

რძეში და რძის პროდუქტში აფლატოქსინ M₁-ის განსაზღვრის ქრომატო-მას სპექტრომეტრული (LC MS/MS) მეთოდის შემუშავება და ვალიდაცია

ჩიკვილაძე თამარი¹, ზარამიძე ქეთევანი², ჩაფიძე ნინო², ტატანაშვილი მარიამი¹,
ოთარაშვილი თამარი¹

თსუ ფარმაცევტული, ტოქსიკოლოგიური და სამედიცინო ქიმიის დეპარტამენტი¹
„გლობალტესტის“ საგამოცდო ლაბორატორია²

აბსტრაქტი

სოფლის მეურნეობის პროდუქტზე მზარდი ობის სოკოს მრავალი სახეობა გამოყოფს ტოქსიკურ ნივთიერებებს, რომლებსაც მიკოტოქსინები ეწოდება.

აფლატოქსინი B₁ ყველაზე გავრცელებული, ძლიერ ტოქსიკური და კანცეროგენულია. მას წარმოქმნის *Aspergillus*-ის გვარის სოკოები, რომლებიც იზრდება ცხელ და ნოტიო პირობებში შენახულ მარცვლეულზე, თესლსა და ნაყოფზე.

აფლატოქსინი M₁ არის აფლატოქსინ B₁-ის ჰიდროქსილირებული ფორმა, მისიტოქსიკური მეტაბოლიტი, წარმოიქმნება იმ ცხოველების ღვიძლში, რომლებიც იღებენ აფლატოქსინ B₁-ით დაბინძურებულ საკვებს.

აფლატოქსინი M₁ გროვდება ცხოველის ორგანიზმში და გამოიყოფა რძესთან ერთად, რაც საფრთხეს უქმნის მიძღები სახეობის - ადამიანის ჯანმრთელობას. აფლატოქსინი M₁ ძლიერი კანცეროგენია, იწვევს აგრეთვე ღვიძლის და იმუნური სისტემის დაზიანებას.

მაღალი ტოქსიკურობის და ჰეპატოკანცეროგენული პოტენციალის გამო, რძესა და რძის პროდუქტებში აფლატოქსინ M₁ - ის დასაშვები დონე მკაცრად რეგულირდება განვითარებულ ქვეყნებში, მათ შორის საქართველოშიც. ჩვენს ქვეყანაში აფლატოქსინ M₁ - ის დასაშვებ ზღვრად დადგენილია **0.05 მკგ/კგ**.

კვლევის მიზანი იყო აფლატოქსინ M₁-ის განსაზღვრისთვის ქრომატო - მას - სპექტრომეტრული მეთოდის შემუშავება და ვალიდაცია.

ჩვენ მიერ შემუშავებული და ვალიდირებულია რძეში და რძის პროდუქტში აფლატოქსინ M₁-ის განსაზღვრის ქრომატო მას სპექტრომეტრული მეთოდი; აფლატოქსინ M₁-ის თვისობრივი განსაზღვრის ზღვრად განისაზღვრა: რძეში - 0.003 მკგ/კგ, რძემჟავა პროდუქტში - 0.0034 მკგ/კგ, ყველში - 0.0038 მკგ/კგ, ნალებში - 0.0036 მკგ/კგ;

აფლატოქსინ M₁-ის რაოდენობრივი განსაზღვრის ზღვარად განისაზღვრა: რძეში - 0.03 მკგ/კგ, რძემჟავა პროდუქტში - 0.034 მკგ/კგ, ყველში - 0.038 მკგ/კგ, ნაღებში - 0.036 მკგ/კგ;

მიღებული შედეგები მიუთითებს ანალიზური მეთოდების მიმართ წაყენებული მოთხოვნებისადმი შერჩეული მეთოდის შესაბამისობაზე.

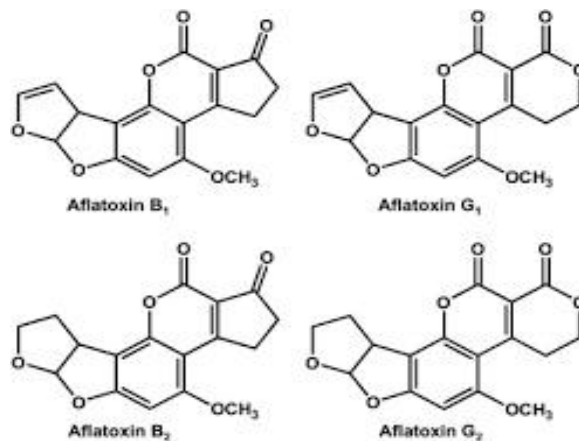
საკვანძო სიტყვები: მიკოტოქსინები, აფლატოქსინი, რძის პროდუქტები, მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია, მას-სპექტრომეტრია

სოფლის მეურნეობის პროდუქტზე მზარდი ობის სოკოს მრავალი სახეობა გამოყოფს ტოქსიკურ ნივთიერებებს, რომლებსაც მიკოტოქსინები ეწოდება.

მიკოტოქსინები სხვადასხვა სახეობის სოკოს მეორადი მეტაბოლიტებია. ერთმანეთისგან განსხვავდება როგორც ქიმიური სტრუქტურით ასევე ბიოლოგიური ეფექტებით.

მიკოტოქსინების ერთ-ერთი ყველაზე შესწავლილი ჯგუფია აფლატოქსინები, რომლებსაც *Aspergillus* -ის გარკვეული სახეობები წარმოქმნის. ეს ტოქსიკური მეტაბოლიტები გვხვდება სასოფლო-სამეურნეო საკვებში, თხილში, მარცვლეულში, სოიოსა და ცხოველთა საკვებში. დაბინძურება, როგორც წესი, ხდება მაღალი ტემპერატურის და ტენიანობის პირობებში, ანუ ნიადაგზე, თესლზე, მარცვლეულსა და ლპობის პროცესში მყოფ მცენარეზე ობის სოკოს ზრდისთვის ხელსაყრელ გარემოში. აფლატოქსინები მიეკუთვნება დიფურანოკუმარინების კლასს, ისინი კუმარინის მაღალჩანაცვლებული ნაერთებია, შეიცავს კონდენსირებულ დიჰიდროფუროფურანის ციკლს.

