

Dr n. wet. inż. Magdalena POLAK-ŚLIWIŃSKA
Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Dr inż. Mariusz Sławomir KUBIAK
Katedra Procesów i Urządzeń Przemysłu Spożywczego, Wydział Mechaniczny, Politechnika Koszalińska
Dr inż. Zbigniew BOREJSZO

Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

METODY OZNACZANIA WYBRANYCH MIKOTOKSYN W ŻYWNOCI I PASZACH®

Methods for the determination of selected mycotoxins in food and feed®

*Pracę przygotowano na potrzeby projektu badawczego własnego nr N N312 439837
finansowanego ze środków na naukę w latach 2009-2011*

Słowa kluczowe: mikotoksyny, zearalenon, ochratoksyna A, HPLC, GC, LC/MS, GC/MS.

W związku z koniecznością oznaczania mikotoksyn zgodnie z wytycznymi Komisji Europejskiej (WE) oraz stale rosnącym zainteresowaniem problematyką mikotoksyn ze względu na zmieniający się klimat, w Polsce i na świecie wiele instytucji naukowych i firm opracowuje nowe metody ich oznaczania.

Celem pracy przedstawionej w artykule była analiza stosowanych metod oznaczania mikotoksyn, takich jak ochratoksyna A i zearalenon w żywności oraz w paszach.

Key words: mycotoxins, zearalenone, ochratoxin A, HPLC, GC, LC/MS, GC/MS.

Due to the necessity for determining mycotoxins in accordance with the guidelines of the European Commission (EC) and the growing interest of the problem of mycotoxins due to the changing climate in Poland and in the world, many scientific institutions and companies to develop new methods for their determination.

The aim of the study was to discuss the most commonly used methods for the determination of mycotoxins, such as ochratoxin A and zearalenone in food and feed.

WSTĘP

Występowanie substancji niepożądanych w materiale roślinnym, może doprowadzić do zaburzenia homeostazy ogólnej lub narządowej zarówno u człowieka, jak i u zwierząt [20]. Substancje te mogą wnikać drogą oddechową, pokarmową i dermalną, przy czym najczęściej dostają się one przez przewód pokarmowy, do organizmu tak zwierząt, jak i ludzi, powodując niekorzystne zmiany [22]. Wśród tych substancji należy wymienić mikotoksyny. Substancje te są grupą wtórnych metabolitów grzybów toksynotwórczych, głównie z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus* i *Fusarium* [20, 33]. Mogą one wykazywać ostre oddziaływanie toksyczne ze względu na właściwości: mutagenne (fumonizyny, ochratoksyna A, aflatoksyny, toksyna T-2), teratogenne (toksyna T-2, ochratoksyna A, patulina, aflatoksyna B₁) i/lub estrogenne (zearalenon) [19, 35, 36]. Dawki, które wywołują ostrą toksyczność (LD₅₀ 10-20 mg/kg masy ciała), rzadko występują w spożywanej żywności. Dopuszczalne dzienne pobrania poszczególnych mikotoksyn są dużo niższe od dawek, na które narażone są zwierzęta hodowlane spożywające zanieczyszczoną paszę. Mogą wystąpić w nich ostre objawy typu podrażnienia skóry lub zapalenie spojówek, ale przede wszystkim chroniczne schorzenia [18, 19, 20]. Podstawę ochrony konsumenta stanowią wartości TDI (TDI = Tolerable Daily Intake), ustanowione przez Komitet Naukowy ds. Żywności (Scientific Committee on Food – SCF) Komisji Europejskiej. Informują one o dawkach substancji, które mogą być

codziennie i dożywnotnio spożywane, bez skutku występowania zauważalnych negatywnych efektów zdrowotnych [5, 10]. Wykrycie mikotoksyn umożliwia szybką reakcję producentów pasz i żywności poprzez wycofanie tych zbóż i przetworów zbożowych z obrotu handlowego, w których poziomy związków przekraczają dopuszczalne wartości [20]. W Polsce szczególnie niebezpieczne są mikotoksyny należące do trichotecenów, zearalenon oraz ochratoksyna A [40]. Metabolity te zanieczyszczają jednak kłosa i wiechy zbóż przeznaczane na cele spożywcze i paszowe we wszystkich strefach klimatycznych [2, 46, 47].

Celem artykułu jest omówienie metod oznaczania mikotoksyn, takich jak zearalenon oraz ochratoksyna A w żywności oraz w paszach.

