērtējot ar vienfaktora dispersijas analīzi, varam secināt, ka nav būtiskas atšķirības, STC ekstrahējot no graudiem ar vienu un to pašu šķīdinātāju maisījumiem dažādās attiecībās ($F_{\text{fakt}} (0.35) < F_{\text{krit}} (3.49)$, $p > 0.05$), bet ir būtiska atšķirība, ekstrahējot STC ar dažādiem šķīdinātāju maisījumiem ($F_{\text{fakt}} (8.14) > F_{\text{krit}} (3.49)$, $p < 0.05$), pie tam par labākiem ekstrakcijas šķīdumiem atzīstami acetonitrila-ūdens šķīdumi.

Rezultātus izvērtējot ar vienfaktora dispersijas analīzi, secinām, ka nav būtiskas atšķirības, STC ekstrahējot no siera ar vienu un to pašu šķīdinātāju maisījumiem dažādās attiecībās ($F_{\text{fakt}} (2.13) < F_{\text{krit}} (3.49)$, $p > 0.05$), bet ir būtiska atšķirība, ekstrahējot STC ar atšķirīgiem šķīdinātāju maisījumiem ($F_{\text{fakt}} (4.82) > F_{\text{krit}} (3.49)$, $p < 0.05$), pie tam par labākiem ekstrakcijas šķīdumiem atzīstami acetonitrila-ūdens šķīdumi.

Analizējot iegūtos rezultātus, kā optimālie tika izvēlēti šādi STC ekstrakcijas maisījumi:

- STC ekstrakcijai no graudiem ieteicams izmantot acetonitrila-ūdens šķīdumu attiecībās 84:16 (% , v/v);
- STC ekstrakcijai no siera ieteicams izmantot acetonitrila-ūdens šķīdumu attiecībās 90:10 (% , v/v).

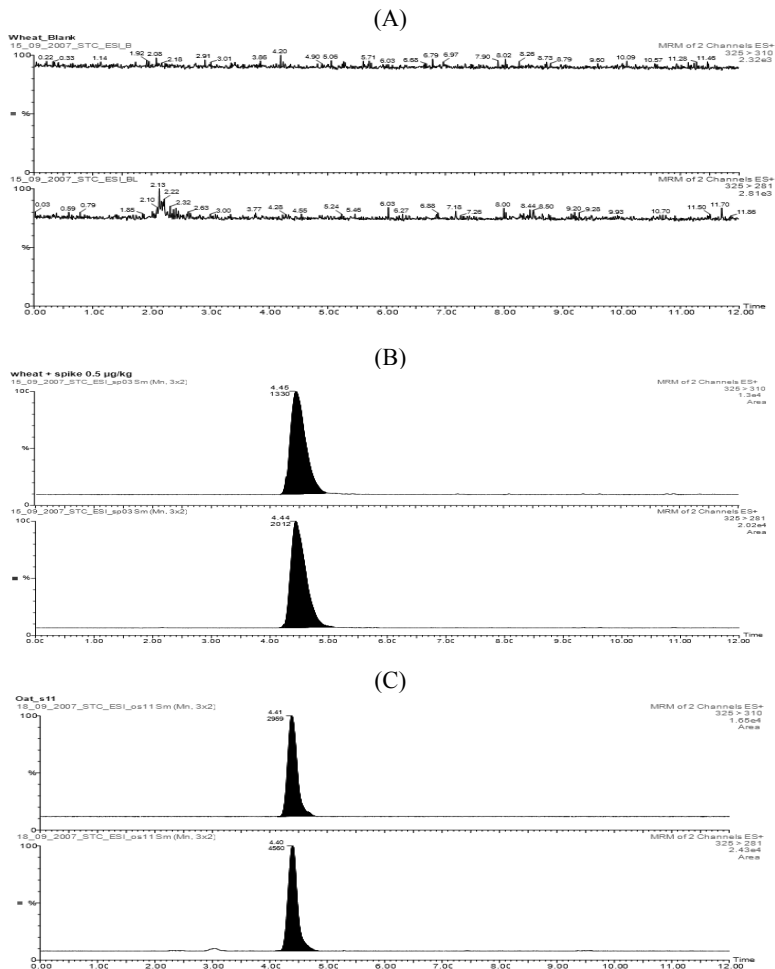
6. Sterigmatocistīna noteikšanas metodes izstrāde graudos

Šī pētījuma laikā izstrādāta jutīgāka analīzes metode, kas ļauj noteikt STC saturu koncentrācijā zem $2.0 \mu\text{g kg}^{-1}$, un pārbaudīts STC saturs 2006. un 2007. gada ražu kviešu, auzu, rudzu, miežu un griķu graudos. 95 paraugi tika savākti 2006. gadā un 120 paraugi – 2007. gadā.

Paraugu sagatavošana. 25 g sasmalcināta un homogenizēta graudu parauga ekstrahēja 30 min ar 100 ml acetonitrila-ūdens šķīdumu (84:16, %, v/v), izmantojot horizontālo maisītāju. Iegūto ekstraktu filtrēja caur papīra filtru, 10 ml filtrētā ekstrakta atšķaidīja ar 20 ml dejonizēta ūdens. Iegūtos 30 ml atšķaidītā ekstrakta attīrīja un koncentrēja, izmantojot Strata X (500 mg) CFE kolonnu. Attīrīšanas metode: kolonnu sagatavoja, caur to izlaižot 6 ml metanola un pēc tam 6 ml ūdens. Pēc tam caur kolonnu izlaida 30 ml ekstrakta (izmantojot 100 ml kaseti un CFE manifoldu), skaloja ar 3 ml 40% acetonitrila šķīdumu ūdenī un 3 ml 40% metanola šķīdumu ūdenī. STC eluēja, izmantojot 4 ml 100% acetonitrila. Iegūtos 4 ml eluāta ietvaicēja slāpekļa plūsmā $+60^\circ\text{C}$ temperatūrā un sauso atlikumu izšķīdināja 250 μl acetonitrila-ūdens šķīdumā (75:25, %, v/v). Kalibrēšanas šķīdumus gatavoja, pie attiecīgās matricas pievienojot standartšķīdumus un sagatavojot tāpat kā paraugu.

Metodes selektivitāte. Metode ir selektīva, jo analizējamās vielas signāls nepārklājas ar citu vielu signāliem.

STC nesaturošā kviešu parauga, kviešu parauga ar standartpiedevu ($0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$) un ar STC dabiski piesārņota auzu parauga SRM hromatogrammas ir redzamas **12. attēlā**.



12. att. Tīra kviešu parauga (A), kviešu parauga ar standartpiedevu ($0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$) (B) un ar STC dabiski piesārņota auzu parauga (C) SRM (MRM) hromatogrammas
 Fig. 12. SRM (MRM) chromatograms of blank wheat sample (A), wheat sample spiked with $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ of STC (B) and naturally contaminated oat sample (C)

Metodes zemākā noteikšanas robeža (ZNR) un metodes zemākā rēķināšanas robeža (ZRR). Zemākais validētais STC saturs ir $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (signāla intensitāte pret fonu (S/F) ir 10.5). ZNR un ZRR rēķināja, izmantojot masspektrometrisko datu apstrādes programmas „Masslynx” (ZNR = $3 \times \text{S/F}$ un ZRR = $2 \times \text{ZNR}$). ZNR bija $0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$ un ZRR bija $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Atgūstamība, atkārtotamība un reproducējamība. Iegūtie rezultāti ir atspoguļoti 2. tabulā.

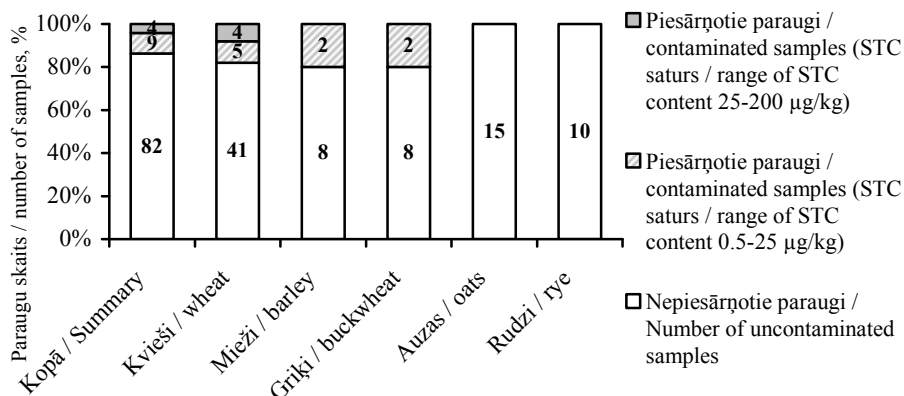
**STC atgūstamība, atkārtojamība (RSN_r) un reproducējamība (RSN_R)
 paraugos ar standartpiedevām / Recovery, repeatability (RSN_r) and reproducibility
 (RSN_R) of STC from spiked samples**

Parauga veids / Sample matrix	Pievienotais STC daudzums / Added STC concentration, µg kg ⁻¹	Noteiktais STC daudzums / Found STC concentration, µg kg ⁻¹	Vidējā atgūstamība / Mean recovery, %	RSN _r / RSD _r , %	RSN _R / RSD _R , %
Kviešu graudi / Wheat grains	0.50	0.47	94.5	4.0	4.2
	5.00	4.92	98.4	4.8	2.8
	25.0	26.1	104	6.4	0.2
	100	105	105	6.5	0.2
Miežu graudi / Barley grains	0.50	0.45	90.3	5.3	7.6
	5.00	4.89	97.8	2.6	4.4
	25.0	24.3	97.2	7.5	8.4
	100	98.4	98.4	6.2	7.1
Auzu graudi / Oat grains	0.50	0.48	96.3	4.6	6.4
	5.00	5.03	101	2.9	3.7
	25.0	26.8	107	5.2	6.5
	100	105	105	7.3	7.8
Griķu graudi / Buckwheat grains	0.50	0.49	97.4	4.2	5.6
	5.00	5.02	101	2.8	4.4
	25.0	26.2	105	3.2	6.0
	100	105	105	4.4	7.3
Rudzu graudi / Rye grains	0.50	0.44	88.4	4.5	6.7
	5.00	4.02	80.5	2.8	3.2
	25.0	23.2	92.8	6.2	7.4
	100	95.6	95.7	8.5	8.8

Mazākā atgūstamība bija rudzu graudiem ar 5 µg kg⁻¹ standartpiedevu – 80%, bet lielākā – auzu graudiem ar 25 µg kg⁻¹ standartpiedevu – 107%.

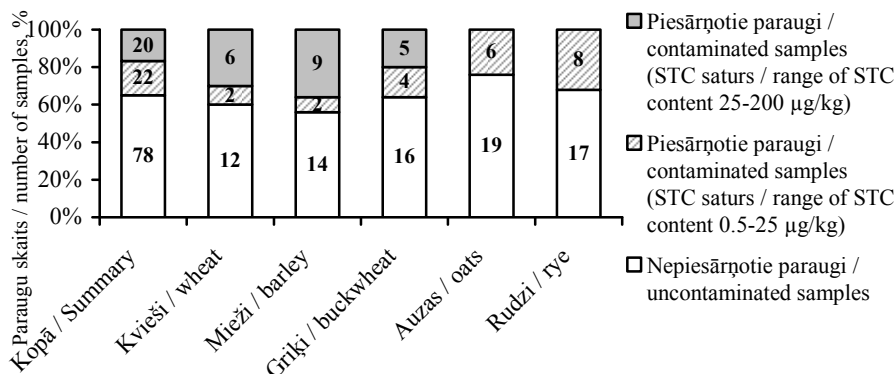
Linearitāte. Metode ir lineāra līdz STC saturam 200 µg kg⁻¹. Regresijas vienādojumi standartšķīdumos ir $y = 13627x$ ($R^2 > 0.999$) un, kalibrējot uz matricas, $y = 3859x$ ($R^2 > 0.991$). Kā redzams no regresijas vienādojumiem, matricas efekta dēļ ir būtiska atšķirība starp kalibrēšanu ar standartšķīdumiem un kalibrēšanu uz matricas. Tāpēc STC noteikšanai graudos kalibrēšanu vienmēr veic uz matricas.

Rezultāti atbilst Eiropas Komisijas Regulas (EK) Nr. 401/2006 prasībām un metode ir precīza. Rezultāti, kas iegūti, analizējot STC saturu 2006. un 2007. gada ražas graudos, redzami **13. – 14. attēlos**.



13. att. STC saturs un koncentrāciju diapazoni dažādos Latvijas 2006. gada graudu paraugos
Fig. 13. STC presence and concentration ranges in different Latvian grains in the year 2006

14% (13 paraugi) 2006. gada graudu paraugu saturēja STC ($0.7-83 \mu\text{g kg}^{-1}$) un 35% (42 paraugi) 2007. gada graudu ražas paraugu saturēja STC ($1-47 \mu\text{g kg}^{-1}$).



14. att. STC saturs un koncentrāciju diapazoni dažādos Latvijas 2007. gada graudu paraugos
Fig. 14. STC presence and concentration ranges in different Latvian grains in year 2007

Pieciem paraugiem STC saturs ($23, 29, 29, 54$ un $83 \mu\text{g kg}^{-1}$) pārsniedza maksimāli pieļaujamo STC koncentrāciju, kāds ir noteikts Čehijā un Slovākijā ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). Kopā 27% (55 paraugi) 2006. – 2007. gada graudu ražas graudu paraugos tika konstatēta STC klātbūtne.

Pētījumi liecina par STC klātbūtni Latvijā audzētos graudos, tātad arī graudu izcelsmes produkti var saturēt STC.

7. Sterigmatocistīna stabilitāte maizes cepšanas procesā

Pētījuma laikā pārbaudīja STC stabilitāti, cepot maizi no dabiski STC saturošiem graudiem. Tika analizēts STC saturs izceptajā maizē un salīdzināts ar STC saturu graudos, no kuriem tika cepta maize.

Daļu STC saturošu kviešu graudu paraugu ($83 \mu\text{g kg}^{-1}$) homogenizēja un, lai pārbaudītu STC satura dispersiju, sešos paralēlos paraugos noteica STC saturu. Kā kontrolparaugus izmantoja STC nesaturošus kviešu graudus, kas tika sagatavoti tāpat.

