

**A MULTIPLEX MÉRÉSI MÓDSZER ALKALMAZÁSA
BIOLÓGIA MINTÁK GYORS ANALÍZISÉBEN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

RAKK DÁVID

TÉMAVEZETŐK:

DR. SZEKERES ANDRÁS
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS

DR. VARGA MÓNICA
TUDOMÁNYOS MUNKATÁRS



BIOLÓGAI DOKTORI ISKOLA

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGAI TANSZÉK**

SZEGED

2023

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	5
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1 Múltiplex mérés technika Orbitrap tömegspektrométerekben	7
3.2 Központi metabolitok és MS alapú mérés technikájuk	12
3.2.1 Központi metabolitok, mint biomarkerek	12
3.2.1 Központi metabolitok mérése biológiai mintákból	14
3.3 Mikotoxinok jellemzői és analízisük	16
3.3.1 Mikotoxinok jellemzése	16
3.3.2 Mikotoxinokra vonatkozó élelmiszerbiztonsági előírások	19
3.3.3 Minta előkészítési eljárások mikotoxinok nyomnyi kimutatásához	20
3.3.4 Mikotoxinok kvantitatív analitikai vizsgálata	22
4. Célkitűzés	25
5. Anyagok és módszerek	26
5.1 Felhasznált anyagok	26
5.2 Központi metabolitok analízise	26
5.2.1 <i>Aspergillus nidulans</i> törzs tenyésztése és extrahálása	26
5.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> felnevelése és extrahálása	27
5.2.3 HO-1-N-1 humán karcinóma sejtek tenyésztése és extrahálása	27
5.2.4 FIA-MS paraméterek	28
5.2.5 Standard oldatok készítése	30
5.2.6. Szelektivitás vizsgálata	30
5.2.7. LLOQ értékek meghatározása	30
5.2.7. Dinamikus tartomány meghatározása	30
5.2.8. Biológiai minták mérése és mátrixhatás meghatározása	31
5.3 Mikotoxinok analízise	31

5.3.1 Módszerfejlesztés	31
5.3.2 Módszervalidálás.....	36
6. EREDMÉNYÜK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	41
6.1 Multiplex módszerek alapelvei.....	41
6.2 Multiplex módszer fejlesztése központi metabolitok mennyiségi meghatározására	44
6.2.2 Módszerfejlesztés	45
6.2.3 Módszervalidálás.....	47
6.3 Multiplex módszer fejlesztése mikotoxinok mennyiségi meghatározására	56
6.3.1 Tömegspektrometriás körülmények optimalizálása.....	56
6.3.2 Multiplex módszer fejlesztése	57
6.3.3 UHPLC-MS/MS módszer fejlesztése	59
6.3.4 Mikotoxin extrakció optimalizálása.....	60
6.3.5 Módszer validálása.....	62
7. Összefoglalás	71
8. Summary	73
9. Irodalomjegyzék	75
10. Köszönetnyilvánítás.....	85
11. Mellékletek	87

1. Rövidítések jegyzéke

AB1	Aflatoxin B1
AB2	Aflatoxin B2
ACN	Acetonitril
AIF	összes ion fragmentálás (All Ion Fragmentation)
AG1	Aflatoxin G1
AG2	Aflatoxin G2
ATP	Adenozin-trifoszfát
C18	Oktadecil funkciós csoport
DDMS	Adatfüggő adatgyűjtés (data dependent)
DIA	Adatfüggetlen analízis (Data Independent Analysis)
DI-MS	direkt infúziós tömegspektrometria (Direct Infusion Mass Spectrometry)
DON	Dezoxinivalenol
dSPE	Diszperz szilárd fázisú extrakció (Dispersive solid phase extraction)
FB1	Fumonizin B1
FB2	Fumonizin B2
FIA	Áramlásba történő injektálásos analízis (Flow Injection Analysis)
GC	Gázkromatográfia (Gas Chromatography)
GC-MS	Gázkromatográffal csatolt tömegspektrometria (Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry)
HESI	Fűtött elektroporlasztásos ionizáció (Heated Electrospray Ionization)
HILIC	hidrofil interakciós folyadékkromatográfia (Hydrophilic interaction liquid Chromatography)
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
HRMS	Nagyfelbontású tömegspektrométer (High Resolution Mass Spectrometry)
HT2	HT-2 toxin
IPA	Izopropanol
IPC	Ionpár képző kromatográfia (Ion Pairing Chromatography)

LLOD	Kimutatás alsó határa (Lower limit of detection)
LLOQ	Meghatározás alsó határa (Lower limit of quantification)
MSX	Multiplex mérési technika
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NCE	Normalizált ütközési energia (Normalized Collision Energy)
OTA	Ochratoxin A
PPP	Pentóz-foszfát útvonal
PRM	Párhuzamos reakció monitorozás (Paralell Reaction Monitoring)
PSA	Primer és szekunder amin adszorbens
PTFE	Poli(tetrafluor-etilén)
QuEChERS	Gyors, könnyű, olcsó, hatékony, robosztus és biztonságos mintaelőkészítés (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe)
SALLE	Kisózásos folyadék-folyadék extrakció (Salting-out assisted liquid-liquid extraction)
SIM	Kiválasztott ion monitorozás (Selected Ion Monitoring)
SPE	Szilárd fázisú extrakció (Solid Phase Extraction)
SRM	Kiválasztott átmenet monitorozás (Selected Reaction Monitoring)
T2	T-2 toxin
UHPLC	Ultra nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
ULOQ	Meghatározás felső határa (Upper limit of Quantification)
VOL	Verukarrol
ZEA	Zearalenon

2. Bevezetés

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával csatolt tömegspektrometria (HPLC-MS) nagy pontosságának, érzékenységének, robusztusságának és gyorsaságának köszönhetően napjainkban a legelterjedtebb analitikai technika az 1000 Daltonnál kisebb molekulatömegű vegyületek kvantitatív és kvalitatív vizsgálatában (Tiller et al., 2003). Az elmúlt években egyre inkább elterjedtek a nagy áteresztő képességű mérési módszerek, melyek révén a mintákból a lehető legrövidebb analízis idő mellett határozható meg a vizsgált vegyületek mennyiségi és minőségi paraméterei (van der Laan et al., 2019; Rola et al., 2020). A nagy áteresztőképességű módszerek létrejöttét olyan fejlesztések tették lehetővé, mint a fejlett mintaelőkészítő rendszerek, a 2 µm alatti szemcseátmérőjű kromatográfiás oszlopok, a korszerű ionforrások és tömeganalizátorok. A rövid analízis időnek köszönhetően a HPLC-MS készülékek egységnyi idő alatt jóval több minta vizsgálatára képesek, mint akár csak egy évtizeddel ezelőtt (Beccaria and Cabooter, 2020).

Jelenleg a legrövidebb analízis idővel a kromatográfiás elválasztást nem alkalmazó, áramlásba történő injektálásos (flow injection analysis, FIA) eljárások rendelkeznek (Nanita and Kaldon, 2016). A FIA módszerek alkalmazásakor valamennyi mintakomponens egy időben érkezik a tömegspektrométer ionforrásába. Több komponens egymás melletti detektálása esetén a jelenleg elérhető nagyfelbontású tömegspektrométerek (HRMS) a legszelektívebbnek mondható üzemmódjaikban nem rendelkeznek megfelelő gyorsasággal kellő mennyiségű adatpont gyűjtésére. A tíznél több komponens egymás melletti meghatározására alkalmazható FIA-HRMS módszerek a legtöbb esetben valamilyen MS1 üzemmódot alkalmaznak (Chekmeneva et al., 2015). Ezeknek a mérési üzemmódoknak az az egyik legnagyobb hátránya, hogy nem tudnak különbséget tenni izobár vegyületek között (Gray et al., 2016). Ha azonban a vizsgált komponensek koncentrációját pontosan szeretnénk meghatározni, a tömegspektrométereknek a lehető legszelektívebb mérési üzemmódban kell működniük.

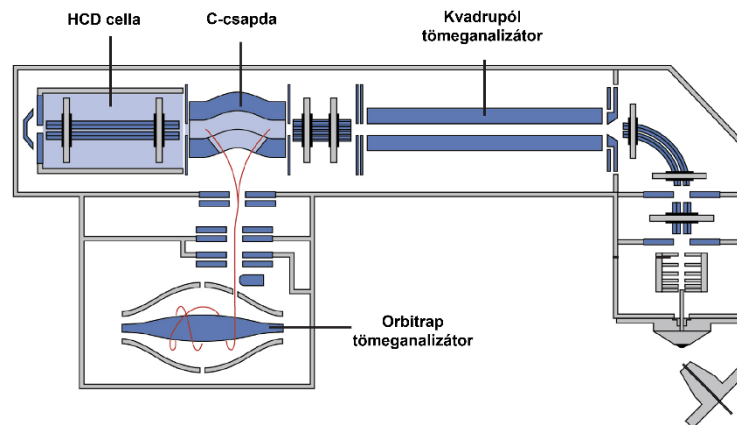
A nagyfelbontású, kvadrupól analizátorral rendelkező Orbitrap tömegspektrométerek legszelektívebb mérési üzemmódja a párhuzamos reakció monitorozás (PRM), ahol az egyes szülőionokból képződő valamennyi fragmens pontos tömegét vizsgáljuk (Bourmaud et al., 2016). Az Orbitrap tömeganalizátor viszonylag hosszú analízis idejének köszönhetően a PRM üzemmód alkalmazása mellett tíz, vagy annál több komponens egyidejű vizsgálata esetén a kimutatási határok jelentős romlása

észlelhető (Bourmaud et al., 2016). Ezen a jelenségen segíthet egy, az Orbitrap analizátoros készülékekhez köthető mérési módszer alkalmazása. E módszer, az ún. multiplex mérési technika (MSX) alkalmazásával egyesíteni tudjuk a FIA-MS módszerek gyorsaságát, és a PRM mérési üzemmód nagy szelektivitását, így gyors és kellő szelektivitású mérési megoldásokat tudunk kidolgozni nagyfelbontású Orbitrap analizátoros tömegspektrométereken.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Multiplex mérés technika Orbitrap tömegspektrométerekben

A lehető legegyszerűbb és alacsony költségű, de a nagy felbontást és a pontos tömeg meghatározását egyidejűleg biztosító rutin vizsgálatok kivitelezésére alkalmas tömegspektrométerek iránti igény vezetett 2011-ben a hibrid kvadrupól-Orbitrap tömegspektrométerek megjelenéséhez (Michalski et al., 2011), amelyben ötvöződik a kvadrupól által biztosított szülőion kiválasztás és az Orbitrap tömeganalizátor segítségével megvalósított nagyfelbontású detektálás. Ez a készülék megbízható és érzékeny, mennyiségi és minőségi vizsgálatok végrehajtására alkalmas, mind MS1 és MS2 mérési üzemmódban, célzott és nem célzott mérések során egyaránt. Mivel bizonyos adatgyűjtési módokban kiemelkedő érzékenységet és szelektivitást biztosít, nemcsak a proteomikában, lipidomikában, metabolomikában és általában a bioanalitikában alkalmazható, hanem kis mennyiségben jelen lévő vegyületek mennyiségi meghatározására is az élelmiszerbiztonság és a környezeti analitika területén (Zubarev and Makarov, 2013). Ezekben a készülékben a szülőionok kiválasztása, a fragmentáció, a leányionok izolálása és a detektálás olyan, térben elkülönülő egységekben játszódik le, melyeket egy speciális egység, a C-csapda köt össze, amely tulajdonképpen egy lineáris ioncsapda (**1. ábra**). Az ionforrásban keletkező, töltéssel rendelkező részecskék a kvadrupól analizátoron keresztül jutnak el az ionok tárolására szolgáló C-csapdába, majd onnan full-scan mérések esetén rögtön, vagy MS2 vizsgálatoknál a HCD cellában lejátszódó fragmentációt követően kerülnek a C-csapdán keresztül az Orbitrap tömeganalizátorba.



1. ábra: Q Exactive Orbitrap készülékek felépítése

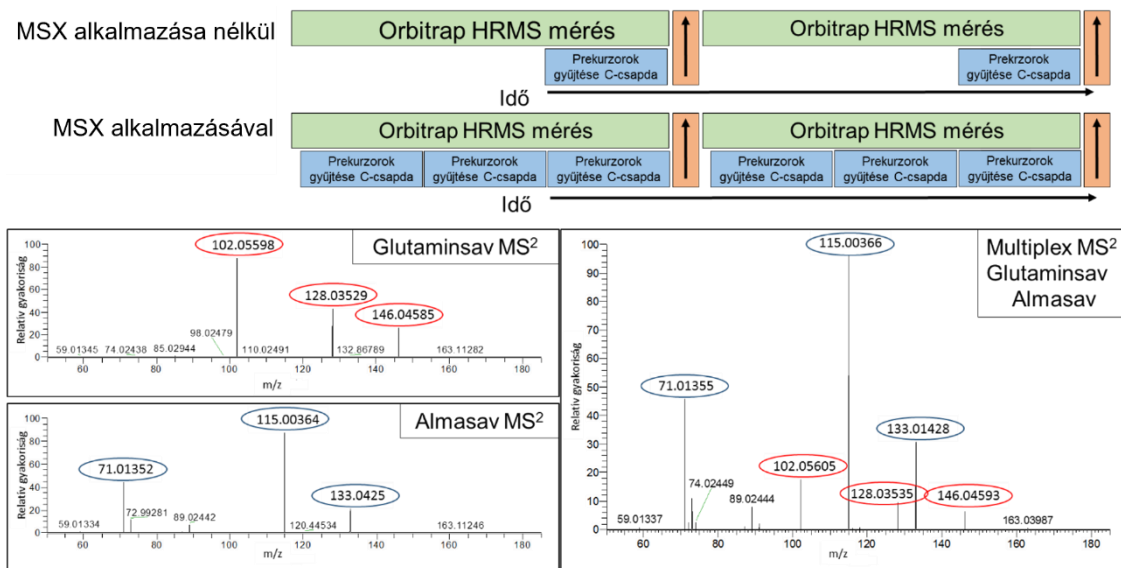
A hagyományos tandem kvadrupól tömegspektrométerektől eltérően a hibrid Orbitrap készülékekben a kvadrupól szerepe csak a szülőionok elkülönítésére, kiválasztására korlátozódik. A fragmentáció nitrogén gáz felhasználásával az ütközési cellában játszódik le (**1. ábra**). A térben elkülönülő ütközési cella teszi lehetővé, hogy a pontos tömeg detektálásához szükséges ultranagy vákuum biztosított legyen az analizátoron belül. Az ionok (szülőionok és fragmensek) összegyűjtése és tárolása mellett a rádiófrekvencián alapuló C-csapda feladata az ionok felgyorsítása és tömeganalizátorba juttatása. Az Orbitrap analizátor egy orsó alakú központi és két egymás felé forduló, hordó alakú külső elektródból tevődik össze. A csapdázott ionok az elektródok közé kapcsolt elektromos térben tömeg/töltés (m/z) arányuktól függő frekvenciával harmonikus oszcillációt végeznek a központi elektród körül. Az oszcilláció frekvenciája közvetlenül detektálható a két külső elektródban indukálódó áram révén, melynek Fourier transzformációja adja a tömegspektrumot. Az Orbitrap tömeganalizátor a C-csapda felől érkező ionokat nem folyamatosan monitorozza, hanem ciklusosan működik; a C-csapdából ultragyors injektálással pontszerű ionfelhőként bejuttatott megfelelő számú ion oszcillációját és x tengely mentén történő kitérését vizsgálva szolgáltatja a tömegspektrumot.

