

¹Katedra Turystyki i Rekreacji, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, Polska

²Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, Polska
e-mail: radoslaw.kowalski@up.lublin.pl

GRAŻYNA KOWALSKA¹ , RADOŚLAW KOWALSKI² 

Kontrola obecności mykotoksyn w produktach rolniczych i żywności. Cz. I. Praca przeglądowa

Control of the presence of mycotoxins in agricultural products and food.
Part I. A review

Streszczenie. Jakość żywności i pasz jest determinowana przede wszystkim czynnikami, które są charakterystyczne dla produkcji w gospodarstwie rolniczym czy ogrodniczym. Na każdym następnym etapie związanym z przetwarzaniem surowców pochodzenia roślinnego czy zwierzęcego może dojść do wprowadzenia lub powstania składników niepożądanych, które mogą stanowić zagrożenie dla ludzkiego zdrowia czy życia. Liczne badania naukowe prowadzą do ciągłej aktualizacji wiedzy na temat ryzyka związanego z obecnością kontaminantów w żywności. Jedną z takich grup są mykotoksyny, czyli wtórne metabolity grzybów strzępkowych. Znane są czynniki, które zwiększają ryzyko pojawienia się mykotoksyn w żywności i paszach. Wprowadzono stosowne regulacje prawne celem ograniczenia wystąpienia w obrocie produktów skażonych mykotoksynami. Ponadto prowadzone są badania mające na celu optymalizację procedur przygotowania próbki pod względem oceny obecności tej grupy kontaminantów w surowcach rolniczych, żywności oraz paszach. W pracy przedstawiono zagadnienia związane z czynnikami zwiększającymi ryzyko wystąpienia mykotoksyn, aktualne wymagania prawne dotyczące obecności mykotoksyn w żywności oraz techniki przygotowania próbek do analizy ze szczególnym uwzględnieniem etapu izolacji i oczyszczania mykotoksyn.

Słowa kluczowe: żywność, pasza, izolacja i oczyszczanie mykotoksyn, regulacje prawne

WSTĘP

Rolnictwo jest zasadniczym działem produkcyjnym, który dostarcza różnych surowców, wykorzystywanych głównie do wytwarzania żywności i pasz. Żywność jest dla człowieka niezbędnym źródłem składników energetycznych oraz innych związków, które wpływają na metabolizm oraz regulują procesy życiowe. Bardzo ważne są wobec tego jakość oraz bezpieczeństwo żywności, która może także zawierać niepożądane składniki, zagrażające ludzkiemu zdrowiu i życiu.

Obecnie obserwuje się zainteresowanie ze strony konsumentów problemem jakości żywności. Wynika to głównie ze wzrostu świadomości społeczeństwa, na co szczególnie wpływ ma postęp naukowy. W społeczeństwach ekonomicznie rozwiniętych konsument zwraca uwagę nie tylko na wygląd zewnętrzny i cechy organoleptyczne produktów spożywczych, ale także na skład oraz obecność substancji szkodliwych. Odpowiednie regulacje prawne stawiają przed producentami szereg wymagań, natomiast konsumentom zapewniają spełnianie przez żywność kryteriów, które są gwarancją bezpieczeństwa zdrowotnego. Szczególnie ważnym aspektem w ocenie jakości żywności jest spełnienie norm bezpieczeństwa w zakresie obecności substancji toksycznych, które pochodzą z różnych źródeł i należą do bardzo zróżnicowanych grup chemicznych. Jedną z takich grup kontaminantów są mykotoksyny, które oddziałują negatywnie na zdrowie człowieka, a nawet mogą stanowić zagrożenie dla życia.

Mykotoksyny są obecne w różnych produktach, głównie pochodzenia roślinnego (zboża, mąki, orzechy, oleje, kakao, ryż, kukurydza, zioła, przyprawy, kawa, herbata), ale także w produktach pochodzenia zwierzęcego. Problem zanieczyszczenia mykotoksynami sięga odległych czasów. Znane są opisy pochodzące z dawnych wieków dotyczące dolegliwości wynikających ze spożycia zapleśniałej żywności czy paszy. W późnym średniowieczu opisywano choroby występujące po zjedzeniu chleba żytniego. Dzisiaj wiemy, że przyczyną był alkaloid zawarty w sporyszu – bardzo toksyczny, powodujący niedokrwistość oraz obumieranie części ciała (ergotyzm, „ogień św. Antoniego”). Z wieku XIX pochodzą opisy chorób wywołanych toksynami *Penicillium* („choroba żółtego ryżu”) oraz opisy przypadków zatrucia w latach 1942–1947 na Syberii, prawdopodobnie w wyniku spożycia pszenicy i jęczmienia skażonych mykotoksynami z rodzaju *Fusarium* (pokarmowa toksyczna aleukia) [Schoental 1994]. W roku 1960 w Anglii odnotowano śmierć stu tysięcy indyków. Przyczyną zgonu była aflatoksyna B1 zawarta w paszy [Wróbel 2014]. Epidemia w Anglii spowodowała podjęcie licznych badań w tematyce mykotoksyn, w wyniku których ustalono interakcje między toksynami i organizmami żywymi oraz opracowano procedury analityczne, a także wydano stosowne regulacje prawne w tym zakresie.

Produkty rolne ulegają zanieczyszczeniu mykotoksynami już podczas rozwoju rośliny na polu, w czasie zbioru, obróbki, przechowywania, a także transportu gotowego produktu [Chelkowski 1985, Suchorzyńska i Misiewicz 2009, Bis i in. 2010]. Ze względu na gwałtowny wzrost industrializacji, globalizacji oraz rozwój handlu mykotoksyny stały się problemem ogólnoswiatowym. Mykotoksyny, jako naturalne zanieczyszczenie żywności, stanowią poważny problem zarówno dla krajów słabo, jak i dobrze rozwiniętych. W pierwszej kolejności chodzi o straty ekonomiczne, a w drugiej o zagrożenia dla zdrowia i życia ludzi [Zawadzki 2006]. Dlatego też ważne są wszelkie działania na wszystkich płaszczyznach: od projektu prowadzonej produkcji, poprzez poszczególne jej etapy, ze szczególnym uwzględnieniem procedur analitycznych, które pozwalają kontrolować jakość i bezpieczeństwo żywności i pasz.

CO TO SĄ MYKOTOKSYNY?

Nazwa substancji z grupy mykotoksyn wywodzi się od słów: gr. *mycos* – grzyb, łac. *toxicum* – trucizna, wiąże się z ich pochodzeniem jako wtórnych metabolitów grzybów strzępkowych. Substancje te wykazują toksyczne działanie nie tylko w stosunku do bakterii, ale też kręgowców. Mykotoksyny wytwarzane są na różnych podłożach, takich jak zboża, owoce, ziola, przyprawy, pasze, tytoń. Grzyby wytwarzające mykotoksyny należą przede wszystkim do rodzajów: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Pithomyces*, *Diplodia* [Nikonorow i Urbanek-Karłowska 1987, Gertig 1996, Żakowska i Stobińska 2000, Grajewski 2006, Pokrzywa i in. 2007, Bis i in. 2010]. Wśród toksyn można wyróżnić endotoksyny – znajdujące się wewnątrz grzybni, a także egzotoksyny – mające zdolność szybkiego przedostawania się z grzybni do produktów spożywczych, gleby, powietrza.

Tabela 1. Główne grupy mykotoksyn i ich działanie fizjologiczne [Weidenbömer 2001, Richard 2007, Turner i in. 2009, Bianchini i Bullerman 2014]

Table 1. The main groups of mycotoxins and their physiological effects [Weidenbömer 2001, Richard 2007, Turner et al. 2009, Bianchini and Bullerman 2014]

Toksyna	Główne działanie w stosunku do układów narządów ssaków
Aflatoksyny (AF)	rakotwórcze, ostre zapalenie wątroby, zaburzony układ odpornościowy
Cytrynina (CIT)	nefrotoksyczne
Citreowiridyna	neurotoksyczne
Kwas cyklopiazonowy	rakotwórcze, biegunka, zmiany w wątrobie, utrata laktacji, zmiany w nerkach, „zatrucie kodo”, przeczulica depresyjna, utrata masy ciała
Fumonizyny (F)	rakotwórcze, hepatotoksyczne, leukoencefalomalacja u koni
Moniliformina (MON)	rakotwórcze, utrata masy ciała, krwotok jelitowy, choroba keshan
Ochratoksyny (OT)	rakotwórcze, nefrotoksyczne, hepatotoksyczne, teratogenne
Patulina (PT)	krwotoki płucne i mózgowe
Sterigmatocystyna (ST)	rakotwórcze, biegunka, zmiany w wątrobie, utrata laktacji, zmiany w nerkach
Trichoteceny (m.in. toksyna T-2, toksyna HT-2, deoksyniwalenol)	immunosupresyjne, krwotoki z przewodu pokarmowego, mutagenne, teratogenne
Zearalenon (ZEN)	estrogenne
Luteoskiryna	mutagenne
Kwas penicylowy (PA)	o niższej toksyczności od patuliny, do której jest podobny strukturalnie, w wysokich dawkach rakotwórczy, powoduje stłuszczenie i martwicę wątroby
Kwas byssochlaminowy	o niższej toksyczności od patuliny

Mykotoksyny są związkami niskocząsteczkowymi ($M < 1,5$ kDa) oraz słabo polarnymi. Procesy pasteryzacji oraz obróbka w wyższych temperaturach nie powodują destrukcji tych substancji. Natomiast skutecznie niszczone są w wyniku działania promieniowania UV oraz środowiska alkalicznego. Chemicznie jest to grupa zróżnicowana i ogólnie zaliczane są one do węglowodorów aromatycznych [Soroka i in. 2008, Pławińska-Czarnak i Zarzyńska 2010]. Poznano ponad 400 mykotoksyn i ich pochodnych, wśród których najbardziej znanymi są: aflatoksyny (AF), ochratoksyny (OT), zearalenon (ZEN), trichoteceny, patulina (PT), fumonizyny (F), sterigmatocystyna (ST), luteoskiry-na, kwas penicylinowy (PA), kwas byssochlaminy, cytrynina (CIT), kwas cyklopiasonowy [Chełkowski 1985, Seńczuk 2002, Stępień i in. 2007].