ZEARALENON (ZEA)

Dieta ludzi i zwierząt może być źródłem wielu niesterydowych estrogennych związków [25], które są produkowane przez rośliny (fitoestrogeny) [33] lub grzyby pleśniowe (miko estrogeny), jak na przykład zearalenon. Zearalenon jest mikotoksyną biosyntezowaną przez kilka grzybów toksynotwórczych, włączając w to *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium equiseti* i *Fusarium semitectum* [5, 17, 31, 32]. Toksyczne efekty ZEA i jego metabolitów wynikają głównie z ich właściwości estrogenowych, obejmujących strukturalne podobieństwo do naturalnie występującego estrogenu,

estronu czy estriolu oraz interakcje z receptorami estrogenowymi człowieka, konkurując z estradiolem-17 β (E₂) [15, 30, 54]. Potencjał estrogenowy ZEA jest kilkakrotnie większy niż innych estrogenów środowiskowych [18, 40].

Zearalenon występuje przede wszystkim w kukurydzy i innych zbożach (w tym pszenicy, jęczmieniu, sorgu i ryżu) oraz mieszanych paszach, co w konsekwencji może się wiązać z objawami hiperestrogenizmu (zaburzenia rozwoju osobniczego) i innymi chorobami zwierząt, głównie świń i bydła [18].

Zearalenon jest łatwo absorbowany w przewodzie pokarmowym, a następnie metabolizowany w ścianach jelit i wątrobie do α - i β -zearalenolu oraz α - i β -zearalenalu [48, 51]. Jest on związkiem stabilnym, odpornym na działanie wysokiej temperatury. Nie niszczą go procesy mielenia i przechowywania, jak też obróbka termiczna żywności, czy środków żywienia zwierząt. Praktycznie nie rozpuszcza się w wodzie, natomiast jest rozpuszczalny w wodnych roztworach zasad, eterze, benzynie, chloroformie, chlorku metylu, octanie etylu, acetonitrylu, alkoholach i acetonie [25, 41].

Zearalenon i jego pochodne nie wykazują szczególnie wysokiej toksyczności ostrej, jednakże ich przestrzenna struktura wskazuje na wyraźne działanie estrogenne i anaboliczne. Substancje te **wiążą receptory estrogenu w macicy, pochwie, gruczołach mlecznych, wątrobie i podwzgórz** [25, 48].

W stosunku do człowieka nie ma jednoznacznych dowodów na toksyczne działanie zearalenonu, niemniej jednak istnieją sugestie, co do wywoływania zmian nowotworowych macicy oraz jajników u kobiet młodych lub w okresie menopauzy [28].

OCHRATOKSYNA A (OTA)

Ochratoksyna A produkowana jest przez toksynotwórcze gatunki grzybów z rodzaju *Aspergillus* oraz *Penicillium* [3]. Głównym producentem ochratoksyny A w Europie, w tym i w Polsce, jest *Penicillium verrucosum* [12]. Ochratoksyna A jest bardzo stabilna termicznie. Nie ulega ona rozkładowi ani w procesie gotowania ani np. podczas wypieku chleba. Termiczny rozkład tej toksyny zachodzi dopiero w temperaturze powyżej 250°C [26].

Stwierdzono, że OTA występuje naturalnie we wszystkich zbożach, w tym w kukurydzy, jęczmieniu, pszenicy, sorgu, życie, owsie i ryżu [9, 11]. Niewątpliwie występowanie OTA jest związane z klimatem, a zwłaszcza z warunkami w jakich przeprowadzone są żniwa i z warunkami przechowywania zbiorów.

Oprócz zbóż, występowanie OTA stwierdzono w wielu innych produktach spożywczych, w tym w nasionach soi, fasoli, ciecierzycy, ziarnach surowej kawy, ziarnach kakao, winie i soku z winogron, piwie, przyprawach i ziołach, podrobach wieprzowych i w przetworach mięsnych zawierających krew [52].

