

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

<sup>2</sup>Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, Polska  
e-mail: [radoslaw.kowalski@up.lublin.pl](mailto:radoslaw.kowalski@up.lublin.pl)

GRAŻYNA KOWALSKA<sup>1</sup> , RADOŚLAW KOWALSKI<sup>2</sup> 

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

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

**Streszczenie.** Wzrost świadomości społeczeństwa w zakresie jakości i bezpieczeństwa żywności wynika przede wszystkim z postępu naukowego. Bezpieczny produkt albo nie stwarza żadnego niebezpieczeństwa, albo stwarza mało zagrożeń, które są uważane za akceptowalne w ramach wysokiego poziomu ochrony zdrowia i bezpieczeństwa ludzi. Można wymienić wiele substancji, których obecność w żywności jest niepożądana. Szczególnie niebezpiecznymi dla zdrowia i życia człowieka są metabolity grzybów strzępkowych określane mianem mykotoksyn. Jest to grupa związków bardzo zróżnicowanych pod względem chemicznym, co utrudnia analizę obecności tych substancji w różnorodnych próbkach pochodzenia rolniczego, w tym w żywności i paszach. W pracy zawarto przegląd literatury na temat metod oznaczania mykotoksyn z zastosowaniem różnych technik analitycznych jak: chromatografia cienkwarstwowa (TLC), wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) i chromatografia gazowa (GC) z różnymi wariantami detekcji oraz spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIR). Ponadto przedstawiono zastosowanie testów immunoenzymatycznych i metod opartych na biologii molekularnej, które stanowią alternatywne rozwiązania w stosunku do metod chromatograficznych.

**Słowa kluczowe:** mykotoksyny, analiza jakościowa i ilościowa, techniki analityczne

### WSTĘP

Większość mykotoksyn jest toksyczna w bardzo niskich stężeniach, dlatego konieczne jest stosowanie czułych i niezawodnych metod ich wykrywania. Ze względu na zróżnicowanie chemiczne poszczególnych mykotoksyn trudno jest opracować w pełni uniwersalną

metodę spełniającą pod każdym względem wymagania jakościowe. Ważny jest tutaj rodzaj matrycy, w której prowadzi się oznaczenie. Istotne znaczenie ma także wyposażenie specjalistycznego laboratorium oraz kwalifikacje personelu. W przypadku braku spełnienia tych wysokich wymagań rozwiązaniem są szybkie, niedrogie i proste gotowe testy, które mogą stanowić skuteczne narzędzie w ocenie jakości badanych produktów i mogą być stosowane także w warunkach terenowych [Turner i in. 2009]. W analizie mykotoksyn stosuje się różne metody, z których wiele jest przeznaczonych dla specjalistycznych laboratoriów, ale nie ma jednej techniki, która wyróżniałaby się na tle innych. Bardzo popularna jest metoda chromatografii cieczowej, często powiązana ze spektrometrią mas (tab. 1) [Turner i in. 2009].

## JAKOŚCIOWE I ILOŚCIOWE METODY OZNACZANIA MYKOTOKSYN

### Techniki chromatograficzne w analizie mykotoksyn

Najczęściej stosowanymi technikami w analizie mykotoksyn są chromatografia cieczowa (LC) i chromatografia gazowa (GC) w połączeniu z odpowiednim detektorem. Należy również wspomnieć o chromatografii cienkowsarstwowej (TLC), która ma znaczenie we wstępnych badaniach jakościowych. W przypadku analizy określonej grupy mykotoksyn, jak np. aflatoksyn, lub ochratoksyny A często stosowana jest klasyczna chromatografia cieczowa z detektorem fluorescencyjnym FLD. Jednak obecnie najbardziej aktualne są badania, w których ocenia się współwystępowanie mykotoksyn należących do różnych grup chemicznych, dlatego najbardziej odpowiednią techniką jest w tym przypadku chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS).

**Chromatografia cienkowsarstwowa (TLC)** była najczęściej stosowaną metodą w analizie mykotoksyn od czasu odkrycia aflatoksyn w 1961 r. i należy do tzw. metod tradycyjnych [Sargeant i in. 1961, Stubblefield i in. 1967]. Przede wszystkim rozpowszechnienie TLC wiązało się z niskimi kosztami analizy i powszechnej dostępności wyposażenia laboratoryjnego. Pierwotnie za pomocą TLC prowadzono głównie ocenę jakościową, ale rozwinięcie tej techniki poprzez sprzężenie z densytometrią pozwoliło także stosować ją w badaniach ilościowych [Castro i Vargas 2001, Stubblefield i in. 1967]. W roku 1978 oznaczanie aflatoksyny B1 w próbkach kukurydzy prowadzono głównie metodą TLC [Honma i in. 2004]. Wraz ze wzrostem świadomości dotyczącej jakości wyniku analitycznego technika ta została zastąpiona wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC). Wykazano jednak, że odsetek użycia metod TLC spadł do 48% w 1989 r. i do 7% w 2002 r. [Zhang i in. 2018]. Należy podkreślić, że TLC w dalszym ciągu stanowi wygodne narzędzie we wstępnej ocenie przesiewowej próbek [AOAC 1998, Grabarkiewicz-Saczesna i in. 1985, United States Pharmacopeial Convention 2014]. Ostatnie publikacje na temat zastosowania techniki TLC do badania obecności mykotoksyn dotyczą przede wszystkim aflatoksyn [Castro i Vargas 2001, Rizzo i in. 2004, Bugno i in. 2006, Braicu i in. 2008, Singh i in. 2008, Aquino i in. 2010, Gautam i in. 2010, Delgado i in. 2011,

Ahmad i in. 2014, Ezekwesili-Ofili i in. 2014, Aiko i Mehta 2016, Rajeshwari i Raveesha 2016], ochratoksyny A [Bugno i in. 2006, Braicu i in. 2008, Delgado i in. 2011, Ahmad i in. 2014], zearalenonu [Rizzo i in. 2004], neosolaniolu [Rizzo i in. 2004], deoksyniwalenolu [Rizzo i in. 2004], toksyny T2 [Rizzo i in. 2004], cytryniny [Gautam i in. 2010], sterygmatocystyny [Gautam i in. 2010, Delgado i in. 2011].