არსებობს აფლატოქსინების ოთხი ძირითადი ტიპი: B₁, B₂, G₁ და G₂. [6.7]



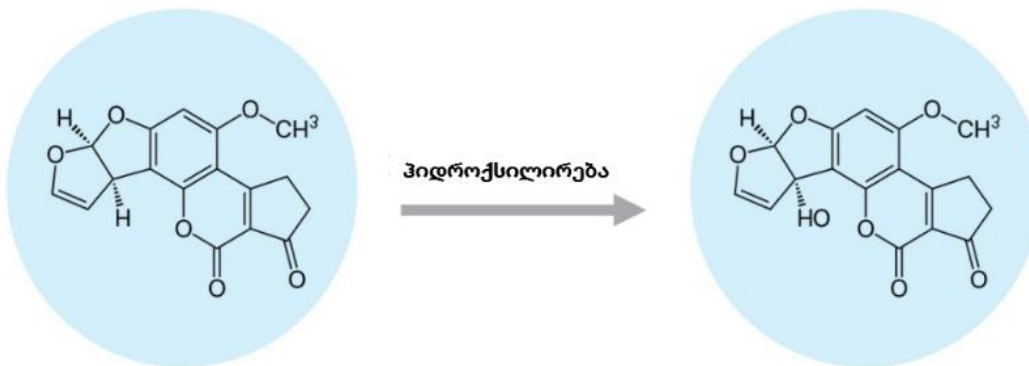
სურ.1 აფლატოქსინების ძირითადი ტიპები

აფლატოქსინები გავლენას ახდენენ იმუნიტეტზე სუბკლინიკური კონცენტრაციებით. აფლატოქსინური ინფექციები მძიმეა, ნაკლებად ექვემდებარება მკურნალობას და გართულებების მაღალი რისკი აქვთ. ეს ნაერთები შეიძლება გადაეცეს შთამომავლობას

ორსულობის ან ლაქტაციის პერიოდში. დადასტურებულია ამ ნაერთების კანცეროგენული, მუტაგენური, ტერატოგენული და იმუნოსუპრესიული ეფექტები ცხოველებსა და ადამიანებზე. ღვიძლი კი მთავარ სამიზნე ორგანოდ განსაზღვრა. კიბოს კვლევის საერთაშორისო სააგენტომ (IARC) აფლატოქსინები აღიარა კანცეროგენულად (ჯგუფი 1) და პოტენციურად კანცეროგენულად ადამიანისთვის. მთავარ სამიზნე ორგანოდ განისაზღვრა ღვიძლი.

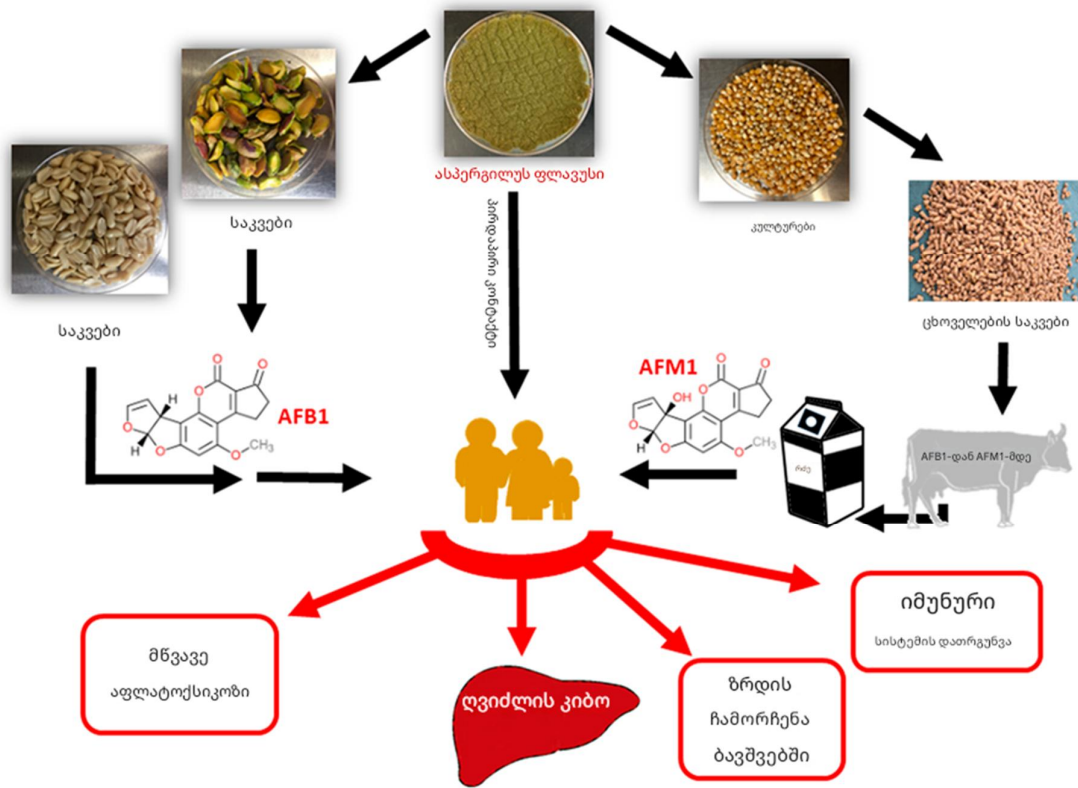
აფლატოქსინი B₁ ყველაზე გავრცელებული, ძლიერ ტოქსიკური და კანცეროგენულია. მას წარმოქმნის *Aspergillus*-ის გვარის სოკოები, რომლებიც იზრდება ცხელ და ნოტიო პირობებში შენახულ მარცვლეულზე, თესლსა და ნაყოფზე.