A megoldandó analitikai problémától függően a készüléket különböző adatgyűjtési paraméterekkel működtethetjük. Fragmentálást nem igénylő vizsgálatok esetén, ha a kvadrupól széles tömegtartományt felölelő tömegfilterként működik, MS1 üzemmódban vizsgálhatjuk a töltéssel rendelkező részecskéket, illetve lehetőség van egységnyi tömegek izolálására is (0,4 Da) kiválasztott ion monitorozás módban (Selected Ion Monitoring, SIM). Bizonyos esetekben, pl. komplex mátrixok, izomerek, nyomnyi mennyiségben jelen lévő anyagok vizsgálata esetén a megfelelő szelektivitás eléréséhez vagy azonosításhoz szükség lehet fragmentációra. Az ún. minden ion fragmentálás módban (All Ion Fragmentation, AIF) a kvadrupól által kiválasztott széles tömegtartományba eső összes szülőion egyszerre fragmentálódik és ezáltal nem konkrét szülőionokhoz kapcsolt termékionokat kapunk. Nagyobb szelektivitást biztosít az adatfüggetlen analízis (Data Independent Analysis, DIA), amely során a felhasználó által kiválasztott viszonylag keskeny (néhány 10 Da) tömegtartományba eső valamennyi szülőion fragmentálódik egyszerre, így a termék ionok egy szűkebb m/z tartományba eső szülőionoktól származnak. Nem célzott (non-targeted) fragmentáció elérhető adat függő (data-dependent, DDMS2) adatgyűjtéssel, amely a felhasználó által meghatározott számú, adott küszöbértéket meghaladó abundanciájú, egységnyi m/z tartományba eső ion

fragmentációját jelenti. Célzott (targeted) fragmentáció valósítható meg PRM módban, mely során a felhasználó által (egységnyi m/z felbontásban) kiválasztott szülőionokból keletkező összes termékion egyszerre detektálható.

Az Orbitrap tömeganalizátor felbontása az oszcillációk számával, azaz a mérési idővel arányosan nő és elsősorban ez határozza meg a mérési ciklus hosszát. A kvadrupól tömeganalizátor, a C-csapda és a HCD cella sokkal gyorsabban képes elvégezni a tömeganalízishez szükséges mennyiségű ion áteresztését, csapdázását és fragmentálását egységnyi felbontással, mint amennyi időre szüksége van az Orbitrap analízatornak a töltéssel rendelkező komponensek pontos tömegének meghatározásához. Annak ellenére, hogy a C-csapdában és a HCD cellában az ionok csapdázása és fragmentálása az előző ion csomag tömeganalízisével párhuzamosan történik, egy adott mérési eseményen belül a kvadrupól tömeganalizátor, a C-csapda és a HCD cella hasznos munkája nem tölti ki a teljes mérési eseményt. Abban az esetben, ha a mérési ciklus nem csupán egy, hanem több mérési eseményből tevődik össze, előfordulhat, hogy egy kromatográfiás csúcs egyértelmű detektálásához szükséges 10-12 adatpontot a készülék nem képes rögzíteni. Különösen igaz ez ultra nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) körülmények mellett, ahol keskeny félértékszélességű kromatográfiás csúcsok jellemzőek.

A bemutatott problémát hivatott orvosolni az úgynevezett multiplex mérési technika (multiplex, MSX) (Zubarev and Makarov, 2013). A MSX lényege, hogy a tömeganalízis teljes ideje alatt folyamatosan történik az ionok összegyűjtése, azaz a készülék egy mérési eseményben több szülőiont (maximum 10) gyűjt be – és a mérési módszertől függően - azokat egyszerre injektálja az Orbitrap tömeganalizátorba, illetve MS2 mérések esetén a szülőionokat egymás után fragmentálja és a keletkező fragmenseket együtt juttatja az analízatorba (**2. ábra**). Mivel az egy mérési eseményen belül begyűjtött töltéssel rendelkező részecskéket (akár szülőionokat, akár fragmenseket) a tömeganalizátor egy időben analizálja, azok egy tömegspektrumon jelennek meg. A MSX technika alkalmazása mellett a készülék valamennyi elektro-optikai berendezése a teljes mérési ciklusban hasznos munkát végez, ezáltal a készülék teljesítménye maximálisan kihasználható. Továbbá a mérési események száma csökkenthető, ezáltal a teljes mérési ciklus hossza rövidíthető. Ennek köszönhetően a készülék több adatpontot képes rögzíteni egy adott kromatográfiás csúcsról.



2. ábra: Mérési ciklus felépítése MSX alkalmazásával és alkalmazása nélkül

A multiplex mérési technikát elsőként a proteomikában alkalmazták DIA mérési üzemmóddal kombinálva. A MSX-DIA eljárás rövidebb pásztázó ciklusok véletlenszerű kiválasztásán alapul, melynek következtében olyan molekulák is azonosíthatók, melyek a hagyományos DIA analízis során nem különíthetők el, mert tömegük kevéssé tér el és fragmentációjuk megegyezik (Egertson et al., 2013). A DIA és MSX-DIA módszereket Sidoli és mtsai hasonlították össze hiszton fehérjék analízise során. Eredményeik szerint a multiplex adatgyűjtés kétszer több MSMS scant, átlagosan 5%-kal több full scant, kevesebb háttériont és kevésbé komplex extrahált ion kromatogramokat eredményezett (Sidoli et al., 2016). A DIA-MSX mérési üzemmód előnyeit kihasználva a későbbiekben sikeresen fejlesztettek kvantitatív módszert direkt infúziós mintabevételt alkalmazva 200 hiszton peptid analíziséhez is (Sidoli et al., 2019).

A proteomikai alkalmazások mellett kismolekulák kvalitatív analízise is megoldható a DIA-MSX mérési technikával. Wang és társai 2017-ben olyan módszert dolgoztak ki, ami alkalmas volt 448 peszticid kimutatására zöldségekből és gyümölcsökből. Munkájuk során független full scan-DDMS2 adatgyűjtés alkalmazásával valamennyi peszticid felhasználásával egy adatbázis építettek, ami tartalmazta valamennyi vizsgált peszticidre jellemző retenciós időt, valamint a szülőionok és a fragmensek pontos tömegét. A kvalitatív mérések Full MS/DIA-MSX technikával történtek. A full scan mérési esemény biztosította az adott peszticid retenciós idejét a DIA adatgyűjtés pedig a fragmensek pontos tömegét. Végző módszerük 94%-os hatékonyságúnak bizonyult a vizsgált vegyületeket 10 µg/kg koncentrációban tartalmazó

gyümölcs és zöldségminták analízise során (Wang et al., 2017). A kutatócsoport ugyanezen alapelvek mentén fejlesztett módszert 105 állatgyógyászatban használt gyógyszermaradvány analízisére tejből. A módszer 96%-os hatékonyságúnak bizonyult 10 µg/kg vizsgált komponens koncentráció mellett (Wang et al., 2018). Ugyancsak DIA-MSX kvalitatív mérési módszert dolgoztak ki 58 mikotoxin kimutatására zöld teából (Jia et al., 2019). Amennyiben a DIA mérési üzemmódot multiplex mérési technikával kombináljuk jelentősen csökkenthető a mérési események száma, így a ciklusidők rövidíthetők, vagy ugyanolyan hosszú ciklusidő mellett a mérési események száma növelhető, így pontosabb detektálást érhető el.

Szintén proteomikában alkalmazták először a multiplex technikát kvantitatív analízis céljából (Gallien et al., 2012). A tanulmányban hármass kvadrupól készülék szelektált reakció monitorozáson (selected reaction monitoring, SRM) alapuló, valamint az Orbitrap készülék SIM, PRM mérési üzemmódjait hasonlították össze és megállapították, hogy a legnagyobb érzékenységet és szelektivitást (LOQ 20 amol) a PRM módszer biztosította. Multiplex alkalmazása tovább növelte a PRM módszer hatékonyságát annak köszönhetően, hogy a vizsgált peptidok száma tovább növelhető volt. A PRM-MSX módszerrel 770 élesztő peptid mennyiségét határozták meg 60 perc futási idő mellett. Megállapították, hogy multiplex mérések esetén az egy mérési eseményben egy ionra jutó akkumulációs időt osztani kell az egy mérési eseményben multiplexált szülőionok mennyiségével. Erre azért van szükség, hogy az adott mérési eseményben multiplexált ionok áteresztése, csapdázása és fragmentálása ne legyen hosszabb idő, mint az Orbitrap analizátor mérési ideje, mivel abban az esetben a MSX technika alkalmazása értelmét veszítené.

Meg kell jegyezni, hogy multiplex mérési üzemmód esetén az egy tömegspektrumon megjelenő több szülőionokhoz tartozó fragmensek értelmezése és kvantitatív, kvalitatív célokra történő felhasználása, csak az Orbitrap készülékekre jellemző nagy felbontás miatt lehetséges. Nagy felbontás alkalmazása nélkül a kapott spektrumok értelmezhetetlenek lennének, hiszen a hasonló m/z értékű jelek átlapolódnának.

3.2 Központi metabolitok és MS alapú mérés technikájuk

3.2.1 Központi metabolitok, mint biomarkerek

Az élő szervezetek a szerves tápanyagból különböző prekursorokat készítenek, amelyeket felhasználnak sejtalkotók felépítéséhez, energiatermeléshez, és egyéb endergonikus folyamataikhoz. A fő energia előállító útvonalakként is funkcionáló központi metabolikus útvonalak, a glikolízis, a pentóz-foszfát útvonal (PPP) és a citromsavciklus enzimatikus lépések sorozatán keresztül alakítják át a cukrokat metabolikus szempontból fontos prekursorokká és keresztezik a különböző anabolikus (lebontó) és katabolikus (bioszintetikus) útvonalakat (Sudarsan et al., 2014).

A tíz enzimatikus reakcióból álló glikolízis során a kiindulási glükóz molekulából oxidációs lépéseket követően két piruvát képződik, miközben adenzin-trifoszfát (ATP) és nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) termelődik. A legtöbb köztitermék valamilyen szénhidrát-foszfát típusú vegyület (Litwack, 2018).

A glikolízissel párhuzamos útvonal, a PPP eredményeképpen többek között a nukleotid bioszintézis prekursora, a ribóz-5-foszfát keletkezik. Kémiai szempontból vizsgálva a PPP köztitermékei a glikolízishez hasonlóan szénhidrát-foszfát jellegű vegyületek (Kathagen-Buhmann et al., 2016).

A citromsavciklus valamennyi aerob organizmusban lejátszódó folyamat, amely során a szénhidrátokban, zsírokban és fehérjékben elraktározott energia acetil-koenzim A oxidációja révén szabadul fel. Továbbá, a ciklus egyes elemei bizonyos aminosavak prekursorai (Berg et al., 2002).

A központi metabolikus útvonalak esszenciális mivolta miatt, a bennük szereplő köztitermékek mennyiségének változása számos megbetegedésre enged következtetni. Többek között a citromsavciklusban szerepet játszó enzimekben történő örökölt és szerzett mutációk összefüggésbe hozhatók többfajta rákos megbetegedéssel is, mint például a mellékvesevelő rákkal (Jochmanova and Pacak, 2016).

A citromsavciklus elemeinek vizsgálata ugyancsak elengedhetetlen a metasztatikus tumor sejtek vizsgálatához, ugyanis több kutatás is bebizonyította, hogy a ciklusban részt vevő metabolitok mennyisége metasztázis esetén megnő (Simões et al., 2015; Caneba et al., 2012).

Az elmúlt években több kutatás is részletesen foglalkozott a borostyánkőssavval, mint lehetséges tumormarkerrel. Egyes kutatások szerint a rákos sejtekben a

borostyánkősav-dehidrogenáz változó expressziójának köszönhetően felhalmozódó borostyánkősav epigenetikus változásokat indukál, megváltoztatja a rákos sejtek metabolizmusát, továbbá epitélium-mezenchimális átmeneteket idéz elő (Dalla Pozza et al., 2020). Wang és mtsai szerint (Wang et al., 2014) a borostyánkősav mennyiségi meghatározásával megvalósítható az orális laphámrák korai kimutatása. Zhu és mtsai az egészséges emberekhez képest szignifikánsan nagyobb borostyánkősav koncentrációt észleltek a vastagbélrákban szenvedő betegek vérében (Zhu et al., 2015).

A vizeletben megemelkedett mennyiségben megjelenő glutársav jelezheti egy ritka betegség, az egyes típusú glutársav acidurea kialakulását, amit a glutaril-CoA dehidrogenáz örökletes hiánya okoz (Kölker et al., 2011).

A tumorsejtek metasztatikus sajátosságait célzó kutatások fontos eleme az aminosavak vizsgálata, ugyanis az aminosavak mennyisége befolyásolhatja a rákos sejtek metasztatikus viselkedését (Fu and Meadows, 2007). A glutamin lebontásban történő zavarok összefüggésben állnak a nemalkoholos steatohepatitis kialakulásával, így a glutamin a betegség potenciális biomarkere lehet (Garcia Whitlock and Titchenell, 2020). Ugyancsak biomarkernek tekinthető az aszparagin és az aszparagin-szintáz, amelynek elsősorban a leukémia kimutatásában van szerepe (Lorenzi et al., 2006). Több kutatásban is beszámoltak már a D-szerin csökkent szintjéről. Ezek alapján a közelmúltban folyó kutatások arra a következtetésre jutottak, hogy a szerin szint csökkenése a skizofrénia és a depresszió potenciális biomarkere lehet (MacKay et al., 2019).