OTA została zakwalifikowana przez IARC do kategorii 2B wśród czynników rakotwórczych jako toksyna prawdopodobnie wywołująca raka u ludzi [55]. Jej działanie jest również teratogenne, powoduje wady rozwojowe płodu i zaburzenia układu immunologicznego, zaburza metabolizm węglowodanów u kurcząt. *P. verrucosum* z uwagi na wytwarzanie OTA stał się przyczyną bałkańskiej endemicznej

nefropatii (BEN), która jest jedną z form zapalenia nerek [55]. Zdiagnozowano ją po raz pierwszy u społeczności zamieszkującej wybrzeże Dunaju. Dotychczas brak jest wiedzy odnośnie całkowitej ilości OTA spożywanej z żywnością, pomimo wielu badań prowadzonych w tym kierunku [13, 14]. Mechanizm toksycznego oddziaływania OTA polega na inhibicji enzymów uczestniczących w przemianach węglowodanów. Pomimo, iż występowanie ostrych zatrueń mikotoksynami u ludzi jest niewielkie, należy brać pod uwagę długotrwałe narażenie wynikające z przyjmowania małych ilości toksyn zarówno przez ludzi, jak i zwierzęta, stanowiące ogniwo w łańcuchu żywnościowym [7, 23, 29, 34].

METODY OZNACZANIA OTA I ZEA

Komisja Wspólnoty Europejskiej udowadniając zrozumienie problemu, wprowadziła ujednolicone normy zawartości tych toksyn w produktach spożywczych [43, 44] oraz paszowych [42, 45]. Stąd podejmowane są starania mające na celu określenie zawartości mikotoksyn w żywności i paszach, poprzez zastosowanie różnych technik oznaczania zarówno potencjalnej, jak i faktycznej mikotoksynotwórczości grzybów infekujących żywność oraz paszę [7]. Całkowite wyeliminowanie mikotoksyn z produktów spożywczych jest niemożliwe [40]. Jedynym rozwiązaniem jest zatem przestrzeganie zasad dobrej praktyki rolnej oraz przemysłowej [20]. W celu zmniejszenia zagrożeń, jakie niosą za sobą mikotoksyny, wprowadzono ograniczenia ich ilości w żywności i w paszach. Obecnie w Polsce obowiązuje *Rozporządzenie Komisji UE nr 1881/2006 z 19 grudnia 2006 r. wraz z późniejszymi zmianami*, które ustanawia najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych, w tym mikotoksyn OTA i ZEA [44].

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) zalicza się do metod fizykochemicznych. Na skutek oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy związkami chemicznymi a wypełnieniem dochodzi do separacji jednorodnych mieszanin na poszczególne składniki [7]. Migracja cząsteczek jest możliwa tylko wówczas, gdy znajdują się one w fazie ruchomej, którą w metodzie HPLC jest ciecz [17]. Składniki próbki są rozdzielane w kolumnie analitycznej i na wyjściu z kolumny wykrywane przez detektor. Zaletami tej metody analitycznej w stosunku do innych typów chromatografii cieczowej jest krótszy czas analiz, całkowicie zautomatyzowana aparatura, możliwość analizy jakościowej i ilościowej, lepsza odtwarzalność wyników analiz, lepsza separacja związków na kolumnach analitycznych, które można używać wielokrotnie bez potrzeby regeneracji. Najczęściej stosowana jest chromatografia w odwróconym układzie faz (RP, *reversed phase* – w porównaniu do chromatografii w normalnym układzie faz), ze względu na możliwość separacji różnych związków polarnych i niepolarnych [17]. Wysokosprawna chromatografia cieczowa jest szeroko stosowana w analityce w różnych gałęziach przemysłu, w tym do detekcji mikotoksyn [1]. Warunkiem analizowania tych związków jest ich rozpuszczalność. Metoda ta umożliwia jednoczesne oznaczenie dużej ilości różnych mikotoksyn znajdujących się w próbce żywności czy paszy [4]. Dzięki HPLC możliwe jest wykrycie ZEA, trichotecenów, takich jak DON, NIV oraz fumonizyn,

zwłaszcza przy zastosowaniu metody HPLC ze spektrometrią mas [1, 4, 6, 16, 21, 24, 37, 38, 39, 49, 53]. Sprzężenie chromatografii cieczowej i spektrometrii mas wydaje się być doskonałym narzędziem służącym do rozdzielania i detekcji, choć wymaga od analityka stosownych działań, by zoptymalizować ten układ. W spektrometrii mas wymagana jest próbka w fazie gazowej, podczas gdy z kolumny analitycznej chromatografu cieczowego próbka jest w stanie ciekłym, co determinuje pewne etapy analizy, jak jonizacja próbki. Jednak dzięki technice LC/MS generowana jest informacja o masie molowej, strukturze oraz dokładnej analizie ilościowej związków [49].