აფლატოქსინი M₁ არის აფლატოქსინ B₁-ის ჰიდროქსილირებული ფორმა (სურ. 1) მისი ტოქსიკური მეტაბოლიტი, წარმოიქმნება ციტოქრომ P450 1A2 (CYP1A2) მოქმედებით იმ ცხოველების ღვიძლში, რომლებიც იღებენ აფლატოქსინ B₁-ით დაბინძურებულ საკვებს.



სურ. N2 აფლატოქსინი B₁ და მისი მეტაბოლიტი - აფლატოქსინ M₁

აფლატოქსინი M₁ გროვდება ცხოველის ორგანიზმში და გამოიყოფა რძესთან ერთად, რაც საფრთხეს უქმნის მიძღები სახეობის - ადამიანის ჯანმრთელობას. აფლატოქსინი M₁ ძლიერი კანცეროგენია, იწვევს აგრეთვე ღვიძლის და იმუნური სისტემის დაზიანებას, ონკოგენების გააქტივებას.



სურ. N3 AFB1 -ის და AFM1 -ის ორგანიზმში მოხვედრის გზები და ტოქსიკურობა

ორივე ტოქსინს მსგავსი ქიმიური თვისებები აქვს: ისინი მცირედ ხსნადია წყალში, უხსნადია არაპოლარულ გამხსნელებში და კარგად ხსნადია პოლარულ ორგანულ გამხსნელებში. აფლატოქსინებს ახასიათებთ მაღალი თერმული სტაბილურობა (>100 °C). რძიდან და რძის პროდუქტებიდან მათი მოცილება ძნელია, განმეორებითი დამუშავების, მათ შორის პასტერიზაციის და ულტრაპასტერიზაციის შემდეგაც კი. ამიტომ, აფლატოქსინი M₁ გვხვდება არა მხოლოდ ნედლ რძეში, არამედ ულტრაპასტერიზებულ და პასტერიზებულ რძეში, იოგურტში, ყველში, რძის ფხვნილში, ჩვილ ბავშვთა საკვებში [6.7.9]

მაღალი ტოქსიკურობის და ჰეპატოკანცეროგენული პოტენციალის გამო, AFM1 ერთადერთი მიკოტოქსინია, რომლის დასაშვები დონე (MRLs) რძესა და რძის პროდუქტებში მკაცრად რეგულირდება, თუმცა ზღვრული მაჩვენებლები განსხვავდება ქვეყნების მიხედვით [4].

ცხრილი N1: სხვადასხვა ქვეყნებისთვის ავლატოქსინ M₁ - ის მაქსიმალური დასაშვები ზღვრები (MPL)

ქვეყანა	ავლატოქსინ M ₁ - ის მაქსიმალური დასაშვები ზღვარი, მკგ/კგ	მატრიცა
ევროკავშირი	0.05	რძე/ნედლი რძე
	0.25	ყველი
აშშ	0.5	რძე/ნედლი რძე
შვეიცარია	0.05	რძე/ნედლი რძე
	0.25	ყველი
	0.02	კარაქი
ავსტრალია	0.05	რძე/ნედლი რძე
გერმანია	0.05	რძე/ნედლი რძე
ბელგია	0.05	რძე/ნედლი რძე
შვეცია	0.05	რძე/ნედლი რძე
საფრანგეთი	0.05	რძე/ნედლი რძე
იტალია	0.05	რძე/ნედლი რძე
ირანი	0.05	რძე/იოგურტი/ნაყინი
	0.2	ყველი
	0.02	კარაქი
ჩინეთი	0.5	რძე/ნედლი რძე
თურქეთი	0.05	რძე/ნედლი რძე/იოგურტი
	0.025	ყველი
ნიდერლანდები	0.02	კარაქი
	0.2	ყველი
ბრაზილია	0.5	რძე
არგენტინა	0.5	რძე/ნედლი რძე
პერუ	0.5	რძე/ნედლი რძე
მექსიკა	0.5	რძე/ნედლი რძე

ეკვადორი	0.5	რძე/ნედლი რძე
ჩილი	0.05	რძე/ნედლი რძე
იაპონია	0.5	რძე
ინდოეთი/პაკისტანი	0.5	რძე/ნედლი რძე
მაროკო	0.05	რძე
	0.5	რძის ფხვნილი
ისრაელი	0.05	რძე/ნედლი რძე
მალიზია/სინგაპური	0.5	რძე/ნედლი რძე
ვიეტნამი	0.5	რძე/ნედლი რძე
სამხრეთ აფრიკა	0.05	რძე/ნედლი რძე
კენია	0.5	რძე/ნედლი რძე

სურსათში მიკოტოქსინების შემცველობა რეგულირდება საქართველოშიც [1.2.3] ტექნიკური რეგლამენტის – „ცოცხალ ცხოველებსა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ზოგიერთი ნივთიერებისა (სუბსტანციის) და მათი ნარჩენების მონიტორინგის წესის დამტკიცების შესახებ“ საქართველოს მთავრობის 2016 წლის 18 იანვრის N22 დადგენილების დანართი N1 შესაბამისად, მიკოტოქსინები მიეკუთვნება ვეტერინარული პრეპარატების და დამაბინძურებლების „ბ ჯგუფს“ და აფლატოქსინ M₁-ის დასაშვებ ზღვრად დადგენილია **0.05 მკგ/კგ** [1.]