Otrā šo graudu daļa tika izmantota pilngraudu kviešu miltu iegūšanai, ko izmantoja pilngraudu maizes cepšanai. Mīklas receptūra: milti – 1100 g, raugs – 22 g, ūdens – 700 g, cukurs – 40 g, sāls – 10 g. Maizes cepšanas tehnoloģija: mīcīšanas laiks 8-15 min; mīcīšanas temperatūra $+24-26^\circ\text{C}$; mīklas raudzēšana ~ 20 min.; mīklas pēcraudzēšana: ~ 40 min., $T^\circ\text{C} = +35-38^\circ\text{C}$; maizes cepšana ~ 17 min., $T^\circ\text{C} = +200-210^\circ\text{C}$).

STC satura analizēšana paraugos. STC satura analīze maizē un graudos tika veikta, izmantojot iepriekš izstrādāto metodi STC satura noteikšanai graudos, kas ietver parauga ekstrakciju ar acetonitrila-ūdens maisījumu 84:16 (% v/v), CFE uz Strata X CFE kolonnas un STC noteikšanu, izmantojot AEŠH-MS-MS.

STC satura aprēķināšana piesārņotos graudos un no tiem izceptās maizes paraugos. Iegūtais STC saturs pilngraudu kviešu maizē tika pārrēķināts uz STC saturu miltos, izmantojot sekojošas izteiksmes.

Izteiksme (1) paredzēta atdzesētās maizes masas pārrēķināšanai uz maizes daudzumu, ko var iegūt no 1000 g piesārņoto miltu jeb graudu:

$$BM_1 = \frac{DM_1 * BM_2}{DM_2}, \quad (1)$$

kur / where:

BM_1 – maizes masa, ko var iegūt no 1000 g piesārņoto miltu jeb graudu / bread mass what can be obtained from 1000 g of contaminated flour (grains), g [1628];

BM_2 – atdzesētās maizes masa, kuru iegūst no zināmas mīklas masas / cold bread mass obtained from known dough mass, g [1654];

DM_1 – mīklas masa, kuru iegūst no 1000 g piesārņoto miltu jeb graudu (to var izrēķināt no mīklas receptūras) / dough mass obtained from 1000 g of contaminated flour (it is calculated from dough making recipe), g [1772];

DM_2 – vidējā mīklas masa, kuru izmanto maizes cepšanai / average dough mass used for bread making, g [1800].

Izmantojot rezultātu, kas iegūts no izteiksmes (1) (no 1000 g miltu jeb graudu ieguva 1628 g maizes), var izrēķināt koeficientu iegūtā STC satura maizē pārrēķināšanai uz STC saturu graudos (izteiksme 2):

$$K = \frac{BM_1}{FM_1}, \quad (2)$$

kur / where:

K – pārrēķināšanas koeficients / recalculation coefficient [1.628];

BM_1 – maizes masa, ko iegūst no 1000 g piesārņoto miltu jeb graudu / bread mass obtained from 1000 g of contaminated flour, g [1628];

FM_I – miltu masa receptūrā / flour mass from recipe, g [1000].

Tātad STC saturs pārrēķināšanai no maizes uz graudiem var izmantot pārrēķināšanas koeficientu – 1.628 (izteiksme 3.):

$$FR_{STC} = K \cdot BR_{STC}, \quad (3)$$

kur / where:

FR_{STC} – STC saturs miltos vai graudos, kas pārrēķināts no STC saturs maizē / STC content in flour recalculated from obtained STC content in bread, $\mu\text{g kg}^{-1}$;

K – pārrēķināšanas koeficients / recalculation coefficient – 1.628;

BR_{STC} – noteiktais STC saturs maizē / STC content determined in bread, $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Mīklas, karstas maizes un atdzesētas maizes masa ir redzama **3. tabulā**.

3. tabula / Table 3.

Mīklas, karstas un atdzesētas maizes masa / Dough and bread sample weights

Paralēlā parauga numurs / Replicate number	Parauga masa, g / Sample weight, g		
	Mīklas paraugs / Dough sample	Karsta maize / Hot bread sample	Atdzesēta maize / Chilled bread sample
1	300	282	277
2	300	280	273
3	300	283	275
4	300	278	271
5	300	286	280
6	300	285	278
Vidējais /Average	300	282	276
SN / SD	0.1	3.0	3.3
RSN, % / RSD, %	0.0	1.1	1.2
Kopā / Total	1800	1694	1654

Vidējais STC saturs graudos, no kuriem tika cepta maize, bija $83 \mu\text{g kg}^{-1}$. Vidējais STC saturs izceptajā maizē bija $48 \mu\text{g kg}^{-1}$ – tas ir ekvivalents $78 \mu\text{g kg}^{-1}$ STC saturam graudos (**4. tabula**).

4. tabula / Table 4.

STC saturs maizē un piesārņotos graudos / STC content in bread and contaminated grains

Paralēlā parauga numurs / Replicate number	STC saturs maizes paraugos / STC content in bread samples, $\mu\text{g kg}^{-1}$	STC saturs graudos, pārrēķināts no maizes paraugiem / STC content recalculated to grains, $\mu\text{g kg}^{-1}$	STC saturs piesārņotos graudos / STC content in contaminated grains, $\mu\text{g kg}^{-1}$
1.	52	84	83
2.	49	79	88
3.	50	81	80
4.	46	75	79
5.	45	73	76
6.	46	75	89
Vidējais /Average	48	78	83
SN / SD	2.8	4.5	5.2
RSN / RSD, %	5.7	5.7	6.3

T-testa rezultāti rāda, ka nav būtiskas statistiskas atšķirības starp rezultātiem, kas iegūti, STC saturu maizē pārrēķinot uz tā saturu miltos jeb graudos, un STC saturu graudos, no kuriem tika cepta maize ($t_{\text{apr}}(1.7) < t_{\text{krit}}(1.8)$; $p > 0.05$). Tātad STC ir stabils visos maizes cepšanas tehnoloģiskajos posmos un maizes cepšanas procesā, līdz ar to ir iespējama tā klātbūtne maizē. Lai novērstu šī mikotoksīna nelabvēlīgo ietekmi uz cilvēku veselību, ir ieteicama STC satura kontrole graudos un miltos.

8. Sterigmatocistīna saturs dažādos Latvijā ražotos maizes paraugos

Dažādu Latvijā ražotu maizes šķirņu paraugus (sešu veidu rudzu, deviņu veidu rudzu-kviešu un 14 veidu kviešu maizes) sasmalcināja un homogenizēja. STC satura analīze maizē tika veikta saskaņā ar iepriekš izstrādāto metodi STC satura noteikšanai graudos (Veršilovskis et al., 2007; 2008), kas ietver parauga ekstrakciju ar acetnitrila – ūdens maisījumu 84:16 (% v/v), CFE uz Strata X CFE kolonnas un STC noteikšanu, izmantojot AEŠH-MS-MS. Kalibrēšanas šķīdumus (kalibrēšanai uz maizes matricas) gatavoja, pievienojot standartšķīdumus pie maizes parauga un sagatavojot tāpat kā paraugu. Kalibrēšanu veica uz nepiesārņotas matricas. Metodes linearitātes apstiprināšanai atsevišķu kalibrēšanas punktu atšķirības tika pieņemtas ± 10 %.

STC noteikšanas metode ir lineāra kalibrēšanas diapazonā no $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ līdz $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Standartšķīdumu regresijas vienādojums ir $y = 13656x + 212$ ($R^2 > 0.999$), regresijas vienādojums kalibrēšanai uz maizes matricas ir $y = 4477x - 176$ ($R^2 > 0.999$). Atgūstamība maizes matricai variēja no 96 līdz 103% ar RSN_r no 4.6 līdz 6.2%. STC saturs pārbaudītajos maizes paraugos ir redzams **5. tabulā**.

5. tabula / Table 5

STC izplatība dažādos maizes paraugos / STC occurrence in different bread samples

Parauga Nr. / Sample Nr.	Maizes parauga nosaukums / Bread sample name	Maizes tips / Bread type	Maiznīca / Bakery	Rezultāts / Result, $\mu\text{g kg}^{-1}$
1.	“Hanzas” rudzu maize	R	Hanzas	n.a.
2.	Īstā rupjmaize	R	Lāči	n.a.
3.	“Saules” tumšā pilngraudu	R	Ilguciema	n.a.
4.	“Rīgas” rudzu maize	R	Ilguciema	n.a.
5.	“Fazer” pilngraudu rudzu	R	Druva	n.a.
6.	Rudzu maize	R	Sono	2.4
7.	“Hanzas” rudzu-kviešu	RK	Hanzas	n.a.
8.	Īstā saldskābmaize	RK	Lāči	n.a.
9.	“Fit Life” maize	RK	Lāči	n.a.
10.	Saldskābā maize	RK	Ilguciema	n.a.
11.	“Meistara” rudzu maize	RK	Druva	n.a.
12.	“Meistara” kublu saldskābmaize	RK	Druva	n.a.

Parauga Nr. / Sample Nr.	Maizes parauga nosaukums / Bread sample name	Maizes tips / Bread type	Maiznīca / Bakery	Rezultāts / Result, $\mu\text{g kg}^{-1}$
13.	Dinaburga	RK	Dinella	n.a.
14.	“Saimnieks” pilngraudu	RK	Sono	7.1
15.	Saldskābmaize	RK	Sono	n.a.
16.	Fitness maize	K	Hanzas	n.a.
17.	“Hanzas” kviešu maize	K	Hanzas	n.a.
18.	“Sendviču” graudu maize ar miežu un rudzu pārslām	K	Hanzas	n.a.
19.	“Sendviču” graudu maize ar rudzu pārslām	K	Hanzas	4.4
20.	“Sendviču” graudu maize ar auzu pārslām	K	Hanzas	n.a.
21.	Īstā kviešu maize	K	Lāči	n.a.
22.	„Saules” graudu maize	K	Ilguciema	3.2
23.	Pilsētas kviešu maize	K	Ilguciema	n.a.
24.	“Fazer” karaliskās graudu tostermaizītes	K	Druva	5.6
25.	“Fazer” kviešu tostermaize	K	Druva	n.a.
26.	“Spēkotava” kliju maize	K	Druva	n.a.
27.	“Zeltene” kviešu maize	K	Dinella	n.a.
28.	“Rudens” kviešu maize	K	Dinella	n.a.
29.	“Kurzemes” kviešu maize	K	Sono	n.a.

R – rudzu maize / rye bread; RK – rudzu-kviešu maize / rye-wheat bread; K – kviešu maize / wheat bread; n.a. – nav atrasts / not detected

No sešiem rudzu maizes paraugiem tikai vienā (16.7%) konstatēja STC, no deviņiem rudzu-kviešu maizes paraugiem arī tikai viens (11.1%) bija piesārņots ar STC, no 14 kviešu maizes paraugiem trijos (21.4%) atrada STC. No pieciem piesārņotajiem paraugiem četri (80%) saturēja graudus un pilngraudu miltus. Kaut gan STC saturs maizes paraugos bija salīdzinoši mazs (no 2.4 līdz 7.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$) un nepārsniedza maksimāli pieļaujamo koncentrāciju, kas noteikta Čehijā un Slovākijā (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$), divi paraugi pārsniedza maksimāli pieļaujamo STC saturu (5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), kas šajās valstīs ir rīsiem, dārzeņiem, kartupeļiem, miltiem, gaļai.

Pētījuma rezultāti norāda uz varbūtību, ka graudi, no kuriem bija cepta STC saturošā maize, arī saturēja STC. Lai samazinātu šī mikotoksīna nokļūšanu maizē, ieteicama STC satura kontrole graudos un miltos.

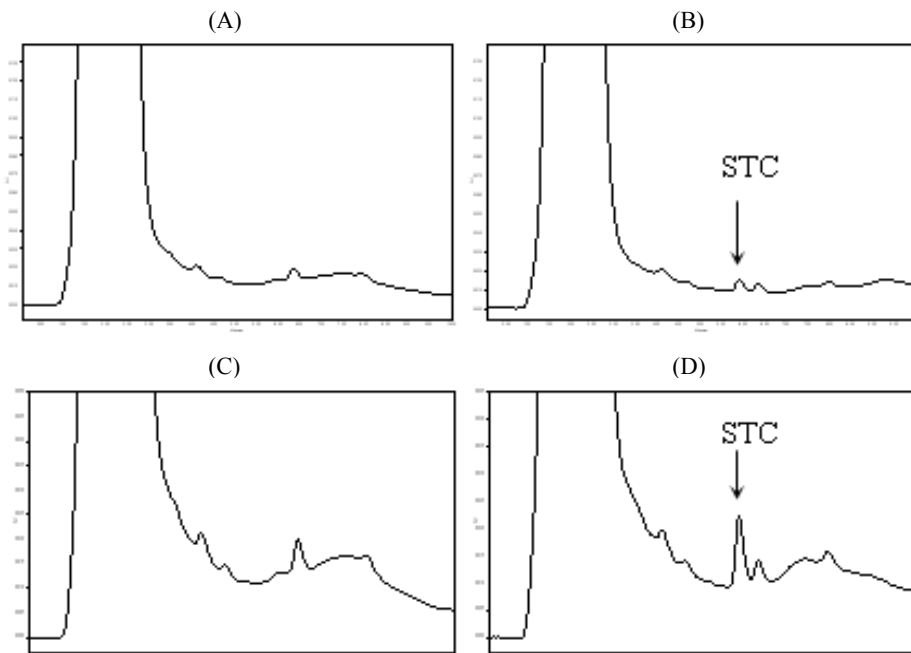
9. Sterigmatocistīna noteikšanas metodes izstrāde alū, izmantojot augstefektīvu šķidrumu hromatogrāfiju ar ultravioleto detektēšanu un tā noteikšana Latvijā ražotos alus paraugos

Tika izstrādāta un validēta jutīga STC noteikšanas metode alū. Metode tika pielietota STC satura analīzei Latvijā ražotā tumšajā un gaišajā alū.