Chromatografia gazowa (GC)

Fazą ruchomą w chromatografii gazowej (GC, *Gas Chromatography*) jest gaz, który porusza się wewnątrz kolumny z fazą stacjonarną, osadzoną na jej wewnętrznych ściankach i pełni jedynie funkcję transportującą próbkę [7]. Warunkiem analizy metodą GC jest przeprowadzenie substancji obecnych w próbce badanej w stan gazowy [7]. Detekcja odbywa się dzięki użyciu różnych detektorów, w tym FLD i ECD, przy czym sygnały z detektora rejestrowane są w postaci chromatogramów. Analiza jakościowa odbywa się poprzez identyfikację piku analitu na podstawie jego czasu retencji, porównywanego z czasem retencji piku wzorca analizowanej substancji [7]. Chromatografię gazową wykorzystuje się do identyfikacji szeregu mikotoksyn, w tym trichotecenów: deoksyniwalenolu i niwalenolu [27, 50] oraz zearalenonu [27].

Metoda GC jest idealną metodą rozdzielania substancji, ale nie daje jednoznacznych informacji o składzie rozdzielanej próbki. Sprzężenie GC z metodami spektroskopowymi np. GC/MS daje natomiast duże możliwości w zakresie identyfikacji składników złożonych mieszanin. Połączenie dwóch technik, które opierają się na różnych podstawach fizykochemicznych, pozwala na uzyskanie dobrej selektywności. Chromatografy gazowe sterowane komputerowo zawierają ogromne bazy danych, stanowiące podstawę do porównania widm i identyfikacji związków chemicznych.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC, *Thin-Layer Chromatography*) jest techniką analityczną, służącą do identyfikacji i rozdzielenia mieszanin związków. Dzięki tej metodzie można rozdzielić i oznaczyć jednocześnie kilka mikotoksyn. Niski koszt analizy oraz dostępność sprawiły, iż metoda ta stała się powszechnie wykorzystywana w badaniach jakości [8], zarówno żywności, jak i roślin oraz produktów rolniczych. Podczas badania rozdziela się najpierw badaną mieszaninę, a następnie przeprowadza się detekcję poszczególnych składników. Fazą rozdzielającą jest faza stacjonarna, o właściwościach sorpcyjnych [51] tworząca cienką warstwę, umieszczoną na płycie. Badane substancje nanosi się punktowo na płytkę, którą umieszcza się w komorze chromatograficznej tak, by zanurzyła się w fazie ruchomej, stanowiącej siłę napędową procesu chromatograficznego [51]. Identyfikację rozdzielonych substancji przeprowadza się na podstawie otrzymanych chromatogramów [7]. Stosuje się ją do detekcji takich toksyn jak: ochratoksyna A, zearalenon, toksyna T-2, niwalenol, czy deoksyniwalenol [8, 51].

PODSUMOWANIE

Dekontaminacja silnie zanieczyszczonych mikotoksynami plonów jest bardzo skomplikowana ze względu na stosunkowo wysoką odporność tych substancji wobec działania czynników fizykochemicznych, co w konsekwencji powoduje znaczące straty finansowe hodowców zwierząt, głównie trzody chlewnej i drobiu. Podstawowym źródłem narażenia człowieka na te związki jest żywność, stąd wynika tak duża potrzeba ciągłego śledzenia ich poziomów. Detekcja zanieczyszczonych produktów i wycofanie ich z łańcucha pokarmowego stanowi obecnie najprostsze rozwiązanie, zapewniające bezpieczeństwo żywności i pasz, niemniej jest to bardzo kosztowne dla producentów. Ważne jest zatem dysonowanie odpowiednimi technikami analitycznymi, umożliwiającymi wykrycie ksenobiotyków nawet w śladowych ilościach zanim produkt trafi na rynek. Dla przemysłu zasadniczą sprawą jest jednak opracowanie efektywnych metod kontroli, mających zastosowanie w całym łańcuchu produkcji. Istotna jest współpraca Państwowej Inspekcji Sanitarnej (PIS) z Głównym Inspektoratem Weterynarii (GIW) w zakresie bezpieczeństwa żywności, międzyresortowe wieloletnie krajowe plany kontroli, prowadzenie Krajowego Punktu Kontaktowego (KPK) i koordynowanie działań w zakresie Systemu Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach (**Rapid Alert System for Food and Feed - RASFF**), wynikające z zadań PIS. Pozwala to na podjęcie skutecznych i możliwie szybkich działań w celu eliminowania nieprawidłowości poprzez natychmiastowe wycofanie z obrotu niewłaściwych środków spożywczych lub/i pasz, jak również objęciu wzmożonym nadzorem producenta, który wprowadził takie produkty na rynek. Tylko skoordynowane działania wyspecjalizowanych instytucji w kraju, mające na celu zapobieganie ryzyku wystąpienia zagrożeń bezpieczeństwa żywności, zagwarantują zdrowie konsumenta.