აფლატოქსინ M₁-ის განსაზღვრისთვის ძირითადად გამოიყენება ისეთი მეთოდები, როგორცაა ELISA (იმუნოფერმენტული მეთოდი) და მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია ულტრაიისფერი დეტექტორით[4.5.8].

აფლატოქსინ M₁-ის ძალიან დაბალი დასაშვები ზღვარის გათვალისწინებით, განსაზღვრისთვის გამოყენებული მეთოდი უნდა იყოს ზედმიწევნით მგრძობიარე. ამიტომ, „ტექნიკური რეგლამენტის – სასურსათო დანიშნულების ცხოველებში ფარმაკოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების (სუბსტანციების) ნარჩენების ანალიზის მეთოდების განხორციელების, ნიმუშის აღებისა და შედეგების ინტერპრეტაციის წესის დამტკიცების შესახებ საქართველოს მთავრობის 2023 წლის 5 ივნისის N212 დადგენილებების მოთხოვნების შესაბამისად, აფლატოქსინ M₁-ის განსაზღვრისთვის დამადასტურებელ მეთოდად განსაზღვრულია ქრომატო - მას სპექტრომეტრული მეთოდი[2].

კვლევის მიზანი: აფლატოქსინ M₁-ის განსაზღვრისთვის ქრომატო - მას - სპექტრომეტრული მეთოდის შემუშავება და ვალიდაცია.

კვლევის ობიექტები:

მიკოტოქსინების სტანდარტული ნიმუშები:

- აფლატოქსინი B₁ - (Sigma (Aldrich Chemical Company - გერმანია)
 - აფლატოქსინი M₁ - (Sigma (Aldrich Chemical Company - გერმანია)
- ლაბორატორიაში საანალიზოდ შემოსული რძე და რძის პროდუქტები:

რძე (ნედლი რძე, პასტერიზებული რძე, რძის ფხვნილი),

რძემჟავა პროდუქტები (იოგურტი, მაწონი, კეფირი, არაჟანი, ხაჭო),

ყველი,

ნაღები,

კარაქი

სულ 2000- მდე ნიმუში

კვლევის მეთოდები:

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია მას სპექტრომეტრული დეტექტორით

ექსპერიმენტული ნაწილი

ცხრილი N2: ანალიზის მეთოდების კლასიფიკაცია სპეციფიკაციათა მიხედვით

სპეციფიკაცია	დადასტურება		სკრინინგი		
	თვისებრივი	რაოდენობრივი	თვისებრივი	ნახევრად რაოდენობრივი	რაოდენობრივი
ნივთიერება (სუბსტანცია)	A	A, B	A, B	A, B	A, B
იდენტიფიკაცია	X	X			
CC α	X	X			
CC β			X	X	X
სარწმუნოება		X			
პრეციზიულობა		X		(X)	X
ფარდობითი მატრიცის ეფექტი/აბსოლუტური აღდგენა*	-	X			X

სელექტიურობა/სპეციფიურობა		X	X	X	X
სტაბილურობა**		X	X	X	X
მდგრადობა		X	X	X	X

X – საჭიროა ვალიდაციით დადასტურდეს, რომ სპეციფიკაციის მიმართ მოთხოვნები დაკმაყოფილებულია;

(X) –სიზუსტის მოთხოვნები არ საჭიროებს დაკმაყოფილებას ნახევრად რაოდენობრივი სკრინინგის მეთოდებისთვის. თუმცა, პრეციზიულობა უნდა იქნეს განსაზღვრული, რათა ანალიზის ცრუ შედეგების თავიდან აცილების მიზნით დადასტურდეს მეთოდის ვარგისობა;

A – აკრძალული ანუ დაუშვებელი/არავტორიზებული ნივთიერებები (სუბსტანციები);

B – დაშვებული/ავტორიზებული ნივთიერებები (სუბსტანციები);

* თუ მატრიცაში არსებული საანალიზო ნივთიერების სტაბილურობის მონაცემები ხელმისაწვდომია სამეცნიერო ლიტერატურიდან ან სხვა ლაბორატორიიდან, ეს მონაცემები არ საჭიროებს ხელახლა განსაზღვრას შესაბამისი ლაბორატორიის მიერ. თუმცა, ხსნარში საანალიზო ნივთიერების სტაბილურობის ხელმისაწვდომ მონაცემებზე მითითება მისაღებია მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ გამოყენებულია იდენტიური პირობები.

** რელევანტურია MS მეთოდებისთვის, ვალიდაციის საშუალებით იმის დასადასტურებლად, რომ სამუშაო მახასიათებლების მოთხოვნები დაკმაყოფილებულია. მეთოდის ფარდობითი მატრიცული ეფექტი უნდა განისაზღვროს, თუ ეს ეფექტი არ იქნა შეფასებული ვალიდაციის პროცედურის დროს. მეთოდის აბსოლუტური აღდგენა უნდა განისაზღვროს, როდესაც დაკალიბრებისთვის არ არის გამოყენებული შიდა სტანდარტი ან მატრიცით ფორტიფიცირებული სტანდარტი.

