

AGNIESZKA FILIPEK, MAREK DANIEWSKI, KAROL BAL

OZNACZANIE OŚMIU MIKOTOKSYN Z GRUPY TRICHOTECENÓW
METODĄ GCMSMS. CZĘŚĆ I – OPRACOWANIE WARUNKÓW MS/MS

DETERMINATION OF EIGHT TRICHOTHECENE MYCOTOXINS USING METHOD
GCMSMS. PART I – ELABORATION OF CONDITIONS OF MS/MS

Samodzielna Pracownia Technologii Żywności i Żywienia
Instytut Żywności i Żywienia
02–903 Warszawa, ul. Powsińska 61/63
Kierownik: dr inż. M. Daniewski

W pracy zastosowano technikę MS/MS do oznaczania ośmiu mikotoksyn z grupy trichotecenów stosując chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas firmy Finnigan Mat typ GCQ. Opisano optymalne warunki analizy kolizyjnie indukowanej dysocjacji (CID) i wybrano najlepsze pary jonów (jon pierwotny i jon potomny) dla wszystkich analizowanych toksyn.

Mikotoksyny z grupy trichotecenów należą do wtórnych toksycznych metabolitów, które są produkowane przez różne rodzaje grzybów strzępkowych (pleśni), takich jak: *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Cylindracarpon* i *Verticimonosporium*. Stanowią grupę ponad 150 związków, spośród której do najczęściej spotykanych zalicza się: deoksynivalenol (DON), jego pochodne acetylowe – 3-acetylodeoksynivalenol (3-AcDON) i 15-acetylodeoksynivalenol (15-AcDON), nivalenol (NIV), fusarenon-X (FUS-X), toksynę T-2 jej pochodna hydroksylową toksynę HT-2, toksynę T-2 tetraol, diacetoksyscirpenol (DAS), monoacetoksyscirpenol (MAS) [3, 6, 7, 9, 14].

Ze względu na to, że pleśnie występują powszechnie w środowisku naturalnym, zarówno je, jak i mikotoksyny przez nie produkowane, zalicza się do zanieczyszczeń żywności, surowców wykorzystywanych do jej produkcji oraz pasz. Ogromna większość tych substancji charakteryzuje się wysoką toksycznością w stosunku do organizmów ludzkich i zwierzęcych [2, 5, 7, 14, 17].

Do organizmu człowieka mikotoksyny mogą się dostać nie tylko drogą pokarmową ale również przez drogi oddechowe, a nawet przez skórę. Wysokie stężenie mikotoksyn w żywności prowadzi do powstania zatruc ostrych o zróżnicowanym przebiegu np. do silnych uszkodzeń narządów wewnętrznych. Obecnie jednak zatrucia ostre są bardzo rzadko spotykane. O wiele częściej występujące i bardziej niebezpieczne są zatrucia przewlekłe. Zatrucia te powstają w wyniku działania bardzo małych dawek mikotoksyn przyjmowanych z pożywieniem przez dłuższy czas. Przy niskim stężeniu związku te kumulują się w tkankach organizmu i przypuszcza się, że wywołują m.in. martwicze

zmiany w obrębie jamy ustnej, przełyku, żołądka, leukopemię i są przyczyną wysokiej umieralności [1, 2, 6, 8, 9, 10, 11, 15]

Dokładność, szybkość i skuteczność jest niezwykle ważna w oznaczaniu poziomu zanieczyszczeń toksynami w żywności i paszach. Do ostatecznego rozdziału oraz jakościowej i ilościowej identyfikacji mikotoksyn z grupy trichotecenów stosuje się różne metody analityczne. Większość z nich bazuje na technice chromatografii cienkowarstwowej (TLC) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem UV lub fluoroscencyjnym. Metoda TLC jest niedostatecznie selektywna i czuła. Metoda HPLC również ma ograniczoną czułość. Nadaje się wyłącznie do oznaczania wysokich i bardzo wysokich stężeń trichotecenów [4, 6, 9, 11, 13, 15].

Także metody immunologiczne takie jak EIA (enzyme immuno assay) i ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), które rozwinęły się w ostatnim czasie, nie dają całkowitej pewności pod względem ilościowym [(4, 6, 9, 11, 13, 15].