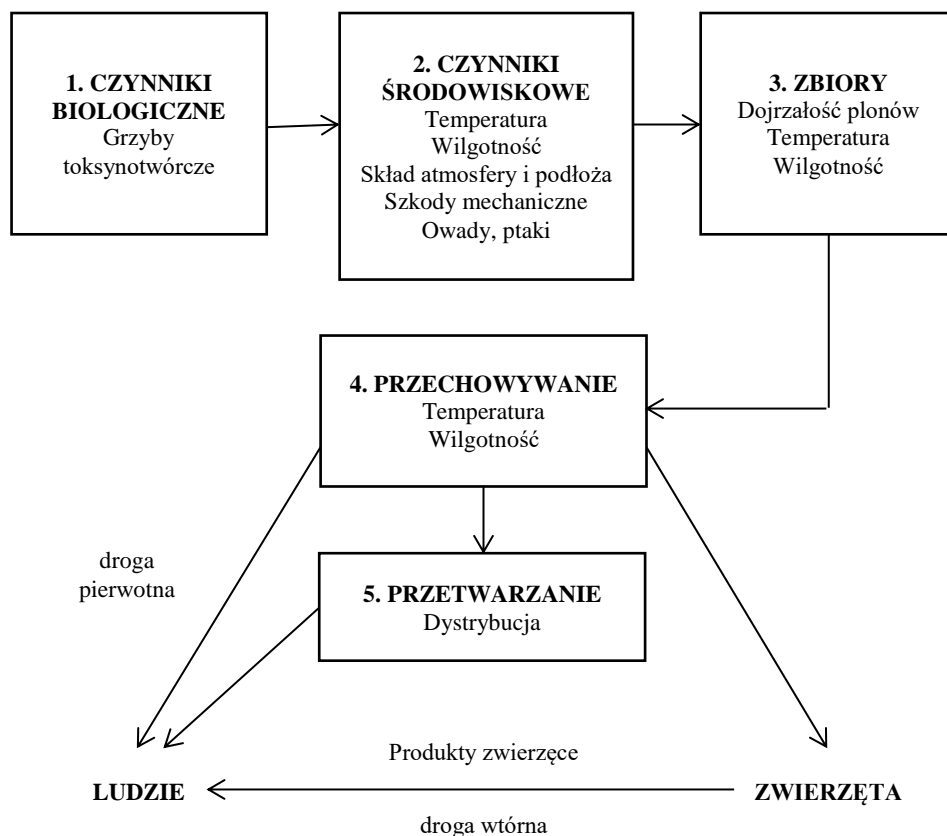
Mykotoksyny, oprócz powodowania ostrych zatruc, wykazują także właściwości rakotwórcze, mutagenne, teratogenne i estrogenne (tab. 1), które ujawniają się już przy bardzo niskich stężeniach [Muro-Cach i in. 2004, Turner i in. 2009]. Nie wszystkie jednak pleśnie są toksyczne, jak np. te, które mają dobroczynny wpływ przy produkcji żywności – serów czy wędzonek, a także jako substancje o właściwościach antybiotycznych [Quilien 2002].

SKĄD SIĘ BIORĄ MYKOTOKSYNY W PRODUKTACH ROLNICZYCH I ŻYWNOCI?

Wytwarzanie mykotoksyn przez grzyby strzępkowe uwarunkowane jest różnymi czynnikami, m.in. składem podłoża, obecnością mikroelementów (cynk, magnez, kobalt), temperaturą, wilgotnością, zawartością tlenu i dwutlenku węgla w powietrzu, mikroflorą towarzyszącą czy obecnością szkodników – rys. 1 [Jurga 2007a].

Szczególnym „stymulatorem” grzybów strzępkowych do wydzielania mykotoksyn jest wilgotność względna powietrza powyżej 70%, zaś w przypadku surowca roślinnego powyżej 15%, a także temperatura 10–40°C, pH 4–8 [Zawadzki 2011]. W warunkach polowych czynnikami, które sprzyjają powstawaniu mykotoksyn są długotrwałe opady lub wręcz przeciwnie – susza. Zanieczyszczenie surowców roślinnych przez mykotoksyny może nastąpić nawet w środowisku, które spełnia warunki odpowiedniego wysuszenia, jeżeli będą one przechowywane w pomieszczeniach o nieregulowanych warunkach wilgotności i temperatury [Nikonow i Urbanek-Karłowska 1987, Żakowska i Stobińska 2000, Suchorzyńska i Misiewicz 2009]. Wzrost zagrożenia mykotoksynami jest także skutkiem anomalii pogodowych oraz narastających zmian klimatycznych. Istotne znaczenie w tym względzie ma wzrost i rozszerzenie obszaru handlu produktami roślinnymi. W konsekwencji wiele mykotoksyn, których występowanie było ograniczone do danego regionu czy kontynentu, rozprzestrzeniło się na cały świat [Jurga 2007b]. Dowiedziono, że stosowanie fungicydów nie wpływa hamująco na powstawanie mykotoksyn. Środki grzybobójcze wywołują stres u grzybów, co w konsekwencji skutkuje nadmierną produkcją mykotoksyn [Suchorzyńska i Misiewicz 2009]. Obecność mykotoksyn w żywności zależy więc od wielu czynników, m.in. kultury rolnej, technologii przetwarzania surowców, warunków przechowywania i sposobów magazynowania [Pokrzywa i in. 2007].

Większość mykotoksyn jest stabilna chemicznie, więc mają tendencję do przetrwania podczas przechowywania, przetwarzania, a nawet podczas przygotowywania produktów spożywczych w dość wysokich temperaturach, takich jak te osiągnęte np. podczas pieczenia [Pokrzywa i in. 2007]. Dlatego ważne jest, aby unikać warunków, które prowadzą



Rys. 2. Czynniki powodujące powstawanie mykotoksyn w łańcuchu pokarmowym [Żakowska i Stobińska 2000]

Fig. 2. The factors leading to the formation of mycotoxins in the food chain [Żakowska and Stobińska 2000]

do tworzenia mykotoksyn, co nie zawsze jest możliwe i nie zawsze osiągnięte w praktyce. Usunięcie mykotoksyn z żywności jest trudne, natomiast najlepszą metodą kontroli jest stosowanie metod prewencyjnych [Bullerman i in. 1984]. Widoczna obecność wytwarzającego toksynę patogenu grzybowego wcale nie oznacza, że surowiec czy produkt zawiera mykotoksyny. Także brak jakichkolwiek oznak porażenia mikroorganizmami grzybowymi nie upoważnia do wniosku o braku skażenia mykotoksynami [Turner i in. 2009]. Z surowca zawierającego kontaminanty, powstaje zanieczyszczony produkt, który w wyniku spożycia (nasiona roślin oleistych, oleje, zboża, warzywa, owoce, przyprawy czy orzechy) przedostaje się do organizmu (tzw. droga pierwotna). Z kolei pośrednim źródłem mykotoksyn są pasze, które przyczyniają się do skażenia produktów pochodzenia zwierzęcego (mięso, mleko, jaja) i w ten sposób mogą trafić do organizmu konsumenta (tzw. droga wtórna) – rys. 1.

Bardzo istotne są badania dotyczące zawartości mykotoksyn zarówno w surowcach, jak i w produktach. Szczególnie wiele prac dotyczy oceny występowania aflatoksyn (tab. 1) [Kowalska i in. 2017]. W Polsce aflatoksyny występują głównie w importowa-

nych orzechach oraz kukurydzy pochodzących z krajów o klimacie tropikalnym i subtropikalnym, co skutkuje możliwością wprowadzenia tych toksyn do organizmu wraz z produktami zawierającymi te składniki. Dlatego też głównie aflatoksyny są obiektem zainteresowań zarówno grup badawczych, jak i laboratoriów oferujących usługi w zakresie kontroli jakości.