LITERATURA

- [1] ANIOŁOWSKA M., STEININGER M. 2014. *Determination of trichothecenes and zearalenone in different corn (Zea mays) cultivars for human consumption in Poland*. Journal of Food Composition and Analysis 33: 14-19.
- [2] BALAS J. 2006. *Mikotoksyny jako źródło zanieczyszczeń żywności pochodzenia roślinnego*. Postępy Fitoterapii 2, 98-104
- [3] BELLÍ N., MARÍN S., DUAIGÜES A., RAMOS A.J., SANCHIS V. 2004. *Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain*. Journal of Science of Food and Agriculture, 84:591-594.
- [4] BELTRÁN E., IBÁNEZ M., PORTOLÉS T., RIPOLLÉS C., SANCHO J.V., YUSÀ V., MARÍN S. HERNÁNDEZ F. 2013. *Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study*. Analytica Chimica Acta, 783: 39-48.
- [5] BENNETT J.W., KLICH M. 2003. *Mycotoxins*. Clin Microbiol Rev, 16: 497-516.
- [6] BERTHILLER F., SULYOK M., KRŠKA R., SCHUHMACHER R. 2007. *Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals*. International Journal of Food Microbiology, 119: 33-37.

- [7] **BIASUCCI G., CALABRESE G., DI GIUSEPPE R., CARRARA G., COLOMBO F., MANDELLI B., MAJ M., BERTUZZI T., PIETRI A., ROSSI F. 2011.** *The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits.* European Journal of Nutrition, 50(3): 211-218. doi: 10.1007/s00394-010-0130-y. Epub 2010 Sep 2.
- [8] **BRAICU C., PUJA, C., BODOKI E., SOCACIU C. 2008.** *Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin a in different cereals cultivated in romania using thin-layer chromatography-densitometry.* Journal of Food Quality, 31: 108-120.
- [9] **CASTELLANOS-ONORIO O., GONZALEZ-RIOS O., GUYOT B., TACHON A. FONTANA, GUIRAUD J. P., SCHORR-GALINDO S., DURAND N., SUÁREZ-QUIROZ M. 2011.** *Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (Coffea arabica).* Food Control, 22: 1184-1188.
- [10] **CHELKOWSKI J. 2000.** [http.: Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy. www.cropnet.pl/mycotoxin](http://www.cropnet.pl/mycotoxin)
- [11] **CORONEL M. B., MARIN S., CANO-SANCHO G., RAMOS A. J., SANCHIS V. 2012.** *Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts, coffee, wine, and beer.* Food Additives & Contaminants: Part A, 29: 979-993. doi: 10.1080/19440049.2012.660708.
- [12] **CZABAN J., WRÓBLEWSKA B., STOCHMALA., JANDA B. (2006).** *Growth of Penicillium verrucosum and production of ochratoxin A on nonsterilized wheat grain incubated at different temperatures and water content.* Polish Journal of Microbiology, 55: 321-331.
- [13] **CZERWIECKI L., WILCZYŃSKA G. 2005.** *Oznaczanie ochratoksyny A w przyprawach kulinarnych.* Roczniki PZH, 56(4): 323-330.
- [14] **CZERWIECKI L., WILCZYŃSKA G. 2007.** *Optymalizacja metod oznaczania aflatoksyn w żywności z zastosowaniem postkolumnowego tworzenia pochodnych z bromem.* Roczniki PZH 58, 3: 489-501.
- [15] **DING X., LICHTI K., STAUDINGER J. L. 2006.** *The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the Pregnane X Receptor.* Toxicological Sciences, 91(2): 448-455.