W ostatnich latach coraz powszechniejsze staje się oznaczanie trichotecenów przy pomocy chromatografii gazowej. Wykorzystanie wysokorozdzielczych kolumn kapilarnych wraz z zastosowaniem optymalnych systemów detekcji (ECD, MS) pozwala osiągnąć zadowalający poziom selektywności i czułości w analizie trichotecenów.

W analizie śladowej nie bez znaczenia jest rodzaj stosowanego detektora. W celu stworzenia znacznie czulszego układu, pozwalającego z bardzo wysokim prawdopodobieństwem zidentyfikować pod względem jakościowym związku zawarte w próbce, stosuje się chromatograf gazowy połączony ze spektrometrem mas (GC/MS).

Podstawową zasadą spektrometrii mas jest wytwarzanie, rozdzielanie i wykrywanie jonów ze związków chemicznych, w funkcji stosunku ich masy do ładunku (m/z). Związki opuszczające kolumnę chromatografu gazowego są wprowadzane do komory (wysoka próżnia ok. 10^{-7} Tora) i tam ulegają jonizacji. Jony te najczęściej powstają w wyniku zderzenia analizowanych związków ze strumieniem elektronów (elektron impact – EI), wytwarzanych przez żarzące się włókno wolframowe lub renowe. Jony są oddzielane od siebie (następuje fragmentacja) w analizatorze masowym, w zależności od stosunku ich masy do ładunku (m/z), a następnie rejestrowane przez powielacz elektronów. W ten sposób działa typowy analizator, tzw. kwadrupol [12, 16].

Znacznie lepszym analizatorem do analiz śladowych jest pułapka jonowa. Działanie pułapki polega na tym, że po wprowadzeniu jonów do komory jonizacyjnej, powstają jony, które następnie są stabilizowane przez odpowiedni potencjał elektrody centralnej. Zwiększanie tego potencjału powoduje wyrzucenie jonów z komory, kolejno od mas najniższych do najwyższych. Następnie są one wykrywane, wzmacniane i rejestrowane przez układ przetwarzania danych. Tak więc w pułapce jonowej tworzenie jonów i ich detekcja odbywa się w tej samej komorze, co znakomicie zwiększa czułość układu analitycznego [16].

Po takiej analizie otrzymujemy widmo mas (TIC – całkowity prąd jonowy), składające się z pojedynczych jonów powstałych w wyniku rozpadu cząsteczki związku chemicznego. Dzięki komputerowemu systemowi przetwarzania danych możemy określić ich skład. Identyfikację nieznaną związków prowadzi się przez porównanie uzyskanych widm mas z widmami mas substancji wzorcowych [16].

Dzięki specyficznej budowie i działaniu pułapki jonowej możliwe jest znaczne zwiększenie selektywności analizy poprzez zastosowanie techniki MS/MS. Działanie to

polega na tym, że z jonów jakie wchodzi do komory jonizacyjnej, wybierany jest jeden (ten który chcemy monitorować) tzw. jon pierwotny. Pozostałe jony są usuwane z komory jonizacyjnej. Z jonu pierwotnego w wyniku zderzenia z cząsteczkami helu (gaz nośny o odpowiednio wysokim potencjale) powstają tzw. jony potomne. Układ jonów w widmie mas jest charakterystyczny dla danego jonu pierwotnego pochodzącego z danego związku i obrazuje jego fragmentację.

Wyżej opisana technika MS/MS jest możliwa do zastosowania wyłącznie w laboratoriach, które dysponują pułapką jonową. Badania prowadzone tą metodą mają dużą wartość, ze względu na to, że jest to stosunkowo nowa technika (w Polsce nie prowadzi się tego typu badań), która daje dużą specyficzność tzn. pozwala na wyeliminowanie szeregu błędów pochodzących z matrycy.

Stosowana powszechnie w analizie śladowej związków technika SIM (czyli monitorowanie wybranych jonów), która zapewnia podobną czułość, nie daje takiej pewności. W tym przypadku często powstają znaczne zafałszowania w oznaczeniach poprzez nakładanie się pików pochodzących zarówno z zanieczyszczeń, jak i tła. Błąd taki można tylko częściowo wyeliminować poprzez zastosowanie odpowiedniej procedury przygotowania próbki.

W pierwszym etapie badań celem pracy było opracowanie warunków MS/MS w analizie wybranych mikotoksyn z grupy trichotecenów. Uzyskane wyniki posłużą do opracowania metody oznaczania mikotoksyn z grupy trichotecenów przy użyciu układu GC/MS/MS. Metoda dająca całkowitą pewność, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym pozwoli w przyszłości na zbadanie ziarna i przetworów zbożowych dostępnych na naszym rynku.