Mint azt az előző példák jól szemléltetik, az egyes aminosavak mennyiségében bekövetkező változások bizonyos betegségek biomarkerének tekinthetők. Ugyanakkor aminosav profil felállításával és vizsgálatával is következtethetünk egyes betegségek kialakulására. Egészséges és rákos gyermekek vérének aminosav profilját összehasonlítva szignifikáns csökkenést figyeltek meg a vizsgált onkológiai betegek esetén a glutamin mennyiségében, míg szignifikáns növekedést az aszpartát, glutaminsav, aszparagin, szerin, citrullin és triptofán mennyiségében (Synakiewicz et al., 2017).

Mint az a bemutatott példákon jól látszik, a különböző citromsavciklus elemek és a hozzájuk kapcsolódó aminosavak és egyéb szerves savak mennyiségi meghatározásával számos betegség kimutatható, illetve több biológiai folyamat nyomon követhető. Ezen metabolitok mennyiségi analízise a korai diagnózison túl, a manapság egyre inkább elterjedt személyre szabott kezelések és gyógyszerfejlesztések szempontjából is döntő.

3.2.1 Központi metabolitok mérése biológiai mintákból

A központi metabolitok nagy száma, változatos kémiai tulajdonságai és széles koncentráció tartományt felölelő előfordulásuk a biológiai mintákban nagy kihívást jelent analitikai szempontból. Ezek a kis molekulatömegű cukrok, cukor-foszfátok, nukleotidok, karbonsavak poláris vegyületek, meghatározásuk különböző analitikai módszerekkel valósítható meg.

Mérésükhöz a leggyakrabban alkalmazott technika a GC-MS (Eylem et al., 2022), mellyel egy kétlépéses származékképzést követően szinte valamennyi központi metabolit egyetlen analízissel meghatározható. A módszer hátránya, hogy a származékképző reagensek bomlékonysága miatt a reakciók vízmentes körülményeket igényelnek, viszont a meghatározandó metabolitok a biológiai mintákban vizes közegben találhatóak, ezért a minták bepárlása/liofilizálása szükséges, ami a vegyületek bomlásához vezethet (Guo and Li, 2010).

A központi metabolitok LC-MS alapú meghatározásakor a legnagyobb nehézséget az jelenti, hogy a legtöbb központi metabolit poláris, szolvatált körülmények között ionos vagy ikerionos vegyület, így a legtöbb, általánosan elterjedt hidrofób karakterű fordított fázisú tölteten visszatartás nélkül halad át (Moldoveanu and David, 2013). A probléma kiküszöbölhető származékképző reagensek alkalmazásával, ionpárképző kromatográfia (ion-pairing chromatography, IPC), vagy hidrofil interakciós folyadékkromatográfia (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) használatával.

A metabolitok származékképzése révén nemcsak a retenció, de az érzékenység is növelhető fordított fázisú töltet alkalmazása mellett. Különböző származékképző reagensek terjedtek el, pl. *o*-benzil-hidroxilamin (OBHA) (Tan et al., 2014), ami alkalmazható karbonil és karboxil csoportok átalakítására és a keletkező származékok pozitív és negatív ionizációs módban egyaránt mérhetők. Továbbá a dimetil-amino-fenacil-bromid alkalmas karboxil-, amino-, és tiol-csoportok együttes átalakítására, kiterjesztve ezzel a vizsgálható metabolitok körét (Willacey et al., 2019).

Az ionpár kromatográfia a poláris, ionos metabolitok meghatározását azáltal teszi lehetővé, hogy a mozgó fázisban jelen lévő ellentétes töltésű reagens hatására kialakuló hidrofób ionpárok a fordított fázisú állófázison nagyobb visszatartást szenvednek (Lu et al., 2010). Az ionpár képző reagensnek az MS detektálás miatt megfelelően illékonynak kell lennie, ezért a központi metabolitok meghatározásához

alkil-aminok, mint például tributil-amin (Büscher et al., 2009; Lu et al., 2010) és a tributil-ammónium-acetát (Luo et al., 2007) alkalmazható.

Széles körben elterjedt poláris vegyületek LC-MS alapú mérésére a hidrofíli interakciós folyadékkromatográfia (HILIC), ami kiválóan alkalmas központi metabolitok mérésére is (Tang et al., 2016). A HILIC állófázisok legtöbb esetben hidrofíli jellegűek, így a gradiens HILIC módszerek az elválasztás elején magas szerves oldószer tartalmú mozgó fázist áramoltatnak az oszlopon, majd fokozatosan növelik a vizes pufferes eluens részarányát a mozgó fázisban, amely hatására a vizsgált poláris komponensek eluálódnak az oszlopról. Napjainkban nem csak szilanol funkciós csoporttal rendelkező állófázisokat (Themelis et al., 2017) alkalmaznak poláris vegyületek elválasztására, hanem amino (King et al., 2019), amid (Gika et al., 2012), (Tsochatzis et al., 2019), diol (Cuykx et al., 2017), valamint ikerionos (Huang et al., 2012; Westrop et al., 2015) töltetek is elterjedtek a metabolomikai kutatásokban. A HILIC oszlop alkalmazása esetén szélesebb csúcsokat, retenciós idő eltolódásokat tapasztalhatunk, továbbá a magas szerves oldószer koncentráció mellett induló gradiens elválasztások miatt a mintákat az injektáláshoz szerves oldószerben kell oldani, ami gyakran oldhatósági problémákhoz vezet. A HILIC módszerek legnagyobb hátránya, hogy általában hosszú re-ekvibrációs idővel rendelkeznek, így igazán gyors módszerek nem fejleszthetők segítségükkel (McCalley, 2018).

Mint azt az előző példából is láttuk, a központi metabolitok LC-MS detektálása poláris mivoltuk miatt csak különleges mozgó vagy állófázis alkalmazásával lehetséges. A szakirodalomban nem találunk a három bemutatott technika valamelyikét alkalmazó olyan módszert, ahol több központi metabolit mennyiségi meghatározása öt percnél rövidebb analízis idő mellett valósulna meg.

Rövidebb analízis idő érhető el direkt infúziós MS (DI-MS) (Chekmeneva et al., 2015), vagy rövid fordított fázisú oszlopok alkalmazásával (Gray et al., 2016), de mint azt a bevezetőben említettem, a HRMS készülékek relatív hosszú analízis ideje nem teszi lehetővé, hogy a legszelektívebb üzemmódjukban a készülék ionforrásába egy időben érkező 10 vagy annál több komponenst analizáljunk.

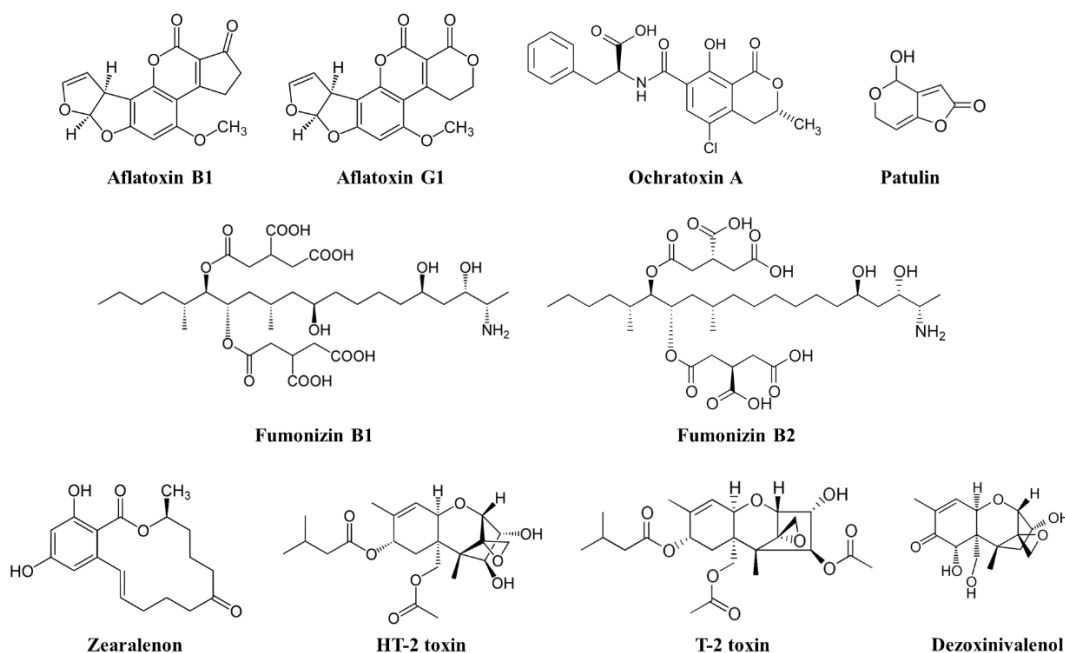
3.3 Mikotoxinok jellemzői és analízisük

3.3.1 Mikotoxinok jellemzése

Mikotoxinoknak nevezzük a fonalgombák által extracellurálisan kiválasztott mérgező vegyületeket. Az emberre nézve krónikus és akut toxikus hatással rendelkeznek. A krónikus toxicitás esetén a hosszú időn át tartó alacsony dózis okozhat daganatos elváltozásokat, míg az akut toxicitás gyors és egyértelmű jeleket mutat (Freire and da Rocha, 2016). Az emberek és az állatok elsősorban mikotoxinnal fertőzött élelmiszer bevitel kapcsán kerülhetnek kapcsolatba mikotoxinokkal. A mikotoxinok feldolgozott élelmiszerben is megjelennek, ugyanis a legtöbb mikotoxin hőstabil, azaz sütést követően változatlan formában jelenik meg a készételekben (Schaarschmidt and Fauhl-Hassek, 2021).

Az élelmiszerekben hat kiemelt mikotoxin vagy mikotoxin-csoport létezik: az aflatoxinok, a trichothének, a zearalenon (ZEA), a fumonizinek, az ochratoxin (OTA) és a patulin (Alshannaq and Yu, 2017).

A mikotoxinok termelésére képes fonalgombákat két csoportba soroljuk attól függően, hogy mikor kolonizálják az élelmiszer alapanyagokat. A szántóföldi penészgombák, amelyek a magasabb nedvességtartalmat kedvelik (>20%), a betakarítás előtt fertőzik meg a növényeket. Ezzel szemben az alacsonyabb víztartalom mellett is életképes raktári penészgombák a növények betakarítása után termelnek toxinokat. A szántóföldi gombafertőzések leggyakoribb okozói a *Fusarium* és *Alternaria* nemzetségbe tartozó gombák, különösképpen a *Fusarium culmorum* és a *F. graminearum* fajok. Érdeemes megjegyezni, hogy a *Fusarium* fertőzések kapcsán az élelmiszerekbe jutó mikotoxinokat nem csak egy, hanem többféle gombafaj is okozhatja. Az említett raktári penészgombák leggyakoribb képviselői az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetségbe tartozó fajok (Tanaka et al., 1988).



3. ábra: Élőlényekre leginkább ártalmas mikotoxinok szerkezete

Az egyik legismertebb mikotoxin származékok az aflatoxinok, melyek kémiai szerkezetüket tekintve difuranokumarin származékoknak tekinthetők. Összesen 18 változatuk ismert. A legfontosabbak az aflatoxin G1 (AG1), az aflatoxin G2 (AG2), az aflatoxin B1 (AB1), az aflatoxin B2 (AB2), az aflatoxin M1 és aflatoxin M2 (Iram et al., 2016). Legnagyobb mennyiségben a magas páratartalmat kedvelő *Aspergillus flavus* és *A. parasiticus* törzsek képesek aflatoxinok termelésére (Kumar et al., 2016). Az aflatoxin B1, B1, G1 és G2 nagy mennyiségben fordulhat elő olajos magvakban, szójában, kölesben, rizsben, kukoricában és más gabonafélékben (Mahato et al., 2019), míg az aflatoxin M1 és M2 elsősorban tejben jelenhet meg (Duarte et al., 2013). Valamennyi aflatoxinnak súlyos májkárosító és rákkeltő hatása van (Gong et al., 2016). A hatvanas években aflatoxin mérgezés volt az emlékezetes angliai pulykavész okozója, ami több mint százezer állat pusztulásához vezetett (Wannop, 1961).

Az *Aspergillus* és *Penicillin* fajok különböző ochratoxin származékok termelésére is képesek. Az ochratoxinok legismertebb képviselője a legnagyobb biológiai aktivitással rendelkező ochratoxin A (OTA), amely szerkezetét tekintve egy dihidrokumarinhoz kapcsolódó β -fenilalanin. Vese- és májkárosító, valamint teratogén hatása ismert. Az OTA kimutatható különböző zöldség és gyümölcsfélékben, továbbá rizsben, kukoricában és földimogyoróban is (Tao et al., 2018).

Ugyancsak *Penicillium* és *Aspergillus* gombafajok másodlagos metabolitja az antibiotikus hatású patulin. A patulin állatra és embere erősen mérgező, rákkeltő és teratogén hatású vegyület. Leginkább különböző zöldségekben és gyümölcsökben, illetve a belőlük készült élelmiszerekben fordul elő, mint például almálében és almaborban. A gabonafélékben előfordulása kevésbé jellemző (Puel et al., 2010).

A szfingolipidekkel szerkezeti hasonlóságot mutató fumonizinek képesek azok bioszintézisének gátlására, így jelentős toxikus hatással rendelkeznek, sejthalált vagy sejtburjánzást indukálhatnak. Fumonizinek termelésére elsősorban *Fusarium* törzsek képesek, mint például a *F. verticillioides*, a *F. proliferatum*, de az *Alternaria* nemzetségbe tartozó gombákból is mutattak már ki fumonizin vegyületeket. Elsősorban kukoricában és kukorica alapú élelmiszerekben fellelhető mikotoxinok (Alshannaq and Yu, 2017). Legfontosabbak képviselőik a fumonizin B1 (FB1), fumonizin B2 (FB2), azonban több mint ötven fumonizin származék ismert (Bartók et al., 2006). Magyarországon az egyik legnagyobb problémát a *Fusarium* fertőzések okozzák (Tima et al., 2016).

