

Szent István Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

**Mintatisztítási módszerek és kalibrációs
technikák vizsgálata mikotoxinok HPLC-MS
analitikai meghatározásához csiperkegombában
(*Agaricus bisporus*)**

TDK DOLGOZAT

Név: Csuka Noémi

Témavezető: Varga Emese Tanszéki mérnök

Budapest

2018

Tartalomjegyzék	2
RÖVIDÍTÉSEK	3
1. BEVEZETÉS	5
2. CÉLKITŰZÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1. Mikotoxinok jellemzése, jelentősége	7
3.1.1. Aflatoxinok	7
3.1.2. Trichotecének	9
3.1.3. Fumonizinek	11
3.1.4. Zearalenon	12
3.2. Mikotoxinok Európai Unión belüli szabályozása	13
3.3. Mintaelőkészítési lehetőségek	14
3.3.1. Mintatisztítást nem igénylő „dilute and shoot” technika	14
3.3.2. QuEChERS mintatisztítás	15
3.4. Kalibrációs technikák	17
3.4.1. Mátrixra illesztett kalibráció	18
3.4.2. Az izotóphígítás	18
3.5. HLPC-ESI-MS kapcsolt analitikai rendszer bemutatása	20
3.5.1. Elektroszpre ionforrás (ESI)	20
3.5.2. Hármass kvadrupól analízátor	21
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
4.1. Anyagok és berendezések ismertetése	22
4.1.1. Vizsgált mátrix	22
4.1.2. Mintaelőkészítés során alkalmazott eszközök és vegyszerek	22
4.1.3. Mérési összeállítás	24
4.2. Mintaelőkészítési módszerek	25
4.2.1. „Dilute and shoot” technika során alkalmazott mintaelőkészítés	25
4.2.2. Módosított QuEChERS mintaelőkészítés	26
4.3. Alkalmazott kalibrációs technikák	27
4.3.1. Izotóphígítási technika	27
4.3.2. Mátrixra illesztett kalibráció	30
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	31
5.1. Kinyerési hatásfokok értékelése	31
5.2. Izotóphígítási technika és a mátrix illesztett és kalibráció összehasonlítása	37
6. ÖSSZEFOGLALÁS	43
7. IRODALOMJEGYZÉK	45

RÖVIDÍTÉSEK

ACN: acetonitril

AFB₁: aflatoxin B₁

AFB₂: aflatoxin B₂

AFG₁: aflatoxin G₁

AFG₂: aflatoxin G₂

AFM₁: aflatoxin M₁

DON: deoxinivalenol

ESI: Electrospray Ionisation, Elektroszpré ionizáció

FB₁: fumonizin B₁

FB₂: fumonizin B₂

GC: Gas chromatography, Gázkromatográfia

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Nagyhatékonyságú
folyadékkromatográfia

IR: Isotope Ratio, Izotóp arány

ISTD: Internal Standard, Belső sztenderd

JECFA: Joint Expert Comitee for Food Additives, Élelmiszer Adalékanyagok Kódex
Bizottsága

LOD: Limit of Detection, Kimutatási határ

MRL: Maximum Residue Limit, Maximálisan megengedett szennyezettség szint

MRM: Multiple Reaction Monitoring, Kiválasztott ionátmenet követése

MS: Mass Spectrometry, Tömegspektrometria

PMTDI: Provisional Maximum Tolerable Daily Intake, Átmeneti maximálisan elviselhető
napi bevitel

PSA: Primer Secunder Amine, Primer és Szekunder Amin

QuEChERS: Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe, Egyszerű, gyors, alacsony költségű hatékony, robusztus, biztonságos

SIM: Selected Ion Mode, Kiválasztott ion figyelés

SCAN: Scanning, Pásztázás

SPE: Solid Phase Extraction, Szilárd Fázisú Extrakció

T-2: T-2 toxin

UHPLC: Ultra High-Pressure/Performance Liquid Chromatography, Ultranagy nyomású/teljesítőképességű folyadékkromatográfia

ZON: zearalenon

1.BEVEZETÉS

A mikotoxinok egyes fonalas gombafajok extracellulárisan termelt másodlagos anyagcseretermékei. A fő toxintermelő gombanemzetségek az *Aspergillus*, a *Fusarium* és a *Penicillium*. A gombás fertőzésnek leginkább kitett növények az élelmiszerként és takarmányként egyaránt hasznosított gabonafélék. A kontamináció bekövetkezhet aratás előtt, aratáskor, valamint a tárolás során. A nem megfelelő gabonakezelési gyakorlat a szennyezettséget tovább növelheti. Mezőgazdasági szempontból kiemelten fontos mikotoxin csoportok az aflatoxinok, ochratoxinok, trichotecének, zearalenon, fumonizinek, és az ergot alkaloidok. Bizonyos koncentráció felett elfogyasztott mikotoxin mennyiség az embereknél és állatoknál egyaránt toxikus reakciót, úgynevezett mikotoxikózist vált ki. A mérgezés tünetei lehetnek a nemzőképesség csökkenése, súlyvesztés, és az immunrendszer gyengülése, súlyosabb esetben akár halálhoz is vezethet. A mikotoxinok széleskörű elterjedésük és az általuk okozott mérgezés súlyossága miatt globális veszélyt jelentenek, visszaszorításuk és további kutatásuk tehát nagyon fontos szereppel bír a társadalom számára. Kutatásuk során a nehézséget az adja, hogy nagyon kis koncentrációban vannak jelen az élelmiszerben, mely egy bonyolult összetételű hordozó. A HPLC-MS/MS kapcsolt analitikai berendezés megjelenésével jelentősen javultak a mikotoxinokra vonatkozó kimutatási határok a HPLC-UV mérőműszerhez képest, azonban a mátrixhatás továbbra is problémaként lép fel. A zavarás csökkentésének nagyon hatékony, ám rendkívül költséges módja az izotópjelzett belső sztenderdek használata. Bonyolult összetételű minták esetén azonban továbbra is fennálló probléma, hogy a mátrixhatás a belső sztenderd jelét is elnyomja, ezért mintatisztítás oldalról kell megnövelni az analitikai módszer szelektivitását. Dolgozatomban a „dilute and shoot”, valamint egyes lépéseiben módosított QuEChERS mintaelőkészítési eljárás kinyerési hatásfokát vizsgáltam öt mikotoxinnál (DON, T-2, FB₁, AFB₁, és ZON) fehér csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) mátrix esetén, valamint az izotóphígításos technikát és a mátrix illesztett kalibrációt hasonlítottam össze.

2. CÉLKITŰZÉS

Az általam vizsgált fehér csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) termesztéshez táptalajként használt komposzt állati trágya és búzaszalma keveréke, mely potenciálisan mikotoxinnal szennyezett. A toxinos komposzton termesztett csiperkegomba anyagcseréje során felveheti és metabolizálhatja a toxinokat. Ahhoz, hogy ez a felvétel tudományosan megalapozott legyen mindenképpen szükséges egy multi-mikotoxin meghatározásra alkalmas analitikai módszer fejlesztése. A mintaelőkészítés ennek egyik kulcs lépése. Ezért dolgozatomban az alábbi célokat fogalmaztam meg:

- Módosított QuEChERS eljárás kidolgozása DON, T-2, FB₁, AFB₁, és ZON mikotoxin esetén csiperkegomba mátrixra
- „Dilute and shoot” és a módosított QuEChERS mintaelőkészítési módszer kinyerési hatásfokának összevetése DON, T-2, FB₁, AFB₁, és ZON mikotoxinok esetén csiperkegomba mátrixban.
- A mért értékek összehasonlítása az a EU 401/2006/EK „Az élelmiszerek mikotoxin tartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapításáról” szóló rendeletében lévő ajánlásokkal, valamint a Codex Alimentarius "General standard for contaminants and toxins in food and feed" (2015) című kiadványában szereplő ajánlásokkal.
- ISTD és mátrix illesztett kalibráció eredményeinek összehasonlítása DON, T2, FB₁, AFB₁, és ZON mikotoxinok esetén csiperkegomba mátrixra.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Mikotoxinok jellemzése, jelentősége

A mikotoxinok a gombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek mind az emberre, mind pedig az állatokra és a növényekre rendkívül károsan hatnak, különböző megbetegedéseket és gazdasági károkat okozva ezzel. Mezőgazdasági-gazdasági szempontból a legjelentősebb mikotoxin csoportok az aflatoxinok, ochratoxinok, trichotecének, zearalenon, fumonizinek, és az ergot alkaloidok. Egyes penészgombák képesek többféle mikotoxin termelésére és különböző gombafajok képesek ugyanazt a mikotoxint termelni. Amennyiben a haszonnövényt (búza, kukorica, zab stb.) megtámadja a toxintermelő penészgomba, jellemzően többféle mikotoxin együttes előfordulása várható. Az élelmiszer és takarmány mikotoxinnal való szennyezettségét számos környezeti tényező befolyásolja, mint például a hőmérséklet vagy a páratartalom. A mikroklíma paramétereinek szabályozásával a mikotoxinok jelenléte valamelyest kontrollálható. Vannak azonban nem, vagy csak kismértékben befolyásolható tényezők, mint például a makroklíma vagy, hogy adott esetben mely gombafajokkal fertőződik meg a takarmány.

A mikotoxinok jelentős gazdasági károkat okoznak emberi és állati életeket követelve, megnövelve a humán és állategészségügyi ellátás költségeit, csökkentve az állatállomány hozamát, a fertőzött élelmiszer és takarmány kezelését teszik szükségessé, mely szintén jelentős költségeket von maga után. Ezért kiemelkedően fontos a mikotoxinok visszaszorítása, melynek érdekében számos irányelvet dolgoztak ki világszerte, azonban ezek kivitelezése nehezen tud megvalósulni a gyakorlatban (**Hussein & Brasel, 2001**).

3.1.1. Aflatoxinok

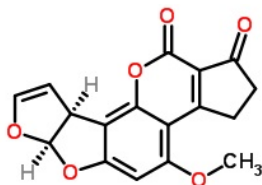
Az aflatoxinok kémiaiilag hőstabil difurán-kumarin származékok. Elsősorban *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* fajok termelik meleg, nedves éghajlat mellett. Az aflatoxin B-t termelő *Aspergillus flavus* a természetben széleskörűen előforduló mikroorganizmus, főként a növények levelein, virágain telepszik meg. A B és G aflatoxint termelő *Aspergillus parasiticus* a termőföldeken fordul elő. Az *Aspergillus* nemzetség egyéb fajai is termelnek aflatoxint, mint például az *Aspergillus nominus*, *Aspergillus pseudotamarii* és az *Aspergillus bombycis* (**Marin et al., 2013**).

A mikotoxinok az aratás előtti és utáni gombás fertőzés következményeként kerülnek a gabonába. A szennyezettség arányát számos tényező befolyásolja, mint a hőmérséklet, páratartalom, vízaktivitás, konkurens mikrobióta jelenléte, fizikai sérülés és egyéb tárolási körülmények (EFSA, 2007). A legtoxikusabb forma az aflatoxin B₁ (AFB₁), mely a májban aflatoxin M₁ toxinná alakul a citokróm P450 enzim segítségével. Ha a nőtény emlősök AFB₁ toxinnal fertőzött élelmet fogyasztanak jelentős mennyiségű 4-hidroxilált metabolit AFM₁ választódik ki a tejbe (Marin *et al.*, 2013). Az aflatoxin B₁ kémiai szerkezete az 1. ábrán látható.

Az aflatoxinok nagyon stabil szerkezetű vegyületek, ezért számos élelmiszeripari feldolgozási eljárással szemben ellenállóak, mint a pörkölés, extrudálás, sütés vagy főzés. Ezen eljárások során nem inaktiválódnak teljes mértékben, így komoly problémát jelentenek feldolgozott élelmiszerek esetén is. Leggyakrabban gabonákban és gabonából készült élelmiszerekben, valamint diófélékben fordulnak elő (Bullerman & Bianchini, 2007).

Toxikológiai szempontból az aflatoxin karcinogén és genotoxikus hatású. Megkülönböztetünk akut és krónikus mérgezést. Akut mérgezés akkor fordul elő, ha az élelmiszer nagy koncentrációban tartalmazza a toxint, ez azonban embereknél nagyon ritkán fordul elő és leginkább a fejlődő országokban élőkre jellemző. 2004-ben Kenyában 317 akut mérgezés esetről számoltak be, köztük 125 halálos kimenetelű volt (Lewis *et al.*, 2005). Az akut mérgezés tünetei a hányás, hasüregi fájdalom, tüdő vagy agy ödéma és nekrosis. További tünetek az anorexia, depresszió, sárgaság, hasmenés és fényérzékenység. Állatok esetében gyakoribb az akut mérgezés. A mérgezés súlyossága különböző tényezőktől függ, mint a faj, kor, nem, dózis, kitettség időtartama. A tünetek ebben az esetben nem specifikusak, nagyban megnehezítve ezzel a diagnózist. Nem specifikus tünetek például a súlyvesztés, kevesebb takarmány fogyasztása, csökkenő tojás-vagy tejhozam és megnövekedett érzékenység egyes betegségekkel szemben (Marin *et al.*, 2013).

Általában a madarak érzékenyebbek az aflatoxinokra, mint az emlősök, az emlősök közül pedig a kérődzők a legellenállóbbak. Emberek esetében az aflatoxinnal szennyezett élelmiszer hosszú távú folyamatos fogyasztása számos megbetegedéshez és súlyos elváltozásokhoz vezet, mint a májrák, nemzőképesség csökkenése, immunrendszer gyengülése vagy az intersticiális tüdőfibrózis (Marin *et al.*, 2013).