MATERIAŁ DO BADAŃ

Materiał do badań stanowiły: czysty wzorec deoksynivalenolu (DON) zakupiony w firmie Sigma-Aldrich oraz wzorce 7 trichotecenów – 15-acetylodeoksynivalenolu (15AcDON), nivalenolu (NIV), diacetoksyscirpenolu (DAS), monoacetoksyscirpenolu (MAS), triacetoksyscirpenolu (TAS), fusarenonu-X (FUS-X) i toksyny T-2, które otrzymaliśmy dzięki uprzejmości dr *Henryka Jelenia* z Instytutu Technologii Żywności Akademii Rolniczej w Poznaniu.

DO stworzenia mieszanki silującej w celu upochodnienia trichotecenów użyto następujących odczynników: TMCS (trimethylchlorosilane), MSTFA (N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoroacetamide) i TMSI (N-Trimethylsilyl-Imidazol).

METODYKA BADAŃ

APARATURA

Pojedyncze wzorce trichotecenów analizowano metodą chromatografii gazowej stosując chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas typu GCQ firmy Finnigan/Mat, o zakresie mas od 1 do 1000 absolutnych jednostek masy (amu). Chromatograf wyposażony jest w dozownik typu split/splitless, połączony z urządzeniem do elektronicznej regulacji ciśnienia (EPC).

Do analizy chromatograficznej związków zastosowano kolumnę typu CPSil 8 CB firmy CHROMPACK, o długości 30 m, śr. wewn. 0,25 mm i grubości filmu fazy wewnętrznej 0,40 μm.

Związki w ilości 2 ng nanoszono na kolumnę przy pomocy autosamplera typu AS9000.

Zastosowano system przetwarzania danych – FINNIGAN MAT DATA STATION

WARUNKI ANALIZY CHROMATOGRAFICZNEJ

Warunki pracy spektrometru mas:

Potencjał jonizacji: 70 eV; napięcie powielacza: 1350 V; praca w trybie TIC – rejestracja całkowitego prądu jonowego o zakresie mas 40 – 650 amu/skan.; praca w trybie MS/MS – ustalona doświadczalnie; temperatura źródła jonów: 180°C; temperatura linii transferowej GC/MS: 270°C;

Warunki chromatografii:

Gaz nośny: hel o stałym przepływie z szybkością 25 cm/sek.; temperatura dozownika: 270°C; split 1:10; temperatura pieca programowana.

- Program temperaturowy dla trichotecenów został ustalony doświadczalnie:
- Temperatura początkowa: 120°C
- Izoterma początkowa 5 minut
- Przyrost temperatury od 120°C do 270°C w tempie 5°C/min
- Izoterma 5 minut
- Przyrost temperatury od 270°C do 290 w tempie 10°C/min
- Izoterma końcowa: 8 minut

Wyniki oznaczeń były rejestrowane przy pomocy komputerowego integratora firmy Finnigan Mat. Urządzenie to w sposób automatycznie zaprogramowany kontroluje pracę chromatografu gazowego i spektrometru mas.

Interpretację jakościową uzyskanych chromatogramów przeprowadzono porównując spektra mas (dotyczy wyłącznie trybu TIC) posiadanych wzorców ze spektrami mas wzorcowych związków zawartych w bibliotece komputerowej.

WARUNKI DERYWATYZACJI TRICHOTECENÓW

Aby związki mogły być analizowane metodą chromatografii gazowej, muszą być lotne i trwałe w warunkach analizy. Dlatego też wzorce trichotecenów przeprowadzono w pochodne silylowe TMS. Proces ten, określany jest jako derywatywacja i polega na podstawieniu wodoru w polarnych grupach, grupą trimetylosililową $(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{Cl}$.

Mieszanekę do silylacji sporządzono przez zmieszanie MSTFA, TMCS i TMSI w stosunku 100:5:2. Mieszanekę ta, po dokładnym wymieszaniu była następnie przechowywana w lodówce.

Roztwór w ilości 10 µl zawierający 0,2 µg toksyny, umieszczano w wysuszonym naczynku reakcyjnym. Rozpuszczalnik odparowywano w temperaturze pokojowej, w łagodnym strumieniu azotu. W celu całkowitego usunięcia resztek wody, po odparowaniu rozpuszczalnika, próbki były suszone w eksykatorze próżniowym z P_2O_5 , przez noc. Następnie trichoteceny przeprowadzono w pochodne.

