

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

**ZASTOSOWANIE TECHNIKI LC-MS/MS W OZNACZANIU
WYBRANYCH MIKOTOKSYN FUZARYJNYCH**

mgr Anna Błajet-Kosicka

Promotor: Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski

Gdańsk 2014

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

*Panu Prof. dr hab. inż. Janowi Grajewskiemu
za cierpliwość, mobilizację, poświęcony czas,
cenne uwagi i pomoc w trakcie realizacji tej pracy*

*Dziekanowi i Radzie Wydziału, a szczególnie
Panu Prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi
za umożliwienie przeprowadzenia przewodu
doktorskiego
na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Fizjologii i
Toksykologii,
Instytutu Biologii Eksperymentalnej,
Wydziału Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy
za pomoc, życzliwość i miłą atmosferę pracy*

*Szczególnie dziękuję mojemu Mężowi
za pomoc, mobilizację i wiarę we mnie
oraz moim Bliskim za wsparcie duchowe*

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów i akronimów stosowanych w pracy	5
WSTĘP	8
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1. Wtórne metabolity pleśni	10
2. Charakterystyka analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych	13
2.1. Trichoteceny – budowa, biosynteza	13
2.2. Zearalenon i jego pochodne – budowa, biosynteza	17
2.3. Toksyczność mikotoksyn wytwarzanych przez grzyby z rodzaju <i>Fusarium</i>	18
2.4. Przepisy prawne i zalecenia związane z obecnością analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w żywności i paszach	21
2.5. Pochodne mikotoksyn i mikotoksyny „zamaskowane”	24
3. Procedury stosowane do izolowania, wykrywania i oznaczania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych	26
3.1. Ekstrakcja analitów z próbek żywności	26
3.2. Techniki oczyszczania ekstraktów i wzbogacania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych.....	29
3.3. Identyfikacja i oznaczanie analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych	32
3.3.1. Chromatografia gazowa	34
3.3.2. Chromatografia ciekłowa	37
3.3.3. Techniki immunochemiczne i szybkie testy	46
II. CEL I ZAKRES PRACY	49
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	51
4. Materiały i metody	51
4.1. Odczynniki i wzorce	51
4.2. Aparatura i wyposażenie	52
4.3. Przygotowanie szkła	54
4.4. Przygotowanie roztworów wzorcowych	55
4.5. Charakterystyka badanych próbek	56
4.6. Metodyki oznaczania wtórnych metabolitów pleśni z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach pochodzenia zbożowego	56

5. Wyniki i ich omówienie	59
5.1. Wyznaczenie optymalnych warunków rozdzielania chromatograficznego analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych	59
5.1.1. Optymalizacja parametrów pracy detektora	59
5.1.2. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego	68
5.2. Optymalizacja procedury przygotowania próbki z wykorzystaniem techniki SPE	78
5.3. Optymalizacja procedury przygotowania próbki z wykorzystaniem podejścia QuEChERS	103
5.4. Porównanie wydajności ekstrakcji procedur SPE i QuEChERS	109
5.5. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych opracowanych procedur analitycznych	109
5.5.1. Powtarzalność oraz precyzja pośrednia	110
5.5.2. Liniowość i zakres pomiarowy	112
5.5.3. Granice wykrywalności i oznaczalności	113
5.5.4. Niepewność pomiaru	115
5.5.5. Poprawność – wykorzystanie materiałów odniesienia	116
5.6. Analiza próbek rzeczywistych	118
5.6.1. Współwystępowanie analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach surowców i produktów zbożowych	125
5.6.2. Oszacowanie narażenia pokarmowego na anality z grupy mikotoksyn fuzaryjnych	128
5.6.3. Oznaczanie wybranych analitów (DON, T-2 i ZEN) w próbkach zboż i mieszanek paszowych z wykorzystaniem techniki ELISA	129
IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	132
V. STRESZCZENIE	135
VI. ABSTRACT	136
VII. LITERATURA	137
VIII. DOROBEK NAUKOWY	152

Wykaz skrótów i akronimów stosowanych w pracy

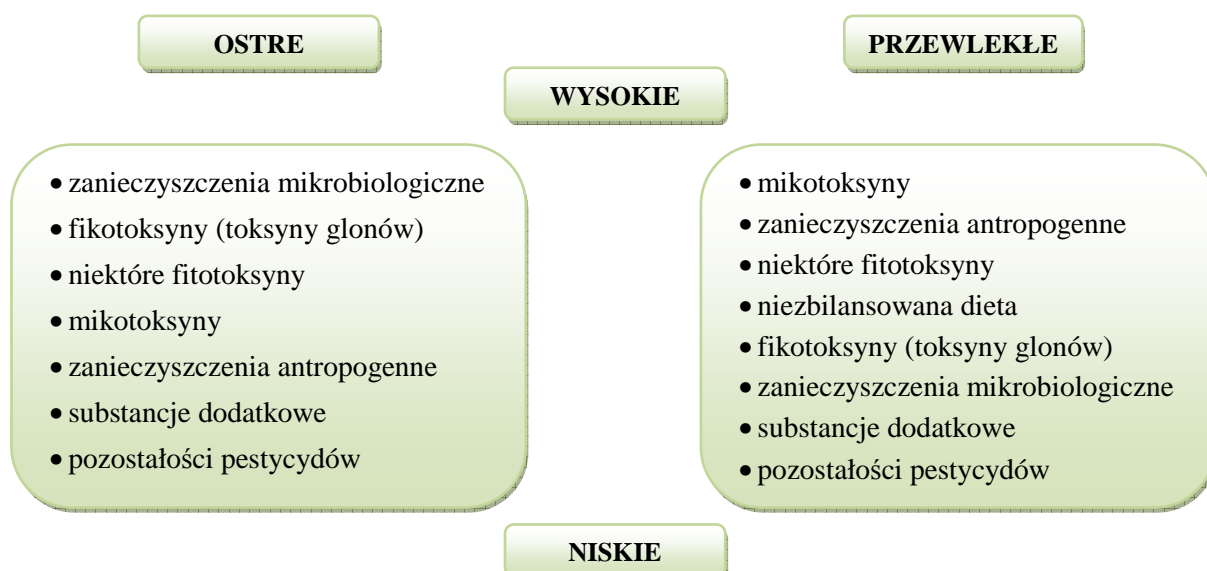
Skrót	Termin Anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
15-ADON	<i>15-Acetyldeoxynivalenol</i>	15-Acetylodeoksyniwalenol
1-AN	<i>1-Anthroynitrile</i>	1-Antracenonitryl
1-NC	<i>1-Naphthoyl chloride</i>	Chlorek 1-nafloilu
2-NC	<i>2-Naphthoyl chloride</i>	Chlorek 2-nafloilu
3-ADON	<i>3-Acetyldeoxynivalenol</i>	3-Acetylodeoksyniwalenol
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Acetonitryl
AcOEt	<i>Ethyl Acetate</i>	Octan etylu
AFs	<i>Aflatoxins</i>	Aflatoksyny
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	Analiza wariancji
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>	Międzynarodowe Stowarzyszenie Chemików Analitycznych
APCI	<i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i>	Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>	Jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym
ASE/PLE	<i>Accelerated Solvent Extraction/ Pressurized Liquid Extraction</i>	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
ATA	<i>Alimentary Toxic Aleukia</i>	Toksyczna aleukia pokarmowa
BSA	<i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>	N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamid
C18	<i>Silica Gel Modified with Octadecyl Groups</i>	Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi
C3CCI	<i>Coumarin-3-carboxylic acid chloride</i>	Chlorek kwasu kumaryno-3-karboksyłowego
C8	<i>Silica Gel Modified with Octyl Groups</i>	Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktylowymi
CE	<i>Collision Energy</i>	Energia zderzeń
CUR	<i>Curtain Gas</i>	Gaz osłonowy
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>	Potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń
D3G	<i>Deoxynivalenol-3-glucoside</i>	Glukozyd 3-deoksyniwalenolu
DAS	<i>Diacetoxyscirpenol</i>	Diacetoksyscirpenol
DMAP	<i>4-Dimethylaminopyridine</i>	4-Dimetyloaminopirydyna
DON	<i>Deoxynivalenol</i>	Deoksyniwalenol
DP	<i>Declustering Potential</i>	Potencjał rozgrupowania klastrów
d-SPE	<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>	Dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej
DT	<i>Dwell Time</i>	Czas monitorowania poszczególnych jonów
ECD	<i>Electron Capture Detector</i>	Detektor wychwytu elektronów
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>	Europejski Urząd do spraw Bezpieczeństwa Żywności
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	Test immunoenzymatyczny
ERs	<i>Estrogen Receptors</i>	Receptory estrogenowe
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>	Jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>	Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa
FUM	<i>Fumonisin</i>	Fumonizyny
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>	Analiza przepływowo-nastrzykowa
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>	Detektor płomieniowo-jonizacyjny
FLD	<i>Fluorescence Detector</i>	Detektor fluorescencyjny
FPIA	<i>Fluorescence Polarization Immunoassay</i>	Immunofluorescencja w świetle spolaryzowanym
FPP	<i>Farnesyl Pyrophosphate</i>	Difosforan farnezyłu
FUS X	<i>Fusarenon-X</i>	Fuzarenon X
GBC	<i>Graphitized Black Carbon</i>	Węgiel grafityzowany
GC	<i>Gas Chromatography</i>	Chromatografia gazowa
GMA-DVB	<i>Glycidymethacrylate-Divinylbenzene</i>	Glicydylometakrylan-diwinylbenzen
GS1	<i>Gas 1 (Nebulizer Gas)</i>	Gaz wspomagający rozpylanie
GS2	<i>Gas 2 (Heater Gas)</i>	Gaz pomocniczy
HFBA	<i>Heptafluorobutyric Anhydride</i>	Bezwodnik kwasu heptafluoromasłowego

HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>	Wysokosprawną chromatografię cieczową
HT-2	<i>HT-2 Toxin</i>	Toksyna HT-2
IAC	<i>Immunoaffinity Column</i>	Kolumnienka powinowactwa immunologicznego
IDL	<i>Instrumental Detection Limit</i>	Granica wykrywalności instrumentu pomiarowego
IQL	<i>Instrumental Quantification Limit</i>	Granica oznaczalności instrumentu pomiarowego
IS	<i>Internal Standard</i>	Wzorzec wewnętrzny
JECFA	<i>The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>	Wspólny Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności
KBD	<i>Kashin–Bek Disease</i>	Choroba Kaszina-Beka
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry</i>	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Coupled With Tandem Mass Spectrometry</i>	Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas
LFD	<i>Lateral Flow Device</i>	Immuno chromatograficzny test paskowy
LLE	<i>Liquid–Liquid Extraction</i>	Ekstrakcja ciecz-ciecz
LOD	<i>Limit of Detection</i>	Granica wykrywalności
LRM	<i>Laboratory Reference Material</i>	Laboratoryjny materiał odniesienia
LSD	<i>Lysergic Acid Diethylamide</i>	Dietyloamid kwasu lizergowego
MAE	<i>Microwave Assisted Extraction</i>	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym
MAS	<i>Monoacetoxyscirpenol</i>	Monoacetoksycirpenol
MDL	<i>Method Detection Limit</i>	Granica wykrywalności metodyki analitycznej
MeOH	<i>Methanol</i>	Metanol
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>	Polimery z odwzorowaniem cząsteczkowym
MISPE	<i>Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction</i>	Ekstrakcja do fazy stałej z wykorzystaniem polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym
MON	<i>Moniliformin</i>	Moniliformina
MQL	<i>Method Quantification Limit</i>	Granica oznaczalności metodyki analitycznej
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>	Monitorowanie wielu reakcji fragmentacji równoległe (tryb pracy spektrometru mas)
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	Spektrometria mas
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem
NC	<i>Nebulizer Current</i>	Natężenie prądu wyładowania koronowego
NDP (pl.)	<i>Maximum Acceptable Level</i>	Najwyższy Dopuszczalny Poziom
NEO	<i>Neosolaniol</i>	Neosolaniol
NIR	<i>Near-Infrared Spectroscopy</i>	Spektroskopia w bliskiej podczerwieni
NIV	<i>Nivalenol</i>	Niwalenol
OTA	<i>Ochratoxin A</i>	Ochratoksyna A
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>	Analiza głównych składowych
PCC	<i>Pyrene-1-carbonyl Cyanide</i>	Karbonylocyjanek 1-pirenylu
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>	Agar glukozowo-ziemniaczany
PFFA	<i>Pentafluoropropionic Anhydride</i>	Bezwodnik kwasu pentafluoropropionowego
PKSs	<i>Polyketide Synthases</i>	Syntazy poliketydowe
PP	<i>Polypropylene</i>	Polipropylen
PSA	<i>Primary-Secondary Amine</i>	Amina pierwszo-, drugorzędowa
QCM	<i>Quality Control Material</i>	Materiał do kontroli jakości
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (Methodology)</i>	Szybka, łatwa, tania, wydajna, odporna, bezpieczna (metodologia)
R	<i>Recovery</i>	Odzysk
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>	System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznych Produktach Żywnościowych i Środkach Żywnienia Zwierząt
R _S	<i>(Peak) Resolution</i>	Rozdzielczość (pików)

RSD _r	<i>Relative Standard Deviation, calculated from results generated under repeatability conditions</i>	Względne odchylenie standardowe, obliczone na podstawie wyników otrzymanych w warunkach powtarzalności
RSD _R	<i>Relative Standard Deviation calculated from results generated under reproducibility conditions</i>	Względne odchylenie standardowe, obliczone na podstawie wyników otrzymanych w warunkach odtwarzalności
S/N	<i>Signal-To-Noise Ratio</i>	Stosunek sygnału do szumu
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>	Komitet Naukowy ds. Żywności EU
SE	<i>Solvent Extraction</i>	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i>	Ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>	Monitorowanie pojedynczego jonu
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>	Ekstrakcja do fazy stałej
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>	Powierzchniowy rezonans plazmowy
SSE	<i>Signal Suppression or Enhancement</i>	Oslabienie lub wzmocnienie sygnału
T-2	<i>T-2 Toxin</i>	Toksyna T-2
TDI	<i>Tolerable Daily Intake</i>	Tolerowane dzienne pobranie
TEM	<i>Ion Source Temperature</i>	Temperatura źródła jonów
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>	Kwas trifluorooctowy
TFAA	<i>Trifluoroacetic Anhydride</i>	Bezwodnik kwasu tritluorooctowego
TIC	<i>Total Ion Current</i>	Całkowity prąd jonowy
TMCS	<i>Trimethylchlorosilane</i>	Trimetylochlorosilan
TMS	<i>Trimethylsilyl</i>	Grupa trimetylosililowa
TMSI	<i>Trimethylsilylimidazole</i>	Trimetylosililimidazol
TOF	<i>Time of Flight (analyzer)</i>	Analizator czasu przelotu
t _R	<i>Retention Time</i>	Czas retencji
UAE	<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami
Z4G	<i>Zearalenone-4-glucoside</i>	Glukozyd 4-zearalenonu
Z4S	<i>Zearalenone-4-sulfate</i>	Siarczan 4-zearalenonu
ZAL	<i>Zearalanol</i>	Zearalanol
ZAN	<i>Zearalanone</i>	Zearalanon
ZEL	<i>Zearalenol</i>	Zearalenol
ZEN	<i>Zearalenone</i>	Zearalenon

WSTĘP

Obserwowany w skali światowej intensywny rozwój produkcji i handlu żywnością powoduje, że zagadnienia związane z jej bezpieczeństwem stają się przedmiotem rosnącego zainteresowania społeczeństwa, władz publicznych i organizacji handlowych. Obok aspektu ilościowego – prawa człowieka do zapewnienia żywności (bezpieczeństwo żywnościowe), istnieje pojęcie „bezpieczeństwa żywności”, czyli działań i warunków, które muszą być spełnione na każdym etapie produkcji i obrotu, w celu zapewnienia ochrony zdrowia i życia ludzi. Warunki, działania i cele bezpieczeństwa żywności są przedmiotem uregulowań prawnych, w tym przepisów wspólnotowych. W Rozporządzeniu (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. zostały ustanowione ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności, powołano Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) oraz podkreślono konieczność zapewnienia wysokiego poziomu ochrony życia i zdrowia ludzkiego, w kontekście swobodnego przepływu bezpiecznej, zdrowej żywności i pasz. Zagrożeniem bezpieczeństwa żywności są m.in. obecne w niej zanieczyszczenia. Ocena ryzyka zdrowotnego związanego z żywnością (Rys. 1.) wskazuje na istotny udział wtórnych metabolitów pleśni (mikotoksyn) w wywoływaniu niepożądanych efektów, szczególnie o charakterze przewlekłym (Magan i Olsen 2004).



Rys. 1. Charakterystyka ryzyka zdrowotnego związanego z żywnością

W celu określenia narażenia na zanieczyszczenia obecne w żywności i paszach oraz monitorowania przestrzegania wytycznych, konieczne jest dysponowanie wiarygodnymi

i skutecznymi metodami oznaczania tych związków. Dostępność odpowiednich procedur analitycznych jest jednym z czynników, obok danych toksykologicznych oraz informacji o narażeniu i dystrybucji, warunkujących najwyższe dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń w środkach spożywczych i paszach. Opracowanie metodyk izolowania, wykrywania i oznaczania mikotoksyn stanowi wyzwanie dla analityków, m.in. ze względu na niskie poziomy stężeń, zróżnicowane właściwości fizykochemiczne, złożoność składu matrycy próbek i możliwe zakłócenia ze strony pozostałych składników. Uzyskanie informacji analitycznej, która jest elementem procesu decyzyjnego, w możliwie najkrótszym czasie, skłania do badań nad opracowaniem metodyk pozwalających na oznaczanie szerszego spektrum analitów w ramach jednego cyklu analitycznego, przy jednoczesnym obniżeniu zużycia rozpuszczalników organicznych i zachowaniu kryteriów skuteczności metody. Dlatego też tematyka pracy związana jest z opracowaniem procedur analitycznych służących oznaczaniu mikotoksyn, wykorzystujących połączenie chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas, jako technikę oznaczenia końcowego.

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wtórne metabolity pleśni

W dobie szybkiego rozwoju cywilizacyjnego i globalizacji zagadnienia dotyczące bezpieczeństwa żywności zajmują jedno z czołowych miejsc. Obok antropogennych zanieczyszczeń środowiska, związanych z industrializacją i urbanizacją, w surowcach, produktach spożywczych i paszach mogą być obecne zanieczyszczenia pochodzenia naturalnego. Takimi związkami są mikotoksyny, wtórne metabolity grzybów pleśniowych, powszechnie zasiedlających uprawy. Biosynteza mikotoksyn uzależniona jest od czynników środowiskowych (temperatura, wilgotność) i może mieć miejsce podczas wegetacji roślin, w czasie zbiorów lub w trakcie przechowywania i przetwarzania surowców. Za produkcję mikotoksyn o największym obecnie zagrożeniu zdrowotnym odpowiadają trzy rodzaje grzybów pleśniowych – *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Tabela 1) (Sweeney i Dobson 1998). Dotychczas zidentyfikowano ponad trzydzieści tysięcy wtórnych metabolitów mikroorganizmów, z których około czterystu zostało sklasyfikowanych jako mikotoksyny (Laatsch 2011), jednakże względnie niewielka ich liczba występuje w żywności i paszach, w stężeniach i częstotliwości zagrażających zdrowiu. Mikotoksynami o największym znaczeniu, z punktu widzenia zagrożenia zdrowia i strat ekonomicznych, są aflatoksyny (AFs), ochratoksyna A (OTA), fumonizyny (FUM), zearalenon (ZEN) oraz trichoteceny (deoksyniwalenol – DON, toksyna T-2). Zespół objawów chorobowych, związanych z narażeniem na mikotoksyny, nosi miano mikotoksykozy. Oddziaływanie wtórnych metabolitów pleśni na organizmy zwierzęce jest zróżnicowane. Niektórym mikotoksynom przypisuje się działanie kancerogenne (AFs, OTA, FUM), mutagenne (AFs), teratogenne (OTA), estrogenne (ZEN), krwotoczne i toksyczne dla układu krwiotwórczego (trichoteceny), immunotoksyczne (AFs, OTA, trichoteceny), hepatotoksyczne (AFs) oraz dermatotoksyczne (trichoteceny) (Richard 2007).

Niepożądane skutki działania pleśni i ich wtórnych metabolitów były znane już w starożytności. W siódmym i ósmym wieku p.n.e. festiwal „Robigalia” został ustanowiony na cześć boga Robigusa, który musiał być przebłagany w celu ochrony zbóż i drzew. Obchody tego święta przypadały na koniec kwietnia, ponieważ był to najbardziej prawdopodobny czas dla zaatakowania upraw przez pleśń lub rdzę zbożową (Peraica i in. 1999, Ager 2010, Dean i in. 2012).

Tabela 1. Główne rodzaje grzybów pleśniowych i najważniejsze mikotoksyny

Rodzaj	Gatunek	Mikotoksyny
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	aflatoksyny B ₁ , B ₂ , kwas cyklopiazonowy
	<i>A. parasiticus</i>	aflatoksyny B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
	<i>A. ochraceus</i>	ochratoksyna A, kwas penicylinowy
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i>	ochratoksyna A
	<i>P. citrinum</i>	cytrynina
	<i>P. expansum</i>	patulina
<i>Fusarium</i>	<i>F. sporotrichoides</i>	toksyna T-2, HT-2, diacetoksyscirpenol
	<i>F. verticilloides</i>	fumonizyna B ₁ , B ₂ , B ₃
	<i>F. graminearum</i>	deoksyniwalenol, niwalenol, zearalenon

Mikotoksyny zostały powiązane z jedną z dziesięciu plag egipskich (śmierć pierworodnych), opisaną w Biblii (Bhatnagar i in. 2002, Richard i in. 2003, O'Brien i Dietrich 2004). Zapasy żywności doświadczonych plagami Egipcjan zawierały wilgotne zapleśniałe ziarno, które najprawdopodobniej było zanieczyszczone mikotoksynami. Zgodnie z ówczesną tradycją, pierworodni synowie traktowani byli w sposób uprzywilejowany i otrzymywali najwięcej żywności, co – w połączeniu z prawdopodobnym skażeniem – mogło przyczynić się do ich śmierci (Dugan 2008). Najstarszą znaną mikotoksykozą u ludzi jest ergotyzm, którego przypadki zostały opisane już w 600 roku p.n.e. w Asyrii (Meggs 2009). Choroba ta, wywołana alkaloidami sporyszu (*Claviceps purpurea*), w średniowieczu osiągnęła rozmiary epidemii, okaleczając i zabijając w Europie tysiące ludzi. Zatrucie to było również znane jako „święty ogień” lub „ogień św. Antoniego”, ponieważ w tym czasie uważano, że pielgrzymka do Sanktuarium św. Antoniego przyniesie ulgę w intensywnym uczuciu pieczenia, towarzyszącemu chorobie. Wśród objawów opisanych w średniowiecznych przypadkach ergotyzmu u ludzi, znalazły się obrzęk i pieczenie kończyn, a także martwica, prowadząca do utraty przydatków (Richard i in. 2003). Średniowieczne wybuchy choroby, powiązane z alkaloidami sporyszu, obejmują epidemie w Quitania (Francja) w 994 roku oraz w Salem (USA) w 1692. W ubiegłym stuleciu choroba pojawiła się w Pont-Saint-Esprit (Francja) w 1951 roku (Meggs 2009). Ofiary doznawały halucynacji, wpadały w szal i wiły się w agonii. Skurcze doprowadzały do utraty palców, a w skrajnych przypadkach dłoni i stóp. Ofiary ergotyzmu były narażone na dietyloamid kwasu lizergowego (LSD), w wyniku spożywania chleba z mąki zanieczyszczonej alkaloidami sporyszu (Peraica i in. 1999). Początkiem intensywnych badań nad wtórnymi metabolitami pleśni było odkrycie aflatoksyn

w latach 60-tych ubiegłego stulecia, poprzedzone śmiercią ponad stu tysięcy sztuk drobiu w Anglii (Fratamico i in. 2008).

Mikotoksyny są powszechnymi zanieczyszczeniami zbóż – według szacunków Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), każdego roku około 25% zbiorów zawiera wtórne metabolity pleśni (Krska 2009). Wiele krajów wprowadziło regulacje prawne (w formie rozporządzeń i zaleceń), ustanawiające najwyższe dopuszczalne poziomy (NDP) mikotoksyn w żywności i paszach (van Egmond i in. 2007). Ze względu na różnice w budowie chemicznej mikotoksyn, która determinuje ich toksyczne działanie, wartości NDP także są zróżnicowane – od kilku (AFs, OTA) do kilku tysięcy ng/g (FUM), pozostając jednakże na lub poniżej poziomu śladowego. Obowiązujące przepisy prawne uwzględniają środki spożywcze najczęściej zanieczyszczone określonymi mikotoksynami (Tabela 2).

Tabela 2. Występowanie mikotoksyn w surowcach i produktach spożywczych

Mikotoksyny	Surowce i produkty spożywcze
Aflatoksyny B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Przyprawy, sorgo, orzeszki ziemne, orzechy, migdały, nasiona roślin oleistych, suszone owoce, jajka, mięso, ryż, kukurydza, pszenica
Ochratoksyna A	Rodzynki, sok z winogron, wino, kawa, przyprawy, zboża
Trichoteceny grupy A: toksyna T-2, toksyna HT-2, diacetoksyscirpenol, neosolaniol	Zboża, produkty na bazie zbóż
Trichoteceny grupy B: niwalenol, deoksyniwalenol, 3-acetylo-DON, 15-acetylo-DON, fuzarenon X	Zboża, produkty na bazie zbóż
Zearalenon	Zboża, produkty na bazie zbóż, ryż, sorgo, sezam, soja
Fumonizyny B ₁ , B ₂ , B ₃	Kukurydza, produkty na bazie kukurydzy, sorgo, szparagi, ryż, mleko

W 2011 roku działający w UE System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznych Produktach Żywnościowych i Środkach Żywienia Zwierząt (RASFF) zarejestrował 514 zatrzymań na granicy, związanych z importem produktów zanieczyszczonych mikotoksynami. Był to najwyższy odsetek (26,7%) odrzuconych produktów importowanych – w klasyfikacji według rodzaju zanieczyszczenia. Dla porównania zakwestionowane produkty zawierające pozostałości pestycydów (drugie w kolejności) stanowiły 11,5% (RASFF 2012). Obecność pleśni w żywności nie świadczy o jej skażeniu mikotoksynami, a nieobecność

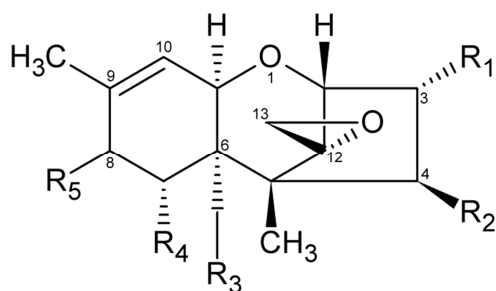
grzybów nie gwarantuje braku zanieczyszczenia. Bardzo często mikotoksyny występują razem w niskich stężeniach. Jest to spowodowane zdolnością grzybów do jednoczesnego wytwarzania wielu mikotoksyn oraz wynika z faktu, że dany surowiec może być zanieczyszczony różnymi pleśniami. Przypuszcza się, że zmiany klimatyczne, którym poświęca się wiele uwagi w ostatnich latach, mogą generować problemy, związane ze zmianami w populacji mikroorganizmów i mikotoksynami, prowadzące do wzrostu obaw o zdrowie publiczne w odniesieniu do przechowywania, higieny i bezpieczeństwa żywności (Ingram i in. 2010). Chociaż nie jest możliwe wyeliminowanie mikotoksyn z zasobów żywności i pasz, zastosowanie odpowiednich praktyk rolniczych, właściwe przechowywanie i kontrola produktów może obniżyć narażenie na te substancje. W tym kontekście rozwój i stosowanie wiarygodnych procedur analitycznych odgrywają zasadniczą rolę w ocenie charakteru i poziomu zanieczyszczenia mikotoksynami żywności i pasz.

2. Charakterystyka analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są powszechnymi patogenami roślin uprawnych na całym świecie. Powodowane przez nie choroby (fuzariozy), a także zdolność do wytwarzania wtórnych metabolitów (fuzariotoksyn) stanowią zagrożenie zdrowia i przyczynę olbrzymich strat gospodarczych. Porażenie roślin przez *Fusarium* może nastąpić na każdym etapie ich rozwoju i jest zależne od wielu czynników (m.in. od warunków klimatycznych, podatności genetycznej, rodzaju gleby, obecności szkodników). Grzyby te zostały uznane za główne źródło zanieczyszczenia mikotoksynami zbóż drobnoziarnistych w strefie klimatu umiarkowanego. Ze względu na duże znaczenie dla bezpieczeństwa żywności prowadzone są liczne badania nad charakterystyką i występowaniem grzybów z rodzaju *Fusarium* (Goswami i Kistler 2004, Khan i in. 2006, Nicolaisen i in. 2009, Yli-Mattila 2010).

2.1. Trichoteceny – budowa, biosynteza

Jedną z najliczniejszych i najczęściej występujących grup wtórnych metabolitów *Fusarium* są cykliczne seskwiterpenoidy – trichoteceny. Grupa ta liczy około 200 związków produkowanych również przez inne gatunki pleśni, m.in. *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*. Charakterystycznym elementem budowy cząsteczek trichotecenów jest pierścień 12,13-epoksydowy (Rys. 2.), któremu przypisuje się ich toksyczne oddziaływanie.



	Masa molowa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
NIV	312	OH	OH	OH	OH	= O
DON	296	OH	H	OH	OH	= O
FUS-X	354	OH	OOCCH ₃	OH	OH	= O
15-ADON	338	OH	H	OOCCH ₃	OH	= O
3-ADON	338	OOCCH ₃	H	OH	OH	= O
NEO	382	OH	OOCCH ₃	OOCCH ₃	H	OH
MAS	324	OH	OH	OOCCH ₃	H	H
DAS	366	OH	OOCCH ₃	OOCCH ₃	H	H
T-2	466	OH	OOCCH ₃	OOCCH ₃	H	OOCCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2	424	OH	OH	OOCCH ₃	H	OOCCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2 Triol	382	OH	OH	OH	H	OOCCH ₂ CH(CH ₃) ₂

Rys. 2. Wzór ogólny związku z grupy trichotecenów

W zależności od budowy pozostałej części cząsteczki, trichoteceny zostały podzielone na cztery typy:

- Typ A: zawierający w pozycji C-8 grupę funkcyjną inną niż karbonylową
- Typ B: zawierający w pozycji C-8 grupę karbonylową
- Typ C: zawierający drugi pierścień epoksydowy w pozycjach C-7,8 lub C-9,10 (np. krotocyna);
- Typ D: trichoteceny makrocykliczne, diestry w pozycjach C-4 i C-15 (np. satratoksyna, produkowana przez grzyby z rodzaju *Stachybotrys*) (McCormick i in. 2011).

W żywności i paszach najbardziej rozpowszechnione są trichoteceny A (głównie toksyny T-2 i HT-2) oraz B (głównie deoksyniwalenol – DON i niwalenol – NIV) (Tabela 3). Biosynteza tych związków rozpoczyna się cyklizacją i izomeryzacją difosforanu farnezyli (FPP) do trichodieniu, katalizowaną przez enzym – syntazę trichodieniu, po których następuje szereg reakcji utleniania i estryfikacji. Grupę genów o największym znaczeniu dla tego procesu określono mianem zbioru TRI. Warunkiem biosyntezy trichotecenów jest obecność w genomie genu TRI5, kodującego syntazę trichodieniu. Inne geny z tego zbioru (TRI3, TRI7, TRI13) warunkują rodzaj powstającej miktotoksyny.

Tabela 3. Informacje literaturowe na temat występowania trichotecenów oraz zearalenonu i jego pochodnych w surowcach i produktach zbożowych

Matryca	Analit	Liczba próbek; % pos ^a	Zawartość [ng/g]	Miejsce i okres badań	Literatura
Jęczmień, pszenica, owies	DON	449; 31	20-1440	Norwegia 1996-1998	Langseth i Rundberget (1999)
	NIV	449; 6	20-211		
	T-2	449; 13	20-380		
	HT-2	449; 33	20-880		
Mieszanki paszowe	DON	50; 56	64-1230	Słowacja 2003-2004	Labuda i in. (2005)
	NIV	50; 0	-		
	15-ADON	50; 4	130; 229		
	3-ADON	50; 6	207-1497		
	T-2	50; 90	1-130		
	HT-2	50; 76	2-173		
	DAS	50; 20	2-5		
ZEN	50; 88	3-86			
Pieczywo pszenne, pieczywo żytnie	DON	101; 92	15-690	Niemcy 1999	Schollenberger i in. (2005)
	NIV	101; 5	25-64		
	3-ADON	101; 8	11-73		
	T-2	101; 1	4		
Zboża, pasze	HT-2	101; 2	12	Chorwacja 1998-2004	Sokolović i Šimpraga (2006)
	DON	51; 41	50-3440		
	T-2	429; 17	100-700		
Kukurydza	DAS	409; 28	100-1200	Nigeria 2005	Adejumo i in. (2007)
	DON	180; 22	204-745		
	3-ADON	180; 17	<150		
Kukurydza	DAS	180; 9	23-51	Meksyk 2001	Briones-Reyes i in. (2007)
	ZEN	25; 70	3-83,6		
Płatki owsiane	T-2	43; 100	0,1-34	Niemcy 2005	Gottschalk i in. (2007)
	HT-2	43; 100	0,4-51		
	T-2 Triol	43; 65	0,6-2,7		
	DAS	43; 86	0,1-0,38		
	MAS	43; 95	0,04-0,66		
Kukurydza, pszenica, ryż i ich produkty	NEO	43; 100	0,1-2,7	Turcja 2004	Omurtag i in. (2007)
	DAS	69; 0	-		
Jęczmień	DON	300; 53	500-10000	Urugwaj 1996-2002	Pan i in. (2007)
Pszenica	DON	120; 89	7-2788	Argentyna 2003-2004	González i in. (2008)
	NIV	120; 1	50		
	15-ADON	120; 0	-		
	3-ADON	120; 22	14-43		
	T-2	120; 0	-		
	HT-2	120; 23	10-41		
	T-2 Triol	120; 28	21-123		
DAS	120; 0	-			
Pszenica, kukurydza, jęczmień	DON	139; 37	40-2460	Serbia 2004-2005	Jajić i in. (2008)
Pszenica, jęczmień, kukurydza	ZEN	91; 8	11,6-148	Bułgaria 2007	Manova i Mladenova (2009)

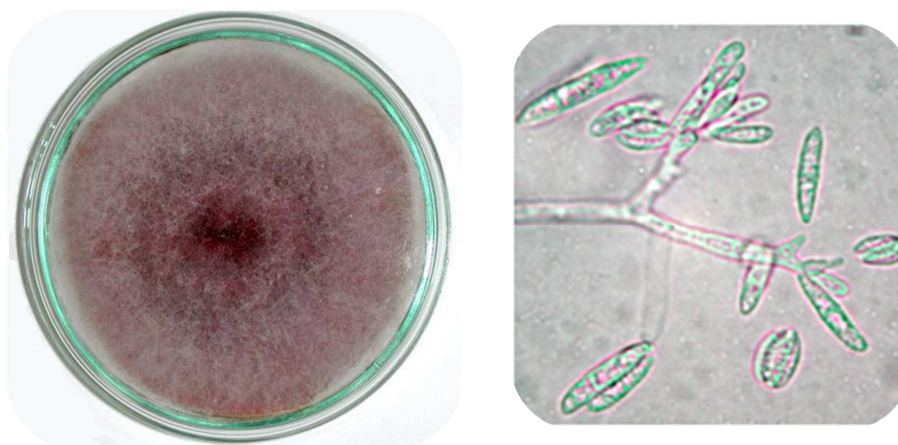
^a % pos – % próbek, w których wykryto mikotoksyny

Tabela 3. c.d.

Matryca	Analit	Liczba próbek; % pos ^a	Zawartość [ng/g]	Miejsce i okres badań	Literatura
Owies	DON	458; 32	10-282	Anglia 2002-2005	Edwards (2009)
	NIV	458; 72	10-847		
	3-ADON	458; 1	10-26		
	T-2	458; 84	10-2406		
	HT-2	458; 92	10-7584		
	T-2 Triol	458; 41	10-263		
Pszenica, żyto, pszenżyto	DON	975; 33	50-10400	Niemcy 2000-2007	Meister (2009)
	ZEN	898; 8	10-451		
Pszenica	DON	65; 83	7,2-54	Tunezja 2007	Bensassi i in. (2010)
Produkty pszenne	DON	75; 91	10,9-623	Hiszpania 2008	González-Osnaya i in. (2011)
	T-2	75; 12	8,2-260		
Pszenica, żyto, pszenżyto, jęczmień	DON	125; 95	100-445	Litwa 2006-2007	Mankevičienė i in. (2011)
	T-2	125; 89	7,5-133		
	ZEN	125; 85	10-46		
Ryż, jęczmień, kukurydza	DON	187; 39	3,7-492	Korea Pd 2009	Ok i in. (2011)
	NIV	187; 51	7,8-129		
	FUS X	187; 13	2,1-18,7		
	15-ADON	187; 42	4,7-98		
	3-ADON	187; 21	4,9-10,2		
Mieszanki paszowe	DON	277; 17	100-864	Portugalia brak danych	Almeida i in. (2011)
	ZEN	404; 26	5-73		
Zboża paszowe, kiszonki, mieszanki paszowe	DON	1092; 88	5-14470	Polska 2006-2009	Grajewski i in. (2012)
	NIV	393; 43	15-526		
	T-2	572; 51	1,5-289		
	HT-2	527; 68	5-124		
	ZEN	972; 75	1-1150		
Kukurydza	DON	40; 85	15-17920	Chorwacja 2010	Pleadin i in. (2012)
	ZEN	40; 88	2-5110		
Pszenica, kukurydza, ryż i ich produkty, produkty żytnie, jęczmienne, owsiane	DON	265; 3	63-296	Włochy, Hiszpania, Maroko, Tunezja 2010	Serrano i in. (2012)
	NIV	265; 51	100-961		
	T-2	265; 3	13-112		
	HT-2	265; 3	36-83		
	DAS	265; 2	6,4-97		
	ZEN	265; 0	-		
Mąka pszenna	DON	15; 87	17,5-976	Serbia 2011	Škrbić i in. (2012)
	T-2	15; 27	9,8-26,9		
	HT-2	15; 0	-		
	ZEN	15; 33	1,9-21,1		
Pszenica, kukurydza, jęczmień, owies	DON	181; 57	34-2942	Chorwacja 2011	Pleadin i in. (2013)
	T-2	181; 36	5-42		
	ZEN	181; 49	4-611		

^a % pos – % próbek, w których wykryto mikotoksyny

Trichoteceny A syntezowane są przez gatunki *Fusarium* należące do sekcji *Sporotrichella* (m.in. *F. sporotrichioides* – Rys. 3., *F. poae*), natomiast związki typu B są wytwarzane głównie przez gatunki sekcji *Discolor* (m.in. *F. graminearum*, *F. culmorum*) (Desjardins i in. 1993, Moss i Thrane 2004).



Rys. 3. Kolonia (podłoże PDA) i makrokonidia *F. sporotrichioides*

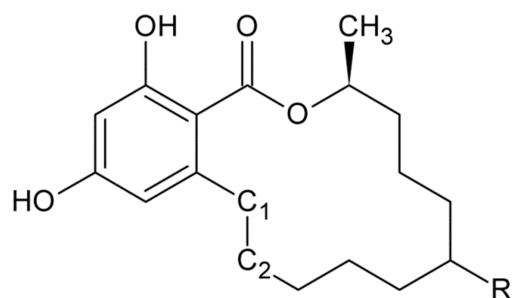
2.2. Zearalenon i jego pochodne – budowa, biosynteza

Zearalenon (ZEN) jest metabolitem drugorzędowym produkowanym przez wiele gatunków *Fusarium*, m.in. *F. graminearum*, *F. culmorum* (Rys. 4.), *F. equiseti*.



Rys. 4. Kolonia (podłoże PDA) i makrokonidia *F. culmorum*

Podobnie jak trichoteceny, ZEN powszechnie występuje w zbożach i produktach z nich wytwarzanych (Tabela 3). Wraz z pochodnymi – zearalenolem (ZEL), zearalanolem (ZAL) oraz zearalanonem (ZAN) stanowią grupę fenolowych laktonów kwasu beta-rezorcylowego (1,4-dihydroksybenzoesowego) (Rys. 5.).



	Masa molowa	R	C ₁ -C ₂
ZEN	318	= O	C=C
α -ZEL	320	····· OH	C=C
β -ZEL	320	▴ OH	C=C
α -ZAL	322	····· OH	C-C
β -ZAL	322	▴ OH	C-C
ZAN	320	= O	C-C

Rys. 5. Wzór ogólny zearalenonu i jego pochodnych

W biosyntezie ZEN biorą udział geny kodujące syntazy poliketydowe (PKSs). PKSs katalizują sekwencyjne reakcje kondensacji wielu jednostek octanowych do poliketydu, rozpoczynając od jednej cząsteczki acetylo-CoA, do której przyłącza się kolejno osiem grup acylowych malonylo-CoA. Powstający pierwotnie ZEL utleniany jest do ZEN w reakcji katalizowanej przez oksydazę alkoholu izoamyłowego (Bennett i Klich 2003, Kim i in. 2005).

2.3. Toksyczność mikotoksyn wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*

Niekorzystny wpływ mikotoksyn fuzaryjnych na zdrowie ludzi i zwierząt jest przedmiotem badań od wielu lat. Trichoteceny A i B są szybko wchłaniane z przewodu pokarmowego. Związki te nie wymagają aktywacji metabolicznej do wywierania toksyczności – odpowiada za nią obecność reaktywnego elektrofilowego pierścienia 12,13-epoksydowego. Głównymi reakcjami biotransformacji trichotecenów są de-epoksydowanie i sprzężanie z kwasem glukuronowym. W przypadku niektórych związków inne przemiany (hydroksylowanie, deacetylowanie) również mają znaczenie (Pronk i in. 2002). Podstawowym mechanizmem toksyczności trichotecenów jest hamowanie syntezy DNA, RNA i białek. Związki te powodują również ogólną cytotoxycznosc przez hamowanie mitochondrialnego układu transportu elektronów (Ueno 1977, Sudakin 2003, Eriksen 2003, Pestka 2010).

Liczne badania wykazały, że trichoteceny są immunotoksyczne w modelach zwierzęcych. Związki typu A wykazują ponadto działanie toksyczne dla układu krwiotwórczego (EFSA 2011a), wywołują krwawienia, obrzęki i martwicę skóry (SCF 2001, SCF 2002, Parent-Massin 2004). U zwierząt hodowlanych trichoteceny powodują przede wszystkim odmowę przyjęcia paszy, wymioty i zaburzenia funkcjonowania jelit (świnie). Drób nie jest tak wrażliwy na DON (trichoteceny B), a odmowa przyjęcia paszy jest obserwowana tylko przy bardzo wysokich dawkach (EFSA 2004a, Richard 2007, Pestka 2007). W przypadku narażenia drobiu na trichoteceny A zaobserwowano zmiany chorobowe w jamie dzioba, obniżenie spożycia paszy i zmniejszenie masy ciała. Ponadto stwierdzono, że wyższe stężenia toksyn T-2 i HT-2 negatywnie wpływają na produkcję jaj u kur niosek (Yegani i in. 2005, Sokolović i in. 2008). Przeżuwacze są gatunkami zwierząt najmniej wrażliwymi na trichoteceny – fakt ten jest przypisany zdolności mikroflory żwacza do detoksykacji tych związków (Upadhaya i in. 2010). W latach 70 i 80-tych ubiegłego stulecia, trichoteceny zostały uznane za domniemane biologiczne środki bojowe, wykorzystane w atakach "żółtego deszczu" na obszarach działań wojennych (Afganistan, Laos i Kambodża). Najczęstszymi objawami obserwowanymi u ofiar ataków były: wymioty, biegunka, podrażnienie, pieczenie i swędzenie skóry, wysypka, pęcherze, krwawienie oraz duszność. Wszystkie z wymienionych objawów można przypisać toksycznemu działaniu trichotecenów. Występowanie trichotecenów stwierdzono w próbkach roślin, na powierzchni fragmentów tworzyw sztucznych i skał w miejscach działań wojennych, wykryto je także w krwi i tkankach ofiar ataku (Garmon 1981, Cullen i in. 1982, Wannemacher i Wiener 1997, Tucker 2001). Długotrwałe narażenie na podostre dawki trichotecenów (głównie toksyny T-2) jest przyczyną toksycznej aleukii pokarmowej (ATA) u ludzi i mikotoksykozy u zwierząt. Wystąpienie epidemii tej choroby odnotowano na Syberii (1913, 1932, 1945), kiedy to niedobór pożywienia zmusił mieszkańców do spożywania zapleśniałego, przemarzniętego ziarna. Przebieg kliniczny ATA składa się z czterech etapów. Objawami pojawiającymi się wkrótce po spożyciu skażonej żywności są pieczenie w jamie ustnej, gardle, przełyku i żołądka. Następnie obserwuje się wymioty, biegunkę, bóle brzucha, wywołane zapaleniem błony śluzowej żołądka i jelit, a także ból i zawroty głowy, tachykardię, ślinotok i gorączkę, zmniejsza się również liczba leukocytów we krwi. Objawy te mogą trwać od 3 do 9 dni, po czym ustępują, sygnalizując początek fazy drugiej. Wraz z redukcją intensywności początkowych objawów, następuje poprawa samopoczucia, jednakże w fazie tej postępuje zniszczenie układu krwiotwórczego i stale zmniejsza się liczba limfocytów, czemu towarzyszy niedokrwistość. Ciągłe spożywanie zanieczyszczonej żywności prowadzi do

zapoczątkowania etapu trzeciego, sygnalizowanego pojawieniem się krwotoków na skórze i na błonach śluzowych ust, języka oraz w jelitach i żołądku. W najcięższych przypadkach rozwijają się intensywne procesy owrzodzeniowe i zgorzelinowe w krtani, co prowadzi do bezgłosu i śmierci przez uduszenie. Kiedy zmiany martwicze zostaną wyleczone i temperatura ciała spadnie, rozpoczyna się etap powrotu do zdrowia. W tym okresie, chorzy są podatni na różne infekcje wtórne, w tym zapalenie płuc (Peraica i in. 1999, Sudakin 2003, Omaye 2004, EFSA 2011a). Trichoteceny rozważane są również jako możliwa przyczyna atakującej stawy choroby Kaszina-Beka (KBD), występującej endemicznie na terenie Chin i Tybetu (Stone 2009).

Zearalenon określany jest mianem niesteroidowego estrogenu lub mikoestrogenu, ze względu na swoje estrogenne właściwości. Budowa cząsteczek ZEN i jego pochodnych warunkuje ich zdolność wiązania do receptorów estrogenowych (ERs) (Fink-Gremmels i Malekinejad 2007, Morgavi i Riley 2007, Zinedine i in. 2007). Podobnie jak trichoteceny, ZEN jest szybko wchłaniany z przewodu pokarmowego i metabolizowany do ZEL lub sprzęgany z kwasem glukuronowym. Najbardziej wrażliwa na działanie ZEN jest trzoda chlewna, szczególnie młode loszki. α -ZEL jest metabolitem o silniejszych właściwościach estrogennych niż ZEN (Shier i in. 2001). Toksyczność ostra ZEN jest niska, natomiast długotrwałe narażenie powoduje zaburzenia płodności i hiperestrogenizm, objawiające się, m.in. obrzękiem sromu i powiększeniem macicy, skurczeniem jajników, przerwaniem ciąży, czy nabyciem cech żeńskich przez samców (Kuiper-Goodman i in. 1987, Shibamoto i Bjeldanes 1993, EFSA 2004b, Omaye 2004, Eriksen 2006, Binder 2007, Kanora i Maes 2009, EFSA 2011b). Prowadzone są liczne badania nad wpływem ZEN na układ hormonalny, płodność i rozwój ssaków (Green i in. 1990, Yang i in. 2007, Benzoni i in. 2008, Minervini i Dell'Aquila 2008, Filannino i in. 2011, Sambuu i in. 2011, Gajęcka 2013). Ze względu na właściwości anaboliczne α -ZAL znalazł zastosowanie jako promotor wzrostu u bydła (preparat Ralgro[®]) i stał się alternatywą dla silniejszego syntetycznego estrogenu, dietylostilbestrolu (Kuiper-Goodman i in. 1987, CAST 2003, Murphy i in. 2006). Narażenie na zearalenon może być przyczyną przedwczesnego dojrzewania dziewcząt, jest kojarzone również z występowaniem nowotworów hormonozależnych, m.in. raka sutka, szyjki macicy i prostaty (Tomaszewski i in. 1998, Pillay i in. 2002, Gajęcki i in. 2004, Kuciel-Lisieska i in. 2008, Massart i in. 2008, EFSA 2011b, Twarużek 2013).

2.4. Przepisy prawne i zalecenia związane z obecnością analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w żywności i paszach

Mikotoksyny o największym zagrożeniu zdrowotnym i ekonomicznym są przedmiotem uwagi wielu komisji eksperckich (EFSA, JECFA, SCF), co skutkuje powstawaniem licznych regulacji prawnych i zaleceń, m.in. w zakresie odpowiednich praktyk rolniczych. Pierwszym wspólnotowym przepisem prawnym uwzględniającym zagrożenia związane z mikotoksynami *Fusarium* było Rozporządzenie Komisji (WE) nr 856/2005 (Rozporządzenie Komisji (WE) 2005). W oparciu o opinie Komitetu Naukowego ds. Żywności (SCF 1999, SCF 2000, SCF 2001), zostało ustanowione tolerowane dzienne pobranie (TDI) mikotoksyn, którego wartości w następnych latach uległy zmianie wraz ze zwiększeniem liczby raportów o toksycznym działaniu i występowaniu tych związków (Tabela 4).

Tabela 4. Wartości tolerowanego dziennego pobrania (TDI) wyznaczone dla mikotoksyn fuzaryjnych

Mikotoksyna	TDI [µg/kg masy ciała]	Źródło
DON	1	Rozporządzenie Komisji (WE) 2005; Rozporządzenie Komisji (WE) 2006a
ZEN	0,2	Rozporządzenie Komisji (WE) 2005; Rozporządzenie Komisji (WE) 2006a
	0,25	EFSA 2011b
NIV	0,7 ^a	Rozporządzenie Komisji (WE) 2005; Rozporządzenie Komisji (WE) 2006a
	1,2	EFSA 2013a
T-2+HT-2	0,06 ^a	Rozporządzenie Komisji (WE) 2005; Rozporządzenie Komisji (WE) 2006a
	0,1	EFSA 2011a; Zalecenie Komisji 2013

^a t-TDI – tymczasowe tolerowane dzienne pobranie

W oparciu o wyniki projektu SCOOP 3.2.10 „Zebranie danych o występowaniu toksyn *Fusarium* w środkach spożywczych i ocena pobrania w żywności przez ludność Państw Członkowskich UE” (SCOOP 2003), Komisja uznała, że „mikotoksyny *Fusarium* są szeroko rozpowszechnione w łańcuchu żywnościowym we Wspólnocie, a głównymi źródłami ich spożycia są produkty wytworzone ze zbóż, a zwłaszcza z pszenicy i kukurydzy. O ile spożycie toksyn *Fusarium* dla całej populacji i dorosłych jest często mniejsze od TDI dla poszczególnej toksyny, w przypadku grup ryzyka, takich jak niemowlęta i małe dzieci, jest

Tabela 5. Najwyższe dopuszczalne poziomy mikotoksyn fuzaryjnych w surowcach i produktach spożywczych

Mikotoksyna	Środki spożywcze	NDP [µg/kg]
DON	Nieprzetworzone zboża inne niż pszenica durum, owies i kukurydza	1250
	Pszenica durum i owies, nieprzetworzone	1750
	Nieprzetworzona kukurydza, z wyjątkiem nieprzetworzonej kukurydzy przeznaczonej do mielenia na mokro	1750
	Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby oraz zarodki jako produkt końcowy wprowadzany na rynek do bezpośredniego spożycia	750
	Makaron (suchy)	750
	Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i płatki śniadaniowe	500
	Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	200
	Fracje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek powyżej 500 mikronów nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi	750
	Fracje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek co najwyżej 500 mikronów nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi	1250
	ZEN	Nieprzetworzone zboża inne niż kukurydza
Nieprzetworzona kukurydza, z wyjątkiem nieprzetworzonej kukurydzy przeznaczonej do mielenia na mokro		350
Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby oraz zarodki jako produkt końcowy wprowadzany na rynek do bezpośredniego spożycia		75
Olej kukurydziany rafinowany		400
Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i płatki śniadaniowe, z wyjątkiem przekąsek kukurydzianych i płatków śniadaniowych na bazie kukurydzy		50
Kukurydza przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi, przekąski kukurydziane i płatki śniadaniowe na bazie kukurydzy		100
Przetworzona żywność na bazie zbóż (z wyjątkiem przetworzonej żywności na bazie kukurydzy) oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci		20
Przetworzona żywność na bazie kukurydzy dla niemowląt i małych dzieci		20
Fracje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek powyżej 500 mikronów nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi		200
Fracje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek co najwyżej 500 mikronów nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi		300
Suma toksyn T-2 i HT-2	Nieprzetworzony jęczmień (w tym jęczmień browarny) i kukurydza	200
	Nieprzetworzony owies (z łuską nasioną)	1000
	Nieprzetworzona pszenica, żyto i pozostałe zboża	100
	Owies do bezpośredniego spożycia przez ludzi	200
	Kukurydza do bezpośredniego spożycia przez ludzi	100
	Pozostałe zboża do bezpośredniego spożycia przez ludzi	50
	Otręby i płatki owsiane	200
	Otręby zbożowe z wyjątkiem otrębów owsianych, produkty z mielonego owsa inne niż otręby i płatki owsiane, a także produkty z mielonej kukurydzy	100
	Pozostałe produkty z mielonego ziarna zbożowego	50
	Śniadaniowe przetwory zbożowe, w tym formowane płatki zbożowe	75
	Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciastka, herbatniki, przekąski zbożowe, makaron	25
	Żywność na bazie zbóż przeznaczona dla niemowląt i małych dzieci	15

bliskie lub nawet w niektórych przypadkach przekracza TDI. Zwłaszcza w przypadku deoksyniwalenolu, spożycie w grupie małych dzieci i młodzieży jest bliskie TDI.” (Rozporządzenie Komisji (WE) 2005), ustanawiając najwyższe dopuszczalne poziomy (NDP) DON i ZEN w produktach spożywczych.

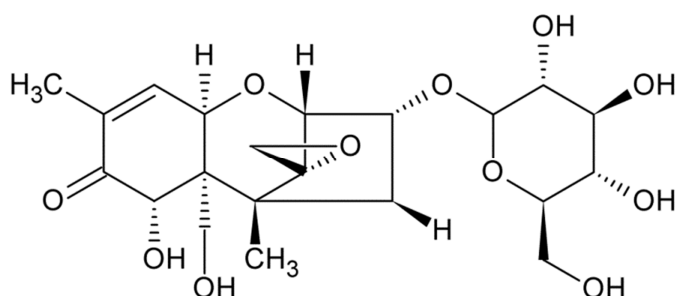
Obecnie wartości NDP (Tabela 5) są regulowane Rozporządzeniami Komisji (WE) 1881/2006 oraz 1126/2007 (Rozporządzenie Komisji (WE) 2006a, Rozporządzenie Komisji (WE) 2007). W odniesieniu do materiałów paszowych i gotowych mieszanek (Tabela 6) UE wydała jedynie zalecenie (Zalecenie Komisji 2006). W przepisach prawnych z lat 2005 i 2006 Komisja Europejska przedstawiła również opinię dotyczącą toksyn T-2 i HT-2, wskazując, że ich obecność w żywności może budzić obawy w odniesieniu do zdrowia publicznego i uznała opracowanie czułych metod analizy, a także zebranie większej ilości danych o występowaniu tych toksyn za konieczne i priorytetowe. W 2013 roku Komisja Europejska wydała zalecenie w sprawie obecności toksyn T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych, określające poziomy wskaźnikowe stężeń, powyżej których należy przeprowadzić badania dotyczące czynników prowadzących do obecności tych związków, a także ponownie podkreśliła konieczność zgromadzenia większej ilości danych na temat występowania T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych (Zalecenie Komisji 2013).

Tabela 6. Zalecane wartości graniczne poziomów mikotoksyn w surowcach i produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt

Mikotoksyna	Produkty przeznaczone do żywienia zwierząt	Wartość orientacyjna [mg/kg]
DON	Zboża i produkty zbożowe z wyjątkiem produktów ubocznych kukurydzy	8
	Produkty uboczne kukurydzy	12
	Mieszanki paszowe uzupełniające i pełnoporcjowe	5
	Mieszanki paszowe uzupełniające i pełnoporcjowe dla świń	0,9
	Mieszanki paszowe uzupełniające i pełnoporcjowe dla cieląt (< 4 miesięcy), jagniąt i kozłąt	2
ZEN	Zboża i produkty zbożowe z wyjątkiem produktów ubocznych kukurydzy	2
	Produkty uboczne kukurydzy	3
	Mieszanki paszowe uzupełniające i pełnoporcjowe dla prosiąt i loszek (młodych macior)	0,1
	Mieszanki paszowe uzupełniające i pełnoporcjowe dla macior i tuczników	0,25
	Mieszanki paszowe uzupełniające i pełnoporcjowe dla cieląt, bydła mlecznego, owiec (w tym jagniąt) i kóz (w tym kozłąt)	0,5
Suma toksyn T-2 i HT-2	Produkty z mielonego owsa (łuski nasion)	2
	Pozostałe produkty zbożowe	0,5
	Mieszanki paszowe z wyjątkiem karmy dla kotów	0,25

2.5. Pochodne mikotoksyn i mikotoksyny „zamaskowane”

W ostatnich latach uwagę środowiska naukowego przykuwają pochodne mikotoksyn, w tym toksyny „zamaskowane”, które mogą stanowić dodatkowe źródło narażenia ludzi i zwierząt na wtórne metabolity pleśni. Rośliny porażone toksynotwórczymi grzybami mogą zmieniać strukturę chemiczną wytworzonych mikotoksyn, w ramach procesu detoksykacji. Pojęcie „zamaskowanych mikotoksyn” nawiązuje do pewnych trudności analitycznych, ponieważ związki te nie są wykrywane podczas rutynowych analiz na zawartość macierzystych mikotoksyn (Berthiller i in. 2005a). Głównym zagrożeniem, związanym z zamaskowanymi mikotoksynami, jest potencjalna hydroliza do aglikonów, zarówno podczas przetwarzania surowców (Galaverna i in. 2009), jak i w przewodzie pokarmowym zwierząt (Nagl i in. 2012). Pochodne mikotoksyn nie są jedynie metabolitami roślinnymi. Sprzężone formy macierzystych związków mogą być wydzielane bezpośrednio przez grzyby, choć nie jest to częste zjawisko. Najbardziej znanymi substancjami są 3- i 15-acetylodeoksyniwalenol (3-ADON, 15-ADON), które występują w zbożach porażonych *Fusarium*. Oba związki są prekursorami biosyntezy DON. Również procesy technologiczne w przetwórstwie spożywczym mogą być źródłem sprzężonych form mikotoksyn (Berthiller i in. 2009). Rośliny zbożowe zainfekowane grzybami wytwarzającymi DON, potrafią go metabolizować. Jednym z głównych szlaków jest sprzężanie DON z ugrupowaniem glukozowym, powodujące powstanie glukozydu 3-deoksyniwalenolu (D3G) (Rys. 6.). W latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia Miller i współpracownicy pierwsi wnioskowali, że tworzenie się mniej toksycznej, sprzężonej formy DON może być odpowiedzialne za częściową odporność pszenicy na fuzariozę kłosów, wykazując że stężenie DON w próbkach rośliny zainfekowanej *F. graminearum* osiągnęło maksimum w ciągu 6 tygodni po inokulacji, a następnie obniżyło się przed zbiorem (Miller i Young 1985, Berthiller i in. 2007).



Rys. 6. Wzór chemiczny glukozydu 3-deoksyniwalenolu

Występowanie D3G w naturalnie i sztucznie zanieczyszczonej grzybami *Fusarium* pszenicy zostało po raz pierwszy opisane przez Berthillera i współpracowników w 2005 roku (Berthiller i in. 2005a). Stwierdzono występowanie D3G w słodzie jęczmiennym i piwie (Lancova i in. 2008), kukurydzy (Tran i in. 2012) oraz mące (Vendl i in. 2010). Szacuje się, że stężenie pochodnych DON (D3G, 3- i 15-ADON) w próbkach zbożowych może stanowić nawet do kilkudziesięciu procent zawartości DON (Berthiller i in. 2013). Z tego względu Wspólny Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (JECFA) uznał te związki za dodatkowe czynniki przyczyniające się do narażenia na DON i zalecił dalsze badania nad współwystępowaniem DON i jego pochodnych (JECFA 2011). Podobnie jak DON, również ZEN jest metabolizowany przez rośliny do glukozydu (Z4G) i pochodnych (m.in. ZEL). Wykazano, że grzyby częściowo przekształcają ZEN do siarczanu 4-zearalenonu (Z4S). Do tej pory jedynie w kilku badaniach stwierdzono obecność tych metabolitów w roślinach uprawnych. Analiza kilkudziesięciu próbek surowców i produktów zbożowych nie ujawniła obecności Z4G, ZEL oraz ich połączeń z glukozydami, natomiast w kilku próbkach wykryto Z4S (Vendl i in. 2010; Berthiller i in. 2013). Według opinii naukowej EFSA o zagrożeniu zdrowia publicznego, związanym z obecnością ZEN, dane dotyczące występowania jego pochodnych (ZEL, ZAL) w żywności i paszach są ograniczone (EFSA 2011b). Ze względu na różnice w aktywności estrogennej (α -ZEL, α -ZAL > ZEN > β -ZEL), ważnym jest monitorowanie obecności tych substancji (szczególnie α -ZEL i α -ZAL) wraz z ZEN. Wyniki najnowszych badań pokazują, że możliwe jest uwolnienie macierzystych mikotoksyn (DON, ZEN) z ich sprzężonych form, w wyniku działania mikroflory ludzkiej okrężnicy. Fakt ten podkreśla znaczenie włączenia zamaskowanych mikotoksyn do badań oceny ryzyka i ponowne rozpatrzenie najwyższych dopuszczalnych stężeń mikotoksyn *Fusarium* (Dall'Erta i in. 2013). Dane dotyczące toksyczności zamaskowanych mikotoksyn są ograniczone. Prawdopodobnie sprzężone formy mikotoksyn wykazują mniejszą toksyczność w porównaniu ze związkami macierzystymi, ponieważ reakcje sprzęgania są uznane za proces detoksykacji. Oznaczanie zamaskowanych mikotoksyn jest utrudnione z powodu braku wzorców analitycznych tych substancji. Tylko jeden związek – D3G – jest obecnie dostępny w handlu. Zamaskowane mikotoksyny mogą być izolowane z zaszczepionych roślin, jednakże stabilność tak pozyskanych związków w roztworze jest niska (Berthiller i in. 2013). Zagadnienie sprzężonych mikotoksyn jest ważne również dla hodowców roślin, zainteresowanych odmianami odpornymi na *Fusarium*. Występowanie D3G w wysokich stężeniach w pszenicy jest skorelowane z ogólną odpornością na *Fusarium*. W celu skutecznej

oceny wysiłków hodowlanych, niezbędne jest opracowanie procedur analitycznych, pozwalających na oznaczanie sprzężonych mikotoksyn (Berthiller i in. 2009).

3. Procedury stosowane do izolowania, wykrywania i oznaczania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Oznaczanie mikotoksyn w żywności i paszach jest procesem wieloetapowym, składającym się z pobrania i przygotowania próbki, ekstrakcji i oczyszczania ekstraktu oraz określenia stężenia analitu przy wykorzystaniu odpowiedniej techniki analitycznej.