Parauga sagatavošana. Pirms analīzēm visus alus paraugus degazēja

ultraskaņas vannā 40 min. Paraugu sagatavošana bija šāda: 30 ml degazētā parauga filtrē caur papīra filtru, 10 ml filtrāta atšķaida ar 5 ml 10% acetonnitrila ūdens šķīdumu, iegūto šķīdumu attīra un koncentrē, izmantojot CFE uz Strata X (60 mg) CFE kolonnas. Attīrīšanas procedūra: izlaiž caur kolonnu 6 ml metanola, tad 6 ml ūdens, pēc tam 15 ml iegūtā parauga šķīduma. Pēc tam no kolonnas eluē piemaisījumus ar 6 ml 30% acetonnitrila šķīduma ūdenī, un STC eluē no kolonnas ar 3 ml 100% acetonnitrila šķīdumu. Eluātu ietvaicē slāpekļa plūsmā 70°C temperatūrā un sauso atlikumu izšķīdina 200 μ l acetonnitrila-ūdens šķīdumā (60:40, %, v/v). Eluēšanas soli optimizēja, variējot acetonnitrila saturu ūdenī, līdz ar to palielinot maisījuma eluēšanas spēju. Iegūtās frakcijas analizēja, izmantojot AESH-UV. Izstrādājot un optimizējot STC noteikšanas metodi alū, iegūti šādi rezultāti.

Selektivitāte. Metode ir pietiekoši selektīva, jo STC smaile nepārklājas ar citu vielu signāliem **15. attēlā** ir redzamas tīra gaišā alus parauga, dabiski piesārņota alus parauga, nepiesārņota tumšā alus parauga un dabiski piesārņota alus parauga hromatogrammas.



15. att. Nepiesārņota gaišā alus parauga (A), dabiski piesārņota alus parauga (B) ($4.0 \mu\text{g kg}^{-1}$), nepiesārņota tumšā alus parauga (C) un dabiski piesārņota alus parauga ($7.8 \mu\text{g kg}^{-1}$) (D) hromatogrammas

Fig. 15. The chromatograms of blank light beer (A), naturally contaminated ($4.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) light beer (B), blank dark beer (C) and naturally contaminated ($7.8 \mu\text{g kg}^{-1}$) dark beer (D) samples

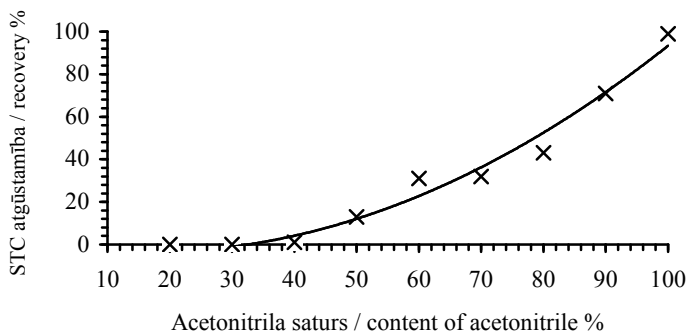
Metodes linearitātes noteikšanai atsevišķu kalibrēšanas punktu atšķirības tika pieņemtas ± 10 %. Regresijas vienādojums 0.5 līdz $10 \mu\text{g l}^{-1}$ kalibrācijas diapazonā

ir $y = 17590x - 885$, determinācijas koeficients $R^2 > 0.997$, regresijas vienādojums 10 līdz 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ kalibrācijas diapazonā ir $y = 19069x - 15194$, determinācijas koeficients $R^2 > 0.999$. Tātad metode ir lineāra līdz STC koncentrācijai 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ tumšajā un gaišajā alū.

ZNR (LOD) un ZRR (LOQ) ($\text{ZNR} = 3.3 \times \text{S/F}$; $\text{ZRR} = 10 \times \text{S/F}$) ir attiecīgi 0.26 $\mu\text{g l}^{-1}$ un 0.68 $\mu\text{g l}^{-1}$. Tik liela metodes jutība tika sasniegta, pateicoties parauga koncentrēšanai (50 reizes) un CFE attīrīšanai. **Nozīmīgi**, ka metodes jutības palielināšanai nav nepieciešama STC ķīmiska modifikācija (derivatizācija).

CFE metodes optimizācija. Lai samazinātu piemaisījumu daudzumu ekstraktā, jāzin divi parametri: kādā acetonitrila koncentrācijā STC sāk eluēties no kolonnas un pie kādas acetonitrila koncentrācijas to var maksimāli eluēt no CFE kolonnas. Šī informācija ir nepieciešama, lai zinātu, kādam ir jābūt acetonitrila saturam piemaisījumu eluēšanai no CFE kolonnas (neeluējot STC) un, lai zinātu, kādam acetonitrila saturam ir jābūt, lai maksimāli eluētu STC no kolonnas. Abus parametrus var ietekmēt matricas komponentu sastāvdaļas. CFE metodē, kas tika izstrādāta STC noteikšanai graudos, šķīdums, ar kuru veica piemaisījumu eluēšanu, saturēja no 40% acetonitrila šķīduma ūdenī. Tā kā alus var saturēt no 3 līdz 12% etanola, tad nevar izmantot vienu un to pašu eluēšanas šķīdumu visos gadījumos. Tas ir pozitīvi, jo lielākā daļa piemaisījumu nesaistīsies uz kolonnas, bet eluēsies ar metanolu jau parauga uznešanas stadijā. Taču jāņem vērā, ka jāsamazina acetonitrila saturs eluēšanas šķīdumā, lai STC neeluētos no kolonnas piemaisījumu eluēšanas stadijā. Bez tam alus var saturēt dažādas organiskās skābes, kas arī var palielināt STC eluēšanas iespēju no CFE kolonnas jau piemaisījumu eluēšanas stadijā. Lai pārbaudītu šo hipotēzi, veica STC atgūstamības pārbaudi no CFE kolonnas, izmantojot alus matricu un variējot acetonitrila daudzumu ūdens maisījumā.

STC atgūstamība no Strata X CFE kolonnas redzama **16. attēlā** kā acetonitrila satura funkcija acetonitrila-ūdens maisījumā.



16. att. CFE metodes attīrīšanas un eluēšanas soļu optimizēšana (n=3)

Fig. 16. Optimization of wash and elution steps of the SPE method (n=3)

Jo lielāks acetonitrila saturs, jo vieglāk eluēt STC no kolonnas. STC eluēšana no kolonnas sākas 30% acetonitrila ūdens šķīdumā, un tā sasniedz savu maksimumu 100% acetonitrila šķīdumā. Tātad piemaisījumu, kas varētu traucēt

tālākai analīzei, eluēšanai var izmantot 30% acetonitrila šķīdumu ūdenī, un STC eluēšanai no kolonnas – 100% acetonitrilu.

Atgūstamība, atkārtojamība un reproducējamība aprēķināta paralēliem paraugiem (n=18) ar standartpiedevām katrā standartpiedevas koncentrācijā. Izstrādātajai metodei ir laba atgūstamība un precizitāte (**6. tabula**).

6. tabula / Table 6.

**STC atgūstamība paraugos ar standartpiedevām, izmantojot AEŠH – UV metodi /
Recovery of STC from spiked samples using the HPLC – UV method**

Matrica / Matrix	Pievienotais STC daudzums / Spiked concentration, $\mu\text{g l}^{-1}$	Vidējais noteiktais STC daudzums / Mean found concentration, $\mu\text{g l}^{-1}$	Vidējā atgūstamība / Mean recovery, %	RSN_r / RSD_r , %	RSN_R / RSD_R , %
Gaišais alus / Light beer	0.50	0.63	126	9.2	12
	1.00	1.14	114	3.6	4.5
	5.00	4.07	81	9.8	11
	10.0	9.76	98	4.6	8.4
	25.0	20.2	81	2.2	5.1
	100	90.6	91	4.5	5.3
Tumšais alus / Dark beer	0.50	0.63	126	9.4	14
	1.00	1.09	109	7.5	11
	5.00	5.42	108	14	18
	10.0	10.8	108	8.6	12
	25.0	26.0	104	9.0	14
	100	88.5	88	3.3	5.5

AEŠH-UV-CFE metode STC satura noteikšanai gaišajā un tumšajā alū ir vienkārša un jutīga, tāpēc nav nepieciešama STC ķīmiskā modifikācija jutības paaugstināšanai. Metodei piemīt laba selektivitāte, precizitāte un atgūstamība, tāpēc metodi var lietot STC analīzēm analītiskajās laboratorijās.

Alus paraugi. STC konstatēja divos no 26 pārbaudītajiem gaišā un tumšā alus paraugiem. Tikai viens (11%) no deviņiem tumšā alus paraugiem un viens (6%) no 17 gaišā alus paraugiem bija piesārņoti ar STC. Tātad, no 26 pārbaudītajiem Latvijā ražotiem dažādu šķirņu alus paraugiem tikai divos (7.7%) konstatēja STC.

STC saturs pozitīvajos alus paraugos ir mazs un nevar nopietni apdraudēt cilvēku veselību, jo alus patēriņš Latvijā nav liels (tikai 61 litrs gadā jeb 167 mililitri dienā uz vienu pieaugušo). Tātad, ja cilvēks izdzer 167 ml alus dienā, kas satur STC $7.8 \mu\text{g l}^{-1}$, tad uzņem tikai $1.3 \mu\text{g}$ STC dienā. Tas ir daudz mazāk, nekā Čehijā un Slovākijā noteiktais maksimāli pieļaujamais STC daudzums ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). Protams, ja alus satur STC, jo vairāk alus cilvēks izdzer, jo lielāka iespēja uzņemt STC.

STC saturs pārbaudītajā Latvijā ražotā alū redzams **7. tabulā**.

STC saturs Latvijas ražotā alū / STC content in Latvian beer

Parauga numurs / Sample Nr.	Parauga nosaukums / Sample name	Alus tips / Beer type	Alus darītava / Brewery	Rezultāts, korigēts uz atgūstamību / Result corrected for recovery, $\mu\text{g l}^{-1}$
1.	Zelta	Gaišais	Aldaris	<ZRR
2.	Pilzenes	Gaišais	Aldaris	<ZRR
3.	Porteris	Tumšais	Aldaris	<ZRR
4.	Tumšais alus	Tumšais	Bauskas alus	<ZRR
5.	Gaišais alus	Gaišais	Bauskas alus	<ZRR
6.	Light	Gaišais	Cēsu alus	<ZRR*
7.	Porter	Tumšais	Cēsu alus	<ZRR
8.	Bocmanis	Gaišais	Cēsu alus	<ZRR
9.	Tumšais	Tumšais	Lāčplēsis	<ZRR
10.	Gaišais	Gaišais	Lāčplēsis	4.0
11.	Plostnieku	Gaišais	Lāčplēsis	<ZRR
12.	Gaišais	Gaišais	Latgales alus	<ZRR
13.	Mārtiņa gaišais	Gaišais	Latgales alus	<ZRR
14.	Mārtiņa tumšais	Tumšais	Latgales alus	<ZRR
15.	Melnais ūpis	Tumšais	Līvu alus	<ZRR
16.	Rubenis tumšais	Tumšais	Līvu alus	7.8
17.	Rubenis gaišais	Gaišais	Līvu alus	<ZRR
18.	Kuršu	Gaišais	Līvu alus	<ZRR
19.	Piebalga	Gaišais	Piebalgas alus	<ZRR
20.	Lux	Tumšais	Piebalgas alus	<ZRR
21.	Mīnhauzena alus	Gaišais	Piebalgas alus	<ZRR
22.	Oriģinālais	Gaišais	Tērvetes alus	<ZRR
23.	Tērvete	Gaišais	Tērvetes alus	<ZRR
24.	Senču	Gaišais	Tērvetes alus	<ZRR
25.	Gaišais alus	Gaišais	Užavas alus	<ZRR
26.	Tumšais alus	Tumšais	Užavas alus	<ZRR

*ZRR=0.68 g l⁻¹

Tā kā STC saturs alū var būt atkarīgs no tā satura miežos, vienmēr ir iespējams lielāks alus piesārņojums. STC veidošanos miežos, ražu glabājot, var ietekmēt dažādi faktori, piemēram, mitruma saturs gaisā, temperatūra utt. Iesala gatavošanas laikā arī iespējama piesārņošanās ar STC. Pelējumu sporu avots var būt arī apiņi. Tāpēc, lai novērstu STC klātbūtni alū, ieteicams kontrolēt tā saturu alus izejvielās.

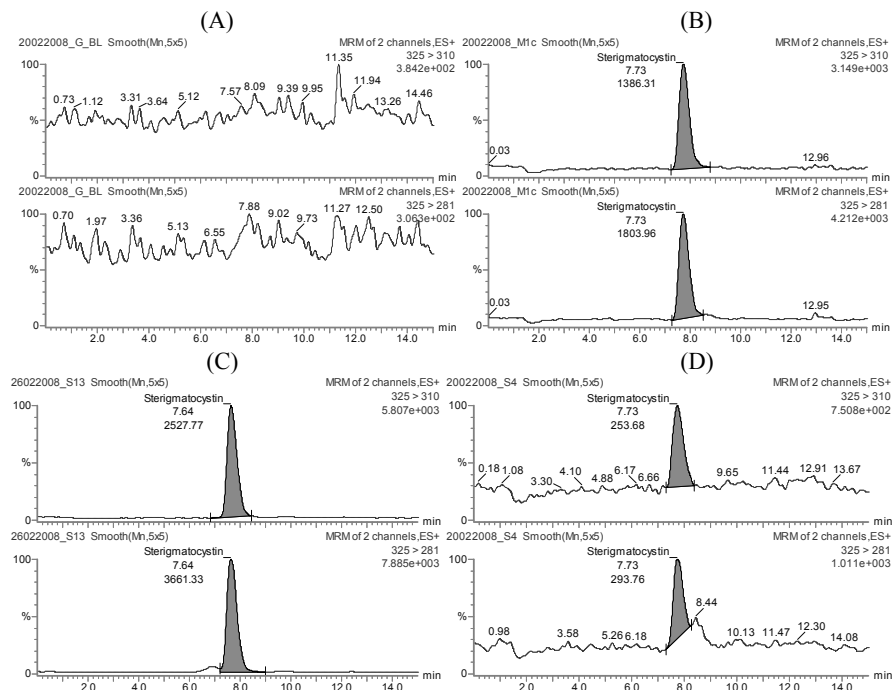
10. Sterigmatocistīna noteikšanas metodes izstrāde sierā

Izstrādāta AEŠH-MS-MS metode STC noteikšanai sierā un analizēts STC saturs astoņos dažādos Latvijā un 13 dažādos Beļģijā ražotos siera paraugos.