ცხრილი N2-ს შესაბამისად, გამოკვლეულია შემდეგი პარამეტრები:

1. სპეციფიურობა;
2. სისტემის ვარგისობა;
3. თვისობრივი განსაზღვრის ზღვარი (LOD);
4. რაოდენობრივი განსაზღვრის ზღვარი (LOQ);
5. სწორხაზოვნება;
6. სისწორე (პრეციზიულობა);

შიდალაბორატორიული სისწორე;

7. სიზუსტე;

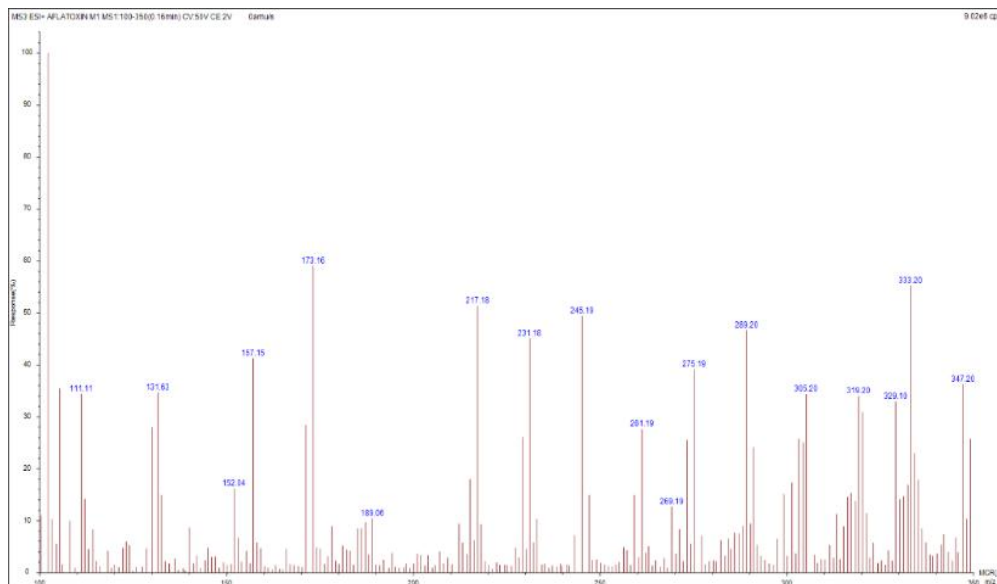
განსაზღვრა აგრეთვე:

- ფორტიფიცირებული მატრიციდან აღდგენის საშუალო მნიშვნელობა;
- შიდალაბორატორიული განმეორებადობა;
- მატრიცის ფაქტორი;
- მატრიცის ეფექტი;
- აფლატოქსინი M1 სტანდარტული ნიმუშის ხსნარის სტაბილურობა;
- ფორტიფიცირებული მატრიცის ექსტრაქტის სტაბილურობა;
- გაზომვის განუსაზღვრელობა თითოეული მატრიცისთვის;
- გადაწყვეტილების მიღების ზღვარი (CC α) და აღმოჩენის შესაძლებლობა (CC β) თითოეული მატრიცისთვის.

მას სპექტრომეტრული დეტექტირების პირობების შერჩევა:

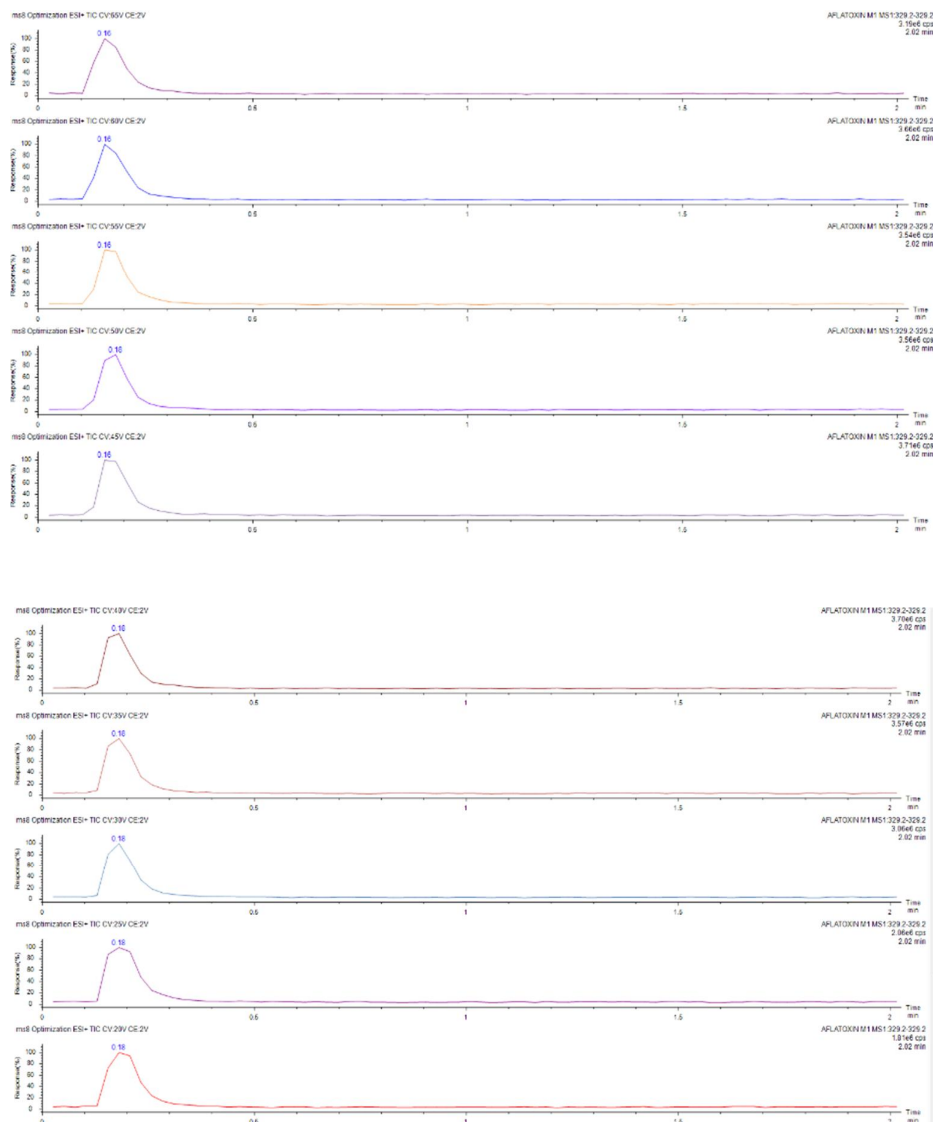
აფლატოქსინ M₁-ის იონიზაცია ტარდებოდა ელექტროგაფრქვევის მეთოდით, დადებითად დამუხტული იონების რეგისტრაციის რეჟიმში.