Pobieranie próbek jest etapem o szczególnym znaczeniu dla każdego procesu analitycznego. Próbka musi zostać pobrana w taki sposób, by była reprezentatywna dla całego obiektu, a cecha ta jest warunkiem koniecznym uzyskania wiarygodnej informacji analitycznej (Namieśnik i in. 1995). Niejednorodne, „ogniskowe” rozmieszczenie mikotoksyn w materiale roślinnym sprawia, że pobranie próbki reprezentatywnej dla całej partii jest niełatwym zadaniem. Opracowane zostały różne procedury dla tego etapu (Whitaker 2003, Whitaker 2006, Hallier i in. 2011), a metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych regulowane są przepisami unijnymi (Dyrektywa Komisji 2005, Rozporządzenie Komisji (WE) 2006b).

Laboratoria urzędowej kontroli żywności mogą stosować dowolną metodę oznaczania mikotoksyn, pod warunkiem że spełnia ona określone kryteria skuteczności (Tabela 7).

3.1. Ekstrakcja analitów z próbek żywności

Najczęściej wykorzystywaną techniką izolacji mikotoksyn ze stałych próbek spożywczych jest ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (SE). Proces ten realizowany jest na drodze wytrząsania lub homogenizacji, a stosowanymi rozpuszczalnikami organicznymi są acetonitryl (ACN), metanol (MeOH), octan etylu (AcOEt) i ich mieszaniny, w tym z wodą, w różnych proporcjach (Langseth i Rundberget 1998, Radova i in. 1998, Mateo i in. 2001, Krska i in. 2001, Krska i in. 2007). Wybór medium ekstrahującego uzależniony jest m.in. od kierunku analizy (oznaczenie pojedynczej mikotoksyny, związków należących do jednej lub kilku grup, tzw. multimetoda). Mateo i in. (2001) zastosowali 5 mieszanin ekstrakcyjnych: ACN:H₂O (84:16, v/v), ACN:H₂O (75:25, v/v), MeOH:H₂O (50:50, v/v), MeOH:H₂O (70:30, v/v) oraz AcOEt:ACN:H₂O (77:19:4, v/v/v) do izolacji trichotecenów typu B z próbek pszenicy, ryżu i kukurydzy. Wyniki badań potwierdziły najwyższą skuteczność mieszaniny acetonitrylu i wody w stosunku 84:16 (v/v), powszechnie używanego rozpuszczalnika

ekstrakcyjnego (Radova i in. 1998, Schothorst i Jekel 2001, Razzazi-Fazeli i in. 2002, Berthiller i in. 2005b, Klötzel i in. 2005, Milanez i in. 2006, Stecher i in. 2007).

Tabela 7. Kryteria skuteczności procedur analitycznych dla mikotoksyn fuzaryjnych (Rozporządzenie Komisji (WE) 2006b)

Poziom [µg/kg]	RSD _r [%]	RSD _R [%]	Odzysk [%]
Deoksyniwalenol			
<100 - ≤500	≤ 20	≤ 40	60-110
>500	≤ 20	≤ 40	70-120
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
Zearalenon			
≤50	≤ 40	≤ 50	60-120
>50	≤ 25	≤ 40	70-120

RSD_r – względne odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników otrzymanych w warunkach powtarzalności; RSD_R – względne odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników otrzymanych w warunkach odtwarzalności

Wykorzystanie tych rozpuszczalników w innych proporcjach i kombinacjach zostało również opisane (Schollenberger i in. 1998, Tanaka i in. 2000, Dall’Asta i in. 2004a, Cavaliere i in. 2005, Klötzel i in. 2006). Ustalono, że ekstrakty metanole zawierają więcej substancji przeszkadzających (Langseth i Rundberget 1998, Mateo i in. 2001). Zastosowanie mieszaniny AcOEt:ACN:H₂O okazało się być nieefektywne dla ekstrakcji DON (Mateo i in 2001). Masa próbki analitycznej w oficjalnych metodach oznaczania mikotoksyn wynosi 10-50g. W ostatnich latach opracowano wiele procedur, w których wielkość ta została obniżona, nawet poniżej 1 grama. W większości procedur na 1g próbki przypada 4-5ml ekstrahenta, choć w przypadku materiałów o dużej objętości (np. kiszonki, słoma) wymagane są większe ilości roztworu. W procesie przygotowania próbki nie bez znaczenia jest odpowiednie przygotowanie szkła laboratoryjnego – ze względu na możliwą adsorpcję analitów na jego powierzchni (np. poprzez działanie wysokiej temperatury). Innym rozwiązaniem jest

używanie naczyń wykonanych ze szkła poddanego silanizacji (Langseth i Rundberget 1998) lub z innego materiału (Mateo i in. 2001).

Doniesienia na temat stosowania alternatywnych technik ekstrakcji do izolacji mikotoksyn fuzaryjnych są nieliczne. Technika ekstrakcji za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym (SFE) została wykorzystana do ekstrakcji DON z próbek pszenicy (Järvenpää i in. 1997, Krska 1998) oraz ZEN i jego pochodnych z próbek mąki kukurydzianej (Zougagh i Rios 2008). Warunkiem uzyskania odpowiednio wysokiej wydajności procesu było zastosowanie metanolu (3-9%) jako modyfikatora medium ekstrahującego (CO₂). Pallaroni i von Holst (2003) porównali alternatywne techniki ekstrakcji (MAE – ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym, ASE/PLE – przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika, UAE – ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami) z technikami klasycznymi (wytrząsanie i homogenizacja z rozpuszczalnikiem) do izolacji ZEN z próbek kukurydzy. Wydajności procesów były porównywalne, chociaż nieco wyższe w przypadku technik MAE i ASE. Autorzy zbadali również użyteczność różnych kombinacji rozpuszczalników w technice ASE, proponując wykorzystanie mieszanin rozpuszczalników organicznych z wodą (do 50%), jako rozwiązanie wystarczająco skuteczne, a mniej szkodliwe dla środowiska (Pallaroni i von Holst 2004). Technika ASE znalazła zastosowanie do jednoczesnej izolacji DON, ZEN i fumonizyny B₁ z próbek kukurydzy. Uzyskane ekstrakty wymagały jednak oczyszczenia z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE) przed etapem oznaczenia końcowego (Royer i in. 2004). Urraca i współpracownicy opracowali metodykę oznaczania ZEN i ZEL w próbkach pszenicy i paszy z wykorzystaniem techniki ASE (Urraca i in. 2004). Wykazano porównywalną skuteczność homogenizacji z rozpuszczalnikiem próbek pszenicy i kukurydzy z techniką UAE, zastosowanych do ekstrakcji ośmiu mikotoksyn (Capriotti i in. 2010a). Względnie wysokie koszty aparatury sprawiły, że techniki SFE i ASE nie znalazły zastosowania do rutynowego oznaczania mikotoksyn (Kralj Cigić i Prosen 2009, Lattanzio i in. 2009).

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o zastosowaniu w analityce mikotoksyn ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD) (Capriotti i in. 2010b). Opracowana i opatentowana blisko ćwierć wieku temu technika (Barker 2000a, 2000b) służy do ekstrakcji analitów z próbek stałych i półstałych, o wysokiej lepkości. Próbka mieszana jest w naczyniu szklanym z sorbentem (np. C18), który powoduje fizyczne zmiany jej struktury i adsorbuje składniki jej matrycy. Całość przenoszona jest do kolumnienki (szklana, PP), wyposażonej w filtr papierowy, a po ściśnięciu za pomocą tłoczka wprowadzany jest odpowiedni eluent (Kot-Wasik 2008). Powstanie jednorodnej mieszaniny

próbki i adsorbentu ułatwia dostęp cząsteczkom rozpuszczalnika do izolowanych analitów (Majors 2010). Technika MSPD została wykorzystana do ekstrakcji trichotecenów z próbek mąki kukurydzianej (Gentili i in. 2007), NIV, DON, DAS, T-2, HT-2, ZEN z próbek mąki wieloziarnistej (Rubert i in. 2011) oraz trichotecenów, ZEN i ZEL z próbek sproszkowanej żywności dla dzieci (Rubert i in. 2012a).

3.2. Techniki oczyszczania ekstraktów i wzbogacania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Próbki żywności i pasz charakteryzują się złożonym składem matrycy. Fakt ten sprawia, że podczas procesu ekstrakcji wraz z analitami izolowane są substancje przeszkadzające (np. tłuszcze, cukry, białka, barwniki), których obecność w ekstrakcie może zakłócać etap oznaczenia końcowego. Wymagany stopień oczyszczenia ekstraktu zależy, m.in. od stężenia toksyny, stosowanej metody oznaczania i sposobu detekcji oraz od składu matrycy (Langseth i Rundberget 1998). Etap oczyszczania ekstraktu pozwala na wzbogacenie analitu, co jest szczególnie ważne w oznaczaniu mikotoksyn występujących w próbkach na poziomie śladowym.

Najczęściej stosowaną techniką oczyszczania ekstraktów próbek żywności w analityce mikotoksyn jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE), polegająca na przeniesieniu analitów z próbki ciekłej (ekstrakt) do fazy stałej (sorbent) – w oparciu o zjawisko podziału (Namieśnik i in. 2000). Mikotoksyny eluowane są ze złoża sorbentu za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika. Technika SPE posiada wiele zalet – szczególnie w porównaniu z techniką ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE), m.in. mniejsze zużycie rozpuszczalników organicznych, większa zdolność rozdzielania analitów od zanieczyszczeń, wyeliminowanie problemu tworzenia emulsji, łatwość zbierania frakcji zawierającej anality, możliwość automatyzacji. Główną wadą tej techniki jest możliwość nieodwracalnej adsorpcji wybranych analitów na złożu sorbentu, niekiedy niska powtarzalność – związana głównie z różnicami w upakowaniu poszczególnych partii sorbentu (Majors 2010). Wybór odpowiedniej fazy stałej pozwala na wykorzystanie SPE do adsorpcji analitów na złożu lub do zatrzymania zanieczyszczeń. Spektrum wykorzystywanych sorbentów SPE w analityce mikotoksyn jest bardzo szerokie, np. węgiel aktywny, tlenek glinu, celit, modyfikowany żel krzemionkowy, Florisil (krzemian magnezu), żywice jonowymienne, inne polimery np. GMA-DVB (poli(glicydyloetakrylan-diwinylbenzen)). Powszechnie stosowane są tzw. kolumnienki wielofunkcyjne dedykowane oczyszczaniu ekstraktów zawierających mikotoksyny (np. MycoSep[®], MultiSep[®] firmy Romer Labs, BondElut Mycotoxin[®] firmy Agilent), wypełnione różnymi sorbentami.

Porównanie dwustopniowej SPE z wykorzystaniem kolumniek wypełnionych Florisilem i żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami C18 z kolumnkami MycoSep 225 (węgiel aktywny, żywica jonowymienna i celit) w przygotowaniu próbek pszenicy do oznaczania wybranych trichotecenów, pozwoliło na stwierdzenie, że oczyszczenie ekstraktu z substancji przeszkadzających było efektywne w przypadku dwuetapowej SPE, jednakże wielkości odzysku dla bardziej polarnych związków (NIV, DON, FUS X) były niskie (20-38%). W przypadku zastosowania kolumniek wielofunkcyjnych wartości odzysku wyniosły 76-93% (Radova i in. 1998). W innych badaniach z wykorzystaniem kolumniek MycoSep 225 odzysk trichotecenów typu B z próbek pszenicy znalazł się w przedziale 66-103%. Najniższą wartość uzyskano dla NIV, co przypisano adsorpcji związku na polarnych fragmentach wypełnienia kolumnki (Krska 1998). Kolumnki SPE wypełnione Florisilem, żelem krzemionkowym oraz MycoSep 225 zostały wykorzystane również do oczyszczania ekstraktów próbek kukurydzy (oznaczanie trichotecenów B), jednakże wielkość odzysku dla obu rodzajów sorbentów była niezadowalająca (Florisil 41-79%, żel krzemionkowy 31-67%). Uznano, że użycie kolumniek MycoSep 225 (odzysk 73-90%) stanowi lepszą metodę, ze względu na wyższą efektywność procesu (Mateo i in. 2001). Dwustopniowa SPE z wykorzystaniem kolumniek wypełnionych Florisilem oraz żywicą kationowymienną okazała się efektywną metodą oczyszczenia ekstraktów próbek produktów zbożowych, takich jak chleb wieloziarnisty (Schollenberger i in. 1998). Różne sposoby oczyszczania ekstraktów próbek pszenicy: LLE, kolumnki MycoSep 227, kolumnki wypełnione modyfikowanym żelem krzemionkowym (C-8, C-18) oraz polimerami (Oasis HLB, GMB-DVB) zostały porównane przez Stechera i współpracowników, którzy oznaczali trichoteceny typu B i D. Ekstrakcję ciec-z ciec-z (AcOEt, eter dietylowy) uznano za nieefektywną, m.in. ze względu na niską powtarzalność uzyskanych wyników. Kolumnki wypełnione żelem krzemionkowym stanowiły akceptowalny sposób oczyszczenia dla związków makrocyclicznych – w przeciwieństwie do związków typu B, a zastosowanie sorbentów polimerowych okazało się najlepszą metodą oczyszczenia ekstraktów (odzysk >82%) (Stecher i in. 2007). Równie wysoki odzysk uzyskano izolując DON, ZEN, T-2 i HT-2 z próbek produktów zbożowych (mąka jęczmienna, pszenna i owsiana oraz chrupkie pieczywo pszenne i żytnie) przy użyciu kolumniek Oasis HLB (Lattanzio i in. 2008). Wykorzystanie kolumniek wypełnionych węglem grafityzowanym (GBC) do izolacji mikotoksyn z ekstraktów próbek kukurydzy (Cavaliere i in. 2007), pozwoliło na uzyskanie odzysków 80-111% (trichoteceny) oraz 92-102% (ZEN i pochodne). W celu otrzymania czystszych ekstraktów oraz zmniejszenia wpływu składników matrycy na sygnał pomiarowy wykorzystano frakcjonowanie składników

ekstraktu: trichoteceny eluowano metanolem, a ZEN i jego pochodne – mieszaniną MeOH:dichlorometan (80:20, v/v). Trichoteceny B i ZEN były izolowane z ekstraktów próbek kukurydzy również z wykorzystaniem kolumniek SPE wypełnionych mieszaniną żelu krzemionkowego, Florisilu i ziemi okrzemkowej (Jin i in. 2010). W odniesieniu do wybranych trichotecenów A obecnych w próbkach owsa opisane zostało użycie dwustopniowej ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem kolumniek MycoSep 227 oraz MycoSep 216 (odzysk od 77% (T-2) do 95% (MAS)) (Razzazi-Fazeli i in. 2002). Zastosowanie kolumniek MycoSep 227 do oczyszczania ekstraktów kukurydzy okazało się nieskuteczne w odniesieniu do ZEN, natomiast kolumnieki MycoSep 226, przeznaczone do oczyszczania ekstraktów zawierających ZEN i aflatoksyny, zostały wykorzystane do skutecznego usuwania zanieczyszczeń z próbek analizowanych na zawartość trichotecenów i ZEN (najniższa wielkość odzysku 50% – NIV) (Berthiller i in. 2005b). W oczyszczaniu ekstraktów próbek zbożowych zawierających trichoteceny i ZEN wykorzystywane są również kolumnieki Bond Elut Mycotoxin (Klötzel i in. 2006), opracowane specjalnie dla tych grup mikotoksyn fuzaryjnych.

Szczególną odmianą techniki SPE w analityce mikotoksyn są kolumnieki powinowactwa immunologicznego (IAC), których wypełnienie stanowią mono- i poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko danej mikotoksynie. Zaletą tego rozwiązania jest wysoka czystość uzyskiwanych eluatów – ze względu na specyficzność przeciwciał, wysoka powtarzalność i czułość oraz zmniejszone wykorzystanie rozpuszczalników organicznych (Stevenson 2000), wadą natomiast jest ich wysoka cena i ograniczone zastosowanie w jednoczesnym oznaczaniu kilku mikotoksyn, chociaż w ostatnich latach opracowano kolumnieki IAC zawierające mieszaninę przeciwciał, np. Myco6in1 firmy Vicam. Wykorzystanie IAC przeznaczonych do izolacji DON, ZEN oraz toksyn T-2 i HT-2 zostało szeroko opisane w literaturze (Cahill i in. 1999, Kruger i in. 1999, Fazekas i Tar 2001, Brenn-Struckhofova i in. 2007, Cambell i Armstrong 2007, Meister 2008, Neumann i in. 2009, Şenyuva i Gilbert 2010, Burek i in. 2011, Pascale i in. 2012).

Rozwój technik wykorzystujących polimery z odwzorowaniem cząsteczkowym (MIP) spowodował zainteresowanie nimi, m.in. jako potencjalną fazą stałą SPE (MISPE) do izolacji mikotoksyn (Pascale i in. 2008, Turiel i Martín-Esteban 2010). W porównaniu z innymi selektywnymi materiałami, np. immunosorbentami, MIP charakteryzują się bardzo dobrą trwałością termiczną i chemiczną, możliwością wielokrotnego wykorzystania, wysoką wytrzymałością mechaniczną oraz względnie niskimi kosztami wytworzenia (Mahony i in. 2005). Synteza MIP polega na polimeryzacji odpowiednich monomerów w obecności

szablonu (cząsteczka analitu), który jest usuwany po zakończeniu reakcji. Wytworzony początkowo trwały kompleks monomer-szablon ulega reakcji polimeryzacji w obecności odczynnika sieciującego, a powstały po usunięciu szablonu porowaty polimer posiada jego odwzorowanie (Qiao i in. 2006, Sellergren i Martín-Esteban 2010). W odniesieniu do mikotoksyn fuzaryjnych przeprowadzono syntezę MIP dla DON i ZEN (Weiss i in. 2003), a technika MISPE znalazła zastosowanie w izolacji i wzbogacaniu ZEN i jego pochodnych z ekstraktów próbek pszenicy, kukurydzy, jęczmienia, żyta, ryżu i paszy (Urraca i in. 2006a, Urraca i in. 2006b, Lucci i in. 2010) oraz tkanek endometrium ze zmianami nowotworowymi (Gadzała-Kopciuch i in. 2011). Technika MISPE została wykorzystana również do izolacji toksyny T-2 z ekstraktów próbek kukurydzy, jęczmienia i owsa (De Smet i in. 2010).

W ostatnich latach w analityce mikotoksyn można zaobserwować zainteresowanie kompleksowym podejściem w przygotowaniu próbek, tzw. metodą QuEChERS – łączącą technikę ekstrakcji i oczyszczania. Metodologia QuEChERS (Quick – szybka, Easy – łatwa, Cheap – tania, Effective – skuteczna, Rugged – elastyczna, Safe – bezpieczna) została opracowana w 2003 roku dla procedury oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach o wysokiej zawartości wody (owoce, warzywa) (Anastassiades i in. 2003). Technika ta charakteryzuje się zmniejszonym wykorzystaniem odczynników (w tym toksycznych rozpuszczalników), prostotą wykonania i wysokimi odzyskami analitów, a procedura składa się z dwóch głównych etapów: ekstrakcji analitów za pomocą hydrofilowego rozpuszczalnika, mieszającego się z wodą (ACN, aceton) oraz dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (d-SPE). Dodatek soli (NaCl, MgSO₄) wspomaga ekstrakcję analitów do fazy organicznej. Etap d-SPE jest realizowany z wykorzystaniem popularnych sorbentów (np. C18, PSA), a po odwirowaniu próbki roztwór nad osadem jest poddawany oznaczeniu końcowemu (Majors 2010). Dotychczas zastosowano zmodyfikowaną technikę QuEChERS, m.in. w procedurach oznaczania DON, T-2, HT-2 i ZEN w próbkach mąki oraz płatków zbożowych (Trebstein i in. 2009), DON, NIV, DAS, T-2 i HT-2 w próbkach mąki pszennej (Sospedra i in. 2010), ZEN w próbkach jęczmienia i żywności funkcjonalnej (Wu i in. 2011), trichotecenów i ZEN w próbkach jęczmienia (Rubert i in. 2012b).

3.3. Identyfikacja i oznaczanie analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Wybór właściwej techniki służącej wykrywaniu analitów i analizie ilościowej uzależniony jest, m.in. od ich właściwości, złożoności składu matrycy, wymaganych granic wykrywalności i oznaczalności. Obecnie w analityce mikotoksyn największą rolę odgrywają

Tabela 8. Zalety i wady technik analitycznych wykorzystywanych do wykrywania i oznaczania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Technika	Zalety	Wady
GC	<ul style="list-style-type: none"> • jednoczesne oznaczanie kilku mikotoksyn • wysoka czułość • możliwość automatyzacji (automatyczny podajnik próbek) • dodatkowe punkty identyfikacyjne (MS) 	<ul style="list-style-type: none"> • konieczność przeprowadzania analitów w lotne pochodne • zakłócenia ze strony składników matrycy • nieliniowość krzywych wzorcowych • dryf linii podstawowej • „efekt pamięci” poprzednich próbek (carry-over) • niekiedy niska powtarzalność i odtwarzalność • wysoki koszt aparatury, wykwalifikowany personel
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • dobra czułość, selektywność i powtarzalność • możliwość automatyzacji (automatyczny podajnik próbek) • krótkie czasy analizy • dostępność metod wzorcowych 	<ul style="list-style-type: none"> • niekiedy istnieje konieczność przeprowadzania analitów w pochodne • wysoki koszt aparatury, wykwalifikowany personel
LC-MS (LC-MS/MS)	<ul style="list-style-type: none"> • wysoka czułość (LC-MS/MS) • jednoczesne oznaczanie kilku mikotoksyn • dodatkowe punkty identyfikacyjne • nie ma konieczność przeprowadzania analitów w pochodne • możliwość uproszczenia procedury przygotowania próbki 	<ul style="list-style-type: none"> • czułość zależna od techniki jonizacji • bardzo wysoki koszt aparatury, wykwalifikowany personel • wpływ składników matrycy na sygnał pomiarowy
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • łatwość przygotowania próbki • niskie koszty aparatury • jednoczesna analiza kilku próbek • odpowiednia jako metoda przesiewowa • ograniczone stosowanie rozpuszczalników organicznych • możliwa ocena wizualna 	<ul style="list-style-type: none"> • reakcje krzyżowe z mikotoksynami o podobnej budowie cząsteczek • czasochłonny etap inkubacji (reakcja enzymatyczna) • zakłócenia ze strony składników matrycy • możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich/ujemnych • wymaga potwierdzenia technikami chromatograficznymi (LC) • półilościowa
SZYBKIE TESTY	<ul style="list-style-type: none"> • prostota i krótki czas analizy • niskie koszty wyposażenia • ograniczone stosowanie rozpuszczalników • odpowiednie jako metody przesiewowe • możliwość użycia <i>in situ</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • analiza jakościowa lub półilościowa • możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich/ujemnych • reakcje krzyżowe z mikotoksynami o podobnej budowie cząsteczek • zakłócenia ze strony składników matrycy • niska czułość, bliska NDP

techniki chromatograficzne (chromatografia gazowa i cieczowa), których rozwój w ostatnim czasie związany jest głównie z wykorzystaniem zaawansowanych detektorów, jakimi są spektrometry mas. Ze względu na powszechność stosowania (np. w przemyśle) duże znaczenie mają również techniki immunochemiczne (głównie ELISA) oraz tzw. szybkie testy. W Tabeli 8 przedstawiona została krótka charakterystyka najważniejszych technik służących wykrywaniu i oznaczaniu mikotoksyn (Pascale i Visconti 2008, Lattanzio i in. 2009, Pascale 2009).

3.3.1. Chromatografia gazowa

Według raportu Kocha z 2004 roku najczęściej wykorzystywaną techniką oznaczania trichotecenów była chromatografia gazowa (GC). Trichoteceny obu typów nie wykazują fluorescencji, a dodatkowo związki grupy A nie absorbują promieniowania z zakresu UV-Vis. Mikotoksyny są związkami nielotnymi, dlatego prowadzenie oznaczeń z wykorzystaniem GC wymaga przeprowadzenia ich w odpowiednie pochodne. Stosowane są głównie dwa sposoby blokowania grup OH: tworzenie eterów trimetylosililowych (TMS) oraz synteza estrów kwasów trifluorooctowego (TFA), pentafluoropropionowego (PFP) i heptafluoromasłowego (HFB). Wybór sposobu przeprowadzenia w pochodne i odczynnika zależy od grupy związków i metody detekcji. Obecność grupy karbonylowej (pozycja C-8) w budowie cząsteczek trichotecenów B czyni je czułymi na detekcję ECD, natomiast dla związków grupy A wzrost czułości uzyskuje się przez zastosowanie acylowania (Langseth i Rundberget 1998, Kraska i in. 2001, Koch 2004). Sililowanie prowadzi do bardziej selektywnej konwersji chemicznej związków grupy B oraz do mniejszej interferencji tła niż acylowanie. Trichoteceny grupy A łatwo reagują z BSA (N,O-bis-trimetylosililotrifluoroacetamid), jednakże dla związków grupy B często obserwuje się dwa piki na chromatogramie – w związku z niecałkowitym przebiegiem procesu. Zjawisko to przypisuje się trudności zajścia reakcji z grupą –OH w pozycji C-7, która tworzy wiązania wodorowe z tlenem grupy karbonylowej (C-8). W celu przeciwdziałania temu zjawisku stosuje się mieszaniny odczynników, np. TMSI (trimetylosililoimidazol) + TMCS (trimetylochlorosilan), TMSI+BSA(N,O-bis(trimetylosililo)acetamid)+TMCS (Langseth i Rundberget 1998, Kraska i in. 2001). Użycie kombinacji TMSI i TMCS (w stosunku 100:1) prowadzi do zadowalającej wydajności procesu konwersji chemicznej DON, NIV, 3- i 15-ADON oznaczanych techniką GC-ECD. Jednakże, gdy celem analizy jest oznaczenie jedynie DON i NIV, większą intensywność sygnału obserwuje się dla układu TMSI+BSA+TMCS (3:3:2) (Tri-Sil TBT,

Sylon BTZ). W reakcji syntezy perfluorowanych estrów (trichotecenów obu typów) stosowane są zazwyczaj bezwodniki kwasowe lub imidazole oraz katalizatory, np. DMAP (4-dimetyloaminopirydyna), pirydyna, NaHCO₃. Dla pochodnych HFB związków grupy B szybkość reakcji jest większa w przypadku bezwodnika niż imidazolu. Porównano użycie bezwodników: TFA i HFB w oznaczaniu związków grupy B metodą GC-ECD. Intensywność sygnałów pochodnych HFB była większa, jednakże nie obserwowano piku 15-ADON (Mateo i in. 2001). Ze względu na stereochemię trichotecenów HFBA nie reaguje z grupą –OH w pozycji C-3 – estryfikacji ulegają grupy przy atomach węgla 7 i 15. W 15-ADON grupa octanowa (C-15) stanowi zawadę steryczną dla reakcji w pozycji C-3. Bezwodnik kwasu trifluorooctowego jest często wybieranym reagentem do konwersji chemicznej trichotecenów, a jego nadmiar jest łatwy do usunięcia poprzez odparowanie (Radova i in. 1998, Schollenberger i in. 1998, Mateo i in. 2001, Milanez i in. 2006). Wybór tego odczynnika może być podyktowany sposobem detekcji, np. ograniczonym zakresem mas w GC-MS (Tanaka i in. 2000).

Tabela 9. Metodyki oznaczania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych z wykorzystaniem techniki GC

Analit	Matryca	Ekstrakcja i oczyszczanie ekstraktów	Konwersja chemiczna	Sposób detekcji	LOD [ng/g] / LOQ [ng/g] / Odzysk [%]	Literatura
NIV, DON, FUS X, 15-ADON, 3-ADON	pszenica	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE MycoSep 225	Tri-Sil TBT	ECD	6,6-8,2/ 23,4-28,7/ 53-116	Weingärtner i in. (1997)
NIV, DON, FUS X, 15-ADON, 3-ADON, DAS, HT-2, T-2	pszenica, ryż, chleb	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 75:25 Oczyszczanie: SPE Florisil + żywica kationowymienna	TFAA	MS	2-12/ 6-38/ 74-120 (pszenica) 71-101 (ryż) 95-116 (chleb)	Schollenberger i in. (1998)
NIV, DON, 3ADON, FUS X, T-2, DAS, NEO, ZEN	pszenica, kukurydza	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 75:25 Oczyszczanie: SPE Florisil	TMS	MS	5-10/ bd/ 83-94 (pszenica) 81-93 (kukurydza)	Tanaka i in. (2000)
NIV, DON, FUS X, 3-ADON, DAS, HT-2, T-2, NEO	pszenica	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE MycoSep 227 + MycoSep 216	Tri-Sil TBT	FID	25/ 75/ 79-116	Schothorst i Jekel (2001)

LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; bd – brak danych

Tabela 9. c.d.

Analityt	Matryca	Ekstrakcja i oczyszczanie ekstraktów	Konwersja chemiczna	Sposób detekcji	LOD [ng/g] / LOQ [ng/g] / Odzysk [%]	Literatura
NIV, DON, 15-ADON, 3-ADON	pszenica	Ekstrakcja: wyrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie (SPE): 1. MycoSep 225 2. Florisil 3. Al ₂ O ₃ -C _{akt} -Celit 545 (5:7:3) 4. Al ₂ O ₃ - C _{akt} (100:15) 5. Al ₂ O ₃ - C _{akt} -C18 (75:3:40) 6. Al ₂ O ₃ - C _{akt} - SiO ₂ ·nH ₂ O (90:1.5:5)	PFPA, HFBA	ECD	4-39/ bd/ 1. 73-90 2. 55-71 3. 22-47 4. 104-132 5. 61-103 6. 68-106	Valle-Algarra i in. (2005)
DON, NIV, DAS, T-2, H-2	produkty kukurydzy	Ekstrakcja: wyrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE MycoSep 227	TFAA	MS	20-120/ 60-550/ 52-155	Milanez i in. (2006)
ZEN, α/β-ZOL, α/β-ZAL, ZAN	mocz	Ekstrakcja: LLE z METB Oczyszczanie: SPE C18	HFAA	MS	(ng/ml) 0,06-0,35/ 0,11-0,60/ 38-87	Blokland i in. (2006)
DON, NIV	produkty kukurydzy	Ekstrakcja: wyrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE MycoSep 227	Tri-Sil TBT	ECD	9,6-14,4/ 15,9-25,4/ 71-113	Castillo i in. (2008)
T-2, HT-2	pszenica, żyto	Ekstrakcja: homogenizacja MeOH:H ₂ O 90:10 Oczyszczanie: IAC T-2test	PFPA	ECD	1,7-2,3/ 5,4-6,6/ 71-76 (pszenica) 112-116 (żyto)	Majerus i in. (2008)
ZEN, α/β-ZOL, α/β-ZAL, ZAN	osady	Ekstrakcja: PLE MeOH:ACN 1:1 Oczyszczanie: SPE Supelclean Envi-18	BSTFA	MS	0,01-0,17/ 0,02-0,53/ bd	Kinani i in. (2008)
DON, FUS X, 15-ADON, NIV, ZEN	kukurydza	Ekstrakcja: QuEChERS Oczyszczanie: d-SPE MgSO ₄ , C18	Tri-Sil TBT	MS	16-65/ 48-196/ 61-118	Ferreira i in. (2012)

LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; bd – brak danych

Technika GC-MS znalazła zastosowanie również w oznaczaniu ZEN i jego metabolitów w próbkach moczu, osadów (Blokland i in. 2006, Kinani i in. 2008), a także w metodyce jednoczesnego oznaczania ZEN i trichotecenów w próbkach zbóż (Ryu i in. 1996, Tanaka i in. 2000). Ze względu na naturalną fluorescencję ZEN, znacznie częściej wybieraną techniką oznaczenia końcowego jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Informacje

literaturowe o stosowanych metodykach oznaczania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych z wykorzystaniem techniki GC zestawiono w Tabeli 9.

3.3.2. Chromatografia cieczowa

Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z klasycznymi sposobami detekcji znajduje zastosowanie w analityce mikotoksyn od wielu lat (Tabela 10). Opracowane zostały procedury analityczne oznaczania wybranych związków w próbkach spożywczych o różnym składzie matrycy. Połączenie HPLC z detektorem UV stało się popularną techniką oznaczenia końcowego DON w próbkach pasz i żywności, których ekstrakty zostały oczyszczone z wykorzystaniem techniki IAC, uzyskując status norm europejskich, odpowiednio EN 15791:2009 i EN 15891:2010 (CEN 2009a; CEN 2010a). Często jednak pomimo specyficznego oczyszczenia piki substancji przeszkadzających są obserwowane na chromatogramach (Klötzel i in. 2005). Wykorzystanie techniki HPLC w połączeniu z detektorem fluorescencyjnym w oznaczaniu toksyn T-2 i HT-2 związane jest z koniecznością przeprowadzania ich we fluoryzujące pochodne, przed wprowadzeniem do kolumny chromatograficznej. Wśród odczynników stosowanych do tego celu znalazły się, m.in. chlorek kwasu kumaryno-3-karboksyłowego (C3CCI), 1-antracenonitryl (1-AN), chlorki 1 i 2-naftoilu (1-NC, 2-NC), karbonylocyjanek 1-pirenylu (PCC). Podczas badań na opracowaniu metodyki oznaczania toksyn T-2 i HT-2 w postaci pochodnych z 1-AN techniką HPLC-FLD stwierdzono, że dodatek NaCl na etapie ekstrakcji analitów z próbek zbożowych, przed oczyszczaniem ekstraktów techniką IAC, skutkuje zmniejszeniem ilości substancji przeszkadzających w obrazach chromatograficznych. Metodyka ta nie znajduje jednak zastosowania w oznaczaniu toksyny HT-2 w próbkach owsa, ze względu na silny wpływ składników matrycy na sygnał analitu (Visconti i in. 2005, Trebstein i in. 2008). Stwierdzono, że przeprowadzenie toksyn T-2 i HT-2 w pochodne w reakcjach z PCC i 2-NC skutkuje większą intensywnością sygnałów analitów i selektywnością, w porównaniu z 1-NC i 1-AN (Lippolis i in. 2008).

Technika HPLC-FLD jest również powszechnie wykorzystywana w metodykach oznaczania ZEN w próbkach produktów zbożowych (Visconti i Pascal 1998, Krska i Josephs 2001, Radová i in. 2001) i pasz (De Saeger i in. 2003), w tym w procedurach CEN: EN 15792:2009 oraz EN 15850:2010 (CEN 2009b, CEN 2010b), a także służy oznaczaniu jego metabolitów w próbkach surowicy (Shin i in. 2009), moczu (Thieu i Pettersson 2009) i tkanek (Duca i in. 2009).

Tabela 10. Metodyki oznaczania mikotoksyn fuzaryjnych z wykorzystaniem techniki HPLC

Analit	Matryca	Ekstrakcja i oczyszczanie ekstraktów	Konwersja chemiczna	Sposób detekcji	LOD [ng/g] / LOQ [ng/g] / Odzysk [%]	Literatura
NIV, DON, FUS X, 3-ADON	ryż, kukurydza	Ekstrakcja: wytrząsanie MeOH:1%NaCl 55:45 Oczyszczanie: LLE chloroform	-	UV	2-5/ bd/ bd	Visconti i Bottalico (1983)
ZEN	kukurydza	Ekstrakcja: homogenizacja ACN:H ₂ O 90:10 Oczyszczanie: IAC ZearalaTest	-	FLD	3/ bd/ 93-100	Visconti i Pascale (1998)
ZEN	kukurydza	Ekstrakcja: homogenizacja ACN:H ₂ O 75:25 Oczyszczanie: IAC Easi-Extract	-	FLD	6/ bd/ 94	Schuhmacher i in. (1998)
DON	pszenica	Ekstrakcja: homogenizacja H ₂ O Oczyszczanie: IAC DONtest	-	UV	100/ bd/ 80-102	Cahill i in. (1999)
T-2, HT-2, NEO, DAS	ryż, kukurydza	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE Florisil	C3CCl i DMAP	FLD	10-15/ bd/ 65-69	Jiménez i in. (2000)
T-2	pszenica, kukurydza, jęczmień, owies, ryż	Ekstrakcja: wytrząsanie MeOH:H ₂ O 80:20 Oczyszczanie: IAC T2 TAG	1-AN, DMAP	FLD	5/ bd/ 88-99 (pszenica) 80-90 (kukurydza) 89-99 (jęczmień) 82-91 (owies) 84-96 (ryż)	Pascale i in. (2003)
ZEN, α-ZEL	pszenica, kukurydza, ryż, jęczmień, pasza, żyto	Ekstrakcja: ASE ACN:MeOH 50:50 Oczyszczanie: -	-	FLD	2-6/ bd/ 91-100 (pszenica) 96-102 (kukurydza) 97-104 (ryż) 94-102 (jęczmień) 95-99 (pasza) 97-102 (żyto)	Urraca i in. (2004)
NIV, DON, FUS X, 3,15-ADON, T-2, HT-2, DAS	pszenica	Ekstrakcja: homogenizacja ACN:H ₂ O 80:20 Oczyszczanie: SPE MycoSep 225	C3CCl i DMAP	FLD	0,2-1,0/ bd/ 89 (DON)	Dall'Asta i in. (2004a)

LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; bd – brak danych

Tabela 10. c.d.

Analit	Matryca	Ekstrakcja i oczyszczanie ekstraktów	Konwersja chemiczna	Sposób detekcji	LOD [ng/g] / LOQ [ng/g] / Odzysk [%]	Literatura
DON	kukurydza	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie (SPE): 1. C _{akt} -Al ₂ O ₃ -Celit - żywica kationowymienna (7:5:3:20) 2.Mycosep 225 3.IAC DONtest	-	DAD	60/ bd/ 1. 98 2. 93 3. 74	Abramović i in. (2005)
DON	pszenica	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 85:15 Oczyszczanie: SPE MultiSep 227	-	UV	50/ 100/ 87	Sugita- Konsihi i in. (2006)
HT-2, T-2	owies, kukurydza, żyto, pszenica, jęczmień	Ekstrakcja: wytrząsanie MeOH:H ₂ O 90:10 Oczyszczanie: IAC T2 TAG	1-AN, DMAP	FLD	0,6-0,7/ 0,9-1,1/ 72-92 (owies) 95-99 (kukurydza) 70-88 (żyto) 90-94 (pszenica) 90-99 (jęczmień)	Meister (2008)
DON	produkty pszenne	Ekstrakcja: wytrząsanie H ₂ O Oczyszczanie: IAC	-	UV	200/ 380/ 86-105	Klinglmayr i in. (2010)
DON	pszenica, kukurydza, ryż	Ekstrakcja: wytrząsanie MeOH:ACN:H ₂ O 1:4:5 Oczyszczanie: SPE Al ₂ O ₃ -C _{akt} - SiO ₂ ·nH ₂ O (1:1:1)	-	UV	40/ 87/ 87-90 (pszenica) 86-94 (ryż)	Gupta i in. (2011)
NIV, DON	pszenica, kukurydza	Ekstrakcja: wytrząsanie H ₂ O Oczyszczanie: Oasis HLB	acetylo- acetonian metylu, octan amonu	FLD	11-14/ 37-47/ 89-101 (pszenica)	Muscarella i in. (2012)
ZEN, α-ZEL	żywność, zioła	Ekstrakcja: wytrząsanie MeOH:H ₂ O 80:20 Oczyszczanie: IAC ZearalaTest	-	FLD	2,5-4/ 4,5-7,5/ 85-99	Kong i in. (2012)

LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; bd – brak danych

W oznaczaniu śladowych ilości zanieczyszczeń coraz większego znaczenia nabiera połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Rozwój i wykorzystanie sprzężonych technik analitycznych, takich jak LC-MS i LC-MS/MS stał się możliwy po

opracowaniu odpowiednich rozwiązań technicznych, pozwalających na wyeliminowanie problemu znacznej różnicy ciśnień panujących w obu układach.

Spektrometry mas są czułymi, uniwersalnymi, a jednocześnie selektywnymi detektorami, pozwalającymi na identyfikację substancji na podstawie stosunku jej masy do ładunku (m/z), a charakterystyczne reakcje fragmentacji mogą dostarczać informacji o jej budowie strukturalnej. Dwa sposoby jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (API): elektrorozpylanie (ESI) oraz jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) są najczęściej stosowane w technikach LC-MS i LC-MS/MS, wykorzystywanych w procedurach oznaczania mikotoksyn (Tabela 11).

Na jonizację cząsteczek analitu w źródle jonów wpływają jego właściwości (m.in. polarność, pK_a), a także czynniki związane z fazą ruchomą (m.in. lotność, napięcie powierzchniowe, polarność, pH) oraz ze spektrometrem mas (m.in. temperatura źródła jonów, ciśnienie gazu osłonowego i wspomagającego rozpylanie).

Tabela 11. Metodyki oznaczania mikotoksyn fuzaryjnych z wykorzystaniem technik LC-MS i LC-MS/MS

Analit	Matryca	Ekstrakcja i oczyszczanie ekstraktów	Sposób detekcji	LOD [ng/g]/ LOQ [ng/g]/ Odzysk [%]	Literatura
DON	pszenica	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE MultiSep DON IAC Vicam DON	APCI- MS/MS	DON: 5/10/bd	Kappenstein i in. (2002)
T-2, HT-2, DAS, MAS, NEO	owies	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE: MycoSep 227 MycoSep 216	APCI-MS	T-2: bd/50/77 HT-2: bd/85/90 DAS: bd/50/87 MAS: bd/60/95 NEO: bd/50/92	Razzazi- Fazeli i in. (2002)
DON, NIV, 3-ADON, FUS X	kukurydza	Ekstrakcja: homogenizacja ACN:H ₂ O 75:15 Oczyszczanie: SPE CarboGraph-4	ESI- MS/MS	DON: 1,5/bd/91-97 NIV: 4,5/bd/81-82 3-ADON: 1,8/bd/92-96 FUS X: 10/bd/94-98	Lagana i in. (2003)
DON, NIV	pszenica, kukurydza	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: -	ESI-MS ESI- MS/MS	< 2000 (MS)/bd/bd 50 (MS/MS)/bd/bd	Plattner i Maragos (2003)
DON, NIV, 3-ADON, 15-ADON, FUS X	kukurydza	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE MycoSep 227	APCI-MS	DON: bd/70/51-73 NIV: bd/50/70-88 3-ADON: bd/50/70-89 15-ADON: bd/150/99-106 FUS X: bd / 50 / 80-97	Razzazi- Fazeli i in. (2003)

LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; bd – brak danych

Tabela 11. c.d.

Analit	Matryca	Ekstrakcja i oczyszczanie ekstraktów	Sposób detekcji	LOD [ng/g]/ LOQ [ng/g]/ Odzysk [%]	Literatura
DON, D3G, NIV, 3-ADON, 15-ADON, FUS X, NEO, T-2, HT-2, MAS, DAS T-2 Triol, ZEN, α/β -ZEL (+ 91 innych analitów); metoda półilościowa	bułka tarta	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O: CH ₃ COOH 79:20:1 Oczyszczanie: -	ESI- MS/MS	DON: 20/bd/93 D3G: 15/bd/65 NIV: 50/bd/83 3-ADON: 20/bd/98 15-ADON: 50/bd/110 FUS X: 50/bd/104 NEO: 3/bd/104 T-2: 2/bd/106 HT-2: 20/bd/108 MAS: 2 /bd/104 DAS: 1/bd/110 T-2 Triol: 40/bd/bd ZEN: 0,4/bd/108 α/β -ZEL: 3-4/bd/99-110	Sulyok i in. (2007a); Sulyok i in. (2010)
DON, HT-2, T-2, ZEN (+ AFs, OTA, FUM)	płatki zbożowe, makaron pszenny, żywność dla dzieci	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:0,1% HCOOH 80:20 Oczyszczanie: -	ESI- MS/MS	DON: 25-45/80-150/73-92 HT-2: 2-5/6,5-15/84-103 T-2: 1/3,5/62-99 ZEN: 0,5-1/1,5-3,5/61-103	Beltran i in. (2009)
DON, HT-2, T-2, ZEN (+ AFs, OTA)	kukurydza	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O: CH ₃ COOH 80:19:1 Oczyszczanie: -	APCI- MS/MS	DON: 80/120/bd HT-2: 7/9/bd T-2: 5/11/bd ZEN: 5/6/bd	Capriotti i in. (2010a)
NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON, FUS X, ZEN (+OTA, OTB, MON)	kukurydza	Ekstrakcja: UAE ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE kolumnienki (SiO ₂ ·nH ₂ O -Florasil- ziemia okrzemkowa 1,6-0,45-0,45)	ESI- MS/MS	NIV: 0,25/0,74/93-96 DON: 0,16/0,48/99-103 3-ADON: 0,11/0,32/104-107 15-ADON: 0,15/0,44/98-100 FUS X: 0,59/ 1,78/101-105 ZEN: 0,48/1,44/78-79	Jin i in. (2010)
DON, T-2, HT-2, ZEN	pszenica, herbatniki	Ekstrakcja: wytrząsanie MeOH:H ₂ O 75:25 Oczyszczanie: IAC DZT MS-PREP	ESI- MS/MS	DON: 0,13/bd/78-82 T-2: 0,03-0,04/bd/91-103 HT-2: 0,08-0,17/bd/89-93 ZEN: 0,24-0,33/bd/88-109	Tanaka i in. (2010)
DON, ZEN, HT-2, T-2 (+AFs, OTA)	mąka jęczmienna, pszenna, owsiana, pieczywo pszenne, żytnie	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O 84:16 Oczyszczanie: SPE Oasis HLB	APCI- MS/MS	DON: 3,9-59/bd/89-108 ZEN: 2,2-5,8/bd/64-97 HT-2: 0,3-2,4/bd/90-112 T-2: 0,2-1,2/bd/84-114	Lattanzio i in. (2011)
ZEN, DON, T-2, HT-2 (+ AFs, OTA, FUM)	pszenica, owies, jęczmień, kukurydza, ryż	Ekstrakcja: wytrząsanie ACN:H ₂ O: CH ₃ COOH 79:20:1 Oczyszczanie: -	ESI- MS/MS	ZEN: 0,4-0,5/0,8-1/87-90 DON: 8-10/15-20/86-89 T-2: 4-5/8-10/96-97 HT-2: 4-5/8-10/95-98	Soleimany i in. (2012)

LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; bd – brak danych

W ESI faza ruchoma opuszczająca kolumnę chromatograficzną jest wprowadzana przez kapilarę do źródła jonów, w którym pod wpływem gazu rozpylającego i wysokiego napięcia (4-5 kV) tworzy się aerozol. Podczas odparowywania rozpuszczalnika obdarzone dużym ładunkiem krople kurczą się, co powoduje zwiększenie gęstości ładunku, a następnie ich rozerwanie. Powstałe mniejsze krople ulegają temu samemu procesowi do czasu, gdy gęstość ładunku jest wystarczająca do desorpcji jonów. W APCI próbka (faza ruchoma) jest rozpylana w wyniku działania ciepła i gazu rozpylającego. Po usunięciu rozpuszczalnika próbka jest przenoszona za pomocą strumienia azotu do obszaru wyładowań koronowych i ulega jonizacji (Cody 2002, Kostakis i in. 2013).

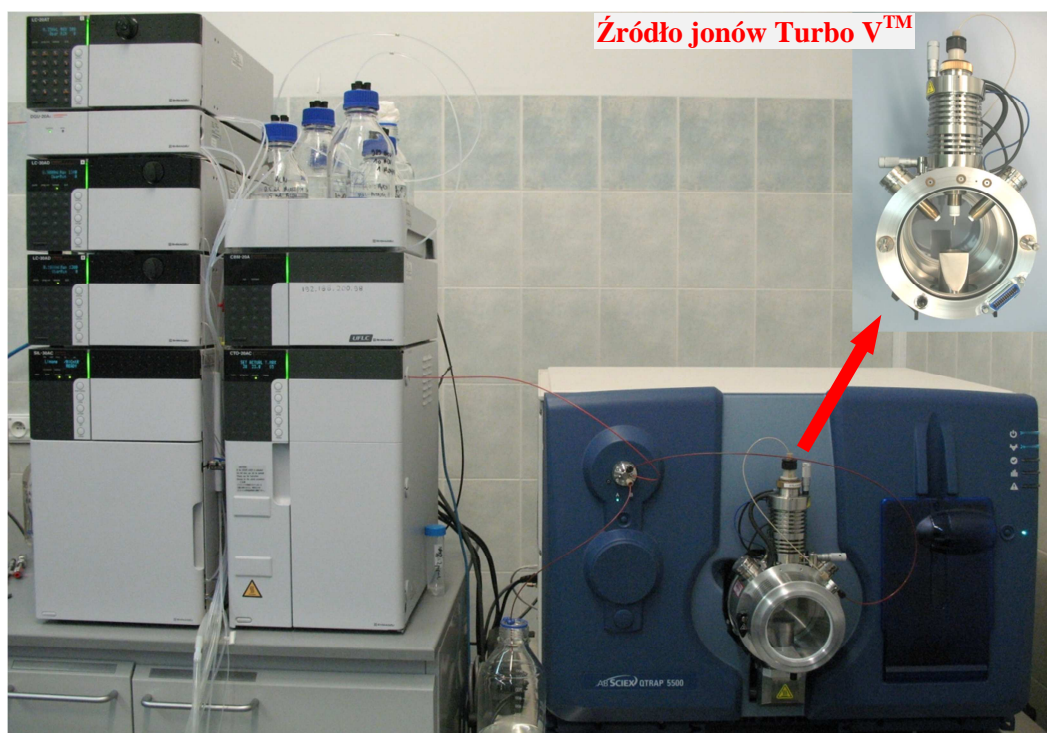
Tabela 12. Zalety i wady technik jonizacji w LC-MS i LC-MS/MS

Technika jonizacji	Zalety	Wady
ESI	<ul style="list-style-type: none"> • Jonizacja odbywa się bezpośrednio z roztworu, co pozwala na jej stosowanie wobec związków jonowych i termicznie nietrwałych • Przepływ fazy ruchomej w zakresie od $\mu\text{l}/\text{min}$ do powyżej $1\text{ ml}/\text{min}$ umożliwia stosowanie kolumn chromatograficznych tradycyjnych i typu microbore • Podczas procesu jonizacji, w przeciwieństwie do większości innych technik, wytwarzane są jony wielokrotnie naładowane, co zwiększa zakres roboczy spektrometru i pozwala na badanie cząsteczek o masie cząsteczkowej spoza jego normalnego zakresu. • Możliwość pracy w układzie faz odwróconych • Wysoka czułość 	<ul style="list-style-type: none"> • ESI nie znajduje zastosowania dla związków niepolarnych lub mało polarnych • Możliwość wystąpienia efektu tłumienia sygnału, który ma znaczenie dla analitów jednocześnie eluowanych z kolumny chromatograficznej • ESI jest „miękką” techniką jonizacji, co wiąże się ze słabą fragmentacją, a tym samym z trudnościami w określaniu struktury analitu.
APCI	<ul style="list-style-type: none"> • APCI jest najczęściej stosowana dla związków o małej i średniej polarności • Jako „twardsza” technika jonizacji dostarcza więcej informacji strukturalnych w porównaniu z ESI • Możliwość pracy przy przepływie fazy ruchomej do $2\text{ ml}/\text{min}$, pozwala na stosowanie tradycyjnych kolumn HPLC • Bardziej „tolerancyjna” wobec obecności buforów w fazie ruchomej oraz warunków chromatograficznych (rodzaje faz ruchomych, elucja gradientowa) w porównaniu z ESI • Możliwość pracy w układzie faz odwróconych • Wysoka czułość i liniowość odpowiedzi 	<ul style="list-style-type: none"> • Uzyskane widma zawierające jony analitów w postaci adduktów mogą być trudne do zinterpretowania • Nieodpowiednia dla związków o dużej masie cząsteczkowej i termicznie nietrwałych • Nieskuteczna przy niskich przepływach fazy ruchomej • Technika nieodpowiednia dla związków jonowych

Ze względu na różnice w procesach fizykochemicznych prowadzących do powstania jonów w ESI i APCI, wybór techniki podyktowany jest celem analizy (informacje strukturalne, wykrywanie i oznaczanie), budową oraz właściwościami chemicznymi i termicznymi analitu (Tabela 12) (Cody 2002, Ardrey 2003). W celu zwiększenia wydajności jonizacji do fazy

ruchomej dodawane są lotne związki, m.in. woda amoniakalna, kwasy: octowy i mrówkowy oraz ich sole amonowe. Jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym w trybie tworzenia jonów dodatnich prowadzi do powstania jonów o stosunku m/z odpowiadającym masie cząsteczkowej analitu powiększonej o masę protonu ($[M+H]^+$), a także połączeń z kationami: amonowym i metali alkalicznych. Jonizacja ujemna skutkuje powstaniem jonów pseudomolekularnych $[M-H]^-$ oraz połączeń z jonami octanowymi i mrówczanami. Addukty analitów z jonami metali alkalicznych nie są powszechne wykorzystywane w analityce ze względu na ich trwałość i tym samym niską zdolność do fragmentacji, jednakże Dall'Asta i in. (2004b) zaproponowali takie rozwiązanie w oznaczaniu trichotecenów w próbkach pszenicy.

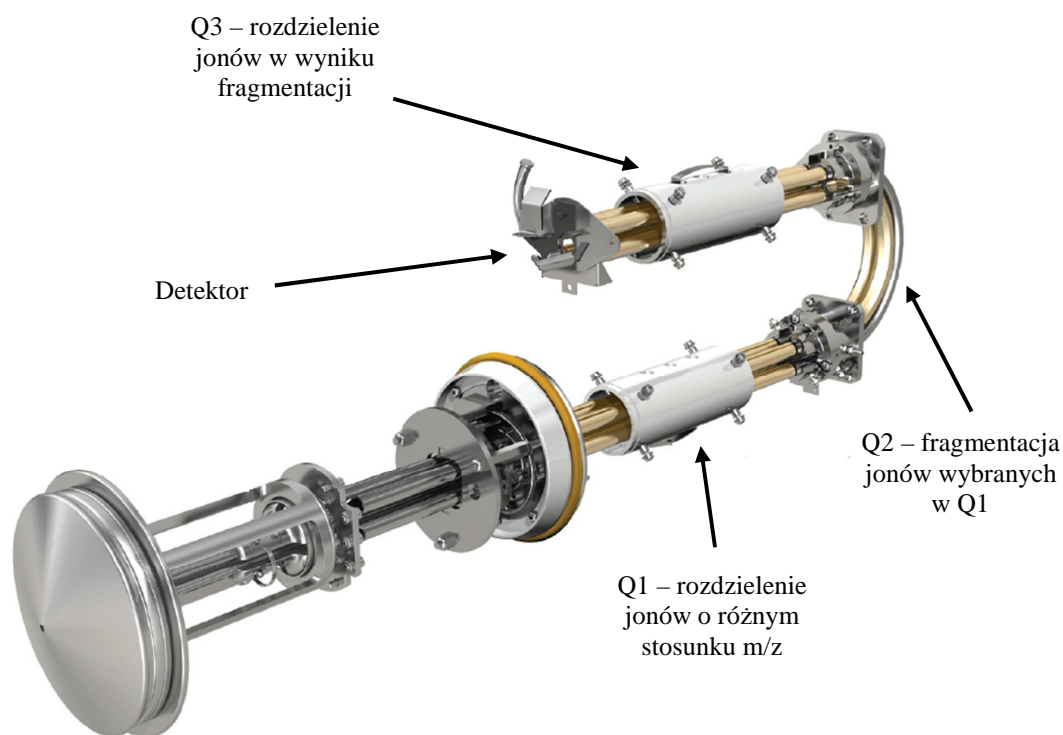
Jony wytworzone w źródle trafiają do analizatora mas, gdzie następuje ich rozdzielenie ze względu na stosunek m/z .



Rys. 7. Chromatograf cieczowy Shimadzu Nexera sprzężony z tandemowym spektrometrem mas LC-MS/MS System 5500 Q TRAP

Wśród kilku typów analizatorów mas w analityce mikotoksyn znalazły zastosowanie analizatory kwadrupolowe: pojedyncze (pracujące w trybie SIM – single ion monitoring) oraz potrójne (QqQ) stosowane w tandemowych spektrometrach mas MS/MS (Rys. 7.), jednakże wykorzystanie pułapek jonowych i analizatora czasu przelotu (TOF) zostało również opisane (Tanaka i in. 2006, Şenyuva i in. 2008, Monaci i in 2011, Liu i in. 2012, Suman i in 2013).

W tandemowej spektrometrii mas (Rys. 8.) jony pierwotne analitów wybrane w pierwszym analizatorze mas (pierwszy kwadrupol, Q1) są kierowane do strefy kolizji (drugi kwadrupol, Q2), gdzie ulegają fragmentacji (przy wykorzystaniu techniki CID – fragmentacji przez zderzenia), a powstałe jony wtórne trafiają do kolejnego analizatora mas (trzeci kwadrupol, Q3).



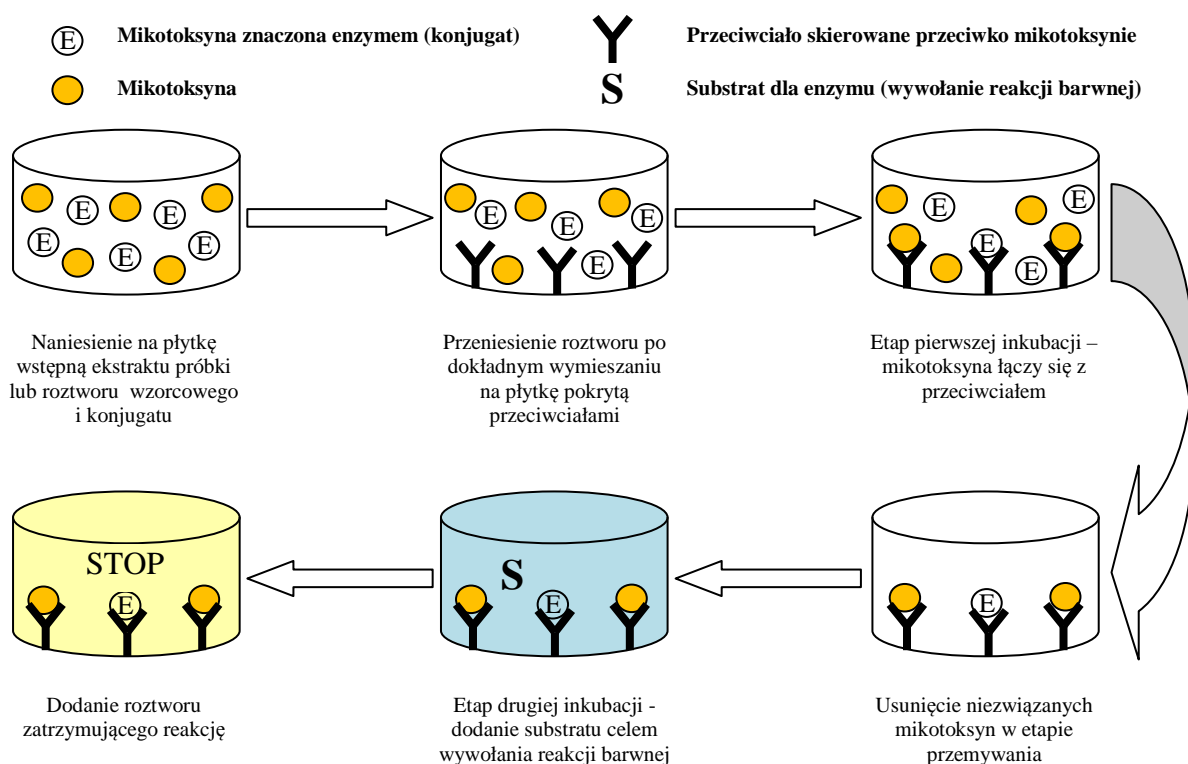
Rys. 8. Schemat działania tandemowego spektrometru mas 5500 QTRAP (AB Sciex, 2012)

Analiza ilościowa prowadzona z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas wymaga rozpoznania i określenia niekorzystnego wpływu składników matrycy na jonizację analitu – tzw. efektów matrycowych. Efekty matrycowe spowodowane są jednoczesnym wymywaniem z kolumny chromatograficznej składników matrycy, które mogą wpływać na wzmocnienie (enhancement) lub osłabienie (suppression, supresja) sygnału analitu, a tym samym na podniesienie granic wykrywalności i oznaczalności. Wpływ składników matrycy może występować we wszystkich sposobach jonizacji, jednak problem ten jest szczególnie zauważalny w technice ESI. Na wielkość tego zjawiska wpływa również budowa chemiczna związku – supresja jonów jest silniejsza w przypadku substancji bardziej polarnych (Annesley 2003, Taylor 2005). Wpływ składników matrycy na sygnał analitu może być badany poprzez monitorowanie intensywności sygnału analitu w roztworze wzorcowym, który wprowadzany jest do źródła jonów za pomocą trójnika typu „T-piece”, znajdującego się

między chromatografem a spektrometrem, przy jednoczesnym wprowadzaniu ekstraktu próbki matrycy nie zawierającej analitu do kolumny chromatograficznej. Porównanie intensywności sygnałów analitu w roztworze rozpuszczalnika oraz w obecności składników matrycy, pozwala na określenie wzmocnienia lub supresji sygnału (Annesley 2003). Innym sposobem wyznaczania efektów matrycy jest metoda SSE (signal suppression or enhancement), oparta na obliczeniu względnej intensywności sygnałów analitu w roztworach o jednakowym stężeniu, przygotowanych w czystym rozpuszczalniku i w ekstraktach próbek matrycy nie zawierającej analitu (Matuszewski i in. 2003). Efekty matrycowe są szczególnie zauważalne, gdy przygotowane ekstrakty próbek żywności lub paszy są wprowadzane do układu bez wcześniejszego oczyszczenia (Sulyok i in. 2006). Obserwowane są różnice w wielkości wyznaczonego efektu matrycowego między poszczególnymi partiami tego samego materiału (Sulyok i in. 2007b). Efekty matrycowe można zminimalizować dzięki zastosowaniu bardziej selektywnych technik ekstrakcji lub oczyszczania ekstraktów. Innym sposobem jest rozcieńczenie ekstraktu, jednakże może to prowadzić do podniesienia granic wykrywalności i oznaczalności stosowanych metodyk analitycznych, związanego ze zmniejszeniem stężenia analitu spowodowanego zwiększeniem objętości próbki. Zastosowane wzorców wewnętrznych (IS) minimalizuje zarówno efekty matrycowe, jak i straty analitów w procesie przygotowania próbki, co w konsekwencji przekłada się na poprawienie jakości wyników analitycznych. Odpowiedni wzorzec wewnętrzny powinien być jak najbardziej podobny w zachowaniu chromatograficznym i w detekcji MS do oznaczanego analitu, ale jednocześnie nie może występować naturalnie w badanych próbkach. W oznaczaniu toksyn fuzaryjnych wykorzystuje się do tego celu werrukarol (produkt hydrolizy trichotecenów makrocyklicznych), deepoksydeoksyniwalenol (metabolit DON) oraz zearalanon (ZAN) (Biselli i in. 2004, Klötzel i in. 2005, Berthiller i in. 2005b). Zastosowanie znaczonego izotopowo analogów analitów stanowi optymalne rozwiązanie, służące ograniczeniu wpływu matrycy na sygnał pomiarowy, eliminujące potencjalne błędy systematyczne, wynikające z różnego zachowania strukturalnie podobnego IS i analitu w czasie analizy. W oznaczaniu trichotecenów i zearalenonu wykorzystywane są analogi analitów znaczone deuterem (Razzazi-Fazeli i in. 2002, Hartmann i in. 2007), a także izotopem węgla ^{13}C , np. $^{13}\text{C}_{15}$ -DON, $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2 (Häubl i in. 2006, 2007). Głównym ograniczeniem stosowania znaczonego izotopowo analogów jest ich wysoka cena oraz ograniczona dostępność.