Parauga sagatavošana. Parauga sagatavošana ir līdzīga kā pie STC noteikšanas graudos, tikai nedaudz modificēta (mainīts parauga iesvars, lietota attaukošana ar

n-heksānu, mainīta kustīgās fāzes sastāva attiecība, kā arī konusa gāzes plūsmas ātrums). 10 g sasmalcināta un homogenizēta siera paraugam pievieno 50 ml acetnitrila ūdens maisījumu 90:10 (% , v/v) (STC ekstrahēšanai no parauga) un 10 ml *n*-heksāna (parauga attaukošanai). Paraugu ekstrahē 30 min, izmantojot horizontālo maisītāju un centrifugē (3500 min^{-1} , 10 min, $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pēc tam acetnitrila šķīduma slāni ($\sim 30\text{ ml}$) filtrē caur papīra filtru, 10 ml filtrāta atšķaida ar dejonizētu ūdeni un attīra, izmantojot Strata X (60 mg) CFE kolonnu. Attīrīšanas procedūra: kolonnu sagatavo, izlaižot 3.5 ml metanola, pēc tam 3.5 ml ūdens, tad atšķaidītu siera parauga ekstraktu (izmantojot CFE rezervuārus un CFE kolektoru). Kolonnu divas reizes skalo ar 3.5 ml 30% acetnitrila šķīduma ūdenī un STC eluē no kolonnas ar 3 ml 100% acetnitrila. Eluātu ietvaicē slāpekļa plūsmā $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā un sauso atlikumu izšķīdina $250\text{ }\mu\text{l}$ kustīgās fāzes. Kustīgās fāzes sastāvs: 0.02% skudrskābe acetnitrilā un 0.02% skudrskābes šķīdums ūdenī attiecībās 75:25 (% , v/v). Kalibrēšanas paraugus ar standartpiedevām sagatavo līdzīgi.

Selektivitāte. Metode ir selektīva, jo analīta signāls tikpat kā nepārklājas ar citu vielu signāliem (17.attēls).



17. att. Nepiesārņota siera parauga (A), siera parauga ar standartpiedevu ($0.5\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$) (B), dabiski piesārņota siera parauga (C) un siera parauga, kas satur STC zīmes (D), SRM (MRM) hromatogrammas

Fig. 17. SRM (MRM) chromatograms of blank cheese sample (A), spiked cheese sample ($0.5\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$) (B), naturally contaminated cheese sample (C) and cheese sample containing traces of STC (D)

ZNR un ZRR. Zemākā validācijas robeža sierā ir $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($S/F = 25$). ZNR un ZRR noteica, pievienojot standartpiedevas siera matricai un izrēķināja, izmantojot hromatogrāfisko un masspektrometrisko datu apstrādes programmu „Masslynx” ($ZNR = 3.3 \times S/F$; $ZRR = 10 \times S/F$). ZNR un ZRR attiecīgi ir $0.03 \mu\text{g kg}^{-1}$ un $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Kalibrēšana un linearitāte. AEŠH-MS-MS metodēs matricas sastāvdaļas traucē analīta jonizāciju, kas vienmēr rada matricas efektu, tādēļ kalibrēšanu vienmēr veic nepiesārņotā siera paraugā (Gauda siers no Beļģijas), pievienojot standartpiedevas. Siera matricu kalibrēja lineāros diapazonos no $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ līdz $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ g un no $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ līdz $200 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Metode ir lineāra kalibrēšanas diapazonā no $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ līdz $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($y = 2921x + 82$, $R^2 > 0.991$) un no $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ līdz $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($y = 2656x + 617$, $R^2 > 0.990$).

Atgūstamība un precizitāte. STC atgūstamība no siera matricas ir pietiekama – no 97 % līdz 104 %. Relatīvā standartnovirze liecina, ka metodes precizitāte ir pietiekama: 17-27 % (**8. tabula**).

8. tabula / Table 8.

STC atgūstamība siera paraugos ar standartpiedevām /
Recovery of STC from spiked samples

Pievienotā STC koncentrācija / Added concentration, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Noteiktā STC koncentrācija / Found concentration, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Vidējā atgūstamība / Mean recovery, %	RSN_r / RSD_r , %	RSN_R / RSD_R , %
5.0	4.8	97	23	20
10	9.6	96	27	21
25	26	103	25	18
100	104	104	24	20
200	205	103	17	19

STC saturs siera paraugos. Rezultāti, kas iegūti analizējot siera paraugus redzami **9. Tabulā**.

9. tabula / Table 9.

STC saturs dažādos Latvijas un Beļģijas siera paraugos /
STC presence in different Latvian and Belgium cheese samples

Parauga Nr. / Sample Nr.	Parauga nosaukums / Sample Name	Siera tips / Type of cheese	Izcelsmes valsts / Country of origin	Noteiktā STC koncentrācija / Found STC concentration, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Gala rezultāts / Final result
1.	Zelta	puscietais	Latvija	0.04	<ZRR
2.	Krievijas	puscietais	Latvija	<ZNR (zīmes)	<ZNR
3.	Holandes	cietais	Latvija	0.04	<ZRR
4.	Parito	cietais	Latvija	0.07	<ZRR

Tabulas nobeigums/ Continuation of the table

Parauga Nr. / Sample Nr.	Parauga nosaukums / Sample Name	Siera tips / Type of cheese	Izcelsmes valsts / Country of origin	Noteiktā STC koncentrācija / Found STC concentration, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Gala rezultāts / Final result
5.	Montenegro	cietais	Latvija	<ZNR (zīmes)	<ZNR
6.	Kamambērs 1	mīksta	Latvija	0.03	<ZRR
7.	Kamambērs 2	mīksta	Latvija	-	<ZNR
8.	Trikātas Blue	mīksta	Latvija	-	<ZNR
9.	Breugel	cietais	Beļģija	<ZNR (zīmes)	<ZNR
10.	Brugs Broodje	pusmīksta	Beļģija	-	<ZNR
11.	Brugse Blomme	mīksta	Beļģija	-	<ZNR
12.	Bouquet des Moines	mīksta	Beļģija	-	<ZNR
13.	Chevre Affine	mīksta	Beļģija	1.23	Pozitīvs
14.	Chimay	puscietais	Beļģija	<ZNR (zīmes)	<ZNR
15.	Orval	pusmīksta	Beļģija	0.03	<ZRR
16.	Oud Brugge	puscietais	Beļģija	-	<ZNR
17.	Passendale	pusmīksta	Beļģija	-	<ZNR
18.	St.Paulin	pusmīksta	Beļģija	<ZNR (zīmes)	<ZNR
19.	Nazareth	puscietais	Beļģija	-	<ZNR
20.	Watou Special	mīksta	Beļģija	0.52	Pozitīvs
21.	Gouda	cietais	Beļģija	-	<ZNR

STC virs ZRR tika konstatēts tikai divos (15%) no 13 Beļģijas sieriem jeb 9.5 % no visiem 21 analizētā siera paraugiem. Četros (50%) no astoņiem Latvijas sieriem STC saturs bija augstāks par ZNR, bet zemāks par ZRR. Pieci (24%) no 21 analizēta parauga saturēja STC virs ZNR, bet zem ZRR, un četri (19%) no 21 parauga saturēja STC zīmes.

Kā redzams no iegūtajiem rezultātiem, sieru piesārņojums ar STC ir iespējams. Lai novērstu STC veidošanos sierā, svarīgi ir nepieļaut netipisku pelējumu izplatību siera gatavošanas un nogatavināšanas telpās, stingri ievērojot higiēnas un uzglabāšanas noteikumus.

KOPSAVILKUMS

Apkopojot darbā iegūtos rezultātus, var izdarīt šādu kopsavilkumu:

1. Eksperimenti STC noteikšanas optimizēšanai, izmantojot augstefektīvu šķidrums hromatogrāfiju tandēma masspektrometriju, tika veikti divos posmos.
 - Pirmajā posmā veikti eksperimenti par kustīgās fāzes sastāva ietekmi uz STC izdalīšanas laiku no Phenomenex Luna(2) C₁₈ AEŠH kolonnas.
Iegūtie rezultāti rāda, ka STC ilgāk aizturas uz kolonnas, ja kā kustīgo fāzi lieto acetnitrila-0.02M amonija acetāta šķīdumu. Metanola-ūdens un acetnitrila-0.01% skudrskābes un acetnitrila-0.02% skudrskābes šķīdumiem ir vidējs eluēšanas laiks, un visātrāk STC eluējas no kolonnas ar acetnitrila-ūdens šķīdumiem. Iegūto informāciju var izmantot STC izdalīšanas laika regulēšanai, lai mainītu (paātrinātu vai kavētu) analīzes laiku.
 - Otrais augstefektīvas šķidrums hromatogrāfijas tandēma masspektrometrijas metodes izstrādes etaps ir stabilu molekulāro jonu iegūšana STC identifikācijai un kvantitatīvai noteikšanai. Eksperimenti tika veikti, izmantojot STC standartšķīdumu, kas tika ievadīts ar ASĶJ un EIJ aprīkotā tandēma masspektrometrā. To veica pozitīvajos un negatīvajos jonizācijas režīmos, lietojot dažādu konusa spriegumu un dažādu fragmentācijas enerģiju.
Rezultāti rāda, ka optimālākais jonizācijas režīms STC detektēšanai ir AEŠH-EIJ⁺-MS-MS ar konusa spriegumu 30 V un fragmentācijas enerģiju 30 eV. Tika iegūts protonētais molekulārais jons ar molmasu 325 g mol⁻¹, kuru tālāk fragmentēja līdz tā šķembu joniem ar molmasām 281 g mol⁻¹ un 310 g mol⁻¹. Jons ar molmasu 281 g mol⁻¹ tika izmantots STC satura rēķināšanai, bet jons ar molmasu 310 g mol⁻¹ – STC kvalitatīvai pierādīšanai.
2. Pētītas STC eluēšanas iespējas no Strata X un Strata C₁₈ CFE kolonnām, izmantojot dažādus acetnitrila-ūdens un metanola-ūdens maisījumus, kā arī pārbaudīta kolonnu piemērotība STC CFE veikšanai.
Iegūtie rezultāti apliecina, ka:
 - gan acetnitrilu un tā ūdens šķīdumus, gan metanolu un tā ūdens šķīdumus var izmantot STC eluēšanai no Strata X un Strata C₁₈ CFE kolonnām, iegūstot statistiski vienādus rezultātus;
 - ekonomisko apsvērumu dēļ tālākiem eksperimentiem tika izvēlēta Strata X CFE kolonna un CFE procedūru realizēšanai acetnitrils un tā ūdens šķīdumi.
3. Noteikta STC stabilitāte dažādos šķīdinātajos atkarībā no uzglabāšanas laika un temperatūras. Eksperimentos ar STC standartšķīdumiem acetnitrilā, metanolā un to maisījumā tilpumu attiecībās 50:50 (% v/v), kas uzglabāti -25 °C, +4 °C un +25 °C temperatūrā astoņas nedēļas. Paraugi analizēti, izmantojot AEŠH-UV. Pētījuma rezultāti rāda, ka:
 - STC ir nestabils, uzglabājot +25°C temperatūrā jebkurā no izmantotajiem šķīdinātajiem;

- STC ir stabils vienu nedēļu, uzglabājot to temperatūras intervālā no $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ līdz $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ jebkurā no izmantotajiem šķīdinātājiem.
4. Pētīta STC stabilitāte paaugstinātā temperatūrā. Eksperimentos ar STC standartšķīdumiem, kas tika karsēti $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+105\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+115\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15, 30 un 60 minūtes, konstatēts, ka:
 - STC ir termiski stabils vismaz līdz $+115\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai vismaz 60 minūtes;
 - tāvad STC varētu būt termiski stabils, arī ceptot maizi (krāsns temperatūra $+200\text{--}240\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatūra maizes iekšienē $+95\text{--}96\text{ }^{\circ}\text{C}$) vai citus miltu izstrādājumus, ja to izejvielas saturēs STC.
 5. Pētīta dažādu STC ekstrakcijas šķīdinātāju efektivitāte no graudu un siera matricas. Analizējot iegūtos rezultātus, izvēlēti šādi STC ekstrakcijas šķīdinātāju maisījumi:
 - STC ekstrakcijai no graudiem – acetonnitrila-ūdens šķīdums attiecībās 84:16 (% v/v);
 - STC ekstrakcijai no siera – acetonnitrila-ūdens šķīdums attiecībās 90:10 (% v/v).
 6. Izstrādāta un validēta AEŠH-MS-MS STC noteikšanas metode graudos, kurā izmantoja parauga ekstrakciju ar acetonnitrila-ūdens maisījumu, CFE uz Strata X CFE kolonnas, separēšanu uz šķīdumu hromatogrāfijas C_{18} kolonnas un STC detektēšanu, izmantojot AEŠH-MS-MS ar pozitīvo EIJ. Metodes validācijas rezultāti atbilst Eiropas Komisijas Regulas (EK) Nr. 401/2006 prasībām.
 - Šī analīzes metode ļauj noteikt STC saturu dažādos graudos $0.15\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ koncentrācijā;
 - izmantojot izstrādāto metodi, tika analizēts STC saturs dažādos Latvijas graudos (kviešos, miežos, auzās, rudzos un griķos). 95 paraugi tika savākti 2006. gadā un 120 paraugi – 2007. gadā. 14% 2006. gada graudu paraugu saturēja STC ($0.7\text{--}83\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$) un 35% 2007. gada graudu ražas paraugu saturēja STC ($1\text{--}47\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$);
 - pētījumi par STC saturu graudos liecina, ka Latvijā audzēti graudi satur STC, un līdz ar to ir iespējama tā klātbūtne arī graudu izcelsmes produktos.
 7. Pētīta STC stabilitāte maizes gatavošanas tehnoloģiskajā procesā. Kviešu maizes cepšanai tika izmantoti dabiski STC saturoši kviešu graudi. Izcēptos kviešu maizes paraugos ($n=6$) pārbaudīja STC saturu, izmantojot izstrādāto AEŠH-MS-MS analīzes metodi. Pētījums par STC stabilitāti rāda, ka:
 - STC ir termiski stabils visos maizes gatavošanas tehnoloģiskajos posmos. Lai novērtētu STC saturu Latvijā ražotā maizē, ir nepieciešams veikt STC satura pētījumus maizē;
 - lai samazinātu šī mikotoksīna nokļūšanu maizē, ir ieteicama STC satura kontrole graudos.
 8. Veikts pētījums par STC saturu Latvijā ražotā maizē. STC saturs tika analizēts 29 dažādos maizes paraugos (sešos rudzu, deviņos rudzu-kviešu un 14 kviešu) no dažādām Latvijas maiznīcām. Analīzes veica, izmantojot iepriekš izstrādāto AEŠH-MS-MS metodi (Veršilovskis et al., 2007).