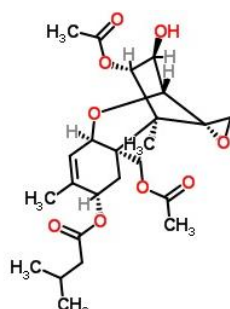


1. ábra Az aflatoxin B₁ kémiai szerkezete (Internet 1)

3.1.2. Trichotecének

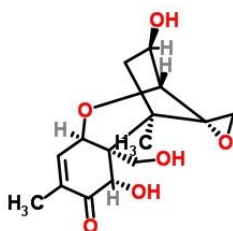
A trichotecén toxinok a *Fusarium* gomba nemzetség által termelt másodlagos anyagcseretermékek. A trichotecén családba több, mint 200 toxin tartozik, melyek szeszkviterpén alapvázal rendelkeznek, és sok esetben tartalmaznak egy makrociklikus észtert vagy észter-éter hidat a 4. és a 15. szénatom között. Toxicitásukért elsősorban a 12,13-epoxi gyűrű és a 9. és 10. szénatom közötti kettős kötés felelős. A trichotecéneket attól függően, hogy az alapvázukhoz milyen funkciós csoportok kapcsolódnak négy csoportba sorolják (A, B, C és D csoport) (Escrivá *et al.*, 2015). A dolgozatomban csak az „A” csoportba tartozó T-2 és a „B” csoportba sorolható deoxinivalenol toxint fogom részletesebben tárgyalni.

A T-2 toxin (2. ábra) többek között a *Fusarium sporotrichioides* és a *Fusarium poae* faj által termelt toxin (Coravelli *et al.*, 2014). Bár a többi trichotecénhez képest ritkábban fordul elő, jelenléte mégis nagy figyelmet kap erős toxicitása miatt. Leggyakrabban a rozsban, kukoricában és szójában fordul elő. A T-2 toxin káros hatása a DNS-, RNS- és a fehérjeszintézis gátlásában nyilvánul meg. A T-2 toxinnal való fertőzöttség tünetei sokféleképpen jelentkezhetnek az állatoknál, mint például súlyvesztés, hányás, hasmenés, letargia, immungyengeség, nekrosis, vörösvérsejt és leukocita szám csökkenése, DNS szerkezetének sérülése (Escrivá *et al.*, 2015).



2. ábra A T-2 toxin kémiai szerkezete (Internet 2)

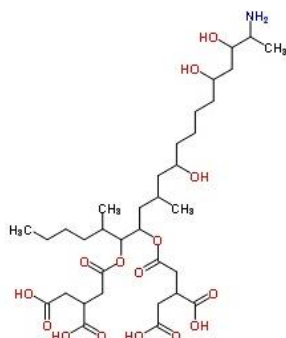
A deoxinivalenol (DON) a legjelentősebb trichotecén, mely minden gabonafélében előfordulhat (3. ábra). Habár a DON toxin nem annyira toxikus, mint a T-2 toxin, mégis sokkal szigorúbb szabályozások vannak érvényben a DON esetén. Ennek oka, hogy sokkal szélesebb körben és nagyobb mennyiségben fordul elő, ennek megfelelően a deoxinivalenol által okozott gazdasági károk is jelentősebbek, valamint az emberek DON toxinnak való kitettsége is nagyobb. A toxinnal szennyezett táplálék fogyasztása bél- immun- és idegrendszeri problémákat okoz. Akut tünetek a hányás, hasi fájdalom, anorexia, fejfájás és szédülés. Az immunrendszerre gyakorolt hatása változatos tünetekkel jár, immunszuppresszió, vagy akár immunstimuláció is felléphet (Escrivá *et al.*, 2015).



3. ábra A deoxinivalenol (DON) toxin kémiai szerkezete (Internet 3)

3.1.3. Fumonizinek

A fumonizinek többek között a *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* és *Fusarium nygamai* gombafajok által termelt nem fluoreszkáló, vízzoldható, poláros vegyületek, melyek leginkább kukoricában és kukoricát tartalmazó élelmiszerekben fordulnak elő. A toxint 1980-ban Dél-Afrikában fedezték fel és állapították meg karcinogén hatását. A fumonizineket négy csoportra oszthatjuk: „A”, „B”, „C” és „P” csoport, legjelentősebb ezek közül a B (B₁, B₂, B₃) csoport (**Ahangarkani et al., 2014**). Ezek a toxinok a propán-1,2,3-trikarboxil savak diészterei, melyek hosszú láncú amino poliol gerinccel rendelkeznek. Legjelentősebb közülük a fumonizin B₁ toxin, előfordulási gyakorisága és toxicitása miatt (**Escrivá et al., 2015**). A toxin alkoholos hidroxil csoportjai a szfingozin aminoalkoholos komplexéhez hasonló tulajdonságúak, így képesek megzavarni a szvingozin szintézist és leukoencephalomaláciát, máj nekrozist, és halált okozni lovak esetén (**Ahangarkani et al., 2014**). A fumonizinek toxicitása széleskörű, állatokra és emberre nézve egyaránt neurotoxikus, citotoxikus és májkárosító hatásuk van. A tisztított FB₁ toxin képes volt máj- és veserákot okozni rágcsálókön végzett kísérlet során. Wang és társai (**2015**) Heidelbergben végzett kutatásuk során arra a megállapításra jutottak, hogy a fumonizinek oxidatív stressz generáló hatása jelentős szerepet játszik a toxicitásukban. Komoly problémát jelent továbbá az úgynevezett maszkolt forma jelenléte, mely a gabona toxin elleni védekezése során keletkezik. Ekkor a növény a leggyakrabban cukor molekulát kapcsol a natív toxinra, növelve ezzel a veszélyes anyag polaritását. Ezen konjugátumok a gyomorban képesek lehetnek hidrolizálni, növelve a toxikus hatást. (**Ahangarkani et al., 2014**). Ezzel ellentétben a sertések vakbelében jelenlevő mikrobióta képes metabolizálni a fumonizineket (**Wang et al., 2015**). A tortilla készítés során alkalmazott lúgos főzés, melyet kalcium-hidroxiddal végeznek a kukorica maghéj puhítására, szintén nagymértékben képes átalakítani a FB₁-et HFB₁ metabolittá, csökkentve ezzel a toxikus hatást. (**Dombrink-Kurtzman et al., 2000**). A FB₁ toxin kémiai szerkezete a 4. ábrán látható.

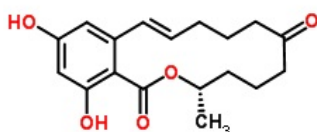


4. ábra A FB₁ toxin kémiai szerkezete (**Internet 4**)

3.1.4. Zearalenon

A zearalenon (ZON) kémiai szerkezetét tekintve rezocilsav lakton (5. ábra). 1965-ben izolálták elsőként Minnesotában egy patkány méhéből (**Christensen et al., 1965**). A *Fusarium* nemzetség sok faja termeli, köztük a *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* és a *F. sambucinum* (**Kachalek et al., 2017**). Számos tanulmány szerint a zearalenonnal fertőzött gabonában más toxinok is kimutathatóak, leggyakrabban a szintén *Fusarium* nemzetség által termelt fumonizinek és a DON toxin. Ezeknek feltehetően szinergens hatása van egymásra. A zearalenon a DON toxin után a leggyakrabban előforduló természetes szennyező kukorica esetében, más gabonában azonban ritkán található meg (**Escrivá et al., 2015**). Habár a toxin *Fusarium*-mal fertőzött gabonában képes felhalmozódni aratás előtt, számos tapasztalat van arra vonatkozólag, hogy mennyisége a nem megfelelő tárolás következtében is feldúsulhat a kukoricában (**Zinedine et al., 2007**). A ZON toxin az ösztrogén hormonhoz való hasonlósága miatt antagonistá módon kötődik az ösztrogén receptorokhoz, károsan befolyásolva ezzel a reprodukciós képességeket. (**Kachalek et al., 2017**). Nagy mennyiségű toxin elfogyasztása késleltetett fejlődést, álivarzást, a petefészek formájának megváltozását, illetve folytonos vetélést okoz. Az állatok érzékenysége zearalenon toxinnal szemben különböző, a leginkább érzékeny faj a sertés. A reprodukciós képességek csökkentése mellett citotoxikus és genotoxikus hatását is megállapították (**Su et al., 2018**). Su és társai (**2018**) figyelemreméltó tanulmányukban arról számolnak be, miszerint a C-vitamin képes detoxifikálni a zearalenont sertések esetében. A kísérletet 32 nőstény sertésen végezték el, melynek során megállapították, hogy a C-vitamin képes jelentősen csökkenteni a ZON toxin által indukált reprodukciós toxicitást és vér toxicitást, emellett egyensúlyban tartja az immunoglobulin szintet és a hormonszintet.

A C-vitaminnal kezelt takarmány és élelmiszerek esetében a toxin mennyisége jelentősen csökkent.. Gao és társai (2013) a toxin emberi magzat veséjéből származó sejtekre való hatását tanulmányozta. A vizsgálat során megállapították, hogy a zearalenon toxinnak DNS károsító hatása a lizoszóma membrán stabilitásának megszűnésével van összefüggésben, a pontos hatásmechanizmusa azonban még nem tisztázott. A toxin emberre gyakorolt hatását vizsgálva megállapították, hogy a ZON már nagyon kis koncentrációban is növeli a sejtburjánzást és sejtváándorlást az emberi HTC 116 karcinóma sejtvonalon, amely karcinogén hatását igazolja (Abassi *et al.*, 2016).



5. ábra A Zearalenon kémiai szerkezete (Internet 5)

3.2. Mikotoxinok Európai Unión belüli szabályozása

A mikotoxinokra vonatkozó MRL értéket az Európai Bizottság 1881/2006/EK rendelete határozza meg különböző mátrixok esetén. A felső határértékeket olyan szigorú szinten kell meghatározni, amely a helyes mezőgazdasági, halászati és előállítási gyakorlatok alkalmazásával és az élelmiszer fogyasztásához kapcsolódó kockázatok figyelembevételével ésszerűen elérhető. Az általam vizsgált mikotoxinokra vonatkozó határértékeket az 1. Táblázat tartalmazza. Gombák esetén még nincsen határérték, így a mikotoxinokkal leginkább szennyezett gabonafélékre vonatkozó értékeket tüntettem fel, melyek a gombatermesztésnél táptalajként használt komposzt alapanyagai. Mivel T-2 toxin esetén nem ír elő határértéket a rendelet, így ennél a toxinnál a JEFCA által előírt PMTDI értéket tüntettem fel.

1. Táblázat Mikotoxinok MRL értéke

*¹: JEFCA által előírt PMTDI érték

Toxin	Élelmiszer	MRL érték (µg/kg)
aflatoxin B₁, B₂, G₁ és G₂ összesen	gabonafélék	4
aflatoxin B₁		2
T-2	* ¹	0.06
Deoxinivalenol	kukorica	1750
	egyéb gabona	1250
Fumonizin B₁ és B₂ összesen	feldolgozatlan kukorica	4000
Zearalenon	feldolgozatlan gabonafélék	100
	feldolgozatlan kukorica	350

3.3. Mintaelőkészítési lehetőségek

A HPLC-MS/MS készülékek érzékenységének köszönhetően lehetőség nyílik a mintában kis koncentrációban jelenlévő célkomponens meghatározására, ám a mátrixhatás problémájával itt is számolni kell. A zavarás rendkívül sokrétű lehet a célkomponenstől, a meghatározás során alkalmazott módszertől és az ionforrástól függően. A mátrixalkotók a célkomponenssel együtt koeluálódva interferenciát okoznak az ionizáció során, mellyel jelentősen befolyásolják a mért eredményeket (Fang *et al.*, 2014).

A bonyolult összetételű mintamátrixban lévő szennyezőanyagok általában nagyon kis koncentrációban vannak jelen, ezért elengedhetetlen a mérést megelőző mintatisztítási és előzetes dúsítási lépés (Andrade-Eiroa *et al.*, 2015).

3.3.1. Mintatisztítást nem igénylő „dilute and shoot” technika

A hármas kvadrupol technikában végzett jelentős fejlesztéseknek köszönhetően a készülékek gyorsabbak és érzékenyebbek lettek. A kimutatási határok nagyságrendekkel történő csökkentésével lehetőség nyílt mintatisztítási lépést nem igénylő módszerek kidolgozására. A minta extrakcióját, majd további hígítását („dilute”) követően a mintát fecskendőszűrővel szűrjük és injektáljuk (shoot) az LC-MS/MS készülékbe.

A „dilute and shoot” módszerek akkor alkalmazhatók, ha magas határértékű célkomponensről van szó, vagy ha a készülék érzékenysége miatt lehetőség van a kis koncentrációban jelenlevő célkomponens további hígítására. A minta hígulása következtében a mátrixalkotók koncentrációja is csökken, redukálva ezzel az ionforrásban létrejövő mátrixhatást. A mátrixhatás tovább kompenzálható izotóphígítást vagy mátrix-illesztett kalibrációt alkalmazva, így egy gyors és megbízható módszert kapunk, ám az izotópjelölt sztenderdek jelentősen megnövelik a költségeket, valamint mátrix-illesztett kalibrációnál sok esetben nem érhető el vak mátrix. Az eljárás előnye a gyorsaság és a minimális anyagigény. Mivel nincs szükség extrakciós tisztításra (SPE), így az egymástól fizikai-kémiai tulajdonságban (polaritásban vagy savas-bázikus jellegben) különböző célvegyületek is mérhetők egymás mellett az egyszeri szilárd-folyadék extrakció után (**Tölgyesi & Fekete, 2017**). Hickert és társai (**2015**) 26 mikotoxin egyidejű meghatározását végezték kukorica mintában micro HPLC-MS/MS mérőberendezéssel. A mintaelőkészítés egy acetonitriles extrakcióból állt, melyet nem követett további mintatisztítási lépés. Az alkalmazott módszerrel 51-120%-os kinyerési hatásfokot értek el, kivéve tentoxin esetében, ahol a 160%-os kinyerési érték a mátrix ionerősítő hatásának következménye volt. Franco és kutatócsapata (**2018**) 9 mikotoxin (aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂, fumonizin B₁ és B₂, ochratoxin A, zearalenon és deoxinivalenol) multi-mikotoxinos analízisét végezte kukoricaliszt, búzaliszt, rizs és bab mátrixban HPLC-MS/MS készülékkel, „dilute and shoot” módszert alkalmazva. Kutatásuk során 93-110%-os kinyerési hatásfokot értek el.