Szerkezete miatt az ösztrogénhez hasonló bioaktivitással rendelkező vegyület a zearaleon (ZEA) és származékai. A ZEA a szervezetbe kerülve nem okoz heveny mérgezést, viszont különböző nőgyógyászati jellegű rendellenességeket válthat ki. ZEA-val fertőzött ételek fogyasztása esetén megfigyeltek már méh megnagyobbodást, petefészek és méh működési zavarokat. Megjelenése különböző gabonafélékben, rizsben és kukoricában a leggyakoribb, elsősorban a betakarítást előtti időszakban jelenik meg a növényekben (Alshannaq and Yu, 2017).

Az egyik leggyakoribb mikotoxin származékok a terpén vázas trichotecének. Kémiai szerkezetüket tekintve tetraciklusos 12,13-epoxitrichotecén-9 variánsok. Toxicitásuk az alapvázhoz kapcsolódó funkciós csoportoktól függően változhat (McCormick et al., 2011). Legfontosabb képviselőik a T-2 toxin (T2), a HT-2 toxin (HT2) és a dezoxinivalenol (DON), más néven vomitoxin. Erősen toxikus vegyületek, elsősorban a hámjellegű szerveket károsítják (Pinton et al., 2012). A gabonafélékben leggyakoribb trichotecén a DON.

A felsoroltakon kívül még számos élettani hatással rendelkező mikotoxin ismert, ám az említett vegyületek fordulnak elő leginkább az élelmiszerekben és legnagyobb koncentrációban, ezáltal ezen vegyületek élelmiszerbiztonsági kockázata a legnagyobb, ezért megengedett mennyiségük hatóságilag szabályozott.

3.3.2 Mikotoxinokra vonatkozó élelmiszerbiztonsági előírások

A Föld növekvő lakossága miatt a minőségi élelmiszerhez való hozzájutás napról-napra egyre nagyobb kihívás elé állítja az emberiséget. Az elmúlt években a megtermelt gabonában megnövekedett a mikotoxinnal való fertőzések esélye, elsősorban a változó éghajlati viszonyoknak és az intenzív mezőgazdaságnak köszönhetően. A szennyezett gabonatermékek nem csupán emberekre veszélyesek, hanem a szennyezett gabonákat fogyasztó állatokra is. Mivel a mikotoxin szennyezések az emberi fogyasztásra szánt állati és növényi élelmiszereket egyaránt érintik, az élelmiszerbiztonság egyik fontos sarokköve a mikotoxinok mennyiségi vizsgálata (Bullerman, 1979).

A helyes mezőgazdasági gyakorlat alkalmazásával, amely magába foglalja a gabonák megfelelő módon történő szárítását, tárolását és válogatását, a mikotoxinok okozta egészségügyi kockázat és gazdasági kár egyaránt csökkenthető. A legsúlyosabb egészségkárosító hatással bíró és leggyakrabban előforduló mikotoxinok legmagasabb megengedett mennyiségét az Európai Unió rendeletekkel szabályozza, melyek betartásáért az illetékes hatóságok felelősek.

Az élelmiszerekben előforduló szennyező anyagok felső határértékét az Európai Unióban, köztük mikotoxinokét is az Európai Bizottság 1831/2003/EK rendelete szabályozza (**1 táblázat**). Az ide vonatkozó szakirodalom alapján a megállapított határértékek alatti mértékben mikotoxinnal szennyezett élelmiszerek rendszeres fogyasztása nem okoz negatív egészségügyi hatást. A megállapított határértékeknél alacsonyabb mikotoxin tartalom a helyes mezőgazdasági, halászati és élelmiszeripari gyakorlat alkalmazásával és az élelmiszer fogyasztáshoz kapcsolódó kockázat figyelembevételével elérhető. A rendelet ugyanakkor kiköti, hogy a közegészség hatékony védelme érdekében a felső határértéket meghaladó szennyező anyag tartalmú termék nem hozható forgalomba, sem önállóan, sem más élelmiszerekkel keverve.

A Bizottság 2013-ban vezetett be egy ajánlást (2013/165/EU), melyben élelmiszerek HT2 és T2 tartalmának monitorozására tesznek javaslatot. Az ajánlásban indikatív értékeket határoznak meg, amely felletti többszöri kimutatás esetén ajánlott vizsgálatokat végezni az említett toxinok nagy mennyiségét eredményező tényezők feltárására. A megállapított indikatív mennyiség feldolgozatlan kukorica esetén T2 és HT2 toxinra 200 µg/kg, míg búzára 100 µg/kg (**1. táblázat**)

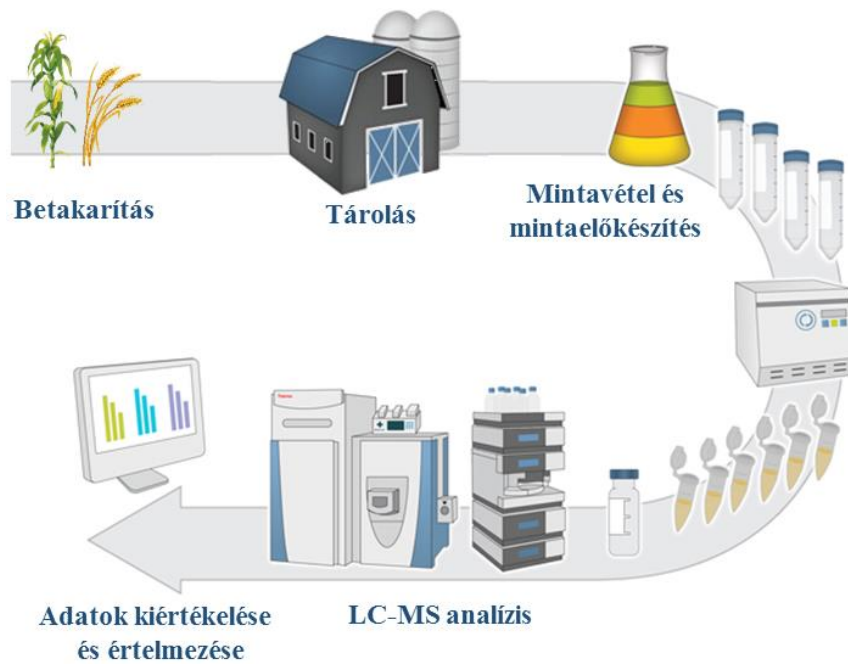
1. táblázat: Mikotoxinok felső határértékei feldolgozatlan búzában és kukoricában

	Búzára vonatkozó határértékek (µg/kg)	Kukoricára vonatkozó határértékek (µg/kg)
AB1	2	5
AB2	B1, B2, G1, G2 összege 4	B1, B2, G1, G2 összege 10
AG1	B1, B2, G1, G2 összege 4	B1, B2, G1, G2 összege 10
AG2	B1, B2, G1, G2 összege 4	B1, B2, G1, G2 összege 10
ZEA	100	200
OTA	5	5
DON	1250	1750
FB1	-	B1, B2 összege 2000
FB2	-	B1, B2 összege 2000

A mikotoxinokat kiválasztó fonalas gombák nem egyenletesen növekednek a gazdanövényen, ezért a természetes minták toxintartalma nem tekinthető homogénnek. Ebből adódik, hogy a mikotoxin analízisek során az egyik legnagyobb hibaforrás általában a helytelen mintavételi gyakorlat. A Bizottság ezért nem csak az egyes élelmiszereket szennyező mikotoxinok felső határértékét állapította meg, hanem egy külön rendeletben a helyes mintavételi és elemzési eljárásokat is előírta (401/2006/EK rendelet). A rendelet meghatározza, hogy az alkalmazott analitika eljárások során milyen tartományban fogadható el az egyes toxinokra kalkulálható visszanyerés. Feldolgozatlan búzá és kukorica tekintve, a megállapított határérték esetén aflatoxinokra 70-100% közötti, OTA-ra 70-110% közötti, DON-ra ZEA-ra, FB1-re és FB2-re 70-120% közötti, T2 és HT2-re 60-130% közötti visszanyerés fogadható el.

3.3.3 Mintaelőkészítési eljárások mikotoxinok nyomnyi kimutatásához

A fogyasztók egészségének védelme és a hatályban lévő jogszabályok által előírt követelményeknek való megfelelés miatt kiemelten fontos olyan megfelelő érzékenységgel és pontossággal rendelkező vizsgálati módszerek kidolgozása, amelyek alkalmasak mikotoxinok nyomnyi kimutatására. A vizsgálati eljárások alkalmával a betakarított, majd eltárolt gabonákból első lépésben reprezentatív mintavétel történik, majd egy megfelelő mintaelőkészítési eljárás során a mikotoxinokat kivonják a növényi mintákból, illetve olyan formába hozzák, hogy valamilyen műszeres analitikai módszerrel vizsgálhatók legyenek, végül a kapott adatokat értelmezik (**4. ábra**).



4. ábra: Rutin mikotoxin vizsgálat folyamata

A mintaelőkészítési eljárások első lépése a gabona-magok őrését követő szilárd-folyadék extrakció. A jelenleg alkalmazott több toxin egyidejű meghatározását lehetővé tevő ún. multitoxin módszerek során metanol-víz vagy acetonitril-víz keveréket használnak extrakciós oldószerként (Breidbach, 2017) valamilyen szerves savval kiegészítve, ugyanis a fumonizinek és ochratoxinok alacsony pH mellett nyerhetők ki a leghatékonyabban (Capriotti et al., 2014). Ugyanakkor etanol, aceton, etil-acetát és kloroform tartalmú oldószerrendszereket is alkalmaznak (Zhang and Banerjee, 2020). Annak érdekében, hogy a szilárd és folyadék fázis között a lehető legintenzívebb legyen az érintkezés, az extrakciót vertikális rázógép segítségével végzik, esetleg ultrahangos kezelés segítségével növelik az extrakciós hatékonyságot (Zhang and Banerjee, 2020).

A 2003-ban kifejlesztett, eredetileg növényvédőszer meghatározására alkalmazható QuEChERs (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos előkezelési technika (Anastassiades et al., 2003) kisebb módosításokkal mikotoxinok növényekből történő kinyerésére is alkalmazható (Cunha and Fernandes, 2010). A módszer három lépésből áll. Első lépés a már bemutatott szilárd-folyadék extrakció, legtöbb esetben acetonitril vagy acetonitril-víz oldószerkelet alkalmazása mellett. A második lépésben a kapott extraktumot kisózasos folyadék-folyadék extrakciónak (salting-out liquid-liquid extraction, SALLE) vetik alá. A SALLE során a nyers extraktumhoz különböző ásványi sókat tartalmazó porkeveréket adnak, melynek hatására az eredetileg egy fázisú víz és acetonitril tartalmú

elegy két fázisra válik szét. Ideális esetben az alsó vizes fázisban halmozódnak fel a detektálást esetlegesen zavaró sók, míg a felső szerves fázisban a mikotoxinok. A harmadik lépésben a SALLE felső fázisát diszperz szilárd fázisú extrakciónak (Dispersive solid phase extraction, dSPE) vetik alá, azaz valamilyen szilárd adszorbenst adnak a folyadékhoz, amely képes megkötni egyes mátrix komponenseket. Leggyakrabban oktadecil funkciós csoporttal (C18) módosított szilikát, primer és szekunder amin adszorbenst (PSA), vagy aktív szén szorbenseket alkalmaznak, amelyek elsősorban a lipid jellegű mátrix komponenseket hivatottak megkötni. A dSPE eljárás előnye a klasszikus szilárd fázisú extrakcióval (solid phase extraction, SPE) szemben, hogy gyorsabban kivitelezhető, ugyanis egy homogenizálási és centrifugálási lépésből áll. Ugyanakkor az SPE eljárások segítségével nagyobb mértékben csökkenthető a mátrixhatás a dSPE-hez képest. Abban az esetben, ha a mátrixhatás jelentős és ezért az analitikai módszer nem megfelelően érzékeny, érdemes az SPE módszert alkalmazni. Ha viszont a mátrixhatás kisebb mértékű csökkentése is elegendő, a dSPE is megfelelő eljárás lehet. Amennyiben szükséges, a dSPE vagy SPE mintaelőkészítési eljárást követően a mintákat koncentrálni is lehet, az oldószer valamilyen inert gázzal történő lepárlásával, és kisebb térfogatba történő visszaoldásával. Érdemes megjegyezni, hogy a koncentráció hatására nem csak a vizsgált mikotoxinok, hanem a mátrix komponensek koncentrációja is növekszik, ezért a töményítés az érzékenység növelése szempontjából nem minden esetben kifizető.

Nagy tisztaságú minták készíthetők az antigén kölcsönhatáson alapuló immunoaffinitás oszlopok (Immunoaffinity Column, IAC) alkalmazásával. Az eljárás az SPE eljáráshoz hasonló, ugyanis a nyers extraktumokat egy szilárd tölteten vezetjük át, ami a mikotoxinokat megköti, azonban a mátrix komponensek nem lépnek kölcsönhatásba a szilárd fázissal. Ennek köszönhetően a későbbiekben a töltetről lemosott mikotoxinok mellett, elenyésző mennyiségben vannak jelen a zavaró mátrix komponensek. Az IAC alapú módszerekkel a minták jelentős mátrixhatás növekedés nélkül töményíthetők. A módszer hátránya, hogy alkalmazása jóval költségesebb, mint a SPE vagy dSPE módszerek (Kong et al., 2013).

3.3.4 Mikotoxinok kvantitatív analitikai vizsgálata

A mikotoxinok felfedezése, megismerése, és a hozzákapcsolódó kutatások szorosan összefüggenek a detektálásukra alkalmazott analitikai vizsgálatokkal.

Az aflatoxinok felfedezése óta a vékonyréteg kromatográfia volt a mikotoxin-analítika hagyományos eszköze, többek között innen ered az aflatoxinok neve is, ugyanis UV fény alatt a vékonyrétegen az AG1 és AG2 zöld (green) míg az AB1 és AB2 kék (blue) színű foltot ad (Sargeant et al., 1961). A vékonyréteg kromatográfia bár elégséges módszernek bizonyult a mikotoxinok kimutatásához, az analitikai műszerek fejlődése miatt a jóval szelektívebb és ezáltal megbízhatóbb elválasztáson alapuló eljárások fokozatosan kiszorították. Alacsony költségei miatt ugyanakkor a vékonyréteg kromatográfiai eljárásokat a mai napig használják (Braicu et al., 2008).