**Chromatografia cieczowa (LC).** W badaniu aflatoksyn wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) z detektorem fluorescencyjnym FLD jest prawdopodobnie najczęściej stosowaną techniką [European Pharmacopoeia Commission 2016, United States Pharmacopoeial Convention 2014]. Zastosowanie rozpuszczalników z wodą w chromatografii w układach faz odwróconych RPHPLC prowadzi do wygaszenia fluorescencji aflatoksyn B1 i G1, dlatego też przeprowadza się w tym przypadku derywatyzację przed- i postkolumnową, najczęściej z zastosowaniem kwasu trifluorooctowego (TFA) [Ali i in. 2005, Fazekas i in. 2005, D'Ovidio i in. 2006, Cho i in. 2008, Lee i in. 2015, Li i in. 2015, Garduno Garcia i in. 2017]. Derywatywacja przedkolumnowa wymaga dość złożonego załączenia próbki. Natomiast derywatywacja postkolumnowa jest procesem prostszym i polega na otrzymaniu pochodnych na drodze chemicznej (z użyciem jodobromku bromowodorku pirydynowego oraz dodatkowej pompy i układu grzewczego) [Martins i in. 2001, Ip i Che 2006, Ledzion i in. 2011, Ran i in. 2017, Yang i in. 2005, Zhang i in. 2005], fotochemicznej lub elektrochemicznej. Postkolumnowe metody elektrochemicznej i fotochemicznej derywatywacji są łatwiejsze do przeprowadzenia i charakteryzują się wyższą czułością i szerszym zakresem liniowości [Wen i in. 2013, Cao i in. 2014, Lee i in. 2015]. W przypadku skomplikowanych matryc, które są charakterystyczne dla surowców zielarskich oraz przypraw, można obserwować szereg interferencji, które skutkują nieprawidłową identyfikacją analitów. Dlatego lepsze w tym względzie są detektory typu spektrometrów masowych MS. Pewnym rozwiązaniem może też być porównanie chromatogramów HPLC uzyskanych z rozdziału analitów bez prowadzonej derywatywacji oraz po przeprowadzeniu tego procesu, jak też zastosowanie faz ruchomych, charakteryzujących się odpowiednią polarnością [Ali i in. 2005, 2015], co także pozwala na przeprowadzenie badań bez użycia drogiej aparatury sprzężonej ze spektrometrią mas. Technika HPLC z detekcją fluorescencyjną (FLD) jest również wykorzystywana w oznaczaniu zawartości ochratoksyny A oraz zespołu aflatoksyn z ochratoksyną A, co umożliwiło zastosowanie kolumn immunopowinowactwa Al-flaOchra Test™ [Fazekas i in. 2005, Trucksess i in. 2007, Whitaker i in. 2009, Kong i in. 2013, Wen i in. 2013, Ali i in. 2015]. Zaproponowano oznaczenie niektórych innych mykotoksyn w HPLC-FLD, w tym cytryniny [Wu i in. 2011a, Li i in. 2012, Mornar i in. 2013], zearalenonu [Zhang i in. 2011] i fumonizyny B [Katerere i in. 2008]. Ostatnio do analizy mykotoksyn stosuje się ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC), co znacznie poprawia rozdzielczość i czułość oraz skraca czas analizy w porównaniu z tradycyjną HPLC [Cao i in. 2013, Wen i in. 2014, Yang i in. 2014]. Zastosowanie chromatografii UPLC także pozwala wyeliminować etap derywatywacji [Wen i in. 2014]. Do detekcji mykotoksyn po rozdziale chromatograficznym stosowane są również detektory rozpraszania światła przez odparowanie (ELSD) [Wu i in. 2011b] oraz detektor spektrofotometryczny w ultrafiolecie (UV). Detektor

UV stosowano w oznaczaniu deoksyniwalenolu i niwalenolu [Yue i in. 2010b], chociaż czułość tej metody jest niższa niż uzyskana w przypadku chromatografii gazowej GC z detektorem wychwytu elektronów (ECD) [Yue i in. 2010a]. Najczęściej w przygotowaniu próbek do oznaczania technikami HPLC lub UPLC z detekcją FLD lub UV stosuje się kolumnienki powinowactwa immunologicznego IAC, co ogranicza oznaczanie tylko do niektórych typów mykotoksyn. Natomiast zastosowanie detekcji spektrometrii mas MS w układzie LC-MS/MS znacznie poszerzyło możliwości analizy różnych typów mykotoksyn [Zhang i in. 2018]. Na przykład w matrycach ziołowych można wykrywać w jednej serii aż 35 różnych toksyn [Han i in. 2012].

Spektrometry mas są czułymi, uniwersalnymi a jednocześnie selektywnymi detektorami, umożliwiającymi przeprowadzenie identyfikacji oznaczanej substancji na podstawie stosunku jej masy do ładunku ( $m/z$ ). Ponadto charakterystyczna fragmentacja w spektrometrii mas dostarcza nam informacji o budowie strukturalnej związku chemicznego. Najczęściej w technikach LC-MS i LC-MS/MS stosowane są dwa sposoby jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (API): elektrorozpylanie (ESI) oraz jonizacja chemiczna (APCI). Elektrorozpylanie polega na wprowadzeniu fazy ruchomej opuszczającej kolumnę chromatograficzną przez kapilarę do źródła jonów, w którym tworzy się aerozol w wyniku działania gazu rozpylającego i wysokiego napięcia (4–5 kV). W wyniku odparowywania rozpuszczalnika krople obdarzone dużym ładunkiem kurczą się, przez co następuje zwiększenie gęstości ładunku i w końcu zachodzi rozerwanie z wytworzeniem mniejszych kropli, które ulegają temu samemu procesowi do czasu, gdy gęstość ładunku jest wystarczająca do desorpcji jonów. Natomiast w jonizacji chemicznej analizowana substancja znajdująca się w fazie ruchomej jest rozpylana pod wpływem ciepła i gazu rozpylającego. Po desolwatacji próbka przenoszona jest ze strumieniem azotu do obszaru wyładowań koronowych i ulega jonizacji [Banerjee i Mazumdar 2012, Kostakis i in. 2013]. Wybór rodzaju jonizacji wiąże się z celem analizy oraz jest uzależniony od budowy i właściwości chemicznych i termicznych analitu. Aby zwiększyć wydajność jonizacji, dodaje się do fazy ruchomej związki lotne, tj. wodę amoniakalną, kwasy mrówkowe i octowy czy ich sole amonowe. Jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym prowadzi do powstania jonów o stosunku  $m/z$ , odpowiadającym masie cząsteczkowej analizowanej substancji powiększonej o masę protonu ( $[M+H]^+$ ) lub połączeń z kationami amonowym i metali alkalicznych (tryb tworzenia jonów dodatnich) oraz jonów pseudomolekularnych  $[M-H]^-$  czy połączeń z resztami octanowymi i mrówczanowymi (jonizacja ujemna). Jony wytworzone w źródle zostają rozdzielane w analizatorze mas ze względu na stosunek  $m/z$ . W analityce mykotoksyn stosowane są analizatory kwadrupolowe: pojedyncze (pracujące w trybie SIM – *single ion monitoring*) oraz potrójne (QqQ) stosowane w tandemowych spektrometrach mas MS/MS, ale także wykorzystuje się pułapki jonowe i analizatory czasu przelotu (TOF) [Tanaka i in. 2006, Şenyuva i in. 2008, Monaci i in. 2011, Liu i in. 2012, Suman i in. 2013].