Tabela 2. Występowanie aflatoksyn w produktach pochodzenia roślinnego [Kowalska i in. 2017]
Table 2. The occurrence of aflatoxins in products of plant origin [Kowalska et al. 2017]

Grupa produktów	Rodzaj produktu	Liczba analizowanych próbek	Procent zanieczyszczonych próbek	Oznaczana aflatoksyna	Stężenie/zakres stężeń (ppb)	Kraj
Nasiona oleiste	masło orzechowe	33	93,94	Suma AF ^a	0,7–95,9	Chiny
	pistacje	10068	36,74	AFB1	5,9 (średnia)	Iran
	orzeszki ziemne	151	19,21	Suma AF ^b	0,16–60,9	Turcja
	krem z orzechów włoskich	40	95,0	Suma AF ^b	0,625–10	Turcja
	orzechy laskowe	51	84,31	Suma AF ^b	0,625–10	Turcja
	orzechy arachidowe	7	42,86	Suma AF ^b	0,2–39	Polska
	orzechy laskowe	15	93,33	AFB1	0,02–1,47	Polska
	orzechy arachidowe	6	50,0	AFB1	0,01–0,04	Polska
	orzechy inne	6	66,67	AFB1	0,01–0,16	Polska
	orzechy arachidowe	289	37,37	Suma AF ^b	LOD ^c –76,76	Polska
Przyprawy	papryka	44	18,18	Suma B+G	1,1–97,5	Turcja
	czerwona papryka w proszku	26	11,54	Suma B+G	1,8–16,4	Turcja
	papryka czerwona mielona	75	96,0	AFB1	0,11–24,7	Turcja
	papryka	20	95,0	AFB1	1,1–15,4	Maroko
	kminek	20	25,0	AFB1	0,8–6,7	Maroko
	czarny pieprz	20	15,0	AFB1	0,7–7,3	Maroko
	biały pieprz	20	10,0	AFB1	2,8–3,7	Maroko
	pieprz	11	100,0	Suma AF ^b	0,40–12,1	Polska
	papryka słodka	12	100,0	Suma AF ^b	0,43–5,56	Polska
	czarny pieprz	12	16,67	Suma AF ^b	0,15–0,55	Polska
	biały pieprz	11	18,18	Suma AF ^b	0,14–0,25	Polska
	chilli	10	50,0	Suma AF ^b	0,15–3,96	Polska
	gałka muskatołowa	10	100,0	Suma AF ^b	0,19–16,91	Polska
	imbir	9	66,67	Suma AF ^b	0,15–5,61	Polska
	kurkuma	9	55,56	Suma AF ^b	0,15–1,00	Polska
	zioła i przyprawy	52	40,38	Suma AF ^b	LOQ ^c –5,0	Polska
mieszanki przypraw	10	90,0	AFB1	0,05–5	Polska	

Zboża	kukurydza	633	38,07	AFB1	1,1–2072	Chorwacja
	ryż	1200	67,83	AFB1	0,1–308,0	Indie
	sorgo	82	6,105	AFB1	<1,0–25,9	Etiopia
	pszenica	41	58,54	Suma AF ^b	0,0104–0,6435	Turcja
	jęczmień	115	11,30	AFB1	<1,0–11,7	Etiopia
	mąka	6	–	Suma AF ^b	0,3–1,2	Polska
	kasza	4	–	Suma AF ^b	0,3–0,4	Polska
	makaron	11	–	Suma AF ^b	0,3–0,3	Polska
	płatki owsiane	13	–	Suma AF ^b	0,3–0,3	Polska
	mąka pszenna	10	20,0	AFB1	0,18–0,33	Polska
	pszenica ziarno	7	0,0	AFB1	<0,05	Polska
	ciastka	3	66,67	AFB1	0,06–0,31	Polska
	kukurydza	199	160	Suma AF ^b	LOD ^c –4	Polska
	kukurydza	140	80,40	AFB1	0,05–560	Włochy
kukurydza i przetwory	22	0,0	Suma AF ^b	<LOQ ^e	Polska	
Owoce suszone	rodzynki sułańskie	19	15,79	Suma AFB1 + AFB2	0,3–2,0	Brazylia
	figi	2680	25,52	Suma AF ^b	nd ^e –278,04	Turcja
	rodzynki	17	47,06	Suma AF ^b	LOQ ^c –5,0	Polska
	suszone owoce	1373	13,62	Suma AF ^b	<0,1–1870	Włochy

AF – aflatoksyny, AFB1 – aflatoksyna B1, AFB2 – aflatoksyna B2, AFG1 – aflatoksyna G1, AFG2 – aflatoksyna G2

^aSuma AF: AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2 + AFM1 + AFM2, ^bSuma AF: AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2,

^cLOD – granica wykrywalności (limit of detection), ^dLOQ – granica oznaczalności (limit of quantification),

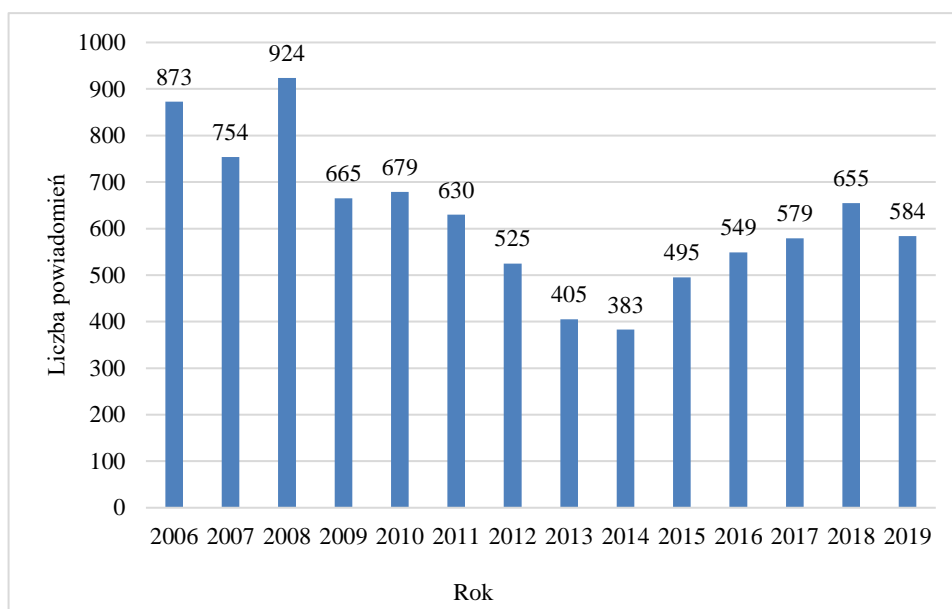
^enie wykryto

WYMAGANIA PRAWNE W ZAKRESIE OBECNOŚCI MYKOTOKSYN W ŻYWNOSCI

Ze względu na zagrożenie związane z konsumpcją żywności, która potencjalnie może zawierać mykotoksyny, prowadzony jest monitoring zawartości tych substancji zarówno w surowcach, jak i gotowych produktach. Rozpatrując ten problem w aspekcie globalnym, należy wymienić instytucje doradcze i organy zajmujące się bezpieczeństwem żywności, tj. Światową Organizację Zdrowia (WHO), Wspólny Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (JECFA) oraz Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). W Polsce wszelkie sprawy dotyczące bezpieczeństwa i jakości żywności są w gestii Ministra Zdrowia oraz Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, natomiast kwestie prawne reguluje Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia [Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, 2006].

Należy wspomnieć, że w działaniach ograniczających ryzyko przedostawania się mykotoksyn do łańcucha żywnościowego istotne znaczenie ma wymiana informacji między państwami członkowskimi UE, w zakresie naruszenia bezpieczeństwa żywności i pasz. Na podstawie Rozporządzenia Komisji (WE) 178/2002 [Rozporządzenie Komisji

(WE) 2002] został w tym celu powołany System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach – RASFF, który koordynuje właściwy obieg informacji wewnątrz UE. W Polsce za działanie systemu RASFF odpowiada Główny Inspektor Sanitarny. Odpowiednie reagowanie na niepokojące informacje z całego obszaru UE umożliwia zapobieganie zagrożeniom związanym z bezpieczeństwem żywności i pasz oraz skutkuje zastosowaniem właściwych metod zaradczych. Dane udostępnione przez system RASFF wskazują, że mykotoksyny, obok patogennych mikroorganizmów i pestycydów, są najczęściej zgłaszanym zagrożeniem w krajach EU (rys. 2), a główną grupą mykotoksyn są aflatoksyny i ochratoksyny, zaś rzadziej toksyny *Fusarium* [European Commission 2020].



Rys. 2. Liczba powiadomień zgłoszonych do systemu RASFF dotyczących obecności mykotoksyn – dane z portalu RASFF [European Commission 2020]

Fig. 2. The number of notifications submitted to the RASFF on the presence of mycotoxins – data from the RASFF portal [European Commission 2020]

W celu ograniczenia zagrożeń ze strony mykotoksyn (zarówno dla człowieka, jak i dla zwierząt) zostały wprowadzone wytyczne, które narzucają ograniczenia zawartości mykotoksyn w paszach i żywności. Dokumentem regulującym najwyższe dopuszczalne zawartości aflatoksyn w produktach żywnościowych jest Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych [CE 2006]. W tabeli 3 zestawiono najwyższe dopuszczalne poziomy dla zanieczyszczeń aflatoksynami w środkach spożywczych [CE 2006].