- 17% no pārbaudītajiem maizes paraugiem saturēja STC ($2.4-7.1 \mu\text{g kg}^{-1}$). No pieciem piesārņotajiem paraugiem četri (80%) saturēja graudus un pilngraudu miltus;
 - šis pētījums par STC saturu Latvijā ražotā maizē norāda uz varbūtību, ka maizes cepšanai tika izmantoti STC saturoši milti;
 - kaut gan STC saturs ir salīdzinoši neliels, pilngraudu maize var būt potenciāls STC avots;
 - lai novērstu STC nokļūšanu maizē, ieteicama pastāvīga STC satura kontrole graudos un miltos.
9. Tika izstrādāta jutīga STC noteikšanas metode alū. Metodē tiek izmantota gaišā un tumšā alus CFE uz Strata X CFE kolonnām un apgrieztās fāzes AEŠH ar UV detektēšanu.
- Lineārā diapazonā no 0.5 līdz $100 \mu\text{g l}^{-1}$ atgūstamība no gaišā alus matricas bija 81-126%, no tumšā alus matricas 88-126% ar variācijas koeficientiem no 2.2 līdz 14%;
 - no 26 pārbaudītajiem Latvijā ražotu dažādu šķirņu alus paraugiem tikai divos (7.7%) konstatēja STC klātbūtni;
 - AEŠH-UV-CFE metode STC satura noteikšanai gaišajā un tumšajā alū ir vienkārša un jutīga, tāpēc nav nepieciešama STC ķīmiskā modifikācija jutības paaugstināšanai;
 - metodei piemīt laba selektivitāte, precizitāte un atgūstamība, tāpēc metodi var lietot STC analīzēm analītiskajās laboratorijās;
 - rezultāti, kas iegūti, pētot STC saturu dažādos alus paraugos, liecina, ka STC saturs alū ir salīdzinoši mazs. Taču piesārņošanas risks vienmēr pastāv;
 - lai novērstu STC klātbūtni alū, ir ieteicama STC satura kontrole alus izejvielās.
10. Tika analizēts STC saturs astoņos dažādos Latvijā un 13 dažādos Beļģijā ražotos siera paraugos. STC noteikšanai sierā tika modificēta un pielāgota iepriekš izstrādātā AEŠH-MS-MS metode STC noteikšanai graudos (Veršilovskis et al., 2007).
- Tikai divi (9.5%) no 21 pārbaudītā siera paraugiem bija piesārņoti ar STC virs zemākās rēķināšanas robežas (ZRR). Pieci paraugi (24%) saturēja STC virs ZNR, taču zem ZRR. Četri paraugi (19%) saturēja STC zīmes;
 - izstrādātā AEŠH-MS-MS metode STC noteikšanai sierā ļauj noteikt STC koncentrācijā $0.03 \mu\text{g kg}^{-1}$;
 - metodi var lietot kvalitatīvai un kvantitatīvai STC noteikšanai siera paraugos analītiskajās laboratorijās, ka arī dažādiem STC satura pētījumiem;
 - šis ir pirmais pētījums, kas pierāda STC saturu Latvijas un Beļģijas sieros.

SECINĀJUMI

1. Promocijas darbā izstrādāta STC noteikšanas metode, optimizēta kustīgā fāze un noteikti optimālie STC jonizācijas un fragmentācijas parametri.
2. Izstrādāta un optimizēta STC cietfāzes ekstrakcijas metode, izmantojot Strata X CFE kolonnu un acetonnitrila-ūdens šķīdumus.
3. Pētīta STC stabilitāte dažādos šķīdinātajos atšķirīgā temperatūrā uzglabāšanas laikā.
 - STC ir nestabils, uzglabājot +25°C temperatūrā jebkurā no izmantotajiem šķīdinātajiem (acetonitrils, metanols, acetonnitrila un metanola maisījums (50:50, v/v));
 - STC ir stabils vienu nedēļu, uzglabājot to temperatūras intervālā no -25 °C līdz +4 °C jebkurā no izmantotajiem šķīdinātajiem (acetonitrils, metanols, acetonnitrila un metanola maisījums (50:50, v/v));
4. STC ir termiski stabils vismaz līdz +115 °C temperatūrai vismaz 60 minūtes.
5. Izstrādāta jauna jutīga AEŠH-MS-MS STC noteikšanas metode graudos. Metode ir aptuveni **33 reizes jutīgāka** (ZNR 0.15 µg kg⁻¹), salīdzinot ar literatūrā publicēto GŠH-MS metodi (ZNR 5 µg kg⁻¹), un aptuveni **12 reizes jutīgāka**, salīdzinot ar literatūrā publicēto AEŠH-MS metodi (ZNR 1.9 µg kg⁻¹). Analizējot Latvijā ražotus graudus (kviešus, rudzus, auzas, miežus un griķus), 14% 2006. gada graudu paraugu saturēja STC (0.7-83 µg kg⁻¹) un 35% 2007. gada graudu paraugu saturēja STC (1-47 µg kg⁻¹).
6. Izmantojot izstrādāto jutīgo AEŠH-MS-MS metodi, pētīta STC stabilitāte maizes cepšanas procesā. Noteikts, ka STC ir stabils visos maizes gatavošanas tehnoloģiskajos posmos, līdz ar to tas var pāriet maizē no STC saturošiem graudiem.
7. Izmantojot izstrādāto AEŠH-MS-MS metodi, pētīts STC saturs dažādos Latvijā ražotos maizes paraugos (kviešu, rudzu, rudzu-kviešu maizē). 17% no analizētajiem maizes paraugiem saturēja no 2.4 līdz 7.1 µg kg⁻¹ STC.
8. Izstrādāta CFE-AEŠH-UV metode STC satura noteikšanai gaišajā un tumšajā alū (ZNR 0.26 µg l⁻¹). No analizētajiem Latvijā ražotiem tumšā un gaišā alus paraugiem 7.7% konstatēja STC (4.0-7.8 µg l⁻¹).
9. Izstrādāta AEŠH-MS-MS metode STC satura noteikšanai sierā ir aptuveni **80 reizes jutīgāka** (ZNR 0.03 µg kg⁻¹), salīdzinot ar jutīgāko publicēto STC noteikšanas šķidrumu hromatogrāfijas masspektrometrijas metodi (ZNR 2.4 µg kg⁻¹). Latvijā un Beļģijā ražotā sierā STC virs 0.1 µg kg⁻¹ (ZRR) tika konstatēts 9.5% no analizētajiem siera paraugiem, 24% saturēja STC virs 0.03 µg kg⁻¹ (ZNR) un 19% saturēja STC zīmes.
10. Pat, ja STC saturs nepārsniedz pieņemtās normas katrā atsevišķā produktā, uzņemot tos vienlaicīgi, šī toksīna koncentrācija var sasniegt maksimāli pieļaujamo robežu, tāpēc ir nepieciešama STC satura kontrole pārtikas izejvielās.

IETEIKUMI PĒTNIEKIEM UN ANALĪTISKAJĀM LABORATORIJĀM

1. STC detektēšanai pielietojot citu ražotāju tandēma masspektrometru, vispirms jāpārbauda STC molekulas jonizācija un fragmentācija, izmantojot šajā darbā aprakstītos parametrus.
2. STC izdalīšanai, izmantojot darbā aprakstītos parametrus, var izmantot jebkuru AEŠH kolonnu, kas pildīta ar C_{18} sorbentu. Ja kolonnas iekšējais diametrs un sorbenta daļiņu izmēri atšķiras no darbā aprakstītajiem, tad STC izdalīšanas laika koreģēšanai ir jāoptimizē kustīgās fāzes sastāva proporcijas un plūsmas ātrums.
3. STC cietfāzes ekstrakcijai var pielietot jebkuras citas CFE kolonnas, kas pildītas ar tādu pašu sorbentu. Ja CFE plānots pielietot CFE kolonnas, kas pildītas ar kādu citu sorbentu, tad jāoptimizē CFE apstākļi (STC eluēšanas parametri, izmantojot konkrētos organiskos šķīdinātājus un to maisījumus).

ACTUALITY OF THE RESEARCH

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi. Their presence in food and feed are a health risk for animals and humans. They can be found in a diverse range of food and feed due to invisible spoilage in the field during plant growth, harvesting, storage, and processing. It can be assumed that about 25% of food products (mainly of plant origin) are substantially contaminated and it is always cause of economic losses.

There are known more than 31 000 different fungal metabolites, among them about 300 – 400 are mycotoxins. Two main routes of exposure have been identified, which are the inhalation of mycotoxins (often associated to spores) produced by indoor moulds and the consumption of mycotoxins with food that has been spoiled by toxigenic moulds either before harvest or at storage. However, only a small fraction of approximately 20 out of these mycotoxins are normally found in food and feed at levels that are considered to be a health risk for humans and animals. Spoilage fungi such as *Aspergillus*, *Penicillium* or *Alternaria* produce most of the remaining mycotoxins that are able to infect food and feed upon the storage.

It is now well established that mycotoxicoses (the diseases caused by mycotoxins: ergotism, alimentary toxic aleukia, aflatoxicosis etc) have been responsible for major epidemics in man and animals at least during recent historic times. Mycotoxins can be acutely or chronically toxic, or both, depending on the kind of toxin and the dose. In animals, acute diseases include liver and kidney damage, attack on the central nervous system, skin disorders, and hormonal effects. Toxins that act on the liver and kidney are especially difficult to detect because they act on these organs in lower concentration levels (causing the cancer) before any intoxication symptoms can be found.

Food-based mycotoxins extensively were studied worldwide throughout the 20th century. In Europe there is worked out a set of European directives and regulation protocols to monitor a range of mycotoxins permitted in food and animal feed.

One of *Aspergillus* and other fungi mycotoxins is sterigmatocystin (STC) – a precursor of aflatoxin B₁ (AFB) in the biological transformation. It is equally carcinogenic as AFB is, but unlike to AFB, information about its presence in food is not sufficient. Described analytical methods of determination of STC in literature are out of date and are not sensitive and selective enough.

This Doctoral thesis is devoted to development of new sensitive analytical methods for determination of the carcinogenic mycotoxin – sterigmatocystin (STC) in foodstuffs by using liquid chromatography and tandem mass spectrometry methods. There were studied a number of science literature sources about STC carcinogenicity, toxicity, effects on human health, presence of STC in different foodstuffs and STC determination in different foodstuffs by using various analytical methods. To evaluate effect of STC on Latvian people health the research studies about its occurrence in foodstuffs are necessary, therefore, it is essential to develop sensitive methods for the determination of STC in foodstuffs. There were analyzed previous developed analytical methods, and acquired

information was used for the development of new more sensitive methods, which meet the standard of present time and which could more precisely determine STC in different foodstuffs and recommend them to the official STC control in foodstuffs, wherewith reducing the risk for human health. There is worked out STC solid phase extraction method, which improves the purifying and concentration of the sample during sample preparation process. Obtained STC mass spectra and developed high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for STC determination in different grains, cheeses and breads. Worked out high performance liquid chromatography method for STC determination in beer. The developed methods were validated in accordance with prescribed European Commission Regulation (EC) Nr. 401/2006, IUPAC (Thompson et al., 2002) and CEN (European Committee of Standardization) (CEN, 1999) validation requirements. Using these developed methods was analyzed STC stability during bread baking process and it was proved, that STC is stable. There was checked the STC presence in grains, which were harvested in Latvia during the years 2006 and 2007 (together 215 samples) and found out the presence of STC in part of them. Also, there was tested STC presence in light and dark beers produced in Latvia and STC was detected in part of them. The presence of STC was checked in cheeses, produced both in Latvia and in Belgium, and in result STC was found in some samples. As a result, there are offered a number of suggestions in the end.

Object of study – grains (wheat, buckwheat, barley, oat and rye), bread, beer, cheese and STC stability in standard solutions and during bread baking.

The aim of research work – development of new sensitive analytical methods for the determination of sterigmatocystin in foodstuffs and its estimation in different grain, bread, beer and cheese samples and to test STC stability in standard solutions and during bread baking.

In order to achieve the aim, the following **tasks** were advanced:

- 1) development high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric detection of STC: optimization of mobile phase and massspectrometric parameters;
- 2) development and optimization of solid phase extraction of STC;
- 3) researching stability of STC in different solvents under different temperatures;
- 4) development of new method for the analysis of STC in Latvian grains (wheat, buckwheat, barley, oat and rye);
- 5) researching stability of STC during bread baking;
- 6) researching the presence of STC in different Latvian bread samples;
- 7) development of new sensitive method for the analysis of STC in beer and analyzing the presence of STC in different Latvian beer samples;
- 8) development of new sensitive method for the analysis of STC in cheese and analyzing the presence of STC in Latvian and Belgium cheese.

Doctoral thesis is structured into three chapters:

Chapter 1. Review on sterigmatocystin in foodstuffs. Chemical and physical properties, toxicity, analytical methods, natural occurrence of STC.

Chapter 2. Materials and methods used during doctoral thesis investigations.

Chapter 3. Development of new analytical methods for the determination of STC in foodstuffs. Tandem mass spectrometric detection of STC. SPE development of STC. STC stability in standard solutions and during bread baking etc. STC determination in foodstuffs using developed analytical methods. Research results and discussion.

Scientific novelty of the Doctoral thesis:

1. Development of new analytical methods for the determination of sterigmatocystin in different grains, bread, beer and cheese. The sensitivity of the developed methods is several times (12-80) higher than older analytical method and this is the reason why we recommend our methods as possible methods for the official control of STC in food systems, and as methods for the research of STC content in different food systems.
2. For the first time were researched distribution of STC in different Latvian grains, beer, bread and Latvian and Belgium cheese.