Należy wspomnieć o wpływie matrycy na jonizację analitu, która wiąże się z jednoczesnym wymywaniem z kolumny chromatograficznej składników matrycy, powodując wzmocnienie lub osłabienie (supresja) sygnału analitu i jednocześnie podniesienie granic wykrywalności i oznaczalności [Han i in. 2012, Zhao i in. 2017]. Także

budowa chemiczna analizowanej substancji ma wpływ na uzyskaną wartość sygnału. Pewnym rozwiązaniem jest porównanie sygnału pochodzącego od roztworu wzorcowego wprowadzanego bezpośrednio do źródła jonów za pomocą specjalnego trójnika, przy jednoczesnym wprowadzaniu ekstraktu z matrycy niezawierającej analitu (efekt matrycowy), co pozwala na określenie wzmocnienia lub supresji sygnału [Annesley 2003]. Rozwiązaniem wpływu efektu matrycowego może być też matematyczne wyznaczenie względnej intensywności sygnałów analitu w roztworach o jednakowym stężeniu na bazie czystego rozpuszczalnika oraz w ekstraktach otrzymanych z matrycy niezawierającej analitu [Matuszewski i in. 2003]. Szczególnie widoczne są efekty matrycowe w przypadku próbek, które nie są poddane wcześniejszemu oczyszczeniu [Sulyok i in. 2006], ale przeprowadzenie tego etapu znacznie poprawia sytuację podobnie jak np. rozcieńczenie próbki. Innym skutecznym sposobem na wyeliminowanie efektu matrycowego jest zastosowanie wzorców wewnętrznych, które są podobne do badanego analitu, a jednocześnie nie występują w próbce, np. w przypadku toksyn fuzaryjnych stosuje się werrukarol, deepoksydeoksyniwalenol oraz zearalenon [Biselli i in. 2004, Berthiller i in. 2005, Klötzel i in. 2005]. Stosuje się znaczone izotopowo (deuterem, izotopem węgla  $^{13}\text{C}$ ) analogi analitów jako wzorce wewnętrzne, ale takie rozwiązania są dość trudno dostępne i kosztowne [Razzazi-Fazeli i in. 2002, Hartmann i in. 2007, Häubl i in. 2007, Rychlik i Asam 2008].

**Chromatografia gazowa (GC)** jest często wykorzystywana do oceny jakościowej i ilościowej mykotoksyn w surowcach rolniczych oraz w żywności. Najczęściej technika ta jest sprzężona ze spektrometrią mas MS, detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID), detektorem wychwytu elektronów (ECD) lub techniką spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) [Castillo i in. 2008, Majerus i in. 2008, Turner i in. 2009]. Warunkiem zastosowania GC jest występowanie analitu w stanie gazowym w warunkach rozdziału chromatograficznego. Większość mykotoksyn nie jest lotna i dlatego należy przeprowadzić derywatyzację. W tym celu przeprowadza się najczęściej reakcje silylowania lub polifluoroacylowania [Langseth i Rundberget 1998, Krska i in. 2001]. Przykładowo oznaczanie ochratoksyny A techniką GC wymaga derywatyzacji i w ten sposób można uzyskać dolną granicę wykrywalności LOD na poziomie  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  [Jiao i in. 1992]. Należy podkreślić, że w komercyjnych zastosowaniach dotyczących kontroli jakości rozwiązania GC są zastępowane tańszymi i szybszymi technikami HPLC. Trichoteceny oznaczano w badaniach chemotaksonomicznych *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* i *Memnoniella*, stosując derywatyzację bezwodnikiem pentafluoropropionowym [Nielsen i Thrane 2001]. Analiza GC-MS umożliwiła monitorowanie do czterech związków jednocześnie podczas 23-minutowego przebiegu rozdziału. Obecność lotnych metabolitów syntezowanych przez grzyby wykorzystano jako wskaźniki w ocenie jakości ziarna pod względem zanieczyszczenia grzybami [Olsson i in. 2002]. Stosując układ GC-MS, określano w próbkach zawartość ergosterolu, ochratoksyny A i deoksyniwalenolu, uzyskując w ziarnie dla ochratoksyny A wyniki poniżej limitu  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  ustalonego przez Szwedzki Krajowy Urząd ds. Żywności dla ziarna. Porównano także wyniki uzyskane techniką GC-MS z wynikami otrzymanymi z wykorzystaniem elektronicznego nosa, wykazując, że dane GC-MS były błędne tylko w 3 przypadkach na 37

próbek, natomiast dane z elektronicznego nosa były niepoprawne w 7 przypadkach na 37 próbek. Należy zwrócić uwagę, że pomimo ciekawych przykładów zastosowania techniki GC w analizie mykotoksyn w pewnym sensie problematyczna jest procedura przekształcania analitów w lotne pochodne, ponadto zderywatyzowane składniki nie zawsze są stabilne termicznie i mogą ulegać degradacji [Turner i in. 2009].

### **Elektroforeza kapilarna (CE) w analizie mykotoksyn**

W przypadku analizy mykotoksyn, które należą do różnych grup chemicznych, ważnym aspektem, oprócz wysokiej czułości, jest także skuteczny rozdział poszczególnych analitów. Elektroforeza kapilarna (CE) jest prawdopodobnie najszybciej rozwijającą się w ostatnich latach metodą analityczną. CE opiera się na zjawisku elektroforezy, czyli migracji w polu elektrycznym cząstek obdarzonych ładunkiem. Rozdział poszczególnych jonów możliwy jest dzięki różnicom w prędkościach, z jakimi migrują one wzdłuż kapilary. Możemy uzyskać szybki rozdział mykotoksyn dzięki zastosowaniu wodnych roztworów buforowych, z wyłączeniem potrzeby stosowania rozpuszczalników organicznych. Połączenie CE z czułymi metodami wykrywania opartymi na fluorescencji zostały opisane dla aflatoksyn [Maragos 2001] i fumonizyn [Wilkes i Sutherland 1998].