3.3.2. QuEChERS mintatisztítás

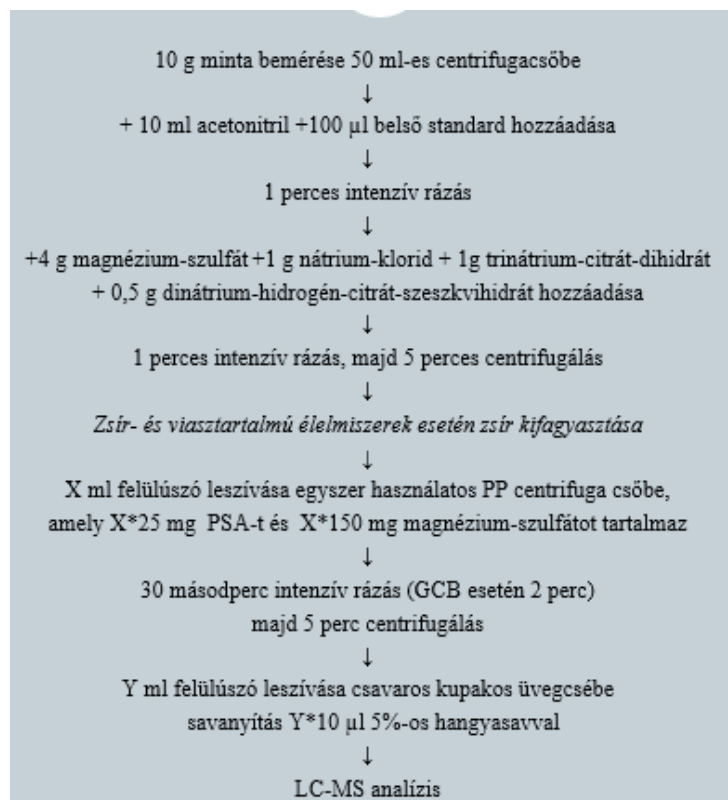
A QuEChERS mintatisztítási eljárást Anastassiades és társai publikálták először hatalmas áttörést elérve ezzel a szermaradék analitikában. A módszer egy acetonitriles extrakcióból áll, amit egy kisózási lépés követ, végül pedig egy d-SPE tisztítási lépést alkalmaznak. A diszperzív SPE PSA töltettel hatékonyan távolítja el a poláros mátrix komponenseket, így a szerves savakat, poláros pigmenteket, cukrokat, és egyéb élelmiszeralkotókat (**Anastassiades et al., 2003**). A QuEChERS-t eredetileg növények peszticid tartalmának meghatározására fejlesztették ki, azonban a módszer hatékonyan alkalmazható egyéb szennyezőanyagok esetén is, mint a mikotoxinok és a poliaromás szénhidrogének (**González-Curbelo et al., 2015**).

A mozaikszó a „quick”, „easy”, „cheap”, „effective”, „rugged”, „safe” szavakból áll, amely a módszer egyszerűségére, gyors kivitelezhetőségére, alacsony költségigényére, hatékonyságára, robusztus és biztonságos végrehajtására utal, mely tulajdonságai miatt széleskörűen elterjedt és rutinanalitikai eljárásnak számít a laboratóriumokban (**González-Curbelo *et al.*, 2015**).

Az MSZ EN 15662:2008 szabvány rendelkezik a növényi eredetű élelmiszerekben előforduló peszticid szermaradékok acetonnitriles extrakcióját és diszperziós SPE tisztítását követő meghatározásáról GC-MS és/vagy LC-MS mérőműszerrel. A szabványban leírt QuEChERS módszer sematikus leírása a 6. ábrán látható. A szabványban szereplő lépések paramétereit változtatva lehetőség nyílik a módszer alkalmazására egyéb célkomponensek és változó mátrixok esetén. Mikotoxinok analízisének a mátrix főként gabona, melyeknek víztartalma igen alacsony, így szükséges a tisztítást megelőzően vizet adni a mintához (**Cuncha & Fernandes, 2009; Kleigrew *et al.*, 2011; Koesukwiwat *et al.*, 2013**). Rasmussen és társai (**2010**) 27 mikotoxin meghatározását végezte LC-MS/MS készülékkel kukoricasilóból származó minták esetén. A mintákat folyékony nitrogénnel fagyasztották, majd keverőgéppel homogenizálták a módosított QuEChERS eljárás előtt. Az első extrakciós lépésnél ecetsavval savanyított acetonnitril-víz 2:1 arányú elegyét használták a célkomponensek kinyerésére. A kisézési lépésnél nátrium-acetát-trihidrátot alkalmaztak, majd 1-2 perces rázást követően vízmentes MgSO_4 -t adtak a mintához a fázis szétválás érdekében. Huszonhét mikotoxinból tizenkilencet kvantitatívan azonosítottak, nyolc esetében kvalitatív meghatározás történt 37-201% -ig terjedő kinyerési százalékokkal és 1-739 $\mu\text{g/kg}$ -ig terjedő LOD értékekkel.

Koesukwiwat és kutatócsapata (**2014**) által módosított QuEChERS eljárásban az első extrakciós lépésben az acetonnitril-víz 1:1 arányú elegyhez 10%-os hangyasavat adtak a pH stabilizálása érdekében, majd egy órán keresztül homogenizálták a mintát. A kisézési lépést követő szilárd fázisú extrakcióhoz MgSO_4 , C_{18} , neutrális alumina és PSA keveréket adtak a mintához. Az így elkészített leszűrt mintát UHPLC-MS/MS mérőműszerrel vizsgálták. A módszerüket 14 mikotoxinra validálták rizs mátrix esetén.

A QuEChERS alkalmazása multi-mikotoxin meghatározás esetén széleskörűen kutatott, de további vizsgálatokat igényel annak felderítése, hogy milyen hatékonysággal csökkenti a mátrixalkotók interferenciáját (**Wang *et al.*, 2015**).



6. ábra Az MSZ EN 15662:2008 szabványban meghatározott tisztítási lépések QuEChERS esetén

3.4. Kalibrációs technikák

A mennyiségi meghatározás alapja a kalibráció. A tandem tömegspektrometriás eljárás legtöbb esetben alkalmas a célkomponens szelektív meghatározására, de kvantitatív meghatározás során figyelembe kell vennünk a minták összetettségét és az ebből adódó mátrixhatást. A mátrixhatás kompenzálására háromféle kalibrációs technikát alkalmazhatunk mikotoxinok meghatározása esetén. A sztenderd addíció során a tesztmintát dúsítjuk a célvegyület meghatározott mennyiségével és a válaszjel növekedéséből következtetünk a célkomponens koncentrációjára a tesztmintában (Tölgyesi & Fekete, 2017). Dolgozatomban a mátrix illesztett kalibrációs eljárást és az izotóphígításos technikát hasonlítom össze, ezért ezeket a következő pontokban részletezem.

3.4.1. Mátrixra illesztett kalibráció

A mátrixhatás kompenzálásának költséghatékony módja a mátrixra illesztett kalibráció. Az eljárás során az extrahált és tisztított vak minták extraktumait adalékoljuk előre meghatározott kalibrációs szintekre és ezeket használjuk a kalibrációhoz. A vak minták mátrixa minőségileg és mennyiségileg is megegyezik a célkomponenst tartalmazó tesztminta mátrixával. Feltételezzük, hogy a kalibrációs mintákban lévő mátrixhatás azonos a tesztmintában lévő mátrixhatással a megegyező háttér miatt. Ennek következményeként ugyanolyan irányú és mértékű mátrixhatás lép fel a kalibrációs mintákban, mint a tesztmintákban, így a mátrixhatás kompenzálódik. Mikotoxinok esetén probléma lehet a vak minta hiánya vagy körülményes és költséges beszerezhetősége (pl. gabona esetén DON szennyezettség mindig előfordul). Ez nagyban megnehezíti a mátrixból felvett kalibrációnál az értékelést, különösen kis koncentrációk meghatározásánál (**Tölgyesi & Fekete, 2017**). Ennek ellenére számos szakirodalmi példát láthatunk mátrix-illesztett kalibráció használatára. Frenich és társai (**2011**) 10 mikotoxin egyidejű meghatározását végezte tojás mintákban UHPLC-MS/MS rendszerrel. A tojás minta összetettsége miatt a mintaelőkészítés során QuEChERS mintatisztítási lépést alkalmaztak, a mennyiségi meghatározáshoz mátrix illesztett kalibrációt használtak. Módszerük kinyerési hatásfoka 70-110% között volt. Koesukwiwat és társai (**2014**) szintén mátrix illesztett kalibrációs technikát alkalmazott 14 mikotoxin egyidejű meghatározásához rizs mátrixban. Az alkalmazott mérőberendezés UHPLC-MS/MS volt. A módszerrel 70-98%-os kinyerési hatásfokot értek el.

3.4.2. Az izotóphígítás

A mátrixhatás legeredményesebb kompenzálása izotóphígítással érhető el. Az izotóp görög eredetű szó, az izosz=egyenlő és a toposz=hely szavakból áll. Jelentése a periódusos rendszer azonos helyén álló ugyanazon kémiai elem nuklidjaira utal. Olyan nuklidokra, melyek rendszáma (protonszáma) megegyezik, de az atommag eltérő számú neutronokat tartalmaz, ezáltal tömegük különbözik (**Üveges, 2008**). Az izotóphígítás során a célvegyület stabil izotópjelzett változatát belső sztenderdként adjuk a mintához (ISTD). A belső sztenderd fizikai-kémiai tulajdonságai megegyeznek a meghatározni kívánt komponens tulajdonságaival, így optimális esetben azonos retenciós időben eluálódnak.

Ennek következtében a célkomponenst és belső sztenderdjét ugyanaz a mátrixhatás éri az ionforrásban, így a célvegyület és az ISTD válaszjelének (területének) aránya - izotóp arány (IR) - független lesz a mátrixhatástól. Az ISTD válaszjelének aránya nem okoz interferenciát a célkomponens jelén, mert az izotópjelzés miatt más m/z értéken kerül detektálásra. A mátrixhatás ellensúlyozásának fokozott jelentősége van kis koncentrációban jelenlevő célkomponensek és bonyolult összetételű minta esetén. A gyakorlatban alkalmazott izotópok például a ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O . A deuterált (^2H) ISTD-k hátránya, hogy a hidrogén-deutérium csere következtében a vegyület polaritása megváltozik, így a deuterált ISTD-k retenciója ($^2\text{H}>3$ esetén) fordított fázisú elválasztásnál olykor még másodperc pontossággal sem esik egybe a célvegyület retenciós idejével, így nem azonos a mátrixhatás iránya és mértéke a célvegyületre és annak jelzett analógjára nézve. Emiatt a deutérium jelzett ISTD-k helyett inkább a ^{13}C jelzésűek preferáltak, ezek azonban nagyon költségesek **(Tölgyesi & Fekete, 2017)**.

Häubl és társai **(2007)** ^{13}C izotópjelzett T-2 toxint használtak a T-2 toxin meghatározásához kukoricában és zabban. Módszerük során mintatisztítási lépést nem alkalmaztak, az analízist HPLC-MS/MS mérőműszerrel végezték. Az izotópjelzett belső sztenderd megfelelő volt a toxin mennyiségi meghatározásához. A mátrix mindkét minta esetén erős ionerősítést okozott, mely túl magas kinyerési százalékokat (139% zab és 146% kukorica esetében) eredményezett. Az ISDT használatával ezt hatékonyan kompenzálták, így 99%-ot értek el zab esetében és 100%-ot kukoricánál.

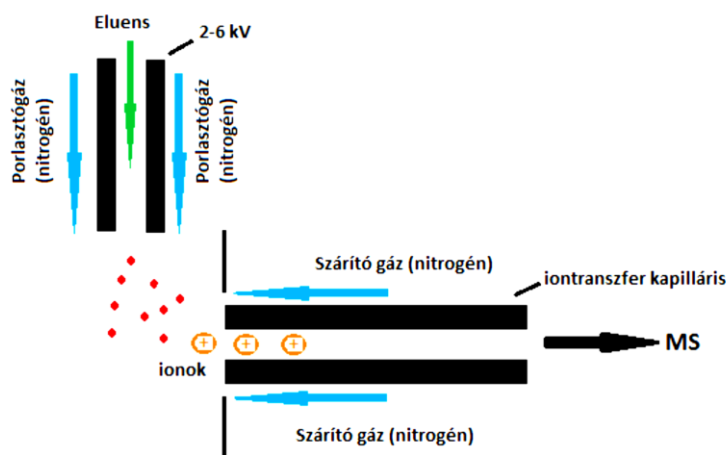
Varga és kutatócsapata **(2012)** 11 mikotoxin egyidejű meghatározását végezte kukoricában. A mennyiségi meghatározáshoz ^{13}C izotópjelzett belső sztenderdeket használtak, a mérést UHPLC-MS/MS berendezéssel végezték. A látszólagos kinyerési határfok 88-105% között volt az erős mátrixhatás miatt. A ^{13}C izotópjelzett belső sztenderddel kompenzált kinyerési határfokok 97-111% közé estek.