საწყისი იონის განსასაზღვრად, უშუალოდ მას-სპექტრომეტრულ დეტექტორში გაიშვებოდა აფლატოქსინ M₁-ის აცეტონიტრილიანი ხსნარი 10 მკგ/მლ და ხდებოდა სრული სპექტრის რეგისტრაცია (სურ. N2).



სურ. N4. აფლატოქსინ M₁-ის აცეტონიტრილიანი ხსნარის (10 მკგ/მლ) მას - სპექტრი

პრეკურსორ იონის ზუსტი მასის განსასაზღვრად, საჭიროა განმეორებითი სკანირება უფრო ვიწრო მასათა დიაპაზონში. ამ შემთხვევაში სკანირება ჩატარდა 324-332 დალტონის ფარგლებში. რის შედეგად დადგინდა ზუსტი მასა m/z 329.16. გამომხაურების სიდიდეზე დიდ გავლენას ახდენს მას - სპექტრომეტრის პარამეტრები. ფრაგმენტატორზე ძაბვის აწევა იწვევს პირველ კვადრუპოლში იონების გადაცემის გაუმჯობესებას, თუმცა ძაბვის ზედმეტი მომატების დროს საანალიზო ნივთიერების საწყისი იონი შეიძლება დაიშალოს ფრაგმენტებად ისე, რომ ვერ მიაღწიოს პირველ კვადრუპოლურ ფილტრს. ოპტიმალური ძაბვის დასადგენად შესწავლილ იქნა საწყისი იონის m/z 329.2 გამომხაურებაზე ძაბვის გავლენა 20–65 ვ-ის დიაპაზონში. მაქსიმალურ გამომხაურება მიიღება 45 ვ ძაბვის მნიშვნელობაზე და ის წარმოადგენს 3.71e6-ს.



სურ. N5. აფლატოქსინ M₁-ის პრეკურსორ იონის სიგნალის ინტენსივობა სხვადასხვა ძაბვის პირობებში

იონური რეაქციების საუკეთესო წყვილის შესარჩევად შესწავლილ იქნა დაჯახების ბლოკში აფლატოქსინ M₁-ის საწყისი იონის ფრაგმენტაციაზე დაჯახების ენერჯის სიდიდის გავლენა.

აფლატოქსინ M₁-ის პროტონირებული მოლეკულის ფრაგმენტაციის შედეგად მიიღება 2 დომინირებადი იონი: m/z 175 და m/z 131, რომელთაგან აფლატოქსინ M₁-ის რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის გამოყენებული იქნა იონ-პროდუქტი m/z 131 (30ვ).

მითითებული რეაქციების მონიტორინგის რეჟიმში აფლატოქსინ M₁-ის მას სპექტრომეტრული დეტექტირების პარამეტრები უარყოფითად დამუხტული იონების რეგისტრაციით მოცემულია ცხრილში N5.

ცხრილი N3: აფლატოქსინ M₁-ის მას - სპექტრომეტრული დეტექტირების პარამეტრები

ნივთიერება	საწყისი იონი m/z	იონ-პროდუქტები m/z	დაჯახების ენერჯია
აფლატოქსინი M ₁	329.2	259.0/273.0	25ვ/25ვ

მეთოდის შესამუშავებლად შერჩეულ იქნა შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფიული სვეტი-Sharpasil-AP C18, რამდენადაც ის არის უნივერსალური, pH-ის ფართო დიაპაზონში მდგრადი და მოსახერხებელია სერიული ანალიზებისთვის.

ქრომატოგრაფიული დაყოფის პირობები:

- ქრომატოგრაფიული სვეტი Sharpasil-AR C18 (100მმ × 4.6მმ, 3მკმ),
- მოძრავი ფაზა **A** - წყალი : 0.1% ჭიანჭველამჟავა (მეთანმჟავა)
- მოძრავი ფაზა **B**- აცეტონიტრილი
- ნაკადის სიჩქარე 0,5 მლ/წთ
- სვეტის თერმოსტატის ტემპერატურა 35^o C
- სინჯის მოცულობა 10 მკლ.

მას სპექტრომეტრული დეტექტირების პარამეტრები:

იონიზაცია ელექტრონების გაფრქვევით დადებითი იონების რეგისტრაციის რეჟიმში, დესოლვატაციის აირის სიჩქარე 15 დმ³/წთ, დესოლვატაციის აირის ტემპერატურა 500^oC, ძაბვა კაპილარზე 4500ვ, დაჯახების ენერჯია 25 ვოლტი, აფლატოქსინ M₁-ისთვის მითითებული რეჟიმის მონიტორინგი m/z 329. → 273

მას-სპექტრომეტრული დეტექცია განხორციელდა სრული სკანირებით (FS – full scan) მას-სპექტრების ჩაწერით და შერჩეული რეაქციის მონიტორინგით (SRM - Selected Reaction Monitoring);

საანალიზო ნივთიერების იდენტურობის დასადასტურებლად, ყველა სადიაგნოსტიკო იონის მასის გადახრა არის 5 ppm-ზე ნაკლები;

შერჩეული პრეკურსორ იონი წარმოადგენს პროტონირებულ მოლეკულას;

Instrument parameters

Ion source: ESI+ Current ion source: ESI

ESI Analyzer

Voltage

Capillary(kV)	4.48	4.5
Sampling cone(V)	39.78	40
TR1 shell (V)	60.42	60
Transfer rod(V)	34.74	35
Transfer lens1 (V)	14.92	15
Transfer rod2 (V)	9.97	10
Transmission2 (V)	9.96	10
Transfer rod3 (V)	0.00	0
Transfer lens3 (V)	0	0
Q0 exit (V)	—	-30
Curtain plate (V)	619.28	600