Pochodne TMS otrzymywano przez dodanie 100 µl mieszanek silylującej do szczelnie zakręcanego naczynka reakcyjnego z próbką, a następnie ogrzewano próbkę w temperaturze 60°C przez 15 minut.

WYNIKI

Analiza jakościowa wzorców trichotecenów

Metodą GC/MS przeanalizowano kolejno osiem wzorców trichotecenów. Nie uzyskano zadowalający chromatogramów pod względem jakościowym. Widma masowe związków były mało charakterystyczne, ponieważ intensywność jonów masowych była bardzo niska. Dlatego też wiarygodna identyfikacja toksyn była niemożliwa. Wynikało to prawdopodobnie z tego, że trichoteceny nie wytrzymują warunków stosowanych w analizie chromatograficznej i ulegają rozpadowi.

Analiza jakościowa pochodnych TMS trichotecenów

Proces derywatywacji związków powoduje wzrost ich trwałości, a ponadto powstanie związków o wyższej lotności i mniejszej polarności, co znacznie polepsza ich rozdzielność.

chromatograficzny. Spektra masowe pochodnych zawierają jony o wyższych masach, a często są to jony masowe. Pozwala to na identyfikację tych związków z bardzo dużym prawdopodobieństwem.

W przypadku pochodnych TMS trichotecenów uzyskano zadowalający rozdział chromatograficzny. Piki na chromatogramach charakteryzowały się wysoką intensywnością i nie było problemów z ich wyizolowaniem. Każdy analizowany pik posiadał charakterystyczne spektrum masowe. W większości przypadków jony masowe miały dużą intensywność. Dzięki temu można było zidentyfikować dany związek.

Analiza GC/MS/MS

Na podstawie widm masowych uzyskanych w wyniku analizy chromatograficznej ośmiu TMS pochodnych trichotecenów, wybrano tzw. jony pierwotne niezbędne do przeprowadzenia analiz w technice MSMS.

Każdy jon pierwotny poddany był wielokrotnej analizie przy zmiennych warunkach pracy spektrometru mas. Następnie porównano intensywność powstałych w wyniku fragmentacji tzw. jonów potomnych i wybrano jeden, który spełnia wymogi jonu do oznaczeń jakościowych i ilościowych.

Optymalizacja warunków spektrometru mas w technice MS/MS wymagała zmiany parametrów takich jak:

- Isolation width – szerokość okienka masowego od 0.5 do 10 amu;
- Excitation voltage – napięcie wzbudzenia od 0 do 10 V
- Excitation time – czas wzbudzenia od 1 do 30 milisekund
- Excitation q – wartość napięcia odpowiadającego częstotliwości radiowej (RF), która jest stosowana w czasie analizy kolizyjnie indukowanej dysocjacji (CID) jonów pierwotnych. Najczęściej stosuje się wartość 0,225. Dla jonów, które trudno ulegają fragmentacji ponieważ są stabilne stosuje się wartości 0,300 lub 0,450.

Dla jonów pierwotnych siedmiu toksyn ustalono parametry o następujących wartościach: isolation width – 1amu, excitation voltage – 1V, excitation time – 15 milisekund, excitation q – 0,45. Tylko jony pierwotne pochodzące z nivalenolu, aby mogły ulec odpowiedniej fragmentacji wymagały zastosowania excitation q w wysokości 0,300.

Jony pierwotne po zastosowaniu optymalnych warunków pracy spektrometru mas i jony potomne dla każdej analizowanej toksyny zestawiono w tabeli.

Tabela Zestawienie jonów pierwotnych i potomnych po zastosowaniu optymalnych warunków analizy kolizyjnie indukowanej dysocjacji.
Precursor ions and daughter ions after using optimal parameters of CID

Nazwa toksyny	Jon pierwotny	Jony potomne
DON	512*	393**, 333, 496
	497	407, 389, 379
	422	317, 32, 305
	407	317, 287, 389
	393	259, 333, 274
	287	271, 257, 243

Tabela cd.