Alternatív módszerként meg kell említeni a gázkromatográfiai (Gas Chromatography, GC) módszereket is. Bár a GC és GC-MS módszerek számos kismolekula kimutatására bizonyultak hatékony platformnak, a legtöbb mikotoxin nem elég illékony a származékképzés nélküli analízishez (Pereira et al., 2014). Ennek köszönhetően a mintaelőkészítési eljárások körülményesek, és nagyban függenek a származékképzési reakció hatékonyságától (Rodríguez-Carrasco et al., 2014).

Mikotoxinok kimutatására a legelterjedtebbek a folyadékkromatográfiai eljárások ultraibolya (ultraviolet, UV), fluoreszcens (fluorescent, FL), vagy MS detektorok alkalmazásával. A 2 µm-nél kisebb pórusméretű kolonnákat alkalmazó UHPLC módszerek megjelenése nagy előrelépést jelentett a mikotoxinok analízisében. Az UHPLC módszerek – az alkalmazott detektortól függetlenül - gyorsabbak, alkalmazásukkal kisebb félértékszélességű csúcsok és jobb kimutatási határok érhetők el, mint egy HPLC módszer segítségével (Fekete et al., 2014).

A HPLC-UV módszerek az általuk biztosított magas kimutatási határok és a mátrixkomponensek zavaró hatása miatt háttérbe szorultak a fluoreszcens detektálást (HPLC-FLD) alkalmazó módszerek mellett. A specifikus elnyelési és kibocsátási hullámhosszt alkalmazó HPLC-FLD módszerek jóval szelektívebbek, ugyanakkor érzékenyebbek, mint a HPLC-UV módszerek (Jiménez and Mateo, 1997). Mivel a legtöbb mikotoxin nem fluoreszkál, a vizsgált vegyületeket származékképezni kell. Leginkább költséghatékonyak az elválasztást megelőző származékképzést alkalmazó eljárások (Jaimez et al., 2000), de elterjedtek az oszlop utáni származékképezések is (Traag et al., 1987). A HPLC-FLD módszerek előnye, hogy a szükséges beruházási költségek lényegesen alacsonyabbak egy HPLC-MS módszer hasonló költségeinél. Ugyanakkor a HPLC-FLD detektálások hátránya, hogy valamennyi fluoreszkáló vegyülettől el kell választani a vizsgált mikotoxinokat, így a módszerek az ismert HPLC-MS módszereknél lényegesen hosszabbak.

Az előbbi példáknál nagyobb szelektivitással rendelkeznek a tömegspektrometriás detektálást alkalmazó módszerek, hiszen az adott komponensre a retenciós időn túl a belőle képződő molekulaion tömege is jellemző. Különösen igaz ez a tandem MS eljárásokra (MS/MS), ahol egy komponens molekulaionjából keletkező - legtöbb esetben - egyedi fragmenseket vizsgáljuk. Így az adott mikotoxin azonosítható a retenciós idő, a molekulaion tömege, az abból keletkező fragmensek tömegei, illetve azok intenzitás aránya segítségével (Rauniyar, 2015). Mivel a mátrixkomponensek között nagy valószínűséggel nem találunk olyan vegyületet, amely valamennyi, az előbb felsorolt paraméterében megegyezik a vizsgált mikotoxinnal, a HPLC-MS/MS módszerek alkalmazásakor nem szükséges elválasztani valamennyi mátrixkomponenstől a vizsgált mikotoxinokat. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy mátrixkomponensek jelenléte az ionforrásban ionelnyomást (ionsuppression) eredményez, így csökkentheti az érzékenységet. A nagy specifikusságnak köszönhetően az LC-MS/MS módszerek segítségével egy mintában több mikotoxin kimutatására is lehetőségünk van. Jelenleg a szakirodalomban fellelhető módszerek között találunk olyat, amely egy mintából az összes határértékkel rendelkező mikotoxint képes kimutatni egy injektálásból (Spanjer et al., 2008). A mai multitoxin módszerek segítségével $\mu\text{g}/\text{kg}$ koncentráció tartományban tudunk mikotoxinokat kimutatni, jellemzően 10-20 perc hosszúságú analitikai futások mellett (De Santis et al., 2017) (Kim et al., 2017).

Napjainkban az egyik legmodernebb mikotoxin kimutatási eljárások a HRMS technikát alkalmazó módszerek, többek között a 2010-es években megjelent hibrid, kvadrupól-Orbitrap készülékeket alkalmazó módszerek. A hibrid, kvadrupól Orbitrap készülékek képesek a vizsgált mikotoxinok fragmenseit nagy tömegpontossággal kimutatni, azaz a teoretikus és a mért tömeg között 5 ppm-nél kisebb a tömegkülönbség. A készülék tömegskálájának rendszeres kalibrálásával ez a tömegkülönbség akár 2-3 ppm is lehet (Castaldo et al., 2019). A nagy tömegpontosságból fakadóan az Orbitrap tömeganalizátorral rendelkező készülékek egyik nagy előnye, hogy jóval kisebb zaj jellemző rájuk, mint egy hármas kvadrupól MS-re vagy egy repülési idő analizátorral ellátott MS-re (Makarov et al., 2006).

4. Célkitűzés

Az elmúlt évek tömegspektrometriás fejlesztéseinek köszönhetően egyre több kvantitatív analitikai feladat oldható meg rövid, nagy áteresztő képességű módszerek segítségével. Különösen elterjedtek a FIA-MS módszerek. HRMS készülékekben a lassú analízis idő miatt több komponens egymás melletti mennyiségi meghatározása nem valószínűsíthető meg kellő érzékenység mellett, különösen igaz ez a FIA-HRMS mérések esetén, ahol valamennyi mért komponens azonos időben jut az ionforrásba. Ezt a problémát orvosolhatja az Orbitrap készülékekben elérhető MSX mérési technika.

Doktori munkám során célom volt olyan FIA-PRM-MSX módszerek kidolgozása, ahol MSX mérési technikát alkalmazva lehetővé válik több vegyület egyidejű kvantitatív analízise kevesebb, mint 1 perc alatt.

Mivel a szakirodalomban a FIA-PRM-MSX módszereket még nem publikáltak, első lépésként a módszerfejlesztésekhez szükséges alapelvek lefektetése volt a cél.

Célom volt egy olyan FIA-PRM-MSX módszer fejlesztése, amely központi metabolitok kvantitatív mérésére alkalmas. A fejlesztett módszert szerettem volna összehasonlítani kimutatási határ, dinamikus tartomány és linearitás szempontjából egy nem multiplex módszerrel. Hogy megbizonyosodjunk a kidolgozott módszerek alkalmazhatóságáról, különböző mátrixokon kívántuk tesztelni őket. További célom volt a fejlesztett módszerre jellemző mátrixhatás vizsgálata.

Ugyancsak FIA-PRM-MSX alapú módszert szerettem volna fejleszteni mikotoxinok kvantitatív vizsgálatára. Azokat a mikotoxinokat kívántam vizsgálni, amelyek legmagasabb határértékét az érvényben lévő jogszabályok szabályozzák feldolgozatlan búzában és kukoricában. A fejlesztett módszer a jelenlegi módszer validálási ajánlásoknak megfelelően validálni szerettem volna, így vizsgálni kívántam a szelektivitást, a kimutatási határt, a linearitást és dinamikus tartományt, a mátrixhatást és a visszanyerést. Annak érdekében, hogy a kapott analitikai teljesítményjelzők könnyebben értelmezhetőek legyenek, a kimutatási határt, a linearitást és a dinamikus tartományt szerettem volna összehasonlítani egy a szakirodalmi példák alapján fejlesztett UHPLC-MS módszerrel.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Felhasznált anyagok

Munkánk során valamennyi felhasznált vegyszer kereskedelmi forgalomban kapható. A felhasznált oldószerek mindegyike UHPLC-MS tisztaságú volt (VWR, Magyarország). A MgSO_4 , NaCl, trinátrium-citrát, ammónium-formiát, az LC-MS tisztaságú ecetsav és hangyasav és a központi metabolit standardok a Merck Kft. termékei voltak. A mikotoxin standardok közül az AB1, AB2, AG1, AG2, DON, ZEA, verucarol toxinokat a Merck Kft-től, a OTA, T2, HT2 standardokat a Romer Kft-től, míg a Fumonizin standardokat a Fumizol Kft-től szereztük be.

5.2 Központi metabolitok analízise

5.2.1 *Aspergillus nidulans* törzs tenyésztése és extrahálása

A doktori munkám során a Szegedi Mikrobiológiai Gyűjtemény (Szeged Microbiology Collection, SZMC) SZMC 0552 számú *Aspergillus nidulans* törzsét használtuk. A fonalas gombát 500 ml burgonya dextróz (PDB) táptalajon tenyésztettük. Inokuláláshoz 5 ml 0,9% NaCl oldatban felvett 10^6 spóraszámú konídium szuszpenziót alkalmaztunk. A tenyészeteket négy napig inkubáltuk 25 °C-on, 100 fordulat/perc fordulatszámom horizontális rázógépből (VWR, Debrecen, Magyarország).

A négy napos inkubálást követően a fermentlevet és a micéliumot 1,5 μm pórusátmérőjű üvegszálas szűrő segítségével szétválasztottuk, majd a micéliumot liofilizáltuk egy éjszakán át. A liofilizált micéliumot dörzsmozsárban folyékony nitrogénnal elporlasztottuk, majd 1 g-ot mértünk mikrocentrifuga csövekbe. A mintákhoz 1 ml 4 °C-os víz:metanol 6:4 arányú elegyet adtunk, majd a mintákat 5 percig ultrahangos kádban (Elma Ultrasonic Technology) 23 kHz-en kezeltük, jeges fürdőben. Ezek után a mintákat 15 másodpercig vortex (VWR, Debrecen, Magyarország) segítségével homogenizáltuk, majd 10 percig 12000 fordulat/perc fordulatszámommal centrifugáltuk (Eppendorf R, Hamburg, Németország) 4 °C-on. A felülúszót -80 °C-on HPLC fiolákban tároltuk a FIA-PRM-MSX analízisig.

5.2.2 *Arabidopsis thaliana* felnevelése és extrahálása

Arabidopsis thaliana vad típusú (Col-0) magok sterilizálásához 70%-os etanolt és 4%-os hígított nátrium-hipoklorit oldatot alkalmaztunk. Ezt követően a magokat steril vízzel mostuk egy percig öt alkalommal. A csíráztatást műanyag Petri-csészében végeztük 1% szacharózt és 1% növényi agart (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Hollandia) tartalmazó B5 táptalajon (Gamborg B5 Medium Including Vitamins, Duchefa Biochemie). A Petri-csészéket növénynevelő szobába helyeztük, ahol folyamatos megvilágítás mellett ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 21 °C-on tartottuk 5 napig.

Az *A. thaliana* leveleket összegyűjtöttük, majd dörzsmozsárban folyékony nitrogén mellett porrá őröltük. Ezek után 25 mg őrleményt 200 μl víz:metanol 6:4 arányú elegyével nedvesítettünk, majd 1 ml víz:metanol 4:6 elegyet adtunk a mintákhoz. A mintákat a fonalas gomba mintákhoz hasonlóan ultrahangos kezelésnek vetettük alá, kevertettük, illetve centrifugáltuk. A felülúszót -80 °C-on tároltuk FIA-PRM-MSX analízisig.

5.2.3 HO-1-N-1 humán karcinóma sejtek tenyésztése és extrahálása

HO-1-N-1 (JCRB0831) humán karcinóma sejtvonalat DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:F12; Lonza) médiumban tenyésztettük, amely 10% hőinaktivált (56 °C, 30 min) magzati borjú szérumot (EuroClone) tartalmazott, kiegészítve 4 mM glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 $\mu\text{g/ml}$ sztreptomocinnel. A tenyésztéseket 37 °C-on végeztük 5 térfogat százalék széndioxid tartalmú atmoszférában. A sejteket 6 lyukú tálcára ültettük, lyukanként 1.5×10^5 sejtszám mellett.

A 24 órás inkubációt követően a kitapadt sejtekről a felülúszót lemostuk, majd kétszer 500 ml 0,9 százalékos NaCl oldattal mostuk. Ezek után a sejtekhez 500 ml 4 °C-os víz:metanol 6:4 arányú elegyet adtunk, majd sejtkaparó segítségével feltártuk a sejteket. A kapott sejt szuszpenziót mikrocentrifuga csövekbe helyeztük, majd a fonalas gomba és növényi mintákhoz hasonlóan ultrahangos kezelésnek vetettük alá, kevertettük, illetve centrifugáltuk a mintákat. A felülúszót -80 °C-on tároltuk FIA-PRM-MSX analízisig.

5.2.4 FIA-MS paraméterek

A központi metabolitok analízise során használt FIA-MS rendszer egy Dionex UltiMate 3000 UHPLC rendszerhez csatolt Thermo Scientific Q Exactive Plus Orbitrap tömegspektrométerből állt (Thermo Scientific, San Jose, USA). Valamennyi méréshez fűtött elektroporlasztásos ionforrást (heated electrospray ionization, HESI) használtunk. Az MS tömegskáláját minden 24 órában kalibráltuk. Módosított kalibrációs oldatot alkalmaztunk, amely az alábbi vegyületeket tartalmazta: nátrium-dodecil-szulfát (m/z 265.14790), nátrium-taurokolsav (m/z 514.28440), Ultramark 1621 (m/z 1279.99721, 1379.99083, 1479.98444, 1579.97805, 1679.97166), szarkozin (m/z 88.04040), aminovajsav (m/z 102.05605) és ornitin (m/z 131.08260).

A módszerfejlesztést követően az alkalmazott eluens MeOH:H₂O:CH₃COOH 1:1:0.2 arányú elegye volt. Az áramlási sebesség 500 µl/min volt, míg az oszloptermosztát hőmérsékletét 30 °C-ra állítottuk. Az injektálási térfogat minden esetben 5 µl volt. A mérések során egy Phenomenex AQ C18 SecurityGuard előtét oszlopot (Phenomenex, Torrance, USA) alkalmaztunk.