3.3.3. Techniki immunochemiczne i szybkie testy

W analityce mikotoksyn ważną rolę odgrywają techniki immunoanalityczne, opierające się na specyficznych oddziaływaniach między antygenami a przeciwciałem – szczególnie test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), przeznaczony do wykorzystania w badaniach przesiewowych. Technika ta jest stosowana w wykrywaniu mikotoksyn od końca lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia. W odniesieniu do mikotoksyn fuzaryjnych opracowane zostały testy ELISA dla głównych związków (DON, T-2, ZEN) do wykorzystania w analizie próbek zbożowych, a najczęstszą odmianą tej techniki są bezpośrednie testy rywalizacyjne (direct competitive ELISA), w których obecny w próbce analit (antygen) rywalizuje z analitem znaczonego enzymem (konjugat) o wiązanie z unieruchomionym na mikropłytkę przeciwciałem (Rys. 9.). Natężenie barwnej reakcji enzymatycznej jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia analitu w próbce. Pomiary absorbancji prowadzi się z wykorzystaniem spektrofometrycznych czytników mikropłytek, przy długości fali $\lambda = 450\text{nm}$.



Rys. 9. Etapy oznaczania mikotoksyn z wykorzystaniem testu ELISA (Zheng i in. 2006)

W procedurach przygotowania próbek uzyskane ekstrakty nie wymagają oczyszczenia, co korzystnie wpływa na czaso- i kosztochłonność tej techniki. Z drugiej strony możliwe reakcje

krzyżowe współekstrahowanych mikotoksyn o podobnej budowie są źródłem błędów w oznaczaniu. Pożądane jest, aby wyniki oznaczeń zostały potwierdzone technikami chromatograficznymi. Cztery handlowo dostępne zestawy ELISA dla DON, T-2 oraz ZEN zostały zatwierdzone przez AOAC (Zheng i in. 2006, Lattanzio i in. 2009).

Kolejnym rozwiązaniem, pozwalającym na stwierdzenie obecności mikotoksyn w próbkach (odpowieź „tak/nie”), są immunochromatograficzne testy paskowe (LFDs – Lateral flow devices), których zasada działania oparta jest na interakcjach pomiędzy specyficznymi przeciwciałami w postaci kompleksów z cząsteczkami koloidalnego złota lub lateksu, unieruchomionych na membranie nitrocelulozowej, a antygenem (mikotoksyną), przy wykorzystaniu zjawisk kapilarnych. W ostatnich latach zostały opracowane testy immunochromatograficzne dla DON (Rys. 10.), ZEN i toksyny T-2 (Kolossova i in. 2008).



Rys. 10. Test paskowy DON-VTM (LFD) opracowany przez firmę Vicam

Technika immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA), w której mierzone są interakcje pomiędzy antygenem znaczonego barwnikiem fluoryzującym i specyficznym przeciwciałem, znalazła zastosowanie w wykrywaniu DON i ZEN w roztworach, jednakże jej wykorzystanie do ekstraktów próbek spożywczych jest ciągle w opracowaniu. Handlowo dostępne testy FPIA dla DON w próbkach pszenicy pozwalają na półilościową analizę, w stężeniach powyżej 1 µg/g (Lattanzio i in. 2009, Maragos 2009). Do wykrywania DON w próbkach pszenicy wykorzystano również spektroskopię w bliskiej podczerwieni (NIR) oraz powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR). Technika NIR z połączeniem z analizą głównych składowych (PCA), pozwoliła na wykrycie DON w stężeniach powyżej 310 ng/g, bez konieczności prowadzenia procesu ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów analizowanych próbek. Zjawisko SPR zostało wykorzystane w bioczuJNIkach, których zasada pomiaru polega na rejestrowaniu zmian w wartościach współczynnika załamania światła na powierzchni metalu, na której unieruchomiona jest mikotoksyna, związana ze specyficznym

przeciwiałem. Obok DON, takie rozwiązanie opracowano również dla toksyn T-2 i HT-2 oraz ZEN, obecnych w próbkach zbóż (Hodnik i Anderluh 2009, Mitchell 2010, Meneely i in. 2011).

Informacje literaturowe o wykorzystaniu technik immunochemicznych i szybkich testów w analizie mikotoksyn fuzaryjnych zostały zestawione w Tabeli 13.

Tabela 13. Metodyki wykrywania mikotoksyn fuzaryjnych z wykorzystaniem technik immunochemicznych i szybkich testów

Analit	Matryca	Ekstrakcja	Sposób detekcji	LOD [ng/g]/ Odzysk [%]	Literatura
T-2, ZEN	pszenica, jęczmień, kukurydza	Ekstrakcja: wyrząsanie ACN:0.5% KCl:1% H ₂ SO ₄ 89:10:1	ELISA	T-2: 43-86/67-93 ZEN: 20-80/81-111	Barna-Vetro i in. (1994)
DON	pszenica	Ekstrakcja: wyrząsanie ACN:H ₂ O 10,5:89,5	ELISA	DON: 160/104-120	Schneider i in. (2000)
DON, NIV, T-2+HT-2	pszenica	Ekstrakcja: ACN:H ₂ O 85:15	ELISA	DON: 80/102-104 NIV: 80/94-101 T-2+HT-2: 30/99-112	Yoshizawa i in. (2004)
DON	pszenica	Ekstrakcja: wyrząsanie MeOH:H ₂ O 10:90	ELISA	DON: 50/82-93	Ji i in. (2011)
T-2	pszenica, owies	Ekstrakcja: wyrząsanie MeOH:H ₂ O 70:30	LFD	T-2: 100/bd	Molinelli i in. (2008)
DON, ZEN	pszenica	Ekstrakcja: wyrząsanie MeOH:H ₂ O 80:20	LFD	DON: 1500/bd ZEN: 100/bd	Kolosova i in. (2007)
DON	pszenica	Ekstrakcja: wyrząsanie H ₂ O	FPIA	DON: 150/98	Maragos i in. (2002)
ZEN	kukurydza	Ekstrakcja: wyrząsanie MeOH:H ₂ O 70:30 4% NaCl	FPIA	ZEN: 137/93-125	Chun i in. (2009)
T-2+HT-2	pszenica, płatki zbożowe, żywność dla dzieci	Ekstrakcja: wyrząsanie MeOH:H ₂ O 40:60	SPR	T-2+HT-2: 25/88-128	Meneely i in. (2010)
DON, ZEN	pszenica, kukurydza	Ekstrakcja: wyrząsanie ACN:1% HCOOH 85:15	SPR	DON: 68-84/bd ZEN: 40-64/bd	Dorokhin i in. (2011)

LOD – granica wykrywalności; bd – brak danych

II. CEL I ZAKRES PRACY

Zboża i produkty zbożowe odgrywają ważną rolę w diecie człowieka i zwierząt. Odpowiednia jakość żywności i pasz stanowi podstawę zapewnienia ich bezpieczeństwa zdrowotnego. Ryzyko zdrowotne pochodzenia żywnościowego jest związane m.in. z obecnością różnego rodzaju zanieczyszczeń w surowcach i produktach. Szczególną grupę zanieczyszczeń tworzą związki pochodzenia naturalnego (w tym wtórne metabolity grzybów pleśniowych – mikotoksyny), których obecność jest nieunikniona, pomimo coraz szerszego stosowania zasad dobrych praktyk rolniczych i produkcyjnych (GAP, GMP). Liczne regulacje prawne i opinie uznanych organizacji światowych i europejskich (WHO/FAO, EFSA) podkreślają konieczność monitorowania poziomów zanieczyszczenia mikotoksynami w łańcuchu żywnościowym (włączając substancje pochodne i współwystępujące mikotoksyny „zamaskowane”) oraz rozwijania i opracowywania odpowiednich procedur analitycznych w tym celu. Z tego względu w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są prace poświęcone poszukiwaniu nowych rozwiązań w analityce tych substancji. Analiza próbek surowców, żywności i pasz stanowi wyzwanie dla analityków, m.in. ze względu na niskie stężenia analitów, zróżnicowanie ich właściwości fizykochemicznych, złożony skład matrycy próbek i obecność substancji przeszkadzających, praco-, czaso- i kosztochłonność etapu przygotowania próbek do analizy, zużycie rozpuszczalników, ograniczoną dostępność substancji wzorcowych i materiałów odniesienia. Z tego względu nadrzędnym celem pracy było opracowanie prostych procedur analitycznych umożliwiających jednoczesne wyizolowanie i oznaczenie analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych i ich pochodnych w próbkach surowców i produktów zbożowych, stanowiących główne źródło narażenia pokarmowego na te związki.

Cel ten realizowano poprzez szczegółowe zadania badawcze:

- Optymalizację rozdzielania chromatograficznego analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych (wyznaczenie optymalnych warunków pracy detektora MS/MS, wybór fazy ruchomej, kolumny chromatograficznej, programu elucji);
- Opracowanie metodyki przygotowania próbek z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE), na etapie oczyszczania ekstraktów (dobór rodzaju i masy sorbentu, ekstrahenta, techniki ekstrakcji, stopnia rozdrobnienia próbki – uwzględniając różnorodność matryc);

- Opracowanie metodyki przygotowania próbek z wykorzystaniem podejścia QuEChERS (dobór rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, rodzaju i masy soli wspomagających proces ekstrakcji);
- Wyznaczenie parametrów walidacyjnych dla nowo opracowanych procedur analitycznych;
- Wykorzystanie opracowanych metodyk do analizy próbek rzeczywistych surowców i produktów zbożowych; określenie współwystępowania analitów i oszacowanie narażenia konsumentów na podstawie wyznaczonych wartości dziennego pobrania;
- Porównanie wyników oznaczeń analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych, przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki ELISA oraz opracowanych procedur, dla wybranych losowo próbek rzeczywistych.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4. Materiały i metody

4.1. Odczynniki i wzorce

- **Odczynniki**

- Acetonitryl do chromatografii cieczowej (LC/MS) LiChrosolv[®] (Merck);
- Acetonitryl czystość gradientowa do chromatografii cieczowej LiChrosolv[®] (Merck);
- Metanol do LC/MS LiChrosolv[®] (Merck);
- Metanol czystość gradientowa do chromatografii cieczowej LiChrosolv[®] (Merck);
- Amoniak, roztwór 25 % Suprapur[®] (Merck);
- Kwas mrówkowy do LC-MS (Fluka);
- Kwas octowy do LC-MS (Fluka);
- Mrówczan amonu do LC-MS (Fluka);
- Octan amonu do LC-MS (Fluka);
- Octan sodu bezwodny do analizy EMSURE[®] (Merck);
- Cytrynian sodu dwuwodny ACS reagent (Sigma-Aldrich);
- Wodorocytrynian sodu półtora wodny (Sigma-Aldrich);
- Siarczan magnezu bezwodny do analizy EMSURE[®] (Merck);
- Chlorek sodu EMSURE[®] (Merck);
- Bondesil – PSA, 40µm (Agilent);
- Węgiel aktywowany DARCO[®], rozmiar cząstek 60-100 mesh (Sigma-Aldrich);
- Tlenek glinu 90 aktywny obojętny do chromatografii kolumnowej 0,063-0,200 mm (70 - 230 mesh ASTM) (Merck);
- Celite[®] 545, rozmiar cząsteczek 0,02-0,1 mm (Merck);
- Woda dejonizowana z urządzenia do produkcji ultraczystej wody Simplicity 185 (Millipore);

- **Wzorce mikotoksyn**

- deoksyniwalenol (Romer Labs[®]);
- niwalenol (Romer Labs[®]);
- fuzarenon-X (Romer Labs[®]);
- 15-acetylodeoksyniwalenol (Romer Labs[®]);
- 3-acetylodeoksyniwalenol (Romer Labs[®]);

- neosolaniol (Romer Labs[®]);
- toksyna T-2 (Romer Labs[®]);
- zearalenon (Romer Labs[®]);
- toksyna HT-2 (Romer Labs[®]);
- monoacetokyscirpenol (Sigma-Aldrich);
- diacetokyscirpenol (Sigma-Aldrich);
- α -zearalenol (Sigma-Aldrich);
- α -zearalanol (Sigma-Aldrich);
- glukozyd 3-deoksyniwalenolu (50 μ g/ml) (Romer Labs[®]);
- T-2 Triol (50 μ g/ml) (Romer Labs[®]);
- U-[¹³C₁₅]-deoksyniwalenol (25 μ g/ml) (Romer Labs[®]);
- U-[¹³C₂₂]-toksyna HT-2 (25 μ g/ml) (Romer Labs[®]);
- U-[¹³C₂₄]-toksyna T-2 (25 μ g/ml) (Romer Labs[®]);
- U-[¹³C₁₈]-zearalenon (25 μ g/ml) (Romer Labs[®]);
- **Matrycowe materiały odniesienia**
 - Quality control test materials FAPAS[®] – Deoxynivalenol: Animal feed (T2240, T2258), Breakfast cereal (T2268, T2279), Corn (T2244); Zearalenone: Animal feed (T2242), Breakfast cereal (T2231), Baby food (T2236, T2263), HT-2 i T-2: Oat Flour (T2280), T-2: Oats (T2243);
 - Matrix Reference Materials BIOPURE – Deoxynivalenol: Wheat (BRM003022), Corn (BRM003012);
 - TRILOGY[®] Reference Materials – Deoxynivalenol: Wheat (D-W-156), Barley (D-B-510, D-B-509), Corn (D-C-612); Zearalenone: Corn (Z-C-311); HT-2 i T-2: Corn (T-C-973);
 - Reference Matrix Materials AOKIN – Zearalenone: Wheat (RMM-01-572a); HT-2: Durum wheat (RMM-78-428a);
 - EFL2, EFL3 – DON, ZEN, T-2 i HT-2 (Animal feed) – materiały otrzymane w związku z udziałem w badaniach porównawczych „LC-MS Multi Mycotoxin Collaborative Trial 2011”, organizowanych przez Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium

4.2. Aparatura i wyposażenie

Aparatura wykorzystywana podczas badań:

- Chromatograf cieczerwowy Nexera (Shimadzu) wyposażony w:

- pompy LC-30AD;
- automatyczny podajnik próbek SIL-30AC;
- termostat kolumny CTO-20AC;
- detektor tandemowy spektrometr mass z analizatorem typu potrójny kwadrupol/liniowa pułapka jonowa 5500 Q TRAP[®] MS/MS (AB SCIEX)
- Kolumny chromatograficzne:
 - ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,60 mm, 5 μm) (Agilent);
 - Chromolith[®] Performance RP-18 endcapped, (100 mm x 4,6 mm) (Merck);
 - Gemini C18 (150 mm x 4,60 mm, 5 μm) (Phenomenex);
 - Kinetex C18 (150 mm x 4,60 mm, 2,6 μm) (Phenomenex);
 - Kinetex PFP (150 mm x 4,60 mm, 2,6 μm) (Phenomenex);
 - Kinetex Phenyl-Hexyl (100 mm x 2,10 mm, 2,6 μm) (Phenomenex)
- Czytnik testów paskowych STAT FAX 303 Plus (Awareness Technology Inc.);
- Zestaw do odparowywania próbek w strumieniu azotu Reacti-Vap[™] (Thermo Scientific);
- Dejonizator wody Elix 3 (Millipore);
- System oczyszczania wody Simplicity 185 (Millipore);
- Młyn ultraodśrodkowy ZM 200 (Retsch);
- Waga analityczna Voyager (Ohaus);
- Waga techniczna Adventurer Pro (Ohaus);
- pH-metr CPC-505 (Elmetron);
- Wirówka laboratoryjna Multifuge 3 L-R (Heraeus);
- Homogenizator Diax 900 (Heidolph);
- Wytrząsarka Promax 1020 (Heidolph);
- Łażnia ultradźwiękowa (Ultron);
- Wytrząsarka Reax Control (Heidolph);
- Pipety automatyczne Transferpette[®] (10-100, 100-1000, 500-5000 μl) (Brand);
- Komora do wykonywania ekstrakcji za pomocą techniki SPE (J.T. Baker);
- Kolumnienki sorpcyjne z różnymi typami źróz:
 - Supel[™]-Select HLB; 60 mg/ 3 ml (Supelco);
 - Discovery[®] DSC-8; 500 mg/ 3 ml (Supelco);
 - Discovery[®] DSC-18; 500 mg/ 3 ml (Supelco);
 - Discovery[®] DSC-18LT; 500 mg/ 3 ml (Supelco);

- Discovery[®] DSC-SAX; 1000 mg/ 6 ml (Supelco);
 - Discovery[®] DSC-WCX; 1000 mg/ 6 ml (Supelco);
 - Discovery[®] DSC-SCX; 1000 mg/ 6 ml (Supelco);
 - Discovery[®] DSC-NH₂; 1000 mg/ 6 ml (Supelco);
 - Discovery[®] DSC-CN; 500 mg/ 3 ml (Supelco);
 - Discovery[®] DSC-PH; 500 mg/ 3 ml (Supelco);
 - MultiSep[®] 225 Trich (Romer Labs[®]);
 - MultiSep[®] 216 (Romer Labs[®]);
 - MultiSep[®] 227 Trich + (Romer Labs[®]);
 - MultiSep[®] 224 Afla Zon (Romer Labs[®]);
 - MycoSep[®] 226 Afla Zon + (Romer Labs[®]);
 - MycoSep[®] 228 Afla Pat (Romer Labs[®]);
 - Bond Elut Jr PSA; 500 mg (Agilent);
 - Bond Elut Jr PSA; 1000 mg (Agilent);
 - Bond Elut Jr SAX; 500 mg (Agilent);
 - Bond Elut Jr NH₂; 500 mg (Agilent);
 - Bond Elut LRC-DEA, 500 mg/ 10 ml (Agilent);
 - Bakerbond spe[™] C18; 500 mg/ 3 ml (J.T.Baker);
 - Trichothecene P (R-Biopharm AG);
 - Kolumnienki przygotowane w laboratorium (węgiel aktywny:Al₂O₃:Celite 7:5:3)
- Testy ELISA: AgraQuant[®] Deoxynivalenol, AgraQuant[®] T-2 Toxin, AgraQuant[®] Zearalenone (Romer Labs[®]);
 - Filtry strzykawkowe Millex[®] z membraną PTFE o średnicy 13 mm i porowatości 0,2 μm (Millipore);
 - Fiolki;
 - Szkło laboratoryjne.

4.3. Przygotowanie szkła

Odpowiednie przygotowanie i mycie szkła laboratoryjnego jest niezbędną procedurą, wpływającą na jakość wyników pomiarów analitycznych.

Procedura przygotowania szkła do badań składała się z następujących etapów:

- mycie w gorącej wodzie z użyciem płynu do mycia naczyń,
- płukanie w ciepłej, a następnie zimnej wodzie, celem usunięcia detergentu,

- zanurzenie naczyń w 3% roztworze środka czyszczącego Mucapol[®] na min. 12h,
- płukanie w zimnej wodzie wodociągowej,
- płukanie w wodzie destylowanej typu II (Elix 3, $\kappa < 0,2 \mu\text{S/cm}$ w 25°C),
- suszenie w suszarce laboratoryjnej, w $T = 90^\circ\text{C}$ przez 3 godziny.

W celu uniknięcia strat analitów spowodowanych ich ewentualną adsorpcją na powierzchni naczyń, w badaniach stosowano fiołki ze szkła poddane silanizacji.

4.4. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Roztwory podstawowe deoksyniwalenolu, niwalenolu, fuzarenonu-X, 15-acetylodeoksyniwalenolu, 3-acetylodeoksyniwalenolu, neosolaniolu, toksyny T-2, toksyny HT-2, monoacetokyscirpenolu, diacetokyscirpenolu, α -zearalenolu, α -zearalanolu, zearalenonu o stężeniu rzędu $200 \mu\text{l/ml}$ przygotowano przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości analitu w acetonitrylu w kolbie miarowej o pojemności 25 ml. Przygotowano trzy roztwory robocze (**L**, **M**, **H**) mikotoksyn, których stężenia przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Stężenia mikotoksyn w przygotowanych roztworach roboczych

Analit	Roztwór roboczy L [$\mu\text{g/ml}$]	Roztwór roboczy M [$\mu\text{g/ml}$]	Roztwór roboczy H [$\mu\text{g/ml}$]
NIV	1,0	5,0	25
D3G	1,0	5,0	25
DON	2,0	10	50
FUS X	1,0	5,0	25
15-ADON	1,0	5,0	25
3-ADON	1,0	5,0	25
NEO	1,0	5,0	25
MAS	1,0	5,0	25
DAS	1,0	5,0	25
T-2 Triol	1,0	5,0	25
HT-2	1,0	5,0	25
T-2	1,0	5,0	25
ZEN	0,4	2,0	10
ZAL	0,4	2,0	10
ZEL	0,4	2,0	10

Roztwory robocze zostały przygotowane przez rozcieńczenie i dodanie odpowiednich objętości każdego z roztworów podstawowych do kolby miarowej o objętości 10 ml i uzupełnieniu jej acetonitrylem. Roztwór roboczy wzorców wewnętrznych został przygotowany przez dodanie odpowiedniej ilości każdego z podstawowych roztworów

wzorcowych [^{13}C]-IS do kolby miarowej o pojemności 5 ml i uzupełnienie jej acetonitrylem. Stężenia znaczących izotopowo analogów mikotoksyn w roztworze roboczym wynosiły: 3,0 $\mu\text{g/ml}$ dla [$^{13}\text{C}_{15}$]-deoksyniwalenolu, 0,6 $\mu\text{g/ml}$ dla [$^{13}\text{C}_{22}$]-toksyny HT-2 oraz 0,3 $\mu\text{g/ml}$ dla [$^{13}\text{C}_{24}$] toksyny T-2 i [$^{13}\text{C}_{18}$]-zearalenonu. Roztwory podstawowe i robocze były przechowywane w zamkniętych fiolkach ze szkła w temperaturze -20°C .

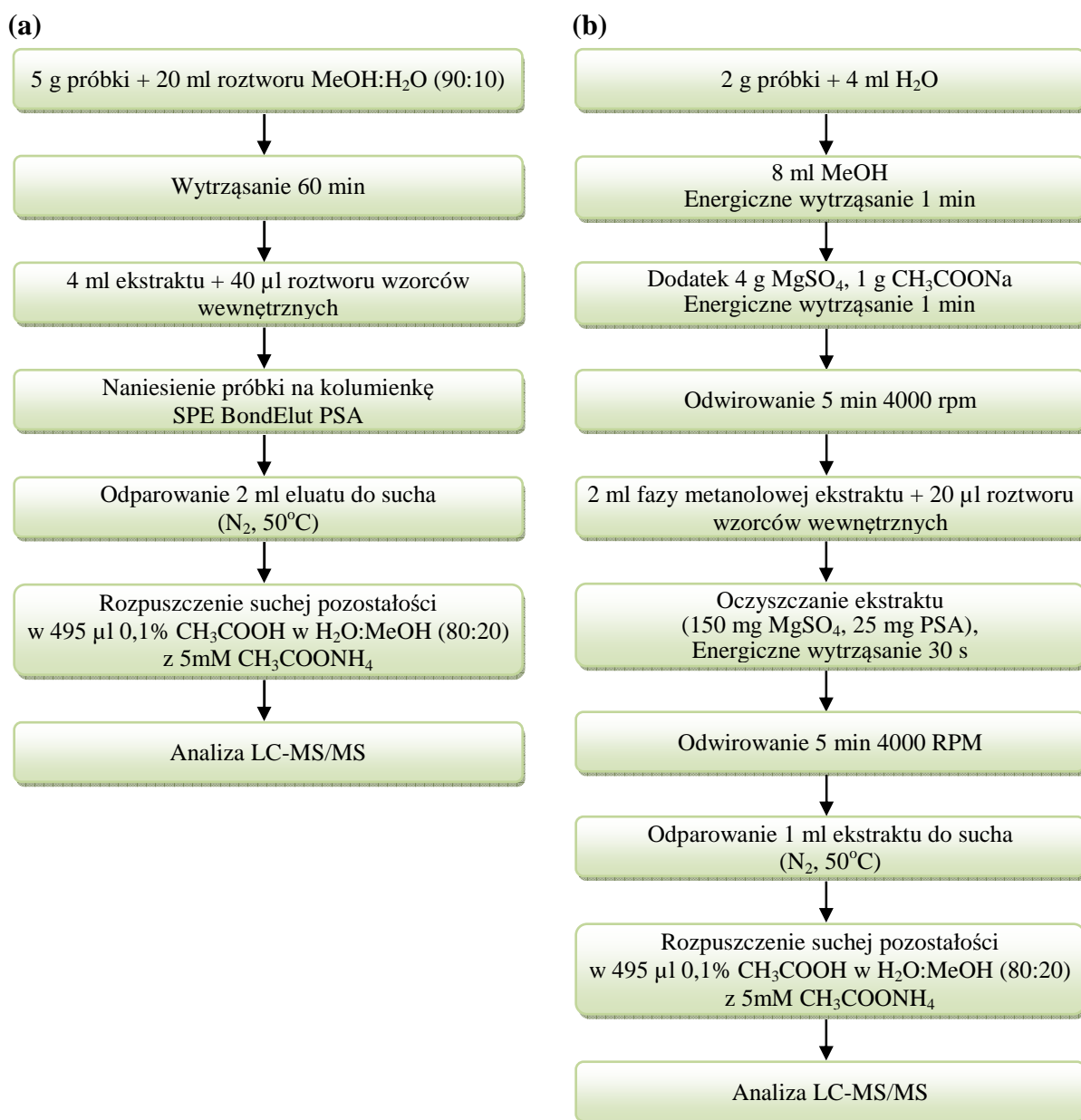
4.5. Charakterystyka badanych próbek

Z uwagi na handlową niedostępność próbek ślepych (blank samples), w odniesieniu do wszystkich oznaczanych związków, do badań optymalizacyjnych wybrano próbki pszenicy, owsa, kukurydzy i jęczmienia, o zawartości analitów poniżej granicy wykrywalności, wyselekcjonowane podczas analizy próbek zleconych przez podmioty zewnętrzne i dostarczonych do Laboratorium Badawczego Mikotoksyn UKW. Próbki zostały poddane procesowi sterylizacji, którego skuteczność zweryfikowano wykonując posiew kontrolny na obecność grzybów pleśniowych, a następnie, po umieszczeniu w szczelnych plastikowych pojemnikach, były przechowywane w temperaturze -20°C .

Próbki rzeczywiste zbóż: pszenicy, owsa, jęczmienia i kukurydzy ($n = 194$), produktów zbożowych ($n = 245$) i mieszanek paszowych ($n = 47$), pobrane w gospodarstwach rolnych (województwo kujawsko-pomorskie i warmińsko-mazurskie), dostarczone przez wytwórnie pasz (woj. kujawsko-pomorskie, warmińsko-mazurskie, wielkopolskie, lubelskie i mazowieckie), młyny gospodarcze i przetwórnice spożywcze (woj. kujawsko-pomorskie) oraz dzięki uprzejmości Krajowego Laboratorium Pasz Instytutu Zootechniki PIB w Lublinie, a także zakupione w handlu detalicznym (woj. kujawsko-pomorskie, pomorskie, wielkopolskie), po wstępnym przygotowaniu były przechowywane w temperaturze -20°C do czasu analizy.

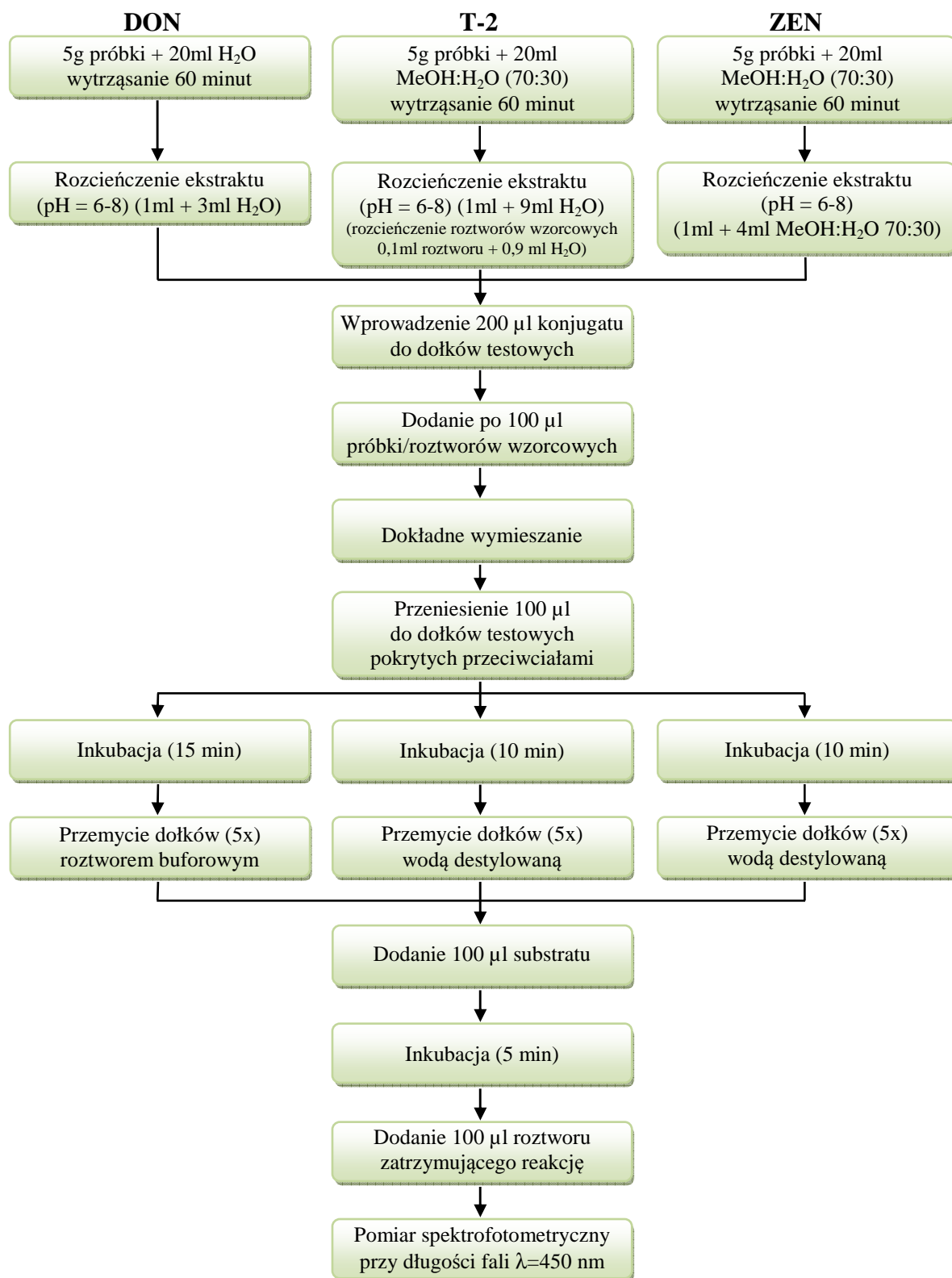
4.6. Metodyki oznaczania wtórnych metabolitów pleśni z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach pochodzenia zbożowego

Opracowanie procedur analitycznych wykorzystujących technikę LC-MS/MS w oznaczaniu analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych realizowano rozpoczynając od zoptymalizowania parametrów pracy spektrometru mas, następnie dobrano warunki rozdzielania chromatograficznego, a w ostatnich etapach – procedur przygotowania próbek. Opracowano dwie procedury oznaczania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych, w których wykorzystano odmienne podejścia na etapie ekstrakcji analitów: technikę SPE i QuEChERS (Rys. 11.).



Rys. 11. Schematy opracowanych metodyk izolowania wtórnych metabolitów pleśni z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach pochodzenia zbożowego, z wykorzystaniem techniki SPE (a) i podejścia QuEChERS (b)

Test immunoenzymatyczny (ELISA) jest powszechnie wykorzystywany w laboratoriach przemysłowych do wykrywania i oznaczania mikotoksyn w próbkach surowców i produktów. Z tego względu, w celu porównania wyników oznaczeń, w badaniach wykorzystano również tę technikę (Rys. 12.). Dostępność testów ELISA ograniczyła możliwość przeprowadzenia oznaczeń do trzech analitów: DON, T-2 oraz ZEN.



Rys. 12. Schemat procedur analitycznych oznaczania DON, T-2 i ZEN w próbkach pochodzenia zbożowego z wykorzystaniem techniki ELISA

5. Wyniki i ich omówienie

5.1. Wyznaczenie optymalnych warunków rozdzielania chromatograficznego analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

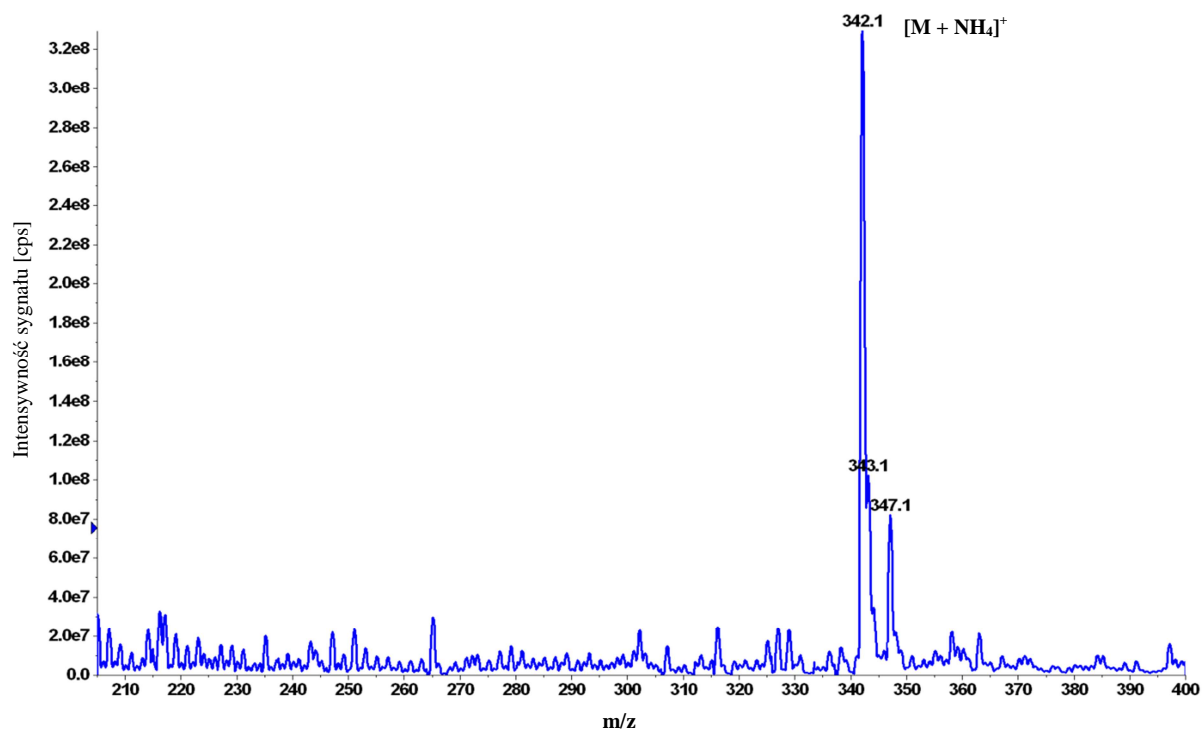
5.1.1. Optymalizacja parametrów pracy detektora

W procesie optymalizacji warunków pracy spektrometru mas 5500 QTRAP, takich jak sposób jonizacji (APCI, ESI), tryb tworzenia jonów (dodatnie/ujemne), napięcie przyłożone do poszczególnych elementów optyki jonowej oraz ciśnienie gazów (m.in. osłonowego i wspomagającego rozpylanie) zastosowano różne sposoby wprowadzania roztworów wzorcowych mikotoksyn do układu: dozowanie z wykorzystaniem pompy strzykawkowej oraz dozowanie do strumienia fazy ruchomej – FIA. W tym celu przygotowano roztwory wzorcowe pojedynczych analitów o określonych stężeniach w różnych kombinacjach rozpuszczalników, stanowiących potencjalne fazy ruchome LC (Tabela 15).

Tabela 15. Stężenia analitów i mieszaniny rozpuszczalników wykorzystane w procesie optymalizacji parametrów pracy spektrometru mas

Grupa analitów	Stężenie [ng/ml]	Mieszaniny do optymalizacji
Trichoteceny B	200	R1 ACN:0,1% NH ₄ OH 1:1 (v/v)
		R2 ACN:0,1% CH ₃ COOH 1:1 (v/v)
		R3 ACN:0,1% HCOOH 1:1 (v/v)
		R4 ACN:10mM CH ₃ COONH ₄ 1:1 (v/v)
Trichoteceny A	100	R5 ACN:10mM HCOONH ₄ 1:1 (v/v)
		R6 MeOH:0,1% NH ₄ OH 1:1 (v/v)
		R7 MeOH:0,1% CH ₃ COOH 1:1 (v/v)
		R8 MeOH:0,1% HCOOH 1:1 (v/v)
Zearalenon i pochodne	20	R9 MeOH:10mM CH ₃ COONH ₄ 1:1 (v/v)
		R10 MeOH:10mM HCOONH ₄ 1:1 (v/v)

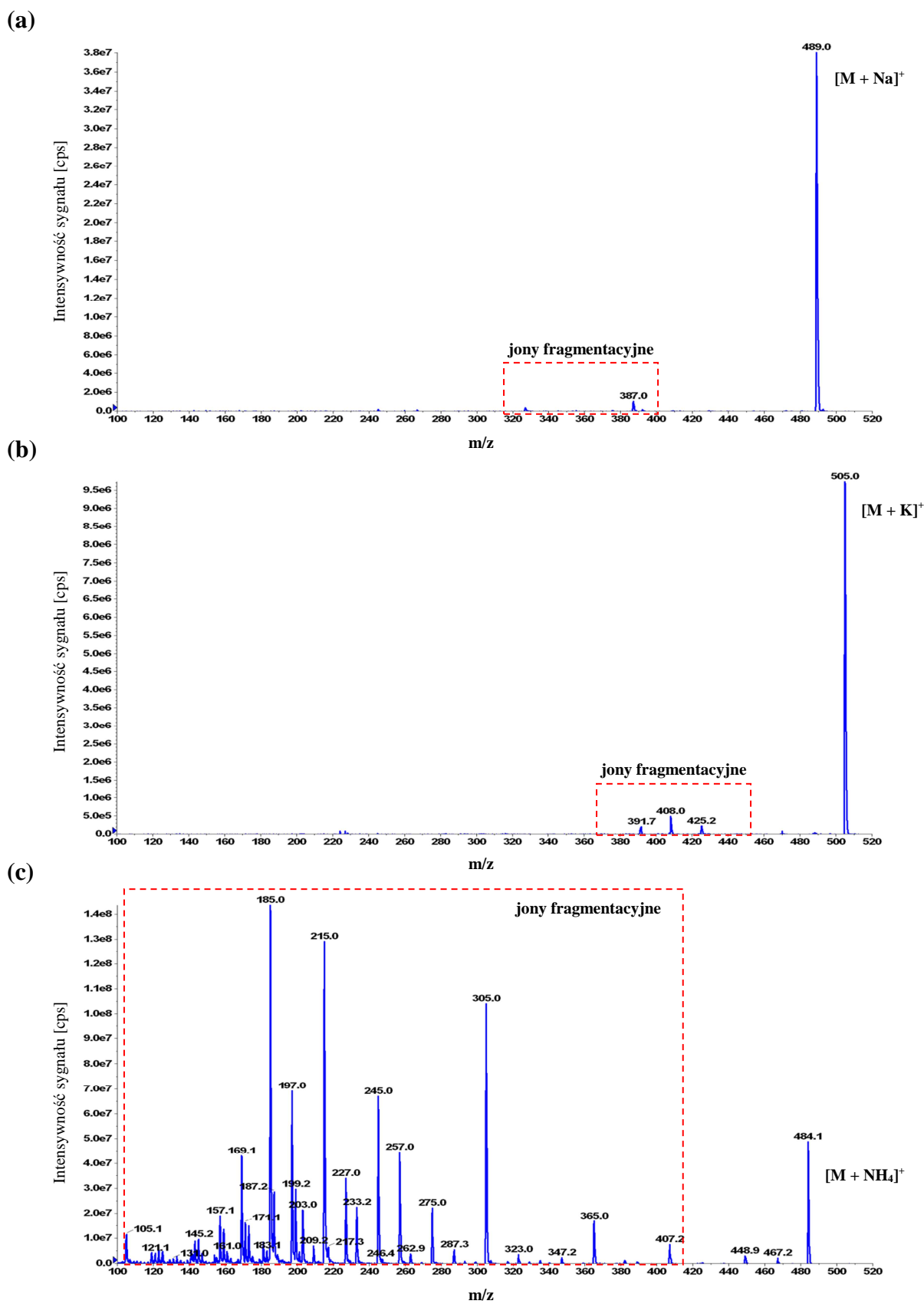
Na widmach mas trichotecenów A jonami o największej intensywności były addukty $[M+NH_4]^+$ (Rys. 13.). Wielkość sygnału obserwowanych jonów była porównywalna w przypadku roztworów zawierających mrówczan i octan amonu (**R4** i **R5**, **R9** i **R10**) i wyższa w porównaniu z roztworami z dodatkiem wodnego roztworu amoniaku (**R1**, **R6**). Zaobserwowano również większą intensywność adduktów w roztworach metanolowych (o około 20%) – w odniesieniu do acetonitrylowych. Sygnały pochodzące od jonów pseudomolekularnych $[M+H]^+$ charakteryzowały się znacznie niższą intensywnością.



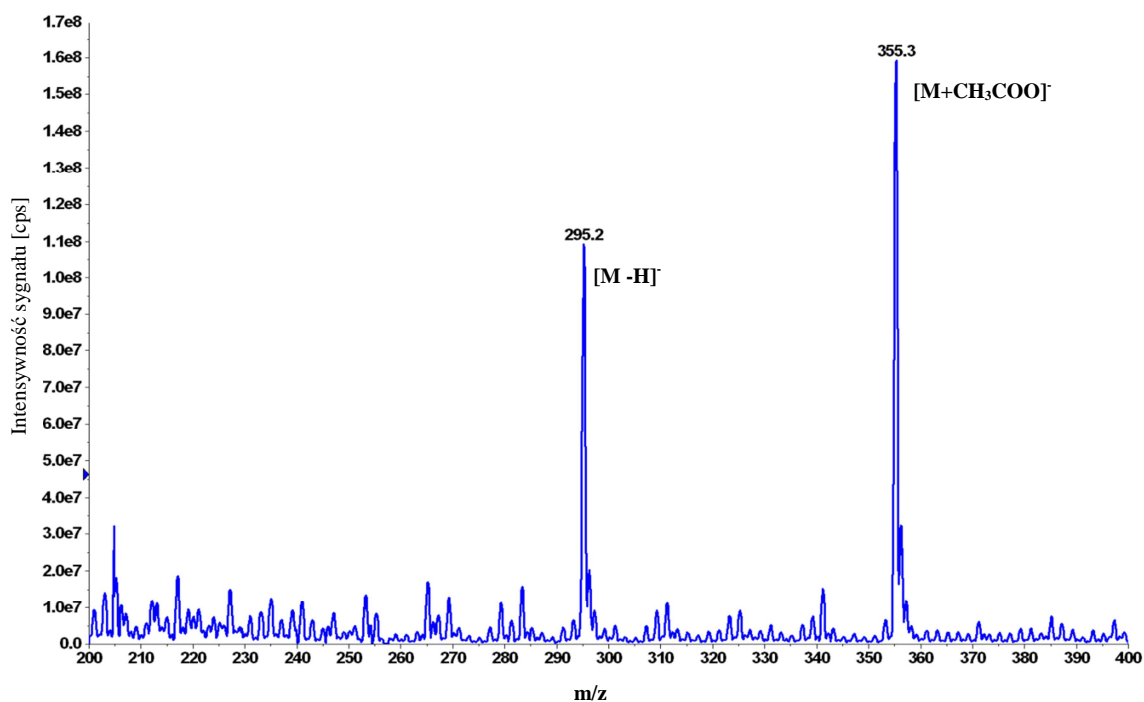
Rys. 13. Widmo mas dla MAS (trichoteceny A) otrzymane w wyniku analizy roztworu wzorcowego z zastosowaniem techniki jonizacji ESI

W trybie tworzenia jonów dodatnich na widmach mas obserwowano również względnie silne sygnały pochodzące od adduktów $[M+Na]^+$ oraz $[M+K]^+$, jednakże dalsze badania wykazały ich słabą fragmentację w porównaniu z jonami $[M+NH_4]^+$ (Rys. 14.). Trichoteceny A znacznie słabiej jonizowały w trybie tworzenia jonów ujemnych (poniżej 10% intensywności sygnałów jonów dodatnich).

Trichoteceny B tworzyły jony pseudomolekularne zarówno w trybie tworzenia jonów dodatnich, jak i ujemnych. Dla większości związków wydajność jonizacji była efektywniejsza w trybie tworzenia jonów ujemnych. W trybie tym oprócz jonów $[M-H]^-$ na widmie mas obserwowano również addukty $[M+HCOO]^-$ i $[M+CH_3COO]^-$ (Rys. 15.), których intensywność była większa w roztworach zawierających odpowiednią sól w porównaniu z roztworami z dodatkiem kwasu. Rodzaj użytego jako faza ruchoma rozpuszczalnika organicznego (ACN, MeOH) nie wpływał na intensywność sygnałów obserwowanych adduktów w trybie tworzenia jonów ujemnych, natomiast w zależności od rodzaju dodanej soli sygnały jonów $[M-H]^-$ były około dwukrotnie bardziej intensywne podczas stosowania octanu w porównaniu z mrówczanem. W trybie tworzenia jonów dodatnich na widmach MS obserwowano również addukty $[M+NH_4]^+$, których intensywność była wyższa w roztworach sporządzonych w MeOH.



Rys. 14. Jony fragmentacyjne obserwowane na widmach mas powstałe z adduktów toksyny T-2: (a) [M+Na]⁺, (b) [M+K]⁺, (c) [M+NH₄]⁺

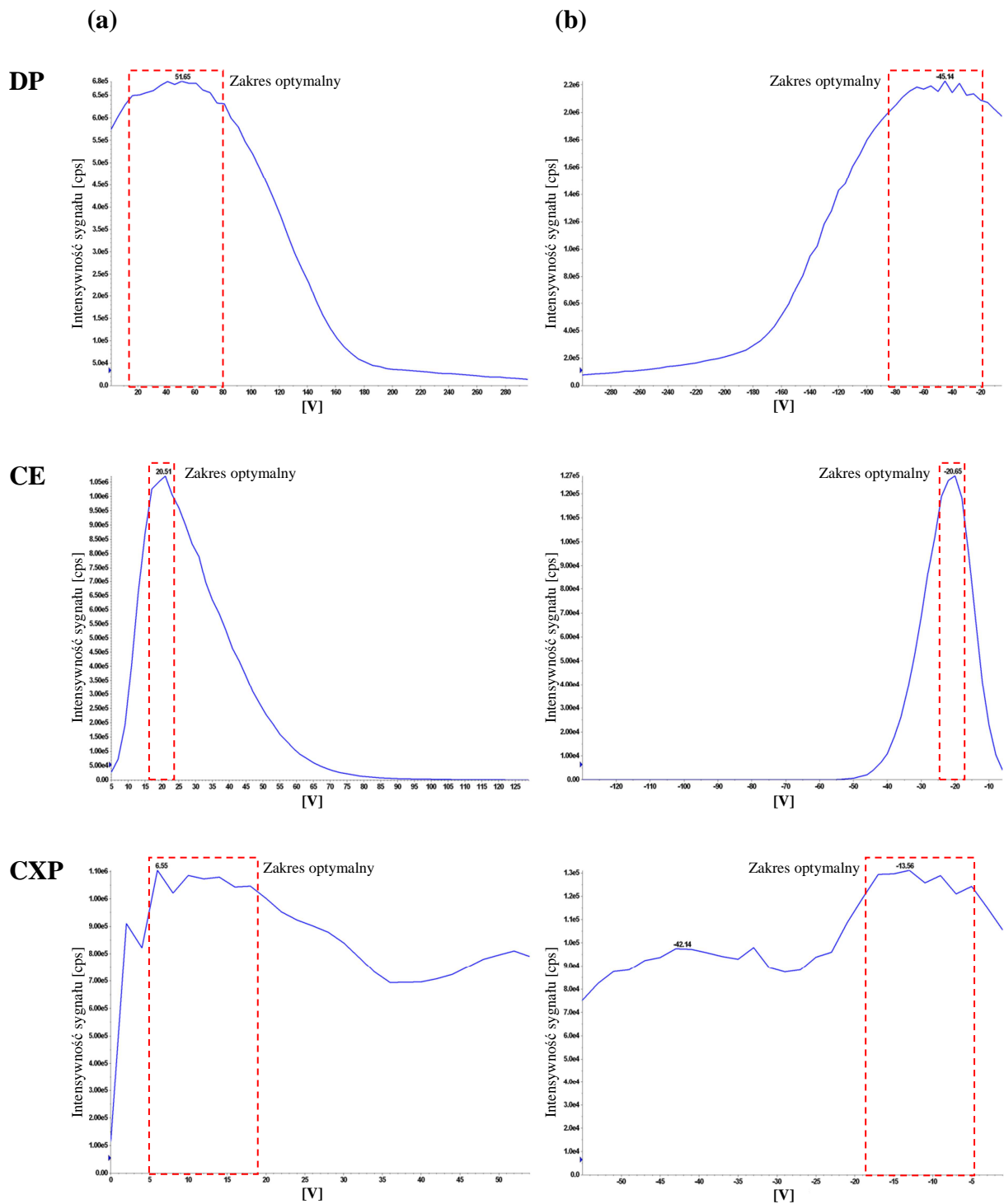


Rys. 15. Widmo mas dla DON (trichoteceny B) otrzymane w wyniku analizy roztworu wzorcowego z zastosowaniem techniki jonizacji ESI

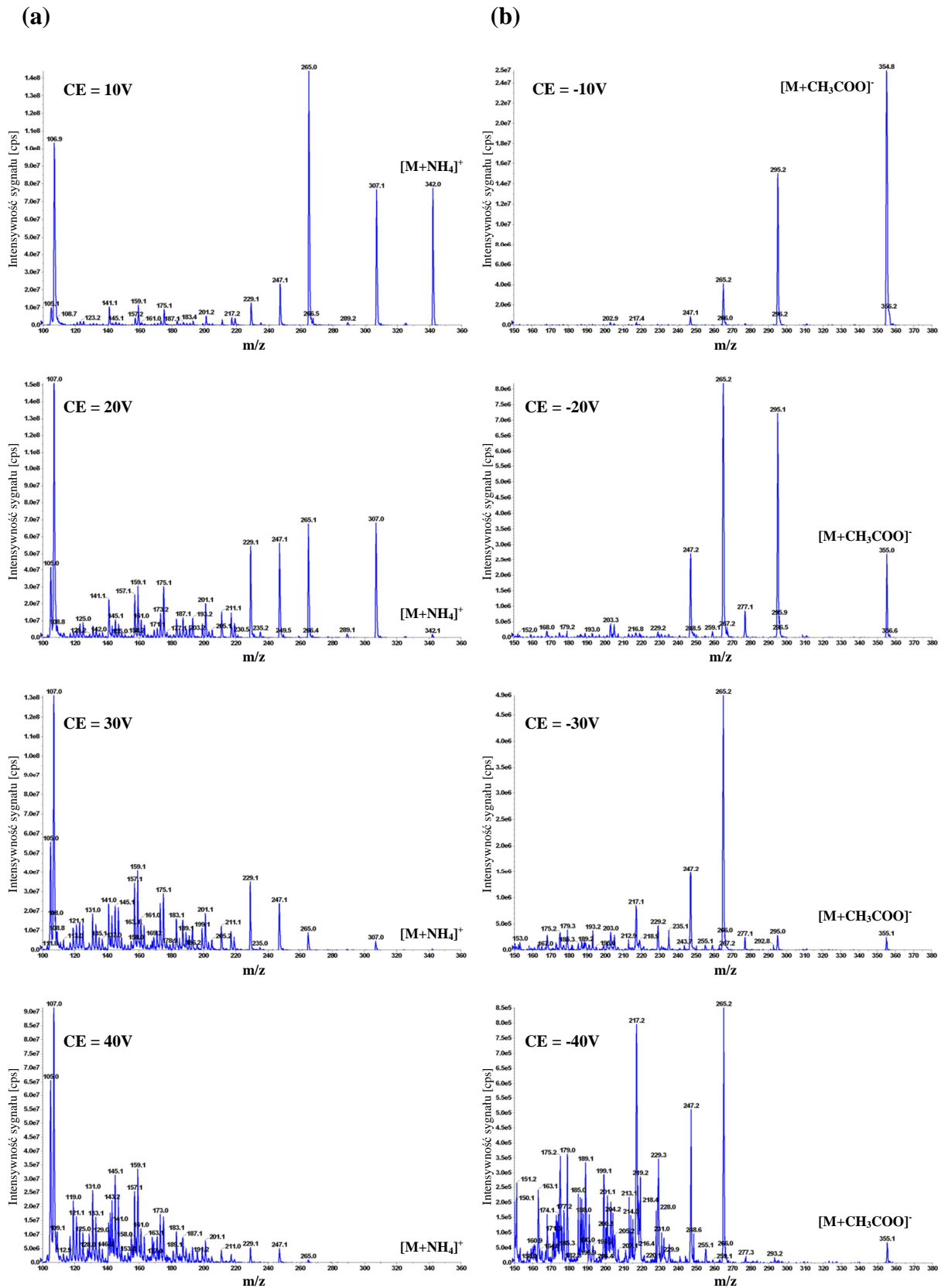
W przypadku ZEN i jego pochodnych na widmach mas w warunkach tworzenia jonów ujemnych obserwowano powstawanie głównie jonów pseudomolekularnych $[M-H]^-$, o intensywności około 10% wyższej w przypadku roztworów metanolowych, w stosunku do roztworów acetonitrylowych. Sygnały adduktów $[M+HCOO]^-$ i $[M+CH_3COO]^-$ stanowiły od 8 do 24% odpowiedzi jonów $[M-H]^-$. Wydajność tworzenia jonów pseudomolekularnych $[M+H]^+$ była ponad połowę niższa w porównaniu z jonami $[M-H]^-$. W trybie tworzenia jonów dodatnich na widmach mas obecne były również addukty $[M+NH_4]^+$ o wielkości sygnału zbliżonej do połączeń z mrówczanami i octanami powstającymi podczas tworzenia jonów ujemnych.

W kolejnym etapie badano reakcje fragmentacji wybranych jonów, optymalizując parametry detektora charakterystyczne dla każdego analitu w następujących zakresach: potencjał rozgrupowania klastrów (DP) od ± 1 do ± 400 V, energia zderzeń (CE) od ± 5 do ± 130 V oraz potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń (CXP) od 0 do ± 55 V (Rys. 16.).

Dla wybranych jonów pierwotnych analitów zarejestrowano również widma fragmentacyjne przy różnych wartościach CE (Rys. 17.). Przyłożone niskie bezwzględne wartości CE prowadziły do powstania głównie jonów fragmentacyjnych o wyższych masach cząsteczkowych. Zwiększenie wartości CE skutkowało wzrostem intensywności sygnałów jonów fragmentacyjnych o niższych masach cząsteczkowych, a fragmenty o masach wyższych nie były obserwowane na widmach.



Rys. 16. Zmiany intensywności sygnału wybranych jonów w zależności od wartości potencjału rozgrupowania klastrow (DP) dla: (a) MAS (tryb tworzenia jonów dodatnich) i (b) DON (tryb tworzenia jonów ujemnych) oraz reakcji fragmentacji: (a) MAS $342 \rightarrow 107$ i (b) DON $355 \rightarrow 265$ w zależności od wartości energii zderzeń (CE) i potencjału wyjścia jonów z komory zderzeń (CXP)

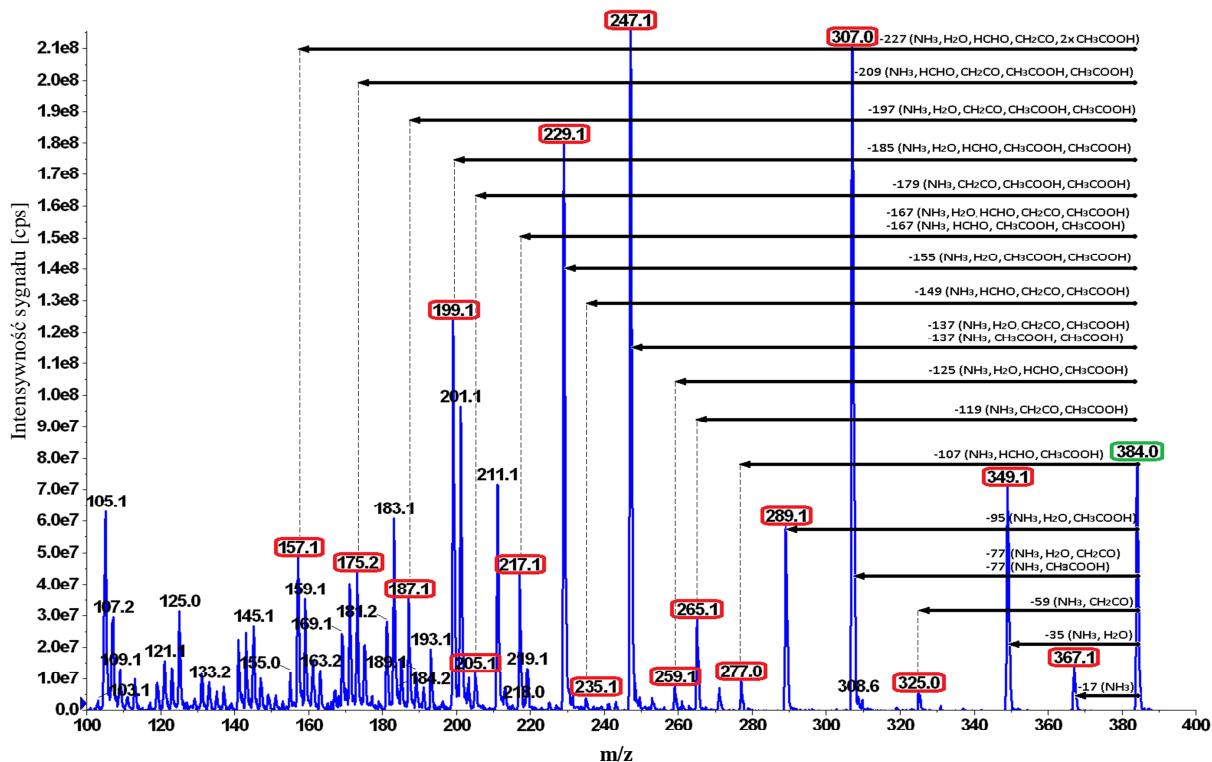


Rys. 17. Widma fragmentacyjne otrzymane dla wybranych jonów pierwotnych: (a) MAS oraz (b) DON otrzymane dla różnych wartości CE

Następnie oszacowano stopień fragmentacji dla wybranych przejść MRM (prowadzonych w warunkach optymalnych) oraz stosunek sygnałów dwóch jonów fragmentacyjnych o największej intensywności (P2/P1), w roztworach **R1-R10**.

Analiza widm fragmentacyjnych trichotecenów A potwierdziła wstępny wybór adduktów $[M+NH_4]^+$, jako potencjalnych jonów pierwotnych dla tej grupy analitów. Stopień fragmentacji jonów ujemnych: $[M-H]^-$, $[M+HCOO]^-$ i $[M+CH_3COO]^-$ oszacowano na poziomie poniżej 10%, za wyjątkiem fragmentacji jonów $[M+HCOO]^-$ w roztworach **R3** i **R5** (średnio 21 i 19%) oraz **R8** i **R10** (średnio 23 i 31%), a także $[M+CH_3COO]^-$ w roztworach **R2** i **R4** (średnio 33 i 38%) oraz **R7** i **R9** (średnio 37 i 40%), jednakże wartości P2/P1 dla tych reakcji były bardzo niskie i nie przekraczały 0,05 (roztwory w ACN) oraz 0,13 (roztwory w MeOH). Niska wartość P2/P1 uniemożliwia potwierdzenie tożsamości związku przy wyznaczonej granicy wykrywalności i tym samym wpływa na jej podniesienie. Na podstawie widm fragmentacyjnych jonów $[M+NH_4]^+$ określono prawdopodobne drogi fragmentacji analitów (Rys. 18.), identyfikując różnice m/z wynoszące, m.in. 17 Da (amoniak), 18 Da (woda), 30 Da (formaldehyd), 42 Da (keten), 60 Da (kwas octowy), 102 Da (kwas izowalerianowy – toksyny T-2, HT-2 i T-2 Triol). W przypadku trichotecenów B najwyższy stopień fragmentacji (powyżej 30%) zaobserwowano dla adduktów w obu trybach pracy spektrometru: $[M+NH_4]^+ > [M+CH_3COO]^- > [M+HCOO]^-$, jednakże niskie wartości P2/P1 w przypadku połączeń z jonami: mrówczanowym i amonowym (poniżej 0,18) dla większości analitów zadecydowały o tym, że jony te nie były rozważane jako potencjalne prekursorzy na dalszych etapach procesu optymalizacji. Wyjątek stanowiły addukty $[M+NH_4]^+$ 3- i 15-ADON, które ze względu na stopień fragmentacji powyżej 50% zostały uwzględnione w dalszych badaniach. W przypadku wymienionych związków intensywną fragmentację zaobserwowano również dla jonów pseudomolekularnych $[M+H]^+$. Stopień fragmentacji jonów pseudomolekularnych $[M-H]^-$ były porównywalny w tej grupie analitów. Ostateczny wybór odpowiednich przejść MRM został dokonany w połączeniu z wynikami optymalizacji procedury rozdzielania chromatograficznego. Na widmach MS/MS trichotecenów B widoczne były jony fragmentacyjne, których różnice m/z względem jonu pierwotnego odpowiadały eliminacji cząsteczek analogicznych do związków typu A. Ponadto obserwowana eliminacja cząsteczek o wyższych masach i przeprowadzone obliczenia pozwoliły na zidentyfikowanie jonów odpowiadających masie metanolu (32 Da), etanolu (46 Da) oraz octanu metylu (74 Da). Dane literaturowe wskazują, że eliminacja jonu fragmentacyjnego odpowiadającego masie cząsteczki formaldehydu (30 Da) z jonów pierwotnych trichotecenów może być wynikiem rozpadu pierścienia epoksydowego lub

eliminacji jonu fragmentacyjnego z grupy $-\text{CH}_2\text{-OH}$ przy atomie węgla C-15 (Razzazi-Fazeli i in. 2003).