Economic significance of the Doctoral thesis:

Developed methods can be applied for the qualitative and quantitative monitoring of STC in different foodstuffs as well as for STC content research in different food systems. Thereby we can partially prevent the presence of STC in animal and human food chain.

Work is written on 105 pages, including 29 figures, 15 tables, and overall 145 sources of literature were analyzed.

APPROBATION OF THE RESEARCH WORK

Results of the research work were published in four international peer reviewed journals and in four peer reviewed international scientific proceedings in English.

1. **Veršilovskis A.**, Bartkevičs V., Miķelsone V. Analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry with electrospray positive ionization. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1157, 2007, p. 467-471.
2. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Sterigmatocystin stability and presence in Latvian grains. **In:** *Consumer Protection through Food Process Improvement & Innovation in the Real World: Proceedings of 5th International Congress on Food technology*, 9-11 March, 2007, Thessaloniki, Greece: Hellenic Association of Food Technologists, North Greece Branch, Vol. 1, 2007, p. 411-415.
3. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Elaboration of solid phase extraction method for analysis of sterigmatocystin. **In:** *Research for rural development 2007: International Scientific Conference Proceedings*, 16-18 May, Jelgava, Latvia. Jelgava: LLU, 2007, p. 107-111.
4. **Veršilovskis A.**, Bartkevičs V., Miķelsone V.. Sterigmatocystin presence in typical Latvian grains. *Food Chemistry*, Vol. 109, 2008, p. 243-248.

5. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Sterigmatocystin presence in different Latvian bread samples. **In: *FoodBalt – 2008: 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology proceedings***, 17-18 April, Jelgava, Latvia. Rīga: Drukātava, 2008, p. 156-160.
6. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Effect of time, temperature and solvent on the stability of sterigmatocystin standard solutions. **In: *Research for rural development 2008: Annual 14th International Scientific Conference Proceedings***, Jelgava, Latvia. Jelgava: LLU, 2008, p. 291-295.
7. **Veršilovskis A.**, De Saeger S., Miķelsone V. Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. ***World Mycotoxin Journal***, Vol. 1, No. 2, 2008, p. 161-166.
8. **Veršilovskis A.**, van Peteghem C., De Saeger S. Determination of sterigmatocystin in cheese by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. ***Food Additives and Contaminants: Part A***, Vol. 26, No. 1, 2009, p. 127-133.

Research results were reported in five international scientific conferences in Latvia, Greece and Spain.

1. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Sterigmatocystin stability and presence in Latvian grains. ***5th International Congress on Food Technology***. Thessaloniki, Greece, 9-11 March, 2007 (*poster presentation*)
2. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Elaboration of solid phase extraction method for analysis of sterigmatocystin. ***International Scientific Conference: Research for rural development 2007***. Latvia university of Agriculture, Jelgava, Latvia, 16-18 May, 2007 (*oral presentation*)
3. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Sterigmatocystin presence in different Latvian bread samples. ***3rd Baltic Conference on Food Science and Technology proceedings: FoodBalt – 2008***. Latvia university of Agriculture, Jelgava, Latvia, 17-18 April, 2008 (*poster presentation*)
4. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Effect of time, temperature and solvent on the stability of sterigmatocystin calibrants. ***International Scientific Conference: Research for rural development 2008***. Latvia university of Agriculture, Jelgava, Latvia, 21-23 May, 2008 (*oral presentation*)
5. **Veršilovskis A.**, Miķelsone V. Stability of sterigmatocystin during bread baking. ***13th ICC (International Association for Cereal Science and Technology) Cereal and Bread congress***. Madrid, Spain, 15-18 June, 2008 (*poster presentation*)

MATERIALS AND METHODS

The research work has been elaborated at several institutions in Latvia and Belgium between 2006 and 2009:

1. ***Latvia University of Agriculture:***
 - Department of Food technology

- Department of Chemistry
- 2. ***Food and Veterinary Service of the Republic of Latvia***
 - National Diagnostic Centre, Food and environmental investigation laboratory, Instrumental analysis division
- 3. ***Ghent University (Belgium)***
 - Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Bio Analysis, Laboratory of Food Analysis
- 4. In cooperation with ***Ministry of Agriculture of Latvia***
 - Plant Protection Research Centre

Doctoral thesis research was made in accordance with previously developed scheme, which in simplified way is shown in **Figure 1**.

So, in the thesis it is planned to optimize mobile phase, where with it will be possible to choose optimal STC retention time. There will be optimized mass spectrometric parameters (ionization and fragmentation) and got STC parameters for mass spectrometric detection. Further, it is planned to work out a solid phase extraction method, check new CFE columns and to check STC stability in different solvents under different temperatures depending on time. Acquired information will be used for HPLC and LC-MS-MS method development in for different foodstuffs – grains, bread, beer, and cheese. The newly developed STC determination methods will be used for STC content analysis in bread, grains, beer, and cheese.

In research, the following methods were used:

1. Extraction with organic solvent mixtures (acetonitrile:water, 84/14 and 90/10, %, v/v) used for the extraction of STC from samples (grains, bread, cheese).
2. Solid phase extraction (SPE) used for the cleanup and concentration of the sample extracts.
3. An evaporating under nitrogen steam used for the concentration of the eluted sample extracts.
4. For the detection and chromatographic separation of STC, a high performance liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection was used.
5. Validations of the analytical methods were done according to European Commission Regulation (EC) Nr. 401/2006, IUPAC and CEN recommendations. During validation, the following parameters checked: selectivity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, recovery, repeatability and reproducibility.

Mathematical data processing

For acquired results, an arithmetical means and standard deviations calculated using *Microsoft Office Microsoft Excel for Windows 7.0* program. All experiments performed using 6 – 8 parallel samples.

To compare obtained results t-test variance analysis (according to which if t_{stat} is smaller than t_{crit} the conclusion is that there is no significant statistical difference in obtained results), as well as single factor analysis of variance (ANOVA) was

used according to which if F_{stat} is smaller than F_{crit} the conclusion is that there is no significant statistical difference in obtained results. To compare the results integrated statistical calculation of *Microsoft Office Microsoft Excel for Windows 7.0* program was used.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Optimization of the detection of STC using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Experiments for the optimization of the detection of STC using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry were performed in two steps. During the first step an influence of different mobile phase content (AcN/H₂O, AcN/ 0.01 and 0.02% formic acid, AcN/ 0.02M ammonium acetate and MeOH/H₂O, content of AcN and MeOH was regulated from 40 till 80%) on the STC retention time on Phenomenex Luna(2) C₁₈ HPLC column was checked. During the second step experiments were performed using STC standard solution, which was several times injected into the triple quadrupole mass spectrometer. Mass spectrometer was equipped with APCI and ESI. STC detection was optimized under negative and positive modes using variable cone voltages and collision energies.

First step experiments results showed that using AcN/ 0.02M ammonium acetate as mobile phase, STC retention times are higher, using MeOH/H₂O, AcN/ 0.01 and 0.02% formic acid as mobile phases, STC have medium retention times; and using AcN/H₂O as mobile phase STC retention times are comparatively short (STC was fasted eluted from HPLC column) (**figure 3**).

Second step experiments showed that best results were obtained under positive electrospray ionization ESI using cone voltage of 30 V (**figure 4**) and collision energy of 30 eV. Precursor molecular ion obtained was 325 g mol⁻¹ (**figure 5**) and obtained product ions were 281 g mol⁻¹ and 310 g mol⁻¹ respectively (**figure 6**). Product ion with molecular mass of 281 g mol⁻¹ was used for quantification of the STC and product ion with molecular mass of 310 g mol⁻¹ was used for confirmation of the STC (**figure 7**). For confirmation of the presence of the STC ratio (281 / 310) should be 0.7 ± 0.1 .

Obtained results are fundamental base for the further STC detection method development.

2. Development of solid phase extraction method for the analysis of sterigmatocystin

Since mycotoxins are normally present in food and food products at very low levels, a strong concentration of the extract is necessary to make the detection possible. The frequent presence of lipids and other substances that may interfere in the final detection makes it necessary to clean up the extract prior to concentration by column clean up and/or precipitation of impurities. Several chromatographic clean up steps are possible with materials such as silica gel, modified silica gel, aluminium oxide, polyamide, Florisil[®], and Sephadex[®]. Modified silica gel with

bonded octadecyl is the most frequently used sorbent (it is called C₁₈ sorbent, and SPE columns are called C₁₈ columns). These columns are considered universal because they can be used for moderately polar and non-polar combinations. C₁₈ columns are often used in reversed phase chromatography.

In literature there is an information, that for STC determination before TLC sample extracts are purified by SPE columns with *Florisil*[®] sorbent (magnesium silicate), different *Silicagel* SPE columns and by phenyl-bonded SPE silicagel columns.

Strata X SPE column contain a new polymeric sorbent – styrene divinylbenzene. It is developed for the reversed phase (RP) SPE of polar and non-polar molecules and it is characterized by hydrophobic and hydrophilic or $\pi - \pi$ delay mechanisms.

Although STC molecule is non-polar, it has both hydrophilic, and hydrophobic functional groups, so it is possible, that STC molecule will hold to Strata X sorbents rather, than to C₁₈ sorbent. Whereby it becomes possible to use more effective elution solvent and wash out more impurities from the extract sample.

During these investigation an elution properties of the different eluting solutions (acetonitrile – water and methanol – water) were checked for elution straight of STC from the Strata X and Strata C₁₈ SPE columns, varying the water content in mixture. The collected eluting solutions fractions were analyzed for content of STC by LC-MS-MS. Strata X and Strata C₁₈ SPE columns for the first time were applied for the analysis of STC.

Total STC elution result from Strata X and Strata C₁₈ columns are shown in **Figure 8**. Obtained results were compared by using t-test, eluting solutions and SPE column comparing matrix are shown in **Table 1**.

Both acetonitrile and acetonitrile – water solutions, and methanol and methanol-water solutions are useful for the STC eluting from the Strata X and Strata C₁₈ SPE columns getting statistically equivalent results.

Because of economic approaches for the further experiments a Strata X SPE column chosen, acetonitrile and acetonitrile-water solutions chosen because of that as well.

3. Effect of storage time, solvents and temperature on the stability of STC standard solutions

To make precise and accurate chromatographic analysis it is needed to calibrate equipment with analyte standard solutions. Their stability differs depending on solutions and temperature they are kept in.

The aim of this study is to establish conditions under which the STC calibrants in acetonitrile, methanol and mixture of acetonitrile and methanol (50:50, v/v) could be held for extended periods without decomposition and to test stability of STC in mentioned above solvents during 8 weeks.

STC standard solutions were prepared in different solvents (acetonitrile, methanol and mixture of both mentioned) and stored in dark glass bottles under different temperature conditions up to 8 weeks.

To provide storage at (–25 °C) temperature, dark glass bottles with standard solutions were stored in laboratory freezer, to provide storage at +4 °C they were

stored in laboratory refrigerator and to provide storage at +25 °C they were stored in laboratory microbiological incubator with forced convection.

After first, second, fourth and eighth week the samples was checked for STC concentration by using HPLC with ultraviolet detection (HPLC-UV).

The results of STC stability in acetonitrile, methanol, and their mix solutions at different temperatures are shown in **Figure 9**.

Obtained results were compared using t-test and they are the following:

- STC is not stable in any of investigated solvents if stored at +25 °C temperature;
- STC is stable in any of investigated solvents if stored at temperature range from -25 °C till +4 °C, but no longer than one week.

4. Influence of high temperature and time on the stability of STC standard solutions

Influence of high temperature and time on the stability of STC standard solutions was investigated. Obtained results (**figure 10**) show that STC is stable in temperature range until +115 °C at least during 60 minutes. Therefore, STC can be stable during bread or bread products baking.

5. The efficiency of extraction solvents

The efficiency of extraction solvents (AcN/H₂O and AcN/4%KCl, MeOH/H₂O and MeOH/4%KCl in ratios of 84/16, 85/15, 90/10 un 100, %, v/v) was tested.

Obtained results show that more suitable STC extraction solvent from grain and cheese matrix is AcN-water mixture (**figure 11**) and there is no statistical significance between usages of specified AcN-water mixture ratios. Therefore, for the extraction of STC from grains, an AcN-water solution (84:16, v/v) is chosen and for the extraction of STC from cheese, an AcN-water solution (90:10, v/v) is chosen.

6. Development of sterigmatocystin determination in grains

Grains like wheat, oat, rye, barley, and buckwheat are typical grains that are used as main ingredients of various Latvian foods. Wheat is used for flour, bread and other grain derived products production. Oats are the main ingredient for oat mash making, oat cookies making and oat flakes production. Rye is a main ingredient for typical Latvian rye bread making. Buckwheat and oats are used for mash making. Barley is a main ingredient for beer making and beer is quite popular drink in Latvia. Therefore, grain derived products are one of the main ingredients of Latvian people food.

STC is a mycotoxin produced by mould, and it can be a grain contaminant. Very little data is available concerning occurrence and monitoring of foodstuffs for STC in Europe. There are only few reports about the occurrence of STC in grains, but there is no information about STC levels in grains below 2 µg kg⁻¹, because used analysis methods were not sensitive enough. Besides, there is no data consisting occurrence and presence of STC in Latvian grains.

Therefore, the aim of this research is to develop new method, which will allow to determine STC presence and concentration at the level lower than $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ and to check STC content in the harvest of Latvian typical grains in the years 2006 – 2007.

Grain samples. Grain samples (50 wheat, 15 oats, 10 ryes, 10 barley and 10 buckwheat samples) were collected from different parts of Latvia in autumn 2006 and grain samples (20 wheat, 25 oats, 25 ryes, 25 barley and 25 buckwheat samples) were collected from different parts of Latvia in autumn 2007. Samples were collected using cooperation with Latvian Plant Safety Research Centre, according to the Commission Regulation (EC) No 401/2006.

After the harvest, the grains were air-dried to a water content of less than 15% to avoid fungal growth during storage. Before the analysis, the samples were grounded and homogenized with a laboratory mill.