- [16] **DUNNE C., MEANCY M., SMYTH M. 1993.** *Multimycotoxin detection and clean-up method for aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in animal feed ingredients using high-performance liquid chromatography and gel permeation chromatography.* Journal of Chromatography A, 629(2): 229-235.
- [17] **GLAJCH J. L., KIRKLAND J. J., SQUIRE K. M., MINOR J. M. 1980.** *Optimization of solvent strength and selectivity for reversed phase liquid chromatography using an interactive mixture – design statistical technique.* Journal of Chromatography, 199: 57-79.
- [18] **GAJEŃCKI M 2002.** *Zearalenone – undesirable substances in feed.* Polish Journal of Veterinary Sciences, 5(2): 117-122.
- [19] **GAJEŃCKI M., GAJEŃCKA M., JAKIMIUK E., ZIELONKA Ł., OBREMSKI K. 2010.** *Zearalenone – undesirable substance.* In: Mahendra Rai, Ajit Varma (eds) *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 131-144.
- [20] **GAJEŃCKI M., JAKIMIUK E., GAJEŃCKA M., MOITYKA M., OBREMSKI K., ZIELONKA Ł.** *Praktyczne metody zmniejszanie aktywności mikotoksyn w paszach.* http://www.konferencjaswinie.pl/referaty/PRAKTYCZNE_METODY.pdf (2.12.2013)
- [21] **GAUCHI J. P., LEBLANC J. C. 2002.** *Quantitative assessment of exposure to the mycotoxin ochratoxin A in food.* Risk Analysis, 22: 219-234.
- [22] **GROCHOWALSKI A. 2004.** *Sample pretreatment methods for the determination of mycotoxins and other hazardous substances (dioksin) in food and feeding materials using gas chromatography and double fragmentation mass spectrometry GC-MS/MS.* IV Międzynarodowa Konferencja Naukowa, Olsztyn, 45.
- [23] **HASSAN A.M., SHEASHAA H.A., FATTAH M.F., IBRAHIM A.Z., GABER O.A., SOBH M.A. 2006.** *Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants.* Pediatric Nephrology, 21(1): 102-105.
- [24] **HERNÁNDEZ M. J., GARCÍA-MORENO M. V., DURÁN E., GUILLÉN D., BARROSO C. G. 2006.** *Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia.* Analytica Chimica Acta, 566: 117-121.
- [25] **HIDY P. H., BALDWIN R. S., GREASHAM R. L., KEITH C. L., MCMULLEN J. R. 1977.** *Zearalenone and some derivatives.* Advances in Applied Microbiology, 22:59-82.
- [26] **KAPTUROWSKA U., ZIELIŃSKA K. J., STECKA K., KUPRYŚ M. P. 2010.** *Evaluation of fodder contamination with ochratoxin A and methods of its decontamination.* Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 55(3): 156-163.
- [27] **KINANI S., BOUCHONNET S., BOURCIER S., PORCHER J. M., AIT-AISSA S. 2008.** *Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography–mass spectrometry analysis of environmental samples.* Journal of Chromatography A, 1190: 307–315.
- [28] **KOLENDA M., MROCZKOWSKI S. 2013.** *Fusarium mycotoxins and methods of assessing the mycotoxicity: a review.* Journal of Central European Agriculture, 2013, 14(1), p.169-180. DOI: 10.5513/JCEA01/14.1.1177
- [29] **KUCIEL-LISIESKA K. 2006.** *Obecność zearalenonu u kobiet ze zmianami nowotworowymi w gruczołach piersiowych.* Praca doktorska, UWM, Olsztyn.
- [30] **KUIPER-GOODMAN T., SCOTT P.M., WATANABE H. 1987** *Risk assessment of the mycotoxin zearalenone.* Regulatory Toxicology and Pharmacology, 7: 253-306.