### **Szybkie metody screeningowe w analizie mykotoksyn**

Duże znaczenie w ocenie żywności ma szybkość uzyskanych wyników, dlatego to kryterium często determinuje podejmowanie decyzji w zakresie wyboru metody oceny. Szczególnie ważne jest to w przypadku tzw. oceny przesiewowej. Metody szybkie nie zawsze charakteryzują się wysoką precyzją, co można zaobserwować w przypadku metod immunologicznych, które określane są często mianem „testów”. W metodach immunologicznych stosowane są przeciwciała odpowiednie dla danej mykotoksyny, które w połączeniu ze wskazanymi substancjami dają mierzalny sygnał. Są to metody o tyle wygodne, że bez skomplikowanego oprzyrządowania możemy przeprowadzić wstępną eliminację próbek, pochodzących z partii stwarzających zagrożenie dla zdrowia. W przypadku uzyskania pozytywnego wyniku testu immunologicznego przeprowadza się potwierdzanie metodami instrumentalnymi charakteryzującymi się większą dokładnością.

### **Testy immunoenzymatyczne (ELISA)**

Praktyczne zastosowanie w badaniu mykotoksyn znajdują testy immunoenzymatyczne ELISA. Metoda ta umożliwia przeprowadzenie analizy ilościowej i jakościowej mykotoksyn [Krska i in. 2005]. W ocenie obecności deoksyniwalenolu i zearalenonu w zbożach i paszach z wykorzystaniem testów ELISA stwierdzono największe stężenie tych toksyn w przypadku kukurydzy i pasz produkowanych na jej bazie [Cegielska-Radziejewska i in. 2009].

Tabela 1. Metody stosowane w analizie mykotoksyn [Turner i in. 2009, Błajet-Kosicka 2014, Zhang i in. 2018]  
 Table 1. Methods used in the analysis of mycotoxins [Turner et al. 2009, Błajet-Kosicka 2014, Zhang et al. 2018]

Mykotoksyna	Matryca	Metoda
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
NIV, DON	pszenica, produkty kukurydziane	GC-ECD
DON, NIV, DAS, T-2, H-2	produkty kukurydziane	GC-MS
DON, T-2	zboża	GC-MS
DON, OTA	jęczmień	GC-MS z elektronicznym nosem
T-2, HT-2	pszenica, żyto	GC-ECD
AFs, ZEN, T-2, NEO, DON	rośliny lecznicze	TLC
AFs, OTA	rośliny	TLC
AFs	różne rośliny lecznicze i przyprawy, m.in. żeń-szeń, imbir, jeżówka, kozłek lekarski, lukrecja, pieprz czarny, pieprz biały, pieprz czerwony, cynamon, Pu-erh, figi	HPLC-FLD
OTA	kawa, wino,	HPLC-FLD
NIV, DON, FUS X, 3-ADON	ryż, kukurydza	HPLC-UV
ZEN	kukurydza	HPLC-FLD
DON	pszenica	HPLC-UV
T-2, HT-2, NEO, DAS	ryż, kukurydza	HPLC-FLD
T2	pszenica, kukurydza, jęczmień, owies, ryż	HPLC-FLD
ZEN	pszenica, kukurydza, jęczmień, pasza, żyto	HPLC-FLD
NIV, DON, FUS X, 3,15-ADON, T-2, HT-2, DAS	pszenica	HPLC-FLD
PAT	sok jabłkowy	HPLC-DAD, HPLC-UV, HPLC-FLD
DON	kukurydza	HPLC-DAD
DON	pszenica	HPLC-UV
NIV, DON	pszenica, kukurydza	HPLC-FLD

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
DON	pszenica	APCI-MS/MS
T-2, HT-2, DAS, MAS, NEO	owies	APCI-MS
Mykotosyny	różne rośliny lecznicze i przyprawy	HPLC-MS/MS
DON, NIV, 3-ADON, FUS X	kukurydza	ESI-MS/MS
ZEN, DON, T-2, HT-2, AFs, OTA, FUM	pszenica, owies, jęczmień, kukurydza, ryż	ESI-MS/MS
AFs	pieprz	ELISA
OTA	pieprz czarny, kolendra, imbir, kurkuma	ELISA
AFs, OTA, CIT	chili, pieprz czarny, kurkuma, kolendra, kminek, koper włoski, imbir, kozieradka	ELISA
FB1, FB2	czosnek	ELISA
T-2, ZEN	pszenica, jęczmień kukurydza	ELISA
DON	pszenica	ELISA
DON, NIV, T-2+HT-2	pszenica	ELISA
OTA	wino	ELISA
DON	pszenica	FPIA
ZEN	kukurydza	FPIA
OTA, T-2	zboża	LFIA
T-2+HT-2	pszenica, płatki zbożowe, żywność dla dzieci	SPR
OTA	próbki żywności	CE

TLC – chromatografia cienkowarstwowa, HPLC – wysokosprawną chromatografią cieczą, FLD – detektor fluorescencyjny, UV – detektor w ultrafiolecie, DAD – detektor diodowy, CE – elektroforeza kapilarna, GC – chromatografia gazowa, ECD – detektor wychwytu elektronów, MS – detektor spektrometrii mas, MS/MS – tandemowy układ spektrometrii mas, APCI – jonizacja chemiczna, ESI – elektrorozpylanie, ELISA – testy immunoenzymatyczne, FPIA – immunofluorescencja w świetle spolaryzowanym, LFIA – immunologiczne paski testowe z przepływem bocznym, SPR – powierzchniowy rezonans plazmowy

ZEN – zearalenon, DON – deoksynivalenol i jego pochodne 3AcDON – 3-acetyldeoxynivalenol, 15AcDON – 15-acetyldeoxynivalenol, NIV – niwalenol, DAS – diacetoksycirpenol, T-1 i HT-2 – toksyna T-1 i HT-2, OTA – ochratoksyna A, NEO – neosolaniol, FUS-X – fusarenon-X, PAT – patulina, MAS – monoacetoksycirpenol, AFs – aflatoksyny, FUM – fumonizyna, CIT – cytrynina, FB1, FB2 – aflatoksyna B1, B2