3.5. HPLC-ESI-MS kapcsolt analitikai rendszer bemutatása

A folyadékkromatográfiás-tömegspektrometriai módszerek rutin analitikai eljárás részét képezik olyan összetett minták elemzésénél, mint például az élelmiszerek. A folyadékkromatográfia biztosítja a célkomponensek elválasztását, míg a tömegspektrométer a célvegyületeket tömeg/töltés (m/z) alapján különíti el a vele együtt koeluálódó mátrix alkotóktól gázfázisban (Tölgyesi & Fekete, 2017).

3.5.1. Elektroszpre ionforrás (ESI)

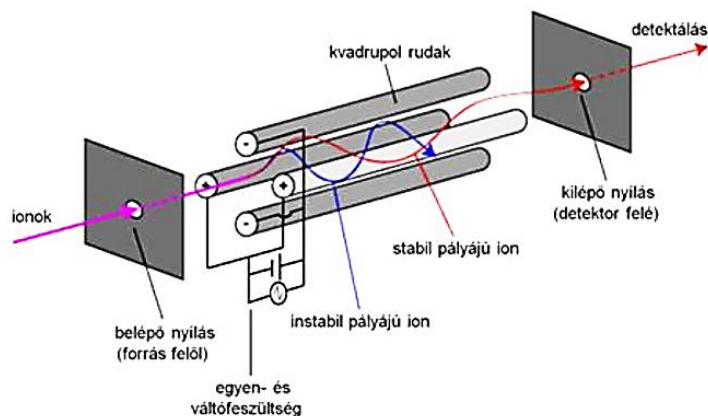
LC-MS technika esetén a komponensek eltérő halmazállapotban és különböző nyomáson történik a molekulák szeparációja, ezért a kapcsoláshoz elengedhetetlen az úgynevezett interfészek (kapcsolóelemek) használata. A legelterjedtebb atmoszférikus nyomáson működő kapcsolóelem az elektroszpre ionforrás (ESI), sematikus felépítése a 7. ábrán látható. A folyadékkromatográfból áramló mozgófázist egy fém kapillárisba vezetik. A feszültség miatt a kapilláris végén úgynevezett Taylor-kónusz alakul ki, ahol a folyadék töltést vesz fel és nitrogén porlasztógáz segítségével porlasztódik, így módon töltéssel rendelkező folyadékcseppek jönnek létre. A párolgás hatására a cseppek töltéssűrűsége folyamatosan növekszik, amíg a kohéziós erőket meghaladják a Coulomb erők, Coulomb robbanás következtében a folyadékcsepp ionokra esik szét és gázhalmazállapotban halad az analizátor irányába (Tölgyesi & Fekete, 2017).



7. ábra Az ESI ionforrás sematikus felépítése (Tölgyesi & Fekete, 2017)

3.5.2. Hármaskvadrupol analízátor

A kvadrupol analízátor felépítése a 8. ábrán látható. A kvadrupol tér frekvenciája úgy változik, hogy csak az az ion legyen képes a térrészben áthaladni, melynek saját frekvenciája megegyezik a tér pillanatnyi frekvenciájával. Az analízátort különböző üzemmódokban lehet működtetni. SCAN (pásztázó) üzemmód esetén csak egy bizonyos m/z tartományt enged át a kvadrupol. SIM üzemmód esetén a kvadrupol tér csak adott tömeg/töltésű (m/z) molekulát enged át. Ez utóbbit hívjuk kiválasztott ion figyelésnek. Hármaskvadrupol detektor esetén a két kvadrupol (Q1 és Q3) analízátor között ütközési cella helyezkedik el (Q2), ahol a célkomponens fragmentálódik. Lágy ionizációt követően az első kvadrupol kiszűri a célkomponens anyaiionját (prekursorion), majd az ütközési cellában ütközési energia hatására fragmentálódik és tovább halad a második kvadrupol analízátor irányába. Itt a keletkezett fragmentum ionok (leányionok) elválnak az izobár mátrix fragmentumaitól m/z értékük alapján. MRM (multiple reaction monitoring) módban alkalmazva a hármaskvadrupolt az első kvadrupol a prekursor iont szűri SIM módban, míg a második kvadrupol- szintén SIM módban- a kiválasztott leányionokat engedi tovább a fotoelektron-sokszorozó detektor felé. Egy komponenst egy anyaiionnal és két leányionnal (ionátmenettel) jellemzünk (Tölgyesi & Fekete, 2017).



8. ábra A kvadrupol felépítése (Tölgyesi & Fekete, 2017)

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

TDK dolgozatomat a Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Karának Alkalmazott Kémia tanszékén készítettem. A tanszéken folyó mikotoxinok HPLC-ESI-MS/MS-el történő meghatározásának módszerfejlesztésében vettem részt, melynek során 5 mikotoxin - DON, ZON, AFB₁, FB₁, T-2 - egyidejű meghatározásához különböző mintatisztítási módszerek hatékonyságát vizsgáltuk eltérő mátrixok esetén. Méréseim alapját az Alkalmazott Kémia Tanszéken kidolgozott multi-mikotoxin mérési módszer szolgálta.

4.1 Anyagok és berendezések ismertetése

4.1.1. *Vizsgált mátrix*

Dolgozatomban a helyi piacról beszerzett fehér csiperkegombát (*Agaricus bisporus*) vizsgáltam, melynek termesztéséhez használt komposztot állati trágya és búzaszalma keverékéből állítják elő. Amennyiben a komposzt szennyezett búzából készült, az azon termesztett gombában is megjelenhetnek a káros anyagok. Ennek a vizsgálatnak első lépése egy hatékony méréstechnikai módszer kidolgozása gomba mátrix esetén, melynek fontos része a mintaelőkészítés kidolgozása.

4.1.2. *Mintaelőkészítés során alkalmazott eszközök és vegyszerek*

Mintaelőkészítés során az alábbi eszközöket használtam:

- Rázógép-Table Shaker
- Falkon típusú centrifugacsövek (15 ml; 50 ml) -VWR
- 5,0 ml-es mérőlombik, 10,0 ml-es mérőlombik
- Automata pipetta -Biohit
- Centrifuga – Hermle Z206-Dialab
- Barna üvegcsé (1,5 ml) - VWR
- Analitikai mérleg
- Nitrogénes bepárló berendezés

Munkám során a következő vegyszereket alkalmaztam:

- Ioncserélt víz (18MΩcm)- MilliQ Merck-Millipore
- MgSO₄ (99%)-VWR szállította (Radnor, PA, USA)
- Puffersó mix (NaCl, trinátrium-citrát, dinátrium-citrát)
- Acetonitril (super gradient grade)-VWR
- Ecetsav (99-100%)-Scharlau (Barcelona, Spanyolország)
- Hangyasav (~ 98%, MS használatra)-Sigma Aldrich
- Ammónium-acetát (>99%)-Sigma Aldrich

A HPLC eluensek összetétele a következő volt:

„A” eluens: 5 mM ammónium-acetát, 0,1% hangyasav vízben oldva

„B” eluens: 5 mM ammónium-acetát, 0,1% hangyasav metilalkoholban oldva

4.1.3. Mérési összeállítás

Az általam használt mérőberendezés a 9. ábrán látható. A felépítése a következő volt:

HPLC:

A méréseim során használt HPLC mérőműszer egységeit a 2. Táblázatban ismertetem.

2. Táblázat A HPLC berendezés egységei

Gáztalanító egység	Agilent 1100 Series Degasser
Pumpa	Agilent 1200 Series Bin Pump SL
Mintaadagoló	Agilent 1200 Series Autosampler
Fűthető egység	Agilent 1100 Series Colcom
Oszlop	Agilent zorbax xdb-C18 2,1 x 50 mm, 3,5 µm

A kromatográfiás kondíciók:

A kromatográfiás paraméterek a 3. Táblázatban szerepelnek.

3. Táblázat Kromatográfiás kondíciók

Injektálási térfogat	10 µl
Kolonna hőmérséklet	40 °C
Áramlási sebesség	400 µl/perc

ESI-MS/MS:

- QTRAP LC-MS/MS 3200 Sciex System



9. ábra A HPLC-MS/MS mérőműszer

4.2. Mintaelőkészítési módszerek

4.2.1. „Dilute and shoot” technika során alkalmazott mintaelőkészítés

A toxinanalitikában nagy problémát okoz a minták inhomogenitása, ezért ennek kiküszöbölésére a gombákat előzetesen liofilizáltam. A liofilizált mintákat alacsony nedvességtartalma miatt a mintaelőkészítést megelőző napon vízzel nedvesítettem. Ehhez ismert mennyiségű toxin sztenderd keveréket adtam két koncentrációs szinten: az első mintához 180 μ l sztenderd oldatot adtam, a második mintához 650 μ l-t. A mintához 10,0 ml Acetonitril:MiliQ víz: hangyasav elegyét adtam 79:20:1 arányban, majd 1 órára a rázógépre helyeztem. A rázatást 5 perces centrifugálás követett 6000 fordulat/perc fordulatszámom. A felülúszóból 500 μ l-t pipettáztam át barna üvegcsékbe, ehhez izotóphígítási technika esetén 25 μ l belső sztenderd oldatot adtam majd nitrogén gáz alatt bepároltam. Mátrix illesztett kalibrációt alkalmazva nem adtam belső sztenderdet a mintáimhoz. A bepárolt mintát először 250 μ l B eluensben oldottam fel, majd ezt követően 250 μ l A eluensben oldottam.

Az eluensek hozzáadását követően első esetben 15 másodpercig, második esetben pedig 5 másodpercig kevertem a mintát a teljes oldódás érdekében. Ezután 0,22 μm pórus átmérőjű PTFE szűrőn átszűrtem a mintáimat.

4.2.2. Módosított QuEChERS mintaelőkészítés

A QuEChERS módszert az MSZ EN 15662:2009 szabvány szerint végeztem, egyes pontjaitól azonban eltértem. A liofilizált mintát az előkészítést megelőző napon vízzel nedvesítettem centrifuga csőben. Az eljárás során 0,5 g liofilizált mintához 7,5 ml vizet adtam. A nedvesített mintához ismert mennyiségű toxin sztenderd keveréket adtam két koncentrációs szinten: Az első mintához 180 μl sztenderd oldatot adtam, a második mintához 650 μl -t. Az adalékolt mintát egy éjszakára fagyasztozóba raktam. A mintához 10,0 ml acetonitrilt pipettáztam, majd kézzel erőteljesen ráztam 1 percen keresztül. Ezután történt a 4 g vízmentes magnézium-szulfát és a sókeverék (MIX: 1 g nátrium-klorid, 1 g trinátrium-citrát, 0,5 g dinátrium-citrát) hozzáadása az oldatokhoz. Ezt követte a centrifugacsövek erőteljes rázása kézzel egy percen keresztül, majd 5 perces centrifugálás 6000 percenkénti fordulatszámon. A felülúszóból 6 ml-t szívtam le, ennek megfelelően 900 mg magnézium-szulfátot adtam hozzá, ezután 30 másodpercig intenzíven ráztam és 5 percet centrifugáltam. Az oldatokból 500 μl -t pipettáztam át barna üvegcsékbe, ehhez izotóphígítási technika esetén 25 μl belső sztenderd oldatot adtam majd nitrogén gáz alatt bepároltam. Mátrix illesztett kalibrációt alkalmazva nem adtam belső sztenderdet a mintáimhoz. A bepárolt mintához 250 μl B eluenst adtam majd 15 másodpercig kevertem. Ezután 250 μl A eluenst adtam hozzá és 5 másodpercig kevertem. 0,22 μm átmérőjű PTFE szűrőn átszűrtem az oldatokat használtam fel a műszeres analízishez. A 4. Táblázatban szemléltetem az eltéréseket a szabványban leírt módszerhez képest. A dolgozatomban alkalmazott mintaelőkészítés a 10. ábrán látható.

4. Táblázat Az alkalmazott MSZ EN 15662 szabvány módosításai

Eltérő pontok	Szabványban meghatározott Quechers	Módosított Quechers
belső standard hozzáadása	a tisztítási lépés elején 100 µl	tisztítás végén 25 µl
minta tömege	10 g	0,5 g (előzetes nedvesítés 7,5 ml vízzel)
tisztítási lépés	MgSO ₄ és PSA hozzáadása	MgSO ₄ hozzáadása
savanyítás	5%-os hangyasavval	kihagyott lépés



10. ábra Mintaelőkészítés

4.3. Alkalmazott kalibrációs technikák

TDK munkám során az izotóphígításos technikával, valamint a mátrix illesztett kalibrációs technikával dolgoztam.

4.3.1. Izotóphígításos technika

A méréseimhez a Römer Labs Kft. által forgalmazott nagy tisztaságú (>99%) mikotoxin sztenderd keveréket használtam. A nem izotópjelzett sztenderdek koncentrációit az 5. Táblázatban, míg az izotópjelzett sztenderdek koncentrációit a 6. Táblázatban tüntetem fel.

5. Táblázat Nem izotópjelezett sztenderdek

toxin	koncentráció (mg/l)	Oldószer	Térfogat
DON	100,1	Acetonitril	5,0 ml
T-2	10,0		
ZON	30,3		
AFB ₁	1,05		
FB ₁	50,2		

6. Táblázat Izotópjelezett (¹³C) sztenderdek

toxin	koncentráció (mg/l)	Oldószer	Térfogat
DON	10,0	Acetonitril	1,2 ml
T-2	1,0		
ZON	3,0		
AFB ₁	0,5		
FB ₁	5,0		

Az egyes toxinokból különböző térfogatokat mértem be 5,0 ml-es mérőlombikba, majd acetonitril:víz:hangyasav 75:25:0,1 (V/V/V%) arányú elegyével jelre töltöttem (7. Táblázat).