15AcDON	408	364, 390, 317
	393	350, 333, 305
	392*	350**, 332, 305
	377	287, 348, 359
	350	305, 317, 375
NIV	510	317, 289, 315
	482	392, 362, 379
	420	405, 315, 392
	393	362, 377, 364
	392	363, 362, 377
	379*	289**, 261, 363
	289	230, 273, 261
FUS-X	480*	390**, 375, 303
	450	360, 318, 272
DAS	378	285, 255, 197
	350*	244**, 290, 332
MAS	408	318, 275, 303
	285	197, 269, 169
	277	261, 159, 187
	247*	159**, 232, 157
	187	159, 129, 144
	159	131, 159, 129
TAS	378	285, 197, 255
	350	244, 290, 272
	332	290, 259, 274
	290*	259**, 274, 275
	272	244, 257, 229
	244	229, 214, 201
T-2	436*	376**, 283, 298
	350	244, 290, 272

* – wybrany jon pierwotny

** – wybrany jon potomny

W przypadku deoksynivalenolu (DON), jako jony pierwotne do analizy wybrano jony 512, 497, 422, 407, 393 i 287. Jony pierwotne: 497, 407 i 287 mają najwyższą (100%) intensywność tzn. uległy słabej fragmentacji. Powstałe z nich jony potomne są słabo widoczne i mało przydatne do celów analitycznych. Fragmentacja jonu pierwotnego 497 nastąpiła w sposób zadowalający. Jednak jony potomne 317 i 332 mają zbliżoną intensywność (odpowiednio 100% i 98%), co może powodować pewne komplikacje

w dalszych analizach, gdyż trudno jest przewidzieć, który jon należy monitorować, jako jon bazowy. Do dalszych analiz wybrano jon pierwotny 512 i jon potomny 393, jako jon który spełniają kryteria jonu do oznaczeń ilościowych.

Do analizy chromatograficznej toksyny – 15-acetyloodeksynivalenolu (15AcDON) wybrano jony pierwotne 408, 393, 392, 377 i 350. Jony 408 i 377 bardzo słabo fragmentowały. Zadowalającą fragmentację uzyskano w przypadku jonów pierwotnych 392 i 393. Jako jon bazowy do dalszych analiz wybrano jon potomny 350 powstający z jonu pierwotnego 392, ponieważ wykazywał większą intensywność niż jon o tej samej masie, który powstał z jony pierwotnego 393.

W przypadku nivalenolu (NIV) wszystkie wybrane jony pierwotne (tabela) trudno fragmentowały. Dopiero zastosowanie excitation q w wysokości 0.300 pozwoliła uzyskać właściwą fragmentację. Do dalszych analiz wybrano jon pierwotny 379 i jon potomny 289, który spełnia wymogi jonu do oznaczeń ilościowych.

W analizie fusarenonu X (FUS-X) i toksyny T-2, jako jony pierwotne wykorzystano jony 480 i 450 dla pierwszej toksyny i jony 436 i 350 dla drugiej. Następnie porównano intensywności jonów potomnych i wybrano dla Fusarenonu X jon pierwotny 480 i jon potomny 390, a dla toksyny T-2 odpowiednio jony 436 i 376.

W ten sam sposób poddano analizie wybrane jony pierwotne dla wzorców monoacetoksyscirpenolu (MAS), diacetoksyscirpenolu (DAS) i triacetoksyscirpenolu (TAS) i następnie porównano jakość fragmentacji tych jonów i intensywność jonów potomnych. Ze względu na kryteria, jakie powinny spełniać jony potomne wybrano następujące jony: dla MAS jon 159, który powstaje z jonu pierwotnego 247, dla DAS jon 244 utworzony z jonu 350 i w przypadku TAS jon 259, który powstaje w wyniku fragmentacji z jonu 290.

WNIOSKI

1. Stosując warunki analizy chromatograficznej opisane w pracy uzyskano zadowalającej jakości widma masowe (w trybie TIC) dla pochodnych TMS ośmiu wzorców trichotecenów. Jednocześnie udowodniono, że nieupochodnione toksyny są związkami nietrwałymi i nie wytrzymują warunków tej analizy.

2. Opracowano optymalne warunki pracy spektrometru mas w trybie MS/MS. Dla jonów pierwotnych siedmiu toksyn ustalono parametry o następujących wartościach: isolation width – 1, excitation voltage – 1, excitation time – 15, excitation q – 0,45. Tylko jony pierwotne pochodzące z nivalenolu, aby mogły ulec odpowiedniej fragmentacji wymagały zastosowania excitation q w wysokości 0,300.