Rys. 18. Proponowane drogi fragmentacji adduktu $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ trichotecenów A na przykładzie DAS

Porównanie widm fragmentacyjnych izomerów 3- i 15-ADON pozwoliło na potwierdzenie drugiej koncepcji. Bardzo słaba intensywność lub nieobecność na widmie jonów fragmentacyjnych o $m/z = 307$ Da (tryb tworzenia jonów ujemnych) i $m/z = 291$ (tryb tworzenia jonów dodatnich), odpowiadających eliminacji fragmentu o $m/z = 30$, gdy poddany fragmentacji jest jon pseudomolekularny $[\text{M}-\text{H}]^-$ lub $m/z = 30 + 60$ (fragmentacja adduktu $[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$) oraz utracie fragmentu o $m/z = 30 + 18$ (fragmentacja $[\text{M}+\text{H}]^+$) lub $m/z = 17 + 30 + 18$ (fragmentacja $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$) w przypadku 15-ADON (grupa octanowa przy atomie węgla C-15) wskazuje, że jony fragmentacyjne o $m/z = 30$ Da nie pochodzą z rozpadu pierścienia epoksydowego – w przeciwnym wypadku zostałyby one zidentyfikowane podczas analizy widm jako grupy eliminowane. Ze względu na wyraźnie większą wydajność jonizacji ZEN i jego pochodnych w trybie jonów ujemnych, główną uwagę skupiono na analizie widm fragmentacyjnych jonów pseudomolekularnych $[\text{M}-\text{H}]^-$. Wśród grup eliminowanych zidentyfikowano, m.in. wodę (-18 Da), tlenek węgla (-28 Da), dwutlenek węgla (-44 Da), kwas 2,4-dihydroksy-6-metylobenzoesowy (-168 Da) oraz fragmenty o masach: 130 Da, 142 Da, 186 Da, odpowiadające związkom o wzorach sumarycznych, odpowiednio: $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2$,

C₇H₁₄O₂, C₈H₁₄O₂. Monitorowane reakcje fragmentacji wraz z zoptymalizowanymi parametrami charakterystycznymi dla analitów przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Optymalne parametry pracy układu MS/MS dla analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Analit	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
NIV	371,0	281,1	-60	-20	-15
	311,1	281,1	-115	-14	-15
D3G	517,1	427,1	-70	-30	-9
	517,1	247,1	-70	-34	-13
DON	355,0	265,0	-45	-20	-15
	295,0	265,1	-100	-16	-15
¹³ C-DON	370,1	279,1	-50	-22	-15
FUS X	413,0	263,1	-45	-22	-13
	353,0	263,1	-90	-16	-15
NEO	400,1	185,0	56	27	12
	400,2	215,0	51	17	14
15-ADON	356,1	137,0	46	21	8
	339,1	137,1	126	15	10
3-ADON	339,1	231,0	126	17	14
	356,1	231,0	46	21	14
MAS	342,1	107,0	51	23	12
	342,1	265,0	51	13	16
DAS	384,1	229,0	36	21	14
	384,1	307,0	36	19	18
T-2 Triol	400,2	215,0	51	17	14
	400,2	145,0	51	37	10
HT-2	442,2	215,0	61	19	12
	442,2	114,9	61	127	16
¹³ C-HT-2	464,2	229,1	71	19	14
T-2	484,2	185,1	51	33	12
	484,2	214,9	51	27	12
¹³ C-T2	508,2	198,1	86	33	12
ZAL	321,1	277,2	-180	-37	-17
	321,1	303,1	-180	-30	-15
ZEL	319,0	159,9	-170	-40	-9
	319,0	129,9	-170	-44	-17
ZEN	317,0	130,9	-155	-44	-17
	317,0	187,1	-155	-34	-11
¹³ C-ZEN	335,1	140,1	-165	-46	-9

Optymalizację parametrów źródła jonów: ciśnienia gazu osłonowego – CUR, wspomagającego rozpylanie – GS1 i pomocniczego – GS2 (tylko dla ESI), temperatury źródła (TEM), napięcia przyłożonego do igły – IS (tylko dla ESI), natężenia prądu wyładowania koronowego – NC (tylko dla APCI) prowadzono stosując technikę FIA, dla analitów

o najniższym sygnale w danej grupie – zakładając możliwy przemienny tryb pracy spektrometru. W technice FIA wykorzystuje się automatyczny podajnik próbek i pompę HPLC, wprowadzając niewielką ilość próbki roztworu wzorcowego do strumienia potencjalnej fazy ruchomej. Analizę wykonano trójrotnie, dla każdego wybranego analitu i każdej konfiguracji optymalizowanych parametrów. Optymalizację parametrów źródła prowadzono przy następujących wartościach: CUR 20, 25, 30, 35 psi, GS1 30, 35, 40, 45, 50, 55 psi, GS2 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 psi, TEM 350, 400, 450, 500°C, IS -3000, ±3500, ±4000, ±4500, +5000 V, NC ±1, ±3, ±5 µA. Wartości optymalne zostały przedstawione w Tabeli 17.

Tabela 17. Zestawienie optymalnych parametrów źródła jonów dla jonizacji ESI i APCI

Parametr	(-) ESI	(+) ESI	(-) APCI	(+) APCI
CUR [psi]	25	25	25	30
TEM [°C]	500	500	450	450
GS1 [psi]	40	55	45	45
GS2 [psi]	55	55	55	55
IS (ESI) [V]/ NC (APCI) [µA]	-3500	4000	-5	3

5.1.2. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego

Wyniki badań procesu optymalizacji warunków pracy detektora pozwoliły na wstępną selekcję potencjalnych faz ruchomych w analizie chromatograficznej. Na etapie ustalania optymalnych warunków rozdzielania sprawdzono sześć kolumn chromatograficznych (Tabela 18), z których eluowano anality wykorzystując następujące roztwory:

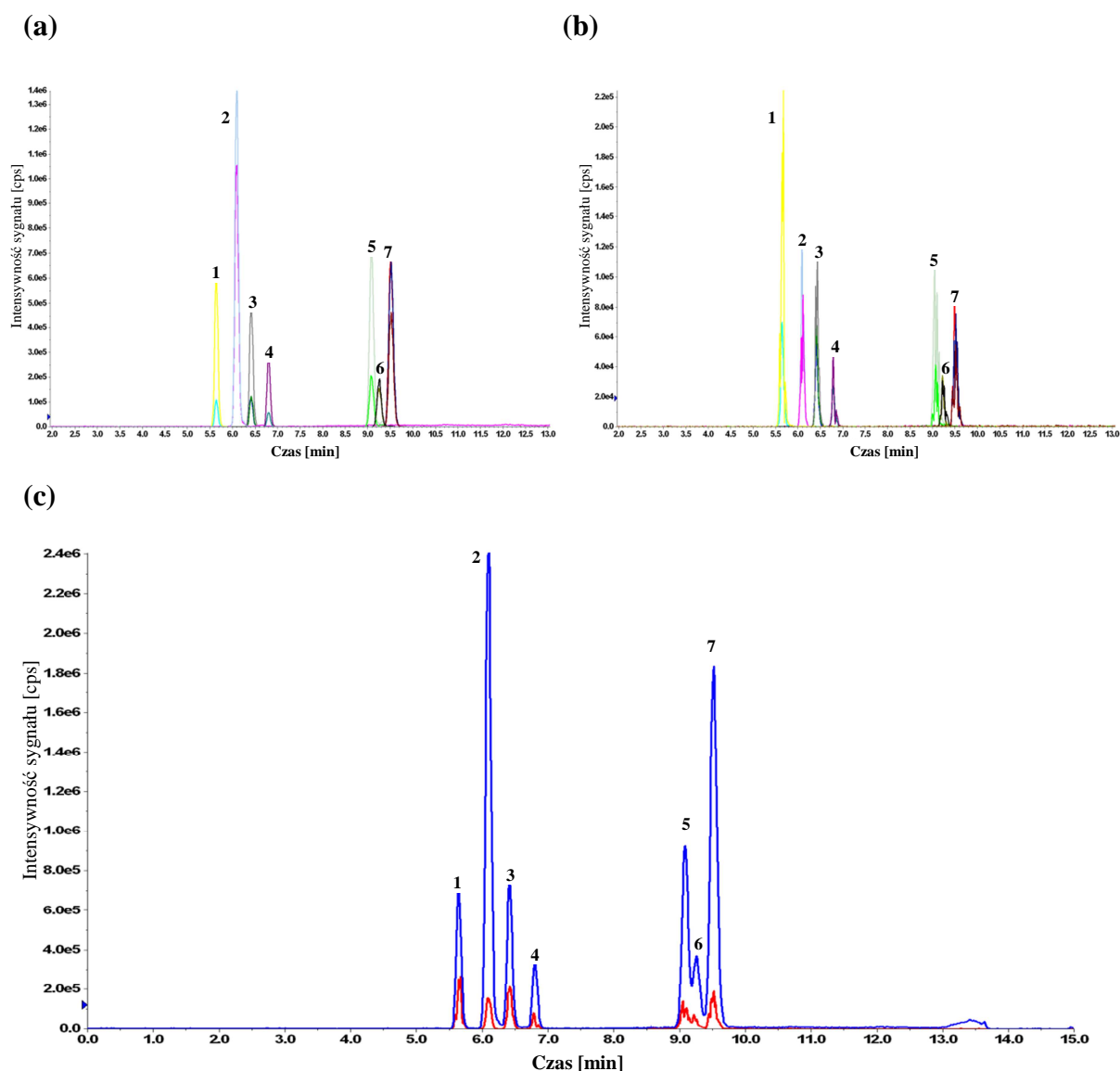
- A: 0,1% CH₃COOH w H₂O z 5mM CH₃COONH₄, B: 0,1% CH₃COOH w ACN z 5mM CH₃COONH₄ (**F1**),
- A: 0,00013% NH₄OH w H₂O z 5mM CH₃COONH₄, B: 0,00013% NH₄OH w ACN z 5mM CH₃COONH₄ (**F2**),
- A: 0,1% CH₃COOH w H₂O z 5mM CH₃COONH₄, B: 0,1% CH₃COOH w MeOH z 5mM CH₃COONH₄ (**F3**),
- A: 0,00013% NH₄OH w H₂O z 5mM CH₃COONH₄, B: 0,00013% NH₄OH w MeOH z 5mM CH₃COONH₄ (**F4**).

Tabela 18. Charakterystyka faz stacjonarnych wykorzystanych w badaniach

Kolumna	Wielkość ziaren wypełnienia (μm)	Rozmiar porów (\AA)	Powierzchnia właściwa sorbentu (m^2/g)	Stopień pokrycia węglem (%)	Stabilność pH	p_{max} (bar)	Wtórna silanizacja (endcapping)	T_{max} ($^{\circ}\text{C}$)
Kinetex C18	2,6	100	200	12	1,5–8,5	600	+	60
Kinetex PFP	2,6	100	200	9	1,5–8,5	600	+	60
Kinetex Phenyl-Hexyl	1,7	100	200	11	1,5–8,5	1000	+	60
Gemini C18	5,0	110	375	14	1–12	245	+	60
ZORBAX Eclipse XDB-C18	5,0	80	180	10	2–9	345	+	60
Chromolith RP-18e	Rozmiar makroporów 2,0	130	300	18	2–7,5	200	+	45

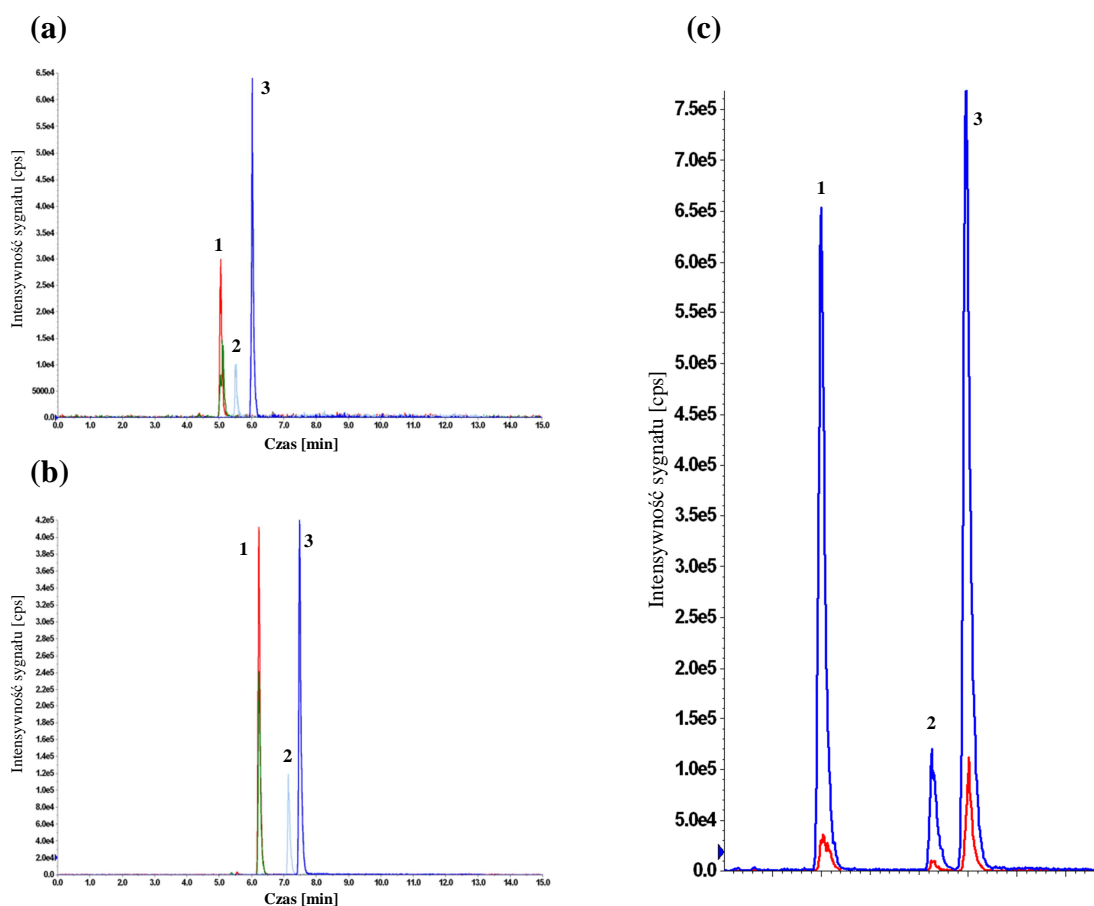
Analizy wstępne przeprowadzono stosując elucję gradientową, o następującym programie: 0-0,5 minuty 20% składnika B; 0,5-5 minuta od 20% do 90% B; 5-10 minuta 90% B; 10-15 minuta 20% B, przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 0,500 ml/min. Przed wprowadzeniem do układu roztworów wzorcowych analitów i każdą zmianą składu fazy ruchomej, kolumny chromatograficzne były kondycjonowane fazą ruchomą o składzie wyjściowym przez minimum 30 minut. Następnie wykonano trzy dozowania roztworu MeOH:H₂O (20:80, v/v). Dla każdego układu faza stacjonarna/faza ruchoma rejestrowano chromatogramy zarówno w trybie tworzenia jonów dodatnich, jak i ujemnych, uwzględniając wyniki etapu optymalizacji pracy spektrometru mas (charakterystyczne reakcje fragmentacji, optymalne wartości parametrów detektora).

Niezależnie od kolumny chromatograficznej i składu fazy ruchomej obserwowano znacznie niższą intensywność (wysokość i pole powierzchni pików) i jakość sygnałów (piki o nieregularnym kształcie), gdy stosowano jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (Rys. 19.), dlatego do dalszych badań zastosowano elektrorozpylanie, jako technikę jonizacji. Ponadto, wykorzystując technikę APCI, w niektórych przypadkach nie obserwowano pików wybranych analitów na chromatogramach: HT-2 i T-2 Triol, 3- i 15-ADON (ZORBAX Eclipse XDB-C18, Chromolith RP-18e, Kinetex C18, Gemini C18; eluenty **F1** i **F2**).



Rys. 19. Porównanie chromatogramów (tryb MRM) otrzymanych w wyniku jonizacji ESI (a) i APCI (b), zarejestrowanych dla mieszaniny wzorcowej w trybie tworzenia jonów ujemnych: NIV (1), D3G (2), DON (3), FUS X (4), ZAL (5), ZEL (6), ZEN (7); (c) nałożenie chromatogramów TIC (całkowity prąd jonowy): ESI (kolor niebieski), APCI (kolor czerwony); kolumna Gemini C18, faza ruchoma F3

Zastosowanie faz ruchomych zawierających ACN (F1 i F2) skutkowało niższą intensywnością sygnałów większości analitów w porównaniu z MeOH, co było szczególnie widoczne w przypadku toksyn HT-2, T-2 Triol oraz 3- i 15-ADON (Rys. 20.). Ponadto, częściej obserwowano rozmycie i asymetryczny kształt pików substancji eluowanych z kolumny jako pierwsze (NIV, D3G, DON, FUS X).

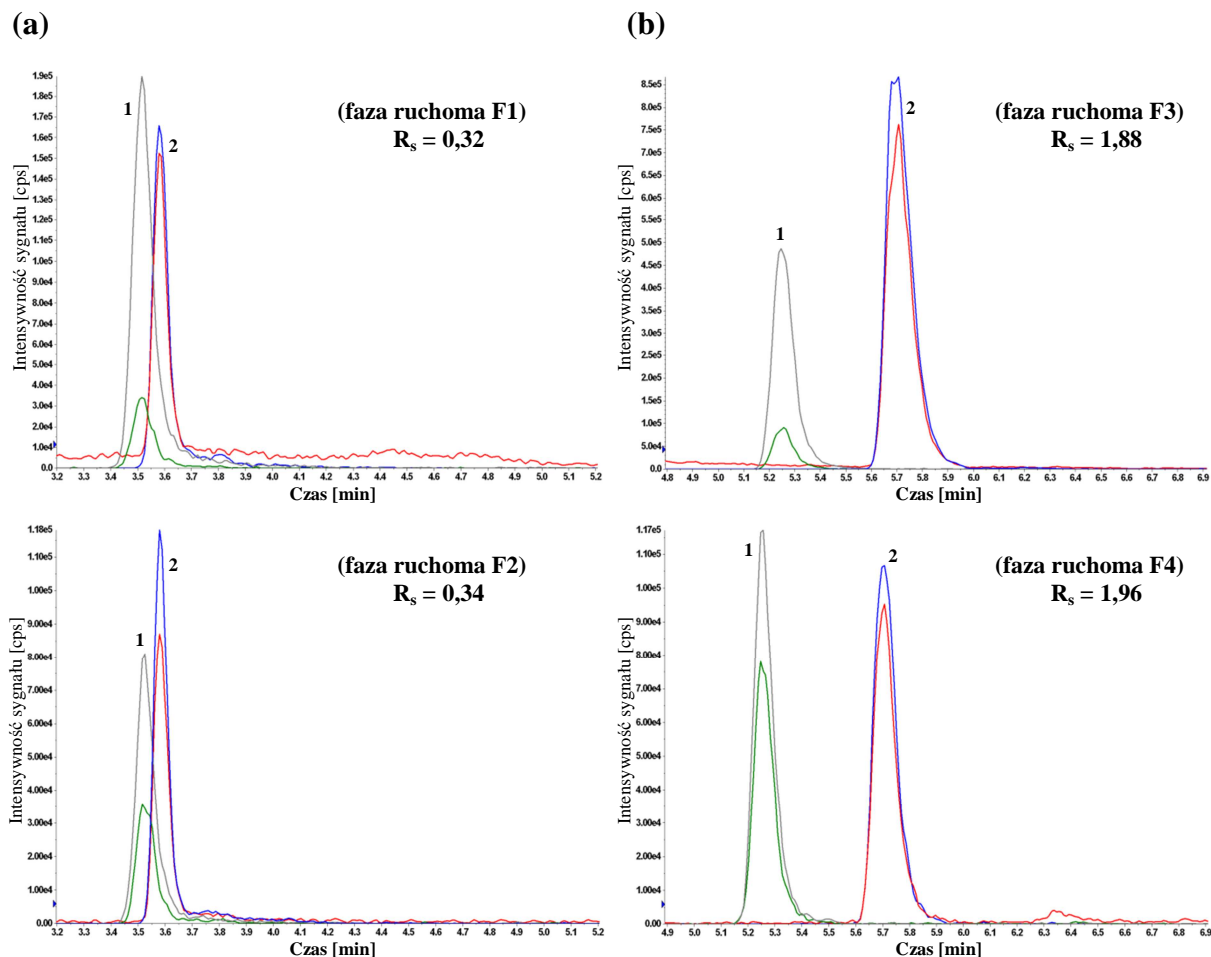


Rys. 20. Porównanie intensywności sygnałów otrzymanych w wyniku zastosowania ACN **(a)** i MeOH **(b)**, jako składników faz ruchomych: fragmenty chromatogramów uzyskanych podczas analizy mieszaniny wzorcowej (tryb tworzenia jonów dodatnich): 3- i 15-ADON **(1)**, T-2 Triol **(2)**, HT-2 **(3)**; **(c)** nałożenie chromatogramów (TIC): kolor niebieski – MeOH, kolor czerwony – ACN, kolumna Chromolith RP-18e, faza ruchoma: **(a) F1**, **(b) F3**

W przypadku faz ruchomych zawierających ACN obserwowano szybsze wymywanie analitów dla każdej z kolumn, co skutkowało krótszymi czasami retencji analitów i niekiedy elucją w czasie martwym (NIV, D3G, kolumna Kinetex Phenyl-Hexyl).

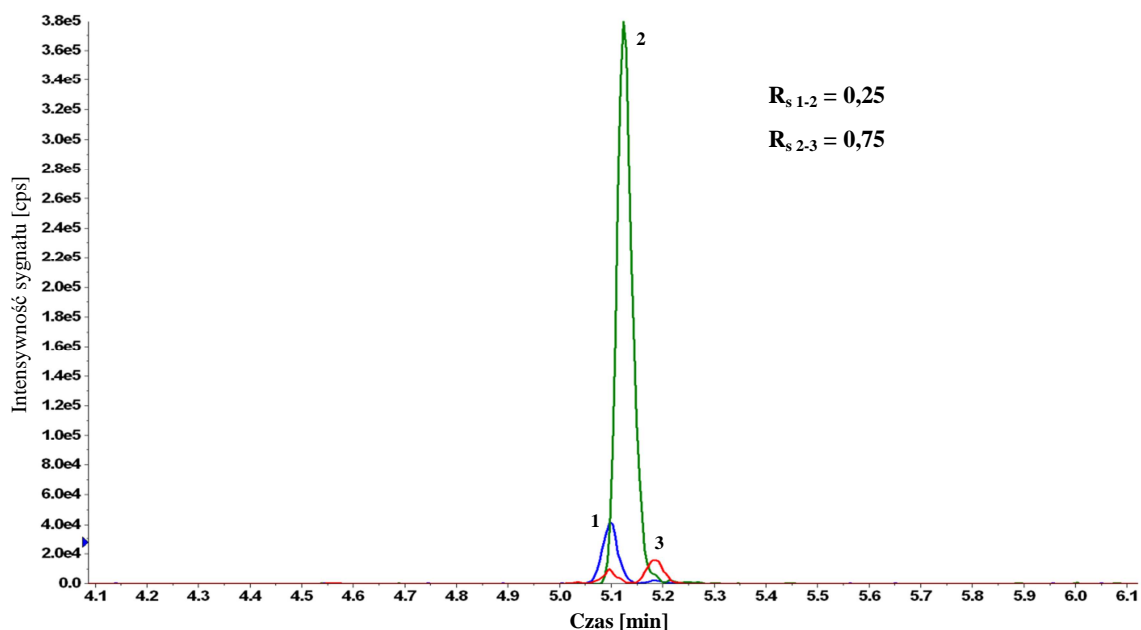
Dane literaturowe wskazują, że zastąpienie metanolu, jako składnika organicznego fazy ruchomej, acetonitrylem pozwala na rozdzielenie (kolumna Alltima C18; 250 mm x 4,6 mm, 5µm; Alltech) dwóch izomerów: 3- i 15-ADON (Genitili i in. 2007). Tymczasem nie zaobserwowano różnic w rozdzieleniu tych analitów przy zastosowaniu ACN w porównaniu z MeOH, w odniesieniu do większości faz stacjonarnych. 3- i 15-ADON były wymywane jednocześnie z kolumn: ZORBAX Eclipse XDB-C18, Chromolith Performance RP-18e (wraz z MAS), Kinetex Phenyl-Hexyl (wraz z MAS), a użycie kolumny Gemini C18 pozwoliło na ich częściowe rozdzielenie. Ponadto, w przypadku zastosowania kolumny ZORBAX Eclipse XDB-C18 obserwowano koelucję HT-2 i DAS oraz ZEL i ZAL, a także częściowe nakładanie

się pików NIV i D3G w układach, w których faza ruchoma zawierała ACN (Rys. 21a.). Przy zastosowaniu faz **F3** i **F4** (MeOH) związki te były dobrze rozdzielone (Rys. 21b.), natomiast stwierdzono nakładanie się pików DAS i T-2 Triol.



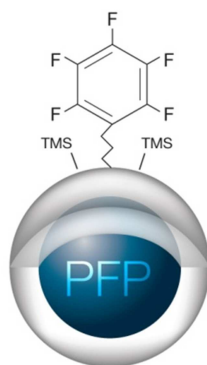
Rys. 21. Porównanie rozdzielania chromatograficznego NIV (1) i D3G (2), w wyniku zastosowania ACN (a) i MeOH (b), jako składników faz ruchomych (kolumna chromatograficzna ZORBAX Eclipse XDB-C18)

Pasma chromatograficzne analitów zarejestrowane podczas użycia kolumny Chromolith Performance RP-18e były szerokie i asymetryczne, obserwowano również ich nakładanie się (np. ZAL i ZEL w **F1** i **F2**, ZEL i ZEN w **F3** i **F4**). Zastosowanie kolumny Kinetex C18 pozwoliło na całkowite rozdzielenie 3- i 15-ADON (**F1** i **F2**), jednakże podczas rejestrowania chromatogramu w trybie jonów dodatnich ich piki pokrywały się z sygnałem MAS (Rys. 22.). Zastosowanie podwójnej spektrometrii mas i trybu MRM – jako techniki detekcji, nie wymaga uzyskania rozdzielania pików, jednakże koelucja analitów może być przyczyną ich wzajemnego oddziaływania na sygnał pomiarowy.



Rys. 22. Przykładowy chromatogram uzyskany podczas analizy mieszaniny wzorcowej (tryb tworzenia jonów dodatnich): 15-ADON (1), MAS (2), 3-ADON (3) (kolumna Kinetex C18, faza ruchoma F1)

Najbardziej korzystne wyniki rozdzielania chromatograficznego otrzymano przy zastosowaniu kolumny Kinetex PFP i eluentów zawierających MeOH. Wypełnienie kolumny Kinetex PFP (Phenomenex) to nowa technologia oparta na sorbencie „core-shell”, którego powierzchnia została zmodyfikowana grupami pentafluorofenyłowymi, przyłączonymi za pomocą krótkich łańcuchów alkilowych (Rys. 23.). Szeroki wachlarz możliwych oddziaływań fazy PFP z analitami pozwala na uzyskanie lepszych wyników rozdzielania chromatograficznego.



Rys. 23. Struktura fazy stacjonarnej Kinetex PFP, Phenomenex

Nie zaobserwowano istotnych różnic w retencji, selektywności i kształcie pików w wyniku modyfikacji składu fazy ruchomej poprzez dodanie roztworów amoniaku lub kwasu

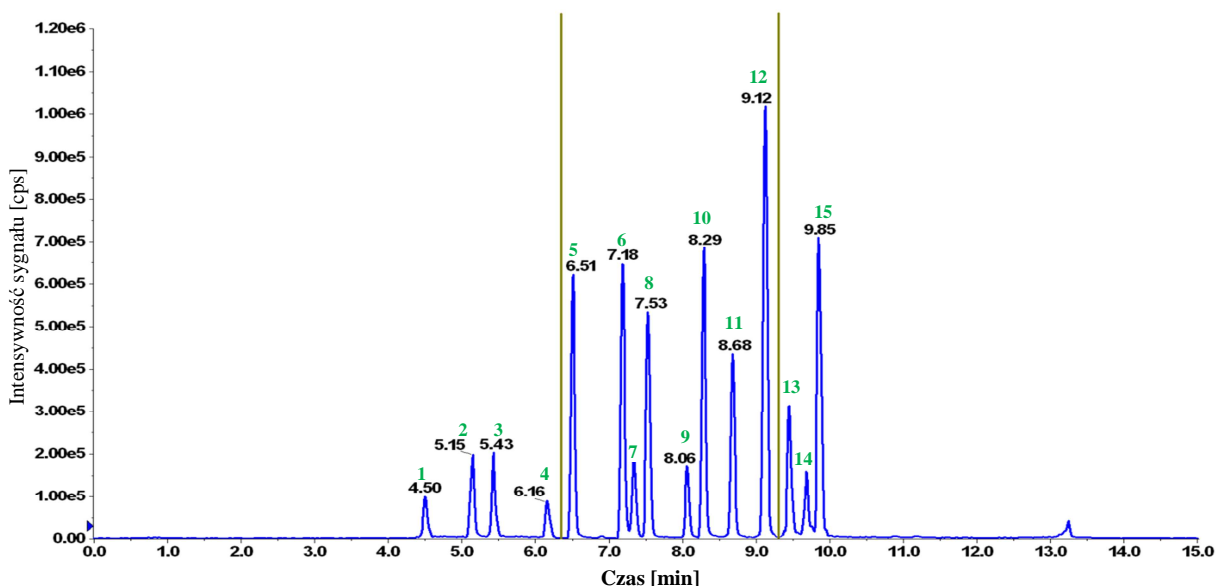
octowego. Rodzaj dodanej substancji wpłynął natomiast na intensywność sygnałów, która w trybie tworzenia jonów ujemnych była od 50 do 100% wyższa w przypadku fazy zawierającej kwas octowy, dlatego do dalszych badań wybrano układ **F3**. Wybór został podyktowany również faktem, że pH fazy zawierającej wodny roztwór amoniaku (**F4**) było zbliżone do górnej granicy zakresu roboczego pH kolumny chromatograficznej, co przy dłuższym stosowaniu w analizie rutynowej może niekorzystnie wpływać na jej żywotność.

Kolejnym etapem badań był dobór programu gradientowego fazy ruchomej, biorąc pod uwagę stopień rozdzielania analitów, zużycie rozpuszczalnika organicznego oraz czas analizy. Modyfikowano początkowy skład fazy ruchomej zmniejszając i zwiększając stężenie składnika organicznego, odpowiednio do 10 i 30%. Wzrost stężenia rozpuszczalnika organicznego w początkowym składzie eluentu powodował wzrost siły elucyjnej fazy ruchomej i zmniejszenie retencji wszystkich analitów. Skrócenie czasów retencji było szczególnie zauważalne dla najbardziej polarnych analitów, eluowanych z kolumny jako pierwsze (Δt_R NIV, D3G > 1 minuty). Dla związków o najmniejszej polarności (najbardziej hydrofobowych) różnice te wynosiły poniżej 0,5 minuty. Wzrost stężenia składnika organicznego z 10 do 20% w fazie ruchomej o początkowym składzie, pozwolił na rozdzielanie 3-ADON i MAS. Dalsze zwiększanie udziału rozpuszczalnika organicznego nie wpłynęło znacząco na poprawę rozdzielania. Badano również efekt szybkości przyrostu stężenia składnika organicznego w fazie organicznej. Programy gradientowe dobierano w sposób zapewniający elucję wszystkich analitów w czasie trwania etapu o najwyższym stężeniu rozpuszczalnika organicznego (90%). Skrócenie czasu przyrostu stężenia składnika organicznego w fazie ruchomej z 4,5 do 2,5 minuty skutkowało skróceniem retencji analitów najbardziej hydrofobowych (Δt_R ZEN > 1,5 minuty), poprawą kształtu pików, ale jednocześnie wpłynęło na obniżenie sprawności układu, czyli rozdzielanie analitów (3- i 15-ADON, 3-ADON i MAS, T-2 triol i DAS, DAS i HT-2). Ponadto, czasy retencji FUS X (tryb tworzenia jonów ujemnych) oraz NEO (tryb tworzenia jonów dodatnich) były jednakowe, co wykluczało opracowanie metody rozdzielania chromatograficznego, wykorzystując zmienny tryb pracy spektrometru. Obniżenie szybkości przyrostu ilości składnika organicznego w fazie ruchomej poprawiło rozdzielanie analitów, ale wydłużyło czas analizy i powodowało poszerzenie i zmniejszenie wysokości pików obserwowanych na chromatogramach. Po wymyciu wszystkich analitów z kolumny prowadzono jej aktywację (końcowy izokratyczny etap programu gradientowego o składzie eluentu identycznym z początkowym składem fazy ruchomej) i dodatkowo zaprogramowano równoważenie kolumny przez każdą analizą

chromatograficzną. Wpłynęło to korzystnie na kształt i szerokość pików analitów o najkrótszych czasach retencji.

Sprawdzano również wpływ temperatury pieca kolumny (w zakresie 20-40°C) na retencję oznaczanych mikotoksyn. Oczekiwane skrócenie czasów retencji wraz ze wzrostem temperatury, spowodowane zmniejszeniem lepkości eluentu, jak i zmniejszenie selektywności były nieznaczne. W wyższej temperaturze następowało zawężenie pików i zwiększenie ich wysokości.

Dobór warunków rozdzielania chromatograficznego (Tabela 19) w połączeniu z wybranymi charakterystycznymi przejściami MRM pozwoliły na opracowanie metody oznaczania wszystkich analitów w ramach jednej analizy chromatograficznej, z zastosowaniem zmiennego trybu pracy spektrometru mas (Rys. 24.).



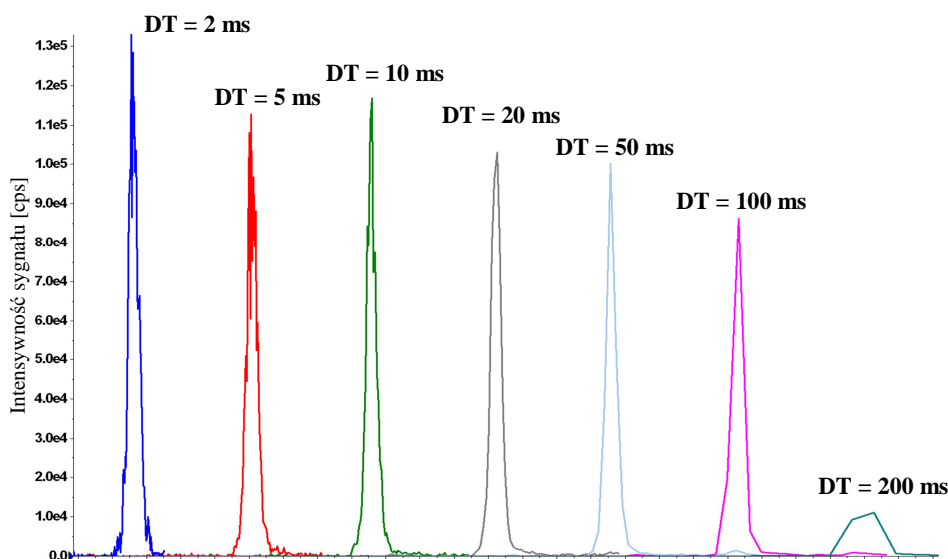
Rys. 24. Chromatogram (TIC) uzyskany w wyniku analizy mieszaniny wzorcowej analitów: NIV (1), D3G (2), DON (3), FUS X (4), NEO (5), 15-ADON (6), 3-ADON (7), MAS (8), T-2 Triol (9), DAS (10), HT-2 (11), T-2 (12), ZAL (13), ZEL (14), ZEN (15), przy zastosowaniu warunków chromatograficznych opisanych w Tabeli 19

Podczas optymalizacji warunków oznaczania mikotoksyn za pomocą techniki LC-MS/MS badano również wpływ wartości czasu monitorowania charakterystycznych przejść (DT – dwell time) na intensywność sygnału analitów (powierzchnia piku) oraz stosunek sygnału do szumu (S/N). Przyjęto wartości DT z zakresu 2 – 200 ms. Dłuższy czas DT sprzyja wzrostowi S/N i poprawie czułości. Z drugiej strony zwiększenie wartości czasu monitorowania jonów obniża liczbę punktów pomiarowych przypadającą na pik, która warunkuje jego kształt (Rys. 25.).

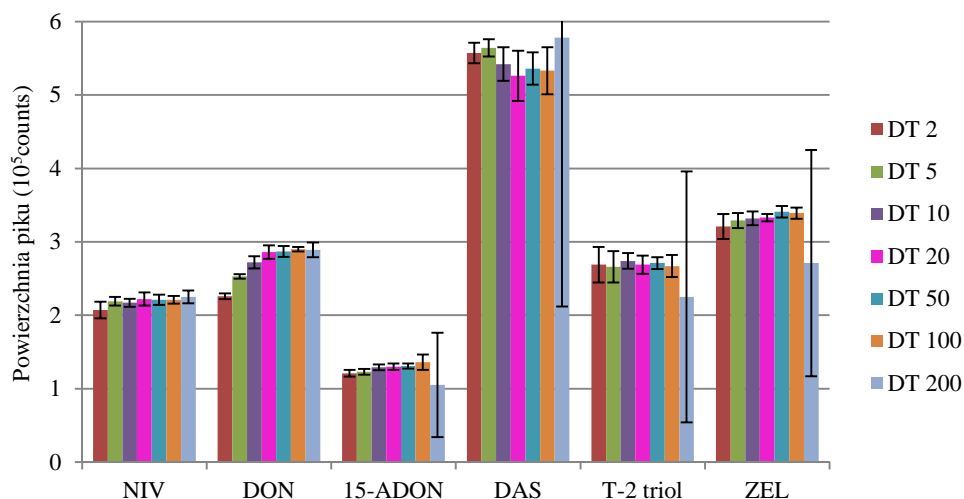
Tabela 19. Warunki prowadzenia procesu rozdzielania chromatograficznego analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Warunki pracy układu chromatograficznego		
Kolumna chromatograficzna	Kinetex PFP 150 mm x 4,60 mm, 2,6 μm T = 40°C	
Objętość dozowanej próbki	5 μl	
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	500 μl/min	
Eluent A	0,1% CH ₃ COOH w H ₂ O z 5mM CH ₃ COONH ₄	
Eluent B	0,1% CH ₃ COOH w MeOH z 5mM CH ₃ COONH ₄	
Gradient elucji	Czas [min]	A:B (% v/v)
	0,00	80:20
	0,20	80:20
	7,00	5:95
	10,00	5:95
	10,10	80:20
	14,90	80:20

Dobierając wielkość DT trzeba uwzględnić ilość monitorowanych przejść w danym okresie zbierania danych. Wpływ różnych wartości DT na wielkość sygnału analitów był zróżnicowany. Zwiększanie wartości DT (najczęściej do 50 ms) skutkowało wzrostem intensywności sygnału, jednakże przyjęcie DT = 200 ms prowadziło w większości przypadków do spadku intensywności sygnału lub/i obniżenia powtarzalności pomiaru powierzchni pików (Rys. 26.). Zostało to spowodowane znacznym obniżeniem wysokości pików w niektórych pomiarach w serii (n = 6), wywołanym „utrata” punktów pomiarowych.

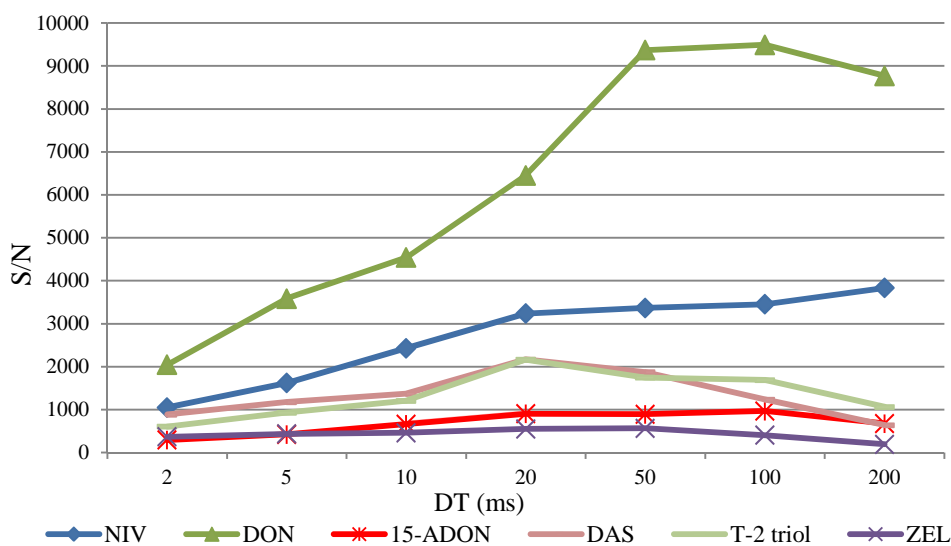


Rys. 25. Kształt i intensywność sygnału toksyny HT-2 dla różnych wartości parametru DT



Rys. 26. Wpływ wartości parametru DT na wielkość pola powierzchni pików wybranych analitów

Wydłużenie czasu DT (w większości przypadków do 50-100 ms) wpłynęło na zwiększenie wartości S/N (Rys. 27.), a efekt ten w poszczególnych grupach analitów kształtował się następująco: trichoteceny B > trichoteceny A > ZEN i jego pochodne. Wybór wartości DT stanowił więc kompromis między najwyższą intensywnością sygnału i wartością S/N, a minimalną liczbą punktów pomiarowych przypadającą na pik, która dla analizy ilościowej wynosi 12-15 punktów (Holčapek i in. 2012).



Rys. 27. Wpływ wielkości DT na wartość stosunku sygnału do szumu (S/N) dla wybranych analitów

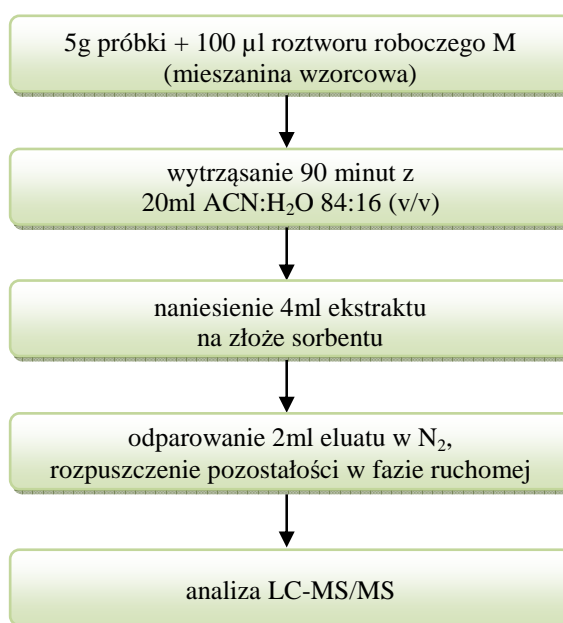
Ostatecznie dla przejść MRM służących analizie ilościowej wybrano wartości DT wynoszące 50 ms (okresy 1 i 3) i 20 ms (okres 2), natomiast dla reakcji fragmentacji potwierdzających tożsamość związków przyjęto czas monitorowania równy, odpowiednio 20 ms i 10 ms.

5.2. Optymalizacja procedury przygotowania próbki z wykorzystaniem techniki SPE

Etap wyboru i optymalizacji procedury jednoczesnej izolacji wielu mikotoksyn z próbek spożywczych o złożonym składzie matrycy jest bardzo ważnym, a zarazem niełatwym zadaniem, co jest związane m.in. ze zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi analitów. W procedurach oznaczania śladowych ilości substancji niezwykle istotne jest oczyszczenie uzyskanych ekstraktów. Zastosowanie uniwersalnej, selektywnej i czulej techniki detekcji (MS/MS) poprzedzonej rozdzielaniem chromatograficznym zakłada możliwość uproszczenia procedury przygotowania próbki, np. poprzez rezygnację z etapu oczyszczania ekstraktu czy wzbogacania analitu (tzw. podejście „dilute-and-shoot”). Takie rozwiązanie jest możliwe, gdy stężenia analitów są względnie wysokie (ze względu na obniżenie granicy wykrywalności i oznaczalności). Stopień oczyszczenia próbki wpływa ponadto na wystąpienie i siłę efektów matrycowych oraz na kondycję i sprawność aparatury, co ma duże znaczenie w oznaczeniach rutynowych. Przeprowadzone wcześniej badania własne pozwoliły na zaobserwowanie znacznego obniżenia czułości detektora (o około 50%), wynikającego z analizy serii próbek nieoczyszczonych ekstraktów kultur grzybowych hodowanych na podłożach o składzie mniej złożonym niż próbki zbożowe. Konieczność jednoczesnego oznaczania związków o zróżnicowanej budowie i właściwościach ogranicza możliwość zastosowania selektywnych technik oczyszczania ekstraktów (np. IAC, MIP). W tym celu sprawdzono wpływ rodzaju kolumnienek SPE (komercyjnych i przygotowanych w laboratorium) na oczyszczanie ekstraktów próbek zbożowych. Zastosowano szerokie spektrum sorbentów, oceniając ich przydatność do adsorpcji zanieczyszczeń bez wstępnego kondycjonowania i przemycia złoża po wprowadzeniu próbki. Część z zastosowanych materiałów jest dedykowana procedurom przygotowania próbki do oznaczania wybranych mikotoksyn, również spoza grupy analitów (np. AF + ZEN, kolumnienki 224 AflaZON i 226 AflaZON+ firmy Romer Labs). W związku z tym badano możliwość ich użycia do oczyszczania ekstraktów próbek zawierających również pozostałe anality.

Z uwagi na handlową niedostępność próbek ślepych (blank samples), w odniesieniu do wszystkich oznaczanych związków, do badań optymalizacyjnych wybrano próbki pszenicy, owsa, kukurydzy i jęczmienia, o zawartości analitów poniżej granicy wykrywalności, wyselekcjonowane podczas analizy próbek zleconych przez podmioty zewnętrzne i dostarczonych do Laboratorium Badawczego Mikotoksyn UKW w Bydgoszczy. Próbki zostały poddane procesowi sterylizacji, którego skuteczność zweryfikowano wykonując posiew kontrolny na obecność grzybów pleśniowych, a następnie, po umieszczeniu

w szczelnych plastikowych pojemnikach, były przechowywane w temperaturze -20°C . W celu związania analitów z matrycą, po dodaniu mieszaniny wzorcowej, próbki były przechowywane przez 24h w zaciemnionym miejscu, w temperaturze pokojowej. Po tym czasie prowadzono ekstrakcję analitów z próbek zgodnie z procedurą przedstawioną na Rysunku 28, a następnie porcje ekstraktu były наносzone na kolumnienki SPE. Po zebraniu i odparowaniu eluatów w strumieniu azotu ($T = 50^{\circ}\text{C}$), pozostałość rozpuszczono w fazie ruchomej 0,1% CH_3COOH w $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (80:20, v/v) z 5mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ i poddano analizie chromatograficznej. Równolegle przygotowano próbki bez dodatku mieszaniny wzorcowej.

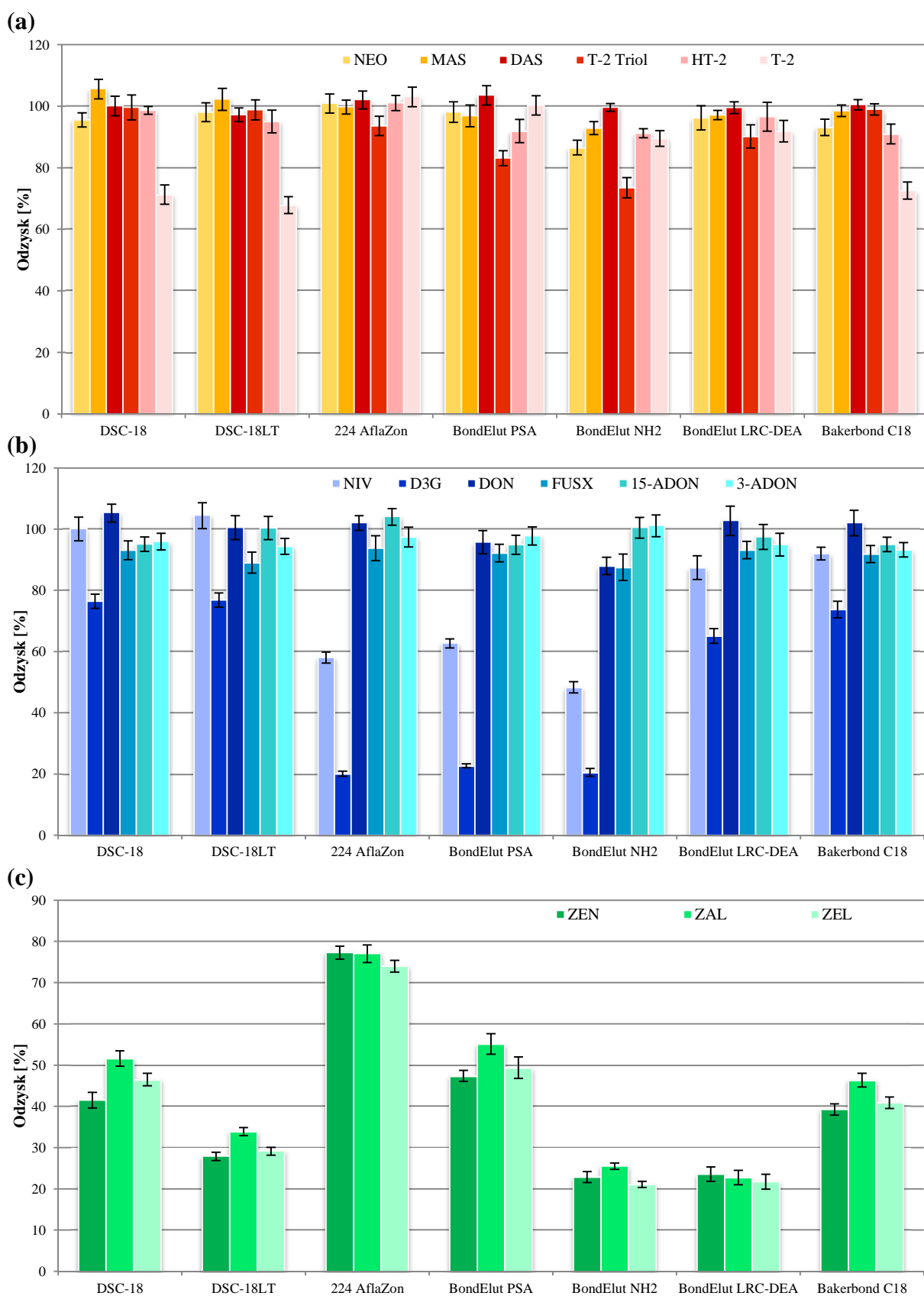


Rys. 28. Schemat procedury stosowanej podczas wyboru optymalnego złoże sorbentu do oczyszczania ekstraktów próbek zbożowych analizowanych na zawartość mikotoksyn fuzaryjnych

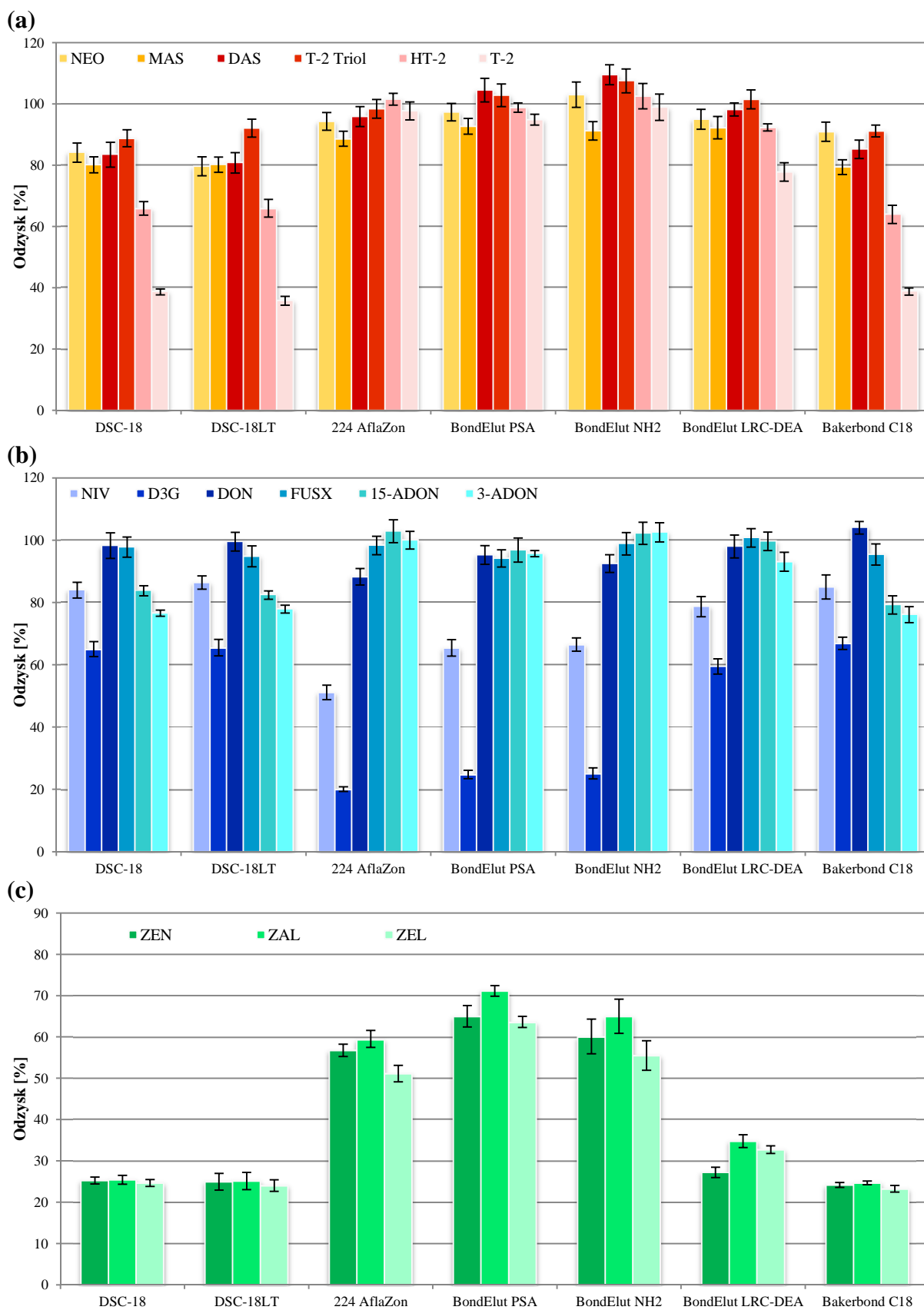
W związku z ograniczoną ilością materiału (kukurydza, jęczmień), zawierającego anality na poziomie poniżej granicy wykrywalności, pierwszy etap badań realizowano w oparciu o analizę próbek pszenicy i owsa. Dla każdej z próbek obliczono odzysk analitów. Na podstawie porównania jego wielkości w pierwszym etapie wyeliminowano sorbenty, dla których wielkość ta była niższa niż 20% przynajmniej dla jednego z analitów, m.in. wymiennicze jonowe: Discovery DSC-SCX – ze względu na odzysk wszystkich trichotecenów z próbek pszenicy (najwyższa wartość 12,5% dla T-2) oraz D3G, FUS X (najwyższa wartość – 17,4%), MAS, T-2 triol, ZEN i pochodnych z próbki owsa; Discovery

DSC-SAX (odzysk D3G, ZEN i ZEL 14-19% dla próbek pszenicy i <5-18% D3G, 3- i 15-ADON, trichoteceny A, ZEN i pochodne – w przypadku próbek owsa); Bond Elut SAX (R_{ZEN} i R_{ZEL} , odpowiednio 16 i 18% dla próbek pszenicy oraz 11% dla próbek owsa); Discovery DSC-WCX ($R_{D3G} = 19$ i 14%, odpowiednio dla próbek pszenicy i owsa) oraz Discovery DSC-NH₂ ($R_{D3G} < 5\%$). Zgodnie z oczekiwaniami odzyski większości trichotecenów były względnie wysokie w przypadku zastosowania kolumniek 225 Trich (57-97% pszenica; 53-101% owies), 216 Trichotecene, 227 Trich+ (77-92% pszenica, za wyjątkiem $R_{NIV} = 35\%$; 63-90% owies, $R_{NIV} = 22\%$) oraz Trichotecene P (71-98% pszenica; 63-102% owies), wyjątek stanowił D3G ($R < 5\%$). Podobnie niski odzysk stwierdzono dla ZEN i jego pochodnych w odniesieniu do wyżej wymienionych materiałów, jak również po użyciu kolumniek przygotowanych w laboratorium. Stężenia mikotoksyn w ekstraktach próbek oczyszczonych z wykorzystaniem kolumniek 226 AflaZON+ stanowiły 41-115% (pszenica) i 49-112% (owies) zawartości analitów w próbkach z dodatkiem wzorca, wykluczając ponownie D3G ($R < 5\%$). Zastosowanie kolumniek wypełnionych polimerem na bazie styrenu modyfikowanym grupami hydrofilowymi (Supel-Select HLB) oraz złożem żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami oktylowymi (DSC-C8) do oczyszczania ekstraktów próbek owsa skutkowało niskimi odzyskami toksyn T-2, ZEN, ZAL i ZEL (15-18%). Dla próbek pszenicy wartości te były około dwukrotnie wyższe. Zbliżone wyniki dla próbek owsa (odzysk T-2, ZEN, ZAL i ZEL < 20%) otrzymano w wyniku użycia kolumniek ze złożem na bazie żelu krzemionkowego z chemicznie związanymi grupami cyjanopropylowymi (DSC-CN) i fenyłowymi (DSC-Ph).

Wyniki dla pozostałych kolumniek SPE (średni odzysk wraz z wartościami odchylenia standardowego w postaci słupków błędów) zostały przedstawione na Rysunkach 29 (pszenica) i 30 (owies). W wyniku zastosowania kolumniek wypełnionych żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami C-18 (DSC-18, DSC-18LT i Bakerbond C18) do oczyszczania ekstraktów uzyskano zbliżone odzyski analitów dla poszczególnych próbek. Zaobserwowano natomiast niższy odzysk toksyn T-2 i HT-2 (o około 30%) oraz NIV i D3G (o około 15%) w przypadku próbek owsa w porównaniu z próbkami pszenicy. Podobnie odzysk ZEN i jego pochodnych z próbek pszenicy był większy (dla kolumniek DSC-18 i Bakerbond C18) w odniesieniu do próbek owsa. Użycie kolumniek DSC-18LT skutkowało zbliżonymi wielkościami odzysku (24-30%) dla obu matryc.



Rys. 29. Średni odzysk analitów ekstrahowanych z próbek **pszenicy** dla wybranych kolumniek SPE: **(a)** trichoteceny A, **(b)** trichoteceny B i **(c)** zearalenon i pochodne; słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; n = 3



Rys. 30. Średni odzysk analitów ekstrahowanych z próbek **owsa** dla wybranych kolumniek SPE: **(a)** trichoteceny A, **(b)** trichoteceny B i **(c)** zearalenon i pochodne; słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; $n = 3$

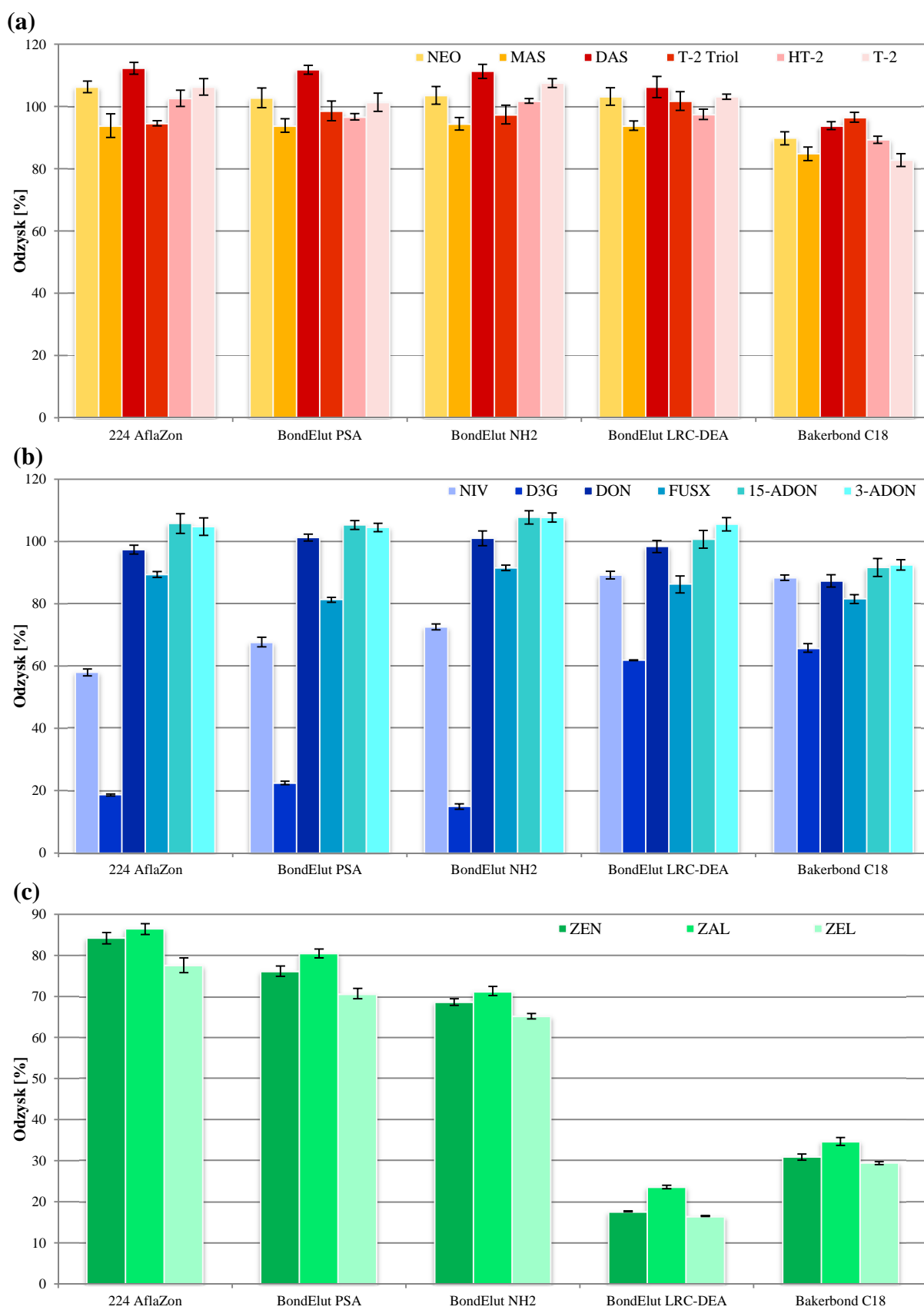
Na podstawie wyników tego etapu kolumnienki podzielono na dwie grupy: względnie wysokiego odzysku D3G (kolumnienki BondElut LRC-DEA, sorbenty C-18) oraz względnie wysokiego odzysku ZEN i pochodnych (kolumnienki 224 AflaZon, BondElut PSA, BondElut NH₂), widoczne w przypadku próbek owsa.

Mając na uwadze możliwe różnice między wielkościami odzysku dla próbek zbóż różnego rodzaju, podczas analizy próbek jęczmienia i kukurydzy, na etapie oczyszczania ekstraktów badaniu poddano wszystkie sorbenty, dla których odzysk analitów z próbek pszenicy i owsa był wyższy niż 20%. Z dalszych badań wyłączono dwa rodzaje kolumnienek C-18 (DSC-18 i DSC-18LT), ze względu na zbliżone wyniki dla próbek pszenicy i owsa. Odzysk analitów z próbek jęczmienia (Rys. 31.) i kukurydzy (Rys. 32.) potwierdza zasadność zaproponowanego wcześniej podziału kolumnienek. Względnie wysoki odzysk trichotecenów A (>82% – jęczmień i >67% – kukurydza) dla każdego z sorbentów spowodował, że kryterium doboru kolumnienki była wartość tego parametru dla D3G oraz ZEN i jego pochodnych, a następnie porównanie odzysku i jego powtarzalności dla trichotecenów B, w tym również dla próbek pszenicy i owsa.