7. Táblázat Törzsoldat

toxin	5 ml-hez bemért térfogat	kapott koncentráció (mg/l)
DON	300 µl	6,0
T-2		0,60
ZON		1,8
AFB ₁	180 µl	0,038
FB ₁	675 µl	6,8

A törzsoldatból 660 µl-t pipettáztam 10,0 ml-es analitikai lombikba, majd jelre töltöttem acetonitril:víz:hangyasav 75:25:0,1 arányú keverékével a munkaoldat elkészítéséhez (8. Táblázat).

8. Táblázat Munkaoldat

toxin	10,0 ml-hez bemért térfogat	kapott koncentráció (µg/l)
DON	660 µl sztenderd mix	396,0
T-2		39,60
ZON		120,1
AFB ₁		2,508
FB ₁		447,5

A munkaoldatból öt különböző térfogatot mértem be a kalibrációs egyenes felvételéhez. Az így kapott koncentrációk a 9. Táblázatban láthatók. Az izotópjelzett belső sztenderd keverékből mindegyik taghoz 25 µl oldatot adtam.

9. Táblázat Kalibrációs pontok izotóphígítási technika esetén

Kalibrációs pont	Munkaoldat(µl)	ng/ml (az analitikai mintában)				
		DON	T2	AFB ₁	FB ₁	ZON
1.	20	15,84	1,584	0,1003	17,90	4,804
2.	230	182,2	18,22	1,154	205,9	55,25
3.	440	348,5	34,85	2,207	393,8	105,7
4.	650	514,8	51,48	3,260	581,8	156,1
5.	860	681,1	68,11	4,314	769,7	206,6

4.3.2. Mátrixra illesztett kalibráció

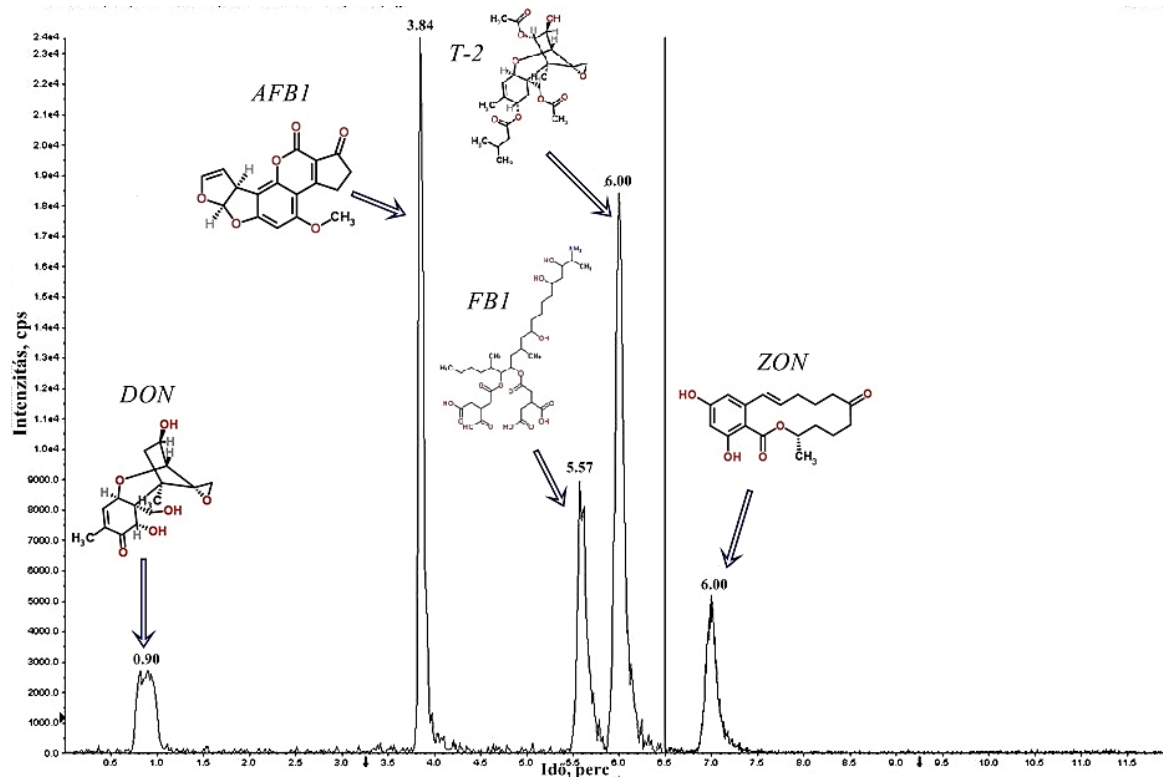
Mátrix illesztett kalibráció esetén fontos, hogy a kalibrációs pontok ugyanakkora mátrixhatással legyenek terheltek, mint maga a tesztminta, ezért a tesztmintával megegyező térfogatot, 500 µl-t mértem be a vak csiperkegomba extraktumából, és erre építettem a 4.3.1. fejezetben leírt módon a kalibrációs pontokat (10. Táblázat).

10. Táblázat Kalibrációs pontok mátrix illesztett kalibráció esetén

Kalibrációs pont	Gomba mátrix	Munkaoldat(µl)	ng/ml (az analitikai mintában)				
			DON	T2	AFB ₁	FB ₁	ZON
1.	500 µl	20	15,84	1,584	0,1003	17,90	4,804
2.	500 µl	230	182,2	18,22	1,154	205,9	55,25
3.	500 µl	440	348,5	34,85	2,207	393,8	105,7
4.	500 µl	650	514,8	51,48	3,260	581,8	156,1
5.	500 µl	860	681,1	68,11	4,314	769,7	206,6

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Dolgozatomban a DON, AFB₁, FB₁, T-2, ZON toxin egyidejű analízisét végeztem HPLC-MS/MS mérőberendezéssel. A vizsgált toxinok kromatogramja a 11. ábrán látható.



11. ábra Vizsgált mikotoxinok retenciósi ideje

5.1. Kinyerési hatások értékelése

A mintatisztítási lépések elkerülhetetlen velejárója a célkomponens részleges elvesztése. Egyes komponensek kinyerési hatásfokával feltétlenül tisztában kell lennünk a mérés során, hogy kalkulálni tudjunk a veszteséggel. Az extrakciós hatásfok megállapítására a vak mintához mikotoxin sztenderd keveréket adtam pontosan ismert koncentrációkban, a mért eredményeimet ehhez hasonlítottam a különböző mikotoxinok esetén. Az EU 401/2006/EK rendelete különböző kinyerési értékeket javasol az egyes mikotoxinok esetén a koncentráció függvényében. A rendelet által ajánlott értékek figyelembevételével hasonlítottam össze az általam vizsgált négy variánst (11. Táblázat).

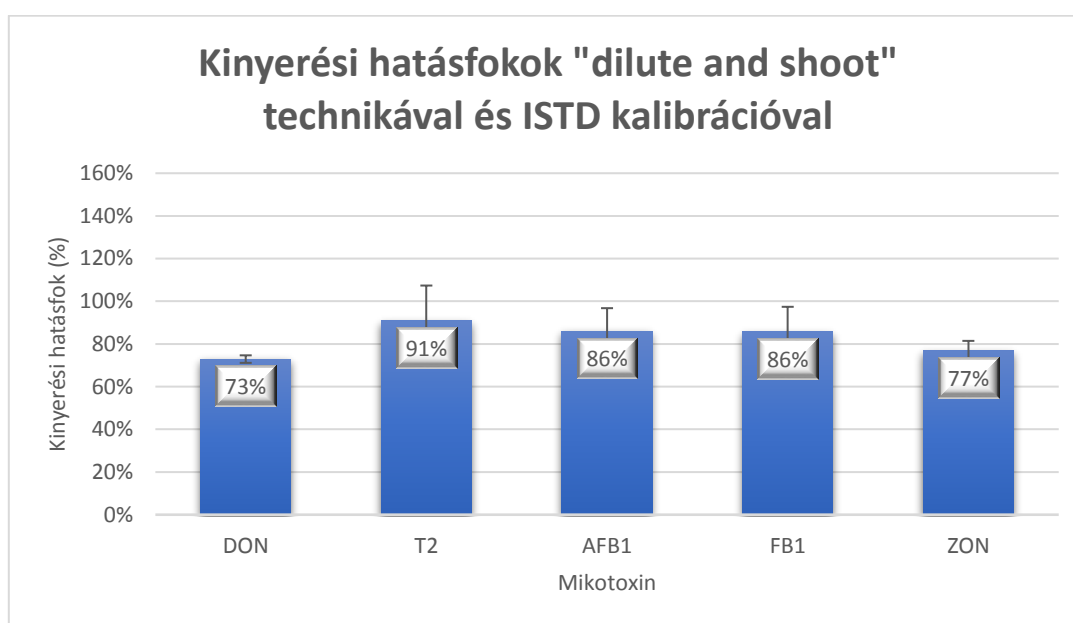
Azokat az értékeket, melyek eltértek az ajánlott kinyerési értékektől kiugró értéknek vettem, a 11. Táblázatban narancssárga színnel jelöltem. T-2 toxin esetén a rendelet nem határoz meg értéket, így itt a 70-110%-ig terjedő tartományt tekintettem elfogadható értéknek, melyet a Codex Alimentarius "General standard for contaminants and toxins in food and feed" (2015) című kiadványában ajánl általános értékként.

Wang és társai (2013) 9 mikotoxin (deoxinivalenol, T-2, aflatoxin B₁, fumonizin B₁, zearalenon, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂, aflatoxin B₁) egyidejű meghatározása során 68,3-93,6%-os kinyerési arányokat értek el kukorica mátrix esetén. Pamel és kutatócsapata (2011) 26 mikotoxin egyidejű meghatározását végezték (köztük az általam mért T-2, AFB₁, FB₁, és ZON toxint) UHPLC-MS/MS készülékkel kukoricasilóból származó minták esetén. Kísérletük során 61-116%-os kinyerési értékeket mértek.

11. Táblázat Kinyerési értékek összehasonlítása az EU 401/2006 EK rendelet által ajánlott értékekkel

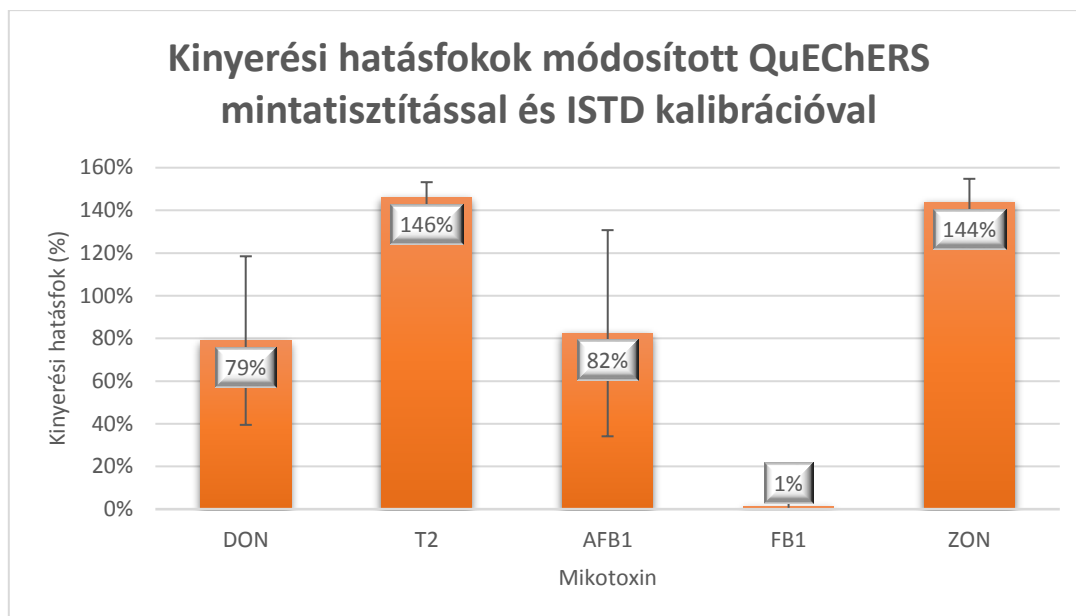
Mikotoxin	Addíciós szint (µl munkaoldat)	Koncentráció (ng/g)	A EU 401/2006/EK rendelet által ajánlott kinyerési érték	¹³ C kalibráció		Mátrix illesztett kalibráció	
				"dilute and shoot" kinyerési érték	QuEChERS kinyerési érték	"dilute and shoot" kinyerési érték	"QuEChERS" kinyerési érték
DON	180	1080	70-120%	72%	107%	77%	85%
	650	3900		74%	51%	72%	88%
T-2	180	108	nincs megadva	79%	151%	107%	145%
	650	390		103%	141%	85%	134%
AFB ₁	180	6,84	70-110%	94%	117%	126%	108%
	650	24,7	80-110%	78%	48%	117%	54%
FB ₁	180	1220	70-110%	94%	3%	68%	3%
	650	4407		77%	0%	69%	3%
ZON	180	327,6	70-120%	80%	152%	89%	112%
	650	1183		73%	136%	95%	99%

A „dilute and shoot” technika kinyerési hatásfokát izotóphígítás esetén a 12. ábra szemlélteti. A diagramokon a párhuzamos méréseim átlagértékei szerepelnek. A mérési módszer kinyerési értékei az EU 401/2006/EK rendelet által ajánlott kinyerési érték tartományába esnek DON, AFB₁, FB₁, ZON esetén, a T-2 toxin 91% kinyerési értéke pedig a Codex Alimentarius "General standard for contaminants and toxins in food and feed" (2015) című kiadványába ajánlott tartományban van, így ezt a módszert alkalmasnak találom erre a multi-mikotoxinos meghatározásra gomba mátrix esetén.