Tabela 3. Najwyższe dopuszczalne zawartości aflatoksyn w środkach spożywczych [CE 2006]
 Table 3. The highest permissible levels of aflatoxins in foodstuffs [CE 2006]

Produkt		Najwyższa dopuszczalna zawartość (µg/kg)		
		aflatoksyna B1	aflatoksyny B1 + B2 + G1 + G2	aflatoksyna M1
Orzeszki ziemne, orzechy oraz suszone owoce	orzechy arachidowe i orzechy oraz przetworzone produkty z orzechów, suszone owoce oraz przetworzone produkty z suszonych owoców przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub użyte jako składniki w środkach spożywczych	2,0	4,0	–
	orzechy arachidowe, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyte jako składnik w środkach spożywczych	8,0	15,0	–
	orzechy i suszone owoce, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyte jako składnik w środkach spożywczych	5,0	10,0	–
Zboża	wszystkie zboża i wszystkie produkty otrzymywane ze zbóż, w tym przetworzone produkty zbożowe, z wyjątkiem środków spożywczych uszczegółowionych w osobnych rubrykach	2,0	4,0	–
	kukurydza, która ma być sortowana lub poddana innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyta jako składnik w środkach spożywczych	5,0	10,0	–
Surowe mleko, mleko poddane obróbce cieplnej i mleko służące do wytwarzania produktów na bazie mleka		–	–	0,050
Przyprawy: <i>Capsicum</i> spp. (pochodzące z tego suszone owoce, całe lub mielone, w tym papryka chili, mielone chili, pieprz kajeński i papryka); <i>Piper</i> spp. (pochodzące z niego owoce, w tym biały i czarny pieprz); <i>Myristica fragrans</i> (gałka muszkatołowa), <i>Zingiber officinale</i> (imbir), <i>Curcuma longa</i> (kurkuma)		5,0	10,0	–
Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci		0,10	–	–
Preparaty dla niemowląt i preparaty pochodne, w tym modyfikowane mleko w proszku dla niemowląt i mleko następne		–	–	0,025
Produkty dietetyczne do specjalnych celów medycznych, przeznaczone specjalnie dla niemowląt		0,10	–	0,025

W Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. [CE 2006], ustalającym najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych znajdują się także wytyczne ograniczające zawartość innych mykotoksyn: ochratoksyny A (tab. 3), patuliny (tab. 4), deoksyniwalenolu (tab. 5), zearalenonu (tab. 6), fumonizyn (tab. 7). Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. [CE 2006] nie podaje wymagań dla toksyn T-2 i HT-2.

Tabela 4. Najwyższe dopuszczalne zawartości ochratoksyny A wg Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1881/2006 [CE 2006]

Table 4. The highest permissible content of ochratoxin A according to Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 [CE 2006]

Produkt	Najwyższa dopuszczalna zawartość (µg/kg)
Nieprzetworzone zboża	5,0
Wszystkie produkty pochodzące z nieprzetworzonych zbóż, w tym produkty z przetworzonych zbóż, oraz zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, z wyjątkiem środków spożywczych uszczegółowionych w osobnych rubrykach	3,0
Suszone owoce winorośli (koryntki, rodzynki i sułtanki)	10,0
Palone ziarna kawy i mielona kawa palona, z wyjątkiem kawy rozpuszczalnej	5,0
Kawa rozpuszczalna	10,0
Wino (w tym wino musujące, z wyjątkiem wina likierowego i wina o mocy alkoholu poniżej 15% obj.) i wino owocowe	2,0
Wino aromatyzowane i napoje na bazie wina aromatyzowanego i aromatyzowane koktajle winopochodne	2,0
Sok winogronowy, koncentrat soku winogronowego po rozcieńczeniu wodą, nektar winogronowy, moszcz winogronowy i koncentrat moszczu winogronowego po rozcieńczeniu wodą przeznaczony do bezpośredniego spożycia przez ludzi	2,0
Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i dzieci	0,50
Produkty dietetyczne do specjalnych celów medycznych przeznaczone specjalnie dla niemowląt	0,50
Zielona kawa, suszone owoce inne niż suszone owoce winorośli, piwo, kakao i produkty z kakao, wina likierowe, produkty mięsne, przyprawy, lukrecja	–

Tabela 5. Najwyższe dopuszczalne zawartości patuliny wg Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1881/2006 [CE 2006]

Table 5. The highest permissible patulin content according to the Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 [CE 2006]

Produkt	Najwyższa dopuszczalna zawartość (µg/kg)
Soki owocowe, koncentrat soków owocowych po rozcieńczeniu wodą oraz nektary owocowe	50
Napoje spirytusowe, jabłecznik i inne sfermentowane napoje otrzymywane z jabłek lub zawierające sok jabłkowy	50
Produkty z jabłek, w tym kompot z jabłek, puree jabłkowe przeznaczone do bezpośredniego spożycia, z wyjątkiem środków spożywczych uszczegółowionych w osobnych rubrykach	25,0
Sok jabłkowy i produkty z jabłek, w tym kompot jabłkowy i puree z jabłek, dla niemowląt i małych dzieci, jako takie oznakowane i sprzedawane	10,0
Żywność dla niemowląt, inna niż przetworzona żywność na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci	10,0

Tabela 6. Najwyższe dopuszczalne zawartości deoksynivalenolu wg Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1126/2007 [CE 2007]

Table 6. The highest permissible levels of deoxynivalenol according to Commission Regulation (EC) No. 1126/2007 [CE 2007]

Produkt	Najwyższa dopuszczalna zawartość (µg/kg)
Nieprzetworzone zboża inne niż pszenica durum, owies i kukurydza	1250
Nieprzetworzona pszenica durum i owies	1750
Nieprzetworzona kukurydza	1750
Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa (w tym mąka kukurydziana, mączka kukurydziana i płatki kukurydziane), otręby jako produkt końcowy wprowadzony na rynek do bezpośredniego spożycia przez ludzi oraz zarodki, z wyjątkiem środków spożywczych uszczegółowionych w osobnych rubrykach	750
Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i zboża śniadaniowe	500
Makaron (suchy)	750
Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	200

Tabela 7. Najwyższe dopuszczalne zawartości zearalenonu wg Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1126/2007 [CE 2007]

Table 7. The highest permissible content of zearalenone according to Commission Regulation (EC) No. 1126/2007 [CE 2007]

Produkt	Najwyższa dopuszczalna zawartość (µg/kg)
Nieprzetworzone zboża inne niż kukurydza	100
Nieprzetworzona kukurydza	200
Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby jako produkt końcowy wprowadzony na rynek do bezpośredniego spożycia przez ludzi oraz zarodki, z wyjątkiem środków spożywczych uszczegółowionych w osobnych rubrykach	75
Kukurydza przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka kukurydziana, mączka kukurydziana, płatki kukurydziane, zarodki kukurydziane oraz rafinowany olej kukurydziany	200
Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i zboża śniadaniowe, z wyłączeniem przekąsek kukurydzianych i zbóż śniadaniowych opartych na kukurydzy	50
Przekąski kukurydziane i zboża śniadaniowe oparte na kukurydzy	50
Przetworzona żywność na bazie zbóż (z wyłączeniem przetworzonej żywności opartej na kukurydzy) oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	20
Przetworzona żywność oparta na kukurydzy, przeznaczona dla niemowląt i małych dzieci	20

Tabela 8. Najwyższe dopuszczalne zawartości fumonizyn (suma B1 + B2) wg Rozporządzenia Komisji (WE) NR 1126/2007 [CE 2007]

Table 8. The highest permissible content of fumonisins (total B1 + B2) according to Commission Regulation (EC) No. 1126/2007 [CE 2007]

Produkt	Najwyższa dopuszczalna zawartość (µg/kg)
Nieprzetworzona kukurydza	2000
Mąka kukurydziana, mączka kukurydziana, płatki kukurydziane, zarodki kukurydziane oraz rafinowany olej kukurydziany	1000
Żywność oparta na kukurydzy, przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi, z wyjątkiem środków spożywczych uszczegółowionych w osobnych rubrykach	400
Przetworzona żywność na bazie kukurydzy oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	200

TECHNIKI PRZYGOTOWANIA PRÓBEK DO ANALIZY MYKOTOKSYN

W oznaczaniu mykotoksyn kluczowym elementem jest pobranie reprezentatywnej próbki. Etap ten jest trudny ze względu na niejednorodne rozmieszczenie grzybów wytwarzających mykotoksyny w badanym materiale [Whitaker 2003, Turner i in. 2009]. Pobieranie próbek ma istotny udział w niepewności wyniku analitycznego i w przypadku analizy mykotoksyn 90% błędu można wiązać z procedurą pobrania oryginalnej próbki [Namieśnik i in. 1995, Lauren i in. 2006]. Znane są różne procedury pobrania próbek [Whitaker 2003, 2006, Vargas i in. 2006, Hallier i in. 2011], które ponadto zostały ujęte w specjalnych regulacjach, celem ujednorodnienia postępowania w przypadku urzędowej kontroli poziomu mykotoksyn w środkach spożywczych [Dyrektywa Komisji 2005/38/WE 2005, Rozporządzenie Komisji (WE) 2006].

Jeżeli prawodawstwo wspólnotowe nie określa szczególnych metod oznaczania zawartości mykotoksyn w środkach spożywczych, to laboratorium może wybrać dowolną metodę, pod warunkiem że spełnia ona odpowiednie kryteria skuteczności (tab. 8, 9) [Rozporządzenie Komisji (WE) 2006].