Mind a mérések, mind pedig az adatkiértékelés során Thermo Scientific TraceFinder 4.1 szoftvert használtunk. Az egyes szülőionokhoz tartozó fragmensek kigyűjtését Thermo Scientific Qual Browser 4.0 szoftver segítségével végeztük el. A mennyiségi meghatározások során az egyes szülőökhöz tartozó fragmenseket 3 ppm széles tömegablakban vizsgáltuk. Amennyiben egy szülőion két fragmensét is vizsgáltuk, a két fragmenshez tartozó extrahált ion kromatogram intenzitásaránya közötti maximális eltérés 20 % lehetett. Az egyes fragmenspárokhoz tartozó intenzitásarányt a standard oldatokban tapasztalt arány alapján, manuálisan állítottuk be.

A fragmentációs paraméterek optimalizálása során is FIA-HRMS technikát alkalmaztunk, az ismertett kromatográfiás paraméterek mellett. Minden egyes vegyület 10 µg/ml töménységű oldatát használtunk, MeOH:H₂O 4:6 oldószerben oldva. Első lépésben a vizsgált vegyületek szülőionjait azonosítottuk be, majd azokat diszkrét normalizált fragmentációs energiák (NCE) mellett analizáltuk. Az optimalizációs mérések során a felbontás 70000 volt ($m/z=200$), 2e5 automatikus erősítésszabályozás (AGC) mellett.

A végső MSX módszerben a porlasztó gáz áramlási sebességét 50, a kísérőgáz áramlási sebességét 20, a függőnygáz áramlási sebességét 1 készülékre jellemző áramlási értékre állítottuk be. A spray feszültség -4 kV értékre állítottuk be, míg az iontovábbító

kapillárist 300 °C-ra melegítettük. A kísérő gáz hőmérséklete 405 °C volt. A felbontás 17500 ($m/z=200$), a C-csapda maximális akkumulációs ideje egy mérési esemény alatt 10 ms volt. A kvadrupól izolációs ablaka 0,4 m/z volt. A végső MSX módszerben szereplő átmeneteket, fragmentációs energiákat, és multiplex csoportokat a **2. táblázat** tartalmazza. A módszer 0,5 perc hosszúságú volt.

A fejlesztett multiplex és nem multiplex módszerek a kromatográfiás és tömegspektrometriás körülményeket tekintve azonosak voltak annyi különbséggel, hogy a nem multiplex módszerekben csupán a belső standardot és további egy komponenszt analizált a tömegspektrométer.

2. táblázat: Központi metabolitok mérésére fejlesztett módszer átmenetei

Komponens	Szülőion m/z	Kvantifikáló ion m/z	Kvalifikáló ion m/z	Fragmentációs energia (NCE)	MSX ID
Aszparagin	131,02240	114,01962	113,03572	10	1
Cisztation	221,06015	134,02815	120,01254	10	1
Glutársav	131,02240	87,04511	113,02451	10	1
Oxálecetsav	131,02240	87,00874	-	10	1
Tienil-alanin	170,02802	153,00152	109,01174	10	1
Aszparaginsav	132,03021	88,04034	115,00361	30	2
Citrullin	174,08841	131,08255	-	30	2
Glutamin	145,03807	127,05133	128,03533	30	2
Ketoglutársav	145,03807	101,02442	73,02923	30	2
Fenil-tejsav	165,05572	147,04512	119,05023	30	2
Akonitsav	173,00916	85,02945	129,01941	30	3
Fumársav	115,00376	71,01359	87,00882	30	3
Szerin	104,03532	74,02445	72,00883	30	3
Borostyánkősav	117,01930	73,02916	99,00873	30	3
Treonin	118,05097	74,06027	102,05591	30	3
Citromsav	191,01973	87,00873	-	50	4
Hisztidin	154,06223	93,04578	137,03564	50	4
Izocitromsav	191,01973	73,02924	117,01932	50	4
Nikotinsav	122,02475	78,03474	94,02982	50	4
Tirozin	180,06664	119,0502	163,04011	50	4
Glutaminsav	146,04585	102,05602	128,03532	30	5
Almasav	133,01294	71,01356	115,00371	30	5
Triptofán	203,08264	116,05051	159,09271	30	5

5.2.5 Standard oldatok készítése

A vizsgált komponensek és a belső standard törzsoldatokat 1 mg/ml koncentrációban készítettük el metanolt, vizet vagy tized százalékos ecetsavat használva. A legmagasabb koncentrációjú köztes keverék törzsoldat 40 µg/ml töménységű volt. Ebből az oldatból kiindulva szériahígítással készítettünk 4 µg/ml, 400 ng/ml, 40 ng/ml és 4 ng/ml töménységű törzsoldatokat. Az oldószer minden esetben MeOH:H₂O 4:6 volt. Tizennégy pontos kalibrációs oldatsorozatot készítettünk, amely valamennyi pontja 1000 ng/ml koncentrációban tartalmazta a belső standardod. A belső standard tienil-analin volt. A készített kalibrációs oldatsorozat koncentráció tartománya a vizsgált komponensekre nézve 10000 ng/ml és 0,2 ng/ml közötti volt.

5.2.6. Szelektivitás vizsgálata

A szelektivitás vizsgálata során a fejlesztett MSX módszerrel olyan oldatokat mértünk, ahol az egyes minták csak egy vizsgált komponenst tartalmaztak 10 µg/ml töménységben. A sikeres szelektivitási teszt esetén csak annál a komponensnél kaptunk S/N>3 nagyságú jelet, amelyet valóban tartalmazott a minta.

5.2.7. LLOQ értékek meghatározása

A meghatározás alsó határa (lower limit of quantification, LLOQ) meghatározása során az **5.2.5 fejezetben** tárgyalt oldatsorozatot használtuk. LLOQ-nak a kalibrációs egyenes legalsó még illeszthető pontját tekintettük, amennyiben a jel-zaj viszony nagyobb volt ötnél. Amennyiben szükséges volt köztes kalibrációs pontokat is készítettünk az LLOQ pontosabb meghatározásához.

5.2.7. Dinamikus tartomány meghatározása

A dinamikus tartomány meghatározása során valamennyi komponensre az **5.2.5 fejezetben** tárgyalt oldatsorozatot használtuk. Minden kalibrációs szintet öt ismétlésben injektáltunk. A párhuzamos kalibrációs szintek mérése során mért koncentrációk relatív szórása nem lehetett nagyobb, mint 20%. A kalibrációs egyenes alsó pontja valamennyi komponensre az LLOQ szintje volt. A kalibrációs pontok esetében a számolt és a valós koncentrációk megengedett különbsége ±15% volt, kivéve az LLOQ szintjén, ahol ±20%. A kalibrációs egyenes illesztése során lineáris illesztést használtunk, az R² értékének

pedig minden esetben nagyobbak kellett lennie 0,99-nél. Az illesztések során súlyozást nem használtunk. A kimutatás felső határa (upper limit of quantification, ULOQ) minden esetben az a kalibrációs pont volt, amire még érvényesek voltak a részletezett kritériumok.

5.2.8. Biológiai minták mérése és mátrixhatás meghatározása

A vizsgált minták metabolit tartalmának meghatározása során 190 µl extraktumhoz 10 µl tienil-alanin belső standardot tartalmazó oldatot adtunk úgy, hogy a belső standard végső koncentrációja 1000 ng/ml legyen. A vizsgált biológiai minták koncentrációját öt független mintaelőkészítési eljárást követően kapott párhuzamos minta segítségével határoztuk meg.

A mátrixhatás meghatározása során 190 µl extraktumhoz 10 µl olyan oldatot adtunk, amely a belső standard mellett a vizsgált komponenseket olyan mennyiségben tartalmazta, hogy az adagolás után a biológiai mintákban mért koncentráció elméletben ötven százalékkal növekedjen. Ezt követően az addíciónált és nem addíciónált mintákat a fejlesztett módszerrel mértük, majd az alábbi képlettel számoltuk a mátrixhatást:

$$\text{Mátrixhatás} = \frac{\text{Area}_{AS} - \text{Area}_S}{\text{Area}_{AT}} \times 100$$

ahol Area_{AS} a vizsgált komponens standard addíciónálást követően mért csúcs alatti területe, Area_S az vizsgált komponens standard addíciónálás előtt mért csúcs alatti területe, Area_{AT} pedig az addíciónált mennyiség csúcs alatti területe tiszta oldószerben.

5.3 Mikotoxinok analízise

Mikotoxinok analízise során a mind a módszerfejlesztés, mind a validálás az 5.2.4 alfejezetben bemutatott készüléken történt.

5.3.1 Módszerfejlesztés

5.3.1.1 Kromatográfias és tömegspektrometriás körülmények optimalizálása

Az optimális eluens összetétel megállapításához minden komponenst tekintve 1 µg/ml koncentrációjú standard oldatot készítettünk az extrakciós oldószer (acetonitril:víz:ecetsav 79:20:1) felhasználásával.

A tesztelt eluensek pontos összetételét a **3. táblázat** tartalmazza. Az áramlási sebesség 0,5 ml/min, az oszloptermostát hőmérséklete 40 °C, az injektált térfogat 5 µl volt. A mérések során egy Phenomenex AQ C18 SecurityGuard előtétkolonnát alkalmaztunk.

Az ionforrás paraméterei a következők voltak: porlasztó gáz áramlási sebessége 50, a kísérőgáz áramlási sebessége 20, a függőnygáz áramlási sebessége 1, a készülékre jellemző áramlási érték volt. A spray feszültséget 4,5 kV értékre állítottuk be, míg az iontovábbító kapillárist 320 °C-ra melegítettük. A kísérő gáz hőmérséklete 420 °C volt. Valamennyi eluens esetében meghatároztuk a képződő adduktokat. Az adduktok meghatározása során pásztázó üzemmódot használtunk, 200-1000 *m/z* tömegtartományban. A felbontás 70000 volt (*m/z*: 200), 1e6 AGC mellett.

Mind a mérések, mind pedig az adatkiértékelés során Thermo Scientific TraceFinder 4.1 szoftvert használtunk. Az egyes szülőionokhoz tartozó fragmensek kigyűjtését Thermo Scientific Qual Browser 4.0 szoftver segítségével végeztük el. A mennyiségi meghatározások során az egyes szülőionokhoz tartozó fragmenseket 3 ppm széles tömegablakban vizsgáltuk. Amennyiben egy szülőion két fragmensét is vizsgáltuk, a két fragmenshez tartozó extrahált ion kromatogram intenzitásaránya közötti maximális eltérés 20 % lehetett. Az egyes fragmenspárokhoz tartozó intenzitásarányt a standard adatokban tapasztalt arány alapján, manuálisan állítottuk be.

3. táblázat: A módszerfejlesztés során tesztelt eluensek

Sorszám	Eluens összetétele
1	Metanol:víz 1:1 + 5 mmol/L ammónium-formiát + 0,1 % hangyasav
2	Metanol: víz 1:1 + 5 mmol/L ammónium-formiát + 0,3 % hangyasav
3	Metanol:víz 1:1 + 5 mmol/L ammónium-formiát + 0,5 % hangyasav
4	Metanol:víz 1:1 + 5 mmol/L ammónium-acetát + 0,5% ecetsav
5	Metanol:víz 1:1 + 0,1% ecetsav
6	Metanol:víz 1:1 + 0,1% hangyasav
7	Acetonitril:víz 1:1 + 0,1% ecetsav
8	Acetonitril:víz 1:1 + 0,1% hangyasav
9	Metanol:víz 1:1
10	Acetonitril:víz 1:1

A kiválasztott eluens alkalmazása mellett az egyes komponensekre legnagyobb intenzitással rendelkező addukt fragmenseit is meghatároztuk, a fragmentációs energiát 10 egységenként változtatva NCE 10-110 között. Az MS paraméterek megegyeztek az eluens kiválasztása során alkalmazottakkal. A fragmensek meghatározása PRM üzemmódban történt 70000 felbontás (m/z 200), és $2e5$ AGC mellett. Az összes detektált MS2 jelet kigyűjtöttük annál a három fragmentációs energiánál, ahol a három legnagyobb intenzitással rendelkező fragmens a legnagyobb jelet adta.

Az optimális fragmentációs energián kigyűjtöttük az egyes szülőionokra jellemző detektálható fragmenseket.

4. táblázat: Mikotoxinok mérése során alkalmazott átmenetek

Toxin	Szülőion	Szülőion tömege	Célfragmens	Konfirmáló fragmens 1	Konfirmáló fragmens 2	Fragmentációs energia (NCE)	MSX ID
AG1	M+H	329,06558	215,06935	200,04605	214,06165	60	1
FB2	M+H	706,40083	336,32693	318,31644	159,0288	40	1
VOL	M+H	267,15909	185,13214	157,1012	175,11154	50	1
AG2	M+H	331,08123	245,07991	217,08514	189,05408	60	2
OTA	M+H	404,08954	257,02087	358,08432	239,01016	20	2
T2	M+NH ₄	484,25411	169,10077	154,07755	215,10611	50	2
AB1	M+H	313,07066	241,04877	269,04358	242,05656	60	3
HT2	M+NH ₄	442,24354	169,10103	157,10118	197,09563	40	3
ZEA	M+H	319,154	69,06995	205,08537	283,13257	40	3
AB2	M+H	315,08631	259,05927	287,09085	243,06448	60	4
FB1	M+H	722,39575	334,31113	95,08608	74,06017	40	4
DON	M+H	297,13326	175,07515	105,07059	79,05452	50	4

A vizsgált mikotoxinokat négy csoportba soroltuk úgy, hogy legyen három olyan fragmensük, melyek relatív intenzitása nagyobb, mint 30% és az adott csoporton belül specifikusak az adott komponensre. Későbbiekben az így kapott legintenzívebb fragmensek segítségével végeztük el a mennyiségi meghatározást (célfragmens), míg a további két fragmenst az adott komponens jelenlétének bizonyítására használtuk fel (konfirmáló fragmens). A végső módszerben a toxinokat négy csoportba soroltuk, így egy teljes mérési ciklus négy mérési eseményből állt (4. táblázat). A végső módszerben a mérések PRM üzemmódban történtek 17500 felbontás (m/z 200), és $2e5$ AGC mellett. Az kvadrupól izolációs ablaka $0,4 m/z$ volt.