Temperature

Desolvation gas	500.00	500	
Vacuum interface(°C)	Open	Off	开启中

Gas control

Nebulizer gas(L/Min)	1.60	1.6
Desolvation gas(L/Min)	12.00	12
Blowback gas(L/Min)	2.00	2

Exhaust valve: Open Close

Instrument parameters

Ion source: ESI+ Current ion source: ESI

ESI Analyzer

MS1

Low quality resolution	164	
High Quality Resolution	134	
Ion Energy (eV)	0	
Pre-rod voltage (V)	-19.7	20

Scan Mode: MS MSMS

Collision chamber

Inlet voltage (V)	-26.91	2
Collision energy (eV)	-24.55	2
Collision energy gradient	Edit...	<input type="checkbox"/> Enabled
Outlet voltage (V)	-26.62	2
Collision gas (mL/Min)	0.45	0.45
Collision Pool (Torr)	1.30e-2	

MS2

Pre-rod voltage (V)	-39.51	15
Low quality resolution	169	
High Quality Resolution	110	
Ion Energy (eV)	3	

CEM

Inlet voltage (V)	-5981.6	6000
Deflection voltage (V)	-395.16	400
Multiplier Voltage (V)	2197.85	2200

სურ. 6. მას-სპექტრომეტრული დეტექტირებისთვის შერჩეული პარამეტრები

საანალიზო ნივთიერებაში, იონების თანაფარდობა შეესაბამება იონების თანაფარდობას სტანდარტით ფორტიფიცირებულ მატრიცაში, რომელიც გაზომილია იგივე პირობებში და ფარდობითი გადახრა არ აჭარბებს $\pm 40\%$;

ექსტრაქტში საანალიზო ნივთიერების შეკავების დრო შეესაბამება როგორც დაკალიბრების სტანდარტს, ასევე მატრიცის შესაბამის სტანდარტს და სტანდარტით ფორტიფიცირებულ მატრიცას ± 0.1 წუთის დაშვების ფარგლებში;

მობილური ფაზის, გამხსნელის და არაფორტიფიცირებული მატრიცის სიგნალი აფლატოქსინ M₁ - ის შეკავების დროის ფარგლებში არის ნულთან ახლოს და შესაბამისად, <30%-ზე;

ცხრილი N4: ვალიდაციის შეჯამებული შედეგები

მატრიცა	განმეორებადობა (RSD _r , %)	შიდალაბორატორიული განმეორებადობა (RSD _r , %)	CC α მკგ/კგ	LOQ მკგ/კგ	აღდგენა %	მატრიცის ეფექტი %	გაფართოებული განუსაზღვრელობა მკგ/კგ
რბე	8.45 \pm 0.10	9.24 \pm 0.99	0.0098	0.03	95.04 \pm 1.55	6.10 \pm 0.08	0.18
რბემჟავა პროდუქტი	3.82 \pm 0.05	9.26 \pm 0.15	0.01	0.034	93.17 \pm 0.38	10.88 \pm 0.13	0.14
ყველი	4.13 \pm 0.06	9.37 \pm 0.14	0.014	0.038	90.38 \pm 0.68	4.13 \pm 0.06	0.16
ნალები	7.86 \pm 0.09	2.29 \pm 0.02	0.014	0.036	88.85 \pm 1.07	7.86 \pm 0.09	0.13

აფლატოქსინ M₁ - ის, როგორც კონტროლირებადი ნივთიერებისთვის, CC α არის გონივრულ ფარგლებში, კერძოდ, 0.0098 – 0.014;

ექსტრაგირება ყველა დონის კონცენტრაციისთვის იყო $\geq 80.0\%$, 20%-ზე ნაკლები განმეორებადობის RSD%-ით (4.13%–8.45%) და 12%-ზე ნაკლები შიდალაბორატორიული აღწარმოებადობის RSD%-ით (2.29 % – 9.37%) რაც <20%-ზე;

გაფართოებული განუსაზღვრელობა გამოთვლილ იქნა 5.0 მკგ/კგ კონცენტრაციისთვის დაფარვის კოეფიციენტით 2, რაც სანდოობას უზრუნველყოფს 95%-ით;

მატრიცის ეფექტის გამოთვლილი იონური დათრგუნვა აფლატოქსინ M₁-ისთვის (ყველა მატრიცისთვის) არ აჭარბებს 11% რაც მისაღებია ვალიდირებული მეთოდისთვის;

თითოეული არაფორტიფიცირებული მატრიცის 20-20 ანალიზის შედეგად არ გამოვლინდა აფლატოქსინ M₁ - ის განსაზღვრის სპეციფიურობისთვის ხელისშემშლელი ფაქტორი.

დასკვნები:

- ჩვენს მიერ შემუშავებული და ვალიდირებულია რძეში და რძის პროდუქტში აფლატოქსინ M₁-ის განსაზღვრის ქრომატო მას სპექტრომეტრული მეთოდი;
- ვალიდირებული მეთოდი არის დამადასტურებელი მეთოდი LC MS/MS (ქრომატოგრაფია მას-სპექტრომეტრული დეტექციით) და ამდენად, უზრუნველყოფს ინფორმაციის მოწოდებას საანალიზო ნივთიერების სტრუქტურულ-ქიმიურ შემადგენლობაზე;
- მეთოდის ვალიდაციით დადასტურდა, რომ ანალიზის მეთოდი შეესაბამება კრიტერიუმებს, რომლებიც გამოიყენება შესაბამისი სამუშაოს მახასიათებლებისთვის;
- აფლატოქსინ M₁-ის თვისობრივი განსაზღვრის ზღვარად განისაზღვრა: რძეში - 0.003 მკგ/კგ, რძემჟავა პროდუქტში - 0.0034 მკგ/კგ, ყველში - 0.0038 მკგ/კგ, ნაღებში - 0.0036 მკგ/კგ;
- აფლატოქსინ M₁-ის რაოდენობრივი განსაზღვრის ზღვარად განისაზღვრა: რძეში - 0.03 მკგ/კგ, რძემჟავა პროდუქტში - 0.034 მკგ/კგ, ყველში - 0.038 მკგ/კგ, ნაღებში - 0.036 მკგ/კგ;
- კარგი სწორხაზოვნება ოთხივე მატრიცისთვის ($R^2=1$) მიღებულ იქნა 0.03 – 10.0 მკგ/კგ კონცენტრაციების დიაპაზონში;