Tabela 9. Kryteria skuteczności metod oznaczania zawartości aflatoksyn w środkach spożywczych [Rozporządzenie Komisji (WE) 2006]

Table 9. Performance criteria for methods for determining the aflatoxin content in foodstuffs [Commission Regulation (EC) 2006]

Kryterium	Zakres stężenia	Wartość zalecana	Najwyższa dopuszczalna wartość
Próbka ślepa	cały	pomijalnie mała	–
Odzysk – aflatoksyna M ₁	0,01–0,05 µg/kg >0,05 µg/kg	60–120% 70–110%	
Odzysk – aflatoksyny B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<1,0 µg/kg 1–10 µg/kg >10 µg/kg	50–120% 70–110% 80–110%	
Precyzja (odtwarzalność) RSD _R (powtarzalność RSD _r można obliczyć jako iloczyn 0,66 × RSD _R dla odpowiedniego stężenia)	cały	wynika z równania Horwitza	2 × wartość wynikająca z równania Horwitza
<p>– wartości, które mają zastosowanie zarówno w odniesieniu do aflatoksyny B₁, jak i sumy aflatoksyn B₁ + B₂ + G₁ + G₂</p> <p>– jeżeli suma aflatoksyn B₁ + B₂ + G₁ + G₂ ma zostać podana, to odpowiedź każdej z nich w systemie analitycznym musi być znana lub równoważna</p> <p>Wartość precyzji (odtwarzalność) RSD_R jest obliczana z równania Horwitza: $RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$, gdzie C jest stężeniem wyrażonym jako stosunek (np. 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).</p>			

Tabela 10. Kryteria skuteczności dla ochratoksyny A, patuliny, deoksyniwalenolu, zearalenonu, fumonizyny B₁ i B₂, toksyn T-2 i HT-2 [Rozporządzenie Komisji (WE) 2006]
 Table 10. Performace criteria for ochratoxin A, patulin, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisin B₁ and B₂, T-2 and HT-2 toxins [Commission Regulation (EC) 2006]

Mykotoksyna	Stężenie (µg/kg)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Odzysk (%)
Ochratoksyna A	<1	≤40	≤60	50–120
	1–10	≤20	≤30	70–110
Patulina	<20	≤30	≤40	50–120
	20–50	≤20	≤30	70–105
	>50	≤15	≤25	75–105
Deoksyniwalenol	>100–≤500	≤20	≤40	60–110
	>500	≤20	≤40	70–120
Zearalenon	≤50	≤40	≤50	60–120
	>50	≤25	≤40	70–120
Fumonizyny B ₁ i B ₂	≤500	≤30	≤60	60–120
	>500	≤20	≤30	70–110
Toksyna T-2	50–250	≤40	≤60	60–130
	>250	≤30	≤50	60–130
Toksyna HT-2	100–200	≤40	≤60	60–130
	>200	≤30	≤50	60–130
Granica wykrywalności stosowanych metod nie jest podawana, ponieważ wartość precyzji jest podana dla danego stężenia. Wartość precyzji (odtwarzalności) jest obliczana z równania Horwitza: $RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$ gdzie: precyzja RSD _R jest odchyleniem standardowym względnym, obliczonym na podstawie wyników otrzymanych w warunkach odtwarzalności $[(s_R/x) \times 100]$ (powtarzalność RSD _r można obliczyć jako iloczyn $0,66 \times RSD_R$ dla odpowiedniego stężenia), C jest stężeniem wyrażonym jako stosunek (np. 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg). Jest to ogólne równanie precyzji, którego wynik nie zależy ani od analitu, ani od matrycy, ale w przypadku większości rutynowych metod analizy zależy wyłącznie od stężenia C.				

Kolejny krok to rozdrobnienie materiału, które ma na celu rozprowadzenie mykotoksyn, jak również uwolnienie z wnętrza w przypadku orzechów czy zbóż. W zalecanych procedurach masa próbki do oznaczania mykotoksyn powinna wynosić 10–50 g. Modyfikacja dotychczas stosowanych procedur pozwala na znaczne zminimalizowanie próbki nawet do poniżej 1 g. W postępowaniu z próbką ma znaczenie również odpowiednie przygotowanie szkła laboratoryjnego, które może być przyczyną adsorpcji analitów na jego powierzchni. W celu wyeliminowania tego problemu szkło poddaje się działaniu wysokiej temperatury, a także zaleca się używanie szkła poddanego silanizacji lub

stosowanie naczyń laboratoryjnych wykonanych z innych materiałów [Langseth i Rundberget 1998, Mateo i in. 2001]. Naczynia szklane powinny być również wolne od pozostałości po alkalicznych detergentach, które mogą tworzyć sole z mykotoksynami i zmniejszać ich stężenie w badanych próbkach [Turner i in. 2009].

Krokiem kończącym przygotowanie próbki do analizy jest wyekstrahowanie mykotoksyn i roddzielenie ich odpowiednimi metodami. Finalnym etapem jest zastosowanie metod służących do analizy mykotoksyn.

IZOLACJA I OCZYSZCZANIE MYKOTOKSYN

Większość stosowanych metod analitycznych w oznaczaniu mykotoksyn wymaga wstępnego oczyszczenia czy ekstrakcji analitów z matrycy, z wyjątkiem testów ELISA, w przypadku których takie procedury nie są wymagane [Turner i in. 2009]. Procedura przygotowania próbki do analizy jest bardzo czasochłonna i zajmuje ok. 2/3 całkowitego czasu analizy. Wybór metody ekstrakcji zależy od rodzaju matrycy oraz od struktury chemicznej mykotoksyny [Wilkes and Sutherland 1998].

Ekstrakcja ciecz – ciecz (LLE)

W ekstrakcji LLE wykorzystuje się różnicę w rozpuszczalności mykotoksyny w dwóch niemieszających się rozpuszczalnikach. Zastosowanie rozpuszczalników, tj. heksanu czy cykloheksanu, umożliwia pozbycie się z matrycy substancji lipidowych oraz cholesterolu. Wadą prowadzenia klasycznej ekstrakcji ciecz – ciecz jest czasochłonność i możliwość utraty analizowanych składników w wyniku adsorpcji na szkło [Turner i in. 2009].

Ekstrakcja rozpuszczalnikowa jest najczęściej stosowana do izolacji mykotoksyn z matrycy. Związki o charakterze polarnym, jak fumonizyny, rozpuszczają się lepiej w układach zawierających wodę w mieszaninach z rozpuszczalnikami organicznymi [Shephard 1998]. Natomiast toksyny hydrofobowe, jak aflatoksyny, są ekstrahowane rozpuszczalnikami organicznymi [Holcomb i in. 1992]. Czasami należy przeprowadzić ekstrakcję wstępną, np. z użyciem n-heksanu, w celu pozbycia się niektórych składników matrycy próbki (odtłuszczenie). Oczyszczanie próbki jest bardzo istotne ze względu na możliwość maskowania bardzo niskich stężeń mykotoksyn przez związki, które są obecne w matrycy oraz w stosowanych materiałach i odczynnikach [Turner i in. 2009]. Najpowszechniej stosowanymi rozpuszczalnikami organicznymi są acetonitryl, metanol, octan etylu lub ich mieszaniny w różnych proporcjach, także z udziałem wody [Langseth i Rundberget 1998, Radová i in. 1998, Mateo i in. 2001, Krska i in. 2001, 2007, Shephard i in. 2009]. Dodanie wody zwykle poprawia wydajność ekstrakcji, ponieważ woda oddziałuje ze składnikami matrycy takimi jak białka lub cukry i w ten sposób ułatwia ekstrakcję toksyn [Pereira i in. 2014]. Woda nie zawsze przynosi pozytywny efekt w przypadku niektórych matryc. W zależności od tego, czy oznaczamy pojedynczą mykotoksynę, czy całą grupę (multimetoda), dobieramy odpowiedni układ ekstrakcyjny. Niektóre rozpuszczalniki ekstrahują także inne składniki, które mogą przeszkadzać w oznaczaniu mykotoksyn. Wykazano, że metanol ekstrahuje także związki, które utrudniają taką analizę [Langseth i Rundberget 1998, Mateo i in. 2001]. W badaniu nad