- [31] LENDZION E., POSTUPOLSKI J., RYBIŃSKA K., KURPIŃSKA-JAWORSKA J., SZCZĘSNA M., KARŁOWSKI K. 2010. System RASFF jako element strategii bezpieczeństwa żywności w zakresie mikotoksyn. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLIII, 4, 533-538.
- [32] MALEKINEJAD H., COLENBRANDER B., FINK – GREMELS J. 2006. *Hydroxysteroid dehydrogenases in bovine and porcine granulose cells convert zearalenone into its hydroxylated metabolites α – zearalenol and β – zearalenol*. *Veterinary Research Communications*, 30: 445-453.
- [33] NOWICKA E., SZKUDELSKI R., NOGOWSKI L. 2006. *Działanie fitoestrogenów na organizm człowieka i zwierząt*. *Medycyna Weterynaryjna*, 62(7): 736-738.
- [34] PFOHL-LEZKOWICZ A., MANDERVILLE R. A. 2007. *Review on Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 61-99. doi: 10.1002/mnfr.200600137.
- [35] PITET A. 2005. *Naturalne występowanie mikotoksyn w żywności i paszach – nowe dane*. *Wyd. Naturan* 12, 1.
- [36] PITET A. 1998. *Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review*. *Revue Médécine Vétérinaire*, 149 (6), 479-492.
- [37] PN-EN 14132. 2010. Artykuły żywnościowe – Oznaczanie ochratoksyny A w jęczmieniu i kawie palonej – Metoda HPLC z oczyszczaniem na kolumnie powinowactwa immunologicznego
- [38] PN-EN 14133. 2010. Artykuły żywnościowe – Oznaczanie ochratoksyny A w winie i piwie – Metoda HPLC z oczyszczaniem na kolumnie powinowactwa immunologicznego
- [39] POKRZYWA P., CIEŚLIK E., TOPOLSKA K. 2007. Ocena zawartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3 (52), 139-146.
- [40] POLAK M. 2007. *Ocena skuteczności węgla sodu, jako destruktor zearalenonu w paszy dla loszek*. Praca doktorska, Olsztyn.
- [41] POLAK M., GAJĘCKA M., JAKIMIUK E. I WSP. 2004. Metabolit profile of pigs with feed containing zearalenone destruktor. IV Międzynarodowa Konferencja Naukowa., Olsztyn, 113.
- [42] ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 187/2011 z dnia 25 lutego 2011 r. zmieniające załącznik I do rozporządzenia (WE) nr 669/2009 w sprawie wykonania rozporządzenia (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie zwiększonego poziomu kontroli urzędowych przywozu niektórych rodzajów pasz i żywności nie pochodzących od zwierząt.
- [43] ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) 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. 2007. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*. 29.09.2007: L 255/14-17.
- [44] ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy dla niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych.
- [45] ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) NR 799/2011 z dnia 9 sierpnia 2011 r. zmieniające załącznik I do rozporządzenia Komisji (WE) nr 669/2009 w sprawie wykonania rozporządzenia (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie zwiększonego poziomu kontroli urzędowych przywozu niektórych rodzajów pasz i żywności nie pochodzących od zwierząt.
- [46] RYBIŃSKA K., POSTUPOLSKI J., LENDZION E., KURPIŃSKA-JAWORSKA J., SZCZĘSNA M. 2008. *Programy monitoringowe realizowane przez Państwową Inspekcję Sanitarną w zakresie zanieczyszczenia wybranych środków spożywczych mikotoksynami*. *Roczniki PZH* 59, 1: 1-7.
- [47] SELWET M. 2010. *Negatywne aspekty występowania wybranych mikotoksyn w paszach*. *Wiadomości Zootechniczne*, R. XLVIII 1: 9-13.
- [48] SHERMA J. 2000. *Thin-Layer Chromatography in food and agricultural analysis*. *Journal of Chromatography A*, 880: 129-147.
- [49] SOLEIMANY F., JINAP S., FARIDAH A., KHATIB A. 2012. *A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals*. *Food Control*, 25: 647-653.
- [50] TANAKA T., YONEDA A., INOUE S., SUGIURA Y., UENO Y. 2000. *Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 882: 23-28.
- [51] TIEMANN U., TOMEK W., SCHNEIDER F. I WSP. 2003. *Effects of mikotoksyn α - i β - zearalenol on regulation of progesterone synthesis cultured granulose cells from porcine ovaries*. *Reproductive Toxicology*, 17, 673.
- [52] VAN EGMOND H. P., SPEUERS G. J. A. 1994. *Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide*. *Journal of Natural Toxins*, 3, 125.
- [53] VISCONTI A., PASCALE M., CENTONZE G. 1999. *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 864: 89-101.
- [54] WHO, 2000. *Zearalenone. Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. Prepared by the Fifty – third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 44, World Health Organization, Geneva, Switzerland: 393-482.
- [55] ZIARNO M., UJAZDOWSKA M. 2009. *Ochratoksyna A w żywności*. *Przemysł Spożywczy*, 63(7): 21-25.