5.3.1.2. Extrakciós és kromatográfiai körülmények optimalizálása

A munkánk során felhasznált kukorica és búza mintákat helyi termelőktől szereztük be. Egy gram kukorica őrleményhez 4 ml belső standard tartalmú extrakciós

oldószert, míg 1 g búza őrleményhez 5 ml belső standard tartalmú extrakciós oldószert adtunk. Az extrakciós oldószer összetétele acetonitril:víz:ecetsav 79:20:1 volt, illetve 50 ng/ml koncentrációban tartalmazta a belső standardod (VOL). A mintákat ezt követően 90 percig kevertettük vertikális rázógépből (Heidolph, Schwabach, Németország). Keverés után a mintákat 2500 fordulat/percen 15 percig centrifugáltuk. Centrifugálás követően a felülúszót analizáltuk.

A SALLE mintaelőkészítési eljárás során a vertikális rázógépből történő kevertetést követően a felülúszóhoz 0,8 g magnézium-szulfát, 0,2 g nátrium-klorid és 0,2 g nátrium-citrát összetételű porkeveréket adtunk, majd centrifugacsőben két percig vortex keverő segítségével kevertettük. Ezt követően 8000 fordulat/percen 15 percig centrifugáltuk. Centrifugálás után a felülúszót HPLC-fiolába pipettáztuk.

A dSPE mintaelőkészítési eljárás során a SALLE extrakciót követően kapott felülúszóhoz meghatározott mennyiségű adszorbent adtunk (**5. táblázat**), majd a mintákat két percig vortex keverő segítségével kevertettük. A kapott zavaros oldatot 8000 fordulat/percen 15 percig centrifugáltuk, a felülúszót 0,2 µm pórusátmérőjű poli(tetrafluor-etilén) (PTFE) szűrőn (Whatman, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) szűrtük.

5. táblázat: A gabona előkészítése során tesztelt dSPE szorbensek és szorbens keverékek

Sorszám	Összetétel
1	50 mg aktív szén
2	200 mg PSA
3	200 mg C18
4	200 mg PSA, 200 mg C18 adszorbens
5	200 mg PSA, 50 mg aktív szén
6	200 mg C18 adszorbens, 50 mg aktív szén
7	200 mg PSA, 200 mg C18 adszorbens, 50 mg aktív szén

Amennyiben a mintákat tízszeresére töményítettük, a SALLE, majd dSPE mintaelőkészítést követően kapott szűrletet nitrogén gázáram alatt szárazra pároltuk. A szárazra párolt mintákat annyi extrakciós oldószerben oldottuk vissza, hogy tízszeres koncentrációt érjünk el. Az elkészült oldatot 30 másodpercig vortex keverő segítségével homogenizáltuk, majd 4 percig ultrahangos kádba helyeztük, végezetül 0,2 µm pórusátmérőjű PTFE szűrőn szűrtük.

Az extrakciós körülmények optimalizálásával párhuzamosan a kromatográfiás körülményeket is módosítottuk, míg a tömegspektrometriás paraméterek az **5.1.1.1 fejezetben** ismertetekkel azonosak voltak.

Amennyiben a kukorica és búza mintákat csak szilárd-folyadék extrakciónak, vagy SALLE mintaelőkészítési eljárásnak vetettük alá a kromatográfiás körülmények a következők voltak: a mérések során metanol:víz 1:1 + 5 mmol/l ammónium-formiát + 0,5 % hangyasav összetételű eluent használtunk, Phenomenex AQ C18 SecurityGuard előtétkolonna (Phenomenex, Torrance, USA) alkalmazása mellett. Az áramlási sebesség 500 µl/perc volt, míg az injektálási térfogat 5 µl. Az oszloptermosztát hőmérsékletét 40 °C-ra állítottuk.

Amikor a szilárd-folyadék extrakció és SALLE mintaelőkészítési eljárás után dSPE módszert is alkalmaztunk az alábbi kromatográfiás körülmények között végeztük a méréseket: eluensként metanol:víz 7:3 + 5 mmol/L ammónium-formiát + 0,5 % hangyasav összetételű oldatot használtunk, Thermo Scientific Hypersil GOLD C18 állófázisú (Thermo Scientific, San Jose, USA) 50 x 2,1 mm, 1,9 µm szemcseméretű kolonna alkalmazása mellett. Az injektálási térfogat 5 µl volt, míg az áramlási sebesség 0,5 ml/min. Az oszloptermosztát hőmérsékletét 40 °C-ra állítottuk be.

5.3.1.4 UHPLC-MS/MS módszer fejlesztése

Az UHPLC-MS/MS mérési módszerben a tömegspektrometriás beállítások a **5.1.1.1 fejezetben** tárgyalt paraméterekkel azonosak voltak. Az elválasztás során – akár csak a multiplex mérési módszerben – az alábbi eluenseket használtuk: víz + 5 mmol/L ammónium-formiát + 0,5 % hangyasav (A), metanol + 5 mmol/L ammónium-formiát + 0,5 % hangyasav (B). Az elválasztásokat Thermo Scientific Hypersil GOLD C18 állófázisú 50 x 2,1 mm, 1,9 µm szemcseméretű oszlopon végeztük, melyet fázisazonos előtétoszloppal láttunk el. Az oszloptermosztát 40 °C-on üzemelt, míg az injektálási térfogat 5 µl volt. Az alkalmazott gradiens programot a **6. táblázat** tartalmazza. Az áramlási sebesség, hasonlóan a MSX módszerhez, 500 µl/min volt. A vizsgált komponensek átmenetei megegyeztek a MSX módszer során vizsgált átmenetekkel, viszont MSX technikát nem alkalmaztunk a mérések során. Az analizált komponensek retenciósi ideje a **7. táblázatban** olvasható.

6. táblázat: UHPLC-MS/MS mérések gradiens programja

Retenciósi idő (perc)	B%
0	5
3	5
14,5	74
15	95
17	95
17.1	5
18	5

7. táblázat: Komponensek retenciósi ideje az UHPLC-MS/MS módszer alkalmazásával

Komponens	Retenciósi idő (perc)
DON	2,40
VOL	6,24
AG2	8,62
AG1	9,02
AB2	9,31
AB1	9,75
HT2	11,27
T2	13,23
FB1	12,75
ZEA	13,85
FB2	14,14
OTA	15,09

5.3.2 Módszervalidálás

A mikotoxinok mérésére fejlesztett módszer validálása során az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) érvényben lévő bioanalitikai módszer validálási irányelveit követtük (Guideline on bioanalytical method validation, 2011). A fejezetben több esetben a koncentrációt $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ban adtuk meg, ahol a mikotoxinok mennyiségét gabona szárazanyagra vonatkoztattuk abban az esetben, ha az alkalmazott mintaelőkészítési eljárást alkalmazzuk (szilárd-folyadék extrakció, SALLE, dSPE, töményítés) 100 százalékos extrakciós hatékonyságot feltételezve.

Az egyes mikotoxinok felső határértékének az Európai Bizottság idevonatkozó rendeletében feldolgozatlan búza és kukoricára vonatkozó adatokat tekintettük (Bizottság 1881/2006/EK rendelete, 2006). HT2 és T2 esetén az Európai Bizottság ide vonatkozó ajánlásában feldolgozatlan búzára és kukoricára vonatkozó indikatív értékeket tekintettük (2013/165/EU). Amennyiben a rendeletben több toxin együttes maximális mennyisége van megadva, az együttes maximális mennyiséget elosztottuk az oda vonatkozó toxinok számával, és a kapott koncentrációt tekintettük határértéknek. A módszer validálása során alapul vett határértékeket a **8. táblázat** tartalmazza.

8. táblázat: Mikotoxinok felső határértéke

	Kukorica	Búza
	Határérték (µg/kg)	Határérték (µg/kg)
AB1	5	2
AB2	5	2
AG1	5	2
AG2	5	2
DON	1750	1250
FB1	1000	-
FB2	1000	-
HT2	100	100
OTA	5	5
T2	100	100
ZEA	200	100

5.3.2.1 Szelektivitás vizsgálata

Szelektivitás vizsgálata során toxin-vak extraktumokat készítettünk. A gabona őrleményeket szilárd-folyadék extrakciónak, SALLE mintaelőkészítési eljárásnak, dSPE eljárásnak vetettük alá, majd a bepárlás és visszaoldás segítségével a mintákat tízszeresre töményítettük (**5.3.1.2 fejezet**).

A készített toxin-vak extraktumokat injektáltuk a készülékbe megvizsgálva, hogy a komponensek kimutathatók-e az extraktumokból. A vizsgálatot akkor tekintettük sikeresnek, ha a toxin-vak mintákban a zavaró komponensek jele az LLOQ 20 százalékánál kisebb volt a vizsgált analitok esetén, illetve 5 százalékánál kisebb volt a belső standard esetén.

Az EMA által előírt szelektivitási vizsgálatokat egy további vizsgálattal egészítettük ki. A 190 µl toxin-vak extraktumhoz 10 µl toxin standardot adagoltunk úgy, hogy a mikotoxinok végső koncentrációja 10 µg/ml legyen. Az addíció során a standard oldat egyszerre egy toxint tartalmazott, így összesen 12 adalékolt mintát készítettünk. A mintákat háromszor injektáltuk a készülékbe. A vizsgálatot akkor tekintettük sikeresnek, ha a mérést követően csak annál a komponensnél kaptunk $S/N > 3$ nagyságú jelet, amelyet valóban tartalmazott a minta.

5.3.2.2. LLOQ és LLOD értékek meghatározása

LLOQ-nak a mátrix-azonos kalibrációs egyenes legalsó még illeszthető pontját tekintettük, amennyiben a jel-zaj viszony nagyobb volt ötnél. Amennyiben szükséges volt köztes kalibrációs pontokat is készítettünk az LLOQ pontosabb meghatározásához. A kimutatás alsó határának (lower limit of detection, LLOD) azt a koncentrációt tekintettük, ahol a jel-zaj viszony nagyobb volt háromnál.

5.3.2.3. Dinamikus tartomány és linearitás meghatározása

A dinamikus tartomány és linearitás vizsgálata során toxin-vak extraktumokat készítettünk. A gabona őrleményeket szilárd-folyadék extrakciónak, SALLE mintaelőkészítési eljárásnak, dSPE eljárásnak vetettük alá, majd a bepárlás és visszaoldás segítségével a mintákat tízszeresre töményítettük (**3.3.1.2 fejezet**).

A toxin-vak extraktumok segítségével mátrix-azonos kalibrációs oldatsorozatot készítettünk. Az egyes kalibrációs minták elkészítése során 190 µl toxin-vak gabona extraktumhoz 10 µl-t adtunk a megfelelő kettes típusú munkaoldatból. A munkaoldatok készítéséhez 200 µg por alapú mikotoxin toxin-vak extraktumban történő beoldásával törzsoldatokat készítettünk. A törzsoldatok segítségével egyes típusú munkaoldat sorozatot készítettünk, amely valamennyi határértékkel rendelkező vizsgált toxint tartalmazott 100000, 10000, 1000, 100 és 10 ng/ml koncentrációban. Az egyes típusú munkaoldat sorozat segítségével készítettük a kettes típusú munkaoldat sorozatot. Az elkészített kalibrációs oldatsorozat 16 tagú volt, 10000-0,125 µg/kg gabona szárazanyagra visszaszámolva.

Egy kalibrációs pontot öt alkalommal injektáltunk. Az egyes kalibrációs szinteken mért koncentrációk relatív szórása nem lehetett nagyobb mint 20%. A kalibrációs egyenes alsó pontja valamennyi komponensre az LLOQ szintje volt. A

kalibrációs pontok esetén a reziduálisok maximum $\pm 15\%$ -osak lehetnek, kivéve az LLOQ szintjén, ahol $\pm 20\%$. A kalibrációs egyenes illesztése során lineáris illesztést használtunk, az R^2 értékének pedig minden esetben nagyobbak kellett lennie 0,99-nél. Az illesztések során súlyozást nem alkalmaztunk. A kimutatás felső határa (ULOQ) minden esetben az a kalibrációs pont volt, amire még érvényesek voltak a részletezett feltételek.

5.3.2.4 Mátrixhatás meghatározása

A mátrixhatás meghatározásához két koncentrációban hat ismétlésben készítettünk mintákat toxin-vak extraktumban és tiszta extrakciós oldószerben. A mátrix-azonos minták készítése során 190 μl toxin-vak extraktumhoz 10 μl mikotoxint tartalmazó oldatot adtunk úgy, hogy azok koncentrációja az LLOQ kétszeresének (MEC1) és az ULOQ 80 százalékának (MEC2) feleljen meg. Az MEC1 és MEC2 koncentrációk az alábbiak voltak FIA-PRM-MSX módszer esetén (MEC1 kukoricában, MEC2 kukoricában, MEC1 búzában, MEC2 búzában): AB1 (5,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AB2 (4,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AG1 (5,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AG2 (5,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), DON (1280 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 7680 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 960 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1920 $\mu\text{g}/\text{kg}$), FB1 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 960 $\mu\text{g}/\text{kg}$), FB2 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), HT2 (128 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4160 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), OTA (7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), T2 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 640 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and ZEA (128 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3840 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Az MEC1 és MEC2 koncentrációk az alábbiak voltak UHPLC-MS/MS módszer esetén: AB1 (5,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AB2 (4,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AG1 (5,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), AG2 (5,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 480 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), DON (1280 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 7680 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 960 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1920 $\mu\text{g}/\text{kg}$), FB1 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 960 $\mu\text{g}/\text{kg}$), FB2 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), HT2 (128 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4160 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$), OTA (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1120 $\mu\text{g}/\text{kg}$), T2 (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1120 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and ZEA (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 192 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A toxin-vak extraktumok készítése során a gabona őrleményeket szilárd-folyadék extrakciónak, SALLE mintaelőkészítési eljárásnak, dSPE eljárásnak vetettük alá, majd a bepárlás és visszaoldás segítségével a mintákat tízszeresre töményítettük (**5.3.1.2 fejezet**). A mátrix-mentes oldatok készítése során 190 μl extrakciós oldószerhez 10 μl mikotoxinokat tartalmazó oldatot adtunk. A mátrix faktort a mátrix-azonos mintában tapasztalt csúcs alatti terület és az extrakciós oldószerben

megfigyelt csúcs alatti terület hányadosaként számoltuk, összesen tizenkét hányados átlagaként. A kapott tizenkét érték szórását is kiszámoltuk.