optymalizacją ekstrakcji 10 mykotoksyn z jednego z gatunków żeńszenia dodatek wody spowodował rozpuszczenie saponin, które negatywnie wpłynęły na sygnał analityczny [Chen i in. 2015]. Chen i in. wykazali, że acetonitryl 100% był optymalnym rozpuszczalnikiem. Wang i współpracownicy porównali wydajność pięciu układów metanol/woda (75%, 80%, 85%, 90% i 100% metanolu) na jednoczesną ekstrakcję aflatoksyny B₁ i ochratoksyny A z korzeni lukrecji i cebul szachownicy, wykazując, że układ zawierający 85% metanolu charakteryzował się najwyższą skutecznością [Wang i in. 2013]. Porównując mieszaniny acetonitryl : woda (84 : 16 v/v), acetonitryl : woda (75 : 25 v/v), metanol : woda (70 : 30, v/v), metanol : woda (50:50 v/v), octan etylu : acetonitryl : woda (77 : 19 : 4 v/v/v) do ekstrakcji trichotecenów typu B z próbek ryżu, pszenicy i kukurydzy, stwierdzono najwyższą skuteczność dla pierwszego z wymienionych układów [Mateo i in. 2001]. Skuteczne stosowanie mieszaniny acetonitryl : woda (84 : 16 v/v) zostało potwierdzone także w innych opracowaniach [Radová i in. 1998, Schothorst i Jekel, 2001, Razzazi-Fazeli i in. 2002, Berthiller i in. 2005, Klötzel i in. 2005, Milanez i in. 2006, Stecher i in. 2007]. Wymienione rozpuszczalniki były badane w różnych wariantach i w zmiennych proporcjach [Schollenberger i in. 1998, Tanaka i in. 2000, Dall'Asta i in. 2004, Cavaliere i in. 2005, Klötzel i in. 2006]. Często, jeśli wydajność jednoetapowej ekstrakcji jest zadowalająca, nie trzeba powtarzać ekstrakcji. W przeciwnym razie można zastosować kolejno dwa rodzaje rozpuszczalników do przeprowadzenia dwuetapowej metody ekstrakcji w celu uzyskania zwiększonej wydajności ekstrakcji [Liu i in. 2015, Xing i in. 2016]. Czasami konieczne są dodatkowe składniki w układach ekstrakcyjnych. Na przykład kwasy (kwas mrówkowy, kwas octowy) i sole skutecznie wspomagają ekstrakcję mykotoksyn. Dodanie odpowiedniej ilości kwasu mrówkowego do rozpuszczalnika ekstrakcyjnego może poprawić odzysk aflatoksyn i fumonizyn [Liu i in. 2015, 2016, Zhang i in. 2016]. Wyższe poziomy odzysku i wyeliminowanie wpływu matrycy uzyskano przez dodanie 1-procentowego kwasu octowego do rozpuszczalnika ekstrakcyjnego podczas oznaczania 11 mykotoksyn w słodzie [Wang i in. 2016]. Dodatek NaHCO₃ do roztworu ekstrakcyjnego zwiększył wartość odzysku aflatoksyn i ochratoksyny A izolowanych z korzeni żeńszienia i imbiru [Trucksess i in. 2007].

Ekstrakcja nadkrytyczna (SFE)

W metodzie SFE wykorzystuje się CO₂ w postaci płynu w stanie nadkrytycznym, który charakteryzuje się dobrymi właściwościami rozpuszczalnikowymi. Wydajność ekstrakcji może być modyfikowana poprzez dodatek innych rozpuszczalników, np. metanolu. Technika ta nie prowadzi do rozkładu badanych analitów, nie wymaga stosowania toksycznych rozpuszczalników, jest szybka i charakteryzuje się wysoką wydajnością w usuwaniu tłuszczów. Niestety wadą tej techniki jest dość wysoki koszt. Proponowana nadkrytyczna chromatografia cieczowa na kolumnach kapilarnych ze stopionej krzemionki nie jest jednak najlepszym rozwiązaniem ze względu na wysokie koszty analizy oraz konieczność posiadania specjalistycznego sprzętu [Christopher Young i Games 1992, Holcomb i in. 1996]. Znane są prace dotyczące zastosowania SFE do ekstrakcji aflatoksyn, trichotecenów i zearalenonu z roślin leczniczych, kukurydzy, pszenicy i ich przetworów z odzyskiem rzędu 53–104% [Razzazi-Fazeli i Reiter 2011].

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Metoda SPE polega na przeniesieniu analitów znajdujących się w próbce ciekłej do fazy stałej. Rozdzielenie składników zachodzi w oparciu o współczynnik podziału związków organicznych między wodę i stały sorbent. Uwolnienie analitów przeprowadza się za pomocą rozpuszczalnika (oznaczenie HPLC) lub na drodze termicznej (oznaczenie GC). Za pomocą SPE analizuje się próbki o różnej objętości, od kilku mikrolitrów do kilku litrów. Systemy ekstrakcji do fazy stałej (SPE) są obecnie często stosowane jako wygodne rozwiązanie konkurujące z klasyczną ekstrakcją ciecz – ciecz, ponieważ w SPE zużywa się znacznie mniej rozpuszczalnika, co umożliwia skrócenie etapu przygotowania próbki. Do wad w tej technice należy zaliczyć możliwość nieodwracalnej adsorpcji wybranych analitów na złożu sorbentu i czasami niską powtarzalność, na którą mają wpływ różnice w upakowaniu poszczególnych partii sorbentu [Majors 2011]. Dostępne są jednorazowe kolumny ekstrakcyjne wypełnione odpowiednim adsorbentem (polarne – żel krzemionkowy, ziemia okrzemkowa, żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminopropylowymi, florisil; niepolarne – żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi C-18, żel krzemionkowy modyfikowany grupami fenylowymi; wymiennicze jonowe – kationity, anionity; materiały powinowactwa – immunoadsorbenty, polimery z odwzorowaniem cząsteczkowym). Mogą być stosowane zarówno do oczyszczania próbek zawierających mykotoksyny, jak również do wstępnego zatężenia próbki, zwiększając wykrywalność analitów. Fazy typu anionity zapewniają dobre oczyszczenie ekstraktów zawierających fumonizyny [Stockenström i in. 1994], natomiast zastosowanie hydrofilowej ziemi okrzemkowej dało dobre rezultaty w oczyszczaniu trichotecenów w ziarnach [Turner i in. 2009]. Zastosowanie kolumny SPE z wypełnieniem C-18, umożliwiło izolację ochratoksyny A z wina [Hernández i in. 2006]. Do oceny jakości win stosowano także wypełnienia z zastosowaniem peptydu z powinowactwem do ochratoksyny A, z odzyskiem na poziomie 95% [Giraudi i in. 2007]. Kolumny powinowactwa immunologicznego (IAC) z wypełnieniem zawierającym mono- i poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko danej mykotoksynie pozwalają uzyskać eluaty o wysokiej czystości, charakteryzują się także wysoką powtarzalnością i czułością oraz umożliwiają zmniejszenie wykorzystania rozpuszczalników organicznych, niestety wadą tego rozwiązania jest wysoka cena [Stevenson 2000, Burek i in. 2011, Pascale i in. 2012]. Opisano zastosowanie kolumny wypełnionej żel krzemionkowym do oczyszczania próbek z suszonych jabłek w celu oznaczenia patuliny techniką HPLC-DAD (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją diodową), uzyskując dokładność i liniowość przy 10–50 ppb [Katerere i in. 2008]. Zastosowanie kolumny wypełnionej węglem grafitowym do izolacji mykotoksyn z kukurydzy pozwoliło otrzymać odzyski na poziomie 80–111% dla trichotecenów oraz 92–102% dla zearalenonu i pochodnych [Cavaliere i in. 2007].

Do oznaczania mykotoksyn stosuje się tzw. wielofunkcyjne kolumny specjalnie przeznaczone do tej grupy analitów: BondElut Mycotoxin[®], MultiSep[®], MycoSep[®], wypełnione różnymi adsorbentami. Porównanie zastosowania kolumny wypełnionej Florisilem, żel krzemionkowym oraz kolumny MycoSep[®] do oznaczania trichote-

cenów B dało różne poziomy odzysku – Florisil 41–79%, żel krzemionkowy 31–67%, natomiast MycoSep 73–90% [Mateo i in. 2001]. Opracowano kolumnę MycoSep® specyficzną dla ochratoksyny A, która przeznaczona jest do oczyszczania różnych matryc, takich jak ziarno, wino czy kawa [Turner i in. 2009].

Interesujące jest zastosowanie polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym (MIP), które w porównaniu z immunosorbentami charakteryzują się możliwością wielokrotnego wykorzystania, wysoką wytrzymałością mechaniczną, dobrą trwałością termiczną i chemiczną oraz względnie niskimi kosztami wytwarzania. Otrzymywanie MIP polega na polimeryzacji odpowiednich monomerów w obecności cząsteczki analitu (szablonu), który usuwany jest po zakończeniu reakcji. Produkt, którym jest porowaty polimer, zawiera odwzorowanie kompleksu monomeru z cząsteczką analitu [Sellergren i Esteban 2012]. Zastosowanie kolumnienek z wypełnieniem MIP zostało wykorzystane np. w izolacji i wzbogacaniu zearalenonu z pszenicy, jęczmienia, ryżu, żyta, kukurydzy i paszy oraz do izolacji toksyny T-2 z ekstraktów z owsa, jęczmienia i kukurydzy [Urraca i in. 2006a, b, De Smet i in. 2010, Lucci i in. 2010].

Metoda QuEChERS

W analityce mykotoksyn obserwuje się zainteresowanie metodą przygotowania próbek określaną w skrócie QuEChERS (*quick* – szybka, *easy* – łatwa, *cheap* – tania, *effective* – skuteczna, *rugged* – elastyczna, *safe* – bezpieczna), która została opracowana przez Anastasiadesa i Lehotaya jako technika przygotowywania próbek do oceny poziomu pozostałości pestycydów w próbkach żywności pochodzenia roślinnego [Anastasiades i in. 2003]. W metodzie tej wykorzystuje się połączenie ekstrakcji w układzie ciecz – ciecz (LLE) i ekstrakcji do fazy stałej (SPE) [Kowalska i Kowalski 2019]. Próbka jest ekstrahowana w pierwszym etapie za pomocą rozpuszczalnika organicznego, w obecności bezwodnych soli i następnie poddawana jest prostemu oczyszczeniu z użyciem sorbentów dyspersyjnych [Kowalska i Kowalski 2019]. Metoda QuEChERS jest metodą uniwersalną, umożliwiającą szerokie modyfikacje w zakresie wprowadzania nowych związków, badanych matryc, a także wyposażenia i technik analitycznych stosowanych w laboratorium. Metoda ta charakteryzuje się małym zużyciem materiału próbki i toksycznych rozpuszczalników, jest ona mało pracochłonna, co pozwala znacznie skrócić czas analizy oraz obniżyć koszty [Kowalska i Kowalski 2019]. Metodę QuEChERS stosowano w oznaczaniu m.in. deoksyniwalenolu, nivalenolu, zearalenonu, toksyn T-2 i HT-2 w matrycach zbożowych, mące i płatkach zbożowych [Trebstein i in. 2009, Rubert i in. 2012, Sospedra i in. 2010, Wu i in. 2011].