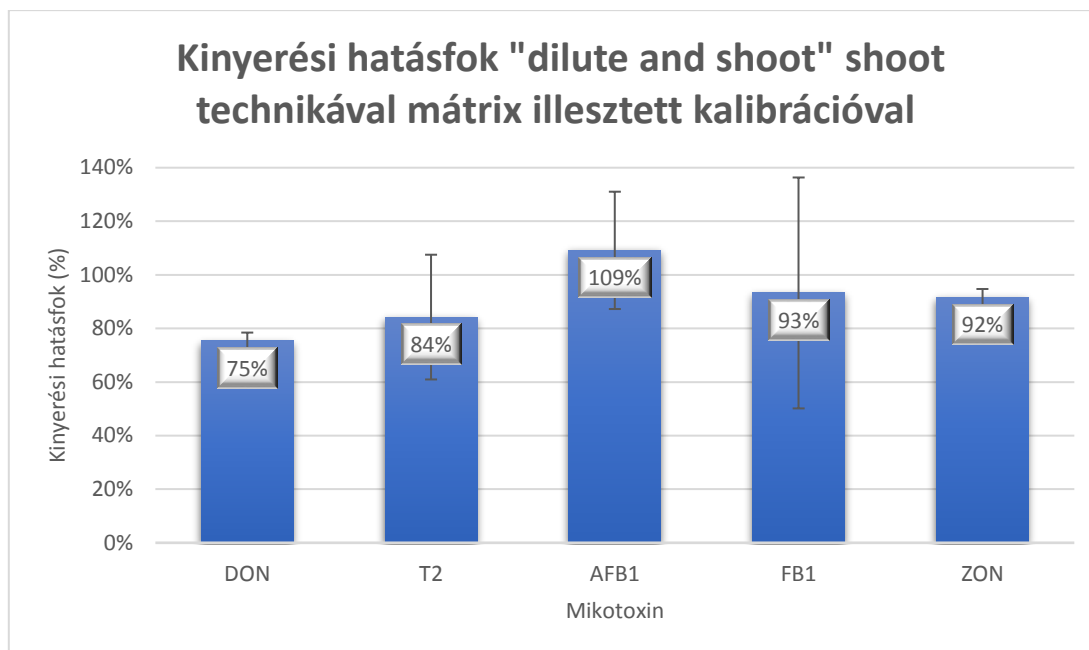
12. ábra Mikotoxinok kinyerési értékei „Dilute and shoot” mintaelőkészítés esetén ISTD technikával

A QuEChERS mintatisztítás kinyerési hatásfokai izotóphígítás esetén a 13. ábrán látható. DON és AFB₁ toxin esetén megfelelő kinyerési értékeket mértem, ugyanakkor szórásértékük jelentősen meghaladja a „dilute and shoot” szórásértékeit. T-2 toxin és ZON toxin kinyerési értékei nagyobbak voltak az ajánlott értékeknél, FB₁ toxin esetén a célkomponens szinte teljesen elveszett a mintaelőkészítés során. Mivel a fumonizin B₁ egy közepesen erős sav (pKa értéke 3,16), ezért a pH 5,5 értékre pufferelt QuEChERS során a sóval történő rázási lépésénél ez a célvegyület a vizes fázisban maradt. Ahhoz, hogy a fumonizin B₁ is átrázható legyen az acetonitril-fázisba a pH értéket 2 alá kellene beállítani. Koesukwiwat és társai (2013) az acetonitril-víz 1:1 arányú elegyhez 10%-os hangyasavat adtak, így 66%-os kinyerési hatásfokot értek el fumonizin B₁ esetén.



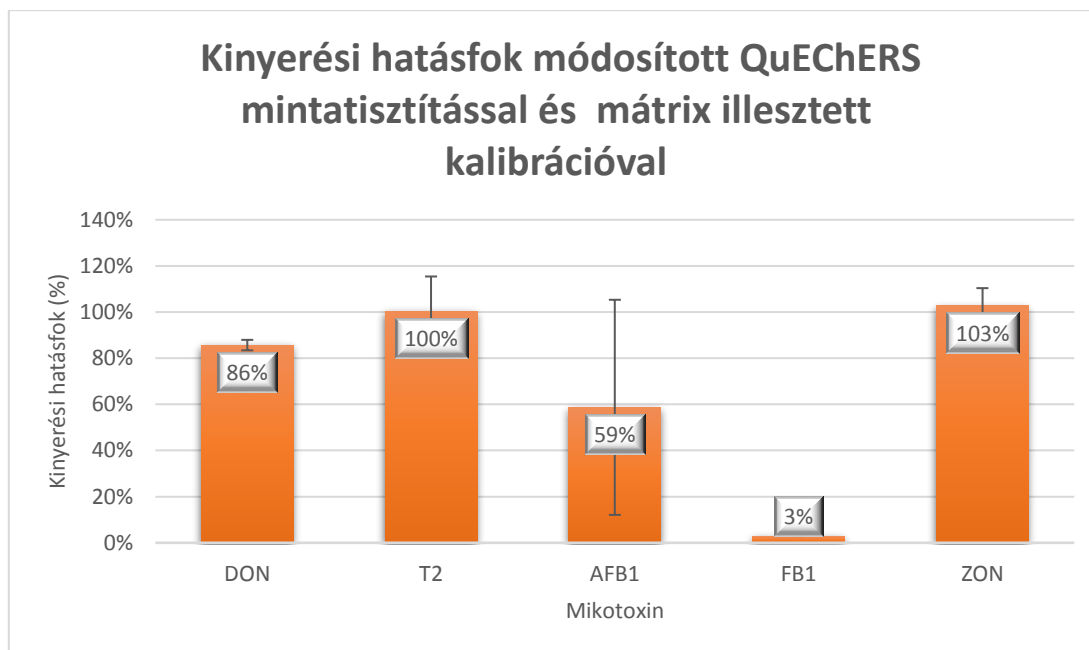
13. ábra Mikotoxinok kinyerési értékei QuEChERS mintaelőkészítés esetén ISTD technikával

A 14. ábrán a „dilute and shoot” technika eredményei láthatók mátrix illesztett kalibráció esetén. Mind az öt mikotoxin kinyerési értéke az ajánlott tartományba esik, ezért ezeket az értékeket megfelelőnek találom. A mátrix illesztett kalibráció szórásértékei jelentősen meghaladják az izotóphígításos technika szórásértékeit, ez a technika kevésbé precíznek minősül.



14. ábra Mikotoxinok kinyerési értékei „Dilute and shoot” mintaelőkészítés esetén mátrix illesztett kalibrációval

A QuEChERS mintaelőkészítést és mátrix illesztett kalibrációt alkalmazva a kinyerési értékek megfelelőnek bizonyultak DON, T-2 és ZON toxinnál (15. ábra). Mátrix illesztett kalibráció esetén a három toxin kinyerési értéke jobb lett ezt a mintatisztítási módot alkalmazva, azonban AFB₁ és FB₁ toxin esetén a kinyerési értékek nem érték el az ajánlott minimum értéket, így ezek mérésére a módszer nem bizonyult megfelelőnek. Az öt mikotoxin egyidejű meghatározásához a „dilute and shoot” technika alkalmasabbnak tekinthető a kinyerési hatásfokokat figyelembe véve.



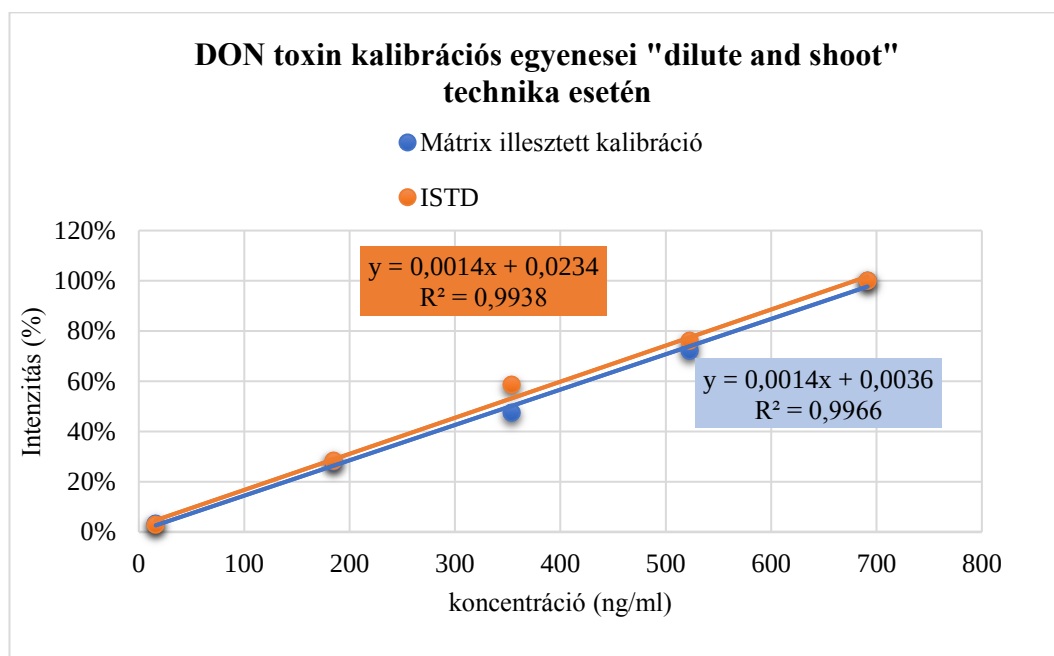
15. ábra Mikotoxinok kinyerési értékei módosított QuEChERS mintaelőkészítés esetén mátrix illesztett kalibrációval

Mindkét kalibrációs eljárásnál a „dilute and shoot” technika bizonyult megfelelőbbnek az öt toxin egyidejű analizésére gombamátrixban. A módszer idő és költséghatékony, valamint kisebb szórásértékek jellemzik. A „dilute and shoot” technika jobb precizitásának magyarázata lehet például, hogy ennél a technikánál jelentősen kevesebbet kellett pipetázni a mintaelőkészítés során. A mérési bizonytalanságba az összes véletlen hiba beletartozik, ilyen releváns hibának tekinthető a pipetázás bizonytalansága. Fontos figyelembe venni azonban, hogy összetettebb mintamátrix esetén szükség lehet a QuEChERS mintatisztítási eljárás alkalmazására, hogy a nagy mennyiségben jelenlevő mátrix ne nyomja el a mintában kis koncentrációban jelenlevő célkomponens jelét. Az izotóphígításos technikát alacsonyabb szórásértékek jellemzik, mint a mátrix illesztett kalibrációt, így az izotópjelzett belső sztenderd alkalmazása, bár sokkal költségesebb, ezzel egyidejűleg precízebb, könnyebben ismételhető és reprodukálható, valamint szélesebb körben alkalmazható az analitikában.

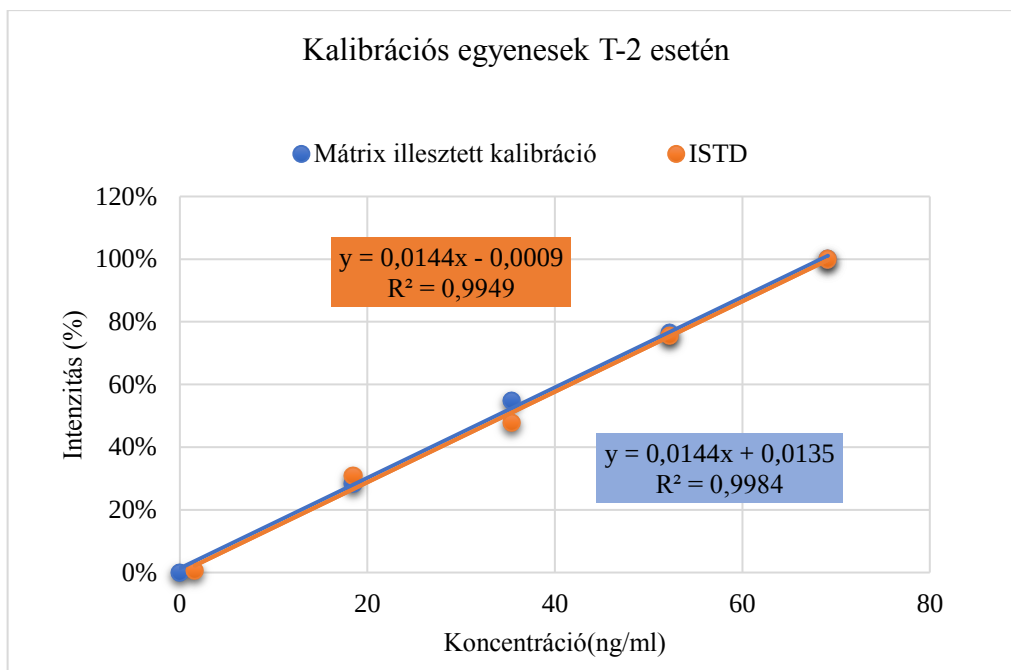
5.2. Izotóphígítási technika és a mátrix illesztett és kalibráció összehasonlítása

Dolgozatomban kétféle kalibrációs technikát hasonlítottam össze. Célom az volt, hogy megvizsgáljam valóban szükséges-e az igen költséges ISTD használata gombamátrixban a vizsgált öt mikotoxin esetén a megfelelő kinyerési hatásfokok eléréséhez, vagy a jóval gazdaságosabb mátrix-illesztett kalibrációval is megfelelő eredményeket kapok. A két kalibrációs technika során az ordináta-tengelyen eredetileg különböző dimenziók szerepelnek. ISDT technika esetén a belső sztenderd jelével kompenzált relatív területtel, mátrix illesztett kalibrációnál pedig korrekció nélkül, a kapott jelintenzitás integrált területével számolunk, így ahhoz, hogy a két technika eredményei összehasonlíthatók legyenek szükséges egy normalizációt elvégezni. A normalizálás során a legnagyobb koncentráció esetén kapott jelintenzitást vettem 100%-nak, a többi koncentráció jelintenzitását pedig ehhez hasonlítottam mindkét technika során.