3. Po porównaniu intensywności powstałych w wyniku fragmentacji tzw. jonów potomnych wybrano jeden spełniający wymogi jonu do oznaczeń jakościowych i ilościowych dla każdego związku. W przypadku DON i 15AcDON były to jony 393 oraz 350. Dla NIV wybrano jon potomny 289. Z kolei dla fusarenonu X (FUS-X) i toksyny T-2 były to jony 390 oraz 376. Jon potomny 244 wybrano dla DAS. W przypadku toksyn MAS i TAS wybrano odpowiednio jon 159 oraz 259.

4. Uzyskanie optymalnych warunków MS/MS dla wybranych trichotecenów pozwoli na opracowanie metody oznaczania tych związków przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas i pracującego w trybie MS/MS. Metoda pozwoli w przyszłości na oznaczenie zawartości tych toksyn w różnych produktach spożywczych

w sposób szybki i wiarygodny, co z kolei umożliwi eliminację skażonej żywności występującej na naszym rynku.

A. Filipek, M. Daniewski, K. Bal

DETERMINATION OF EIGHT TRICHOHECENE MYCOTOXINS USING METHOD GC/MS. PART I – ELABORATION OF CONDITIONS OF MS/MS

Summary

Trichothecene mycotoxins are commonly distributed in cereals in the world. Rapid and accurate methods for the determination of these toxins are required to prevent the intoxication of human and to contribute to the supply of safe foods and feed. MS/MS mode was applied for identification of eight trichothecene mycotoxins with Finnigan /Mat GCQ GC/MS system.

We describe here optimal parameters of CID and to obtain best pairs of ions (precursor ions and daughter ions) for all analysed toxins.

PIŚMIENNICTWO

1. *Czerwiecki L.*: Mikotoksyny w żywności jako czynnik zagrożenia zdrowotnego. *Żywność, Żywnienie a Zdrowie* 1997, 6, 292–300.
2. *Gąsiorowski H.*: Ziarno wadliwe. Przyczyny, objawy oraz sposoby zapobiegania i wykorzystania takiego ziarna. *Przegl. Zboż – Młyn*. 2000, 64, 11–13.
3. *Jeleń H., Kamiński E.*: Tworzenie scirpentriolu i jego pochodnych przez szczepy *Fusarium sambucinum*. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1997, 30, 79–86.
4. *Josephs R. D., Krška R., Grasserbauer M., Broekaert J. A. C.*: Determination of trichothecene mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection or gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A*. 1998, 795, 297–304.
5. *Kluczek J. P.*: Mikotoksyny w zarysie. Wydawnictwa Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej Bydgoszcz 2000, 120–131.
6. *Kotal F., Holadova K., Hajslova J., Poustka J., Radova Z.*: Determination of trichothecenes in cereals. *J. Chromatogr. A*. 1999, 830, 219–225.
7. *Krška R.*: Performance of modern sample preparation techniques i the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *J. Chromatogr. A*. 1998, 815, 49–57;
8. *Leal M., Gonzalez de Majia E.*: Toxicological and nutritional implications of T-2 toxin. *Food Sci. Technol. Int.* 1997, 3, 241–250.
9. *Lisa M. C., M., Kruger S. C., McAlice B. T., Ramsey C. S., Prioli R., Kohn B.*: Quantification of deoxynivalenol i wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1999, 859, 23–28.
10. *Peraica M.*: Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. WHO* 1999, 77, 754-766.
11. *Razzazi-Fazeli E., Böhm J., Luf W.*: Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography – mass spektrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *J. Chromatogr. A*. 1999, 854, 45–55.
12. *Szczepaniak W.*: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1999, 281–334
13. *Toshitsugu T., Atsushi Y., Shigeto I., Yoshitsugu S., Yoshio U.*: Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spektrometry. *J. Chromatogr. A*. 2000, 882, 23–28.
14. *Won-Bo S., Kim J., Seo J. A., Lee Y.*: Natural occurrence of trichothecenes and zearaenone in Korean and imported beers. *Food. Addit. Contam.* 1997, 14, 1–5.

15. *Yoshiki O, Aoki Y, Tani N, Umabayashi K, Kitada Y, Dohi Y*: Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1998, 815, 59–65.
16. *Zieliński W, Rajcy A*: Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwo Naukowo – Techniczne Warszawa 2000, 436–500.

Otrzymano: 2001.08.01