WNIOSKI

Dotychczasowe badania naukowe wskazują na konieczność podejmowania działań w zakresie wyeliminowania, względnie ograniczenia ryzyka dla zdrowia i życia konsumenta związanego z obecnością kontaminantów z grupy mykotoksyn. Jednym z podstawowych rozwiązań w tej kwestii są wprowadzone regulacje prawne obejmujące wymagania w stosunku do produktów znajdujących się na rynku. Istotne są działania organów zajmujących się bezpieczeństwem żywności oraz powołanie kompetentnych instytucji

doradczych. Szczególne znaczenie ma też wymiana informacji w ramach Systemu Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach – RASFF, który koordynuje właściwy obieg informacji wewnątrz UE. Uzyskanie takiej informacji wiąże się z wcześniej przeprowadzonym etapem analitycznym, w którym istotne znaczenie ma procedura przygotowania próbki oraz izolacja i oczyszczanie tej grupy kontaminantów z zachowaniem zasad zapewniających osiągnięcie poprawnego wyniku analitycznego. Należy wymienić tu różne metody ekstrakcji od klasycznych typu ciecz – ciecz (LLE), poprzez ekstrakcję nadkrytyczną (SFE), ekstrakcję do fazy stałej (SPE), po szybką, łatwą i tanią metodę QuEChERS, szczególnie dedykowaną do oznaczeń prowadzonych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS).

PIŚMIENNICTWO

- Anastassiades A., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86(2), 412–431.
- Berthiller F., Schuhmacher R., Buttner G., Krska R., 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1062(2), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.011>
- Bianchini A., Bullerman L.B., 2014. Mycotoxins classification. W: C.A. Batt, M.L. Tortorello (red.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed.). Academic Press, Oxford, UK, 854–861.
- Bis H., Frączek K., Mędrała-Kuder E., 2010. Produkcja mikotoksyn przez grzyby wyizolowane z warzyw okopowych. *Nauk. Przyr. Technol.* 4(6), 1–8.
- Bullerman L.B., Schroeder L.L., Park K.-Y., 1984. Formation and Control of Mycotoxins in Food. *J. Food. Prot.* 47(8), 637–646. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-47.8.637>
- Burek O., Wiśniewska-Dmytrow H., Żmudzki J., 2011. Determination of T-2 and HT-2 toxins in feedstuffs by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 55(4), 737–40.
- Cavaliere C., D’Ascenzo G., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Laganà A., 2005. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. *Food Chem.* 92(3), 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.057>
- Cavaliere C., Foglia P., Guarino C., Motto M., Nazzari M., Samperi R., Lagana A., Berardo N., 2007. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 105(2), 700–710.
- CE, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006. *Off. J. Eur. Union* 49(L 364), 5–24.
- CE, 2007. Commission Regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Off. J. Eur. Union* 255, 14–17.
- Chełkowski J., 1985. Mikotoksyny wytwarzające grzyby, mikotoksyny i mikotoksydazy. Wyd. SGGW, Warszawa.
- Chen Y., Chen C.J., Li J., Luan L.J., Liu X.S., Wu Y.J., 2015. Determination of 10 mycotoxin contaminants in *Panax notoginseng* by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Acta Pharm. Sin.* 50, 81–85.

- Christopher Young J., Games D.E., 1992. Supercritical fluid chromatography of *Fusarium* mycotoxins. *J. Chromatogr. A* 627(1–2), 247–254. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87204-L](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87204-L)
- Dall'Asta C., Galaverna G., Biancardi A., Gasparini M., Sforza S., Dossena A., Marchelli R., 2004. Simultaneous liquid chromatography–fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. *J. Chromatogr. A* 1047(2), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.002>
- De Smet D., Monbaliu S., Dubruel P., Van Peteghem C., Schacht E., De Saeger S., 2010. Synthesis and application of a T-2 toxin imprinted polymer. *J. Chromatogr. A* 1217(17), 2879–2886, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.068>
- Dyrektywa Komisji 2005/38/WE. 2005. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.
- European Commission, 2020. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/> [data dostępu: 04.05.2020].
- Gertig H., 1996. Żywność a zdrowie. PZWL, Warszawa.
- Giraudi G., Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., Tozzi C., 2007. Solid-phase extraction of ochratoxin A from wine based on a binding hexapeptide prepared by combinatorial synthesis. *J. Chromatogr. A* 1175(2), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.057>
- Grajewski J., 2006. Mikotoksyny i grzyby pleśniowe. Zagrożenie dla człowieka i zwierząt. Wyd. Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz.
- Hallier A., Celette F., David C., 2011. Effects of sampling and extraction on deoxynivalenol quantification. *Food Chem.* 127(1), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.119>
- Hernández M.J., García-Moreno M.V., Durán E., Guillén D., Barroso C.G., 2006. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. *Anal. Chim. Acta* 566(1), 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.002>
- Holcomb M., Thompson H.C., Cooper W.M., Hopper M.L., 1996. SFE extraction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) from corn and analysis by HPLC. *J. Supercrit. Fluids* 9(2), 118–121. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85687-O](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85687-O)
- Holcomb M., Wilson D.M., Trucksess M.W., Thompson H.C., 1992. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *J. Chromatogr. A* 624(1–2), 341–352.
- Jurga R., 2007a. Mykotoksyny w ziarnie zbóż, mące i pieczywie. *Przegl. Piek. Cukier.* 3, 4–8. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(96\)90007-8](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(96)90007-8)
- Jurga R., 2007b. Uwaga na mikotoksyny w paszach. *Przegl. Zboż.-Młynar.*, 51(9), 39–41.
- Katerere D.R., Stockenström S., Shephard G.S., 2008. HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings. *Food Control* 19(4), 389–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.04.015>
- Klötzel M., Lauber U., Humpf H.-U., 2006. A new solid phase extraction clean-up method for the determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals and cereal-based food by LC-MS/MS. *Mol. Nutr. Food Res.* 50(3), 261–269. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0576-x>
- Klötzel M., Schmidt S., Lauber U., Thielert G., Humpf H.-U., 2005. Comparison of Different Clean-Up Procedures for the Analysis of Deoxynivalenol in Cereal-Based Food and Validation of a Reliable HPLC Method. *Chromatographia* 62(1–2), 41–48. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500234>
- Kowalska A., Walkiewicz K., Koziół P., Muc-Wierżgoń M., 2017. Aflatoxins: characteristics and impact on human health. *Postęp. Hig. Med. Dosw.* 71, 315–327. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3816>
- Kowalska G., Kowalski R., 2019. Badania pozostałości pestycydów w żywności pochodzenia roślinnego przy użyciu metody QuEChERS i technik chromatograficznych GC i HPLC

- z detektorem spektrometrii mas MS i MS/MS. *Agron. Sci.* 74(3), 99–112. <https://doi.org/10.24326/as.2019.3.8>
- Krska R., Baumgartner S., Josephs R., 2001. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371(3), 285–299. <https://doi.org/10.1007/s002160100992>
- Krska R., Welzig E., Boudra H., 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137(3–4), 241–264. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.004>
- Langseth W., Rundberget T., 1998. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *J. Chromatogr. A* 815(1), 103–121. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00388-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00388-4)
- Lauren D.R., Jensen D.J., Smith W.A., 2006. Mycotoxin contamination in graded fractions of maize (*Zea mays*) in New Zealand. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 34(1), 63–72. <https://doi.org/10.1080/01140671.2006.9514389>
- Liu H., Kong W., Liu C., Liu Q., Hu Y., Yang M., 2015. Rapid analysis and identification of multi-class mycotoxins in *Morinda officinalis* by UFLC-ESI-MS/MS. *RSC Adv.* 5(78), 63561–63571. <https://doi.org/10.1039/C5RA10205G>
- Lucci P., Derrien D., Alix F., Pérollier C., Bayouhd S., 2010. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts. *Anal. Chim. Acta* 672(1–2), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.010>
- Majors R.E., 2011. Solid-Phase Extraction. W: J. Pawliszyn, H.L. Lord (red.). *Handbook of Sample Preparation*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 53–79. <https://doi.org/10.1002/9780813823621.ch4>
- Mateo J., Llorens A., Mateo R., Jiménez M., 2001. Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *J. Chromatogr. A* 918(1), 99–112. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00704-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00704-X)
- Milanez T.V., Valente-Soares L.M., Baptista G.G., 2006. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. *Food Control* 17(4), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.11.002>
- Muro-Cach C.A., Stedeford T., Anasik M., 2004. Mycotoxins: mechanisms of toxicity and methods of detection for identifying exposed individuals. *J. L. Use Environ. Law.* 19(2), 537–557.
- Namieśnik J., Łukasik J., Jamrógiewicz Z., 1995. *Pobieranie próbek środowiskowych do analizy*. PWN, Warszawa, 278 ss.
- Nikonorow M., Urbanek-Karłowska B., 1987. *Toksykologia żywności*. PZWL, Warszawa.
- Pascale M., Panzarini G., Visconti A., 2012. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta* 89, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.017>
- Pereira V.L., Fernandes J.O., Cunha S.C., 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 36(2), 96–136. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.005>
- Pławińska-Czarnak J., Zarzyńska J., 2010. Mikotoksyny w żywności pochodzenia zwierzęcego. *Mikol. Lek.* 17(2), 128–133.
- Pokrzywa P., Cieślak E., Topolska K., 2007. Ocena zawartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych. *Żywn. Nauk. Technol. Jakość* 14(3), 139–146.
- Quillien J.F., 2002. Mycotoxins. Institut National de la Recherche Agronomique, Flair Flow, France, 19–21.
- Radová Z., Holadová K., Hajšlová J., 1998. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J. Chromatogr. A* 829(1–2), 259–267. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00868-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00868-1)