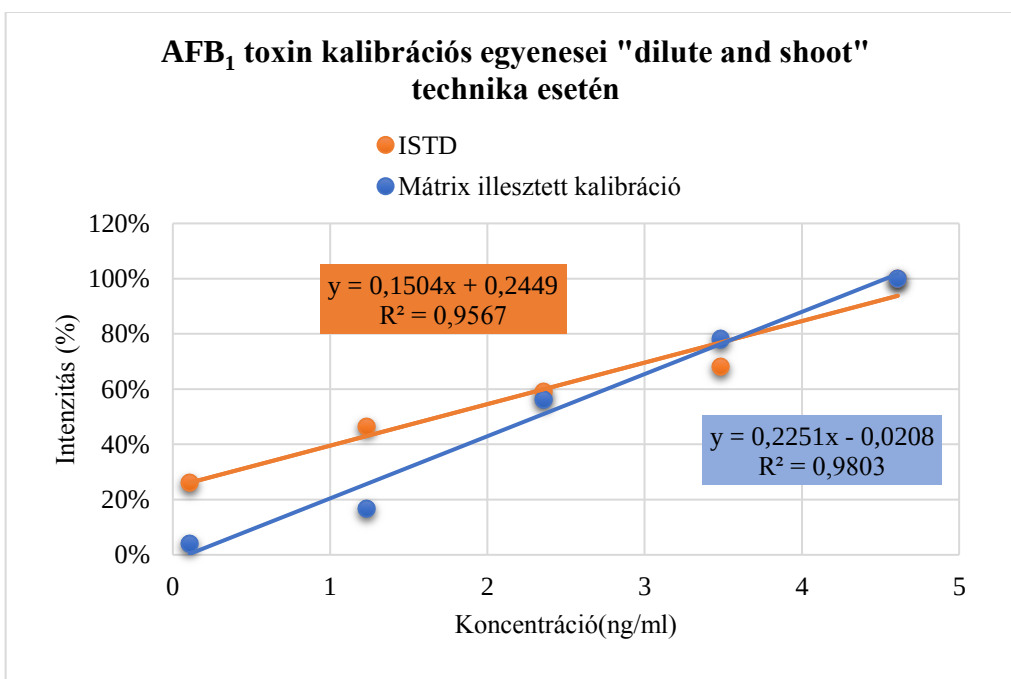
A mintaelőkészítéshez használt mátrix illesztett kalibráció és az izotóphígítási kalibrációs technika egyeneseit a 16-20. ábrán közlöm az általam vizsgált DON, T-2, AFB₁, FB₁ és ZON toxin esetén. A determinációs együtthatókat (R^2) a 12. Táblázatban, a kalibrációs egyenesek meredekségeit pedig a 13. Táblázatban rendszerezem az általam vizsgált mikotoxinokra vonatkozóan.



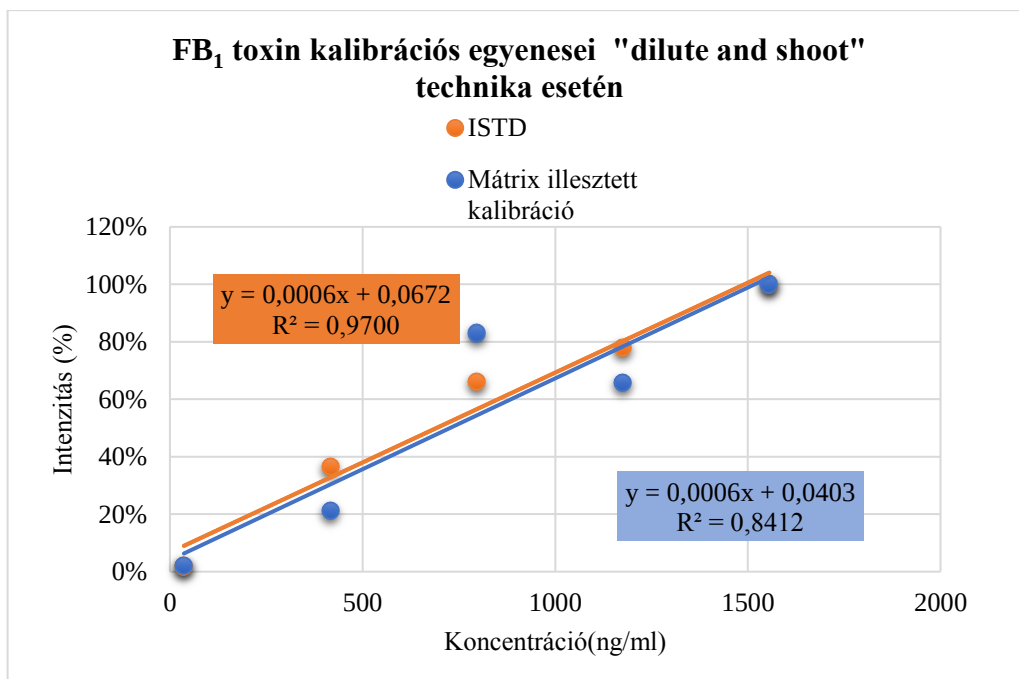
16. ábra DON toxin kalibrációs egyenesei „dilute and shoot” technika esetén



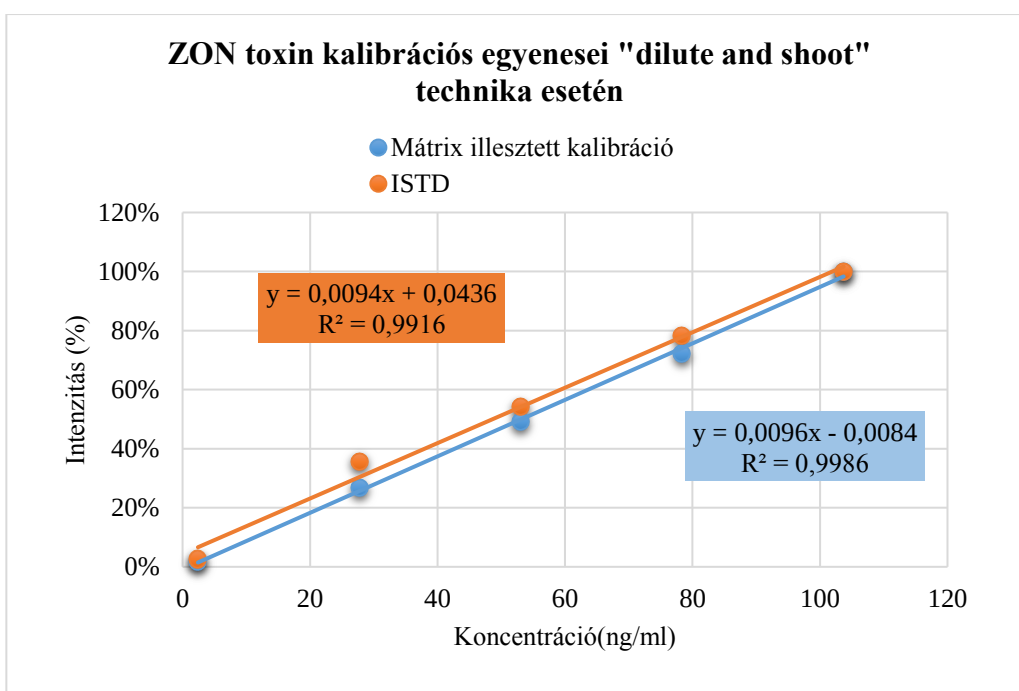
17. ábra T-2 toxin kalibrációs egyenesei „dilute and shoot” technika estén



18. ábra AFB₁ toxin kalibrációs egyenesei „dilute and shoot” technika estén



19. ábra FB₁ toxin kalibrációs egyenesei „dilute and shoot” technika esetén



20. ábra ZON toxin kalibrációs egyenesei „dilute and shoot” technika esetén

12. Táblázat „Dilute and shoot” technikánál alkalmazott kalibrációk determinációs együtthatói

Mikotoxin	ISTD R ²	Mátrix illesztett kalibráció R ²
DON	0,9938	0,9966
T-2	0,9949	0,9984
AFB ₁	0,9567	0,9803
FB ₁	0,9700	0,8414
ZON	0,9916	0,9986

13. Táblázat „Dilute and shoot” technikánál alkalmazott kalibrációs egyenesek meredekségei

Mikotoxin	ISTD meredekség	Mátrix ill. kalibráció meredekség	Mátrix hatás
AFB ₁	0,1504	0,2251	50%
T-2	0,0144	0,0144	0%
ZON	0,0094	0,0096	2%
DON	0,0014	0,0014	0%
FB ₁	0,0006	0,0006	0%

Determinációs együtthatók vizsgálata:

A kalibrációs egyeneseket a determinációs együtthatóval (R^2) jellemezhetjük. A determinációs együttható azt mutatja meg, hogy az egyenes mennyire szorosan illeszkedik a pontokhoz. Minél közelebb van R^2 értéke 1-hez annál szorosabb az illeszkedés. A HPLC-MS/MS mérés során több átmeneten mérünk. Általánosságban elmondható, hogy azt az átmenetet választjuk a kvantitatív méréshez, amelyik intenzívebb ionátmenetet ad, azaz a kalibrációs egyenes meredeksége nagyobb. Azonban, hasonló intenzitású átmeneteknél a választás alapja az egyenes determinációs együtthatójának nagysága is lehet. DON, T2, AFB₁ és ZON esetében mindkét kalibrációs technikánál megfelelő determinációs értékeket kaptam, így mindkét technikát alkalmasnak ítélem a felsorolt négy toxin mennyiségi meghatározására. Ezért amennyiben rendelkezésre áll vak mátrix, a mátrix illesztett kalibrációs technika használatát javaslom alacsonyabb költségigénye miatt.

A 12. Táblázatban sárga színnel jelölt FB₁ toxin determinációs együtthatója mátrix illesztett kalibráció esetén nem volt megfelelő. Ennek oka lehet, hogy mivel ennél a technikánál a mátrixra építjük rá a kalibrációs sort, a kalibrációs pontok mátrixhatással terheltek, így feltételezhető, hogy a mátrix volt zavaró hatással az értékekre. Az ok pontos meghatározása további kutatást igényel.

Vizsgált módszerek érzékenysége:

A kalibrációs egyenes meredekségéből a módszer érzékenysége következtethetünk. A módszer érzékenysége analit függő. A 13. Táblázatban a módszer érzékenysége alapján csökkenő sorba rendszereztem a toxinokat. Minél érzékenyebb a módszer adott mikotoxinra, annál alacsonyabb lesz a célkomponens kimutatási és meghatározási határa. Mindkét technika az AFB₁ toxinra a legérzékenyebb, ennek a toxinnak a legalacsonyabb a kimutatási és meghatározási határa.

Mátrixhatás vizsgálata:

A mátrix illesztett kalibráció mátrixhatással terhelt, míg izotóphígítási technika során nem rakjuk a mátrixot a kalibráció sor mögé, így a két egyenes meredekségének összehasonlításával lehetőség nyílik a mátrixhatás irányának és mértékének vizsgálatára adott analitra vonatkozóan. A mátrixhatás vizsgálatához az alábbi képletet alkalmaztam:

$$\textbf{Mátrix hatás (\%)} = \left[\left(\frac{a}{b} \right) - 1 \right] * 100$$

a: vak mátrix-szal terhelt kalibrációs egyenes meredeksége

b: szerves oldószerre épített kalibrációs egyenes meredeksége

A mátrixhatás ionelnyomást és ionerősítést is okozhat adott célkomponensnél. A mátrixhatás a 13. Táblázatban sárga színnel kiemelt AFB₁ toxin esetén volt a legjelentősebb, ahol 50%-os jelnövekedést eredményezett. A mátrix egyáltalán nem befolyásolta az egyenes meredekségét DON, T-2 és FB₁ toxin esetében. ZON toxin esetében 2%-os jelnövekedést okozott.