### Test immunologiczny z przepływem bocznym (LFIA)

Immunologiczne paski testowe z przepływem bocznym, znane również jako LFIA, zyskują coraz większą popularność, zapoczątkowaną pod koniec lat 80. XX w. Jest to szybka, wydajna i pełna zalet technika przesiewowa, polegająca na transporcie sondowanej cząsteczki skoniugowanego przeciwciała (lub antygeny) do określonego antygeny (lub przeciwciała) unieruchomionego na powierzchni porowatej błony [Sun i in. 2005]. LFIA stosowano do szybkiego badania przesiewowego pod kątem obecności pojedynczych mykotoksyn lub do jednoczesnego oznaczania aflatoksyny B1, ochratoksyny A i zearalenonu w różnych surowcach rolniczych, produktach żywnościowych oraz paszach. Ponadto dostępne są wieloskładnikowe testy immunochromatograficzne do jednoczesnego oznaczania AFB1, OTA i ZEN w segmencie rolno-spożywczym [Zhang i in. 2018]. Zasada działania tych testów jest oparta na interakcjach pomiędzy specyficznymi przeciwciałami w postaci kompleksów z cząsteczkami koloidalnego złota lub lateksu, które są unieruchomione w nitrocelulozowej membranie, i antygenem (mykotoksyną), z wykorzystaniem zjawisk kapilarnych [Kolosova i in. 2008]. Wyniki uzyskane tą metodą były potwierdzane techniką LC-MS/MS [Zhang i in. 2018]. Jednak nie obserwuje się znaczących postępów w zastosowaniu testów immunologicznych z przepływem bocznym w kontroli surowców i produktów pod kątem obecności mykotoksyn, co może wynikać też z pewnych ograniczeń stosowania tego rozwiązania w związku z występującymi problemami takimi jak interferencje związane z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych [Zhang i in. 2018].

### Metody oparte na biologii molekularnej

Duże znaczenie w wykrywaniu szczepów toksynotwórczych odgrywają metody oparte na biologii molekularnej. Polegają one na analizie struktury kwasów nukleinowych. Zaletą tych metod jest szybka identyfikacja szczepów oraz mykotoksyn. Metody te opierają się na reakcji łańcuchowej polimerazy PCR [Suchorzyńska i Misiewicz 2009]. Największe znaczenie w wykrywaniu mykotoksyn odgrywają metody oparte na modyfikacji PCR. Wśród nich możemy wyróżnić: SCAR, RT-PCR oraz real-time PCR. Metoda SCAR (specyficzny PCR) polega na powielaniu za pomocą pary starterów ściśle zdefiniowanego obszaru genomu. Na przykład metoda ta jest przydatna w badaniach patogenicznych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Za pomocą starterów zaprojektowanych na podstawie fragmentów genów odpowiedzialnych za formowanie wielu mykotoksyn, w tym trichotecenów, można rozróżniać izolaty pod względem produkcji toksycznych substancji [Suchorzyńska i Misiewicz 2009]. RT-PCR, czyli *reverse transcriptase*, to metoda wykorzystująca enzym odwrotną transkryptazę do przemiany RNA w cDNA przez amplifikację PCR. Metoda ta pozwala na zbadanie aktywności genu. Pozwala określić, czy dany grzyb wykazuje aktywność produkcji mykotoksyn. RT-PCR jest wykorzystywana do monitorowania ekspresji genów mykotoksyn powiązanych z syntezą trichotecenów oraz zearalenonu [Suchorzyńska i Misiewicz 2009]. PCR real-time, czyli PCR w czasie rzeczywistym, jest jedną z najdokładniejszych metod do wykrywania grzybów syntetyzujących mykotoksyny [Suchorzyńska i Misiewicz 2009]. Metoda ta pozwala na ilościowe badanie produktów PCR za pomocą specyficznych sond DNA wyznakowanych barwnikami interkalującymi DNA [Jarzynka i in. 2010].

### Inne metody

Technika spektroskopii w bliskiej podczerwieni (NIR) jest także obiecująca w kategorii szybkich analiz surowców i produktów z wyeliminowaniem skomplikowanego etapu przygotowania próbki [Berardo i in. 2005]. NIR polega na pomiarze widma w zakresie podczerwieni, a następnie przeprowadzeniu analizy ilościowej w oparciu o zainstalowane kalibracje, wykorzystujące sztuczne sieci neuronowe, dla różnych matriec. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie powierzchniowego rezonansu plazmowego (SPR). Zjawisko SPR stosowane jest w bioczuJNIKACH, w których zasada pomiaru wiąże się z rejestrowaniem zmian w wartościach współczynnika załamania światła na powierzchni metalu, który zawiera unieruchomioną mykotoksynę, związaną ze specyficznym przeciwciałem. Takie rozwiązanie znalazło zastosowanie w wykrywaniu deoksyniwalenolu, toksyn T-2 i HT-2 oraz zearalenonu w próbkach zbóż [Hodnik i Anderluh 2009, Meneely i in. 2011, Mitchell 2010]. Warto także wspomnieć o testach wykorzystujących technikę immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA), która polega na interakcjach między antygenem a barwnikiem fluoryzującym i specyficznym przeciwciałem. Testy FPIA pozwalają na analizę półilościową, np. dla deoksyniwalenolu w próbkach pszenicy [Lattanzio i in. 2009, Maragos 2009].

### WNIOSKI

Przedstawione w literaturze wyniki badań wskazują na ciągłą konieczność udoskonalania metod analizy mykotoksyn. Obecnie można wyróżnić w tym względzie dwie grupy metod analitycznych. Do pierwszej grupy należą metody chromatograficzne, wśród których najbardziej uniwersalną jest metoda z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas HPLC-MS/MS. Druga grupa obejmuje szybkie testy oparte na metodach immunologicznych. Każda z tych dwóch grup metod jest przeznaczona do osiągnięcia innych celów analitycznych. Szybkie testy mają szczególnie znaczenie w przypadku tzw. oceny przesiewowej i pozwalają bez skomplikowanego oprzyrządowania przeprowadzić wstępną eliminację próbek pochodzących z partii stwarzających zagrożenie dla zdrowia. Natomiast droższe metody, wykorzystujące techniki chromatograficzne, umożliwiają przeprowadzenie szczegółowej analizy ilościowej i pozwalają odnieść się do kryteriów zawartych w prawnych regulacjach.