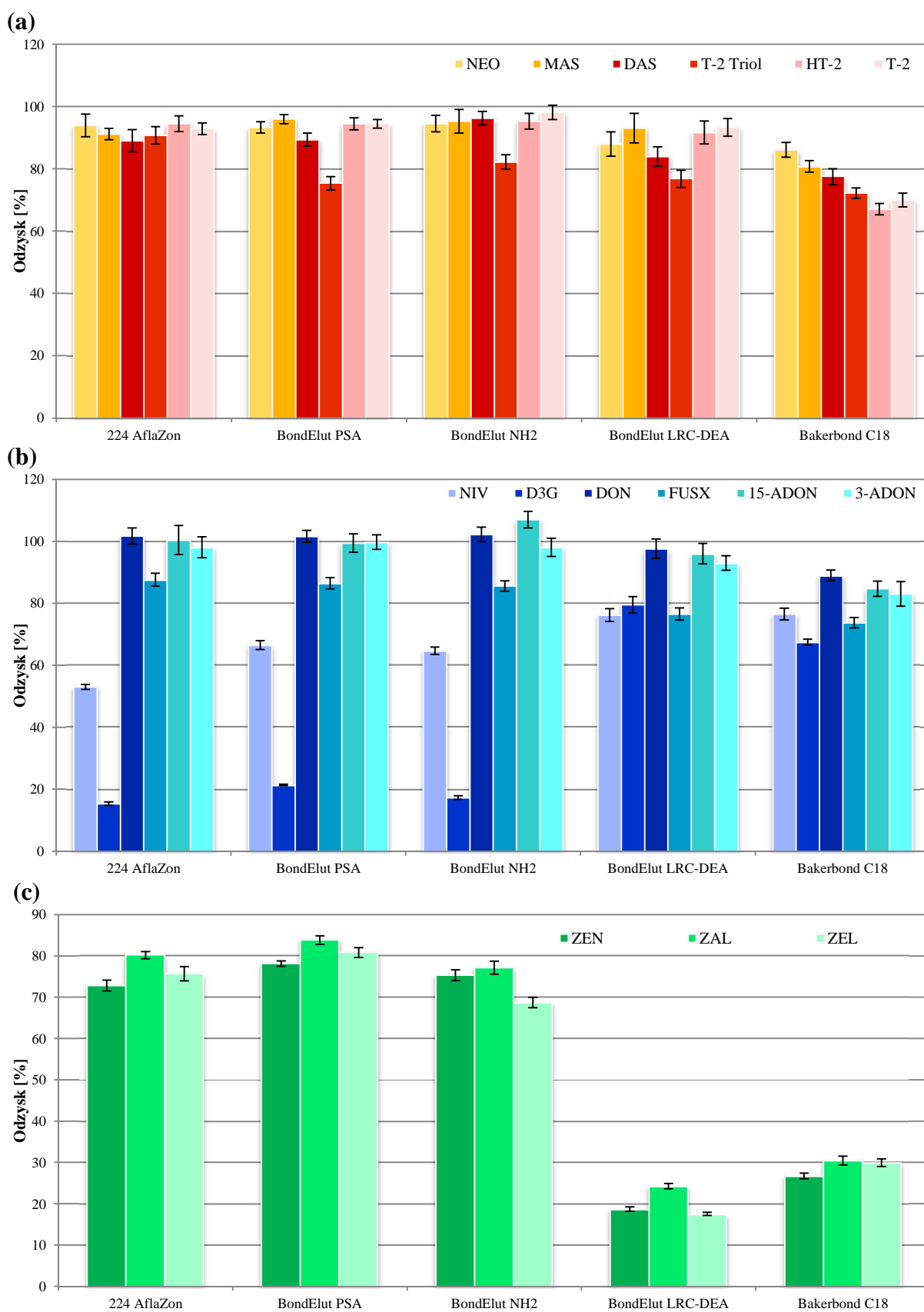
W kolejnym etapie badań nad optymalizacją procedury przygotowania próbki sprawdzono osiem mieszanin ekstrakcyjnych, o następującym składzie:

- ACN:H₂O 90:10 (v/v) (**E1**),
- ACN:H₂O 84:16 (v/v) (**E2**),
- ACN:H₂O 80:20 (v/v) (**E3**),
- ACN:H₂O 75:25 (v/v) (**E4**),
- MeOH:H₂O 90:10 (v/v) (**E5**),
- MeOH:H₂O 84:16 (v/v) (**E6**),
- MeOH:H₂O 80:20 (v/v) (**E7**),
- MeOH:H₂O 75:25 (v/v) (**E8**).

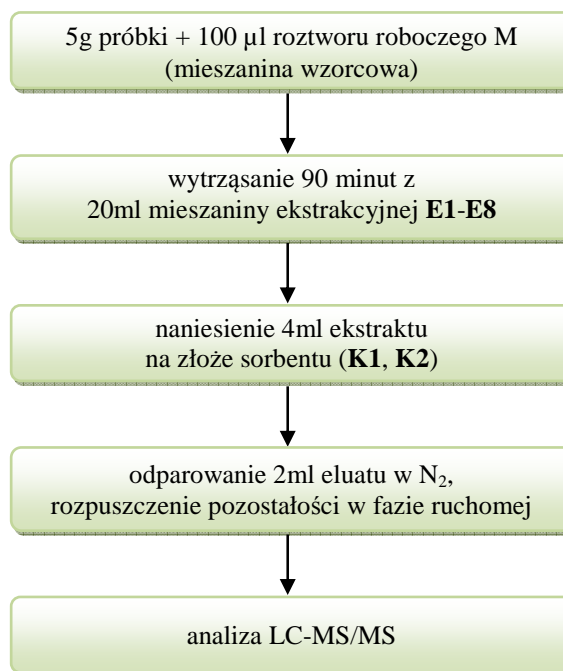
Prowadzono ekstrakcję analitów z próbek pszenicy, owsa, jęczmienia i kukurydzy zgodnie z procedurą przedstawioną na Rysunku 33, wykorzystując dwa wybrane rodzaje kolumnienek SPE: Bakerbond C18 (**K1**) oraz BondElut PSA (**K2**).



Rys. 31. Średni odzysk analitów ekstrahowanych z próbek **jęczmienia** dla wybranych kolumniek SPE: **(a)** trichoteceny A, **(b)** trichoteceny B i **(c)** zearalenon i pochodne; słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; n = 3



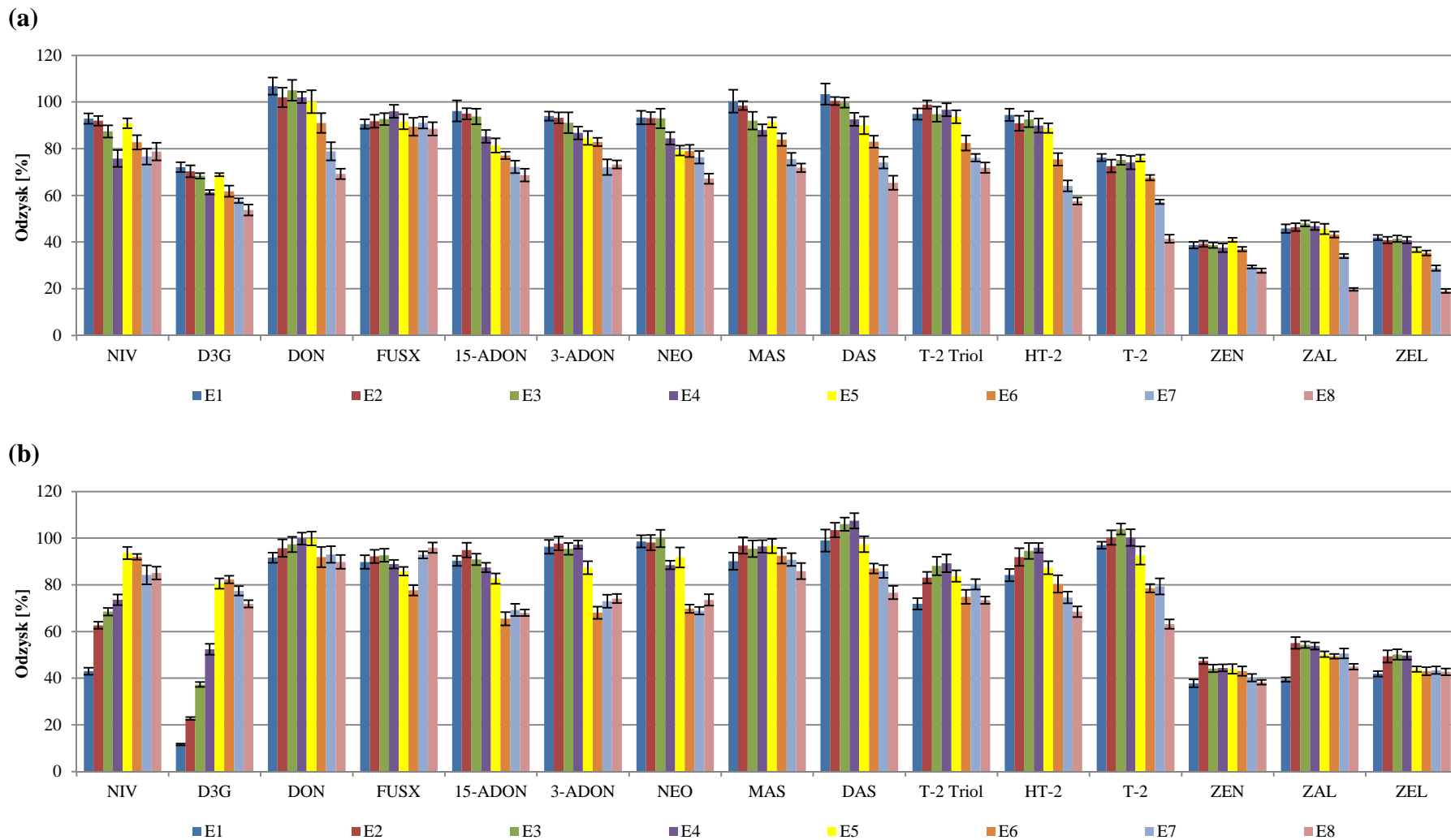
Rys. 32. Średni odzysk analitów ekstrahowanych z próbek **kukurydzy** dla wybranych kolumniek SPE: **(a)** trichoteceny A, **(b)** trichoteceny B i **(c)** zearalenon i pochodne; słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; n = 3



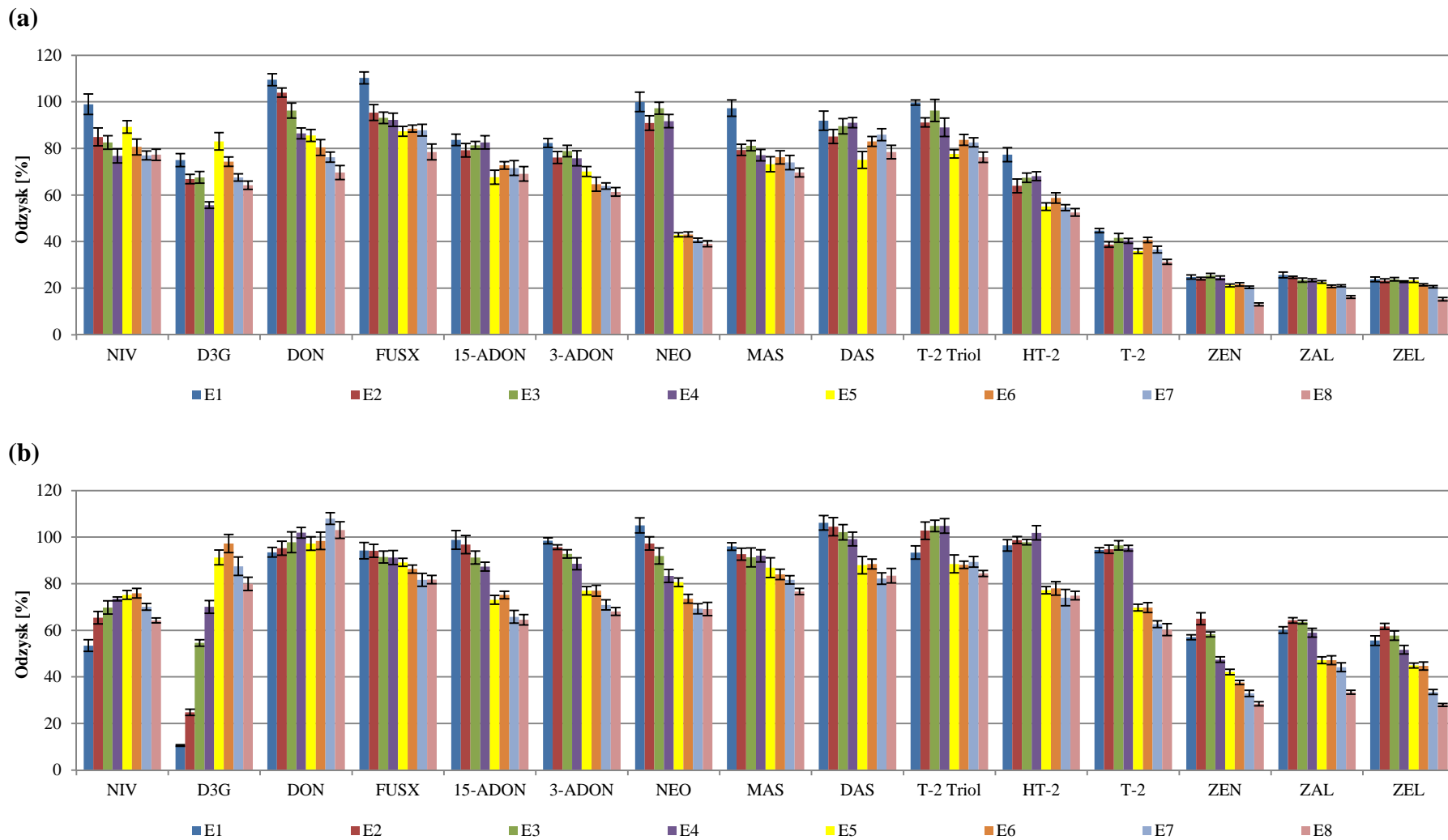
Rys. 33. Schemat procedury stosowanej podczas wyboru optymalnego ekstrahenta do izolacji analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych z próbek zbożowych

Wyniki zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem programów PQStat (wersja 1.4.8.) oraz Statistica (wersja 10). W celu ustalenia istotności różnic dwóch (**K1** i **K2**) wartości średnich odzysku zastosowano test t-Studenta. Porównanie wartości odchyłeń standardowych dla dwóch zbiorów wyników przeprowadzono z wykorzystaniem testu F-Snedecora. W celu określenia istotności różnic wielu wartości średnich odzysku (roztwory ekstrakcyjne) zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla grup niezależnych i test post-hoc Tukeya. W związku z jednakową licznością zbiorów wyników i liczbą zbiorów $k < 12$, wartości odchyłeń standardowych porównywano z wykorzystaniem testu Hartleya (Konieczka i Namieśnik 2007). Przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$ jako znamiennej statystycznie. Średni odzysk analitów z próbek zbóż przedstawiono na Rysunkach: 34 (pszenica), 35 (owies), 36 (jęczmień), 37 (kukurydza). Celem dokonania ostatecznego wyboru kolumny ekstrakcyjnej porównano parami średnie wartości odzysku w każdym układzie z medium ekstrakcyjnym. Dla kolumny **K1** najmniejsze średnie wartości odzysku, niezależnie od zastosowanej mieszaniny ekstrakcyjnej, otrzymano dla ZEN i pochodnych (najniższy odzysk – próbki owsa; około 20% - Rys. 35a.). Odzysk tej grupy analitów z próbek pozostałych zbóż nie przekroczył 50% (Rys. 34a., 36a., 37a.). W przypadku kolumny **K2** najmniejsze średnie wartości odzysku uzyskano dla D3G, gdy do jego ekstrakcji wykorzystano ekstrahenty zawierające ACN, obserwując wzrost odzysku wraz ze spadkiem

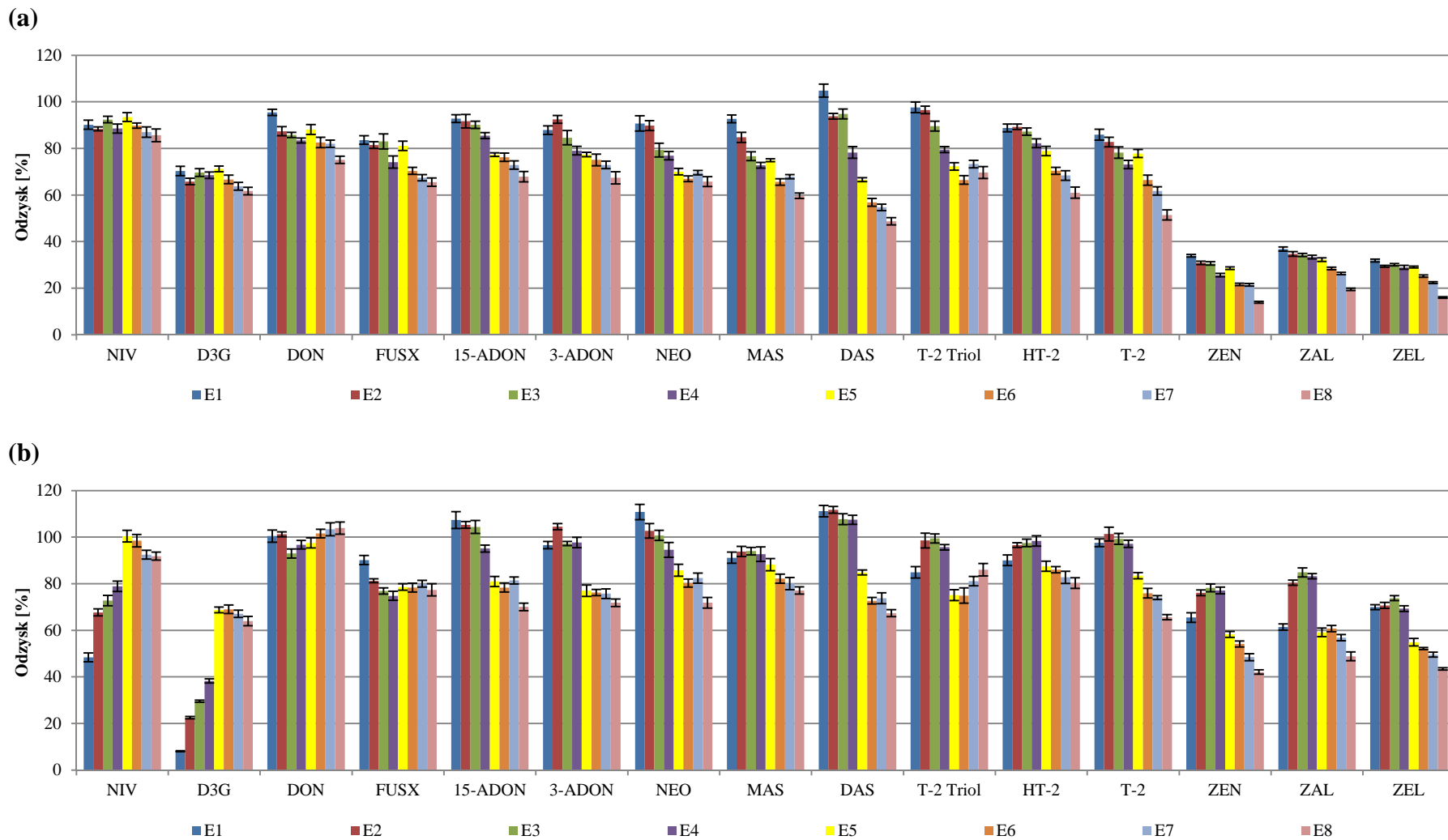
udziału składnika organicznego w mieszaninie ekstrakcyjnej (Rys. 34b. – 37b.). Odzysk ZEN, ZEL i ZAL był wyższy dla kolumnienki **K2**, a różnice wartości średnich (**K1** i **K2**) były statystycznie istotne dla większości z 3x32 układów za wyjątkiem mieszanin ekstrakcyjnych **E1** i **E2** (ZEL i ZAL), **E4** (ZEN), **E5** (ZEN i ZEL) oraz **E6** (ZEL) w przypadku próbek pszenicy. Statystyczną istotność różnic wielkości odzysku stwierdzono również dla D3G. Wyższe R uzyskano dla kolumnienki **K1** i roztworów **E1-E4** (pszenica i jęczmień) oraz **E1-E3** (owies i kukurydza), natomiast niższe dla mieszanin **E5-E8** (pszenica i kukurydza) oraz **E3** i **E6-E8** (owies). Istotny statystycznie wyższy odzysk w wyniku zastosowania kolumnienki **K2** zanotowano ponadto w przypadku DON i HT-2 (owies, kukurydza, jęczmień), 3-ADON (owies i jęczmień), 15-ADON, NEO i DAS (jęczmień), MAS (kukurydza i jęczmień) oraz T-2 (pszenica, oves, kukurydza i jęczmień) dla większości z zastosowanych mieszanin ekstrakcyjnych. W oparciu o uzyskane wyniki do dalszych badań wybrano kolumnienkę **K2** (BondElut PSA). Wyniki analizy statystycznej porównania wartości średnich odzysku dla różnych mieszanin ekstrakcyjnych zostały przedstawione w Tabeli 20. Ujawnione, w wyniku zastosowania testu Tukeya, grupy jednorodne zostały oznaczone literami (a, b, c...). Statystycznie istotne różnice wartości średnich odzysku wraz z największą liczbą grup jednorodnych zaobserwowano w przypadku D3G (wszystkie matryce), a następnie ZEN i NEO (owies, jęczmień, kukurydza) oraz DAS (kukurydza). Rodzaj zastosowanej mieszaniny ekstrakcyjnej nie wpłynął na odzysk DON (wszystkie matryce) oraz ZEL (pszenica). Uwzględniając statystycznie istotne różnice wielkości odzysku do dalszych badań wybrano mieszaninę ekstrakcyjną **E5**.



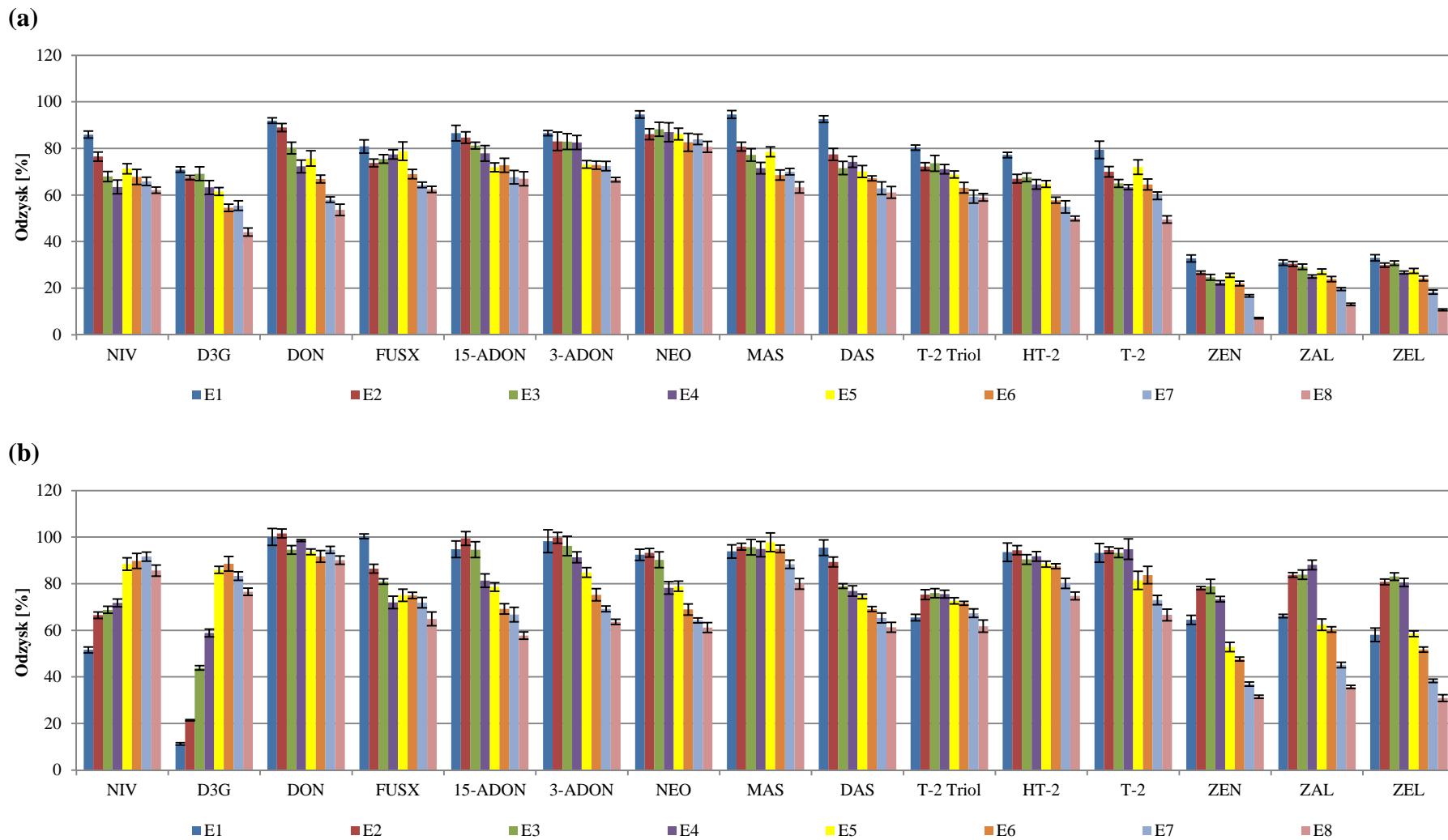
Rys. 34. Wpływ rodzaju mieszaniny ekstrakcyjnej na odzysk analitów z próbek **pszenicy** z zastosowaniem kolumnienki SPE: **(a) K1** (Bakerbond C18); **(b) K2** (BondElut PSA); słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; n = 3



Rys. 35. Wpływ rodzaju mieszaniny ekstrakcyjnej na odzysk analitów z próbek **owsa** z zastosowaniem kolumnienki SPE: **(a)** **K1** (Bakerbond C18); **(b)** **K2** (BondElut PSA); słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; n = 3



Rys. 36. Wpływ rodzaju mieszaniny ekstrakcyjnej na odzysk analitów z próbek **jęczmienia** z zastosowaniem kolumnienki SPE: **(a) K1** (Bakerbond C18); **(b) K2** (BondElut PSA); słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; n = 3



Rys. 37. Wpływ rodzaju mieszaniny ekstrakcyjnej na odzysk analitów z próbek **kukurydzy** z zastosowaniem kolumnienki SPE: **(a) K1** (Bakerbond C18); **(b) K2** (BondElut PSA); słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; n = 3

Tabela 20. Odzysk analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych (kolumnienka SPE K2) w zależności od stosowanej mieszaniny ekstrakcyjnej (E1-E8); n = 3

Analit		Mieszanina ekstrakcyjna							
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
PSZENICA									
NIV	Odzysk [%]	43,0 ^d	62,7 ^b	68,5 ^b	73,6 ^{bc}	93,6 ^a	92,0 ^a	84,3 ^{ac}	85,1 ^{ac}
	SD [%]	3,0	3,0	3,2	4,6	5,3	2,5	8,1	5,4
D3G	Odzysk [%]	11,6 ^c	22,7 ^d	37,3 ^c	52,4 ^f	80,6 ^{ab}	82,3 ^b	77,4 ^{ab}	71,9 ^a
	SD [%]	0,8	1,3	2,1	4,7	4,4	3,2	4,0	3,1
DON	Odzysk [%]	91,6	95,8	97,3	99,9	99,9	91,9	93,0	89,8
	SD [%]	4,4	7,5	6,6	5,1	5,9	8,7	7,2	5,9
FUS X	Odzysk [%]	89,8 ^{ab}	92,2 ^a	92,7 ^a	88,9 ^{ab}	85,9 ^{ab}	77,7 ^b	92,9 ^a	95,9 ^a
	SD [%]	5,9	5,7	5,6	3,7	3,8	4,5	3,0	4,6
15-ADON	Odzysk [%]	90,3 ^a	94,9 ^a	90,9 ^a	87,4 ^a	82,7 ^{ac}	65,5 ^b	69,2 ^{bc}	68,0 ^b
	SD [%]	4,4	6,2	4,8	4,0	4,5	5,7	5,3	2,8
3-ADON	Odzysk [%]	96,4 ^a	97,8 ^a	95,4 ^a	97,3 ^a	87,4 ^{ac}	68,1 ^b	73,0 ^{bc}	74,2 ^{bc}
	SD [%]	5,9	5,9	4,9	3,5	5,5	5,2	5,5	4,0
NEO	Odzysk [%]	98,6 ^a	98,1 ^a	99,9 ^a	88,5 ^{ac}	91,7 ^a	69,7 ^b	68,9 ^b	73,5 ^{bc}
	SD [%]	5,2	6,7	7,5	3,7	8,6	3,6	3,2	4,9
MAS	Odzysk [%]	90,1	96,9	95,5	96,5	96,7	92,5	90,8	85,9
	SD [%]	7,3	7,1	7,1	5,3	6,1	6,8	5,5	6,9
DAS	Odzysk [%]	99,0 ^{ab}	103,5 ^{ab}	106,0 ^b	107,5 ^b	97,5 ^{ab}	87,1 ^{ac}	85,8 ^{ac}	76,7 ^c
	SD [%]	9,5	6,2	5,8	6,6	6,7	4,3	5,5	5,7
T-2 triol	Odzysk [%]	71,9 ^b	83,1 ^{ab}	88,1 ^a	89,2 ^a	83,8 ^{ab}	74,9 ^{ab}	80,2 ^{ab}	73,5 ^{ab}
	SD [%]	4,9	4,9	7,9	7,6	4,9	6,0	4,4	3,1
HT-2	Odzysk [%]	84,2 ^{abc}	91,9 ^a	94,6 ^a	95,9 ^a	87,3 ^{ac}	80,4 ^{abc}	74,6 ^{bc}	68,5 ^b
	SD [%]	5,2	7,6	6,8	4,2	5,7	7,5	4,9	4,6
T-2	Odzysk [%]	97,0 ^a	100,3 ^a	104,0 ^a	100,3 ^a	92,6 ^{ab}	78,5 ^{bc}	79,3 ^b	63,2 ^c
	SD [%]	3,0	6,2	4,7	7,1	7,7	3,6	6,8	4,0
ZEN	Odzysk [%]	37,8 ^a	47,4 ^b	44,2 ^{ab}	44,4 ^{ab}	43,9 ^{ab}	43,0 ^{ab}	40,2 ^{ab}	38,3 ^{ab}
	SD [%]	3,4	2,7	3,2	3,0	4,1	4,0	3,1	2,0
ZAL	Odzysk [%]	39,5 ^c	55,1 ^a	54,3 ^a	53,8 ^{ab}	50,3 ^{ab}	49,4 ^{ab}	50,6 ^{ab}	44,9 ^{bc}
	SD [%]	1,9	4,9	2,8	3,1	2,4	2,0	4,3	2,5
ZEL	Odzysk [%]	41,9	49,4	50,2	49,7	43,8	43,0	43,4	42,7
	SD [%]	2,3	5,2	4,4	3,4	2,3	3,5	3,2	2,9
OWIES									
NIV	Odzysk [%]	53,4 ^c	65,5 ^{ab}	69,8 ^{ab}	73,5 ^{ab}	75,2 ^{ab}	75,9 ^b	70,1 ^{ab}	64,2 ^{ac}
	SD [%]	5,1	5,3	5,7	1,7	3,8	4,1	2,9	2,1
D3G	Odzysk [%]	10,5 ^c	24,8 ^c	54,6 ^d	70,1 ^{de}	91,3 ^{ab}	97,3 ^b	87,5 ^{ab}	80,0 ^{ac}
	SD [%]	0,7	2,7	2,8	5,4	6,4	7,9	7,9	5,7
DON	Odzysk [%]	93,5	95,3	97,8	101,9	97,2	98,4	108,0	103,1
	SD [%]	4,1	6,0	8,9	4,6	5,8	7,5	5,1	7,2
FUS X	Odzysk [%]	94,3	94,2	91,4	87,4	73,1	75,2	65,8	64,5
	SD [%]	7,0	5,6	5,1	6,0	3,4	3,4	5,6	3,6
15-ADON	Odzysk [%]	98,8 ^b	96,9 ^b	91,3 ^b	87,4 ^{bc}	73,1 ^{ac}	75,2 ^{ac}	65,8 ^a	64,5 ^a
	SD [%]	8,0	7,8	5,6	3,7	3,8	3,3	5,4	4,5
3-ADON	Odzysk [%]	98,5 ^b	95,7 ^b	92,8 ^b	88,6 ^b	77,0 ^a	77,0 ^a	70,9 ^a	68,1 ^a
	SD [%]	2,6	2,0	3,5	5,1	3,6	4,7	4,3	3,3
NEO	Odzysk [%]	105,1 ^d	97,3 ^{cd}	91,9 ^{bcd}	83,3 ^{abc}	80,6 ^{ab}	73,6 ^a	69,3 ^a	69,1 ^a
	SD [%]	6,4	5,7	6,8	5,5	3,6	3,8	4,4	5,7
MAS	Odzysk [%]	96,0 ^a	92,7 ^a	91,3 ^{ab}	92,0 ^{ab}	86,9 ^{ab}	84,0 ^{ab}	81,7 ^{ab}	76,7 ^b
	SD [%]	3,2	5,1	8,2	5,2	8,5	4,5	3,5	2,7
DAS	Odzysk [%]	106,2 ^c	104,5 ^{bc}	102,1 ^{bc}	99,2 ^{abc}	88,0 ^{ab}	88,5 ^{ab}	82,3 ^a	83,5 ^a
	SD [%]	6,3	7,7	6,5	5,9	7,4	4,2	4,9	6,3
T-2 triol	Odzysk [%]	93,4 ^{abc}	102,8 ^{bc}	104,8 ^c	104,8 ^c	88,5 ^{ab}	88,1 ^{ab}	89,4 ^{abc}	84,4 ^a
	SD [%]	5,7	7,4	4,8	6,2	7,7	3,2	4,6	2,6
HT-2	Odzysk [%]	96,5 ^b	98,8 ^b	97,9 ^b	101,8 ^b	77,2 ^a	78,0 ^a	74,0 ^a	74,9 ^a
	SD [%]	4,9	3,1	2,4	6,1	3,2	5,8	7,0	3,6
T-2	Odzysk [%]	94,4 ^b	94,9 ^b	96,5 ^b	95,3 ^b	69,8 ^a	69,8 ^a	62,7 ^a	60,3 ^a
	SD [%]	2,0	3,6	4,0	2,4	2,8	4,3	2,9	5,1
ZEN	Odzysk [%]	57,0 ^e	65,0 ^f	58,3 ^{ef}	47,4 ^d	42,1 ^{cd}	37,6 ^{bc}	32,9 ^{ab}	28,5 ^a
	SD [%]	2,1	5,2	2,2	2,3	2,4	1,8	2,7	1,7
ZAL	Odzysk [%]	60,1 ^a	64,3 ^a	63,5 ^a	59,0 ^a	47,2 ^b	47,2 ^b	44,1 ^b	33,4 ^c
	SD [%]	2,7	2,3	1,5	3,7	2,9	3,8	3,8	1,7
ZEL	Odzysk [%]	55,6 ^{bc}	61,7 ^c	57,8 ^{bc}	51,7 ^{ab}	44,9 ^a	44,7 ^a	33,5 ^c	28,0 ^c
	SD [%]	4,1	2,6	4,1	3,7	2,1	3,4	2,1	1,2

a, b, c,... - grupy jednorodne (ANOVA, test Tukeya, przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$)

Tabela 20. c.d.

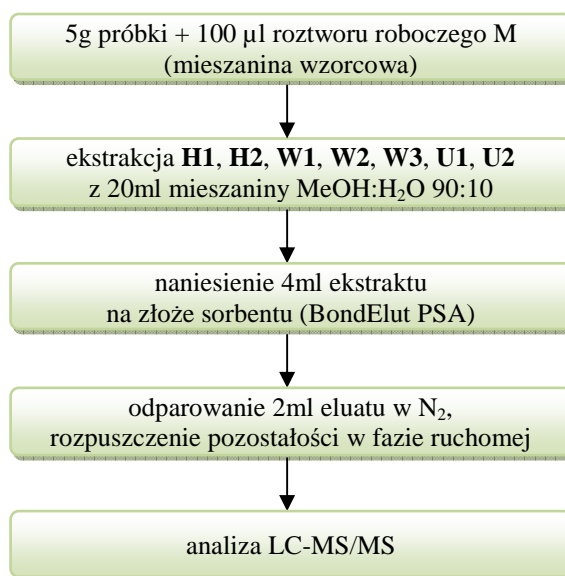
Analit		Mieszanina ekstrakcyjna							
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
JĘCZMIEN									
NIV	Odzysk [%]	48,4 ^c	67,7 ^b	72,8 ^b	78,9 ^b	91,9 ^a	92,4 ^a	98,5 ^a	100,4 ^a
	SD [%]	3,7	3,0	4,5	4,5	4,9	5,3	3,8	3,5
D3G	Odzysk [%]	8,1 ^c	22,5 ^b	29,6 ^b	38,2 ^d	68,7 ^a	69,0 ^a	67,1 ^a	64,0 ^a
	SD [%]	0,4	1,1	1,0	1,8	2,4	3,7	3,1	4,0
DON	Odzysk [%]	100,5	101,3	93,0	96,7	97,5	101,6	103,4	103,9
	SD [%]	5,2	2,1	3,9	3,7	4,3	3,6	5,5	5,2
FUS X	Odzysk [%]	90,2 ^b	81,3 ^{ab}	76,9 ^a	74,9 ^a	78,6 ^a	78,3 ^a	80,0 ^a	77,4 ^a
	SD [%]	3,9	1,6	2,7	3,9	2,8	3,8	2,8	5,3
15-ADON	Odzysk [%]	107,3 ^b	105,3 ^b	104,4 ^b	95,1 ^b	81,0 ^a	78,4 ^a	81,4 ^a	70,1 ^a
	SD [%]	7,2	2,9	5,6	3,0	4,4	3,9	2,9	3,2
3-ADON	Odzysk [%]	96,7 ^b	104,5 ^b	97,3 ^b	97,8 ^b	77,0 ^a	76,2 ^a	75,8 ^a	71,8 ^a
	SD [%]	3,1	2,7	1,7	4,4	4,9	2,7	4,1	3,3
NEO	Odzysk [%]	110,8 ^d	102,8 ^{cd}	100,8 ^{cd}	94,6 ^{bc}	85,8 ^{ab}	80,3 ^{ab}	82,4 ^{ab}	71,9 ^a
	SD [%]	6,6	6,3	4,3	6,4	5,1	3,5	4,3	4,6
MAS	Odzysk [%]	91,2 ^{ab}	93,9 ^a	94,0 ^a	92,7 ^{ab}	88,2 ^{abc}	82,2 ^{abc}	80,1 ^{bc}	77,1 ^c
	SD [%]	4,8	4,3	3,2	6,3	5,2	3,8	5,2	3,1
DAS	Odzysk [%]	111,2 ^a	111,8 ^a	107,7 ^a	107,5 ^a	84,8 ^c	72,7 ^b	73,8 ^b	67,4 ^b
	SD [%]	4,9	2,9	4,7	3,9	2,1	2,8	4,6	3,0
T-2 triol	Odzysk [%]	84,9 ^{ab}	98,6 ^{bc}	99,4 ^c	95,7 ^{bc}	75,1 ^a	74,9 ^a	81,1 ^a	86,1 ^{abc}
	SD [%]	4,9	6,3	3,8	2,3	4,7	6,5	3,9	5,3
HT-2	Odzysk [%]	90,1 ^{abc}	96,7 ^{bc}	97,5 ^b	98,4 ^b	87,5 ^{abc}	86,0 ^{ac}	82,8 ^a	80,3 ^a
	SD [%]	4,6	2,0	3,2	4,5	4,4	2,7	5,2	4,6
T-2	Odzysk [%]	97,6 ^a	101,4 ^a	99,3 ^a	97,2 ^a	83,5 ^c	75,9 ^{bc}	74,1 ^{bc}	65,6 ^b
	SD [%]	3,4	5,9	4,7	3,1	2,6	4,1	1,7	2,2
ZEN	Odzysk [%]	65,5 ^c	76,1 ^a	78,3 ^a	77,1 ^a	58,3 ^{dc}	54,2 ^{cd}	48,5 ^{bc}	42,1 ^b
	SD [%]	4,2	2,5	3,3	3,0	2,6	2,6	3,0	1,9
ZAL	Odzysk [%]	61,4 ^a	80,4 ^b	84,9 ^b	83,2 ^b	59,1 ^a	60,8 ^a	56,8 ^{ac}	48,8 ^c
	SD [%]	2,7	2,2	3,9	2,2	3,7	2,6	2,7	3,8
ZEL	Odzysk [%]	69,9 ^a	70,7 ^a	73,8 ^a	69,4 ^a	54,9 ^b	52,2 ^b	49,5 ^{bc}	43,5 ^c
	SD [%]	2,0	2,5	2,1	2,4	3,2	0,9	2,2	1,0
KUKURYDZA									
NIV	Odzysk [%]	51,6 ^c	65,5 ^b	68,8 ^b	71,7 ^b	88,5 ^a	89,8 ^a	91,7 ^a	85,6 ^a
	SD [%]	2,6	2,8	3,1	3,4	5,3	6,4	3,9	4,8
D3G	Odzysk [%]	11,3 ^c	21,4 ^d	43,9 ^e	58,8 ^f	86,0 ^a	88,6 ^a	83,3 ^{ab}	76,6 ^b
	SD [%]	1,0	0,5	1,9	3,3	3,0	6,2	3,7	3,0
DON	Odzysk [%]	100,1	101,6	94,6	98,5	93,7	91,7	94,6	90,1
	SD [%]	7,2	3,9	3,7	0,7	2,5	5,0	2,9	3,5
FUS X	Odzysk [%]	100,4 ^d	86,5 ^c	80,9 ^{bc}	72,0 ^{ab}	75,1 ^{abc}	75,0 ^{abc}	71,9 ^{ab}	64,9 ^a
	SD [%]	2,0	3,7	2,3	5,3	5,2	2,7	4,4	5,9
15-ADON	Odzysk [%]	94,8 ^{cd}	99,5 ^d	94,6 ^{cd}	81,4 ^{ac}	78,7 ^a	69,2 ^{ab}	66,8 ^{ab}	57,7 ^b
	SD [%]	7,1	5,9	6,7	5,9	3,7	4,4	6,3	3,2
3-ADON	Odzysk [%]	98,3 ^a	99,8 ^a	96,2 ^a	91,4 ^{ad}	84,8 ^{acd}	75,2 ^{bcd}	69,2 ^{bc}	63,7 ^b
	SD [%]	9,8	4,7	8,3	4,7	4,1	5,3	2,5	2,2
NEO	Odzysk [%]	92,5 ^d	93,3 ^d	90,3 ^{cd}	78,2 ^{bc}	78,9 ^{bc}	69,0 ^{ab}	64,2 ^a	61,2 ^a
	SD [%]	4,8	3,6	6,8	5,3	4,3	4,8	2,1	4,2
MAS	Odzysk [%]	93,9 ^{ab}	96,0 ^a	95,7 ^a	94,9 ^{ab}	97,8 ^a	95,0 ^{ab}	88,4 ^{ab}	80,0 ^b
	SD [%]	5,6	2,9	6,7	6,6	8,0	3,2	3,5	4,5
DAS	Odzysk [%]	95,5 ^c	89,4 ^{dc}	79,0 ^d	76,9 ^a	74,6 ^{ac}	69,1 ^{abc}	65,3 ^{bc}	61,3 ^b
	SD [%]	6,7	4,2	2,0	4,4	2,0	2,1	4,2	4,2
T-2 triol	Odzysk [%]	65,5 ^{ac}	75,3 ^{ab}	76,0 ^b	75,6 ^{ab}	72,7 ^{ab}	71,7 ^{abc}	67,3 ^{abc}	61,8 ^c
	SD [%]	2,8	4,3	3,9	3,4	2,7	1,7	3,7	5,3
HT-2	Odzysk [%]	93,5 ^a	94,4 ^a	90,4 ^{ab}	91,8 ^{ab}	88,4 ^{ab}	87,5 ^{ab}	80,2 ^{bc}	74,8 ^c
	SD [%]	7,9	3,8	4,2	4,2	2,5	2,2	4,3	3,2
T-2	Odzysk [%]	93,2 ^a	94,5 ^a	93,2 ^a	94,9 ^a	81,5 ^{ab}	83,7 ^{ab}	73,0 ^b	66,6 ^b
	SD [%]	8,0	2,8	3,9	8,8	7,9	7,4	4,0	5,0
ZEN	Odzysk [%]	64,5 ^d	78,1 ^a	78,9 ^a	73,4 ^{ad}	52,8 ^c	47,7 ^c	36,9 ^b	31,5 ^b
	SD [%]	3,9	1,3	6,0	2,4	4,0	1,7	1,8	1,3
ZAL	Odzysk [%]	66,1 ^a	83,8 ^b	84,0 ^b	88,1 ^b	62,4 ^a	60,3 ^a	45,2 ^d	35,8 ^c
	SD [%]	1,5	2,0	4,0	4,1	4,9	2,3	2,3	1,3
ZEL	Odzysk [%]	58,1 ^a	80,8 ^b	83,1 ^b	80,5 ^b	58,5 ^a	51,8 ^a	38,3 ^c	30,9 ^c
	SD [%]	5,8	2,4	3,3	3,6	2,4	2,3	1,5	2,8

a, b, c, ... - grupy jednorodne (ANOVA, test Tukeya, przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$)

W kolejnym etapie badań porównano różne techniki ekstrakcji analitów z próbek zbożowych. Mając na uwadze ograniczenie czasochłonności i uproszczenie opracowanej procedury analitycznej i możliwość wykorzystania urządzeń powszechnie dostępnych w laboratorium analitycznym, zastosowano w tym celu:

- homogenizację z rozpuszczalnikiem w czasie $t = 1$ min (**H1**),
- homogenizację z rozpuszczalnikiem w czasie $t = 3$ min (**H2**),
- wytrząsanie z rozpuszczalnikiem w czasie $t = 30$ min (**W1**),
- wytrząsanie z rozpuszczalnikiem w czasie $t = 60$ min (**W2**),
- wytrząsanie z rozpuszczalnikiem w czasie $t = 90$ min (**W3**),
- ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami w czasie $t = 5$ min (**U1**),
- ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami w czasie $t = 15$ min (**U2**).

Procedura prowadzenia procesu ekstrakcji została schematycznie przedstawiona na Rysunku 38.



Rys. 38. Schemat procedury stosowanej podczas wyboru optymalnej techniki ekstrakcji do izolacji mikotoksyn fuzaryjnych z próbek zbożowych

Zastosowana technika ekstrakcji nie wpłynęła istotnie na odzysk analitów z próbek pszenicy (Tabela 21). W odniesieniu do pozostałych matryc statystycznie istotne różnice w wielkości odzysku stwierdzono dla wszystkich analitów, z wyjątkiem toksyn T-2 i HT-2 (owies, jęczmień, kukurydza), ZEN (owies, kukurydza), 15-ADON, T-2 Triol (owies) oraz NEO i MAS (kukurydza).

Tabela 21. Odzysk analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w zależności od stosowanej techniki ekstrakcji (H1, H2, W1, W2, W3, U1, U2); n = 3

Analit	Technika ekstrakcji							
	H1	H2	W1	W2	W3	U1	U2	
PSZENICA								
NIV	Odzysk [%]	90,3	89,7	92,4	94,5	93,6	83,7	88,6
	SD [%]	5,1	5,2	6,2	3,7	4,5	5,9	8,3
D3G	Odzysk [%]	78,4	82,4	81,2	84,3	80,6	80,6	78,7
	SD [%]	2,6	4,4	5,6	4,5	4,6	4,5	4,5
DON	Odzysk [%]	90,8	94,3	93,5	95,3	99,9	86,6	91,4
	SD [%]	8,9	7,1	8,6	6,3	7,9	4,7	4,1
FUS X	Odzysk [%]	83,1	87,5	86,2	85,8	85,9	79,6	83,6
	SD [%]	4,0	8,4	5,7	3,0	5,3	5,5	4,6
15-ADON	Odzysk [%]	80,9	84,2	79,3	85,3	82,7	75,9	77,5
	SD [%]	3,8	4,1	2,6	2,1	5,4	5,4	4,0
3-ADON	Odzysk [%]	79,4	83,3	84,3	87,0	87,4	78,7	82,3
	SD [%]	2,2	8,0	8,4	3,9	5,3	7,8	5,2
NEO	Odzysk [%]	86,3	85,2	89,8	89,3	91,7	83,9	86,6
	SD [%]	2,5	4,2	7,2	5,3	6,2	3,2	2,5
MAS	Odzysk [%]	89,8	87,7	91,9	92,2	96,7	84,3	82,8
	SD [%]	3,1	4,2	3,9	4,8	7,1	7,6	4,2
DAS	Odzysk [%]	90,6	94,5	90,9	95,3	97,5	84,3	88,4
	SD [%]	6,2	8,4	5,3	3,0	5,9	6,4	2,8
T-2 triol	Odzysk [%]	85,2	84,6	84,1	87,3	83,8	80,0	83,4
	SD [%]	1,8	3,8	5,0	5,1	4,9	4,7	6,7
HT-2	Odzysk [%]	85,3	88,9	87,9	90,4	87,3	83,3	85,9
	SD [%]	3,0	7,5	4,7	3,2	7,2	4,4	5,4
T-2	Odzysk [%]	87,7	90,6	88,3	91,2	92,6	85,5	89,8
	SD [%]	3,3	4,9	6,4	7,6	5,8	7,0	3,9
ZEN	Odzysk [%]	43,6	46,8	45,2	47,9	43,9	42,1	43,8
	SD [%]	1,9	4,0	1,9	4,0	2,5	3,4	3,4
ZAL	Odzysk [%]	48,3	48,9	52,1	51,2	50,3	44,6	47,8
	SD [%]	2,3	2,2	1,8	3,2	4,5	2,1	3,2
ZEL	Odzysk [%]	45,3	47,9	45,7	48,9	43,8	43,5	46,8
	SD [%]	2,4	4,4	3,7	4,7	4,6	3,0	4,1
OWIES								
NIV	Odzysk [%]	69,9 ^{ab}	74,9 ^{ab}	67,5 ^{ab}	76,5 ^b	75,2 ^{ab}	65,2 ^{ab}	64,4 ^a
	SD [%]	4,4	4,4	4,1	4,5	6,1	3,7	2,1
D3G	Odzysk [%]	81,7 ^{ab}	83,9 ^{ab}	83,9 ^{ab}	89,6 ^a	91,3 ^a	72,4 ^b	77,2 ^{ab}
	SD [%]	5,0	6,1	3,7	3,6	9,8	3,5	3,6
DON	Odzysk [%]	88,5 ^{ab}	90,7 ^{ab}	87,8 ^{ab}	94,4 ^a	97,2 ^a	76,0 ^b	81,5 ^{ab}
	SD [%]	7,1	8,5	7,4	4,9	6,1	3,4	4,1
FUS X	Odzysk [%]	82,1 ^{ab}	85,3 ^{ab}	84,6 ^{ab}	85,2 ^{ab}	89,2 ^b	73,7 ^a	75,3 ^a
	SD [%]	2,6	5,4	4,8	3,5	5,3	6,4	3,9
15-ADON	Odzysk [%]	69,5	74,3	68,8	74,9	73,1	64,2	68,4
	SD [%]	2,5	7,1	4,7	4,0	5,9	2,9	4,1
3-ADON	Odzysk [%]	71,3 ^{ab}	73,6 ^{ab}	67,7 ^{abc}	74,3 ^{ab}	77,0 ^b	58,4 ^c	63,2 ^{ac}
	SD [%]	2,5	2,5	4,2	5,8	1,6	2,9	6,1
NEO	Odzysk [%]	73,5 ^{ab}	80,0 ^a	76,7 ^{ab}	82,2 ^a	80,6 ^a	67,3 ^b	65,3 ^b
	SD [%]	2,2	4,2	6,6	2,9	4,8	3,9	2,5
MAS	Odzysk [%]	77,5 ^{abc}	78,6 ^{ab}	79,4 ^{ab}	83,3 ^a	86,9 ^a	63,3 ^c	67,3 ^{bc}
	SD [%]	4,6	3,6	5,9	7,9	4,8	4,9	3,8
DAS	Odzysk [%]	79,5 ^{abc}	80,8 ^{abc}	78,5 ^{abc}	84,5 ^{bc}	88,0 ^c	70,4 ^{ab}	68,6 ^a
	SD [%]	6,1	7,0	5,6	4,7	6,5	5,2	4,2
T-2 triol	Odzysk [%]	81,8	83,7	82,2	86,2	88,5	73,4	76,4
	SD [%]	5,0	8,2	2,9	7,3	6,4	4,8	6,7
HT-2	Odzysk [%]	69,4	74,4	73,2	79,4	77,2	67,4	73,5
	SD [%]	6,3	6,9	6,1	4,9	3,4	5,0	4,8
T-2	Odzysk [%]	70,0	68,5	67,4	73,2	69,8	67,9	72,2
	SD [%]	6,0	3,3	3,2	3,6	2,6	4,9	4,1
ZEN	Odzysk [%]	37,3	39,6	39,6	43,3	42,1	36,9	39,9
	SD [%]	2,9	3,4	1,9	2,2	3,4	1,8	2,5
ZAL	Odzysk [%]	40,0 ^{ab}	39,0 ^a	42,9 ^{abc}	46,7 ^{bc}	47,2 ^c	40,1 ^{ab}	43,4 ^{abc}
	SD [%]	3,8	3,2	2,2	1,6	1,7	1,3	2,3
ZEL	Odzysk [%]	42,4 ^{ab}	45,3 ^a	43,8 ^{ab}	47,9 ^a	44,9 ^{ab}	39,5 ^b	44,2 ^{ab}
	SD [%]	1,4	2,1	1,6	1,6	1,9	2,4	3,0

a, b, c,.... - grupy jednorodne (ANOVA, test Tukeya, przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$)

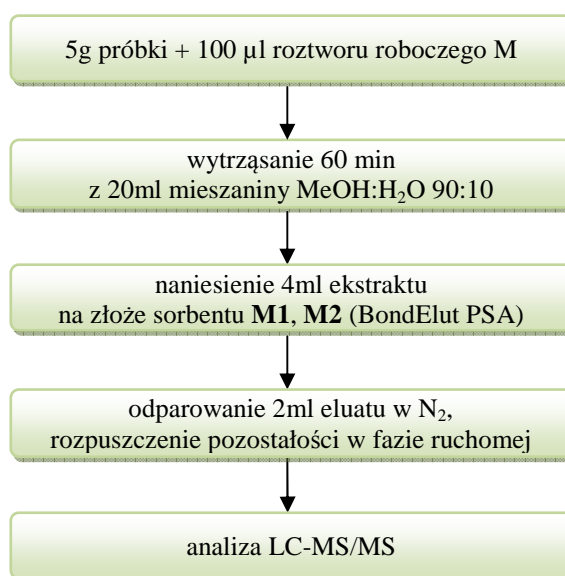
Tabela 21. c.d.

Analit		Technika ekstrakcji						
		H1	H2	W1	W2	W3	U1	U2
JĘCZMIEN								
NIV	Odzysk [%]	85,1 ^{ad}	92,4 ^{ab}	87,6 ^a	96,3 ^{ab}	100,4 ^b	72,1 ^c	74,6 ^{cd}
	SD [%]	3,0	2,3	3,3	4,5	4,5	7,2	5,4
D3G	Odzysk [%]	62,3 ^{ab}	67,3 ^a	64,2 ^a	69,1 ^a	68,7 ^a	53,3 ^b	53,0 ^b
	SD [%]	4,2	3,8	3,4	2,4	3,3	2,7	3,6
DON	Odzysk [%]	85,6 ^{abc}	91,8 ^{abcd}	87,2 ^{abcd}	95,4 ^{cd}	97,5 ^d	79,6 ^a	83,7 ^{ab}
	SD [%]	5,9	5,2	2,0	3,3	2,1	3,2	5,6
FUS X	Odzysk [%]	67,4 ^{abc}	72,3 ^{ab}	71,9 ^{abc}	77,0 ^{ab}	78,6 ^b	59,7 ^c	64,8 ^{ac}
	SD [%]	3,7	5,7	2,4	4,8	1,6	5,5	5,9
15-ADON	Odzysk [%]	72,2 ^{ab}	79,8 ^a	76,3 ^a	78,3 ^a	81,0 ^a	64,8 ^b	65,0 ^b
	SD [%]	1,5	4,8	2,1	4,7	2,2	3,8	1,8
3-ADON	Odzysk [%]	72,7 ^{ab}	74,0 ^{ab}	72,4 ^{ab}	79,7 ^b	77,0 ^{ab}	66,8 ^{ab}	65,3 ^a
	SD [%]	1,7	4,1	4,3	7,1	2,0	5,3	6,5
NEO	Odzysk [%]	76,2 ^{ab}	76,0 ^{ab}	76,6 ^{ab}	85,0 ^b	85,8 ^b	63,5 ^a	68,4 ^a
	SD [%]	3,8	6,9	3,9	4,0	5,2	3,5	6,7
MAS	Odzysk [%]	79,4 ^{ab}	85,3 ^a	83,0 ^{ab}	87,4 ^a	88,2 ^a	71,7 ^b	75,0 ^{ab}
	SD [%]	7,0	8,1	1,7	3,3	4,0	2,3	3,8
DAS	Odzysk [%]	80,0	80,8	81,8	86,7	84,8	76,0	75,0
	SD [%]	7,0	3,8	3,6	2,5	3,2	6,6	4,6
T-2 triol	Odzysk [%]	65,5 ^{ab}	74,8 ^a	72,3 ^a	75,6 ^a	75,1 ^a	59,7 ^b	65,9 ^{ab}
	SD [%]	4,4	5,1	2,6	2,1	4,8	2,1	3,5
HT-2	Odzysk [%]	84,1	85,4	83,8	85,3	87,5	82,9	86,5
	SD [%]	4,0	7,2	3,8	4,9	2,8	4,3	7,1
T-2	Odzysk [%]	82,1	84,3	80,1	87,6	83,5	80,1	84,7
	SD [%]	3,3	4,3	2,2	3,3	4,8	7,9	6,2
ZEN	Odzysk [%]	48,6 ^b	51,0 ^{ab}	51,6 ^{ab}	57,9 ^a	58,3 ^a	50,4 ^{ab}	52,2 ^{ab}
	SD [%]	3,1	2,5	1,5	3,5	1,9	3,7	2,8
ZAL	Odzysk [%]	46,2 ^{ab}	44,8 ^b	50,0 ^{ab}	56,3 ^{cd}	59,1 ^d	51,1 ^{ac}	50,8 ^{ac}
	SD [%]	1,6	2,1	1,8	1,5	1,6	2,4	2,7
ZEL	Odzysk [%]	44,7 ^a	46,0 ^a	50,2 ^{ab}	55,6 ^b	54,9 ^b	48,5 ^{ab}	51,2 ^{ab}
	SD [%]	4,3	3,1	2,4	2,9	2,0	1,7	2,2
KUKURYDZA								
NIV	Odzysk [%]	76,5 ^{abc}	80,3 ^{abc}	82,5 ^{abc}	91,3 ^c	88,5 ^{bc}	69,5 ^a	74,7 ^{ab}
	SD [%]	7,2	5,1	4,9	2,9	3,8	6,4	6,2
D3G	Odzysk [%]	77,2 ^{ab}	76,3 ^{abc}	78,9 ^{ab}	83,1 ^a	86,0 ^a	63,3 ^c	67,4 ^{bc}
	SD [%]	6,4	3,2	4,4	7,8	1,9	2,9	3,4
DON	Odzysk [%]	81,0 ^{ab}	83,7 ^{abc}	84,9 ^{abc}	96,3 ^c	93,7 ^{bc}	77,3 ^a	76,0 ^a
	SD [%]	5,5	4,0	3,3	5,5	3,6	7,7	6,7
FUS X	Odzysk [%]	76,5 ^a	75,8 ^{ab}	74,0 ^{ab}	80,6 ^a	75,1 ^{ab}	65,7 ^b	73,5 ^{ab}
	SD [%]	4,2	3,0	2,5	4,4	3,2	3,9	4,9
15-ADON	Odzysk [%]	73,6 ^{ab}	77,2 ^{ab}	72,8 ^{ab}	82,6 ^b	78,7 ^{ab}	69,3 ^{ab}	67,8 ^a
	SD [%]	3,4	5,4	7,3	4,3	4,7	4,5	4,7
3-ADON	Odzysk [%]	72,2 ^{abc}	77,8 ^{ab}	79,8 ^{ab}	83,2 ^a	84,8 ^a	63,9 ^c	69,6 ^{bc}
	SD [%]	5,3	3,5	4,5	6,6	4,0	6,1	3,3
NEO	Odzysk [%]	70,9	72,2	69,3	79,7	78,9	68,5	70,0
	SD [%]	4,3	5,3	2,8	4,0	4,1	4,3	5,1
MAS	Odzysk [%]	89,5	91,0	87,3	96,3	97,8	85,2	84,6
	SD [%]	7,8	4,3	7,2	6,0	4,0	4,4	6,6
DAS	Odzysk [%]	73,3 ^{ab}	73,0 ^{ab}	71,9 ^{ab}	77,3 ^b	74,6 ^{ab}	64,4 ^a	68,9 ^{ab}
	SD [%]	2,6	3,2	6,3	4,2	3,5	1,4	3,5
T-2 triol	Odzysk [%]	67,3 ^{ab}	73,8 ^{ab}	72,3 ^{ab}	77,9 ^b	72,7 ^{ab}	63,5 ^a	68,4 ^{ab}
	SD [%]	4,1	3,5	4,7	7,2	4,1	4,8	4,2
HT-2	Odzysk [%]	77,9	85,8	83,4	88,0	88,4	80,5	83,6
	SD [%]	3,4	5,3	5,8	4,4	3,6	7,4	4,7
T-2	Odzysk [%]	78,8	80,5	82,6	82,9	81,5	76,2	80,9
	SD [%]	3,3	4,1	3,2	4,4	3,4	4,0	3,4
ZEN	Odzysk [%]	49,8	48,6	48,6	55,2	52,8	50,0	52,6
	SD [%]	4,3	4,4	3,5	3,2	2,9	1,9	3,1
ZAL	Odzysk [%]	50,5 ^a	52,9 ^a	55,2 ^{ab}	62,1 ^b	62,4 ^b	53,4 ^a	51,9 ^a
	SD [%]	1,9	2,3	4,5	2,3	1,5	3,2	2,9
ZEL	Odzysk [%]	52,6	51,6	55,1	57,3	58,5	50,7	55,2
	SD [%]	3,5	4,7	4,3	1,9	1,7	4,1	4,8

a, b, c,... - grupy jednorodne (ANOVA, test Tukeya, przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$)

Podobnie do wyników porównania różnych technik ekstrakcji ZEN z próbek kukurydzy (Pallaroni i von Holst 2003), zwiększenie wydajności procesu związane ze wspomaganie ultradźwiękami nie zostało zaobserwowane. W wielu przypadkach odzysk analitów był istotnie niższy w porównaniu z pozostałymi technikami, co może być związane z częściową degradacją analitów podczas procesu (Santos i in. 2009). Wydłużenie czasu prowadzenia ekstrakcji prowadziło zazwyczaj do zwiększenia wielkości odzysku, nie mniej jednak w przypadku homogenizacji z rozpuszczalnikiem i sonikacji różnice te nie były istotne statystycznie. Istotnie wyższy odzysk niektórych analitów (np. NIV i ZAL z próbek jęczmienia) zaobserwowano podczas zwiększania czasu prowadzenia procesu ekstrakcji rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie. Porównanie technik ekstrakcji ujawniło ponadto istotne statystycznie różnice w wielkości odzysku: DON (techniki **H1** i **W3**, jęczmień oraz **H1** i **W2**, kukurydza), ZEN (techniki **H1** i **W2** oraz **H1** i **W3**, jęczmień), ZAL (techniki **H1** i **W2**, **H1** i **W3**, **H2** i **W2**, **H2** i **W3**, jęczmień i kukurydza), a także ZEL (techniki **H1** i **W2**, **H1** i **W3**, **H2** i **W2**, **H2** i **W3**, jęczmień). Biorąc pod uwagę wyniki analizy statystycznej, czasochłonność wykorzystanych technik, jak również możliwość jednoczesnego prowadzenia procesu dla większej liczby próbek, za optymalną technikę ekstrakcji uznano wytrząsanie z rozpuszczalnikiem w czasie 60 minut (**W2**).