- Richard J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 119(1–2), 3–10.
- Razzazi-Fazeli E., Rabus B., Cecon B., Böhm J., 2002. Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 968(1–2), 129–142. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00957-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00957-3)
- Razzazi-Fazeli E., Reiter E.V., 2011. Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: principles, applications and recent development. W: S. De Saeger (red.), *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 37–70.
- Rozporządzenie Komisji (WE), 2002. Rozporządzenie Komisji Wspólnoty Europejskiej nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (Dz.U. UE L 31 z 1.02.2002 ze zm. 07.08.2009 – 004.001).
- Rozporządzenie Komisji (WE), 2006. Rozporządzenie Komisji Wspólnoty Europejskiej nr 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych (Dz.U. UE L 70/12 z 9.03.2006).
- Rubert J., Dzuman Z., Vaclavikova M., Zachariasova M., Soler C., Hajslova J., 2012. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. *Talanta* 99, 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.010>
- Schoental R., 1994. Mycotoxins in Food and the Plague of Athens. *J. Nutr. Med.* 4(1), 83–85. <https://doi.org/10.3109/13590849409034541>
- Schollenberger M., Lauber U., Jara H.T., Suchy S., Drochner W., Müller H.-M., 1998. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography–mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 815(1), 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00454-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00454-3)
- Schothorst R., Jekel A., 2001. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chem.* 73(1), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00321-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00321-6)
- Sellergren B., Esteban A.M., 2012. The Use of Molecularly Imprinted Polymers for Sampling and Sample Preparation. *Handbook of Sample Preparation*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 445–473. <https://doi.org/10.1002/9780813823621.ch23>
- Seńczuk W., 2002. *Toksykologia. Podręcznik dla studentów, lekarzy i farmaceutów*. PZWL, Warszawa.
- Shephard G., 1998. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *J. Chromatogr. A* 815(1), 31–39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00187-3)
- Shephard G., Berthiller F., Dorner J., Krska R., Lombaert G., Malone B., Maragos C., Sabino M., Solfrizzo M., Trucksess M., Egmond H. van, Whitaker T., 2009. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007–2008. *World Mycotoxin J.* 2(1), 3–21. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1095>
- Soroka P.M., Cyprowski M., Szadkowska-Stańczyk I., 2008. Narażenie zawodowe na mykotoksyny w różnych gałęziach przemysłu. *Med. Pr.* 59(4), 333–345.
- Sospedra I., Blesa J., Soriano J.M., Mañes J., 2010. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. *J. Chromatogr. A* 1217(9), 1437–1440. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.047>

- Stecher G., Jarukamjorn K., Zaborski P., Bakry R., Huck C.W., Bonn G.K., 2007. Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. *Talanta* 73(2), 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.03.028>
- Stępień M., Sokół-Leszczyńska B., Łuczak M., 2007. Mikotoksyny, produkty spożywcze a zdrowie człowieka. *Postępy Mikrobiol.* 46(2), 167–177.
- Stevenson D., 2000. Immuno-affinity solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 745(1), 39–48. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00204-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00204-8)
- Stockenström S., Sydenham E.W., Thiel P.G., 1994. Determination of fumonisins in corn: Evaluation of two purification procedures. *Mycotoxin Res.*, 10(1), 9–14. <https://doi.org/10.1007/BF03192246>
- Suchorzyńska M., Misiewicz A., 2009. Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Postępy Mikrobiol.* 48(3), 221–230.
- Tanaka T., Yoneda A., Inoue S., Sugiura Y., Ueno Y., 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 882(1–2), 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00063-7)
- Trebstein A., Lauber U., Humpf H.-U., 2009. Analysis of *Fusarium* toxins via HPLC-MS/MS multimethods: matrix effects and strategies for compensation. *Mycotoxin Res.* 25(4), 201–213. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0029-8>
- Trucksess M.W., Weaver C.M., Oles C.J., Rump L.V., White K.D., Betz J.M., Rader J.I., 2007. Use of multitoxin immunoaffinity columns for determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and ginger. *J. AOAC Int.* 90, 1042–1049.
- Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* 632(2), 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>
- Urraca J.L., Marazuela M.D., Merino E.R., Orellana G., Moreno-Bondi M.C., 2006a. Molecularly imprinted polymers with a streamlined mimic for zearalenone analysis. *J. Chromatogr. A* 1116(1–2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.032>
- Urraca J.L., Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C., 2006b. Molecularly imprinted polymers applied to the clean-up of zearalenone and α -zearalenol from cereal and swine feed sample extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* 385(7), 1155–1161. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0343-3>
- Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. 2006. Dz.U. 2006 nr 171 poz. 1225.
- Vargas E.A., Whitaker T.B., Dos Santos E.A., Slate A.B., Lima F.B., Franca R.C.A. 2006. Design of a sampling plan to detect ochratoxin A in green coffee. *Food Addit. Contam.* 23(1), 62–72. <https://doi.org/10.1080/02652030500258656>
- Wang L., Wang Z., Gao W., Chen J., Yang M., Kuang Y., Huang L., Chen S., 2013. Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A in licorice roots and fritillary bulbs by solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 138(2–3), 1048–1054. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.066>
- Wang S., Kong W.J., Yang M.H., 2016. Simultaneous determination of 11 mycotoxins in malt by isotope internal standard-UPLC-MS/MS. *Acta Pharm. Sin.* 51, 110–115. <http://jtp.cnki.net/bilingual/detail/html/YXXB201601020>
- Weidenbörner M., 2001. *Encyclopedia of food mycotoxins*. Springer, Berlin, Germany, 52.
- Whitaker T.B., 2003. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control* 14(4), 233–237. <https://doi.org/10.1080/02652030500241587>
- Whitaker T.B., 2006. Sampling Foods for Mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 23(1), 50–61. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00012-4)

- Wilkes J.G., Sutherland J.B., 1998. Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 717(1–2), 135–156. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00664-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00664-6)
- Wróbel B., 2014. Zagrożenia zwierząt i ludzi toksynami grzybów pleśniowych zawartych w paszach i żywności. *Woda, Śr., Obszar. Wiej.* 14(3(47)), 159–176.
- Wu J., Zhao R., Chen B., Yang M., 2011. Determination of zearalenone in barley by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and natural occurrence of zearalenone in functional food. *Food Chem.* 126(3), 1508–1511. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.159>
- Xing Y., Meng W., Sun W., Li D., Yu Z., Tong L., Zhao Y., 2016. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 21 mycotoxins in *Radix Paeoniae Alba* by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. *J. Chromatogr. B* 1031, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.008>
- Żakowska Z., Stobińska H., 2000. Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym. Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź.
- Zawadzki K., 2006. Usuwanie ziaren porażonych mikotoksynami ważnym elementem procesu czyszczenia pszenicy. *Przeł. Zboż.-Młynar.* 50(6), 32.
- Zawadzki K., 2011. Mikotoksyny – zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt, ale także dla wyników ekonomicznych sektora zbożowego i paszowego. *Przeł. Zboż.-Młynar.* 55(10), 2–3.
- Zhang S., Lu J., Wang S., Mao D., Miao S., Ji S., 2016. Multi-mycotoxins analysis in *Pheretima* using ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based on a modified QuEChERS method. *J. Chromatogr. B* 1035, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.022>

Źródło finansowania badań: Subwencja MNiSW na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego Katedry Analizy i Oceny Jakości Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Summary. The quality of food and feed is determined primarily by factors that are characteristic of production on an agricultural or horticultural farm. Each subsequent stage associated with the processing of raw materials of plant or animal origin can also lead to the introduction or formation of undesirable components that can pose a threat to our health or life. Numerous scientific studies lead to constant updating of knowledge about the danger of contaminants in food. One such group is mycotoxins, which are secondary metabolites of filamentous fungi. Factors that increase the risk of mycotoxins in food and feed are known. Appropriate legal regulations have been introduced to restrict the placing of products contaminated with mycotoxins on the market. In addition, research is being carried out to optimize the procedures for sample preparation in terms of assessing the presence of this group of contaminants in agricultural raw materials, food and feed. The paper presents a review covering issues related to factors increasing the risk of mycotoxins, current legal requirements for the presence of mycotoxins in food and techniques for sample preparation for analysis, with particular emphasis on the stage of isolation and purification of mycotoxins.

Key words: food, feed, isolation and purification of mycotoxins, legal regulations

Otrzymano – Received: 20.05.2020
Zaakceptowano – Accepted: 28.07.2020