### PIŚMIENNICTWO

- Ahmad B., Ashiq S., Hussain A., Bashir S., Hussain M., 2014. Evaluation of mycotoxins, mycobiota, and toxigenic fungi in selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Fungal. Biol.* 118(9–10), 776–784. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.06.002>
- Aiko V., Mehta A., 2016. Prevalence of toxigenic fungi in common medicinal herbs and spices in India. *3 Biotech* 6(2), 159. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0476-9>
- Ali N., Hashim N.H., Saad B., Safan K., Nakajima M., Yoshizawa T., 2005. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food Chem. Toxicol.* 43(12), 1763–1772. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.05.019>

- Ali N., Hashim N.H., Shuib N.S., 2015. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in processed spices marketed in Malaysia. *Food Addit. Contam. Part A* 32(4), 518–532. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1011712>
- Annesley T.M., 2003. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 49(7), 1041–1044. <https://doi.org/10.1373/49.7.1041>
- AOAC, 1998. Official Methods of Analysis. Association of the Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Aquino S., Gonçalves E., Rossi M., De Campos N., Reis T.A. dos, Corrêa B., 2010. Evaluation of Fungal Burden and Aflatoxin Presence in Packed Medicinal Plants Treated by Gamma Radiation. *J. Food Prot.* 73(5), 932–937. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.5.932>
- Banerjee S., Mazumdar S., 2012. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* 2012, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
- Berardo N., Pisacane V., Battilani P., Scandolaro A., Pietri A., Marocco A., 2005. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 53(21), 8128–8134. <https://doi.org/10.1021/jf0512297>
- Berthiller F., Schuhmacher R., Buttinger 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>
- Biselli S., Hartig L., Wegner H., Hummert C., 2004. Analysis of *Fusarium* Toxins using LC/MS-MS. *LC/GC-Europe* 17(11a), 25–30
- Błajet-Kosicka A., 2014. Zastosowanie techniki LC-MS/MS w oznaczaniu wybranych mikotoksyn fuzaryjnych. Politechnika Gdańska, Gdańsk.
- Braicu C., Puia C., Bodoki E., Socaciu C., 2008. Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin a in different cereals cultivated in Romania using thin-layer chromatography–densitometry. *J. Food Qual.* 31(1), 108–120. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00187.x>
- Bugno A., Almodovar A.A.B., Pereira T.C., Pinto T. de J.A., Sabino M., 2006. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian J. Microbiol.* 37(1), 47–51. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100009>
- Cao J., Zhou S., Kong W., Ma X., Yang M., Wan L., Yang S., 2014. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in *Fructus Bruceae* by high-performance liquid chromatography with online postcolumn photochemical derivatization. *J. Sep. Sci.* 37(19), 2771–2778. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400501>
- Cao J., Zhou S., Kong W., Yang M., Wan L., Yang S., 2013. Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in ginger and LC-MS/MS confirmation. *Food Control* 33(2), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.023>
- Castillo M.-Á., Montes R., Navarro A., Segarra R., Cuesta G., Hernández E., 2008. Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. *J. Food Compos. Anal.* 21(5), 423–427. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.009>
- Castro L., Vargas E.A., 2001. Determining aflatoxins B1, B2, G1, and in maize using Florisil cleanup with thin layer chromatography and visual and densitometric quantification. *Ciência Tecnol. Aliment. Campinas* 21, 115–122.
- Cegielska-Radziejewska R., Szablewski T., Karoleczak K., Kaczmarek A., Kojowski J., 2009. *Nauk. Przym. Technol.* 3(4), 1–9.
- Cho S., Lee C., Jang M., Son Y., Lee S., Choi I., Kim S., Kim D., 2008. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chem.* 107(3), 1283–1288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.049>

- D'Ovidio K., Trucksess M., Weaver C., Horn E., McIntosh M., Bean G., 2006. Aflatoxins in ginseng roots. *Food Addit. Contam.* 23(2), 174–180. <https://doi.org/10.1080/02652030500442524>
- Delgado S., Núñez F., Sánchez B., Bermúdez E., Rodríguez J.M., 2011. Toxicogenic microorganisms in medicinal plants used for ritual protection of infants. *Food Res. Int.* 44(1), 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.015>
- European Pharmacopoeia Commission, 2016. Determination of aflatoxin B1 in herbal drugs. *European Pharmacopoeia*. 9th ed., Council of Europe, Strasbourg, France, s. 289.
- Ezekwesili-Ofilí J., Onyemelukwe N., Agwaga P., Orji I., 2014. The Bioload and Aflatoxin Content of Herbal Medicines from Selected States in Nigeria. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 11(3), 143. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i3.21>
- Fazekas B., Tar A., Kovács M., 2005. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Addit. Contam.* 22(9), 856–863. <https://doi.org/10.1080/02652030500198027>
- Garduno Garcia J.I., Moreno M.C., Rojo Callejas F., Velasco S.R., 2017. Detection of Aflatoxins, Mutagens and Carcinogens in Black, White and Green Peppers (*Piper Nigrum* L.). *J. Microb. Biochem. Technol.* 09(03), <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000350>
- Gautam A., Sharma S., Bhadauria R., 2010. Detection of toxicogenic fungi and mycotoxins in medicinally important powdered herbal drugs. *Internet. J. Microbiol.* 7, 2.
- Grabarkiewicz-Saczesna J., Golinski P., Chełkowski J., Szewiotko K., 1985. Mycotoxins in cereal grain. Part XI. Simple multidetection procedure for determination of 11 mycotoxins in cereals. *Nahrung* 29, 229–240.
- Han Z., Ren Y., Zhu J., Cai Z., Chen Y., Luan L., Wu Y., 2012. Multianalysis of 35 Mycotoxins in Traditional Chinese Medicines by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Coupled with Accelerated Solvent Extraction. *J. Agric. Food Chem.* 60(33), 8233–8247. <https://doi.org/10.1021/jf301928r>
- Hartmann N., Erbs M., Wettstein F.E., Schwarzenbach R.P., Bucheli T.D., 2007. Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. *J. Chromatogr. A* 1138(1–2), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.045>
- Häubl G., Berthiller F., Hametner C., Rechthaler J., Jaunecker G., Freudenthuss M., Krska R., Schuhmacher R., 2007. Characterization of (13C24) T-2 toxin and its use as an internal standard for the quantification of T-2 toxin in cereals with HPLC–MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 389(3), 931–940. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1493-7>
- Hodnik V., Anderluh G., 2009. Toxin Detection by Surface Plasmon Resonance. *Sensors* 9(3), 1339–1354. <https://doi.org/10.3390/s9031339>
- Honma Y., Naito S., Earnshaw A., Nagashima H., Goto T., 2004. Progress in the accuracy of mycotoxin analysis in the last quarter century. *Mycotoxins* 54(1), 33–38. <https://doi.org/10.2520/myco.54.33>
- Ip S.-P., Che C.-T., 2006. Determination of aflatoxins in Chinese medicinal herbs by high-performance liquid chromatography using immunoaffinity column cleanup. *J. Chromatogr. A* 1135(2), 241–244. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.025>
- Jarzynka S., Dąbkowska M., Netsvetyayeva I., Swoboda-Kopeć E., 2010. Mikotoksyny – niebezpieczne metabolity grzybów pleśniowych. *Med. Rodz.* 4, 113–119.
- Jiao Y., Blas W., Rühl C., Weber R., 1992. Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 595(1–2), 364–367. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85183-T](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85183-T)
- Katerere D., Stockenström S., Thembo K., Rheeder J., Shephard G., Vismar H., 2008. A preliminary survey of mycological and fumonisin and aflatoxin contamination of African traditional herbal medicines sold in South Africa. *Hum. Exp. Toxicol.* 27(11), 793–798. <https://doi.org/10.1177/0960327108099535>