Kolejnym parametrem, który może wpływać na wielkość odzysku analitów, jest masa sorbentu wykorzystanego jako wypełnienie kolumnienek do oczyszczania ekstraktu z zastosowaniem techniki SPE. W celu określenia tego efektu zbadano kolumnienki BondElut PSA, wypełnione 500mg (**M1**) oraz 1000mg (**M2**) sorbentu, zgodnie z procedurą przedstawioną na Rysunku 39.



Rys. 39. Schemat procedury stosowanej podczas określenia wpływu masy sorbentu SPE na odzysk analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Różnice w wartościach średnich odzysku ZEN, ZAL i ZEL (Tabela 22) dla każdej z matryc (pszenica, owies, jęczmień i kukurydza) były istotne statystycznie. Średni odzysk wymienionych analitów był wyższy w przypadku zastosowania kolumnienki wypełnionej sorbentem o masie **M1**, w zakresie: ZEN – od 8,8% (owies) do 15,4% (pszenica), ZAL – od 10,1% (jęczmień) do 19,8% (kukurydza), ZEL – od 13,0% (pszenica) do 13,4% (kukurydza). W przypadku próbek jęczmienia zanotowano również istotnie wyższy odzysk D3G, DAS oraz T-2 Triol. Dlatego też, w dalszych doświadczeniach wykorzystano kolumnienki SPE **M1** (BondElut PSA, 500mg).

Tabela 22. Odzysk analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w zależności od masy sorbentu SPE; n = 3

Analit		Masa sorbentu (kolumnienka SPE)							
		M1		M2		M1		M2	
		PSZENICA		OWIES		JĘCZMIEŃ		KUKURYDZA	
NIV	Odzysk [%]	94,5	91,1	76,5	75,8	96,3	91,3	91,3	85,3
	SD [%]	3,7	5,3	4,5	3,5	4,5	3,3	2,9	4,0
D3G	Odzysk [%]	84,3	84,6	89,6	84,5	69,1 ^a	62,3 ^b	83,1	78,5
	SD [%]	4,5	5,7	3,6	4,5	2,4	2,6	7,8	5,0
DON	Odzysk [%]	95,3	90,4	94,4	89,8	95,4	92,4	96,3	94,6
	SD [%]	6,3	4,1	4,9	5,6	3,3	4,2	5,5	6,0
FUS X	Odzysk [%]	85,8	86,7	85,2	85,7	77,0	73,3	80,6	82,1
	SD [%]	3,0	3,7	3,5	3,9	4,8	3,4	4,4	3,5
15-ADON	Odzysk [%]	85,3	80,0	74,9	76,7	78,3	80,0	82,6	77,4
	SD [%]	2,1	2,6	4,0	4,8	4,7	5,9	4,3	3,5
3-ADON	Odzysk [%]	87,0	85,3	74,3	69,5	79,7	75,2	83,2	84,6
	SD [%]	3,9	4,8	5,8	4,4	7,1	4,2	6,6	3,0
NEO	Odzysk [%]	89,3	84,3	82,2	83,3	85,0	84,4	79,7	75,5
	SD [%]	5,3	3,7	2,9	3,3	4,0	4,7	4,0	3,8
MAS	Odzysk [%]	92,2	85,8	83,3	78,3	87,4	84,7	96,3	93,1
	SD [%]	4,8	3,1	7,9	6,1	3,3	4,4	8,0	6,8
DAS	Odzysk [%]	95,3	87,5	84,5	84,3	86,7 ^a	79,8 ^b	77,3	73,5
	SD [%]	3,0	5,1	4,7	3,6	2,5	3,4	4,2	3,2
T-2 triol	Odzysk [%]	87,3	88,5	86,2	82,1	75,6 ^a	70,3 ^b	77,9	76,0
	SD [%]	5,1	3,4	7,3	3,5	2,1	2,3	7,2	5,6
HT-2	Odzysk [%]	90,4	85,4	79,4	77,5	85,3	83,4	88,0	82,5
	SD [%]	3,2	5,0	4,9	5,2	6,9	4,5	4,4	2,8
T-2	Odzysk [%]	91,2	87,2	73,2	74,7	87,6	82,4	82,9	78,9
	SD [%]	8,6	6,4	3,6	2,9	3,3	2,7	4,4	3,7
ZEN	Odzysk [%]	47,9 ^a	32,5 ^b	43,3 ^a	34,5 ^b	57,9 ^a	43,2 ^b	55,2 ^a	40,8 ^b
	SD [%]	4,0	2,0	2,2	1,7	3,5	1,9	3,2	1,7
ZAL	Odzysk [%]	51,2 ^a	35,4 ^b	46,7 ^a	32,5 ^b	56,3 ^a	46,2 ^b	62,1 ^a	42,3 ^b
	SD [%]	3,2	2,6	1,6	1,5	1,5	2,3	2,3	1,8
ZEL	Odzysk [%]	48,9 ^a	35,9 ^b	47,9 ^a	34,8 ^b	55,6 ^a	42,5 ^b	57,3 ^a	43,9 ^b
	SD [%]	4,7	2,6	1,6	1,9	2,9	2,7	1,9	2,2

^{a, b} - grupy jednorodne (ANOVA, test Tukeya, przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$)

Jednym z czynników warunkujących możliwość penetracji próbki przez rozpuszczalnik jest rozdrobnienie materiału. W celu określenia wpływu stopnia rozdrobnienia na efektywność ekstrakcji i powtarzalność oznaczeń, przeprowadzono analizę próbek rzeczywistych, naturalnie zanieczyszczonych mikotoksynami. Przygotowano cztery frakcje o różnym rozdrobnieniu, poprzez zmielenie próbki laboratoryjnej (Rys. 40.) w młynie ultra-

odśrodkowym, z wykorzystaniem sit pierścieniowych o różnej średnicy oczek trapezoidalnych:

- 2,0 mm (**G1**),
- 1,0 mm (**G2**),
- 0,5 mm (**G3**),
- 0,25 mm (**G4**).

(a)



(b)



Rys. 40. Frakcje próbek jęczmienia (a) i kukurydzy (b) o różnym stopniu rozdrobnienia

W przypadku większości analitów i matryc większe rozdrobnienie próbki skutkowało niższymi wartościami odchylenia standardowego serii pomiarów (Tabela 23). Zastosowanie testu Hartleya pozwoliło na zaobserwowanie statystycznie istotnych różnic wartości odchylenia standardowego dla T-2 (pszenica), ZEN (owies) oraz NIV i T-2 Triol (kukurydza). Dla zbiorów wyników spełniających założenie o jednorodności wariancji dodatkowo wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test Tukeya, które pozwoliły na stwierdzenie statystycznie istotnych różnic wartości średnich grupowych w poszczególnych doświadczeniach (Tabela 23).

Na wybór stopnia rozdrobnienia próbki wpłynęły wyniki analizy statystycznej – znamienne niższa precyzja w przypadku mniejszego rozdrobnienia (dla wybranych analitów i matryc) oraz istotne różnice wartości średnich, jak również czynniki techniczne: praca i czasochłonność przygotowania poszczególnych frakcji próbki. Ze względu na wydzielone ciepło towarzyszące procesowi mielenia nie było możliwe przygotowanie frakcji **G4** na drodze bezpośredniego rozdrobnienia materiału wyjściowego. Intensywne zagrzewanie próbki wystąpiło w przypadku kukurydzy, dla której nie uzyskano bezpośrednio także frakcji **G3**, pomimo wykorzystania specjalnego sita dystansowego. W opracowanej procedurze wybrano mielenie próbki z wykorzystaniem sit o średnicy oczek 1mm (**G2**).

Tabela 23. Stężenie analitów w próbkach naturalnie zanieczyszczonych, wyznaczone dla różnego stopnia rozdrobnienia materiału (G1-G4); n = 7

Analit	Średnica oczek sita			
	G1 (2,0 mm)	G2 (1,0 mm)	G3 (0,5 mm)	G4 (0,25 mm)
Stężenie (wartość średnia ± SD) [ng/g]				
PSZENICA				
NIV	6,7±1,2	7,04±0,75	7,08±0,94	6,92±0,75
D3G	331±34	337±25	344±27	330±25
DON	996±86	1074±78	1103±72	1073±58
15-ADON	5,61 ^b ±0,93	7,34 ^a ±0,64	7,21 ^a ±0,47	7,55 ^a ±0,61
3-ADON	7,75 ^c ±0,88	10,31 ^a ±0,82	11,76 ^b ±0,75	11,05 ^{ab} ±0,79
HT-2	5,44 ^b ±0,94	6,97 ^a ±0,53	7,43 ^a ±0,62	6,88 ^a ±0,38
T-2	17,0±3,4*	17,5±1,4*	18,2±1,3*	17,9±1,1*
ZEN	340 ^b ±48	392 ^a ±27	401 ^a ±23	378 ^{ab} ±26
ZEL	6,19±0,94	6,65±0,55	6,85±0,42	6,43±0,42
OWIES				
NIV	26,8 ^a ±4,5	30,0 ^{ab} ±2,8	33,3 ^b ±3,1	30,1 ^{ab} ±2,4
DON	8,4±1,4	7,32±0,66	7,61±0,76	7,56±0,63
MAS	3,67 ^b ±0,77	4,39 ^a ±0,36	4,52 ^a ±0,51	4,76 ^a ±0,43
T-2 triol	3,40±0,40	3,25±0,25	3,04±0,36	3,25±0,34
HT-2	61,0 ^a ±7,7	66,8 ^{ab} ±5,4	70,9 ^b ±4,8	65,1 ^{ab} ±3,7
T-2	154 ^a ±23	175 ^{ab} ±22	182 ^b ±16	170 ^{ab} ±14
ZEN	12,5±2,3*	13,1±0,8*	13,7±0,8*	12,7±0,6*
JĘCZMIEN				
NIV	15,8 ^b ±2,7	17,6 ^{ab} ±1,6	19,3 ^a ±2,0	19,3 ^a ±1,4
D3G	85 ^b ±11	98,6 ^a ±6,9	104,3 ^a ±5,0	100,8 ^a ±4,9
DON	626±62	641±35	667±39	651±27
15-ADON	34,3±4,7	37,2±3,1	35,1±2,7	37,2±2,5
MAS	5,56 ^b ±0,75	6,54 ^a ±0,53	6,77 ^a ±0,58	6,74 ^a ±0,61
HT-2	16,0 ^b ±1,5	17,0 ^{ab} ±1,2	18,6 ^a ±1,2	17,9 ^a ±1,5
ZEN	10,6±1,4	11,42±0,97	11,51±1,03	10,79±0,96
KUKURYDZA				
NIV	7,6±2,1*	7,84±0,69*	8,13±0,62*	7,46±0,65*
D3G	113 ^a ±12	123,7 ^{ab} ±8,0	132,1 ^b ±9,6	122,4 ^{ab} ±8,6
DON	495±50	503±37	522±31	480±30
15-ADON	59,3±5,8	57,8±4,6	55,0±3,6	57,7±4,2
T-2 triol	5,0±1,4*	5,04±0,48*	5,12±0,53*	4,96±0,39*
HT-2	10,9±1,4	10,97±0,87	10,65±0,68	10,91±0,58
T-2	8,8±1,2	8,93±0,76	9,13±0,69	8,51±0,61
ZEN	76,0±7,8	78,6±5,5	81,3±3,9	77,6±4,1

* statystycznie istotne różnice wartości odchylenia standardowego (test Hartleya, $\alpha = 0,05$),

^{a, b, c} - grupy jednorodne (ANOVA, test Tukeya, przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$)

W procedurach analitycznych wykorzystujących sprzężenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas do analizy próbek charakteryzujących się złożonym składem matrycy bardzo istotną częścią procesu optymalizacji jest wyznaczenie efektów matrycowych (ME). Badanie wpływu matrycy na sygnał pomiarowy analitów prowadzono wykorzystując próbki:

- **A** – próbki zawierające roztwory wzorcowe analitów, przygotowane w mieszaninie 0,1% CH₃COOH w H₂O:MeOH (80:20, v/v) z 5mM CH₃COONH₄;
- **B** – próbki zbóż (pszenica, owies, jęczmień, kukurydza) wzbogacone w anality; roztwory wzorcowe analitów zostały dodane do próbek po uprzednim przeprowadzeniu procedury przygotowania próbek do analizy.

Wyznaczenie wpływu matrycy prowadzono wykorzystując roztwory wzorcowe analitów dodane do próbek na trzech poziomach stężeń: **L**, **M**, **H** (Tabela 24). Wartości ME

wyznaczono na podstawie stosunku liczbowego średnich wartości pól powierzchni pików oznaczanych związków w próbce B i A.

Tabela 24. Stężenia analitów w próbkach wykorzystanych do wyznaczania efektów matrycowych

Analit	Poziom L [ng/g]	Poziom M [ng/g]	Poziom H [ng/g]
NIV	20	100	500
D3G	20	100	500
DON	40	200	1000
FUSX	20	100	500
15-ADON	20	100	500
3-ADON	20	100	500
NEO	20	100	500
MAS	20	100	500
DAS	20	100	500
T-2 Triol	20	100	500
HT-2	20	100	500
T-2	20	100	500
ZEN	8	40	200
ZAL	8	40	200
ZEL	8	40	200

W przypadku większości analitów zaobserwowano osłabienie intensywności sygnału na skutek efektu matrycowego (Tabela 25). Niewielkie wzmocnienie sygnału NIV stwierdzono dla wszystkich matryc (najwyższa wartość ME = 12,0%). Kierunek wpływu składników matrycy na sygnał DAS był zależny od rodzaju próbki: wzmocnienie (pszenica, owies i kukurydza), osłabienie (jęczmień). Efekt matrycowy był zazwyczaj większy przy niższych stężeniach analitów. Zwiększenie zawartości DON w próbkach owsa i kukurydzy skutkowało zmianą charakteru wpływu matrycy (wzmocnienie → osłabienie sygnału).

Intensywność sygnału DON ekstrahowanego z próbek pszenicy została zwiększona (dodatnie wartości ME), natomiast w próbkach jęczmienia odpowiedź tego analitu uległa osłabieniu (ujemne wartości ME). Wpływ składników matrycy na intensywność sygnału NEO i HT-2 w próbkach pszenicy był słabszy w porównaniu z pozostałymi zbożami. Osłabienie sygnału ZEN i jego pochodnych (ME w zakresie od -10,7% do -29,6%) nie było zaskoczeniem, uwzględniając wielkości odzysku otrzymane w poprzednich etapach badań. Wartości te jednakże nie stanowią wytłumaczenia względnie niskiego odzysku, co może wskazywać na straty analitów podczas przygotowania próbki (adsorpcja na złożu kolumnienki SPE). Z tego względu w kolejnym etapie do procedury analitycznej wprowadzono wzorce wewnętrzne (IS) – dostępne handlowo znaczone izotopowo analogi wybranych analitów. Jako IS wykorzystano następujące związki: $^{13}\text{C}_{15}$ -DON (120 ng/g_{próbki}), $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2 (12 ng/g_{próbki}), $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2 (24 ng/g_{próbki}), $^{13}\text{C}_{18}$ -ZEN (12 ng/g_{próbki}).

Tabela 25. Wzmocnienie lub osłabienie sygnału analitów w próbkach zbóż wskutek efektu matrycowego (procedura wykorzystująca technikę SPE); n = 3

Analit	Efekt matrycowy – ME [%]					
	L	M	H	L	M	H
	PSZENICA			OWIES		
NIV	5,4	6,5	3,8	11,4	12,0	10,9
D3G	-12,9	-11,4	-10,8	-16,6	-15,2	-14,4
DON	5,6	2,4	2,6	2,8	-1,7	-3,4
FUS X	-10,9	-7,7	-7,2	-14,8	-14,9	-12,1
15-ADON	-11,8	-9,9	-8,3	-8,0	-8,9	-8,3
3-ADON	-16,5	-15,9	-14,8	-20,7	-19,3	-17,8
NEO	-3,9	-3,3	-3,5	-26,3	-24,9	-23,7
MAS	-7,5	-5,2	-5,6	-4,5	-5,5	-5,2
DAS	7,3	5,9	4,1	9,4	8,4	7,8
T-2 triol	-11,2	-14,2	-12,6	-14,6	-11,5	-12,3
HT-2	-4,4	-3,7	-3,3	-16,2	-16,9	-14,7
T-2	-14,3	-15,2	-15,1	-20,7	-21,5	-18,6
ZEN	-12,4	-15,6	-11,4	-26,9	-26,8	-24,3
ZAL	-10,7	-12,7	-10,8	-25,3	-24,2	-22,3
ZEL	-14,3	-13,2	-12,1	-26,9	-24,9	-24,6
	JĘCZMIEN			KUKURYDZA		
NIV	6,2	5,8	5,1	7,9	5,1	5,3
D3G	-14,6	-12,7	-12,2	-10,1	-9,4	-8,9
DON	-9,3	-7,5	-7,9	4,4	-1,1	-2,2
FUS X	-7,4	-8,2	-6,5	-8,2	-9,0	-8,7
15-ADON	-10,3	-8,6	-9,7	-14,0	-15,2	-12,9
3-ADON	-20,1	-18,6	-18,1	-14,3	-15,2	-13,9
NEO	-20,7	-19,4	-20,2	-15,4	-16,6	-15,3
MAS	-11,1	-9,0	-7,9	-14,9	-13,6	-12,5
DAS	-12,3	-10,7	-11,8	3,0	2,4	1,3
T-2 triol	-15,5	-14,6	-11,9	-18,6	-20,4	-19,2
HT-2	-14,5	-12,4	-10,2	-15,1	-13,1	-14,0
T-2	-20,6	-19,0	-16,8	-15,4	-13,6	-12,8
ZEN	-17,7	-17,1	-16,4	-27,3	-26,7	-24,7
ZAL	-15,7	-16,2	-13,7	-29,3	-28,5	-26,1
ZEL	-18,9	-16,3	-15,2	-29,2	-29,6	-27,4

Roztwory wzorców wewnętrznych zostały dodane do ekstraktu próbki przed oczyszczeniem z wykorzystaniem techniki SPE. Ze względu na budowę chemiczną analitów i znaczonych izotopowo analogów zawartość trichotecenów B określono na podstawie stosunku sygnałów oznaczanych związków i $^{13}\text{C}_{15}$ -DON. Wyjątek stanowiły 3- i 15-ADON (oznaczane w trybie tworzenia jonów dodatnich), dla których jako IS wykorzystano $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2. Związek ten zastosowano również jako wzorzec wewnętrzny dla NEO, MAS, DAS i T-2 Triol. W celu określenia zawartości toksyny T-2 wykorzystano jej znaczone izotopowo analog ($^{13}\text{C}_{24}$ -T-2). Natomiast dla ZEN, ZAL i ZEL zastosowano $^{13}\text{C}_{18}$ -ZEN. W doniesieniach naukowych wpływ składników matrycy na sygnał pomiarowy mikotoksyn określany jest często z wykorzystaniem techniki SSE (Sulyok i in. 2006). Przygotowanie roztworów wzorcowych analitów w ekstraktach ślepych próbek (krzywa wzorcowa) stanowi zarazem sposób zminimalizowania wpływu składników matrycy. Poważnym problemem związanym z takim podejściem są różnice w wielkości wyznaczonego efektu matrycowego między poszczególnymi partiami tego samego materiału, np. kukurydza zbierana w różnych latach

(Sułyok i in. 2007b). W powyższych badaniach wielkości efektu matrycowego w zależności od roku zbioru wynosiły: od -10% do 3% dla NEO, od -9% do 5% dla MAS, od -26% do -5% dla HT-2, od -8% do 8% dla NIV, od 3% do 10% dla DON, od -4% do 57% dla D3G oraz od -9% do 8% dla ZEN. Ponadto przygotowywanie roztworów wzorcowych oznaczanych związków w ekstraktach z próbek nie zawierających analitów może być uciążliwe w rutynowej praktyce analitycznej. Takie podejście jest związane z koniecznością dysponowania szerokim wachlarzem „czystych” matryc, a i tak możliwe różnice między partiami materiału nie zapewnią wyeliminowania wpływu składników matrycy na sygnał pomiarowy analitów.

Wielkości odzysku analitów z próbek zbóż, określone dla procedury analitycznej wykorzystującej wzorce wewnętrzne zostały przedstawione w Tabeli 26. Otrzymane wyniki wskazują na wysoką skuteczność opracowanej procedury analitycznej (wartość średnia odzysku w zakresie od 74% – D3G z próbek jęczmienia, do 104% – MAS z próbek kukurydzy i DAS z próbek pszenicy). Wielkości odzysku DON, ZEN, T-2 i HT-2 uzyskane w warunkach doświadczeń wskazują na spełnienie kryteriów skuteczności przedstawionych w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 401/2006 (Tabela 7, str. 27). Obserwowane różnice w wielkości odzysku między poszczególnymi matrycami potwierdzają konieczność optymalizacji procedury analitycznej dla każdej z nich.

5.3. Optymalizacja procedury przygotowania próbki z wykorzystaniem podejścia QuEChERS

W oryginalnej procedurze QuEChERS ekstrakcja analitów z próbki o wysokiej zawartości wody (>75%), prowadzona jest przez wytrząsanie z jednakową ilością acetonitrylu (stosunek masy próbki do objętości rozpuszczalnika 1:1). W celu umożliwienia wykorzystania tego podejścia w analizie próbek zbożowych (zawartość wody rzędu kilkunastu %), konieczne było wprowadzenie modyfikacji do procedury. Dodatek wody do próbki warunkuje odpowiednią jej penetrację, a jednocześnie jest konieczny do odzysku najbardziej polarnych analitów (NIV, D3G). Nie mniej jednak, w oparciu o zadawalające wielkości odzysku wybranych analitów: NIV (50-92%), DON (42-78%), DAS (60-104%), T-2 (74-97%) i HT-2 (86-119%) w badaniach Sospedra i in. (2010), w pierwszym etapie sprawdzono efektywność ekstrakcji z wykorzystaniem samych rozpuszczalników organicznych: acetonitrylu, metanolu, octanu etylu, acetonu i mieszanin: ACN:MeOH 50:50 (v/v), ACN:MeOH 20:80 (v/v), ACN:MeOH 80:20 (v/v), zachowując poziom wzbogacenia próbek w anality, jak w przypadku procedury wykorzystującej technikę SPE (poziom M).

Tabela 26. Odzysk analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych dla różnych poziomów stężeń (procedura wykorzystująca technikę SPE); n = 3

Analit		Poziom					
		L	M	H	L	M	H
		PSZENICA			OWIES		
NIV	Odzysk [%]	95,7	98,6	98,0	91,0	94,2	93,9
	SD [%]	2,9	4,6	4,4	4,0	4,7	4,6
D3G	Odzysk [%]	89,2	88,0	91,5	90,5	88,6	94,0
	SD [%]	3,0	3,0	3,6	3,5	3,1	4,0
DON	Odzysk [%]	97,7	99,5	96,3	101,4	103,9	102,9
	SD [%]	2,5	3,4	2,0	2,5	3,8	5,6
FUS X	Odzysk [%]	89,7	89,5	93,4	93,1	93,9	100,9
	SD [%]	2,5	3,6	4,3	3,2	4,5	3,9
15-ADON	Odzysk [%]	91,7	93,8	98,1	84,6	86,3	93,7
	SD [%]	2,2	2,1	2,5	3,8	2,5	3,1
3-ADON	Odzysk [%]	93,7	95,7	97,1	86,1	85,7	92,4
	SD [%]	2,1	3,8	3,9	4,7	3,9	3,6
NEO	Odzysk [%]	90,8	98,2	99,3	98,3	94,8	97,6
	SD [%]	3,7	3,4	3,2	3,3	3,5	4,7
MAS	Odzysk [%]	102,2	101,4	102,7	95,6	96,1	99,3
	SD [%]	2,6	3,3	3,9	5,2	4,8	5,9
DAS	Odzysk [%]	103,5	104,9	102,6	94,3	97,4	99,9
	SD [%]	3,4	4,4	3,5	3,8	3,3	3,4
T-2 triol	Odzysk [%]	91,3	96,1	92,9	94,7	99,4	98,7
	SD [%]	2,9	3,8	3,1	3,4	2,5	3,2
HT-2	Odzysk [%]	96,3	99,4	100,1	92,6	91,5	95,1
	SD [%]	3,2	4,5	3,3	3,3	4,0	3,0
T-2	Odzysk [%]	92,7	97,6	97,3	91,4	93,8	100,1
	SD [%]	4,1	4,8	4,2	2,0	3,8	3,3
ZEN	Odzysk [%]	95,6	94,9	99,2	82,8	85,6	89,5
	SD [%]	3,8	2,9	3,2	2,2	2,9	1,8
ZAL	Odzysk [%]	100,9	101,6	103,9	86,3	92,4	87,4
	SD [%]	3,0	3,8	3,9	2,3	4,1	3,0
ZEL	Odzysk [%]	97,7	97,0	102,9	88,8	94,7	98,3
	SD [%]	3,6	2,2	3,5	4,3	3,5	2,4
		JĘCZMIEN			KUKURYDZA		
NIV	Odzysk [%]	103,4	101,9	96,5	104,2	99,8	100,0
	SD [%]	3,7	3,0	3,6	4,8	4,2	4,2
D3G	Odzysk [%]	72,7	73,1	76,7	89,1	90,8	95,0
	SD [%]	3,8	3,7	4,8	5,4	3,9	4,4
DON	Odzysk [%]	98,0	100,9	102,0	96,7	105,3	102,9
	SD [%]	4,6	3,6	4,7	5,1	4,4	3,1
FUS X	Odzysk [%]	80,6	81,4	87,2	85,6	88,1	92,0
	SD [%]	3,0	3,2	3,5	4,0	4,6	3,9
15-ADON	Odzysk [%]	88,4	87,5	91,4	98,3	99,4	104,2
	SD [%]	2,9	2,3	3,3	4,0	3,9	4,1
3-ADON	Odzysk [%]	85,9	88,9	87,8	102,5	100,2	97,9
	SD [%]	3,7	3,0	4,3	3,7	4,3	2,5
NEO	Odzysk [%]	92,2	94,9	96,3	93,5	95,9	98,8
	SD [%]	4,0	3,7	3,7	4,5	4,3	3,4
MAS	Odzysk [%]	92,2	97,6	95,3	101,8	106,0	104,0
	SD [%]	4,9	4,5	4,8	4,6	5,9	5,5
DAS	Odzysk [%]	95,4	96,8	95,5	94,4	93,1	97,4
	SD [%]	4,0	3,6	4,1	4,0	5,0	4,9
T-2 triol	Odzysk [%]	88,9	84,4	85,2	90,3	93,7	94,3
	SD [%]	4,1	4,7	3,6	3,4	4,5	3,7
HT-2	Odzysk [%]	91,5	95,3	94,2	101,1	105,2	104,1
	SD [%]	3,0	3,2	2,7	5,5	3,9	3,6
T-2	Odzysk [%]	95,9	102,1	103,6	93,1	96,2	101,9
	SD [%]	3,0	3,4	2,3	2,5	3,6	3,3
ZEN	Odzysk [%]	99,8	104,6	102,4	90,3	93,6	98,0
	SD [%]	2,9	2,1	3,0	2,7	2,6	3,1
ZAL	Odzysk [%]	95,4	102,7	101,8	99,9	105,3	104,1
	SD [%]	2,6	4,4	3,3	3,2	2,2	4,0
ZEL	Odzysk [%]	94,0	101,5	104,4	91,9	97,2	99,9
	SD [%]	3,0	3,6	2,5	3,2	3,9	2,8

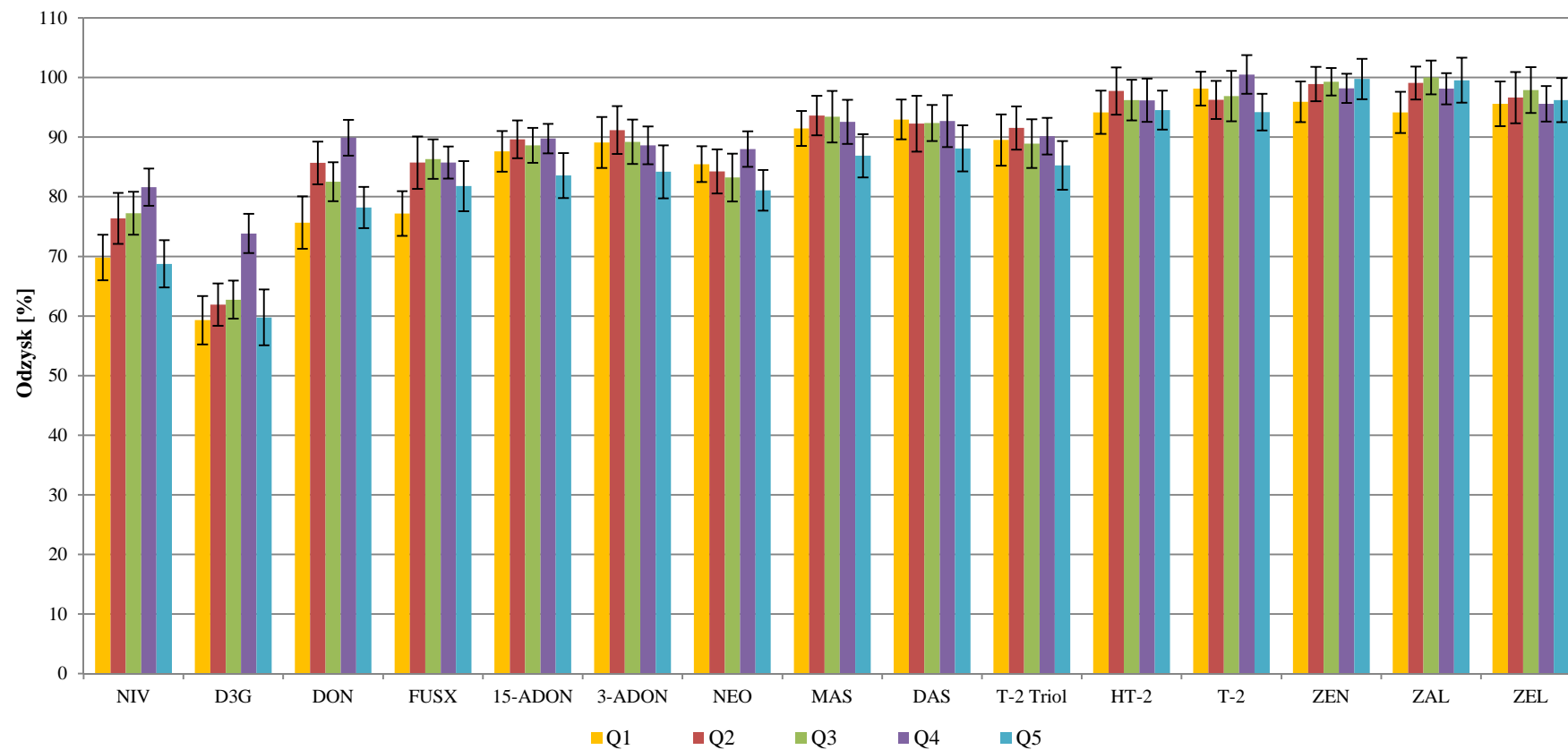
Jako matrycę modelową wybrano pszenicę. Podobnie, jak w badaniach Sospedra i in. (2010), odzysk DON, DAS, T-2 i ZEN w przypadku ekstrakcji za pomocą ACN:MeOH 20:80 (v/v) był wysoki i wynosił powyżej 80%, jednakże dla NIV wielkość ta była znacznie niższa (58%). W każdym układzie odzysk D3G nie przekraczał 20%. Wykorzystanie ACN, AcOEt i acetonu skutkowało odzyskiem DON i NIV poniżej 50%. Wymieszanie próbki z wodą, przed dodaniem rozpuszczalników organicznych, wpłynęło na wzrost odzysku NIV i D3G, szczególnie w przypadku wykorzystania MeOH jako ekstrahenta. Dodatek do rozpuszczalnika organicznego kwasu octowego (1%) nie wpłynął na poprawę efektywności ekstrakcji. W licznych modyfikacjach podejścia QuEChERS, wykorzystywanego w oznaczaniu pozostałości pestycydów, po pierwszym wytrząsaniu do próbki dodawane są sole i ich mieszaniny wspomagające proces ekstrakcji (Lehotay i in. 2010). Podczas optymalizacji procedury sprawdzono wpływ rodzaju dodanej soli na odzysk:

- MgSO_4 (**Q1**),
- $\text{MgSO}_4 + \text{NaCl}$ (**Q2**),
- $\text{MgSO}_4 + \text{NaCl} + \text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COONa})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COOH})(\text{COONa})_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**Q3**),
- $\text{MgSO}_4 + \text{CH}_3\text{COONa}$ (**Q4**),
- $\text{MgSO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_4$ (**Q5**).

Średni odzysk analitów z próbek pszenicy poddanych procedurom QuEChERS (**Q1-Q5**) został przedstawiony na Rysunku 41. Największe zróżnicowanie wielkości odzysku zaobserwowano dla NIV (66 – 82%), D3G (59 – 74%) oraz DON (76 – 90%). Wyniki analizy statystycznej (ANOVA, test Tukeya) nie ujawniły jednak istotności tych różnic, a do dalszych badań wybrano układ **Q4** ($\text{MgSO}_4 + \text{CH}_3\text{COONa}$).

Badanie wpływu składników matrycy na intensywność sygnału analitów (Tabela 27) prowadzono w sposób analogiczny do procedury wykorzystującej technikę SPE.

Wskutek efektu matrycowego intensywność sygnału wszystkich analitów uległa osłabieniu (ME od -3,0% do -49,7%). Najślabszy wpływ składników matrycy na sygnał pomiarowy zaobserwowano dla NIV i DON, oznaczanych w próbkach pszenicy i kukurydzy ($|\text{ME}| \leq 10\%$). Skład próbek pszenicy przygotowanych według procedury QuEChERS powodował mniejsze osłabienie sygnału większości analitów w porównaniu z pozostałymi matrycami.



Rys. 41. Wpływ rodzaju soli (Q1-Q5) wspomagającej proces ekstrakcji (podejście QuEChERS) na odzysk analitów z próbek pszenicy; słupki błędów obrazują wartość odchylenia standardowego; n=3

Tabela 27. Wzmocnienie lub osłabienie sygnału analitów w próbkach zbóż wskutek efektu matrycowego (procedura wykorzystująca podejście QuEChERS); n = 3

Analit	Efekt matrycowy – ME [%]					
	L	M	H	L	M	H
	PSZENICA			OWIES		
NIV	-6,8	-8,9	-7,2	-21,3	-18,2	-17,6
D3G	-16,6	-15,3	-14,5	-22,2	-25,2	-21,0
DON	-5,5	-3,0	-3,3	-16,1	-13,8	-14,2
FUS X	-20,6	-16,4	-15,2	-23,6	-24,6	-21,5
15-ADON	-14,0	-13,8	-17,3	-19,7	-17,6	-18,2
3-ADON	-21,4	-22,2	-19,4	-35,8	-32,8	-33,5
NEO	-18,0	-16,9	-15,8	-37,4	-34,8	-31,4
MAS	-15,6	-14,3	-12,6	-15,6	-12,8	-13,1
DAS	-14,6	-15,9	-13,9	-15,1	-13,3	-12,0
T-2 triol	-21,4	-19,5	-19,9	-21,3	-23,2	-19,0
HT-2	-11,8	-10,2	-9,3	-25,1	-21,2	-19,4
T-2	-17,4	-15,9	-16,9	-26,8	-24,5	-21,7
ZEN	-42,9	-40,3	-41,4	-45,4	-48,6	-44,1
ZAL	-45,2	-43,0	-41,8	-48,8	-46,7	-45,1
ZEL	-45,3	-47,2	-46,7	-47,4	-49,2	-44,6
	JĘCZMIEN			KUKURYDZA		
NIV	-12,9	-15,6	-13,3	-10,0	-8,7	-9,1
D3G	-18,3	-17,7	-15,9	-19,1	-18,6	-15,6
DON	-10,7	-11,2	-8,9	-8,8	-6,8	-6,2
FUS X	-26,6	-22,2	-20,3	-17,9	-19,0	-15,6
15-ADON	-28,0	-27,6	-25,8	-26,1	-22,2	-20,7
3-ADON	-29,4	-28,6	-26,1	-18,7	-19,6	-17,5
NEO	-24,7	-28,5	-27,2	-25,5	-23,9	-22,7
MAS	-14,4	-12,6	-15,8	-28,2	-24,0	-26,1
DAS	-14,3	-11,1	-10,5	-27,6	-25,8	-23,7
T-2 triol	-17,8	-16,1	-13,0	-32,7	-29,6	-28,4
HT-2	-21,6	-23,7	-22,8	-16,7	-15,7	-14,1
T-2	-26,4	-23,5	-27,1	-21,8	-23,3	-22,4
ZEN	-43,6	-41,4	-44,7	-46,5	-45,3	-42,6
ZAL	-42,6	-41,6	-43,2	-46,8	-47,3	-43,5
ZEL	-45,4	-42,3	-40,4	-49,7	-48,3	-46,4

Intensywność sygnałów MAS i DAS, ekstrahowanych z próbek pszenicy, owsa i jęczmienia została obniżona w zbliżonym stopniu (około 14%), natomiast dla próbek kukurydzy bezwzględne wartości ME były wyższe (około 26%). Najsilniejszy wpływ składników matrycy na odpowiedź analitów zaobserwowano dla ZEN i jego pochodnych. Dla wszystkich matryc odnotowano osłabienie sygnału tych związków o ponad 40%. W celu zminimalizowania wpływu składników matrycy na sygnał pomiarowy analitów i ich odzysk (Tabela 28), w procedurze QuEChERS zastosowano znaczone izotopowo analogi jako wzorce wewnętrzne. Wartości średnie odzysku analitów z próbek zbóż mieściły się w zakresach: pszenica od 73% (D3G) do 101% (T-2), owies od 75% (D3G) do 98% (T-2), jęczmień od 64% (D3G) do 99% (T-2) oraz kukurydza od 72% (D3G) do 98% (ZEN). Najmniejsze wielkości odzysku zanotowano dla najbardziej polarnych analitów (NIV, D3G). Kryteria skuteczności w odniesieniu do odzysku mikotoksyn, których NDP są regulowane przepisami UE (DON, T-2, HT-2, ZEN) zostały spełnione dla każdej z matryc.

Tabela 28. Odzysk analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych dla różnych poziomów stężeń (procedura wykorzystująca podejście QuEChERS); n = 3

Analit		Poziom					
		L	M	H	L	M	H
		PSZENICA			OWIES		
NIV	Odzysk [%]	82,5	81,6	79,4	73,2	74,7	77,3
	SD [%]	5,6	5,3	5,2	5,2	4,8	4,4
D3G	Odzysk [%]	72,6	73,8	71,8	72,3	71,5	72,8
	SD [%]	6,3	6,6	5,6	5,4	4,5	4,1
DON	Odzysk [%]	86,8	89,9	90,5	89,9	93,4	92,7
	SD [%]	5,8	6,0	5,5	6,3	5,9	5,3
FUS X	Odzysk [%]	89,5	85,8	85,7	81,9	82,6	84,5
	SD [%]	6,3	5,4	5,9	6,1	6,3	5,4
15-ADON	Odzysk [%]	88,4	89,8	90,7	92,9	92,4	88,6
	SD [%]	5,6	4,9	4,8	5,9	5,4	6,1
3-ADON	Odzysk [%]	92,4	88,6	89,9	93,6	94,2	92,1
	SD [%]	6,7	5,6	4,5	5,3	5,8	5,1
NEO	Odzysk [%]	88,9	88,0	85,4	88,5	85,7	86,3
	SD [%]	6,4	5,9	5,4	6,3	5,9	5,4
MAS	Odzysk [%]	91,2	92,6	94,6	87,5	88,4	89,1
	SD [%]	5,9	5,4	5,5	5,7	6,2	4,9
DAS	Odzysk [%]	89,5	92,7	88,5	90,3	87,8	86,9
	SD [%]	6,2	5,7	5,9	6,3	5,4	5,8
T-2 triol	Odzysk [%]	93,4	90,2	86,9	91,2	92,3	89,9
	SD [%]	5,8	5,2	5,0	5,7	5,8	4,5
HT-2	Odzysk [%]	95,6	96,2	91,1	89,0	92,4	91,3
	SD [%]	5,7	5,3	5,8	6,1	5,2	5,9
T-2	Odzysk [%]	102,3	100,5	100,7	99,8	97,6	97,5
	SD [%]	6,7	6,5	5,3	6,3	6,2	5,3
ZEN	Odzysk [%]	97,5	98,2	95,7	94,7	95,4	93,8
	SD [%]	5,4	4,9	3,9	4,8	3,7	3,8
ZAL	Odzysk [%]	98,8	98,1	97,5	95,8	94,5	92,6
	SD [%]	4,8	5,2	3,6	5,4	4,3	4,5
ZEL	Odzysk [%]	97,8	95,6	96,8	97,9	96,7	94,2
	SD [%]	5,3	5,0	5,8	5,7	4,8	5,0
		JĘCZMIEN			KUKURYDZA		
NIV	Odzysk [%]	84,3	83,5	86,4	78,3	79,7	82,5
	SD [%]	6,4	5,3	4,8	6,6	5,9	5,3
D3G	Odzysk [%]	62,4	63,9	66,3	68,9	73,1	73,4
	SD [%]	4,7	4,9	4,2	6,2	5,0	4,9
DON	Odzysk [%]	93,0	92,5	94,4	91,3	93,4	92,9
	SD [%]	6,6	6,1	4,6	6,7	5,8	6,2
FUS X	Odzysk [%]	82,6	86,8	85,8	84,8	83,7	83,9
	SD [%]	5,9	5,6	6,2	5,8	5,9	4,7
15-ADON	Odzysk [%]	86,5	88,4	89,7	93,5	91,4	94,7
	SD [%]	5,8	5,5	4,9	5,4	5,3	6,1
3-ADON	Odzysk [%]	85,4	86,3	83,6	91,6	92,0	87,8
	SD [%]	6,2	6,5	5,6	5,5	6,0	5,2
NEO	Odzysk [%]	88,8	86,4	87,7	87,6	88,9	89,7
	SD [%]	5,9	6,8	6,3	5,6	5,2	4,7
MAS	Odzysk [%]	92,4	89,5	89,9	95,2	96,6	94,3
	SD [%]	5,5	5,4	5,6	6,3	5,6	5,5
DAS	Odzysk [%]	89,6	90,4	86,7	93,7	92,5	88,5
	SD [%]	6,3	5,8	5,5	5,9	5,7	5,2
T-2 triol	Odzysk [%]	89,8	86,7	88,9	86,7	87,8	84,7
	SD [%]	5,7	5,9	6,1	6,0	5,8	4,7
HT-2	Odzysk [%]	94,3	91,6	88,9	96,4	95,7	94,2
	SD [%]	5,9	6,2	5,5	5,2	4,1	4,5
T-2	Odzysk [%]	100,1	98,6	99,7	99,8	94,3	95,6
	SD [%]	5,8	4,3	4,5	4,7	4,5	3,9
ZEN	Odzysk [%]	99,4	96,8	96,9	98,4	99,5	95,9
	SD [%]	5,4	4,7	4,4	5,0	4,9	5,3
ZAL	Odzysk [%]	95,2	94,2	93,5	95,3	97,2	98,1
	SD [%]	5,6	5,1	5,0	5,3	5,6	5,0
ZEL	Odzysk [%]	96,7	93,8	94,2	96,0	95,9	93,4
	SD [%]	4,8	5,1	5,3	5,8	5,2	4,7

5.4. Porównanie wydajności ekstrakcji procedur SPE i QuEChERS

W celu porównaniu wydajności ekstrakcji analitów (techniki: SPE i QuEChERS) przeprowadzono analizę statystyczną wyników przedstawionych w Tabelach 26 i 28. Jednorodność wariancji weryfikowano w oparciu o test F-Snedecora ($\alpha = 0,05$). Statystyczną istotność różnic wartości odchylenia standardowego stwierdzono dla 3-ADON (pszenica) oraz T-2 (owies), na najniższym poziomie wzbogacenia (L) i dla tych wyników zastosowano test Cochran-Coxa w celu porównania wartości średnich. W przypadku nie stwierdzenia statystycznie istotnych różnic wartości odchylenia standardowego porównanie wartości średnich przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta. Wielkości odzysku NIV i D3G wyznaczone dla obu procedur różniły się w sposób statystycznie istotny dla każdej matrycy i poziomu zawartości (L, M, H). Statystycznie istotne różnice wielkości odzysku DAS (pszenica) oraz DON, FUS X i NEO (owies) stwierdzono również dla wszystkich poziomów wzbogacenia. Wydajność ekstrakcji DON i MAS (pszenica) oraz ZEN (owies) różniła się w sposób statystycznie istotny dla poziomów L i M. Istotne różnice wartości średnich odzysku dla poziomów L i H stwierdzono w odniesieniu do 3-ADON i T-2 (kukurydza), natomiast w przypadku NEO (pszenica), DAS (owies), ZAL i ZEL (jęczmień) oraz 15-ADON i HT-2 (kukurydza) znamienne statystycznie różnice obserwowano dla poziomów M i H. Porównanie wartości średnich ujawniło ponadto statystycznie istotne różnice odzysku ZAL i ZEL (owies) oraz ZEN (kukurydza) dla najniższego stężenia (L), ZAL (kukurydza) i ZEN (jęczmień) – dla poziomu M, a także 15-ADON i HT-2 (pszenica), MAS i T-2 Triol (owies), DAS (jęczmień) oraz FUS X, NEO, MAS, DAS i T-2 Triol (kukurydza) – dla poziomu H.

5.5. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych opracowanych procedur analitycznych

W celu potwierdzenia przydatności danej procedury analitycznej do określonego celu konieczne jest poddanie jej walidacji. Przed przystąpieniem do tego procesu niezbędne jest przeprowadzenie odpowiednich badań optymalizacyjnych służących, m.in. określeniu selektywności metody (Konieczka i Namieśnik 2007). Opracowane procedury oznaczania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych zostały poddane procesowi walidacji, w którym określono: powtarzalność i precyzję pośrednią, liniowość i zakres pomiarowy, granice wykrywalności i oznaczalności, niepewność wyniku pomiaru oraz poprawność, z wykorzystaniem próbek kalibracyjnych, próbek ślepych, wzbogaconych w anality, materiałów odniesienia i próbek rzeczywistych.

5.5.1. Powtarzalność oraz precyzja pośrednia

Powtarzalność charakteryzuje precyzję wyników serii pomiarów przeprowadzonych z danym laboratorium, przez danego analityka z wykorzystaniem danego urządzenia pomiarowego w krótkim czasie (Konieczka i Namieśnik 2007). W oparciu o zalecenia ICH (ICH 1996, 2005) i IUPAC (Thompson i in. 2002) przeprowadzono 6 niezależnych oznaczeń analitów występujących w 4 matrycach na 2 poziomach stężeń. Stężenia analitów w próbkach rzeczywistych (Tabela 29) odpowiadały poziomom, dla których ustalone zostały kryteria skuteczności metodyk analitycznych oznaczania DON, T-2, HT-2 i ZEN.

Tabela 29. Poziomy stężenie analitów w próbkach wykorzystanych do określenia powtarzalności i precyzji pośredniej opracowanych procedur analitycznych

Analit	Poziom C1 [ng/g]	Poziom C2 [ng/g]
NIV	50	375
D3G	50	375
DON	100	750
FUSX	50	375
15-ADON	50	375
3-ADON	50	375
NEO	50	375
MAS	50	375
DAS	50	375
T-2 Triol	50	375
HT-2	50	375
T-2	50	375
ZEN	20	150
ZAL	20	150
ZEL	20	150

Powtarzalność wyznaczono w oparciu o obliczone wartości względnego odchylenia standardowego (RSDr). Wartości względnego odchylenia standardowego oznaczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem obu metodyk różniły się w zależności od analitu, matrycy i poziomu stężenia (Tabela 30). Dla każdego analitu i matrycy różnice wartości RSDr między dwoma poziomami stężeń nie były istotne statystycznie. W przypadku większości oznaczeń wartości względnego odchylenia standardowego dla procedury wykorzystującej technikę SPE były niższe w porównaniu z wartościami tego parametru dla procedury wykorzystującej podejście QuEChERS, jednakże porównanie powtarzalności obu technik (test F-Snedecora, $\alpha = 0,05$) ujawniło istotne różnice w wartościach względnego odchylenia standardowego jedynie dla wybranych analitów i matryc. Ustalono, że procedura analityczna wykorzystująca technikę SPE charakteryzuje się większą powtarzalnością dla 3-ADON, MAS i DAS w próbkach pszenicy, NEO i T-2 Triol w próbkach owsa, 15-ADON

w próbkach jęczmienia oraz ZEN w próbkach kukurydzy, dla niższego poziomu stężeń. Obliczone wartości RSDr ($\leq 10\%$) świadczą o dużej precyzji oznaczeń prowadzonych z wykorzystaniem obu procedur i spełnieniu kryteriów skuteczności w odniesieniu do powtarzalności.

Tabela 30. Ocena statystyczna powtarzalności oznaczeń analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych prowadzonych z wykorzystaniem opracowanych procedur (SPE-LC-MS/MS i QuEChERS-LC-MS/MS); n = 6

Analit	Powtarzalność (względne odchylenie standardowe) [%]															
	PSZENICA				OWIES				JĘCZMIEN				KUKURYDZA			
	C1		C2		C1		C2		C1		C2		C1		C2	
	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q
NIV	5,8	6,6	4,7	5,7	6,2	7,2	5,8	6,9	4,2	7,4	3,9	7,0	4,3	7,3	4,5	6,9
D3G	6,2	7,2	5,1	6,3	4,8	7,2	5,2	6,8	6,1	7,9	5,7	7,5	5,9	7,4	4,8	7,0
DON	4,6	6,4	3,8	6,6	5,1	7,2	4,7	6,7	4,5	7,1	4,7	6,9	4,4	6,9	4,1	6,3
FUSX	4,1	6,6	4,2	5,7	4,4	7,8	4,6	6,4	3,9	7,3	3,8	6,5	5,1	7,1	4,6	7,2
15-ADON	5,6	5,4	4,7	4,8	3,8	6,4	4,3	5,1	3,4*	6,9*	3,6	6,3	4,4	6,7	4,5	5,9
3-ADON	3,4*	7,2*	3,7	6,9	4,1	6,5	3,7	7,1	5,0	7,5	4,7	7,7	3,9	6,9	4,2	7,1
NEO	3,8	6,4	3,4	5,4	3,3*	6,8*	3,5	6,4	4,2	7,2	3,9	6,8	4,7	5,9	4,8	6,0
MAS	3,1*	6,5*	3,7	5,9	4,8	7,3	5,1	6,9	4,9	6,4	4,4	6,0	5,2	6,6	4,7	5,8
DAS	3,3*	6,9*	3,1	5,7	3,6	6,7	3,8	7,0	3,9	6,2	4,0	6,5	5,6	7,1	5,2	6,7
T-2 Triol	3,2	5,9	3,0	5,7	3,1*	7,0*	3,5	6,3	5,5	7,3	4,3	6,6	4,7	6,8	5,0	6,3
HT-2	5,4	6,0	4,9	5,5	5,8	7,1	5,4	7,5	4,5	6,7	4,2	6,8	4,6	6,9	4,4	7,2
T-2	6,2	6,8	5,8	5,9	4,8	6,9	4,3	5,8	5,5	6,5	5,1	6,1	3,8	6,2	4,2	5,6
ZEN	2,7	5,0	2,9	4,7	3,3	5,8	3,1	5,1	3,9	5,9	3,1	5,6	2,6*	5,9*	2,8	5,4
ZAL	3,2	4,9	3,5	4,2	4,2	6,7	4,0	6,0	3,7	6,9	3,4	6,2	3,6	6,4	3,2	5,9
ZEL	4,4	6,6	3,9	5,4	3,3	6,3	3,6	6,6	3,6	5,8	3,9	5,3	4,2	5,9	4,2	5,7

* różnice istotne statystycznie; SPE – procedura wykorzystująca technikę SPE, Q – procedura wykorzystująca podejście QuEChERS

Precyzja pośrednia charakteryzuje długoterminowe odchylenie procesu pomiarowego i jest wyznaczana w oparciu o odchylenia standardowe serii pomiarów uzyskanych w danym laboratorium w kilkutygodniowym okresie czasu (Tabela 31). Na wielkość tego parametru wpływają dodatkowo czynniki osobowe i aparaturowe (np. wykorzystanie akcesoriów i odczynników pochodzących z różnych partii produkcyjnych), co czyni precyzję pośrednią pojęciem szerszym od powtarzalności (Konieczka i Namieśnik 2007). Zgodnie z definicją i zasadą wyznaczania precyzji pośredniej obliczone wartości względnych odchyżeń standardowych są większe w odniesieniu do wartościami odpowiadających precyzji w warunkach powtarzalności. Porównanie precyzji pośredniej obu procedur analitycznych (test F-Snedecora, $\alpha = 0,05$) nie ujawniło statystycznie istotnych różnic wartości względnego odchylenia standardowego. Wyniki wyznaczenia precyzji pośredniej porównano z bardziej restrykcyjnymi kryteriami skuteczności dla precyzji obliczonej w warunkach powtarzalności (w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 401/2006 nie zostały sprecyzowane kryteria odnoszące się do wartości względnych odchyżeń standardowych obliczonych w warunkach wyznaczania

precyzji pośredniej) i stwierdzono, że najwyższe dopuszczalne wartości RSD_r nie zostały przekroczone.

Tabela 31. Ocena statystyczna precyzji pośredniej oznaczeń analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych prowadzonych z wykorzystaniem opracowanych procedur (SPE-LC-MS/MS i QuEChERS-LC-MS/MS); n = 6

Analit	Precyzja pośrednia (względne odchylenie standardowe) [%]															
	PSZENICA				OWIES				JĘCZMIEN				KUKURYDZA			
	C1		C2		C1		C2		C1		C2		C1		C2	
	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q
NIV	6,9	9,2	7,3	8,4	7,7	12,0	7,4	10,6	6,4	10,8	5,9	9,9	6,4	9,8	6,7	9,6
D3G	8,3	10,3	7,4	9,0	8,6	9,4	7,6	8,8	7,5	12,7	7,6	10,4	8,4	10,9	7,7	10,1
DON	6,4	8,6	5,6	9,1	7,5	11,4	6,8	11,0	5,9	10,1	6,6	9,9	6,2	9,7	6,5	9,2
FUSX	6,5	9,8	7,3	8,4	6,3	10,3	6,7	9,4	5,5	10,1	5,1	9,5	7,3	10,0	6,8	10,6
15-ADON	7,7	8,8	6,6	7,4	5,7	8,8	6,1	7,9	6,0	9,7	6,9	9,0	6,4	10,3	6,9	9,2
3-ADON	6,4	10,3	6,9	9,6	6,3	8,1	5,9	9,3	7,5	11,2	6,9	11,9	5,7	10,6	6,5	11,2
NEO	7,2	9,1	5,5	8,5	5,2	9,6	6,3	9,0	6,7	10,2	5,8	9,4	6,3	8,2	6,6	8,7
MAS	6,1	8,4	6,5	7,7	7,1	11,8	7,6	10,4	7,6	8,9	6,4	8,1	7,1	9,2	6,2	8,3
DAS	6,8	9,4	6,7	8,7	6,5	9,6	7,4	10,3	5,9	8,5	6,6	9,3	7,8	10,7	6,9	9,5
T-2 Triol	5,6	7,8	5,6	7,1	6,2	10,2	7,2	9,1	7,9	9,8	6,8	8,4	6,7	10,2	7,3	8,9
HT-2	8,8	8,2	7,6	7,6	7,3	9,5	7,2	10,8	7,5	9,4	6,7	9,9	6,9	9,8	6,1	10,3
T-2	8,1	8,7	7,3	7,8	6,9	8,7	6,4	7,9	7,3	8,3	6,9	8,0	5,6	9,1	6,5	8,4
ZEN	5,8	7,9	4,6	7,9	5,4	8,3	5,1	7,8	7,2	7,9	6,5	7,5	4,6	8,2	5,4	7,6
ZAL	7,2	7,3	6,9	7,7	5,3	8,9	4,8	7,7	4,8	9,2	7,2	8,7	6,4	9,0	5,8	8,3
ZEL	7,4	8,5	7,6	7,8	6,0	8,8	6,4	9,2	7,2	8,9	6,4	8,0	6,3	9,3	5,9	9,0

SPE – procedura wykorzystująca technikę SPE, Q – procedura wykorzystująca podejście QuEChERS

5.5.2. Liniowość i zakres pomiarowy

Wyznaczenie liniowości, definiowanej jako zakres pomiarowy, w którym sygnał wyjściowy jest proporcjonalny do zawartości analitu, prowadzono w oparciu o krzywe kalibracyjne (Konieczka i Namieśnik 2007). W tym celu sporządzono serie roztworów wzorcowych, w zakresie stężeń odpowiadających zawartości analitów w próbkach rzeczywistych oraz z uwzględnieniem wartości NDP. Do próbek kalibracyjnych dodano wzorce wewnętrzne. Przeprowadzono pięć niezależnych oznaczeń i wykreślone krzywe kalibracyjne, opisane funkcją postaci:

$$\frac{A_a}{A_{IS}} = f\left(\frac{c_a}{c_{IS}}\right) \quad (1)$$

gdzie:

A_a – pole powierzchni piku analitu;

A_{IS} – pole powierzchni piku wzorca wewnętrznego;

c_a – stężenie analitu w próbce kalibracyjnej;

c_{IS} – stężenie wzorca wewnętrznego w próbce kalibracyjnej.

Na podstawie równań krzywych wzorcowych określono dokładność wyznaczenia wartości stężeń analitów w poszczególnych próbkach kalibracyjnych. Zakres pomiarowy jest pojęciem szerszym od liniowości i oznacza przedział między najniższym i najwyższym stężeniem, jakie mogą być oznaczone z założoną precyzją, dokładnością i liniowością (Konieczka i Namieśnik 2007). Zakresy liniowości analitów wraz ze współczynnikami determinacji (R^2) i dokładnością wyznaczenia stężeń w próbkach kalibracyjnych zostały przedstawione w Tabeli 32. Wartości liczbowe współczynników determinacji (0,9988 – 0,9998) wskazują na liniowość krzywych kalibracyjnych w badanym zakresie stężeń.

Tabela 32. Zakresy liniowości analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Analit	Zakres [ng/g]	R^2	Dokładność [%]
NIV	LOQ - 1000	0,9992	94,6 - 104
D3G	LOQ - 1000	0,9992	93,9 - 105
DON	LOQ - 2000	0,9996	94,6 - 106
FUSX	LOQ - 1000	0,9998	94,8 - 104
15-ADON	LOQ - 1000	0,9990	93,7 - 105
3-ADON	LOQ - 1000	0,9998	94,1 - 105
NEO	LOQ - 1000	0,9990	94,4 - 106
MAS	LOQ - 1000	0,9990	94,8 - 105
DAS	LOQ - 1000	0,9994	94,9 - 103
T-2 Triol	LOQ - 1000	0,9996	94,8 - 106
HT-2	LOQ - 1000	0,9994	95,5 - 106
T-2	LOQ - 1000	0,9998	96,2 - 106
ZEN	LOQ - 400	0,9988	95,1 - 104
ZAL	LOQ - 400	0,9990	94,5 - 105
ZEL	LOQ - 400	0,9994	94,4 - 103

5.5.3. Granice wykrywalności i oznaczalności

Granica wykrywalności (LOD) oznacza najmniejsze stężenie analitu, przy którym istnieje pewność jego obecności w próbce. Parametr ten charakteryzuje zarówno najmniejszą zawartość analitu, jaka może zostać wykryta za pomocą danego urządzenia pomiarowego (IDL), jak i najmniejszą zawartość analitu, możliwą do wykrycia za pomocą danej metodyki analitycznej (MDL). Wartość liczbową MDL jest większa od korespondującej wartości IDL, ponieważ do jej wyznaczenia konieczne jest przeprowadzenie całej procedury analitycznej. Najmniejsza ilość analitu, możliwa do oznaczenia daną metodą analityczną z założoną precyzją i dokładnością jest definiowana jako granica oznaczalności (LOQ). Wartość LOQ jest wielokrotnością wyznaczonej wartości LOD, a w celu jej obliczenia najczęściej przyjmowana jest zależność: $LOQ = 3 \cdot LOD$ (Konieczka i Namieśnik 2007).

Tabela 33. Granice wykrywalności i oznaczalności procedur analitycznych (SPE-LC-MS/MS i QuEChERS-LC-MS/MS) oznaczania związków z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Analit	PRÓBK KALIBRACYJNE		PSZENICA				OWIES				JĘCZMIEN				KUKURYDZA			
	LOD (IDL)	LOQ (IQL)	SPE		Q		SPE		Q		SPE		Q		SPE		Q	
			MDL	ML	MDL	ML	MDL	ML	MDL	ML	MDL	ML	MDL	ML	MDL	ML		
	[ng/ml]		[ng/g]															
NIV	1,12	3,36	1,25	3,76	4,38	13,1	1,68	5,04	5,79	17,4	1,60	4,79	4,88	14,6	1,42	4,26	6,12	18,4
D3G	1,07	3,21	1,38	4,14	3,94	11,8	1,59	4,77	4,74	14,2	1,76	5,28	4,98	15,0	1,87	5,62	4,75	14,2
DON	0,98	2,94	1,11	3,32	3,63	10,9	1,21	3,64	4,94	14,8	1,21	3,64	4,06	12,2	1,39	4,16	5,01	15,0
FUSX	0,83	2,48	1,03	3,09	4,20	12,6	1,06	3,19	5,16	15,5	1,31	3,93	5,52	16,6	1,08	3,24	5,72	17,2
15-ADON	1,04	3,12	1,40	4,19	5,94	17,8	2,03	6,10	6,22	18,7	1,98	5,94	5,93	17,8	1,91	5,74	6,34	19,0
3-ADON	0,98	2,94	1,21	3,62	5,38	16,1	1,79	5,37	5,87	17,6	1,71	5,13	5,80	17,4	1,75	5,24	6,29	18,9
NEO	0,92	2,76	1,52	4,56	3,61	10,8	1,14	3,42	4,00	12,0	1,15	3,45	3,91	11,7	1,78	5,33	4,70	14,1
MAS	0,53	1,59	0,68	2,03	2,60	7,80	1,11	3,33	2,93	8,78	0,86	2,57	3,05	9,16	0,80	2,39	3,20	9,61
DAS	0,59	1,77	1,08	3,25	3,03	9,08	0,98	2,93	3,23	9,70	0,62	1,86	3,52	10,6	1,28	3,85	3,27	9,80
T-2 Triol	0,66	1,98	1,08	3,25	2,73	8,19	0,77	2,31	2,98	8,95	1,03	3,10	3,51	10,5	0,91	2,72	3,49	10,5
HT-2	0,68	2,04	0,96	2,87	1,97	5,90	1,43	4,28	2,62	7,85	1,73	5,18	2,95	8,84	1,77	5,31	3,05	9,15
T-2	0,33	0,99	0,44	1,33	1,14	3,42	0,58	1,74	1,56	4,69	0,48	1,44	1,73	5,18	0,67	2,02	2,17	6,52
ZEN	0,07	0,20	0,08	0,23	0,22	0,65	0,12	0,36	0,29	0,86	0,07	0,22	0,37	1,12	0,12	0,37	0,34	1,01
ZAL	0,07	0,20	0,16	0,49	0,34	1,03	0,20	0,61	0,44	1,32	0,13	0,38	0,44	1,32	0,12	0,37	0,46	1,39
ZEL	0,07	0,20	0,08	0,23	0,29	0,86	0,15	0,46	0,34	1,01	0,09	0,27	0,40	1,21	0,13	0,39	0,46	1,38

SPE – procedura wykorzystująca technikę SPE, Q – procedura wykorzystująca podejście QuEChERS

Określenie liczbowych wartości granic wykrywalności przeprowadzono w oparciu o analizę próbek kalibracyjnych (IDL) i rzeczywistych (MDL), w których stężenie analitów było bliskie spodziewanych wartości tego parametru. W tym celu wyznaczono wartości stosunku sygnału do szumu (S/N) z wykorzystaniem oprogramowania sterującego układem LC-MS/MS (Analyst, wersja 1.5.1, skrypt „Signal-to-noise”) i obliczono stężenie odpowiadające polu powierzchni piku analitu przy $S/N = 3$. W obliczeniach wartości liczbowych granic wykrywalności i oznaczalności obu metodyk analitycznych (Tabela 33) uwzględniono wielkości odzysku analitów.