მიღებული შედეგები მიუთითებს ანალიზური მეთოდების მიმართ წაყენებული მოთხოვნებისადმი შერჩეული მეთოდის შესაბამისობაზე.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. საქართველოს მთავრობის 2016 წლის 18 იანვრის დადგენილება N22 ტექნიკური რეგლამენტი - ცოცხალ ცხოველებსა და ცხოველური წარმოშობის სურსათში ზოგიერთი ნივთიერებისა (სუბსტანციის) და მათი ნარჩენების მონიტორინგის წესის დამტკიცების შესახებ;
2. საქართველოს მთავრობის 2023 წლის 5 ივნისის დადგენილება №212, ტექნიკური რეგლამენტი – სასურსათო დანიშნულების ცხოველებში ფარმაკოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების (სუბსტანციების) ნარჩენების ანალიზის მეთოდების განხორციელების, ნიმუშის აღებისა და შედეგების ინტერპრეტაციის წესის დამტკიცების შესახებ;
3. საქართველოს მთავრობის 2023 წლის 13 ივნისის დადგენილება №225, ტექნიკური რეგლამენტი – ცხოველური წარმოშობის სურსათში აკრძალულ/დაუშვებელ ფარმაკოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებებთან (სუბსტანციებთან) დაკავშირებით მოქმედებისათვის საცნობარო მაჩვენებლების (RPA) შესახებ დამტკიცების თაობაზე;
5. Andreia Vaz 1, Ana C Cabral Silva 1, Paula Rodrigues, Armando Venâncio. Detection Methods for Aflatoxin M1 in Dairy Products, Microorganisms, NCBI,2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137775>
6. ISO 14501:2021, Milk and milk powder — Determination of aflatoxin M1 content — Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography (edition 3, 2021); Volume 436, 15 March 2024
7. Kamkar A, Yazdankhah S, Nafchi AM, Nejad AS. Aflatoxin M1 in raw cow and buffalo milk in Shush city of Iran. Food Addit Contam Part B Surveill. 2014;7(1):21-24
8. Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. Front Microbiol. 2016;7:2170. [
9. Yaser Almasoud, Manar Alwelaie, Zeyad Aldosari, Sarah Alotaibi, Abdullah Alsayari, Ghada Alzyadi, Mohammed Almutairi, Sulaiman Alajel, Abdullah Al Tamim, Hibah Alharbi □ An assessment of the prevalence of Aflatoxin M1 level in milk and milk powder based on high performance liquid chromatography and dietary risk assessment Toxicol Rep 2024 Nov 9;13:101787. doi: 10.1016/j.toxrep.2024.101787
10. Viola O. Okechukwu, Oluwasola A. Adelusi, Abidemi P. Kappo, Patrick B. Njobeh, Messai A. Mamo .Aflatoxins: Occurrence, biosynthesis, mechanism of action and effects, conventional/emerging detection techniques. Food Chemistry Volume 436, 15 March 2024, 137775

Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometric(LCMS/MS) Method for the Determination of Aflatoxin M₁ in Milk and Dairy Products

Chikviladze tamar¹., Baramidze Ketevan²., Chafidze nino²., Tatanashvili Mariam¹., Otarashvili Tamar.

TSMU Department of Pharmaceutical Toxicological and Medical Chemistry¹,

GlobalTest Examination Laboratory²

Many types of mold growing on agricultural products produce toxic substances called mycotoxins. Aflatoxin B₁ is the most common, highly toxic, and carcinogenic of them. It is produced by fungi of the *Aspergillus* genus, which grow on stored grains, seeds, and fruits under hot and humid conditions.

Aflatoxin M₁ is the hydroxylated form and toxic metabolite of aflatoxin B₁. It is formed in the liver of animals that consume feed contaminated with aflatoxin B₁.

Aflatoxin M₁ accumulates in the animal's body and is excreted in milk, posing a risk to the health of the consuming species — humans. Aflatoxin M₁ is a strong carcinogen and also causes liver and immune system damage. Because of its high toxicity and hepatocarcinogenic potential, the permissible level of aflatoxin M₁ in milk and dairy products is strictly regulated in developed countries, including Georgia.

In Georgia, the maximum allowable limit for aflatoxin M₁ is 0.05 µg/kg.

The aim of this study was to develop and validate a chromat-mass spectrometric method for the determination of aflatoxin M₁. We have developed and validated a chromat-mass spectrometric method for determining aflatoxin M₁ in milk and dairy products.

The limit of qualitative detection of aflatoxin M₁ was determined as follows: in milk – 0.003 µg/kg, in fermented milk products – 0.0034 µg/kg, in cheese – 0.0038 µg/kg, in cream – 0.0036 µg/kg.

The limit of quantitative determination of aflatoxin M₁ was determined as follows: in milk – 0.03 µg/kg, in fermented milk products – 0.034 µg/kg, in cheese – 0.038 µg/kg, in cream – 0.036 µg/kg.

The obtained results indicate that the selected method meets the requirements established for analytical procedures.

Keywords: Mycotoxins, Aflatoxin, Dairy products, High-performance liquid chromatography (HPLC), Mass spectrometry (MS)