- 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/10.1365/s10337-005-0576-x>
- Kolosova A.Y., Sibanda L., Dumoulin F., Lewis J., Duveiller E., Van Peteghem C., De Saeger S., 2008. Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges. *Anal. Chim. Acta* 616(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.029>
- Kong W.-J., Liu S.-Y., Qiu F., Xiao X.-H., Yang M.-H., 2013. Simultaneous multi-mycotoxin determination in nutmeg by ultrasound-assisted solid–liquid extraction and immunoaffinity column clean-up coupled with liquid chromatography and on-line post-column photochemical derivatization-fluorescence detection. *Analyst* 138(9), 2729. <https://doi.org/10.1039/c3an00059a>
- Kostakis C., Harpas P., Stockham P., 2013. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. W: S. Fanali, P.R. Haddad, C. Poole, P. Schoenmakers, D.K. Lloyd (red.), *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier, Waltham, 256–257.
- 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., Berthiller F., Molinelli A., Mizaikoff B., 2005. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Addit. Contam.* 22(4), 345–353. <https://doi.org/10.1080/02652030500070192>
- 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)
- Lattanzio V.M.T., Pascale M., Visconti A., 2009. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends Anal. Chem.* 28(6), 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.012>
- Ledzion E., Rybińska K., Postupolski J., Kurpińska-Jaworska J., Szczesna M., 2011. Badania i ocena bezpieczeństwa surowców zielarskich w zakresie zanieczyszczenia aflatoksynami. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.* 62(4), 377–381.
- Lee D., Lyu J., Lee K.-G., 2015. Analysis of aflatoxins in herbal medicine and health functional foods. *Food Control* 48, 33–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.007>
- Li W., Xu K., Xiao R., Yin G., Liu W., 2015. Development of an HPLC-Based Method for the Detection of Aflatoxins in Pu-erh Tea. *Int. J. Food Prop.* 18(4), 842–848. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.885043>
- Li Y., Zhou Y.-C., Yang M.-H., Ou-Yang Z., 2012. Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products. *Food Chem.* 132(2), 1040–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.051>
- Liu Z.-Y., Yu C.-H., Wan L., Sun Z.-L., 2012. Fragmentation study of five trichothecenes using electrospray hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry with accurate mass measurements. *Int. J. Mass Spectrom.* 309, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.09.007>
- Majerus P., Hain J., Scheer M., 2008. T-2 and HT-2 toxin analysis in cereals and cereal products following IAC cleanup and determination via GC-ECD after derivatization. *Mycotoxin Res.* 24(1), 24–30. <https://doi.org/10.1007/BF02985267>
- Maragos C., 2009. Fluorescence Polarization Immunoassay of Mycotoxins: A Review. *Toxins (Basel)* 1(2), 196–207. <https://doi.org/10.3390/toxins1020196>

- Maragos C.M., 2001. Measurement of Aflatoxins Using Capillary Electrophoresis. W: N.J. Clifton (red.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New Jersey, 51–58. <https://doi.org/10.1385/1-59259-064-0:51>
- Martins M.L., Martins H.M., Bernardo F., 2001. Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Addit. Contam.* 18(4), 315–319. <https://doi.org/10.1080/02652030120041>
- Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., 2003. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Anal. Chem.* 75(13), 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- Meneely J.P., Ricci F., Egmond H.P., Elliott C.T. van, 2011. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *Trends Anal. Chem.* 30(2), 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.012>
- Mitchell J., 2010. Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance. *Sensors* 10(8), 7323–7346. <https://doi.org/10.3390/s100807323>
- Monaci L., De Angelis E., Visconti A., 2011. Determination of deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins in a bread model food by liquid chromatography–high resolution–Orbitrap–mass spectrometry equipped with a high-energy collision dissociation cell. *J. Chromatogr. A* 1218(48), 8646–8654. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.008>
- Mornar A., Sertić M., Nigović B., 2013. Development of a Rapid LC/DAD/FLD/MS<sup>n</sup> Method for the Simultaneous Determination of Monacolins and Citrinin in Red Fermented Rice Products. *J. Agric. Food Chem.* 61(5), 1072–1080. <https://doi.org/10.1021/jf304881g>
- Nielsen K.F., Thrane U., 2001. Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 929(1–2), 75–87. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01174-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01174-8)
- Olsson J., Börjesson T., Lundstedt T., Schnürer J., 2002. Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.* 72(3), 203–214. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00685-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00685-7)
- Rajeshwari P., Raveesha K.A., 2016. Mycological analysis and aflatoxin B1 contaminant estimation of herbal drug raw materials. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 13(5), 123–131. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i5.16>
- Ran C., Chen D., Ma H., Jiang Y., 2017. Graphene oxide adsorbent based dispersive solid phase extraction coupled with multi-pretreatment clean-up for analysis of trace aflatoxins in traditional proprietary Chinese medicines. *J. Chromatogr. B* 1044–1045, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.001>
- 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)
- Rizzo I., Vedoya G., Maurutto S., Haidukowski M., Varsavsky E., 2004. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. *Microbiol. Res.* 159(2), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.01.013>
- Rychlik M., Asam S., 2008. Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 390(2), 617–628. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1717-x>
- Sargeant K., O’Kelly J., Carnaghan R.B.A., Allcroft R., 1961. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Vet. Rec.* 73, 1219–1222.
- Şenyuva H.Z., Gilbert J., Öztürkoğlu Ş., 2008. Rapid analysis of fungal cultures and dried figs for secondary metabolites by LC/TOF-MS. *Anal. Chim. Acta* 617(1–2), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.019>
- Singh P., Srivastava B., Kumar A., Dubey N.K., 2008. Fungal Contamination of Raw Materials of Some Herbal Drugs and Recommendation of Cinnamomum camphora Oil as Herbal Fungitoxicant. *Microb. Ecol.* 56(3), 555–560. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9375-x>