5.5.4. Niepewność pomiaru

Niepewność definiowana jest jako parametr związany z wynikiem pomiaru, charakteryzujący rozrzut wartości, które mogą być w sposób uzasadniony przypisane wielkości mierzonej (Ellison i in. 2012). Wielkość określająca przedział wyniku analizy, w którym można z określonym prawdopodobieństwem spodziewać się wartości oczekiwanej nazywana jest rozszerzona niepewnością (U). Szacowanie niepewności warunkuje miarodajność pomiaru i jest niezbędne w zapewnieniu spójności pomiarowej (Konieczka i Namieśnik 2007). Wyznaczenie rozszerzonej niepewności przeprowadzono wykorzystując równanie:

$$U = k \sqrt{u_{(c_{wz})}^2 + u_{(m_p)}^2 + u_{(cal)}^2 + u_{(c_{MDL})}^2 + \frac{s_{wyn}^2}{n}} \quad (2)$$

gdzie:

- k – współczynnik rozszerzenia (dla $\alpha = 0,05$; $k = 2$)
- $u_{(c_{wz})}$ – niepewność określenia stężenia użytego wzorca, związana z niepewnością wyznaczenia czystości wzorca i niepewnością określenia jego masy, z niepewnością wyznaczenia masy i objętości roztworów wzorcowych i wzorca wewnętrznego;
- $u_{(m_p)}$ – niepewność związana z określeniem masy próbki, zależna od parametrów stosowanej wagi;
- $u_{(cal)}$ – niepewność etapu kalibracji, uwzględniająca wykorzystanie wzorców wewnętrznych (odchylenie standardowe wyznaczonych współczynników odpowiedzi);
- $u_{(c_{MDL})}$ – niepewność związana z wyznaczeniem stężenia dla ślepej próby;
- s_{wyn} – odchylenie standardowe uzyskanych wyników;
- n – liczba niezależnych analizowanych próbek.

Porównano obliczone wartości rozszerzonej niepewności (Tabela 34) z maksymalną dopuszczalną niepewnością U_f (Rozporządzenie Komisji 2006b), określoną równaniem:

$$U_f = \sqrt{\left(\frac{MDL}{2}\right)^2 + (\alpha \cdot c)^2} \quad (3)$$

gdzie:

MDL – granica wykrywalności metodyki analitycznej;

c – stężenia analitu w próbce;

α – stała wartość liczbowa, zależna od stężenia.

Tabela 34. Wartości niepewności stężenia analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach zbożowych

Analit	U [%]							
	PSZENICA		OWIES		JĘCZMIEN		KUKURYDZA	
	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q
NIV	8,8	12	9,7	15	8,1	13	8,6	12
D3G	9,3	13	9,7	15	9,8	15	10	14
DON	7,8	10	7,9	13	7,9	11	8,2	11
FUS X	8,3	11	8,7	12	8,3	12	8,9	12
15-ADON	7,9	11	8,4	12	8,3	13	8,8	12
3-ADON	8,9	12	9,3	12	8,7	12	9,1	13
NEO	8,4	11	8,5	11	8,6	13	9,0	11
MAS	8,4	12	9,3	14	9,0	10	9,6	11
DAS	9,0	13	8,6	11	8,7	12	9,6	12
T-2 Triol	8,8	11	8,3	12	9,7	13	9,2	12
HT-2	9,0	11	8,9	11	8,6	11	8,7	11
T-2	9,6	10	8,6	11	8,3	11	8,4	11
ZEN	9,9	11	10	11	9,6	12	9,8	11
ZAL	9,8	11	10	11	10	11	9,3	11
ZEL	9,3	11	9,7	11	9,7	11	9,8	11

SPE – procedura wykorzystująca technikę SPE, Q – procedura wykorzystująca podejście QuEChERS

Stwierdzono, że obie metodyki analityczne umożliwiają otrzymanie wyników z niepewnością pomiaru mniejszą niż najwyższa dopuszczalna niepewność obliczona na podstawie wzoru (3).

5.5.5. Poprawność – wykorzystanie materiałów odniesienia

Poprawność to stopień zgodności wyniku oznaczenia (wartość średnia obliczona na podstawie serii pomiarów), uzyskanego z wykorzystaniem danej metodyki analitycznej, z wartością oczekiwaną. Wyznaczenie tego parametru przeprowadzono w oparciu o analizę próbek matrycowych materiałów odniesienia: laboratoryjnych (LRM) i materiałów do kontroli jakości (QCM). Ograniczona dostępność materiałów odniesienia (głównie ze względu na anality) zawężyła możliwość określenia poprawności do wybranych mikotoksyn: DON, T-2, HT-2 i ZEN. Z drugiej strony względnie szeroki wachlarz materiałów odniesienia

o różnym składzie matrycy, pozwolił na sprawdzenie poprawności w odniesieniu do próbek pasz i produktów spożywczych. W przypadku, gdy stężenie analitu w próbce znajdowało się poza zakresem pomiarowym konieczne było rozcieńczenie ekstraktu. Wyniki oznaczeń mikotoksyn w próbkach materiałów odniesienia, przeprowadzonych z wykorzystaniem opracowanych procedur wraz z wartościami odniesienia zostały przedstawione w Tabeli 35.

Tabela 35. Wyniki oznaczeń DON, ZEN, T-2 i HT-2 w próbkach materiałów odniesienia z wykorzystaniem opracowanych procedur analitycznych

Materiał odniesienia	Rodzaj matrycy	Analit	Wartość odniesienia ± niepewność [ng/g]	Wartość oznaczona ± niepewność (SPE) [ng/g]	Wartość oznaczona ± niepewność (Q) [ng/g]
TRILOGY D-W-156	Pszenica	DON	400±100	390±31	359±37
BIOPURE BRM 003022	Pszenica	DON	877±23	871±68	815±85
TRILOGY D-B-510	Jęczmień	DON	500±100	485±38	464±52
TRILOGY D-B-509	Jęczmień	DON	1000±100	942±74	918±100
TRILOGY D-C-612	Kukurydza	DON	500±100	484±40	486 ±55
FAPAS T2244	Kukurydza	DON	1092±345	983±81	928±110
BIOPURE BRM 003012	Kukurydza	DON	2010±290	1850±150	1770±200
FAPAS T2279	Płatki śniadaniowe	DON	503±179	477±37	421±44
FAPAS T2268	Płatki śniadaniowe	DON	618±213	534±42	449±47
FAPAS T2240	Pasza	DON	775±258	810±63	688±72
FAPAS T2258	Pasza	DON	991±318	890±69	815±85
IRMM EFL2	Pasza	DON	253±23	244±19	231±24
IRMM EFL3	Pasza	DON	562±46	539±42	549±57
AOKIN RMM-01-572a	Pszenica	ZEN	20,83±9,17	21,1±2,1	15,9±1,7
TRILOGY Z-C-311	Kukurydza	ZEN	88,4±13,9	87,5±8,6	100±11
FAPAS T2231	Płatki śniadaniowe	ZEN	52,7±23,2	52,6±5,2	45,5±4,9
FAPAS T2263	Żywność dla dzieci	ZEN	13,6±5,90	13,1±1,3	12,5±1,3
FAPAS T2236	Żywność dla dzieci	ZEN	20,2±8,90	18,9±1,9	17,1±1,8
FAPAS T2242	Pasza	ZEN	179±75,0	179±18	184±20
IRMM EFL2	Pasza	ZEN	30,8±4,4	31,9±3,2	30,8±3,3
IRMM EFL3	Pasza	ZEN	430±15,5	447±44	438±47
AOKIN RMM-78-428a	Pszenica	HT-2	105±46	115±10	117±13
FAPAS T2243	Owies	T-2	65,5±28,8	70,4±6,0	63,6±6,8
TRILOGY T-C-973	Kukurydza	T-2	1153,3±159,6	1195±100	998±110
		HT-2	1381,4±177,1	1265±110	1188±130
FAPAS T2280	Mąka owsiana	T-2	220±88,5	230±20	238±25
		HT-2	89,1±39,9	82,5±7,3	86,5±9,8
IRMM EFL2	Pasza	T-2	18,2±2,0	20,1±1,7	20,9±2,3
		HT-2	48,7±4,8	46,3±4,0	42,9±4,8
IRMM EFL3	Pasza	T-2	49,7±2,9	52,6±4,4	55,4±6,2
		HT-2	173±11,2	167±15	167±19

SPE – procedura wykorzystująca technikę SPE, Q – procedura wykorzystująca podejście QuEChERS

Zgodność uzyskanych wartości z wartościami odniesienia porównano na podstawie zależności (Konieczka i Namieśnik 2007):

$$|x_i - x_{odn}| < 2 \sqrt{u_{(x_i)}^2 + u_{(x_{odn})}^2} \quad (4)$$

gdzie:

- x_i – wartość wyniku oznaczenia;
- x_{odn} – wartość odniesienia;
- $u_{(x_i)}$ – niepewność wyniku oznaczenia;
- $u_{(x_{odn})}$ – niepewność wartości odniesienia.

W związku ze spełnieniem zależności opisanej wzorem (4), wyniki oznaczeń uznano za zgodne z wartościami odniesienia.

5.6. Analiza próbek rzeczywistych

Opracowane procedury analityczne wykorzystano do oznaczania mikotoksyn w próbkach rzeczywistych. Analizie poddano łącznie 486 próbek zbóż i produktów zbożowych, pobranych w gospodarstwach rolnych (województwo kujawsko-pomorskie i warmińsko-mazurskie), dostarczonych przez wytwórnie pasz (woj. kujawsko-pomorskie, warmińsko-mazurskie, wielkopolskie, lubelskie i mazowieckie), młyny gospodarcze i przetwórnice spożywcze (woj. kujawsko-pomorskie) oraz dzięki uprzejmości Krajowego Laboratorium Pasz Instytutu Zootechniki PIB w Lublinie, a także zakupionych w handlu detalicznym (woj. kujawsko-pomorskie, pomorskie, wielkopolskie). Badano próbki ziarna o różnym przeznaczeniu: na cele spożywcze (pszenica, $n = 35$; owies, $n = 43$; kukurydza, $n = 5$; jęczmień, $n = 23$) i paszowe (pszenica, $n = 42$; owies, $n = 3$; kukurydza, $n = 35$; jęczmień, $n = 8$) oraz gotowe mieszanki paszowe ($n = 47$). Wśród próbek produktów zbożowych wyróżniono następujące grupy:

- Mąka ($n = 17$),
- Makaron ($n = 28$),
- Kasze, płatki i otręby ($n = 61$),
- Pieczywo ($n = 42$),
- Przekąski (ciastka, wafelki, chrupki, chipsy, popcorn, paluszki, krakersy, sucharki, $n = 50$),
- Żywność dla małych dzieci ($n = 28$) i niemowląt ($n = 19$).

Sumaryczne zestawienie wyników analiz próbek przedstawiono w Tabelach 36 (zboże) i 37 (produkty). Ogólne zanieczyszczenie badanego materiału, określone jako odsetek próbek, w których stężenie analitu były wyższe niż granica wykrywalności, kształtowało się następująco: DON (96,5%), NIV (80,9%), ZEN (75,2%), D3G (70,4%), HT-2 (55,4%), 15-ADON (38,8%), T-2 (37,2%), 3-ADON (35,5%), MAS (31,4%), ZEL (17,5%), T-2 triol (10,7%), NEO (7,0%), FUS X (6,6%), ZAL (2,9%) oraz DAS (1,3%). W przypadku 9 próbek stwierdzono przekroczenie najwyższych dopuszczalnych stężeń i wartości określonych jako graniczne w Zaleceniach UE (Tabele 5 i 6, str. 22 i 23). Niezgodności z przepisami w zakresie NDP dotyczyły poziomu DON w 2 próbkach otrębów pszennych (720 ± 56 ng/g i 715 ± 56 ng/g), w próbce mąki pszennej (834 ± 65 ng/g), w próbce krakersów (490 ± 38 ng/g) oraz próbce pieczywa pszennego (476 ± 37 ng/g), a także w próbce pszenicy paszowej, w której zawartość DON wyniosła 8720 ± 910 ng/g, przy jednoczesnym względnie wysokim poziomie D3G (943 ± 120 ng/g). Zawartość toksyn T-2 i HT-2 w próbce popcornu (odpowiednio: $116,2 \pm 9,7$ ng/g i 237 ± 21 ng/g) przewyższała poziom wskaźnikowy dla sumy tych związków (Tabela 5). W próbce tej wykryto również inne trichoteceny grupy A: MAS (<MQL), NEO ($29,7 \pm 2,7$ ng/g) oraz T-2 Triol ($12,3 \pm 1,1$ ng/g), a także trichoteceny B (DON, D3G, 3- i 15-ADON) i ZEN. Niespełnienie zaleceń w zakresie wartości orientacyjnych stężeń mikotoksyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt stwierdzono w dwóch próbkach mieszanek paszowych dla świń, w odniesieniu do zawartości DON (2120 ± 170 ng/g) oraz ZEN (481 ± 48 ng/g). W żadnej próbce pszenicy i produktów nie wykryto DAS, a FUS X i NEO obecne były jedynie w 2 z 233 próbek tej grupy (ciastka pszenne, pszenica paszowa – FUS X, płatki pszenne, pszenica spożywcza – NEO), w stężeniach <MQL. Produkty pszenne nie zawierały ponadto T-2 Triol (za wyjątkiem jednej próbki mąki, w której $c_{T-2 \text{ Triol}} < \text{MQL}$), w stężeniach powyżej MDL. W próbkach makaronu nie wykryto także 3-ADON i ZEL, w pieczywie pszennym – toksyny T-2, a w próbkach mąki – MAS. Największa częstotliwość występowania DAS charakteryzowała próbki ziarna owsa (zboże konsumpcyjne – 44,2%, paszowe – 66,7%). W grupie produktów owsianych, analit ten wykryto jedynie w dwóch próbkach: otręby ($8,45 \pm 0,73$ ng/g) i płatki ($4,31 \pm 0,38$ ng/g). Żadna z próbek owsa i produktów nie zawierała 15-ADON, a ZAL obecny był w jednej próbce ziarna ($c_{ZAL} < \text{MQL}$). W grupie płatków owsianych nie stwierdzono ponadto obecności ZEL, a wśród próbek otrębów owsianych – także NEO i T-2 Triol. W próbce makaronu owsianego wykryto jedynie 3 mikotoksyny fuzaryjne: NIV i T-2 ($c < \text{MQL}$) oraz HT-2 ($5,58 \pm 0,50$ ng/g). Podobnie, jak w przypadku pszenicy i produktów pszennych, w próbkach produktów kukurydzianych nie występował DAS (w stężeniach powyżej MDL). Obecność tego związku

stwierdzono jedynie w czterech próbkach kukurydzy paszowej, natomiast w żadnej próbce z tej grupy nie wykryto ZAL. Produkty kukurydziane również nie zawierały ZAL, a także FUS X (za wyjątkiem jednej próbki płatków kukurydzianych, $c_{FUS X} < MQL$) i NEO (za wyjątkiem jednej próbki popcornu, opisanej powyżej). W próbkach pieczywa, mąki, płatków i kaszy kukurydzianej nie wykryto T-2 Triol, MAS nie występował w próbkach pieczywa i kaszy, a ZEL – w próbkach kaszy i płatków kukurydzianych. Żadna z próbek kukurydzy przeznaczonej na cele spożywcze nie zawierała NEO, FUS X, MAS, DAS, T-2 Triol, T-2 i ZEL.

Tabela 36. Zawartość analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach zbóż

Analit		PSZENICA	OWIES	JĘCZMIENŃ	KUKURYDZA
NIV	Liczba próbek (%) [*]	66 (86%)	46 (100%)	29 (94%)	35 (88%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	114±13	2510±370	198±25	221±27
D3G	Liczba próbek (%) [*]	51 (67%)	7 (15%)	14 (45%)	38 (95%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	943±120	14,7±2,1	54,9±8,3	274±38
DON	Liczba próbek (%) [*]	73 (95%)	39 (85%)	29 (94%)	40 (100%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	24,8±2,8
	Stężenie max [ng/g]	8720±910	170±22	304±34	2940±330
FUS X	Liczba próbek (%) [*]	1 (1%)	14 (30%)	0	10 (25%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	-	<MQL
	Stężenie max [ng/g]		13,5±1,7	-	35,7±4,4
15-ADON	Liczba próbek (%) [*]	32 (42%)	0	2 (7%)	40 (100%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	-	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	61,7±6,9	-	22,9±2,9	604±74
3-ADON	Liczba próbek (%) [*]	36 (47%)	4 (9%)	5 (16%)	38 (95%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	73,9±9,0	<MQL	17,7±2,2	292±37
NEO	Liczba próbek (%) [*]	1 (1%)	10 (22%)	3 (10%)	6 (15%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]		15,3±1,7	<MQL	<MQL
MAS	Liczba próbek (%) [*]	25 (32%)	25 (54%)	24 (77%)	23 (58%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	<MQL	99±13	9,7±1,0	10,7±1,2
DAS	Liczba próbek (%) [*]	0	21 (46%)	2 (7%)	4 (10%)
	Stężenie min [ng/g]	-	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	-	15,5±1,8	<MQL	<MQL
T-2 triol	Liczba próbek (%) [*]	1 (1%)	12 (26%)	2 (7%)	11 (28%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]		<MQL	<MQL	39,2±4,5
HT-2	Liczba próbek (%) [*]	43 (56%)	42 (91%)	18 (51%)	24 (60%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	13,8±1,5	167±19	113±12	275±31
T-2	Liczba próbek (%) [*]	22 (29%)	18 (39%)	13 (42%)	19 (48%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	8,73±0,88	106±11	44,7±4,8	104±12
ZEN	Liczba próbek (%) [*]	59 (77%)	18 (39%)	13 (42%)	40 (100%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	1,14±0,13
	Stężenie max [ng/g]	847±91	137±15	23,4±2,7	682±76
ZAL	Liczba próbek (%) [*]	4 (5%)	1 (2%)	1 (3%)	1 (3%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	1,61±0,17			
ZEL	Liczba próbek (%) [*]	20 (27%)	1 (2%)	5 (16%)	15 (38%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	21,5±2,4		<MQL	2,80±0,31

* % próbek z zawartością analitów powyżej MDL

Tabela 37. Zawartość analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach produktów zbożowych

Analit		PRODUKTY PSZENNE	PRODUKTY OWSIANE	PRODUKTY JĘCZMIENNE	PRODUKTY KUKURYDZIANE
NIV	Liczba próbek (%)*	112 (72%)	16 (89%)	17 (94%)	26 (48%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	115±10	165±16	33,7±2,7	161±14
D3G	Liczba próbek (%)*	128 (82%)	11 (61%)	12 (67%)	34 (63%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	54,0±5,0	51,8±5,0	20,4±2,0	19,9±2,0
DON	Liczba próbek (%)*	155 (99%)	15 (83%)	18 (100%)	54 (100%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	834±65	143±11	28,8±2,3	262±21
FUS X	Liczba próbek (%)*	1 (1%)	2 (11%)	0	1 (2%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	-	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	-	3,48±0,30	-	-
15-ADON	Liczba próbek (%)*	17 (11%)	0	0	40 (74%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	-	-	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	21,9±1,7	-	-	35,6±3,1
3-ADON	Liczba próbek (%)*	27 (17%)	4 (22%)	0	31 (57%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	-	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	17,1±1,5	10,4±1,0	-	19,7±1,8
NEO	Liczba próbek (%)*	1 (1%)	2 (11%)	1 (6%)	1 (2%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	29,7±2,7
	Stężenie max [ng/g]	-	3,54±0,30	-	-
MAS	Liczba próbek (%)*	15 (10%)	3 (17%)	5 (28%)	5 (9%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	5,81±0,49	47,6±4,4	2,94±0,26	<MQL
DAS	Liczba próbek (%)*	0	2 (11%)	0	0
	Stężenie min [ng/g]	-	4,31±0,38	-	-
	Stężenie max [ng/g]	-	8,45±0,73	-	-
T-2 triol	Liczba próbek (%)*	4 (3%)	1 (6%)	1 (6%)	1 (2%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	4,98±0,41	<MQL	12,3±1,1
	Stężenie max [ng/g]	<MQL	-	-	-
HT-2	Liczba próbek (%)*	66 (42%)	16 (89%)	6 (33%)	7 (13%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	47,8±4,3	91,1±8,1	46,4±4,0	237±21
T-2	Liczba próbek (%)*	25 (16%)	15 (83%)	4 (22%)	19 (35%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	11,8±1,1	13,6±1,2	22,0±1,8	116,2±9,7
ZEN	Liczba próbek (%)*	130 (83%)	8 (44%)	6 (33%)	44 (82%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	12,0±1,2	9,03±0,90	3,86±0,37	10,1±1,0
ZAL	Liczba próbek (%)*	2 (1%)	0	0	0
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	-	-	-
	Stężenie max [ng/g]	<MQL	-	-	-
ZEL	Liczba próbek (%)*	10 (6%)	0	0	2 (4%)
	Stężenie min [ng/g]	<MQL	-	-	<MQL
	Stężenie max [ng/g]	0,354±0,033	-	-	<MQL

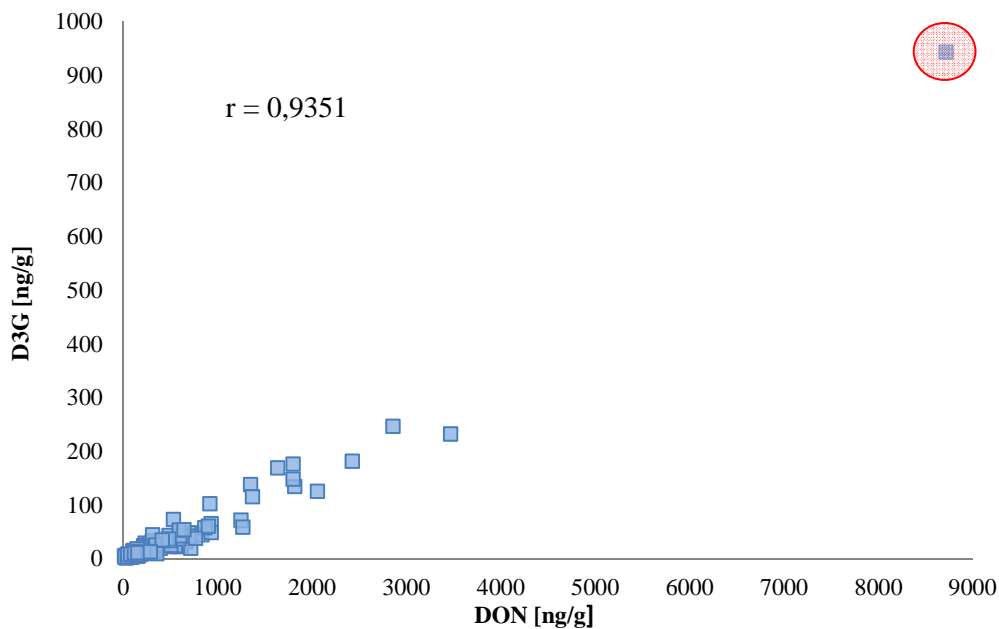
* % próbek z zawartością analitów powyżej MDL

W grupie ziarna i produktów jęczmiennych nie wykryto FUS X, ZAL występował w jednej próbce jęczmienia spożywczego ($c_{ZAL} < \text{MQL}$), a T-2 Triol w 2 próbkach ziarna paszowego. Próbki jęczmienia paszowego nie zawierały DAS, a w ziarnie przeznaczonym na cele spożywcze nie wykryto 15-ADON. W próbkach produktów jęczmiennych również nie wykryto 15-ADON i DAS, a także 3-ADON i ZEL, a obecność NEO stwierdzono w jednej próbce kaszy jęczmiennej ($c_{NEO} < \text{MQL}$). W większości grup w największych stężeniach występował DON. Wyjątek stanowiły próbki owsa paszowego, owsa spożywczego oraz

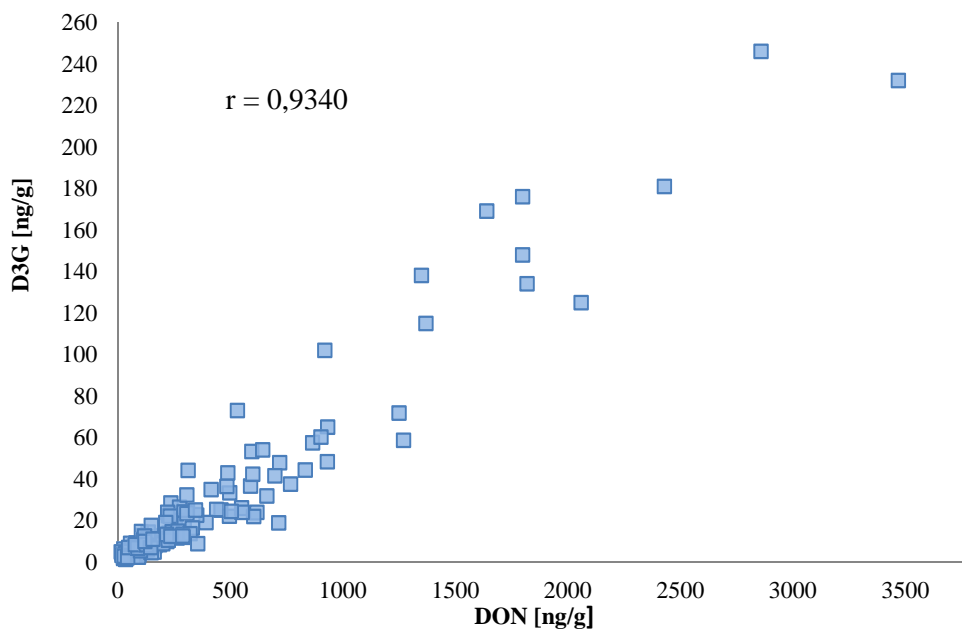
płatków owsianych, w których najwyższe poziomy osiągnął NIV (odpowiednio 2510 ± 370 ng/g, 812 ± 120 ng/g i 165 ± 16 ng/g). Podobnie w próbkach płatków jęczmiennych i jęczmienia przeznaczonego na cele spożywcze, największe stężenia zanotowano dla NIV (odpowiednio $26,6 \pm 2,2$ ng/g i 198 ± 25 ng/g), natomiast w próbkach kaszy jęczmiennej – dla toksyny HT-2 ($46,4 \pm 4,0$ ng/g). DON wykryto we wszystkich pszennych produktach spożywczych, za wyjątkiem jednej próbki kaszki pszennej dla niemowląt. Jego najwyższe stężenia w próbkach płatków, kaszy i makaronu wyniosły, odpowiednio $110,0 \pm 8,6$ ng/g, 497 ± 39 ng/g i 663 ± 52 ng/g. W pozostałych grupach (pieczywo, przekąski, otręby, mąka) najwyższe stężenia DON odpowiadały przedstawionym wcześniej wartościom przekraczającym NDP. W grupie żywności dla dzieci oznaczono DON na najwyższym poziomie, równym 175 ± 14 ng/g w próbce herbatników pszennych, natomiast w próbkach żywności dla niemowląt DON był obecny w najwyższym stężeniu w próbce kaszki ($31,9 \pm 2,5$ ng/g). Najwyższa zawartość DON w próbkach pszenicy spożywczej (532 ± 55 ng/g) była ponad dwukrotnie niższa od wartości NDP. Blisko 80% próbek pszenicy i produktów pszennych zanieczyszczonych DON, zawierało także D3G. Analiza statystyczna wyników ujawniła silną monotoniczną zależność stężeń obu związków. Rozkłady zmiennych (c_{DON} i c_{D3G}) oceniano wykorzystując testy Kołmogorowa-Smirnowa i Lillieforsa (PQstat, wersja 1.4.8). W związku z odrzuceniem hipotezy zerowej o normalności rozkładów ocenę zależności przeprowadzono z wykorzystaniem testu korelacji rang Spearmana dla próbek, w których stężenie analitów było wyższe niż MQL. Istotność współczynnika korelacji została oceniona z wykorzystaniem testu t. Na Rysunku 42a zaprezentowano rozrzut wyników dla wszystkich próbek pszenicy i produktów pszennych ($r = 0,9351$, $p < 0,0001$). Dzięki rangowaniu test korelacji Spearmana jest bardziej odporny na tzw. obserwacje odstające w porównaniu z parametrycznym testem korelacji liniowej Pearsona. Nie mniej jednak usunięto obserwacje odbiegające i ponownie zbadano korelację między stężeniami obu analitów (Rys. 42b.). Pomimo obniżenia wartości współczynnika korelacji r ($r = 0,9340$, $p < 0,0001$), porównanie wartości p z przyjętym poziomem istotności ($\alpha = 0,05$), pozwoliło na uznanie ważnej statystycznie, silnej korelacji między stężeniami DON i D3G w próbkach pszenicy i produktów pszennych. ZEN występował w każdej próbce pszenicy paszowej (najwyższe stężenie 847 ± 91 ng/g) i w blisko połowie próbek pszenicy konsumpcyjnej (najwyższe stężenie $20,4 \pm 2,2$ ng/g). Wszystkie próbki mąki, otrębów, pieczywa i płatków pszennych również zawierały ten związek. Najwyższą zawartość ZEN w produktach pszennych odnotowano w próbce mąki ($12,0 \pm 1,2$ ng/g). Blisko 40% próbek pszenicy paszowej zawierało pochodną zearalenonu – ZEL

(najwyższe stężenie $21,5 \pm 2,4$ ng/g), podczas gdy w pszenicy konsumpcyjnej związek ten występował w 11,4% próbek na poziomie bliskim MQL.

(a)



(b)



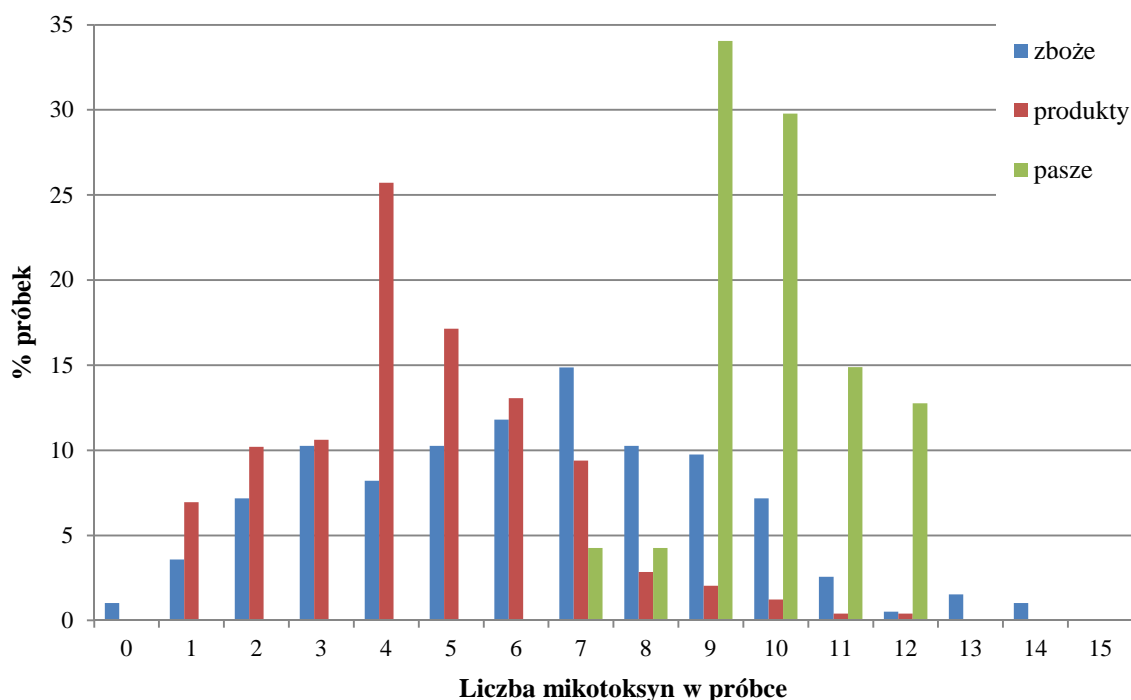
Rys. 42. Rozrzut wyników oznaczeń DON i D3G w próbkach pszenicy i produktów pszennych: (a) dla wszystkich próbek, w których stężenie analitów było wyższe niż MQL; (b) po usunięciu obserwacji odbiegających

Toksyna HT-2 była obecna we wszystkich próbkach otrębów pszennych, w zakresie stężeń $9,09 \pm 0,82$ ng/g ÷ $47,8 \pm 4,3$ ng/g, 60% próbek płatków ($c_{HT-2} < MQL$), 52% próbek makaronu (najwyższe stężenie $5,51 \pm 0,50$ ng/g). Połowa próbek pieczywa pszennego zawierała HT-2 (najwyższe stężenie $7,78 \pm 0,70$ ng/g), związek ten był również obecny w próbkach przekąsek pszennych (37%, $c_{max} = 4,30 \pm 0,39$ ng/g) i mąki (28,6%, $c_{max} = 11,2 \pm 1,0$ ng/g). We wszystkich próbkach pszenicy paszowej, obok DON, D3G i ZEN, występował NIV, a w blisko 80% próbek 3- i 15-ADON. Spośród produktów pszennych 3- i 15-ADON występowały w najwyższych stężeniach w otrębach, osiągając poziom w próbkach zanieczyszczonych w zakresie, odpowiednio: $7,96 \pm 0,71$ ng/g ÷ $17,1 \pm 1,6$ ng/g oraz $15,1 \pm 1,2$ ng/g ÷ $21,9 \pm 1,7$ ng/g. Analogiczne wartości dla próbek zboża spożywczego były poniżej MQL, a dla zboża paszowego: $3,75 \pm 0,33$ ng/g ÷ $73,9 \pm 6,6$ ng/g (3-ADON) oraz $5,06 \pm 0,40$ ng/g ÷ $61,7 \pm 4,9$ ng/g (15-ADON). Toksyna T-2 została wykryta w 20% próbek pszenicy spożywczej, 35% próbek pszenicy paszowej, w stężeniach nie przekraczających 10,0 ng/g. Podobnie jak toksynę HT-2, T-2 zawierały wszystkie próbki otręb pszennych (najwyższe stężenie $11,8 \pm 1,1$ ng/g). W próbkach owsa spożywczego pod względem częstości występowała dominowały: NIV (100%), HT-2 (90,7%) oraz DON (83,7%). Toksyny T-2 i HT-2 były obecne w blisko 90% próbek płatków owsianych, a ich najwyższe stężenia (odpowiednio $13,6 \pm 1,2$ ng/g i $91,1 \pm 8,1$ ng/g) były wyższe od analogicznych wartości w próbkach otrębów owsianych ($5,75 \pm 0,49$ ng/g – T-2, $10,83 \pm 0,96$ ng/g – HT-2), z których każda zawierała oba anality. W próbce otrębów owsianych, o najwyższej zawartości NIV, T-2 i HT-2, obecne były również inne mikotoksyny, w stężeniach: DON $52,7 \pm 4,2$ ng/g, D3G $6,59 \pm 0,61$ ng/g, NEO $3,54 \pm 0,30$ ng/g, MAS $47,6 \pm 4,4$ ng/g, DAS $4,31 \pm 0,37$ ng/g, T-2 Triol $4,98 \pm 0,41$ ng/g, FUS X, 3-ADON i ZEN <MQL. Jęczmień i produkty jęczmienne charakteryzowały się najwyższym udziałem próbek zanieczyszczonych MAS (zboże paszowe 87,5 %, zboże konsumpcyjne 73,9%, płatki 40,0% i kasza 23,1%). Wszystkie próbki kaszy jęczmiennej zawierały NIV i DON. Toksyny T-2 i HT-2 w stężeniach powyżej MQL oznaczono w jednej próbce płatków jęczmiennych (odpowiednio: $2,93 \pm 0,24$ ng/g i $10,70 \pm 0,92$ ng/g) i w jednej próbce kaszy jęczmiennej (odpowiednio: $22,0 \pm 1,8$ ng/g i $46,4 \pm 4,0$ ng/g). W jęczmieniu paszowym związki te były obecne w 75% próbek ($c_{max} = 44,7 \pm 4,8$ ng/g, T-2; $c_{max} = 113 \pm 12$ ng/g, HT-2). W zbożu przeznaczonym na cele spożywcze toksynę T-2 wykryto w 30,0% próbek ($c_{max} = 30,4 \pm 3,3$ ng/g), a toksynę HT-2 – w 52,2% ($c_{max} = 40,5 \pm 4,4$ ng/g). DON, 15-ADON i ZEN były obecne we wszystkich próbkach kukurydzy spożywczej i paszowej. Ponad 94% próbek ziarna przeznaczonego na cele paszowe zawierało również NIV, D3G oraz 3-ADON. Anality te wykryto także w próbkach kukurydzy spożywczej: 40% (NIV) i 80% (D3G i 3-ADON). Ich

najwyższe stężenia wynosiły: NIV $29,1 \pm 3,6$ ng/g, D3G $45,7 \pm 6,4$ ng/g oraz 3-ADON $42,9 \pm 5,4$ ng/g. Obecność MAS stwierdzono jedynie w próbkach kukurydzy paszowej (65,5%), w najwyższym stężeniu wynoszącym $10,7 \pm 1,2$ ng/g i w czterech próbkach produktów kukurydzianych (przekąski, płatki i mąka, $c_{MAS} < MQL$). ZEN występował we wszystkich próbkach kukurydzianego pieczywa ($c_{max} = 9,77 \pm 0,96$ ng/g), mąki ($c_{max} = 3,41 \pm 0,33$ ng/g), płatków ($c_{max} = 6,39 \pm 0,63$ ng/g) i kaszy ($c_{max} = 4,73 \pm 0,46$ ng/g), a jego najwyższą zawartość ($10,1 \pm 1,0$ ng/g) oznaczono w próbce chipsów. W próbkach produktów przeznaczonych dla niemowląt, oprócz DON (obecnego w 94,7% próbek), wykryto również NIV (3 próbki), D3G (1 próbka), MAS (1 próbka) oraz ZAL (1 próbka), w stężeniach poniżej MQL. ZEN był obecny w 31,6% produktów tej grupy ($c_{max} = 1,10 \pm 0,11$ ng/g). W próbce kaszki o najwyższej zawartości DON, oznaczono również toksyny T-2 ($1,34 \pm 0,13$ ng/g), HT-2 ($3,59 \pm 0,33$ ng/g) oraz ZEN ($0,312 \pm 0,031$ ng/g). Występowanie mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach żywności dla małych dzieci kształtowało się następująco: DON 100%, ZEN 82,1% ($c_{max} = 8,16 \pm 0,81$ ng/g, próbka chrupek kukurydzianych), D3G 75% ($c_{max} = 26,4 \pm 2,5$ ng/g, próbka herbatników pszennych o najwyższej zawartości DON spośród produktów tej grupy), NIV i 15-ADON po 42,9%, w najwyższych stężeniach wynoszących, odpowiednio: $7,73 \pm 0,68$ ng/g (próbka płatków pszennych) i $28,6 \pm 2,5$ ng/g (próbka chrupek kukurydzianych), T-2 32,1% ($c_{max} = 2,92 \pm 0,28$ ng/g), 3-ADON 25,0% ($c_{max} = 12,6 \pm 1,2$ ng/g), HT-2 21,4% ($c_{max} = 3,16 \pm 0,30$ ng/g), MAS, NEO i ZAL – poniżej 10% próbek. We wszystkich próbkach mieszanek paszowych oznaczono NIV ($5,45 \pm 0,52 \div 277 \pm 27$ ng/g), D3G ($< MQL \div 151 \pm 15$ ng/g), DON ($37,1 \pm 3,0$ ng/g $\div 2120 \pm 170$ ng/g) oraz ZEN ($1,26 \pm 0,13$ ng/g $\div 481 \pm 48$ ng/g). Toksyny T-2 ($c_{max} = 65,6 \pm 6,3$ ng/g) i HT-2 ($c_{max} = 175 \pm 16$ ng/g) obecne były w 98% próbek. Ponad 90% próbek mieszanek paszowych zawierało 3- i 15-ADON, a pochodną zearalenonu – ZEL wykryto w 68% próbek.

5.6.1. Współwystępowanie analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w próbkach surowców i produktów zbożowych

Ze względu na możliwe synergistyczne oddziaływanie mikotoksyn występujących w żywności i paszach nawet na względnie niskich poziomach, coraz większego znaczenia nabierają informacje o ich współwystępowaniu w badanym materiale (Speijers i Speijers 2004, Grenier i Oswald 2011). Rozkład udziału próbek w zależności od liczby wykrytych mikotoksyn dla głównych grup badanego materiału przedstawiono na Rysunku 43.



Rys. 43. Rozkład udziału próbek w zależności od liczby wykrytych mikotoksyn

Dla próbek mieszanek paszowych zanotowano 19 układów współwystępujących mikotoksyn, z których każdy zawierał od 7 do 12 analitów. W 91% próbek tej grupy wykryto przynajmniej 9 mikotoksyn, a najczęstszymi kombinacjami były: NIV, D3G, DON, 15-ADON, 3-ADON, MAS, HT-2, T-2 i ZEN (17% próbek) oraz NIV, D3G, DON, 15-ADON, 3-ADON, HT-2, T-2, ZEL, ZEN (15 % próbek). Układem 12-analitowym o największej częstotliwości występowania (9% próbek) było jednoczesne zanieczyszczenie próbek NIV, D3G, DON, NEO, 15-ADON, 3-ADON, MAS, T-2 Triol, HT-2, T-2, ZEN i ZEL. Próbkę zawierającą największą liczbę analitów (13 i 14) pochodziły z grupy zbóż (kukurydza paszowa). Ponad 70% próbek produktów zbożowych zanieczyszczonych było przynajmniej 4 mikotoksynami. Najczęściej obserwowano współwystępowanie NIV, D3G, DON i ZEN, obecnych w 36% próbek makaronów, 29% próbek przekąsek zbożowych, 27% próbek pieczywa i 26% próbek mąki. Najbardziej złożoną pod względem liczby kombinacji analitów była grupa próbek płatków, kaszy i otrębów (39 układów), w której zaobserwowano współwystępowanie od 2 do 12 analitów, z największym udziałem układów 5-analitowych (20%), natomiast pod względem częstości występowania dominowały połączenia: NIV, D3G, DON, HT-2 (8% próbek), NIV, D3G, DON, HT-2, T-2 (7% próbek) oraz NIV, D3G, DON i ZEN (7% próbek). Anality wykryte w próbkach pieczywa współwystępowały w 18 kombinacjach (od 4 do 9 mikotoksyn), a największy udział stanowiły układy zawierające 6 analitów (39% wszystkich

kombinacji), spośród których najczęściej obserwowano współwystępowanie NIV, D3G, DON, 3-ADON, HT-2 i ZEN (7% próbek) oraz NIV, D3G, DON, HT-2, T-2 i ZEN (5% próbek). W 15% próbek tej grupy wykrywano jednocześnie NIV, D3G, DON, HT-2 i ZEN, a w 10% – D3G, DON, ZEN i 3-ADON. W próbkach przekąsek zbożowych stwierdzono jednocześnie występowanie od 2 do 10 analitów (4% próbek zawierało wyłącznie DON), w 15 kombinacjach, z największą liczbą połączeń 3, 4, i 6-składnikowych (po 20% wszystkich kombinacji). Wśród układów zawierających 6 analitów najczęściej współwystępowały D3G, DON, 3-ADON, 15-ADON, T-2 i ZEN (10% próbek), a 8 % próbek zawierało DON, D3G i ZEN. Największy udział (27%) w ogólnej liczbie 11 kombinacji mikotoksyn (od 2 do 6 i 8 składników) w próbkach makaronów stanowiły połączenia 4-analitowe, a drugim pod względem częstości występowania w próbkach był układ NIV, D3G, DON, HT-2 i ZEN (25% próbek). Próbki mąki zawierały od 2 do 8 analitów (z wyłączeniem układu 7 mikotoksyn), w 9 kombinacjach. W 18% próbek tej grupy zaobserwowano współwystępowanie NIV, D3G, DON, 3-ADON, 15-ADON, HT-2, ZEN i ZEL (12%) oraz NIV, D3G, DON, 3-ADON, 15-ADON, HT-2, T-2 i ZEN (6%). Współwystępowanie mikotoksyn z wyznaczonymi wartościami NDP w układzie DON+T-2+HT-2+ZEN (włączając kombinacje z innymi analitami) stwierdzono w 16% próbek produktów zbożowych, w tym w 20% próbek płatków, kaszy i otrębów, 17% próbek pieczywa, 12% próbek mąki, 11% próbek makaronu i 8% próbek przekąsek zbożowych. W 29% próbek pieczywa, 25% próbek makaronu, 18% próbek mąki i przekąsek oraz 8% próbek płatków kaszy i otrębów jednocześnie wykryto DON, HT-2 i ZEN (wyłączając współwystępowanie w układzie DON+T-2+HT-2+ZEN). Ponadto blisko połowa (47%) próbek produktów zbożowych zawierała DON+ZEN, 10% próbek DON+T-2+HT-2 i DON+T-2+ZEN, 6% próbek DON+HT-2, a T-2+HT-2 oraz DON+T-2 obecne były w 2% próbek. W 68% próbek żywności dla niemowląt występował jeden analit (DON lub MAS), w 16% próbek wykryto DON+ZEN, a kombinacje NIV+D3G+DON+HT-2+T-2+ZEN, NIV+DON+HT-2+ZEN+ZAL oraz NIV+DON+ZEN stwierdzono w 5% próbek (każda). Analiza próbek żywności przeznaczonej dla małych dzieci pozwoliła na stwierdzenie współwystępowania mikotoksyn w 15 układach, zawierających od 2 do 7 analitów. W 18% próbek wykryto jednocześnie DON, D3G i ZEN, a 28% próbek zawierało jedną z następujących kombinacji: NIV+D3G+DON+15-ADON+3-ADON+HT-2+ZEN, NIV+D3G+DON+15-ADON+3-ADON+ZEN, NIV+D3G+DON+15-ADON+ZEN, D3G+DON+ZEN, w równym udziale.

5.6.2. Oszacowanie narażenia pokarmowego na anality z grupy mikotoksyn fuzaryjnych

Podjęto próbę oceny narażenia konsumentów na mikotoksyny obecne w pożywieniu, na podstawie oszacowania dziennego pobrania, zgodnie z równaniem:

$$DP_m = \sum \frac{c \cdot DS}{m_c} \quad (5)$$

gdzie:

DP_m – dzienne pobranie mikotoksyny [$\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c./dzień];

c – stężenie mikotoksyny w danej grupie produktów [ng/g];

DS – dzienne spożycie produktów danej grupy [$\text{kg}/\text{dzień}$];

m_c – masa ciała [kg].

Oszacowanie DP_m przeprowadzono na podstawie danych dotyczących przeciętnego miesięcznego spożycia poszczególnych grup produktów zbożowych w latach 2011-2012 (ARR 2012, GUS 2013), w oparciu o wartości średnie wyników oznaczeń mikotoksyn w poszczególnych grupach produktów, przyjmując w obliczeniach poziom połowy MDL dla próbek, w których stężenie analitu było poniżej MDL oraz następujące wartości przeciętnej masy ciała: niemowlęta 7,5kg, małe dzieci 15kg, dzieci 25kg, dorośli 65kg. W obliczeniach wartości dziennego pobrania przez dzieci i małe dzieci przyjęto, odpowiednio połowę i jedną trzecią dziennego spożycia dla dorosłych (González-Osnaya i in. 2011, Škrbić i in. 2012). Oszacowano również dzienne spożycie zbożowych kaszek dla niemowląt na poziomie 0,055kg. Obliczone wartości DP_m wyrażono jako %TDI (Tabela 38) dla związków o ustalonej wartości tego parametru, zgodnie z Rozporządzeniami UE (Tabela 4, str. 21).

Tabela 38. Dzielne pobranie mikotoksyn fuzaryjnych o wyznaczonych wartościach TDI

Analit	Niemowlęta *		Małe dzieci *		Dzieci	Dorośli	
	A	B	A	B			
NIV	DP_m ($\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.)	0,0065	0,0087	0,0214	0,0220	0,0198	0,0152
	% TDI	0,9	1,2	3,1	3,1	2,8	2,2
DON	DP_m ($\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.)	0,0742	0,1447	0,8972	0,9171	0,8253	0,6349
	% TDI	7,4	14,5	89,7	91,7	82,5	63,5
T-2 + HT-2	DP_m ($\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.)	0,0070	0,0083	0,0102	0,0137	0,0123	0,0095
	% TDI	11,7	13,8	17,0	22,8	20,5	15,8
ZEN	DP_m ($\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.)	0,0010	0,0019	0,0091	0,0092	0,0083	0,0064
	% TDI	0,5	1,0	4,6	4,6	4,2	3,2

* Obliczenie DP_m przeprowadzono w dwóch wariantach: Niemowlęta A – przyjęto założenie, że grupa produktów dla niemowląt jest jedynym źródłem produktów zbożowych w ich diecie; Niemowlęta B – założono możliwość włączenia do diety produktów zbożowych dla małych dzieci; Małe dzieci A – założono, że małe dzieci spożywają przekąski zbożowe z grupy produktów „żywność dla małych dzieci”; Małe dzieci B – przyjęto możliwość włączenia do diety małych dzieci produktów z grupy przekąsek zbożowych.

Dziennie pobranie mikotoksyn z żywnością pochodzenia zbożowego stanowiło od 0,5% do 91,7% wartości tolerowanego dziennego pobrania, w zależności od związku, grupy konsumentów i przyjętych założeń. Wartości DP_m w grupie niemowląt (<15% TDI) mogą świadczyć o niskim ryzyku narażenia pokarmowego na oznaczane mikotoksyny, jednakże przyjęte założenia nie uwzględniają spożywania produktów spoza grupy żywności dla niemowląt i małych dzieci, np. pieczywa, które stanowiło najistotniejszą składową (blisko 70%) dziennego pobrania DON u pozostałych grup konsumentów. DON obecny był we wszystkich próbkach pieczywa ($n = 42$), a przyjęta w obliczeniach wartość średnia stężenia (193 ng/g) była bliska medianie ($182 \pm 14 \text{ ng/g}$) i niższa od wartości NDP. Najwyższe wartości DP_m DON oszacowano dla małych dzieci (89,7-91,7 %TDI), co potwierdza słuszność zaliczenia ich do tzw. grupy ryzyka (Rozporządzenie Komisji (WE) 2005, Sherif i in. 2009). Uwzględnienie w obliczeniach zawartości analitów, które mogą stanowić przyczynę do ogólnego narażenia na DON (D3G, 3- i 15-ADON) powodowało wzrost wartości DP_m od kilku do kilkunastu procent.

5.6.3. Oznaczanie wybranych analitów (DON, T-2 i ZEN) w próbkach zbóż i mieszanek paszowych z wykorzystaniem techniki ELISA

Łatwość stosowania i względnie niska kosztocłonność sprawiają, że immunoenzymatyczne techniki wykrywania mikotoksyn są powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym i paszowym do monitorowania jakości surowców i produktów. Z tego względu zastosowano test ELISA do analizy losowo wybranych 25 próbek pszenicy, owsa, jęczmienia, kukurydzy i mieszanek paszowych, wykorzystując handlowo dostępne testy: AgraQuant[®] Deoxynivalenol, AgraQuant[®] T-2 Toxin oraz AgraQuant[®] Zearalenone (Romer Labs), przeznaczone do oznaczania, odpowiednio: DON, T-2 i ZEN. Wyniki oznaczeń mikotoksyn wraz z wartościami uzyskanymi podczas analizy próbek z wykorzystaniem opracowanych procedur zostały przedstawione w Tabeli 39. W przypadku 4 próbek wyniki oznaczenia DON z wykorzystaniem techniki ELISA były poniżej granicy oznaczalności testu, w 3 – poniżej granicy wykrywalności, a dla jednej próbki uzyskana wartość znalazła się powyżej górnej granicy zakresu pomiarowego. Dla większości próbek obserwowano przeszacowanie wartości stężenia DON oznaczonego techniką ELISA, co może wskazywać na reakcje krzyżowe z innymi analitami lub składnikami matrycy. W informacji producenta testu zadeklarowane są jedynie reakcje krzyżowe z 3- i 15-ADON.

Tabela 39. Wyniki oznaczeń DON, ZEN, T-2 w próbkach zbóż i mieszanek paszowych, przeprowadzonych z wykorzystaniem technik ELISA i LC-MS/MS

Nr próbki	Rodzaj matrycy	TRICHOTECENY B [ng/g]			TRICHOTECENY A [ng/g]				ZEN I POCHODNE [ng/g]		
		ELISA		LC-MS/MS	ELISA		LC-MS/MS		ELISA		LC-MS/MS
		DON	DON	ΣTB ^a	T-2	T-2	T-2 + HT-2	ΣTA ^b	ZEN	ZEN	ΣZENs ^c
1	pszenica	265±37	150±16	170±20	<LOQ	4,26±0,86	12,9±1,4	12,9±1,4	65,5±7,3	56,5±6,0	57,8±6,2
2	pszenica	>5000	8720±910	9840±1130	<LOD	<MQL	11,5±1,2	11,5±1,2	<LOD	5,72±0,61	5,72±0,61
3	pszenica	1430±210	920±96	1080±120	<LOD	<MQL	6,35±0,67	6,35±0,67	72,8±8,2	84,1±9,0	86,1±9,3
4	pszenica	497±74	346±36	383±44	<LOD	<MDL	<MQL	<MQL	146±16	137±15	138±15
5	pszenica	2920±430	2060±210	2320±270	<LOQ	5,05±0,51	18,9±2,0	19,6±2,3	<LOD	12,1±1,3	12,1±1,3
6	owies	294±44	<MQL	394±45	51,4±8,2	8,50±0,86	36,0±3,8	154±18	<LOD	9,7±1,1	9,7±1,1
7	owies	<LOQ	72,0±9,5	91±10	60,7±9,8	<MDL	59,6±6,4	71,1±7,9	29,7±4,0	25,6±2,9	25,6±2,9
8	owies	346±51	170±22	2700±370	130±21	54,1±5,8	131±15	139±16	<LOD	4,27±0,48	4,27±0,48
9	owies	<LOD	20,3±2,7	24,0±2,9	<LOD	<MDL	4,52±0,48	15,6±1,8	154±21	137±15	137±15
10	owies	<LOQ	40,9±5,4	442±51	125±20	69,2±7,4	122±13	138±16	<LOD	<MDL	<MDL
11	jęczmień	386±51	304±34	400±46	<LOD	<MDL	<MDL	<MDL	<LOQ	23,4±2,7	23,4±2,7
12	jęczmień	<LOD	<MDL	14,0±1,6	<LOD	<MQL	5,84±0,63	7,01±0,79	27,4±3,4	22,5±2,7	23,5±2,7
13	jęczmień	<LOQ	45,3±5,1	123±15	55,2±8,9	11,1±1,2	51,6±5,6	62,0±7,1	<LOD	<MDL	<MDL
14	jęczmień	<LOD	90±10	129±15	<LOQ	<MQL	10,2±1,1	16,2±1,8	<LOD	1,61±0,19	1,61±0,19
15	jęczmień	<LOQ	113±13	226±27	<LOD	<MQL	7,10±0,77	10,6±1,2	<LOQ	3,08±0,36	3,08±0,36
16	kukurydza	2700±390	1490±170	2360±270	288±47	63,1±7,1	309±35	358±41	186±25	196±22	199±23
17	kukurydza	635±94	353±40	636±73	127±21	40,8±4,7	124±14	143±17	248±33	252±28	253±29
18	kukurydza	1620±240	997±110	1380±160	<LOD	<MQL	<MQL	6,76±0,79	<LOD	6,82±0,76	6,82±0,76
19	kukurydza	592±88	453±51	665±76	100±16	16,3±1,8	88,0±9,9	110±13	243±32	228±26	230±26
20	kukurydza	634±94	341±39	607±70	<LOQ	13,5±1,5	16,1±1,8	17,1±1,9	173±23	172±19	173±20
21	m. paszowa	678±98	555±46	784±67	<LOQ	7,22±0,81	17,1±1,9	18,5±2,1	44,7±6,0	37,0±4,3	37,0±4,3
22	m. paszowa	371±55	226±19	351±30	<LOQ	9,6±1,1	16,9±1,9	16,9±1,9	<LOQ	12,0±1,4	12,0±1,4
23	m. paszowa	930±140	623±51	816±69	26,1±4,2	10,9±1,2	21,2±2,5	24,5±2,9	45,8±6,2	37,4±4,4	37,4±4,4
24	m. paszowa	329±49	218±18	283±24	31,4±5,2	7,73±0,87	22,4±2,6	35,5±4,2	351±47	386±45	388±45
25	m. paszowa	1240±180	1020±80	1180±100	61,2±9,9	15,9±1,8	52,7±5,9	57,0±6,8	464±63	481±56	485±57

^aΣTB – suma DON, D3G, NIV, FUS-X, 3-ADON, 15-ADON; ^bΣTA – suma T-2, HT-2, NEO, MAS, DAS, T-2 Triol; ^cΣZENs – suma ZEN, ZAL, ZEL; ELISA (LOD i LOQ podane przez producenta testu) : DON (LOD = 200 ng/g, LOQ = 250 ng/g), T-2 (LOD = 20 ng/g, LOQ = 25 ng/g), ZEN (LOD = 20 ng/g, LOQ = 25 ng/g)

Po uwzględnieniu wyników oznaczeń pozostałych trichotecenów B uzyskano zgodność wartości średnich, przy czym w próbkach kukurydzy i mieszanek paszowych różnice między wynikami były większe, im większy był udział NIV w różnicy zawartości Σ TB i DON, co może wskazywać na brak reakcji krzyżowych z tym związkiem. Przypuszczenia tego nie potwierdzają jednak wartości stężeń wyznaczone dla próbek owsa – w przypadku próbki nr 6 otrzymano wynik fałszywie dodatni (294 ± 44 ng/g), lecz niższy od sumy pozostałych analitów z grupy B. W próbce tej oznaczono NIV (380 ± 56 ng/g) oraz FUS X ($13,5 \pm 1,6$ ng/g), natomiast 3- i 15-ADON oraz D3G nie zostały wykryte. W przypadku próbki owsa nr 8 również znaczny udział w wartości różnicy poziomów Σ TB i DON miała zawartość NIV (2510 ± 370 ng/g). Powyższe obserwacje mogą świadczyć o pewnym powinowactwie NIV do przeciwciał stosowanych w teście ELISA lub też o wpływie składników matrycy na wynik pomiaru. Wyższe wartości wyników oznaczeń DON, w próbkach pszenicy i kukurydzy, prowadzonych z użyciem testów ELISA w porównaniu z technikami chromatograficznymi zostały zaobserwowane również w innych badaniach (Zachariasova i in. 2008, Matić i in. 2011). W blisko połowie próbek poddanych analizie z wykorzystaniem techniki ELISA, ZEN nie został wykryty i/lub oznaczony. W przypadku pozostałych próbek uzyskano zgodność wyników oznaczeń. Prawdopodobnie w związku z niską zawartością pochodnych ZEN w próbkach nie obserwowano ich wpływu na wartości stężeń wyznaczone w wyniku zastosowania testu ELISA. Toksyna T-2 nie została wykryta w większości próbek analizowanych z wykorzystaniem techniki ELISA, a w przypadku próbek, w których określono stężenie tego związku wyznaczone wartości były wyższe w porównaniu z wynikami oznaczeń prowadzonych z użyciem techniki LC-MS/MS. Uwzględnienie stężenia toksyny HT-2 pozwoliło na uzyskanie zgodności większości wyników oznaczeń. W obliczeniach wzięto również pod uwagę zawartości pozostałych trichotecenów A. W związku z tym, że były one względnie niskie w porównaniu ze stężeniami toksyny HT-2 trudno wnioskować o ich wpływie na wyniki oznaczeń. Test ELISA może stanowić użyteczne narzędzie wewnętrznego monitoringu surowców i produktów, a na podstawie wartości stężeń wyznaczonych w wyniku jego zastosowania można wnioskować o sumarycznej zawartości związków danej grupy. Nie mniej jednak nie można wykluczyć wpływu składników matrycy, obecnych w nieoczyszczonych ekstraktach próbek, na przeszacowanie wyznaczonych wartości, dlatego też wyniki oznaczeń prowadzonych z wykorzystaniem testu ELISA wymagają potwierdzenia przez zastosowanie bardziej zaawansowanych technik analitycznych.

IV. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Obserwowany w ciągu ostatnich dekad rozwój technologii w dziedzinie spektrometrii mas i rozszerzający się obszar jej wykorzystania spowodowały, że technika ta jest coraz częściej stosowana w procedurach wykrywania i oznaczania śladowych ilości zanieczyszczeń środowiska i żywności. Szczególnie tandemowe spektrometry mas stanowią uniwersalne, a zarazem selektywne i czułe detektory, które w połączeniu z technikami chromatograficznymi pozwalają na wiarygodną analizę jakościową i ilościową.

Zbadano możliwość wykorzystania techniki LC-MS/MS w oznaczaniu mikotoksyn fuzaryjnych, najczęściej zanieczyszczających surowce, żywność i pasze. Zgodnie z zaleceniami i wskazaniem UE, do grupy analitów włączono również pochodne wtórnych metabolitów pleśni i mikotoksyny „zamaskowane”. Wyznaczono optymalne warunki pracy spektrometru mas. Na podstawie widm mas analitów uzyskanych w wyniku analizy próbek wzorcowych przygotowanych w wielu układach rozpuszczalników, dokonano wyboru optymalnych jonów pierwotnych, a charakterystyczne reakcje ich fragmentacji zostały wykorzystane do identyfikacji i analizy ilościowej (tryb MRM). W wyniku procesu optymalizacji warunków rozdzielania chromatograficznego stwierdzono, że faza stacjonarna PFP (grupy pentafluorofenylowe przyłączone do łańcuchów alkilowych, związanych na podłożu krzemionkowym) jako jedyna umożliwia rozdzielanie dwóch izomerów: 3- i 15-ADON, gdy eluent zawiera w swoim składzie metanol. Użycie metanolu, jako składnika organicznej fazy ruchomej, zostało podyktowane większą intensywnością jonizacji analitów. Zastosowanie zmiennego trybu pracy spektrometru mas pozwoliło na opracowanie metody jednoczesnego oznaczania i identyfikacji kilkunastu analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych. Możliwość oznaczenia wielu substancji w jednym cyklu analitycznym ma szczególne znaczenie w analizie zanieczyszczeń żywności, m.in. w odniesieniu do szybkości uzyskania informacji niezbędnych w podejmowaniu decyzji podczas procesów produkcyjnych.