Sample preparation. An amount of 25 g of homogenized sample was extracted with 100 ml of acetonitrile:water (84:16, v/v) for 30 min using a horizontal shaker. Acquired extract was purified using Strata X (500 mg) SPE columns. The resulting eluate was evaporated to dryness under nitrogen at 60°C and re-dissolved in $250 \mu\text{l}$ of mobile phase. STC was determined by LC-MS-MS. The calibrants were prepared by spiking the blank matrix with the standard and prepared in the same way as the samples.

To check developed method performance the following validation parameters were checked: selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), recovery, and repeatability.

Selectivity. The method has approved to be selective, because the signal of analyzed substance does not cover with other substance signals (**figure 12**).

LOD and LOQ. LOD and LOQ were calculated by using mass spectrometric data processing program „Masslynx” ($\text{LOD} = 3 \times \text{signal to noise ratio (S/N)}$ un $\text{LOQ} = 2 \times \text{LOD}$). Lowest validated level was $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($\text{S/N} = 10.5$). LOD is $0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$ and LOQ is $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Linearity. The method has approved to be linear for STC up to $200 \mu\text{g kg}^{-1}$. A tolerance of $\pm 10\%$ accepted for the separate calibration points for good linearity. The regression line for standard solutions was $y = 13627x$ ($R^2 > 0.999$) and regression line for calibration on matrix was $y = 3859x$ ($R^2 > 0.991$). As equations show, matrix effect makes essential differences between calibration with standard solutions and calibration on matrix, which is why calibration always performed on blank matrix.

Recovery, repeatability and reproducibility. The recovery, repeatability and reproducibility of the method were prepared and calculated according to European Commission Regula Nr. 401/2006 requirements. Lowest recovery obtained in rye grains – 80% at spiking level of $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ and highest recovery obtained in oat grains – 107 % at spiking level of $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Overall the results match to European Commission Regula Nr. 401/2006 and the method was approved to be precise (**table 2**).

STC content in grain samples. The results for 2006 and 2007 years harvest grains are shown in **Figures 12-13**. 14% (13 samples) from the year 2006 harvest contained STC, but its contamination levels were quit low – from 0.7 till $83 \mu\text{g kg}^{-1}$. However, in five samples STC content (23, 29, 29, 54, and 83)

exceeded the maximal STC concentration level, which is stated for food products in Czech Republic and Slovakia ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). The contamination level in the year 2007 harvest was diverse: the highest content was in wheat and barley grains, medium – in buckwheat and comparatively low in oat grains. Almost in the half of the contaminated samples, STC content was higher than $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. In 10 from 22 samples, which had STC in the range of $0.5\text{--}25 \mu\text{g kg}^{-1}$, STC content was from 1 till $2.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ – this amount is lower than the lowest permissible limit in Czech Republic and Slovakia ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$). Overall, 27% of total analysed grain harvests 2006 – 2007 samples were positive for STC.

Results of our research indicate the presence of STC in different Latvian grains. Therefore, there is a strong possibility of presence of STC in grain-derived products. Therefore, there is a possible risk for human health.

So, in the aspect of all mentioned above, monitoring of the presence of STC in typical Latvian grains and other food products in Latvia is clearly necessary.

7. Stability of sterigmatocystin during bread baking

The aim of this research is to test stability of STC during bread processing and to check baked wheat bread samples for STC contamination, using previously developed LC-MS-MS method.

Wheat grain sample contaminated with STC ($83 \mu\text{g kg}^{-1}$) was homogenized for a one hour using laboratory mixer. One part of this sample was milled on laboratory mill and then homogenized. From this homogenized sample – six samples were taken for analysis to check STC content homogeneity and variation. For control were used uncontaminated grains prepared in the same way.

The other part of contaminated grains was used for whole wheat flour preparing. Flour was used for whole bread baking. Dough making prescription is the following: flour 1000 g, yeasts 22 g, water 700 g, sugar 40 g, salt 10 g. Bread baking technology was the following: dough raising ~20 min., after fermentation time ~40 min. ($T\text{ }^{\circ}\text{C} = +35\text{--}38\text{ }^{\circ}\text{C}$), bread baking ~17 min. ($T\text{ }^{\circ}\text{C} = +200\text{--}220\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dough and bread sample weights are shown in **Table 3**.

Analysis of grains and bread for STC content were carried out according to previously developed LC-MS-MS method for STC determination in grains.

The bread was baked from the grains, which were naturally contaminated with STC, checked STC content in baked bread and compared with STC content in grains, from which the bread was baked. Acquired STC content in bread was recalculated to STC content in flour, using the following quotations. **Formula (1)** is used for recalculation of known cold bread mass obtained from known dough mass to bread mass obtained from 1000 g of flour. Using calculated result from the **Formula (1)** (from 1000g of flour or grains we got 1628 g of bread), we can find coefficient for STC content recalculation in bread to STC content in grains, applying the next **Formula (2)**.

So, recalculation coefficient is 1.628. This coefficient can be applied for recalculation of obtained STC content in bread to STC content in flour, which can be seen in the next **Formula (3)**.

Results of STC content in bread samples and recalculated STC content in grains as well as found content of STC are shown in **Table 4**.

Mean content of STC in baked bread was $48 \mu\text{g kg}^{-1}$ – this is equivalent to $78 \mu\text{g kg}^{-1}$ in grains. Mean STC content in contaminated grains, from which the bread been baked, was – $83 \mu\text{g kg}^{-1}$. The results of t-test show, that statistically there were no differences between results obtained in contaminated grains and results obtained in bread baked from these grains ($t_{\text{apr}} (1.7) < t_{\text{krit}} (1.8)$, $p > 0.05$). So, STC found to be stable during bread baking process.

This is the first research that indicates stability of STC after thermal and technological impact during bread baking.

The research about STC stability indicates, that STC is not only heat stable, but also stable during all bread making technology stages. Therefore, STC can be a possible bread contaminant, especially of whole grain bread. To avoid possible Latvian bread contamination with STC and to avoid possible risk for human health an investigation of occurrence of STC in Latvian bread and monitoring of grains are recommended.

8. Determination of sterigmatocystin in bread

The aim of this study is to research different types of Latvian bread samples for STC content using previously developed LC-MS-MS method.

Bread samples from different Latvian bread bakeries (6 rye bread, 9 rye-wheat bread and 14 wheat bread) were tested for the STC presence. Samples were crushed, homogenized, and analysed for STC content using previously developed LC-MS-MS method. Recovery results obtained for bread are varying from 96 to 103%. STC content in different types of analyzed bread samples are shown in **Table 5**.

From six rye bread samples only one (16.7%), from nine wheat-rye bread samples also only one (11.1%) and from 14 wheat bread samples three (21.4%) samples were contaminated with STC. Four (80%) of five contaminated samples were prepared using whole grains. Although STC concentration levels were quite low from 2.4 to $7.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ and did not exceed maximum levels for this toxin set in Czech Republic and Slovakia ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$), two samples exceeded level set in these republics for rice, vegetables, potatoes, flour, poultry and meat ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Results of this research give possibility to suppose that levels of STC in grains from which these bread samples were prepared, were contaminated with STC. Although found contamination of bread is quite low, whole-grain bread still can be a possible source of investigated toxin.

This is the first research on STC content in different types of bread in Latvia, which declares about the occurrence of STC in bread, especially in whole grain bread. Therefore, in the aspect of all mentioned above, to avoid the presence of STC in bread and safe human health, the monitoring of the presence of STC in Latvian bread is clearly necessary.

9. Development of analytical method for the determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its applying for the determination of STC in beer produced in Latvia

Since barley is the main beer raw material, there is a possibility that beer may contain STC. In literature, there is no data available about STC analysis and presence in beer. Some reports notify about other mycotoxins presence in beer

(which can be carried to beer from barley) and aflatoxins are among them. So, aflatoxins are stable during all beer brewing technology steps. Since STC has structure and chemical properties similar to aflatoxins, there is a possibility of STC transferring to beer from contaminated barley grains.

The aim of this research is to develop a simple, sensitive HPLC method with ultraviolet (UV) detection for STC determination in light and dark beer.

Beer samples. In this study, 26 Latvian beer samples (9 dark beers and 17 light beers) were purchased from local supermarkets. Light (Plostnieku alus) and dark (Martina tumsais alus) beer samples were used as blank matrices for validation studies. All samples were stored in the refrigerator at 5 °C until analysis.

Sample preparation. Before analysis, the samples were degassed in a laboratory ultrasonic bath for 40 min. The sample preparation procedure was the following: 30 ml of degassed sample was filtered through a filter paper, 10 ml of the filtrate was diluted with 5 ml acetonitrile:water (10:90, v/v), and acquired liquid was purified using a Strata X (60 mg) solid phase extraction (SPE) column. The purifying procedure was the following: SPE column was conditioned with 6 ml methanol, followed by 6 ml of water, and then 15 ml of diluted sample were loaded on the column. The column was washed with 30% acetonitrile in water and STC was eluted with 3 ml of 100% acetonitrile. The resulting eluate was evaporated to dryness under nitrogen at 70 °C and re-dissolved in 200 µl 40% acetonitrile in water. The wash step was optimized by variation of the acetonitrile content in water, increasing thereby the elution strength. The effluents were collected and subsequently analysed by HPLC-UV.

Selectivity. The method is selective enough (STC signal does not overlaps with other substances signals). **Figure 15** shows chromatograms of uncontaminated light beer, naturally contaminated light beer, uncontaminated dark beer, and naturally contaminated dark beer samples.

Linearity. The method is linear for STC concentration up to 200 µg l⁻¹ for light and dark beer. A tolerance of ± 10% was accepted for the separate calibration points for good linearity. The regression line in the calibration range from 0.5 to 10 µg l⁻¹ was $y = 17590x - 885$ with correlation coefficient $R^2 > 0.997$, while in the calibration range from 10 to 200 µg l⁻¹ the regression line was $y = 19069x - 15194$ with correlation coefficient $R^2 > 0.999$.

The **LOD** and **LOQ** of STC were 0.26 µg l⁻¹ and 0.68 µg l⁻¹, respectively and were determined by using standards prepared in the blank beer matrix (LOD = 3.3 x S/N-ratio; LOQ = 10 x S/N-ratio). These sensitive results were obtained due to the combination of a 50 times concentration of sample and SPE clean-up. Hence, the method did not require derivatisation to obtain the target sensitivity.

Optimization of the SPE method. The beer matrix and acetonitrile content variation in the washing solution were used to test the STC recovery from SPE column. STC recovery from Strata X SPE column is shown in **Figure 16**, as acetonitrile content function in acetonitrile-water solution. The higher acetonitrile content in the elution solution is the easier STC elution from the column is. The STC elution from the column started with 30% of acetonitrile in water and it gets its maximum with 100% of pure acetonitrile. Therefore, to eluate

impurities, which may trouble the analysis, can be used 30% acetonitrile in water, and for STC elution from the column – 100% acetonitrile.

Recovery, repeatability and reproducibility were obtained from parallel samples (of dark and light beer) $n=18$ spiked with STC on six concentration levels. Developed method has a good recovery, repeatability and reproducibility (**table 6**).

STC content in beer samples. STC was found in 2 (7.7%) from 26 inspected samples of light and dark beer (**table 7**). Only one (11%) from 9 dark beer samples and one (6%) from 17 light beer samples were contaminated with STC. The contamination level of dark and light beer was quite low and therefore there is no serious risk for consumers' health, because beer consumption in Latvia is about 61 litres per year (167 millilitres per day). Therefore, if we suppose that beer is contaminated with $7.8 \mu\text{g l}^{-1}$ of STC, and average day consumption is 167 millilitres (it is approximately of $1.3 \mu\text{g}$ of STC per day), this level will be much lower than is stated in Czech Republic and Slovakia. ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$).

However, as STC content in beer can depend on its content in barley and other raw materials, higher contamination of beer always is possible. In addition, environmental conditions during storage of barley (or during the malt preparation), such as moisture in the air, temperature etc can considerably effect the formation of STC. Hop can be possible source of STC producing spores too.

This is a simple and sensitive HPLC -UV- SPE method for determination of STC in light and dark beer, which does not require a sample extraction step and derivatisation step. This method is with acceptable specificity and precision and has a good accuracy, wherewith it is suitable for routine analysis in analytical laboratories.

Results obtained from the analysis of STC in Latvian beer samples show low contamination of Latvian beer. Nevertheless, contamination risk is always possible, so in order to decrease human health risks, the monitoring of the STC content in beer row materials is recommended.

10. Determination of Sterigmatocystin in cheese

The previously developed LC-MS-MS method for the determination of STC in grains was modified and applied for the determination of STC in cheese samples (8 produced in Latvia and 13 produced in Belgium). Cheese samples were purchased from different local supermarkets in Latvia and Belgium. After purchasing samples were homogenized, freezed and kept under (-20°C) before the analysis.

Sample preparation. The sample preparation was slight modification of the method for the determination of STC in grains. Ten grams of cheese were weighed and 50 ml of acetonitrile:water (90:10, v/v) and 30 ml of n-hexane were added. The sample was homogenized and extracted using a shaker for 30 minutes and then centrifuged (3500 rpm, 10 min, $+15^{\circ}\text{C}$). The acetonitrile phase was filtered through filter paper. Filtered extract (10 ml) was diluted with 30 ml of water and purified using a Strata X (60 mg) SPE column. The SPE column was conditioned with 3.5 ml methanol followed by 3.5 ml of water prior to use. Then, 40 ml of diluted extract was loaded on to the column. The column was twice washed with 3.5 ml of acetonitrile:water (30:70, v/v) and STC was eluted with 3 ml of 100 %

acetonitrile. The resulting eluate was evaporated to dryness under nitrogen at 37 °C and re-dissolved in 250 µl of mobile phase (0.02 % formic acid in acetonitrile and 0.02 % formic acid in water (60:40 v/v)). The calibrants were prepared by spiking blank matrix with the standard and prepared in the same way as the samples. Eight replicates at each concentration level were prepared for recovery experiments.

Selectivity. Method found to be selective, because the analyte peak does not overlap with the other matrix compounds peaks. The SRM (MRM) chromatograms of blank cheese sample, spiked cheese sample (0.5 µg kg⁻¹), naturally contaminated cheese sample and cheese sample containing traces of STC are shown in **Figure 17**.