Méréseim alapján mindkét kalibrációs eljárást megfelelőnek találom a vizsgált öt mikotoxin egyidejű analízisére gombamátrix esetén. Elérhető vak mátrix esetén a mátrix illesztett kalibrációs technika alkalmazása célszerűbb alacsonyabb költségigénye miatt. Vak mátrix hiányában az izotópjelzett belső sztenderd technika használata szükségeszerű.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikotoxinok széleskörű elterjedésük és az általuk okozott betegségek súlyossága miatt globális veszélyt jelentenek, visszaszorításuk és kutatásuk tehát nagyon fontos a társadalom számára. A toxin vizsgálatok során problémaként merül fel, hogy jellemzően kis koncentrációban vannak jelen bonyolult összetételű mintákban, továbbá a legtöbb esetben a táplálék egyidejűleg több mikotoxinnal is szennyezett, ezért nagy jelentőségük van a multi-mikotoxinos módszerek kidolgozásának. A HPLC-MS/MS technika megjelenésével a kimutatási és meghatározási határok jelentősen csökkentek a műszer érzékenységének köszönhetően, azonban a mátrixhatás továbbra is problémaként lép fel összetett minták esetén. Dolgozatomban a „dilute and shoot” és a QuEChERS mintatisztítás kinyerési hatásfokait vizsgáltam DON, T-2, AFB₁, FB₁ és ZON toxinnál gomba mátrix esetén. TDK dolgozatom további célja az izotóphígításos technika és a mátrix illesztett kalibráció összehasonlítása volt. A következő eredményekre jutottam:

- Kinyerési értékek vizsgálata:

Dolgozatomban csiperkegomba mátrix esetén vizsgáltam DON, T-2, AFB₁, FB₁, ZON toxin kinyerési értékeit. A mért értékeket a EU 401/2006/EK „Az élelmiszerek mikotoxin tartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapításáról” szóló rendeletében lévő ajánlásokkal, valamint a Codex Alimentarius "General standard for contaminants and toxins in food and feed" (2015) című kiadványában szereplő ajánlásokkal hasonlítottam össze.

- Kinyerési értékek „dilute and shoot” módszer esetén:

„Dilute and shoot” technika esetén 73-91%-os kinyerési értékeket mértem izotópjelzett belső sztenderdet alkalmazva, mátrix illesztett kalibrációnál pedig 74-109%-os értékek között mozgott a kinyerési hatásfok. Ezt a technikát alkalmasnak találom a fent említett öt mikotoxin egyidejű meghatározásához gomba mátrix esetén.

- Kinyerési értékek módosított QuEChERS mintaelőkészítés esetén:

Módosított QuEChERS mintaelőkészítést és ISTD technikát alkalmazva DON és AFB₁ toxin esetén az ajánlott kinyerési értékeknek megfelelő értéket mértem. T-2 toxin és ZON toxin esetén a kinyerési értékek meghaladták az ajánlott hatásfokokat. FB₁ toxin esetén a célkomponens szinte teljesen elveszett a mintaelőkészítés során, így erre a toxinokra nem volt alkalmas a mérési módszer.

Módosított QuEChERS mintaelőkészítést és mátrix illesztett kalibrációt alkalmazva a kinyerési értékek az ajánlottnak megfelelőek lettek DON, T-2 és ZON toxin esetén. AFB₁ és FB₁ toxinok kinyerési értékei nem érték el az ajánlottat. A módosított QuEChERS technika kinyerési hatásfoka alulmaradt a „dilute and shoot” módszerhez képest, valamint kevésbé precíznek bizonyult gomba mátrix esetén. A „dilute and shoot” technika idő- és eszköztakarékos eljárás és gombamátrix esetén megfelelőnek bizonyult, azonban az általam vizsgált mátrixnál bonyolultabb összetételű minta esetén -mint például a gombatermesztésnél táptalajként használat búzaszalma és állati trágya keverékéből összeállított komposzt- mindenképpen megfontolandó a módosított QuEChERS technika alkalmazása a nagymértékű mátrixhatás csökkentésére.

- Az izotóphígításos technika és a mátrix illesztett kalibráció összehasonlítása:

Méréseim alapján mindkét kalibrációs technika megfelel a vizsgált öt mikotoxin multi-mikotoxinos meghatározásához. A mátrix illesztett kalibráció költséghatékonyabb megoldás, amennyiben van elérhető vak mátrix a kalibrációhoz. Fehér csiperkegomba vizsgálatánál vak mátrix beszerzése nem okoz gondot, ezért ezen élelmiszer esetén mindenképpen a költséghatékonyabb mátrix-illesztett kalibráció alkalmazását javaslom. Sok esetben a vak mátrixok nem beszerezhetők, így az izotóphígításos technika szélesebb körben alkalmazható mikotoxinok meghatározása esetén, továbbá a belső sztenderdek köszönhetően kiküszöbölhető a mérőműszer érzékenységének változásából adódó bizonytalanság is.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abassi, H., Ayed-Boussema, I., Shirley, S., Abid, S., Bacha, H., Micheau, O. (2016): The mycotoxin zearalenone enhances cell proliferation, colony formation and promotes cell migration in the human colon carcinoma cell line HCT116. *Toxicology* 254 (2016) 1-7. DOI: **10.1016/j.toxlet.2016.04.012**.
2. Ahangarkani, F., Rouhi, S., Azizi, G., I. (2014): A review on incidence and toxicity of fumonisins. *Toxin Review*. 33(3): 95-100 DOI: **10.3109/15569543.2013.871563**
3. Anastassiades, M., Lehotay, S., J., Štajnbaher, D., Schenck, F., J. (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86: 412-431.
4. Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerdá, V. (2015): Solid extraction of organic compounds: a critical review. *Trends in Analytical Chemistry* Volume 80: 641-654. DOI: **10.1016/j.trac.2015.08.015**
5. Bullerman, L.B., Bianchini A. (2007): Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 140–146 DOI: **10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035**
6. Codex Alimentarius (2015): General standard for contaminants and toxins in food and feed. *Codex Stan 193-1995* 17-18.
7. Coravelli, L. Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Juan, C., Ferrer, E., Manes, J. (2014): Fusarium species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Wiley Online Library* (2014). DOI: **10.1002/jsfa.6772**
8. Christensen, C., M., Nelson, G.H. - Mirocha, C.J. (1965): Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from Fusarium. *Applied Microbiology*. 13: 653-659.
9. Cunha, S., C., Fernandes, J., O. (2009): Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. *Journal of separation Science*. 33: 600-609. DOI: **10.1002/jssc.200900695**
10. Dobrink-Kurtzman, M., A., Dvorak, T., J., Barron, M., E., Rooney, L., W. (2000): Effect of Nixtamalization (Alkaline Cooking) on Fumonisin-Contaminated Corn for Production of Masa and Tortillas. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 48: 5781-5786. DOI: **10.1021/jf000529f**

11. Fang, N., Yu, S., Ronis, M., J., J., Badger, T., M. (2014): Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples. *Experimental Biology and Medicine*.240: 1-11. **DOI: 10.1177/1535370214554545**
12. Gao, F., Jiang, L., Chen, M., Geng, C., Yang, G., Ji, F., Zhong, L., Liu, X. (2013): Genotoxic effects induced by zearalenone in a human embryonic kidney cell line. *Mutation Research*. 755: 6-10. **DOI: doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.04.009**
13. González-Curbelo, M., Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A., V., González-Sálamo, J., Hernandez-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M., Á. (2015): Evolution and application of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* Volume 71: 169-185. **DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.012**
14. European Food Safety Authority (EFSA), (2007): Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA J*. 446, 13-14. Wiley Online Library (2014). **DOI: 10.1002/jsfa.6772**
15. European Food Safety Authority (EFSA) (2011): 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 J*. 2011;9(12):2481. **DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2481**
16. Escrivá, L., Font, G., Manyes, L. (2015): *In vivo* toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*.185-206. **DOI: 10.1016/j.fct.2015.02.005**
17. Franco, L., T., Petta, T., Vendrametto M., E., Oliveira, C., A., F. (2018): Performance and Application of a “Dilute-andShoot” LC-MS/MS Method for Determination of Mycotoxins in Food Products in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Engineering* Volume 4: 206-211. **DOI: 10.18178/ijfe.4.3.206-211**
18. Frenich, A., G., Romero-González, R., Gómez-Pérez, M., L., & Vidal, J., L., M. (2011): Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(28): 4349–4356. **DOI: 10.1016/j.chroma.2011.05.005**

19. Häubl, G., Berthiller, F., Hametner, C., Rechthaler, J., Jaunecker, G., Freudenschuss, M., Schuhmacher, R. (2007): Characterization of (¹³C₂₄) T-2 toxin and its use as an internal standard for the quantification of T-2 toxin in cereals with HPLC–MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(3): 931–940.
DOI 10.1007/s00216-007-1493-7
20. Hickert, S., Gerding, J., Ncube, E., Hübner, F., Flett, B., Cramer, B., & Humpf, H.-U. (2015): A new approach using micro HPLC-MS/MS for multi-mycotoxin analysis in maize samples. *Mycotoxin Research*, 31: 109–115.
DOI: 10.1007/s12550-015-0221-y
21. Hussein, S.H., Brasel, J.M. (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxin on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134 **DOI: 10.1016/S0300-483X(01)00471-1**
22. Jogszabály 1 401/2006/EK rendelet az élelmiszerek mikotoxintartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapításáról. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/ALL/?uri=CELEX%3A32006R0401>
23. Jogszabály 2 1881/2006/EK rendelet az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/hu/TXT/?uri=CELEX:32006R1881>
24. Kachalek, M. – Szabó-Fodor, J. – Kovács, M. (2017): Interactions of the fusarium mycotoxins, fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone. *Hungarian Journal of Animal Production* 66: 181-195
25. Kleigrew, K., Söhnle, A., C., Humpf, H., U. (2011). A new high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method based on Dispersive Solid Phase Extraction for the Determination of the mycotoxin Fusarin C in corn ears and processed corn samples. *Journal of agricultural food chemistry*. 59: 10470-10476. **DOI: 10.1021/jf2026814**
26. Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., Leepipatpiboon, N. (2014): Evaluation of modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food Chemistry*. 153: 44-51. **DOI : 10.1016/j.foodchem.2013.12.029**
27. Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A., Misore, A., DeCock, K., Rubin C., and the Kenya Aflatoxicosis Investigation Group. (2005): Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*. 113: 1763-1764. **DOI: 10.1289/ehp.7998**

28. Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013): Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 60: 218-237
DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.047
29. Pamel, E., Verbeken, A., Vlaemynck, G., Boever, J., Daeseleire, E. (2011): Ultrahigh-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multimycotoxin method for quantitating 26 mycotoxins in maize silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 9747-97455. **DOI: 10.1021/jf202614h**
30. Rasmussen, R., Storm, I., M., L., D., Rasmussen, P., H., Smedsgaard, J., Nielsen, F., K. (2010): Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 397: 765-776.
DOI: 10.1007/s00216-010-3545-7
31. Su, Y., Sun, Y., Ju, D., Chang, S., Sho, B., Shan, A. (2018): The detoxification effect of Vitamin C on zearalenone toxicity in piglets. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 158 (2018) 284-292. **DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.04.046**
32. Szabvány 1 MSZ EN 15662:2009 Növényi eredetű élelmiszerek. Pesticid szermaradékok acetonitriles extrakciót/szétválasztást és diszperziós SPE tisztítást követő meghatározása GC-MS-sel és/vagy LC-MS/MS-sel. QuEChERS-módszer
33. Tóth E. (2008). Aflatoxin B1 kinyerési hatásfokának vizsgálata különféle élelmiszermátrixokból. Diplomadolgozat, Szent István Egyetem
34. Tölgyesi Á., Fekete J. (2017): Folyadékkromatográfiás hármass kvadrupól rendszerű tandem tömegspektrometriai módszerek a gyakorlatban: példák élelmiszer- és bioanalitikai alkalmazásokra 11-18; 29-33.
35. Tölgyesi Á., Tölgyesi L., Békési L., Sharma, V., S., Fekete J. (2015): Folyadékkromatográfiás hármass kvadrupól rendszerű tandem tömegspektrometriás (HPLC-MS/MS) módszerek az élelmiszer-vizsgálatokban: kihívások és előnyök. *Élelmiszervizsgáló közlemények* 1 (2015) 510-512.
36. Üveges M. (2008): Az izotóparány mérés alkalmazásának lehetőségei a módosulatanalitikában és az élelmiszereredet vizsgálata során. PhD disszertáció, Budapesti Corvinus Egyetem.
37. Varga, E., Glauner, T., Köppen, R., Mayer, K., Sulyok, M., Schuhmacher, R., Berthiller, F. (2012): Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(9): 2675–2686. **DOI:10.1007/s00216-012-5757-5**

38. Wang, M., Jiang, N., Xian, H., Wei, D., Shi, L., Feng, X. (2015): A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1429: 22-29. **DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.004**
39. Wang, X., Wu, Q., Wan, D., Liu, Q., Chen, D., Liu, Z., Martínez-Larranaga, M., R., Martínez, M., A., Anadón, A., Yuan, Z. (2015): Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro. *Archives of toxicology*. 90: (2016) 81-86. **DOI 10.1007/s00204-015-1604-8**
40. Wang, Y., Xiao, C., Guo, J., Yuan, Y., Wang, J., Liu, L., Yue, T. (2013): Development and Application of a Method for the Analysis of 9 Mycotoxins in Maize by HPLC-MS/MS. *Journal of Food Science*. 78: 1752-1756. **DOI: 10.1111/1750-3841.12187**
41. Zinedine, A., Soriano, M., J., Moltó, C., J., Manes, J. (2007): Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*. 45: 1-18. **DOI: 10.1016/j.fct.2006.07.030**

Internetes források:

Internet 1: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907#section=Top>

Internet 2: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11969549#section=Top>

Internet 3: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40024#section=Top>

Internet 4: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3431#section=Top>

Internet 5: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281576#section=Top>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm Varga Emese tanszéki mérnöknek a kitartó és nélkülözhetetlen munkáját, türelmét és segítségét, ami nélkül ez a TDK dolgozat nem jöhetett volna létre.

Külön köszönöm Marczika Andrásné dr. Sörös Csilla a segítségét és iránymutatásait, valamint a szakmai tanácsait, melyekkel ellátott a dolgozatom írása során.

Szeretnék köszönetet mondani Édesanyámnak, aki időt és energiát nem sajnálva hatalmas precizitással és lelkesedéssel segítette dolgozatom tökéletesítését.