Opracowano dwie procedury przygotowania próbek do analizy: wykorzystującą technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE) w oczyszczaniu ekstraktów oraz podejście QuEChERS. W proponowanych procedurach stosowana jest nieskomplikowana aparatura, powszechnie dostępna w laboratoriach analitycznych, a dzięki obniżeniu masy próbki (przy zachowaniu optymalnego stosunku masa próbki/objętość ekstrahenta) możliwe było ograniczenie zużycia rozpuszczalnika organicznego. Na podstawie wyników badań wielkości odzysku analitów

z próbek o różnym składzie matrycy stwierdzono, że optymalnym wypełnieniem kolumnienek SPE jest PSA (aminy pierwszo- i drugorzędowe), materiał dotychczas nie dedykowany oczyszczaniu ekstraktów próbek analizowanych na obecność mikotoksyn. Zbadano przydatność różnych ekstrahentów i technik ekstrakcji do izolacji analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych. Mając na względzie wyniki analiz statystycznych (odzysk), jak również możliwość jednoczesnego przygotowania wielu próbek, za najlepsze rozwiązanie uznano ekstrakcję poprzez wytrząsanie z rozpuszczalnikiem (MeOH:H₂O 90:10, v/v) w czasie 60 minut. Dobrano masę sorbentu (PSA) stanowiącego wypełnienie kolumnienek SPE (500 mg) oraz rozdrobienie próbki, na podstawie wyników analizy próbek rzeczywistych. Zmodyfikowano oryginalną metodykę QuEChERS (badając zastosowanie różnych ekstrahentów i soli wpływających na efektywność procesu ekstrakcji) i potwierdzono możliwość jej wykorzystania w przygotowaniu próbek zbożowych do analizy. Dla obu procedur wyznaczono wpływ składników matrycy na sygnał pomiarowy analitów, a w celu jego zminimalizowania wykorzystano znaczone izotopowo analogi DON, T-2, HT-2 i ZEN.

Przeprowadzono walidację opracowanych procedur i porównano je pod względem wydajności ekstrakcji, powtarzalności i precyzji pośredniej. Pomimo istotnych różnic wartości wymienionych parametrów w odniesieniu do wybranych analitów i matryc, stwierdzono, że zarówno procedura wykorzystująca technikę SPE, jak i podejście QuEChERS spełniają kryteria skuteczności określone przepisami UE. Granice wykrywalności i oznaczalności, wyznaczone dla obu metodyk (znacznie poniżej NDP), wskazują na możliwość oznaczenia śladowych ilości analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych. Analiza próbek matrycowych materiałów odniesienia i porównanie wyznaczonych stężeń z wartościami deklarowanymi, pozwoliły na stwierdzenie poprawności obu procedur, a oszacowane niepewności nie przekroczyły najwyższej dopuszczalnej wartości, określonej rozporządzeniem wspólnotowym.

Przeprowadzono analizę blisko pięciuset próbek zbóż i produktów zbożowych z zastosowaniem nowo opracowanych metodyk. Stwierdzono przekroczenie wartości NDP (9 próbek) w odniesieniu do zawartości DON, ZEN oraz toksyn T-2 i HT-2. Najczęściej wykrywanymi związkami były DON, NIV, ZEN oraz D3G. W większości grup analizowanych próbek w najwyższych stężeniach występował DON. Zaobserwowano istotną monotoniczną zależność między poziomami DON i D3G w próbkach pszenicy i produktów pszenicznych. Jest to pierwszy raport o zanieczyszczeniu D3G, jak również ZAL i ZEL surowców i produktów zbożowych, obecnych na polskim rynku. Zgodnie z zaleceniami

i wezwaniami EFSA zebrano również informacje o występowaniu 3- i 15-ADON w próbkach zbożowych (EFSA 2013b), a także określono współwystępowanie analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych w poszczególnych rodzajach próbek. Podjęta próba oszacowania narażenia pokarmowego na mikotoksyny fuzaryjne, w oparciu o wyznaczone wartości dziennego pobrania, wskazała na największy udział DON w wartości TDI i potwierdziła opinię Komisji Europejskiej o możliwym spożyciu mikotoksyn fuzaryjnych na poziomie bliskim TDI w grupie małych dzieci. Na podstawie porównania wyników oznaczeń mikotoksyn z użyciem testów ELISA i opracowanych procedur, stwierdzono przeszacowanie wyznaczonych stężeń DON i T-2 (technika ELISA), co prowadzi do konieczności potwierdzenia otrzymanych wyników przez zastosowanie bardziej zaawansowanych technik analitycznych (np. LC-MS/MS).

V. STRESZCZENIE

Wtórne metabolity pleśni (mikotoksyny) stanowią powszechne zanieczyszczenia zbóż. Zdolność grzybów do jednoczesnej biosyntezy wielu mikotoksyn oraz fakt, że dany surowiec może być zanieczyszczony różnymi grzybami powodują, iż substancje te często występują razem w niskich stężeniach. Chociaż nie jest możliwe wyeliminowanie mikotoksyn z zasobów żywności i pasz, zastosowanie odpowiednich praktyk rolniczych, właściwe przechowywanie i kontrola produktów może obniżyć narażenie na te substancje. W tym kontekście rozwój i stosowanie wiarygodnych procedur analitycznych odgrywają zasadniczą rolę w ocenie charakteru i poziomu zanieczyszczenia mikotoksynami żywności i pasz.

W pracy przedstawiono krótką charakterystykę analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych, określając, m.in. ich występowanie i oddziaływanie na organizm, uregulowania prawne, a także problem mikotoksyn „zamaskowanych”. Zaprezentowano również informacje o procedurach analitycznych wykorzystywanych do wykrywania i oznaczania analitów z grupy mikotoksyn fuzaryjnych. W części doświadczalnej przedstawiono wyniki badań dotyczących możliwości wykorzystania techniki LC-MS/MS w oznaczaniu mikotoksyn fuzaryjnych, najczęściej zanieczyszczających surowce, żywność i pasze. Zgodnie z zaleceniami UE, do grupy analitów włączono również pochodne wtórnych metabolitów pleśni i mikotoksyny „zamaskowane”. Opracowano dwie procedury analityczne, wykorzystujące różne podejścia na etapie przygotowania próbek do analizy (technika SPE i QuEChERS). Określono wpływ różnych parametrów prowadzenia procesu ekstrakcji (m.in. rodzaj rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, technika ekstrakcji, rodzaj i masa sorbentu, rozdrobnienie materiału) na odzysk analitów z próbek o różnym składzie matrycy. Dla obu procedur ustalono wielkość, tzw. efektu matrycowego oraz wyznaczono podstawowe parametry walidacyjne. Przeprowadzono analizę blisko pięciuset próbek pochodzenia zbożowego z wykorzystaniem opracowanych metodyk, określając, m.in. współwystępowanie analitów w próbkach oraz wyznaczając wartości dziennego pobrania, na podstawie których oszacowano narażenie pokarmowe wyrażone jako %TDI. Porównano wyniki oznaczeń mikotoksyn przeprowadzonych z zastosowaniem opracowanych procedur oraz techniki ELISA, powszechnie wykorzystywanej w monitorowaniu zanieczyszczenia mikotoksynami surowców i produktów zbożowych.

VI. ABSTRACT

Secondary metabolites of molds (mycotoxins) are common contaminants of cereals. Both the ability of fungi to simultaneous biosynthesis of several mycotoxins and the fact that raw material may be contaminated with different fungi make these substances are often co-occur at low levels. Although it is not possible to eliminate mycotoxins from food and feed produce, the use of appropriate agricultural practices, proper storage and control strategies can reduce the exposure to these substances. In this context, the development and use of reliable analytical procedures is of great importance in assessing the nature and level of mycotoxin contamination of food and feed. The thesis presents a brief description of the analytes from *Fusarium* mycotoxins group, specifying, among others, their occurrence and impact on living organisms, regulations, and the "masked" mycotoxins problem as well as information on the analytical procedures used for detection and determination of the analytes. In the experimental section, the results of the research on the possibilities of application of the LC-MS/MS technique for the determination of the *Fusarium* mycotoxins, most commonly contaminating raw materials, food and feed, have been presented. Following the EU recommendation, the derivatives of secondary metabolites of molds and the "masked" mycotoxins have also been included to the analytes group. Two analytical procedures using different approaches to sample preparation (SPE and QuEChERS) have been developed. The influence of various factors of the extraction process (including extraction solvent, extraction technique, type and mass of the sorbent, sample particle size) on the recovery of the analytes from samples of different matrices has been evaluated. For both procedures matrix effects as well as the method performance parameters have been determined. The developed procedures were applied in analysis of nearly five hundred samples of cereal origin. Based on the results, the co-occurrence of analytes as well as dietary exposure (% of TDI) have been evaluated. The results of mycotoxins determination carried out using the developed procedures and the ELISA technique (commonly used in the monitoring of mycotoxin contamination of raw materials and cereal products) have been compared.

VII. LITERATURA

1. AB Sciex. 2012. Brochure: AB SCIEX QTRAP 5500 System. www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-cms_056910.pdf
2. Abramović B.F., Jajić I.M., Jurić V.B., Gaál F.F. 2005. *J. Serb. Chem. Soc.* 70, 1005-1013.
3. Adejumo T.O., Hettwer U., Karlovsky, P. 2007. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 350-357.
4. Ager B.K. 2010. Roman agricultural magic. PhD thesis. The University of Michigan.
5. Almeida I., Martins H.M., Santos S., Costa J.M., Bernardo F. 2011. *Mycotoxin Res.* 27, 177-181.
6. Anastassiades M., Lehotay S., Stajnbaher D., Schenck F. 2003. *J. AOAC Int.* 86, 412-431.
7. Annesley T.M. 2003. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.* 49, 1041-1044.
8. Ardrey R.E. 2003. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, ss. 276.
9. ARR. 2012. Agencja Rynku Rolnego – Biuletyn Informacyjny. 3, ARR, Warszawa, ss.52.
10. Barker S.A. 2000a. *J. Chromatogr. A.* 880, 63-68.
11. Barker S.A. 2000b. *J. Chromatogr. A.* 885, 115-127.
12. Barna-Vetro I., Gyöngyösi A., Solti L. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 729-731.
13. Beltrán E., Ibáñez M., Sancho J.V., Hernández F. 2009. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1801-1809.
14. Bennett J.W., Klich M. 2003. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497-516.
15. Bensassi F., Zaied C., Abid S., Hajlaoui M. R., Bacha H. 2010. *Food Control.* 21, 281-285.
16. Benzoni E., Minervini F., Giannoccaro A., Fornelli F., Vigo D., Visconti A. 2008. *Reprod. Toxicol.* 25, 461-467.
17. Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., De Saeger S., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G., Joerg Stroka J. 2013. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 165-186.
18. Berthiller F., Dall'Asta C., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G., Krska R. 2005a. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3421-3425.
19. Berthiller F., Schuhmacher R., Adam A., Krska R. 2009. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1243-1252.

20. Berthiller F., Schuhmacher R., Buttinger G., Krska R. 2005b. *J. Chromatogr. A.* 1062, 209-216.
21. Berthiller F., Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. 2007. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 33-37.
22. Bhatnagar D., Yu J., Ehrlich K.C. 2002. *Toxins of Filamentous Fungi.* W: Breitenbach M., Cramer R., Lehrer S.B. (red). *Fungal Allergy and Pathogenicity.* Chem Immunol. Basel. Karger. 81, 167-206.
23. Binder E.M. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133, 149-166.
24. Biselli S., Hartig L., Wegner H., Hummert C. 2004. *LC-GC Europe.* 17, 25-30.
25. Blokland M.H., Sterk S.S., Stephany R.W., Launay F.M., Kennedy D.G., van Ginkel L.A. 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 1221-1227.
26. Brenn-Struckhoffova Z., Cichna-Markl M., Bohm C., Razzazi-Fazeli E. 2007. *Anal. Chem.* 79, 710-717.
27. Briones-Reyes D., Gómez-Martínez L., Cueva-Rolón R. 2007. *Food Chem.* 100, 693-698.
28. Burek O., Wisniewska-Dmytrow H., Zmudzki J. 2011. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 55, 737-740.
29. Cahill L.M., Kruger S.C., McAlice B.T., Ramsey C.S., Prioli R., Kohn B. 1999. *J. Chromatogr. A.* 859, 23-28.
30. Campbell H.M., Armstrong J.F. 2007. *J. AOAC Int.* 90, 1610-1622.
31. Capriotti A.L., Cavaliere C., Giansanti P., Gubbiotti R., Samperi R., Laganà A. 2010b. *J. Chromatogr. A.* 1217, 2521-2532.
32. Capriotti A.L., Foglia P., Gubbiotti R., Rocca C., Samperi R., Laganà A. 2010a. *J. Chromatogr. A.* 1217, 6044-6051.
33. CAST Report. 2003. *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems.* W: Richard J.L, Payne G.A. (red.) Council for Agricultural Science and Technology Task Force report No. 139. Ames, ss. 199.
34. Castillo M., Montes R., Navarro A., Segarra R., Cuesta G., Hernandez E. 2008. *J. Food Compos. Anal.* 21, 423-427.
35. Cavaliere C., D'Ascenzo G., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Lagana A. 2005. *Food Chem.* 92, 559-568.
36. Cavaliere C., Foglia P., Guarino C., Motto M., Nazzari M., Samperi R., Laganà A., Berardo N. 2007. *Food Chem.* 105, 700-710.
37. CEN. 2009a. *Animal feeding stuffs - Determination of Deoxynivalenol in animal feed - HPLC method with UV detection and immunoaffinity column clean-up.* EN 15791:2009.

38. CEN. 2009b. Animal feeding stuffs. Determination of zearalenone in animal feed. High performance liquid chromatographic method with fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up. EN 15792:2009.
39. CEN. 2010a. Foodstuffs. Determination of deoxynivalenol in cereals, cereal products and cereal based foods for infants and young children. HPLC method with immunoaffinity column cleanup and UV detection. EN 15891:2010.
40. CEN. 2010b. Foodstuffs. Determination of zearalenone in maize based baby food, barley flour, maize flour, polenta, wheat flour and cereal based foods for infants and young children. HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection. EN 15850:2010.
41. Chun H.S., Choi E.H., Chang H.J., Choi S.W., Eremin S.A. 2009. *Anal. Chim. Acta.* 639, 83–89.
42. Cody R.B. 2002. Electrospray ionization mass spectrometry: History, Theory and Instrumentation. W: Pramanik B.N., Ganguly A.K., Gross M.L. (red.). Applied Electrospray Mass Spectrometry: Practical Spectroscopy Series Volume 32. Marcel Dekker Inc. NY.
43. Cullen D., Caldwell R.W., Meisner H., Mirocha C.J. 1982. *Science.* 217, 776-778.
44. Dall'Asta C., Galaverna G., Biancardi A., Gasparini M., Sforza S., Dossena A., Marchelli R. 2004a. *J. Chromatogr. A.* 1047, 241-247.
45. Dall'Asta C., Sforza S., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. 2004b. *J. Chromatogr. A.* 1054, 389-395.
46. Dall'erta A., Cirlini M., Dall'asta M., Del Rio D., Galaverna G., Dall'asta C. 2013. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 305-312.
47. De Saeger S., Sibanda L., Van Peteghem C. 2003. *Anal. Chim. Acta.* 487, 137-143.
48. De Smet D., Monbaliu S., Dubruel P., Van Peteghem C., Schacht E., De Saeger S. 2010. *J. Chromatogr. A.* 1217, 2879–2886.
49. Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. 2012. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414-430.
50. Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P. 1993. *Microbiol. Rev.* 57, 595–604.
51. Dorokhin D., Haasnoot W., Franssen, M.C.R., Zuilhof H., Nielen M.W.F. 2011. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 3005–3011.
52. Duca R.C., Bravin F., Delaforge M., Vladescu L., Badea I.A., Criste R.D. 2009. *J. Agric. Food Chem.* 57, 497-504.
53. Dugan F.M. 2008. Fungi in the ancient world: how mushrooms, mildews, molds, and yeast shaped the early civilizations of Europe, the Mediterranean, and the Near East. ASP Press American Phytopathological Society. Washington, s. 43.

54. Dyrektywa Komisji. 2005. Dyrektywa Komisji 2005/38/WE z dnia 6 czerwca 2005 r. ustanawiająca metody pobierania próbek i metody analizy do celów urzędowej kontroli poziomów toksyn *Fusarium* w środkach spożywczych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 143/18-26.
55. Edwards S.G. 2009. *Food Addit. Contam. A.* 26, 1063-1069.
56. EFSA. 2004a. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal.* 73, 1-42.
57. EFSA. 2004b. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal.* 89, 1-35.
58. EFSA. 2011a. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal.* 9, 2481-2668.
59. EFSA. 2011b. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal.* 9, 2197.
60. EFSA. 2013a. Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA Journal.* 11, 3262.
61. EFSA. 2013b. Scientific report of EFSA, Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA Journal.* 11, 3379.
62. Ellison S.L.R., Williams A. (red.). 2012. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement – EURACHEM/CITAC Guide CG4, www.citac.cc/QUAM2012_P1.pdf.
63. Eriksen G.S. 2003. Metabolism and Toxicity of Trichothecenes. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
64. Eriksen G.S. 2006. Effects of phyto- and mycoestrogens in domestic animals. W: Grotmol T., Bernhoft A., Eriksen G.S., Flaten T.P. (red.) Endocrine Disrupters. The Norwegian Academy of Science and Letters. Oslo, 114-121.
65. Fazekas B., Tar A. 2001. *J. AOAC Int.* 84, 1453-1459.
66. Ferreira I., Fernandes J.O., Cunha S.C. 2012. *Food Control.* 27, 188–193.
67. Filannino A., Stout T.A., Gadella B.M., Sostaric E., Pizzi F., Colenbrander B., Dell'Aquila M.E., Minervini F. 2011. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 134.
68. Fink-Gremmels J., Malekinejad H. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 326-341.
69. Fratamico P.M., Bhunia A.K., Smith J.L. 2005. Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Caister Academic Press. ss. 457.
70. Gadzała-Kopciuch R., Cendrowski K., Cesarz A., Kiełbasa P., Buszewski B. 2011. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 2069–2078.
71. Gajęcka M. 2013. *Pol. J. Vet. Sci.* 16, 313–322.

72. Gajęcki M., Przybyłowicz M., Zielonka Ł., Zwierzchowski W., Obremski K., Skorska-Wyszyńska E., Gajęcka M., Polak M., Jakimiuk E. 2004. *Pol. J. Vet. Sci.* 7, 153-156.
73. Galaverna G., Dall'Asta C., Mangia M., Dossena A., Marchelli R. 2009. *Czech J. Food Sci.* 27, 89-92.
74. Garmon L. 1981. *Science News.* 120, 250-251
75. Gentili A., Caretti F., D'Ascenzo G., Rocca L.M., Marchese S., Materazzi S., Perret D. 2007. *Chromatographia.* 66, 669–676.
76. Gonzáles-Osnaya L., Cortés C., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2011. *Food Chem.* 124, 156-161.
77. González H.H., Moltó G.A., Pacin A., Resnik S.L., Zelaya M.J., Masana M. Martínez E.J. 2008. *Mycopathologia.* 165, 105-114.
78. Goswami R.S., Kistler H.C. 2004. *Mol. Plant. Pathol.* 5, 515–525.
79. Gottschalk C., Barthel J., Engelhardt G., Bauer J., Meyer K. 2007. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1547-1553.
80. Grajewski J., Błajet-Kosicka A., Twarużek M., Kosicki R. 2012. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96, 870-877.
81. Green M.L., Diekman M.A., Malayer J.R., Scheidt A.B., Long G.G. 1990. *J. Anim. Sci.* 68, 171-178.
82. Grenier B., Oswald, I.P. 2011. *World Mycotoxin J.* 4, 285–313.
83. Gupta V.K., Chattopadhyay P., Kalita M.Ch., Chaurasia A.K., Gogoi H.K., Singh L. 2011. *Pharm. Methods.* 2, 25–29.
84. GUS. 2013. Rocznik statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa, ss. 915.
85. Hallier A., Celette F., David C. 2011. *Food Chem.* 127, 303-307.
86. Hartmann N., Erbs M., Wettstein F.E., Schwarzenbach R.P., Bucheli T.D. 2007. *J. Chromatogr. A.* 1138, 132-140.
87. Häubl G., Berthiller F., Hametner C., Rechthaler J., Jaunecker G., Freudenschuss M., Krska R., Schuhmacher R. 2007. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 931-940.
88. Häubl G., Berthiller F., Krska R., Schuhmacher R. 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 692-696.
89. Hodnik V., Anderluh G. 2009. *Sensors.* 9, 1339-1354.
90. Holčapek M., Jirásko R., Lída M. 2012. *J. Chromatogr. A.* 1259, 3– 15.
91. ICH. 1996. Topic Q2b, Guidance for industry – Validation of analytical procedures: Methodology. U.S. Department of Health and Human Services.
92. ICH. 2005. Topic Q2 (R1), Validation of analytical procedure: text and methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline.

93. Ingram J., Ericksen P., Liverman D. 2010. Food Security and Global Environmental Change. Earthscan. London. ss. 385.
94. Jajić I., Jurić V., Abramović B. 2008. *Food Control*. 19, 545-550.
95. Järvenpää E.P., Taylor S.L., King J.W., Huopalahti R. 1997. *Chromatographia*. 46, 33-39.
96. JECFA. 2011. WHO Technical Report Series 2011. Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO. 959, ss. 105
97. Ji F., Li H., Xu J., Shi J. 2011. *Toxins*. 3, 968-978.
98. Jiménez M., Mateo J.J., Mateo R. 2000. *J. Chromatogr. A*. 870, 473-481.
99. Jin P.G., Han Z., Cai Z.X., Wu Y.J., Ren Y.P. 2010. *Food Addit. Contam. A*. 27, 1701-1713.
100. Kanora A., Maes D. 2009. *The Vet. Med. Czech*. 54, 565-576.
101. Kappenstein O., Klaffke H.St., Spott H.J., Tiebach R., Weber R. 2002. *Mycotoxin Res*. 18, 52-55.
102. Khan M.R., Fisher S., Egan D., Doohan F.M. 2006. *Phytopathology*. 96, 386-394.
103. Kim Y.T., Lee Y.R., Jin J.M., Han K.H., Kim H., Kim J.C., Lee T., Yun S.H., Lee Y.W. 2005. *Mol. Microbiol*. 58, 1102-1113.
104. Kinani S., Bouchonnet S., Bourcier S., Porcher J.M., Aït-Aïssa S. 2008. *J. Chromatogr. A*. 1190, 307-315.
105. Klinglmayr C., Nöbauer K., Razzazi-Fazeli E., Cichna-Markl M. 2010. *J. Chromatogr. B*. 878, 187-193.
106. Klötzel M., Lauber U., Humpf H. 2006. *Mol. Nutr. Food Res*. 50, 261-269.
107. Klötzel M., Schmidt S., Lauber U., Thielert G., Humpf H. 2005. *Chromatographia*. 62, 41-48.
108. Koch P. 2004. *Toxicol. Lett*. 153, 109-112.
109. Kolosova A.Y., De Saeger S., Sibanda L., Verheijen R., Van Peteghem C. 2007. *Anal. Bioanal. Chem*. 389, 2103-2107.
110. Kolosova A.Y., Sibanda L., Dumoulin F., Lewis J., Duveiller E., Van Peteghem C. 2008. *Anal. Chim. Acta*. 616, 235-244.
111. Kong W.J., Shen H.H., Zhang X.F., Yang X.L., Qiu F., Ou-yang Z., Yang M.H. 2013. *J. Sci. Food Agric*. 93, 1584-1590.
112. Konieczka P., Namieśnik J. 2007. Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, WNT, Warszawa, ss. 344.

113. Kostakis C., Harpas P., Stockham P. 2013. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. W: Fanali S., Haddad P.R., Poole C., Schoenmakers P., Lloyd D.K. (red.). *Liquid Chromatography: Applications*. Elsevier. Waltham, s. 256-257.
114. Kot-Wasik A. 2008. ABC ekstrakcji z wykorzystaniem techniki SPE – materiały szkoleniowe, Politechnika Gdańska, ss. 34. http://chem.pg.edu.pl/documents/175289/4236734/3Materialy_szkoleniowe_ABC_teknik_SPE.pdf
115. Kralj Cigić I., Prosen H. 2009. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 62-115.
116. Krska R. 1998. *J. Chromatogr. A.* 815, 49-57.
117. Krska R. 2009. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1203-1204.
118. Krska R., Baumgartner S., Josephs R. 2001. *Fresen. J. Anal. Chem.* 371, 285-299.
119. Krska R., Josephs R. 2001. *Fresen. J. Anal. Chem.* 369, 469-476.
120. Krska R., Welzig E., Boudra H. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 241-264.
121. Kruger S.C., Kohn B., Ramsey C.S., Prioli R. 1999. *J. AOAC Intern.* 82, 1364-1368.
122. Kuciel-Lisieska G., Obremski K., Stelmachów J., Gajęcka M., Zielonka Ł., Jakimiuk E., Gajęcki M. 2008. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 52, 671-674.
123. Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H. 1987. *Regul. Toxicol. Pharm.* 7, 253-306.
124. Laatsch H. 2011. *AntiBase 2011: the natural compound identifier*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
125. Labuda R., Parich A., Berthiller F., Tančinová D. 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 19-25.
126. Laganà A., Curini R., D'Ascenzo G., De Leva I., Faberi A., Pastorini E. 2003. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 1037-1043.
127. Lancova K., Hajslova J., Poustka J., Krplova A., Zachariasova M., Dostalek P., Sachambula L. 2008. *Food Addit. Contam.* 25, 732-744.
128. Langseth W., Rundberget T. 1998. *J. Chromatogr. A.* 815, 103-121.
129. Langseth W., Rundberget T. 1999. *Mycopathologia.* 147, 157-165.
130. Lattanzio V.M., Gatta S.D., Suman M., Visconti A. 2011. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 1869-1880.
131. Lattanzio V.M., Solfrizzo M., Visconti A. 2008. *Food Addit. Contam. A.* 25, 320-330.
132. Lattanzio V.M.T., Pascale M., Visconti A. 2009. *Trends Anal. Chem.* 28, 758-768.
133. Lehotay S.J., Son K.A., Kwon H., Koesukwiwat U., Fu W., Mastovska K., Hoh E., Leepipatpiboon N. 2010. *J. Chromatogr. A.* 1217, 2548-2560.
134. Lippolis V., Pascale M., Maragos C.M., Visconti A. 2008. *Talanta.* 74, 1476-1483.
135. Liu Z.Y., Yu C.H., Wan L., Sun Z.L. 2012. *Int. J. Mass Spectrom.* 309, 133-140.

136. Lucci P., Derrien D., Alix F., Pérollier C., Bayouhd S. 2010. *Anal. Chim. Acta.* 672, 15-19.
137. Magan N., Olsen M. 2004. *Mycotoxins in Food: Detection and control.* Wood head Publishing Ltd., Cambridge, UK.
138. Mahony J.O., Nolan K., Smyth M.R., Mizaikoff B. 2005. *Anal. Chim. Acta.* 534, 31-39.
139. Majerus P., Hain J., Scheer M. 2008. *Mycotoxin Res.* 24, 24-30.
140. Majors R.E. 2010. *Solid-Phase Extraction W: Pawliszyn J., Lord H.L. (red.) Handbook of Sample Preparation.* John Willey & Sons Inc. Hoboken. 2010, s.53, 69, 75-76.
141. Mankevičienė A., Butkutė B., Gaurilčikienė I., Dabkevičius Z., Supronienė S. 2011. *Food Control.* 22, 970–976.
142. Manova R., Mladenova R. 2009. *Food Control.* 20, 362–365.
143. Maragos C.M. 2009. *Toxins.* 1, 196-207.
144. Maragos C.M., Jolley M.E., Nasir M.S. 2002. *Food Addit. Contam.* 19, 400–407.
145. Massart F., Meucci V., Saggese G., Soldani G. 2008. *J. Pediatr.* 152, 690-695.
146. Mateo J., Llorens A., Mateo R., Jiménez M. 2001. *J. Chromatogr. A.* 918, 99-112.
147. Matić J.J., Jajić I.M., Šarić B.M., Mišan A.Č., Krstović S.Z., Mandić A. 2011. *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad.* 120, 25-32.
148. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. 2003. *Anal. Chem.* 75, 3019-3030.
149. McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A., Alexander N.J. 2011. *Toxins.* 3, 802–814.
150. Meggs W.J. 2009. *Toxicol. Ind. Health.* 25, 571–576.
151. Meister U. 2008. *Mycotoxin Res.* 24, 31-39.
152. Meister U. 2009. *Mycotoxin Res.* 25, 133-139.
153. Meneely J.P., Ricci F., van Egmond H.P., Elliott C.T. 2011. *Trends Anal. Chem.* 30, 192-203.
154. Meneely J.P., Sulyok M., Baumgartner S., Krska R., Elliott C.T. 2010. *Talanta.* 81, 630-636.
155. Milanez T., Valente-Soares L., Baptista G. 2006. *Food Control.* 17, 293-298.
156. Miller J.D., Young J.C. 1985. *Can. J. Plant Pathol.* 7, 132-134.
157. Minervini F., Dell'Aquila M.E. 2008. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 2570-2584.
158. Mitchell J. 2010. *Sensors.* 10, 7323-7346.
159. Molinelli, A., Grossalber, K., Führer, M., Baumgartner, S., Sulyok, M., Krska, R. 2008. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2589-2594.
160. Monaci L., Angelis E.D., Visconti A. 2011. *J. Chromatogr. A.* 1218, 8646–8654.

161. Morgavi D.P., Riley R.T. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 201–212.
162. Moss M.O., Thrane U. 2004. Fusarium taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicol. Lett.* 153, 23-28.
163. Murphy P.A., Hendric S., Landgren C., Bryant C.M. 2006. *J. Food Sci.* 71, 51-65.
164. Muscarella M., Iammarino M., Nardiello D., Palermo C., Centonze D. 2012. *Talanta.* 97, 145-149.
165. Nagl V., Schwartz H., Krska R., Moll W.D., Knasmüller S., Ritzmann M., Adam G., Berthiller F. 2012. *Toxicol. Lett.* 213, 367– 373.
166. Namieśnik J., Jamrógiewicz Z., Pilarczyk M., Torres L. 2000. Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. Warszawa, ss. 176.
167. Namieśnik J., Łukasiak J., Jamrógiewicz Z. 1995. Pobieranie próbek środowiskowych do analizy. PWN. Warszawa, ss. 278.
168. Neumann G., Lombaert G.A., Kotello S., Fedorowich N. 2009. *J. AOAC Int.* 92, 181-189.
169. Nicolaisen M., Suproniene S., Nielsen L.K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justesen A.F. 2009. *J. Microbiol. Methods.* 76, 234-240.
170. O'Brien E., Dietrich D.R. 2004. Mycotoxins Affecting the Kidney. W: Hook J.B. (red) Toxicology of Kidney. CRC Press. Boca Raton, s.895.
171. Ok H.E., Choi S.W., Chang H.J., Chung M.S., Chun H.S. 2011. *Food Control.* 22, 1647-1652.
172. Omaye S.T. 2004. Food and Nutritional Toxicology. CRC Press. Boca Raton, 204-212.
173. Omurtag G.Z., Tozan A., Sirkecioglu O., Kumbaracı V., Rollas S. 2007. *Food Control.* 18, 970-974.
174. Pallaroni L., von Holst C. 2003. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 908-912.
175. Pallaroni L., von Holst C. 2004. *J. Chromatogr. A.* 1055, 247-249.
176. Pan D., Bonsignore F., Rivas F., Perera G., Bettucci L. 2007. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 149-52.
177. Parent-Massin D. 2004. *Toxicol. Lett.* 153, 75-81.
178. Pascale M. 2009. *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad.* 117, 15-25.
179. Pascale M., De Girolamo A., Visconti A., Magan N., Chianella I., Piletska E.V., Piletsky S.A. 2008. *Anal. Chim. Acta.* 609, 131–138.
180. Pascale M., Haidukowski M., Visconti A. 2003. *J. Chromatogr. A.* 989, 257-264.
181. Pascale M., Panzarini G., Visconti A. 2012. *Talanta.* 89, 231–236.
182. Pascale M., Visconti A. 2008. Overview of detection methods for mycotoxins. W: Leslie J.F., Bandyopadhyay R., Visconti A. (red.) Mycotoxins, Detection methods, Management, Public Health and Agricultural Trade. CABI. Wallingford, s. 171-181.

183. Peraica M., Radić B., Lucić A., Pavlović M. 1999. *Bull. World Health Organ.* 77, 754-766.
184. Pestka J.J. 2007. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 283-298.
185. Pestka J.J. 2010. *Arch. Toxicol.* 84, 663-79.
186. Pillay D., Chuturgoon A.A., Nevines E., Manickum T., Deppe W., Dutton M.F. 2002. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 946-951.
187. Plattner R.D., Maragos C.M. 2003. *J. AOAC Int.* 86, 61-65.
188. Pleadin J., Sokolović M., Perši N., Zadavec M., Jaki V., Vulić A. 2012. *Food Control.* 28, 94-98.
189. Pleadin J., Vahčić N., Perši N., Ševelj D., Markov K., Frece J. 2013. *Food Control.* 32, 49-54.
190. Pronk M.E.J., Schothorst R.C., Egmond H.P. 2002. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. RIVM Report 388802024/2002.
191. Qiao F., Sun H., Yan H., Row K. H. 2006. *Chromatographia.* 64, 625-634.
192. Radová Z., Hajšlová J., Králová J. 2001. *Cereal Res. Comm.* 29, 435-442.
193. Radová Z., Holadová K., Hajšlová J. 1998. *J. Chromatogr. A.* 829, 259-267.
194. RASFF. 2012. The Rapid Alert System for Food and Feed 2011 Annual Report, European Communities.
195. Razzazi-Fazeli E., Böhm J., Jarukamjorn K., Zentek J. 2003. *J. Chromatogr. B.* 796, 21-33.
196. Razzazi-Fazeli E., Rabu B., Cecon B., Böhm J. 2002. *J. Chromatogr. A.* 968, 129-142.
197. Richard J.L. 2007. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 3-10.
198. Richard J.L., Payne G.A., Desjardin A.E., Maragos C., Norred W.P., Pestka J.J., Phillips T.D., Van Egmond H.P., Vardon P.J., Whitaker T.B., Wood G. 2003. Mycotoxins, risks in plant, animal and human systems. CAST Task Force Report 139. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, s. 49.
199. Royer D., Humpf H.U., Guy P.A. 2004. *Food Addit. Contam.* 21, 678-692.
200. Rozporządzenie Komisji (WE). 2005. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 856/2005 z dnia 6 czerwca 2005 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 466/2001 w odniesieniu do toksyn *Fusarium*. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 143/3-8.
201. Rozporządzenie Komisji (WE). 2006a. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 364/5-24.
202. Rozporządzenie Komisji (WE). 2006b. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 401/2006 ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli

poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 70/12-34.

203. Rozporządzenie Komisji (WE). 2007. Rozporządzenie Komisji (WE) 2007 nr 1126/2007 z dnia 28 września 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do toksyn *Fusarium* w kukurydzy i produktach z kukurydzy. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 255/14-17.
204. Rozporządzenie (WE) 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. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L31/1/463-486.
205. Rubert J., Dzuman Z., Vaclavikova M., Zachariasova M., Solera C., Hajslova J. 2012b. *Talanta*. 99, 712–719.
206. Rubert J., Soler C., Mañes J. 2011. *Talanta*. 85, 206-215.
207. Rubert J., Soler C., Mañes J. 2012a. *Food Chem.* 133, 176-183.
208. Ryu J.S., Yang J.S., Song Y.S., Kwon O.S., Park J., Chang I.M. 1996. *Food Addit. Contam.* 13, 333-341.
209. Sambuu R., Takagi M., Namula Z., Otoi T., Shiga S., Rodrigues Dos Santos R., Fink-Gremmels J. 2011. *J. Reprod. Dev.* 57, 547-550.
210. Santos H.M., Lodeiro C., Capelo-Martinez J.L. 2009. The Power of Ultrasound. W: Capelo-Martinez J.L. (red.). *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
211. SCF. 2001. Opinion of the Scientific Committee for Food on *Fusarium* toxins Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin, adopted on 30 May 2001.
212. SCF. 2002. Opinion of the Scientific Committee for Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol adopted on 26 February 2002.
213. SCF. 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 2: Zearalenone (ZEA). ss. 12.
214. SCF. 1999. Opinion of the Scientific Committee on *Fusarium* toxins. Part 1: Deoxinivalenol (DON), ss. 9.
215. Schneider L., Pichler H., Krska R. 2000. *Fresen. J. Anal. Chem.* 367, 98-100.
216. Schollenberger M., Drochner W., Rühle M., Suchy S., Terry-Jara H., Müller H. 2005. *J. Food Comp. Anal.* 18, 69–78.
217. Schollenberger M., Lauber U., Jara H., Suchy S., Drochner W., Müller H. 1998. *J. Chromatogr. A.* 815, 123-132.
218. Schothorst R., Jekel A. 2001. *Food Chem.* 73, 111-117.

219. Schuhmacher R., Krska R., Grasserbauer M., Edinger W., Lew H. 1998. *Fresen. J. Anal. Chem.* 360, 241-245.
220. SCOOP. 2003. Task 3.2.10. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. European Commission. Directorate-General Health and Consumer Protection. Reports on tasks for scientific co-operation, ss. 609.
221. Sellergren B., Martín-Esteban A. 2010. The Use of Molecularly Imprinted Polymers for Sampling and Sample Preparation. W: Pawliszyn J., Lord H.L. (red.) Handbook of Sample Preparation. John Wiley & Sons Inc. Hoboken. 2010, s. 445-473.
222. Şenyuva H. Z., Gilbert J. 2010. *J. Chromatogr. B.* 878, 115-132.
223. Şenyuva H. Z., Gilbert J., Öztürkoğlu S. 2008. *Anal. Chim. Acta.* 617, 97-106.
224. Serrano A.B., Font G., Ruiz M.J., Ferrer E. 2012. *Food Chem.* 135, 423-429.
225. Sherif S.O., Salama E.E., Abdel-Wahhab M.A. 2009. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 212, 347-368.
226. Shibamoto T., Bjeldanes L.F. 1993. Introduction to food toxicology. Academic Press. San Diego, s. 84.
227. Shier W.T., Shier A.C., Xie W., Mirocha C.J. 2001. *Toxicon.* 39, 1435-1438.
228. Shin B.S., Hong S.H., Kim H.J., Yoon H.S., Kim D.J., Hwang S.W., Lee J.B., Yoo S.D. 2008. *Chromatographia.* 69, 295-299.
229. Škrbić B., Živančev J., Durišić-Mladenović N., Godula M. 2012. *Food Control.* 25, 389-396.
230. Sokolović M., Garaj-Vrhovac V., Simpraga B. 2008. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 59, 43-52.
231. Sokolović M., Šimpraga B. 2006. *Food Control.* 17, 733-740.
232. Soleimany F., Jinap S., Abas F. 2012. *Food Chem.* 130, 1055-1060.
233. Sospedra I., Blesa J., Soriano J.M., Mañes, J. 2010. *J. Chromatogr. A.* 1217, 1437-1440.
234. Speijers G.J.A., Speijers, M.H.M. 2004. *Toxicol. Lett.* 153, 91-98.
235. Stecher G., Jarukamjorn K., Zaborski P., Bakry R., Huck C., Bonn G. 2007. *Talanta.* 73, 251-257.
236. Stevenson D. 2000. *J. Chromatogr. B.* 745, 39-48.
237. Stone R. 2009. *Science.* 324, 1378-1381.
238. Sudakin D.L. 2003. *Toxicol. Lett.* 143, 97-107.
239. Sugita-Konsihi Y., Tanaka T., Tabata S., Nakajima M., Nouno M., Nakaie Y., Chonan T., Aoyagi M., Kibune N., Mizuno K., Ishikuro E., Kanamaru N., Minamisawa M., Aita N., Kushiro M., Tanaka K., Takatori K. 2006. *Mycopathologia.* 161, 239-243.

240. Sulyok M., Berthiller F., Krska R., Schuhmacher R. 2006. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2649–2659.
241. Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. 2007a. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1505-1523.
242. Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. 2007b. *Food Addit. Contam.* 24, 1184-1195.
243. Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. 2010. *Food Chem.* 119, 408-416.
244. Suman M., Bergamini E., Catellani D., Manzitti A. 2013. *Food Chem.* 136, 1568–1576.
245. Sweeney M.J., Dobson A.D.W. 1998. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 141-158.
246. Tanaka H., Takino M., Sugita-Konishi Y., Tanaka T. 2006. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 1422–1428.
247. Tanaka H., Takino M., Sugita-Konishi Y., Tanaka T., Leeman D., Toriba A., Hayakawa K. 2010. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2445-2452.
248. Tanaka T., Yoneda A., Inoue S., Sugiura Y., Ueno Y. 2000. *J. Chromatogr. A.* 882, 23-28.
249. Taylor P.J. 2005. *Clin. Biochem.* 38, 328-334.
250. Thieu N.Q., Pettersson H. 2009. *Mycotoxin Res.* 25, 59–66.
251. Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R. 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 835–855.
252. Tomaszewski J., Miturski R., Semczuk A., Kotarski J., Jakowicki J. 1998. *Ginekologia Polska.* 69, 363-366.
253. Tran S.T., Smith T.K., Girgis G.N. 2012. *J. Sci. Food Agric.* 92, 37–44.
254. Trebstein A., Lauber U., Humpf H.U. 2009. *Mycotoxin Res.* 25, 201-213.
255. Trebstein A., Seefelder W., Lauber U., Humpf H.U. 2008. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4968–4975.
256. Tucker J.B. 2001. *The Nonproliferation Rev.* 8, 25-42.
257. Turiel E., Martín-Esteban A. 2010. *Anal. Chim. Acta.* 668, 87–99.
258. Twarużek M. 2013. Zearalenon i jego metabolity w surowicy krwi, moczu i tkance gruczołu krokowego u mężczyzn z prawidłowym, rozrostowym i nowotworowo zmienionym gruczołem krokowym. Wyd. UKW, Bydgoszcz.
259. Ueno Y. 1977. Mode of action of trichothecenes. *Ann. Nutr. Aliment.* 31, 885– 900.
260. Upadhaya S.D., Park M.A., Jong K.H. 2010. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23, 1250-1260.
261. Urraca J.L., Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C. 2004. *Anal. Chim. Acta.* 524, 175-183.
262. Urraca J.L., Marazuela M.D., Merino E.R., Orellana G., Moreno-Bondi M.C. 2006a. *J. Chromatogr. A.* 1116, 127–134.

263. Urraca J.L., Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C. 2006b. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1155–1161.
264. Valle-Algarra F.M., Medina A., Gimeno-Adelantado J.V., Llorens A., Jiménez M., Mateo R. 2005. *Talanta.* 66, 194-201.
265. Van Egmond H.P., Schothorst R.C., Jonker M.A. 2007. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 147–157.
266. Vendl O., Crews C., MacDonald S., Krska R., Berthiller F. 2010. *Food Addit. Contam. A.* 27, 1148–1152.
267. Visconti A., Bottalico A. 1983. *Chromatographia.* 17, 97–100.
268. Visconti A., Lattanzio V.M.T., Pascale M., Haidukowski M. 2005. *J. Chromatogr. A.* 1075, 151-158.
269. Visconti A., Pascale M. 1998. *J. Chromatogr. A.* 815, 133-140.
270. Wannemacher R.W., Wiener S.L. 1997. Trichothecene Mycotoxins. W: Sidell R.R., Takafuji E.T., Franz D.R. (red.) Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Office of the Surgeon General at TMM Publications. Washington, s. 655–676.
271. Weingärtner J., Krska R., Praznik W., Grasserbauer M., Lew H. 1997. *Fresen. J. Anal. Chem.* 357, 1206-1210.
272. Weiss R., Freudenschuss M., Krska R., Mizaikoff B. 2003. *Food Addit. Contam.* 20, 386-395.
273. Whitaker T.B. 2003. *Food Control.* 14, 233-237.
274. Whitaker T.B. 2006. *Food Addit. Contam.* 23, 50-61.
275. Wu J., Zhao R., Chen B., Yang, M. 2011. *Food Chem.* 126, 1508-1511.
276. Yang J.Y., Wang G.X., Liu J.L., Fan J.J., Cui S. 2007. *Reprod. Toxicol.* 24, 381-387.
277. Yegani M., Smith T.K., Leeson S., Boermans H.J. 2005. *World Poultry.* 21, 38-40.
278. Yli-Mattila T. 2010. *J. Plant Pathol.* 92, 7–18.
279. Yoshizawa T., Kohno H., Ikeda K., Shinoda T., Yokohama H., Morita K., Kusada O., Kobayashi Y. 2004. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2076–2085.
280. Zachariasova M., Hajslova J., Kostelanska M., Poustka J., Krplova A., Cuhra P., Hochel I. 2008. *Anal. Chim. Acta.* 625, 77-86.
281. Zalecenie Komisji. 2006. Zalecenie Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt (2006/576/WE). Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 229/7-9.
282. Zalecenie Komisji. 2013. Zalecenie Komisji z dnia 27 marca 2013 r. w sprawie obecności toksyn T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 91/12-15.

283. Zheng M.Z., Richard J.L., Binder J. 2006. *Mycopathologia*.161, 261-273.
284. Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C., Manes J. 2007. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1-18.
285. Zougagh M., Ríos A. 2008. *J. Chromatogr. A.* 1177, 50–57.

VIII. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

Publikacje w czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports (JCR):

1. **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Kosicki R., Sibiorowska E., Grajewski J. 2014. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. *Food Control*. 38, 61–66.
2. Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Wenda-Piesik A., Pałubicki J., Grajewski J. 2013. Statistical comparison of *Fusarium* mycotoxins content in oats grain and related products from two agricultural systems. *Food Control*. 34, 291-295.
3. Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J. 2013. Occurrence of aflatoxins in selected spices in Poland. *J. Verbrauch. Lebensm.* 8, 57–60.
4. Yunus, A.W., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Khan M.Z., Rehman H., Boehm J. 2012. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: Intestinal development, absorptive functionality, and metabolism of the mycotoxin. *Poult. Sci.* 91, 852-861.
5. Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Kosicki R. 2012. Occurrence of mycotoxins in Polish animal feed in years 2006–2009. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96, 870-877.
6. Kłosowski G., Mikulski D., Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.** 2010. The influence of raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. *Bioresour. Technol.* 101, 3147-3152.
7. Potkański A., Grajewski J., Twarużek M., Selwet M., Miklaszewska B., **Błajet-Kosicka A.**, Szumacher-Strabel M., Cieślak A., Raczkowska-Werwińska K. 2010. Chemical composition, fungal microflora and mycotoxin content in maize silages infected by smut (*Ustilago maydis*) and the effect of biological and chemical additives on silage aerobic stability. *J. Anim. Feed Sci.* 19, 130-142.

Prace objęte procesem redakcyjnym:

8. Gutarowska B., Skóra J., Stępień Ł., Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Otlewska A., Grajewski J. Estimation of mould contamination and mycotoxin production at workplaces in composting plants, tanneries, archives and libraries. *World Mycotoxin J.* (zaakceptowana do druku).
9. **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Twarużek M., Grajewski J. Determination of molds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Chem. Toxicol.* (w recenzji).

Pozostałe publikacje:

1. **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Grajewski J., Kalczyńska K. 2013. Occurrence of *Fusarium* toxins in spelt from ecological system of farming/ Występowanie toksyn fuzaryjnych w orkiszu z ekologicznego systemu upraw. *J. Res. Appl. Agric. Engng.* 58, 20-23.
2. Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J., Zatorska K. 2013. Mycotoxicological evaluation of barley grain and its products/ Mikotoksykologiczna ocena ziarna jęczmienia i jego produktów. *J. Res. Appl. Agric. Engng.* 58, 204-207.
3. Twarużek M., Grajewska-Wanat N., **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J. 2013. Występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz głównych mikotoksyn w ziarnie zbóż w latach 2011-2012. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin.* 53, 801-806.
4. Twarużek M., Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.** 2012. Skażenia grzybowe i występowanie toksyn *Fusarium* w ziarnie kukurydzy w latach 2009-2011 w Polsce. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin.* 52, 1064-1069.
5. Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J. 2012. Problem zanieczyszczeń mikologicznych surowców i pasz w świetle aktualnych badań. W: *Pasze Przemysłowe* (red.) Kwiatek K. Korol W. 2: 86-93.
6. Kłosowski G., **Błajet-Kosicka A.**, Mikulski D., Grajewski J. 2011. Ocena możliwości redukcji stężenia mikotoksyn w procesie produkcji etanolu z ziarna kukurydzy technologią BUS i klasyczną. *ZNTJ.* 2, 89-105.
7. Kłosowski G., **Błajet-Kosicka A.** 2010. Mechanizmy powstawania oraz występowanie pirazyn w destylatach spirytusowych, jako element oceny prawidłowości obróbki termicznej surowca w procesie technologicznym. *Biotechnologia.* 1, 140-153.
8. Böhm J., Koinig L., Razzazi-Fazeli E., **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Grajewski J., Lang C. 2010. A risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A and aflatoxins in commercial dry dog foods. *Mycotoxin Res.* 26, 147-153.

Rozdziały w opracowaniach książkowych:

1. Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Grajewski J. Mycotoxin analytical methods. W: Viegas C., Pinheiro C., Verissimo C., Brandao J., Sabino R., Viegas S. (red.). *Enironmental Mycology in Public Health: An Overview on Fungi and Mycotoxins for Risk Assessment and Management.* Elsevier Inc. (wysłany do wydawcy).

Wystąpienia ustne:

1. Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Problem zanieczyszczeń mikologicznych i mikotoksykologicznych pasz w świetle aktualnych badań, XXIX Konferencja Naukowo-Techniczna „Kontrola Jakości Pasz”; 26-27.04.2012, Sandomierz, s. 7-9.
2. **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Twarużek M., Grajewski J., Occurrence of mycotoxins in beer brewed in Poland, 33rd Mycotoxin Workshop 30.05-1.06.2011, Freising, s. 11.
3. **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J., Twarużek M., Kosicki R., Rychlewska J., Mycotoxins and fungi contamination of conventional and ecological oats, IX International Conference “Mycotoxins and moulds” (IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”), 28-29.06.2010, Bydgoszcz, s. 59-60.
4. **Błajet-Kosicka A.**, Analytical methods applied in Mycotoxin Analytical Laboratory, Freie Universität Berlin – Institut für Tierernährung – seminarium, 15-18.12.2008.
5. Grajewski J., Twarużek M., Miklaszewska B., **Błajet-Kosicka A.**, Łukomska W., Kosicki R., 2008, The level of moulds and mycotoxin contamination of food, III International Symposium „Safe food. Plant production, animal production, management”, Journal of Central European Agriculture, 17-20.09., Bydgoszcz, s. 38.
6. **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Twarużek M., Grajewski J., Tandem mass spectrometry in mycotoxins analysis, VIII International Conference „Mycotoxins and moulds” (VIII Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”), 25-27.06.2008, s. 29-30.

Referaty, komunikaty i plakaty:

1. Pałubicki J., Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Grajewski J., Mikotoksyny *Fusarium* w karmie i w przewodzie pokarmowym dzików pozyskanych z terenów leśnych i wielkoobszarowych upraw kukurydzy, XLII Sesja Naukowa Sekcji Żywienia Zwierząt KNZ PAN, Bydgoszcz 18-20.09.2013, s. 187-190 (komunikat).
2. **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Twarużek M., Grajewski J., The efficiency of mycotoxins binding by the commercially available adsorbents – in vitro studies, X Anniversary International Conference „Mycotoxins and moulds” (X Jubileuszowa Międzynarodowa Konferencja Naukowa "Mikotoksyny i grzyby pleśniowe"), 27-28.06.2013, Bydgoszcz, s. 56-57 (komunikat).
3. Wenda-Piesik A., Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J., Fungi occurrence and their metabolites in wheat grain planted as spring and facultative terms under various control of fungicide; Chemical composition, profile of mycotoxins and fungi content in grain of 15 cultivars of corn (*Zea mays*) with varied FAO, X Anniversary International Conference „Mycotoxins and moulds” (X Jubileuszowa Międzynarodowa Konferencja Naukowa "Mikotoksyny i grzyby pleśniowe"), 27-28.06.2013, Bydgoszcz, s. 48-51 (komunikaty).

4. Twarużek M., Kuźmińska K., **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J., Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in raw materials and feed, X Anniversary International Conference „Mycotoxins and moulds” (X Jubileuszowa Międzynarodowa Konferencja Naukowa "Mikotoksyny i grzyby pleśniowe"), 27-28.06.2013, Bydgoszcz, s. 52-53 (komunikat).
5. Skóra J., Gutarowska B., Stępień Ł., Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Otlewska A., Grajewski J., Toxinogenic moulds at the workplaces. X Anniversary International Conference „Mycotoxins and moulds” (X Jubileuszowa Międzynarodowa Konferencja Naukowa "Mikotoksyny i grzyby pleśniowe"), Bydgoszcz, 27-28.06.2013, s. 21-22 (komunikat).
6. Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Mikotoksyny i patogenne pleśnie jako zagrożenia dla zwierząt – wyniki aktualnych badań. IX Poznańskie Forum Zootechniczno-Weterynaryjne „Jakość pasz a efektywność produkcji zwierzęcej – wyzwania dla lekarzy weterynarii i zootechników”, 11.04.2013, Poznań, s. 26-28 (referat).
7. **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Grajewski J., Kosicki R., Zatorska K., Mycotoxicological evaluation of barley and its products, 35th Mycotoxin Workshop, 22-24.05.2013, Ghent, s. 127 (plakat).
8. Pałubicki J., Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Grajewski J., *Fusarium* mycotoxins content in feed and digestive tract of wild boars hunted in forests and corn field areas, 35th Mycotoxin Workshop, 22-24.05.2013, Ghent, s. 185 (plakat).
9. Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Grajewska N., Grajewski J., Mikotoksykologiczne skażenie DDGS; XXXXI Sesja Naukowa Komisji Żywności Zwierząt KNZ PAN; 26-28.09.2012, Tarnowo Podgórne k/Poznań, s. 124-125.
10. **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Twarużek M., Lewandowska W., Grajewski J., Mycotoxin binders – *in vitro* studies; 16th ESVCN (European Society of Veterinary and Comparative Nutrition) Congress; 13-15.09.2012, Bydgoszcz, s. 103 (plakat).
11. Twarużek M., Pałubicki J., Grajewska N., Kosicki R., **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J., Mouldy maize-cobs in large-area plantations – potential risk to wild boars; 16th ESVCN (European Society of Veterinary and Comparative Nutrition) Congress; 13-15.09.2012, Bydgoszcz, s. 101 (plakat).
12. **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J., Mycotoxicological analysis of raw materials as an element of quality control during feed production; 34th Mycotoxin Workshop, 14-16.05.2012, Braunschweig, s. 76 (plakat).
13. Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Kosicki R., Sibiorowska E., Mycotoxicological evaluation of rye and its products, 34th Mycotoxin Workshop, 14-16.05.2012, Braunschweig, s. 65 (plakat).

14. Grajewski J., Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Kuźmińska K., Maćkiewicz M., *Fusarium* toxins in wheat grains and products from organic and conventional farming, 34th Mycotoxin Workshop, 14-16.05.2012, Braunschweig, s. 60 (plakat).
15. **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Twarużek M., Grajewski J., Determination of mycotoxins in Polish beer, EUROFOODCHEM XVI „Translating food chemistry into health benefits”, 6-8.07.2011, Gdańsk, s. 48-49 (plakat).
16. Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Kosicki R., Kalczyńska K., Trichothecenes and zearalenone in spelt wheat from ecological system of farming, 33rd Mycotoxin Workshop 30.05.-1.06.2011, Freising, s. 97 (plakat).
17. Twarużek M., Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Piotrowska M. The level of zearalenone and its metabolites in urine samples in patients prostate cancer and benign prostate hyperplasia, 33rd Mycotoxin Workshop 30.05.-1.06.2011, Freising, s. 139 (plakat).
18. Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Twarużek M., Kosicki R., Occurrence of mycotoxins in animal feed in years 2006-2009, 14th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, 6-8.09.2010, Zurich, s. 112 (plakat).
19. Twarużek M., Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Zblewska A., The level of zearalenone and its metabolites in blood serum in patients prostate cancer and benign prostate hyperplasia, IX International Conference “Mycotoxins and moulds” (IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”), 28-29.06.2010, Bydgoszcz, s. 38-39 (komunikat).
20. Korol W., Bielecka G., Grajewski J., Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Rubaj J., The results of testing mycotoxins in food processing industry’s by-products meant for feed manufacturing purposes, IX International Conference “Mycotoxins and moulds” (IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”), 28-29.06.2010, Bydgoszcz, s. 55-56 (komunikat).
21. **Błajet-Kosicka A.**, Grajewski J., Twarużek M., Kosicki R., *Fusarium* toxins and fungi in oats and its products from ecological and conventional agriculture practice, 32nd Mycotoxin Workshop 14-16.06.2010, Lyngby, s. 81 (plakat).
22. Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Grajewski J., 2010, Mycotoxins and moulds in silages, 32nd Mycotoxin Workshop 14-16.06.2010, Lyngby, s. 118 (plakat).
23. Awad W., Twarużek M., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Grajewski J., Zentek J., Effects of different levels of deoxynivalenol contaminated wheat in diets for growing chickens on growth performance, XXXIX Sesja Naukowa Komisji Żywności Zwierząt Komitetu Nauk Zootechnicznych PAN: „Żywność zwierząt w regulacji rozwoju i produktywności zwierząt”, 28-30.05.2010, Rynia, s. 44-45 (komunikat).
24. **Błajet-Kosicka A.**, Mikłaszewska B., Twarużek M., Grajewski J., Mycotoxins and fungi contamination of feed materials and their components in the years 2006-2008 in Poland, 31st Mycotoxin Workshop 15-18.06.2009, Münster, s. 71 (plakat).

25. Twarużek M., Grajewski J., Łukomska W., **Błajet-Kosicka A.**, Toxicity of smut infected maize, 31st Mycotoxin Workshop 15-18.06.2009, Münster, s. 111 (plakat).
26. **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., Twarużek M., Grajewski J., Application of Liquid Chromatography/ Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry to mycotoxins analysis in several matrices (food- and feedstuffs, biological samples, fungi cultures), 1st Conference of Polish Mass Spectrometry Society, IUNG Puławy, 16-18.04.2008, Acta Biochimica Polonica, 55, Suppl. 2/2008, s. 50 (plakat).
27. Grajewski J., Potkański A., Sulewska H., Twarużek M., Łukomska W., **Błajet-Kosicka A.**, Grzegorska K., Charakterystyka składu chemicznego i mikroflory grzybowej kiszzonek z kukurydzy porażonej głównią guzowatą (*Ustilago maydis*), VIII International Conference „Mycotoxins and moulds” (VIII Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”), 25-27.06.2008, s. 66-67 (komunikat).
28. Twarużek M., Jarzemski P., Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Kosicki R., 2008, The level of zearalenone and its metabolites in prostatic gland tissues, blood serum and urine in patients with prostate disorders, 30th Mycotoxin Workshop 28-30 April, Utrecht, s.60 (komunikat); VIII Międzynarodowa Konferencja Naukowa Mikotoksyny i grzyby pleśniowe, 25-27 czerwca, Bydgoszcz, s. 52-53 (komunikat).
29. Kłosowski G., Grajewski J., **Błajet-Kosicka A.**, Mikulski D., 2008, Mycotoxins impact on biotechnological factors of maize mashes alcoholic fermentation in PLS technology, 30th Mycotoxin Workshop 28-30.04.2008, Utrecht, s. 134 (plakat).
30. Grajewski J., Twarużek M., Miklaszewska B., **Błajet-Kosicka A.**, Łukomska W., Kosicki R., Moulds and mycotoxins contamination of foodstuffs from retail trade in the years 2006-2007, 30th Mycotoxin Workshop 28-30.04.2008, Utrecht, s. 82 (plakat).

Projekty badawcze i Umowy Międzyrządowe:

- 2013-2014 - Umowa Międzyrządowa o Współpracy Naukowej i Naukowo – Technicznej pomiędzy Niemcami „Psucie się i bezpieczeństwo żywności i pasz: izolacja i identyfikacja organizmów grzybowych za pomocą metod MALDI-TOF i LC-MS/MS” - wykonawca,
- 2013-2015 – Umowa Międzyrządowa o Współpracy Naukowej i Naukowo – Technicznej pomiędzy Austrią i Polską: „Health related pilot studies with emerging mycotoxins citrinin, T-2 and HT-2 toxin” – wykonawca,
- 2011-2013 – Grant nr N N311 521940 (własny): „Skażenie kolb kukurydzy w łanach wielkoobszarowych przez grzyby pleśniowe i mikotoksyny a ich wpływ na mikotoksykozę zearalenonową w populacjach dzików” – wykonawca,

- 2010-2012 – Grant 3660/B/P01/2010/39 (własny): „Wpływ skażenia środowiska grzybami pleśniowymi na alergiczne grzybicze zapalenie zatok przynosowych” – wykonawca,
- 2010-2011 Projekt Międzynarodowy niewspółfinansowany, realizowany w ramach umowy polsko-austriackiej - na podstawie decyzji MNiSW nr 761/N-AUSTRIA/2010/0, pt. "Test MTT do oznaczania zanieczyszczenia mikotoksynami w łańcuchu pokarmowym" – wykonawca,
- 2009-2012 - Grant nr NN 305 122136 (własny): „Wpływ skażenia produktów zbożowych ksenobiotykami – trichotecenami grupy A i B w ekosystemie rolnictwa ekologicznego i konwencjonalnego na zagrożenie zdrowia publicznego” – wykonawca,
- 2009-2012 - Grant nr N R12 0017 06 (rozwojowy): „Ustalenie wpływu skażenia mikotoksynami produktów rolno-spożywczych na rozwój nowotworu prostaty u mężczyzn” – wykonawca.

Pozostałe granty:

- 2011-2012 - przygotowanie wniosku i uzyskanie dotacji z MNiSW na inwestycję budowlaną: „Rozbudowa Laboratorium Badawczego Mikotoksyn o Pracownię Hodowli Komórkowych i Testów Toksyczności”, decyzja Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 6277/IB/168/2012 w wysokości 4 749 000 zł,
- 2010 – przygotowanie wniosku i uzyskanie środków z Funduszu Nauki i Technologii Polskiej na finansowanie zadania inwestycyjnego: „Chromatograf cieczowy ze spektrometrem mas wysokiej czułości do oznaczania śladowych ilości mikotoksyn i ich pochodnych w żywności, paszach, tkankach i płynach biologicznych – wraz z oprzyrządowaniem”, decyzja Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 554/FNiTP/168/2010 w wysokości 2 490 000 zł.

Organizowanie konferencji:

- X Anniversary International Conference „Mycotoxins and moulds” (X Jubileuszowa Międzynarodowa Konferencja Naukowa "Mikotoksyny i grzyby pleśniowe"), 27-28.06.2013, Bydgoszcz – członek Komitetu Organizacyjnego,
- IX International Conference „Mycotoxins and moulds” (IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”), 28-29.06.2010, Bydgoszcz – członek Komitetu Organizacyjnego,
- VIII International Conference „Mycotoxins and moulds” (IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”), 25-27.06.2008, Bydgoszcz – członek Komitetu Organizacyjnego.

Nagrody i stypendia:

- Nagroda Rektora Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego – zespołowa I stopnia – za wyróżniające się osiągnięcia naukowe w 2013 roku,
- Stypendium dla doktorantów „Krok w przyszłość – IV edycja” – 2011/2012, 2012/2013,
- Nagroda Marszałka Województwa Kujawsko-Pomorskiego za rok 2010, w dziedzinie Nauka, Badania Naukowe i Postęp Techniczny (grudzień 2011),
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego – zespołowa II stopnia – za znaczące osiągnięcia naukowe i organizacyjne w roku akademickim 2010/2011,
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego – zespołowa III stopnia – za wyróżniające się osiągnięcia organizacyjne w roku akademickim 2008/2009.

Inne osiągnięcia:

- 2013 - zgłoszenie UKW jako pełnoprawnego członka do udziału w interregionalnym konsorcjum „EcoFoodMed” (w ramach Polskiej Mapy Drogowej Infrastruktury Badawczej) działającym na rzecz badań, rozwoju i wdrożeń w zakresie ekologii, żywności i prewencji chorób cywilizacyjnych – opracowanie formularza informacyjnego dotyczącego celów badawczych oraz programu badań,
- członek Society for Mycotoxin Research (od 2010 roku).