LOD and LOQ. The lowest validated level in cheese matrix was 0.5 µg kg⁻¹ (S/N = 25). The LOD and LOQ of STC was determined by using standards prepared in the blank matrix and calculated using chromatographic software “Masslynx” integrated calculation (LOD = 3.3 x S/N-ratio; LOQ = 10 x S/N-ratio). The LOD and LOQ were 0.03 µg kg⁻¹ and 0.1 µg kg⁻¹, respectively.

Calibration and Linearity. In LC-MS methods the matrix often causes the change of the response, because the matrix components disturb the ionization of the analytes. Because of the matrix effect, the calibrants were always prepared in blank matrix (Gouda cheese produced Belgium). Matrix calibrated in two linear diapasons from 0.5 µg kg⁻¹ to 25 µg kg⁻¹ and from 10 µg kg⁻¹ to 200 µg kg⁻¹. The method was linear for STC from 0.5 µg kg⁻¹ to 25 µg kg⁻¹ ($y = 2921x + 82$, $R^2 > 0.991$) and from 10 to 200 µg kg⁻¹ ($y = 2656x + 617$, $R^2 > 0.990$).

Recovery, repeatability and reproducibility. The relative standard deviations (RSD_r and RSD_R, %) demonstrate an acceptable repeatability of the method 17-27 %, mean recovery varies from 97 % to 104 % and good enough (**table 8**).

Presence of STC in cheese samples. STC above LOQ was detected only in two (15%) of 13 Belgium cheese samples, it is in 10.5% from 21 analysed cheese samples. In four (50%) of 8 Latvian cheese samples STC was detected above LOD, but below LOQ. Five (24%) of 21 totally analysed samples contained STC above LOD, but below LOQ and 4 (19%) of 21 samples contained traces of STC (**table 9**).

Results show that there is a possibility of cheese contamination with STC, and it can be prevented by hygiene and storage conditions observing. It is very important to prevent mould distribution in cheese making and storage places.

The developed LC-ESI-MS/MS method for the determination of STC in cheese allows detecting STC with its concentration 0.03 µg kg⁻¹. This method can be applied for qualitative and confirmation analyses of STC in cheese samples.

This is the first research about STC presence in Latvian and Belgium cheese, which is serious human health risk factor.

SUMMARY

Resuming the results of the thesis, it is possible to make the following summary:

1. Experiments for the optimization of the detection of STC using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry were performed in two steps. During first step an influence of different mobile phase content (AcN/H₂O, AcN/ 0.01 and 0.02% formic acid, AcN/ 0.02M ammonium acetate and MeOH/H₂O, content of AcN and MeOH was regulated from 40 till 80%) on the STC retention time on Phenomenex Luna(2) C₁₈ HPLC column was checked. During second step experiments were performed using STC standard solution, which was several times injected into the triple quadrupole mass spectrometer. Mass spectrometer was equipped with APCI and ESI. STC detection was optimized under negative and positive modes using variable cone voltages and collision energies.
 - First step experiments results showed that using AcN/ 0.02M ammonium acetate as mobile phase, STC retention times are higher, using MeOH/H₂O, AcN/ 0.01 and 0.02% formic acid as mobile phases, STC have medium retention times; and using AcN/H₂O as mobile phase STC retention times are comparatively short (STC was fasted eluted from HPLC column).
 - Second step experiments showed that best results were obtained under positive electrospray ionization ESI using cone voltage of 30 V and collision energy of 30 eV. Precursor molecular ion obtained was 325 g mol⁻¹ and obtained product ions were 281 g mol⁻¹ and 310 g mol⁻¹ respectively. Product ion with molecular mass of 281 g mol⁻¹ was used for quantification of the STC and product ion with molecular mass of 310 g mol⁻¹ was used for confirmation of the STC. For confirmation of the presence of the STC ratio (281 / 310) should be 0.7 ± 0.1 .
 - Obtained results are fundamental base for the further STC detection method development.
2. For the determination of different mycotoxins in foodstuffs the solid phase extraction used for clean up and concentration of mycotoxin extracts. During these investigation an elution properties of the different eluting solutions (acetonitrile – water and methanol - water) were checked for elution straight of STC from the Strata X and Strata C₁₈ SPE columns.
 - Both acetonitrile and acetonitrile – water solutions, and methanol and methanol – water solutions are useful for the STC eluting from the Strata X and Strata C₁₈ SPE columns getting statistically equivalent results.
 - Because of economic approaches for the further experiments a Strata X SPE column chosen, acetonitrile and acetonitrile-water solutions chosen because of that as well.
3. The influence of solvent, storage time and temperature on the stability of the STC investigated. STC calibrants (1.0 µg ml⁻¹) in acetonitrile, methanol and mixture of acetonitrile and methanol (50:50, volume/volume) were stored in dark glass bottles at -25 °C, +4 °C and +25 °C for up to 8 weeks. Samples were

analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection.

Obtained results indicate that:

- STC is not stable in any of investigated solvents if stored at +25 °C temperature;
 - STC is stable in any of investigated solvents if stored at temperature range from –25 °C till +4 °C, but no longer than one week.
4. STC is stable in temperature range till +115 °C at least during 60 min time period.
 5. The efficiency of different extraction solvents on the extraction of STC from grain and cheese matrix was tested. Obtained results show that more suitable STC extraction solvent from grain and cheese matrix is AcN-water mixture and there is no statistical significance between usages of specified AcN-water mixture ratios. Analyzing the results obtained during research, the following extraction solvents were selected:
 - for the extraction of STC from grains an AcN-water solution (84:16, v/v) chosen;
 - for the extraction of STC from cheese an AcN-water solution (90:10, v/v) chosen.
 6. LC-MS-MS method for the determination of STC in different grains was developed and validated. Method includes extraction of STC with acetonitrile-water solution, SPE using Strata X SPE column, separation on C₁₈ HPLC column and detection using tandem massspectrometry with electrospray positive ionization. Method validation performance criteria were in agreement with Commission Regulation Nr. 401/2006.
 - This is the first reported method for the determination of STC in grains that allows detect STC at 0.15 µg kg⁻¹ concentration level;
 - 14 % of the samples from the year 2006 harvest contained STC (its content was variable from 0.7 till 83 µg kg⁻¹) and 35% of the samples from the year 2006 harvest contained STC (its content was variable from 1 till 47 µg kg⁻¹). Totally 95 samples of grains analyzed in the year 2006 and 120 samples of grains analyzed in the year 2007;
 - Results of our research indicate the presence of STC in different Latvian grains. Therefore there is a strong possibility of presence of STC in grain-derived products. Therefore, there is a possible risk for human health.
 7. Contaminated wheat grains were used for the bread baking. Baked bread samples (n=6) were analysed for STC content using previously developed LC-MS-MS method.

The research about STC stability indicates, that:

 - STC is heat stable and also stable during all bread making technology stages. Therefore, STC can be a possible bread contaminant.
 - to avoid possible Latvian bread contamination with STC an investigation of occurrence of STC in Latvian bread is recommended;
 - to lower the presence of STC in bread, the monitoring of grains on STC content recommended.

8. Bread samples from different Latvian bread bakeries (6 rye bread, 9 rye-wheat bread and 14 wheat bread) were crushed, homogenized, and analyzed for STC content using previously developed LC-MS-MS method.
 - from six rye bread samples only one (16.7%), from nine wheat-rye bread samples also only one (11.1%) and from 14 wheat bread samples three (21.4%) samples were contaminated with STC. Four (80%) of five contaminated samples were prepared using whole grains. Although STC concentration levels were quite low from 2.4 to 7.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and did not exceed maximum levels for this toxin set in Czech Republic and Slovakia (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$), two samples exceeded level set in these republics for rice, vegetables, potatoes, flour, poultry and meat (5 $\mu\text{g kg}^{-1}$);
 - results of this research give possibility to suppose that grains from which these bread samples were prepared, were contaminated with STC.
 - although found contamination of bread is quite low, whole-grain bread still can be a possible source of investigated toxin.
 - this is the first research on STC content in different types of bread in Latvia, which declares about the occurrence of STC in bread, especially in whole grain bread. Therefore, in the aspect of all mentioned above, to avoid the presence of STC in bread and safe human health, the monitoring of the presence of STC in Latvian bread is clearly necessary.
9. The sensitive method for the determination of STC in beer developed and validated. This is the first sensitive method for the determination of STC in beer. Method includes of SPE light and dark beer on Strata X SPE column, reversed phase HPLC on C₁₈ HPLC column and UV detection.
 - Recovery from light beer matrix was 81-126% and from dark beer matrix was 88-126% in the linear range from 0.5-100 $\mu\text{g l}^{-1}$;
 - STC was detected in 2 (7.7%) from 26 researched beer samples;
 - this is a simple and sensitive HPLC – UV – SPE method for determination of STC in light and dark beer, which does not require a sample extraction step and derivatisation step;
 - this method is with acceptable specificity and precision and has a good accuracy, wherewith it is suitable for routine analysis in analytical laboratories;
 - results obtained from the analysis of STC in Latvian beer samples show low contamination of Latvian beer. Nevertheless, contamination risk is always possible;
 - so, in order to decrease STC content in beer, the monitoring of the STC content in beer raw materials is clearly necessary.
10. The presence of STC in 8 Latvian and 13 Belgian cheese samples investigated. Method for the determination of STC in grains (Veršilovskis et al., 2007) was modified and adopted STC for the determination of STC in cheese.
 - STC above LOQ was detected only in two (15%) of 13 Belgium cheese samples, it is in 10.5% from 21 analysed cheese samples. In four (50%) of 8 Latvian cheese samples STC was detected above LOD, but below LOQ. Five (24%) of 21 totally analysed samples contained STC above LOD, but below

LOQ and 4 (19%) of 21 samples contained traces of STC;

- the developed LC-ESI-MS/MS method for the determination of STC in cheese allows detecting STC with its concentration $0.03 \mu\text{g kg}^{-1}$;
- this method can be applied for qualitative and confirmation analyses of STC in cheese samples as well as for the different research on STC content;
- results show that there is a possibility of cheese contamination with STC. It is very important to prevent mould distribution in cheese making and storage places.
- this is the first research about STC occurrence in Latvian and Belgian cheese, which indicates about the presence of STC in researched cheese samples.

CONCLUSIONS

Resuming the results of the thesis it is possible to make the following conclusions:

1. In the promotion thesis there were developed determination of STC by LC-MS-MS: the mobile phase, ionisation and fragmentation parameters were optimized.
2. In the promotion thesis there were developed and optimized solid phase extraction method using Strata X SPE column and acetonitrile-water solutions.
3. For the first time was tested the stability of STC in different solutions depending on time and temperature. Determinated that STC is not stable in any of investigated solvents if stored at $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature for a one week. STC is stable in any of investigated solvents (acetonitrile, methanol, mixture of acetonitrile and methanol (50:50, v/v)) if stored at temperature range from $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, but no longer than one week. STC is stable in temperature range till $+115\text{ }^{\circ}\text{C}$ at least during 60 min time period. Therefore, STC can be stable during bread or bread products baking.
4. In the promotion thesis there worked out new sensitive STC determination method. The method is approximately **33 times more sensitive** ($\text{LOD } 0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$) comparing to published in literature GSH-MS method ($\text{LOD } 5 \mu\text{g kg}^{-1}$) and approximately **12 times more sensitive**, comparing to published in literature LC-MS method ($\text{LOD } 1.9 \mu\text{g kg}^{-1}$). The developed method used for STC content determination in different grains, produced in Latvia (wheat, rye, oat, barley and buckwheat). 14% of grain samples (year 2006) contained STC (its content varied from 0.7 till $83 \mu\text{g kg}^{-1}$) and 35% of grain samples (year 2007) contained STC (its content varied from 1 till $47 \mu\text{g kg}^{-1}$).
5. Previously developed LC-MS-MS method used for STC stability testing during the bread baking process. It was proved, that STC is stable during all the technological stages of bread baking process and where with STC can transfer into the bread from grains, contaminated with STC.

6. Previously developed LC-MS-MS method used for STC determination in different bread samples, produced in Latvia (wheat, rye, wheat-rye bread). 17% of tested bread samples contained STC and the concentration range was from 2.4 till 7.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$.
7. Developed and approbated HPLC-UV method for the determination of STC content in light and dark beer (LOD 0.26 $\mu\text{g l}^{-1}$). The developed method used for STC determination in light and dark beer, produced in Latvia. 7.7% of the tested beer samples were contaminated with STC. STC content varied from 4.0 till 7.8 $\mu\text{g l}^{-1}$.
8. Previously developed LC-MS-MS method for STC determination in grains and bread was adapted for the STC determination in cheese. The method is approximately 80 times more sensitive (LOD 0.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$), comparing to the previously published the most sensitive LC-MS STC determination method (LOD 2.4 $\mu\text{g l}^{-1}$). For the first time checked and proved the presence of STC in cheeses, produced in Latvia and Belgium. STC content above (LOQ 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$) was determined in 9.5% of analysed samples, 24% of samples contained STC with level above (LOD 0.03 $\mu\text{g l}^{-1}$) and 19% had STC traces.
9. Research about STC presence in foodstuffs produced in Latvia indicates about STC presence in different foods. Even if STC content does not exceed the allowed level in one separate food, using various contaminated products together, the toxin concentration level can achieve the maximum level allowed. Therefore, to decrease STC consumption till minimum, the monitoring of STC in foodstuff raw materials is clearly necessary.

SUGGESTIONS TO RESEARCHERS AND ANALYTICAL LABORATORIES

1. The new user of the analytical method represented in this research work must test ionization and fragmentation of the STC molecule if for the detection of STC planned to use tandem mass spectrometer from other manufacturer.
2. It is possible to use any HPLC column with C_{18} sorbent for the separation of STC on HPLC column. If HPLC column internal diameter and sorbent particle size differs from represented in this research work, user must optimize the proportional content of mobile phase (increase or decrease acetonitrile content in mobile phase mixture) and flow speed.
3. It is possible to use any solid phase extraction columns for the SPE of STC if the columns are packed with the sorbent used in our research. If is planned to use SPE columns with other sorbent it is necessary to optimize STC elution parameters (users must optimize SPE using solvents and its mixtures planned for elution of STC from SPE columns).