- Stubblefield R.D., Shotwell O.L., Hesseltine C.W., Smith M.L., Hall H.H., 1967. Production of aflatoxin on wheat and oats: Measurement with a recording densitometer. *Appl. Microbiol.* 15, 186–90.
- Suchorzyńska M., Misiewicz A., 2009. Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Post. Mikrobiol.* 48(3), 221–230.
- Sulyok M., Berthiller F., Krska R., Schuhmacher R., 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20(18), 2649–2659. <https://doi.org/10.1002/rcm.2640>
- Suman M., Bergamini E., Catellani D., Manzitti A., 2013. Development and validation of a liquid chromatography/linear ion trap mass spectrometry method for the quantitative determination of deoxynivalenol-3-glucoside in processed cereal-derived products. *Food Chem.* 136(3–4), 1568–1576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.085>
- Sun X.L., Zhao X.L., Tang J., Zhou J., Chu F.S., 2005. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 185–194.
- Tanaka H., Takino M., Sugita-Konishi Y., Tanaka T., 2006. Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20(9), 1422–1428. <https://doi.org/10.1002/rcm.2460>
- Trucksess M.W., Weaver C.M., Oles C.J., Rump L.V., White K.D., Betz J.M., Rader J.L., 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>
- United States Pharmacopeial Convention. 2014. USP 38-NF 33 Chapter 561: Articles of Botanical Origin.
- Wen J., Kong W., Hu Y., Wang J., Yang M., 2014. Multi-mycotoxins analysis in ginger and related products by UHPLC-FLR detection and LC-MS/MS confirmation. *Food Control.* 43, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.038>
- Wen J., Kong W., Wang J., Yang M., 2013. Simultaneous determination of four aflatoxins and ochratoxin A in ginger and related products by HPLC with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and postcolumn photochemical derivatization. *J. Sep. Sci.* 36(23), 3709–3716. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300885>
- Whitaker T.B., Trucksess M.W., Weaver C.M., Slate A., 2009. Sampling and analytical variability associated with the determination of aflatoxins and ochratoxin A in bulk lots of powdered ginger marketed in 1-lb bags. *Anal. Bioanal. Chem.* 395(5), 1291–1299. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2880-z>
- 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)
- Wu C.L., Kuo Y.H., Lee C.L., Hsu Y.W., Pan T.M., 2011a. Synchronous high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector and mass spectrometry for the determination of citrinin, monascidin, ankaflavin, and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice. *J. AOAC Int.* 62, 179–90.
- Wu J., Zhao R., Chen B., Yang M., 2011b. 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>

- Yang M.-H., Chen J.-M., Zhang X.-H., 2005. Immunoaffinity Column Clean-Up and Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization for Analysis of Aflatoxins in Traditional Chinese Medicine. *Chromatographia* 62(9–10), 499–504. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0647-z>
- Yang X., Hu Y., Kong W., Chu X., Yang M., Zhao M., Ouyang Z., 2014. Ultra-fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry determination of ochratoxin A in traditional Chinese medicines based on vortex-assisted solid-liquid microextraction and aptamer-affinity column clean-up. *J. Sep. Sci.* 37(21), 3052–3059. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400635>
- Yue Y.-T., Zhang X.-F., Pan J., Ou-Yang Z., Wu J., Yang M.-H., 2010a. Determination of Deoxynivalenol in Medicinal Herbs and Related Products by GC-ECD and Confirmation by GC-MS. *Chromatographia* 71(5–6), 533–538. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1477-1>
- Yue Y.-T., Zhang X.-F., Yang M.-H., Ou-Yang Z., Liu H.-B., 2010b. Simultaneous Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Traditional Chinese Medicine by SPE and LC. *Chromatographia* 72(5–6), 551–555. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1679-6>
- Zhang L., Dou X.W., Zhang C., Logrieco A.F., Yang M.H., 2018. A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines. *Toxins (Basel)* 10(2). <https://doi.org/10.3390/toxins10020065>
- Zhang X., Liu H., Chen J., 2005. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Aflatoxins in Medicinal Herbs and Plant Extracts. *J. Chromatogr. Sci.* 43(1), 47–51. <https://doi.org/10.1093/chromsci/43.1.47>
- Zhang X., Liu W., Logrieco A.F., Yang M., Ou-yang Z., Wang X., Guo Q., 2011. Determination of zearalenone in traditional Chinese medicinal plants and related products by HPLC-FLD. *Food Addit. Contam. Part A* 28(7), 885–893. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.563429>
- Zhao X.S., Kong W.J., Wang S., Wei J.H., Yang M.H., 2017. Simultaneous analysis of multiple mycotoxins in *Alpinia oxyphylla* by UPLC-MS/MS. *World Mycotoxin J.* 10(1), 41–51. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2069>

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

**Summary.** The increase in public awareness of food quality and safety is primarily due to the scientific progress. A safe product either poses no danger or presents few hazards that are considered acceptable as part of a high level of human health and safety protection. Many ingredients may be mentioned, the presence of which is undesirable. Metabolites of filamentous fungi called mycotoxins are especially dangerous for our health and life. This is a group of compounds that are chemically very diverse, which leads to difficulties in analyzing the presence of these substances in various samples of agricultural origin, including food and feed. The paper contains a review of the literature on the methods of mycotoxin determination using various analytical techniques such as thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC) with various detection variants and near infrared spectroscopy (NIR). In addition, the use of enzyme-linked immunoassays and molecular biology based methods are presented as alternatives to chromatographic methods.

**Key words:** mycotoxins, qualitative and quantitative analysis, analytical techniques

Otrzymano – Received: 21.05.2020  
Zaakceptowano – Accepted: 28.07.2020