5.3.2.5 Visszanyerés számítása

A visszanyerés meghatározásához két koncentrációban, koncentrációként hat ismétlésben készítettünk mintákat. A két koncentráció a rendeletben megszabott határérték 80, illetve 120 százaléka volt. Kukorica mátrix esetén ezek a koncentrációk az alábbiak voltak: AB1 (4 µg/kg, 6 µg/kg), AB2 (4 µg/kg, 6 µg/kg), AG1 (4 µg/kg, 6 µg/kg), AG2 (4 µg/kg, 6 µg/kg), DON (1400 µg/kg, 2100 µg/kg), FB1 (800 µg/kg, 1200 µg/kg), FB2 (800 µg/kg, 1200 µg/kg), HT2 (80 µg/kg, 120 µg/kg), OTA (4 µg/kg, 6 µg/kg), T2 (80 µg/kg, 120 µg/kg), and ZEA (160 µg/kg, 240 µg/kg). Búza mátrix esetén a két vizsgált koncentráció szint az alábbi volt: AB1 (1,6 µg/kg, 2,4 µg/kg), AB2 (1,6 µg/kg, 2,4 µg/kg), AG1 (1,6 µg/kg, 2,4 µg/kg), AG2 (1,6 µg/kg, 2,4 µg/kg), DON (1000 µg/kg, 1500 µg/kg), HT2 (40 µg/kg, 60 µg/kg), OTA (4 µg/kg, 6 µg/kg), T2 (40 µg/kg, 60 µg/kg), and ZEA (80 µg/kg, 120 µg/kg).

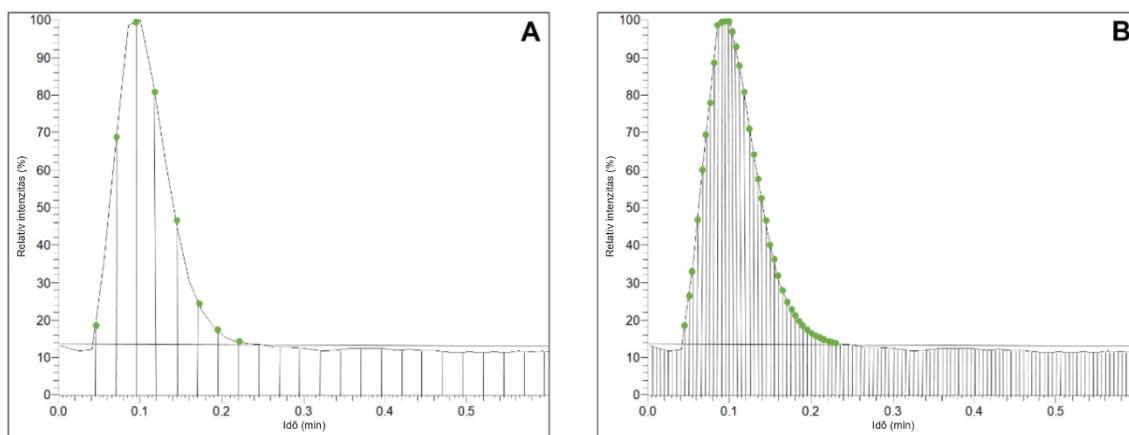
A minták elkészítése során 1 g darált toxint kimutatható mennyiségben nem tartalmazó gabonához 100 µL valamennyi mikotoxint tartalmazó oldatot adtunk. A kapott mintákat 16 órán keresztül levegőn, fénytől elzárt helyen tároltuk, hogy az oldószer elpárologjon. Az így kapott toxinnal szennyezett, száraz darált gabona mintákat szilárd-folyadék extrakciónak, SALLE mintaelőkészítési eljárásnak, dSPE eljárásnak vetettük alá, majd a bepárlás és visszaoldás segítségével a mintákat tízszeresre töményítettük **(3.3.1.2 fejezet)**.

Az elkészített minták koncentrációját mátrix-azonos kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A visszanyerést a mért és a nominális koncentráció hányadosaként határoztuk meg. Az egyes minták mérése során tapasztalt visszanyerés értékeket átlagoltuk, illetve szórást számoltunk.

6. EREDMÉNYÜK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

6.1 Multiplex módszerek alapelvei

Amennyiben Orbitrap tömegspektrométerrel egy időben több vegyületet határozunk meg PRM mérési üzemmód segítségével, minden egyes szülőion saját mérési eseménnyel rendelkezik, amelyek összessége adja meg a teljes mérési ciklust. Amikor tíz, vagy annál több szülőion alkot egy mérési ciklust az Orbitrap tömeganalizátor hosszú mérési ideje miatt a teljes mérési ciklus hosszúvá válik. A hosszú mérési ciklusok miatt csökken az érzékenység, mivel a készülék nem tud elég adatpontot gyűjteni egy kromatográfiás csúcs meghatározásához, amihez legalább 10 adatpontra van szükség (Holčapek et al., 2012). Ez a jelenség különösen megnehezíti a nagy érzékenységű módszerek fejlesztését UHPLC körülmények alkalmazása esetén, ahol keskeny féltértékszélességű kromatográfiás csúcsok a gyakoriak. Multiplex mérési technika alkalmazásával a mérési események száma csökkenthető, így a mérési ciklus ideje jelentősen lerövidíthető. Ennek köszönhetően keskeny féltértékszélességű kromatográfiás csúcsok esetén is kellő mennyiségű adatpontot tud rögzíteni a készülék (**5. ábra**).



5. ábra: Mérési események száma hagyományos (A) és multiplex (B) mérési technika alkalmazása mellett

Az **5. ábra** egy olyan esetet mutat, ahol 23 szülőion iont vizsgálunk egyidőben Orbitrap tömegspektrométer segítségével 17500-as felbontás mellett ($m/z=200$), multiplex mérési technika alkalmazásával (B) és anélkül (A). A függőleges vonalak az egy szülőionra vonatkozó adatpontokat szimbolizálják, a zöld pontok pedig az alapvonalnál nagyobb intenzitással rendelkező adatpontokat jelölik. Jól látszik, hogy az ábra A részén egy szülőionra csupán 8 alapvonalnál nagyobb intenzitású adatpontot

rögzített a készülék még egy relatív nagy intenzitási kromatográfiás csúcs esetén is, ami nem elégséges a bemutatott kromatográfiás csúcs jellemzéséhez. Amennyiben MSX mérési technikát alkalmazunk, és a mérési események számát ötre csökkentjük, a mérési ciklus lerövidülése miatt a kiválasztott szülőionra már 38, alapvonalnál nagyobb intenzitású adatpontot képes gyűjteni a készülék, így a bemutatott kromatográfiás csúcs egyértelműen meghatározható.

Mint az a bemutatott példán is látszik, a multiplex mérési technika előnyei elsősorban akkor érzékelhetők, ha a vizsgált vegyületek kromatográfiásan nem elválaszthatók, vagy nem áll szándékunkban elválasztani őket. Ilyen mérési módszerek például a FIA módszerek, melyekkel gyors analízisek végezhetők el, mivel a mintákat kromatográfiás elválasztás nélkül juttatjuk a tömegspektrométer ionforrásába.

Mivel a szakirodalomban nem található kismolekulák kvantitatív meghatározását lehetővé tevő multiplex technikát alkalmazó PRM módszer, kutatómunkám első lépéseként lefektettük azokat az alapelveket, amik egy sikeres módszer fejlesztéséhez szükségesek.

Mivel PRM mérési üzemmódban a szülőionból keletkező összes fragmentumot detektáljuk, a multiplex technika segítségével rögzített tömegspektrumon az egy mérési eseményben vizsgált összes vegyület valamennyi fragmentuma egy spektrumon jelenik meg (**2. ábra**). Ebből következik, hogy a megbízható mennyiségi és minőségi meghatározás feltétele, hogy egy mérési eseményben, csak olyan vegyületeket vizsgáljunk, melyek egyedi, a többi vegyülettől eltérő tömegű fragmentumokkal is rendelkeznek. Fontos megjegyezni, hogy ez nem azt jelenti, hogy az egy mérési eseményben vizsgált vegyületeknek nem lehetnek azonos tömegű fragementei is.

Tapasztalatunk szerint két fragmens akkor tekinthető nem azonos tömegűnek, ha a tapasztalt pontos tömegük között 50 ppm tömegkülönbség van 17500-as felbontás mellett ($m/z=200$). Annak érdekében, hogy növeljük a fejlesztett módszerek megbízhatóságát, két fragmens tömegét akkor tekintettük különbözőnek, ha a mért tömegük között 100 ppm különbség volt.

Amennyiben lehetőség volt rá egy vegyület két fragmensét vizsgáltuk. Az intenzívebbet vettük alapul a mennyiségi meghatározáshoz, míg a két fragmens intenzitásarányát figyeltük a minőségi meghatározás során. Amennyiben ez az arány a külön mérés során a tiszta vegyület fragmentációjakor tapasztalt intenzitás aránytól 20 százaléknál nagyobb mértékben tért el, az adott komponens azonosítását sikertelennek tekintettük. A kis tömegű szerves savak vizsgálatkor azt tapasztaltuk, hogy nem minden

vegyület esetén keletkezett egynél több fragmens. Ilyen esetekben nem volt lehetőség az fragmensek intenzitásarányának vizsgálatára.

A csúcsazonosításhoz 3 ppm széles tömegablakot használtunk, ezzel is tovább növelve a mérés megbízhatóságát. Az ilyen szűk tömegtartományt úgy tudtuk biztosítani, hogy a mérések során a készülék tömegpontosságát naponta kalibráltuk. Negatív mérési üzemmód esetén bővített kalibrációs tartománnyal dolgoztunk, amely 80 és 140 m/z közötti tömegtartományban is tartalmazott tömegeket.

A mérésekhez használt Orbitrap készülék kvadrupóljának legszűkebb izolációs ablaka 0,4 m/z . A vizsgált vegyületek között előfordultak izobár molekulák (pl.: citromsav-izocitromsav), illetve több vegyület molekulaionja (pl.: ketoglutársav-glutamin), vagy adduktja $[HT2+NH_4]^+ = 442,24354$ – $[OTA+K]^+ = 442,04542$) közötti tömegkülönbség kisebb volt 0,4 m/z értéknél. Ezeket a vegyületeket egy csoportba kellett sorolni, hiszen a kvadrupól nem volt képes tömegük alapján szétválasztani őket. Ilyen esetekben meg kell vizsgálni, hogy a zavaró molekulaion, vagy addukt rendelkezik-e olyan fragmensekkel, amik zavarhatják a vizsgált komponens detektálhatóságát.

A polaritás váltást elvetettük a módszerfejlesztés során. Annak ellenére, hogy az Orbitrap készülékekben a polaritásváltás relatív gyors más nagyfelbontású MS-ekhez képest (Abou-Elwafa Abdallah et al., 2019), körülbelül 500 ms (Breitkopf et al., 2017), a két ionizációs mód a mérés során alternál, így a polaritásváltás ideje többszörösen hozzáadódik a mérési ciklus hosszához, ami nem teszi lehetővé elegendő adatpont gyűjtését kis félértékszélességű kromatográfiai csúcsok esetén.

A FIA-MS mérések megbízhatósága és pontossága növelhető belső standard használatával. A vizsgált vegyületek izotóp jelölt származékai a legalkalmasabb belső standardok, hiszen a jelölt és a nem jelölt forma kromatográfiásan ugyanúgy viselkedik, illetve ionizálhatóságukat az ionelnyomó hatások is ugyanolyan mértékben befolyásolják (Michel et al., 2015) (Wright et al., 2019). Ugyanakkor MSX módszerek alkalmazásakor a jelölt belső standard használata elkerülendő, mivel megduplázza a vizsgált szülőionok számát, ami növeli a mérési események számát, ezáltal a teljes mérési ciklus hosszát, nagyfokú érzékenység csökkenéshez vezetve. Ezért a mérések során egy módszerhez egy belső standardot használtunk, és valamennyi vizsgált vegyület mennyiségi meghatározásához azt alkalmaztuk.

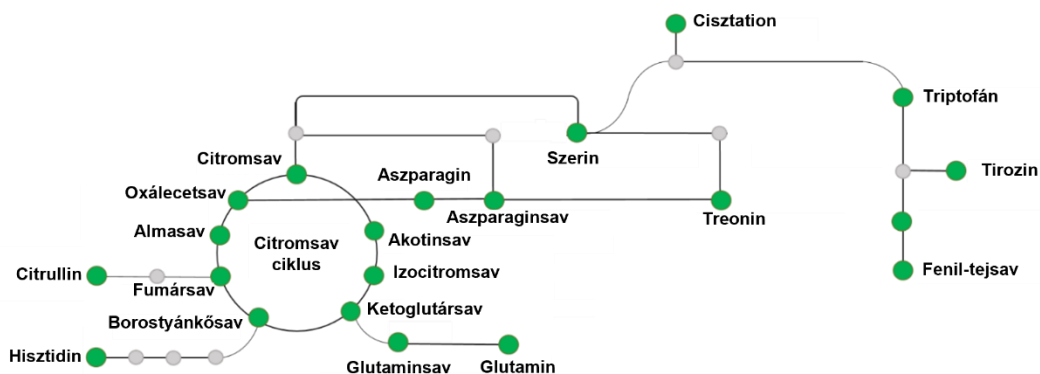
Összességében elmondható, hogy a fejlesztett multiplex módszerek pontossága három alappilléren nyugodott:

1. a kvadrupól izolálta az egyes szülőionokat 0,4 m/z széles izolációs ablakban,
2. a vizsgált szülőionok egy specifikus fragmensét vizsgáltuk 3 ppm széles tömegablakban,
3. a vizsgált szülőionok két specifikus fragmensének intenzitás arányát vizsgáltuk 3 ppm széles tömegablakban.

A fent említett három pont alapján kidolgozott módszerek nem bizonyultak pontatlanabbnak egy általános FIA módszernél, viszont a rövid ciklusidő miatt több vegyület egymás melletti pontos analizését tették lehetővé.

6.2 Multiplex módszer fejlesztése központi metabolitok mennyiségi meghatározására

A módszerfejlesztés olyan vegyületeket érintett, amelyek a központi metabolikus útvonal tagjai, ahhoz kapcsolódó aminosavak és egyéb metabolikus szempontból fontos vegyületek (6 ábra).



6 ábra: Kiválasztott vegyületek elhelyezkedése a különböző metabolikus útvonalakban

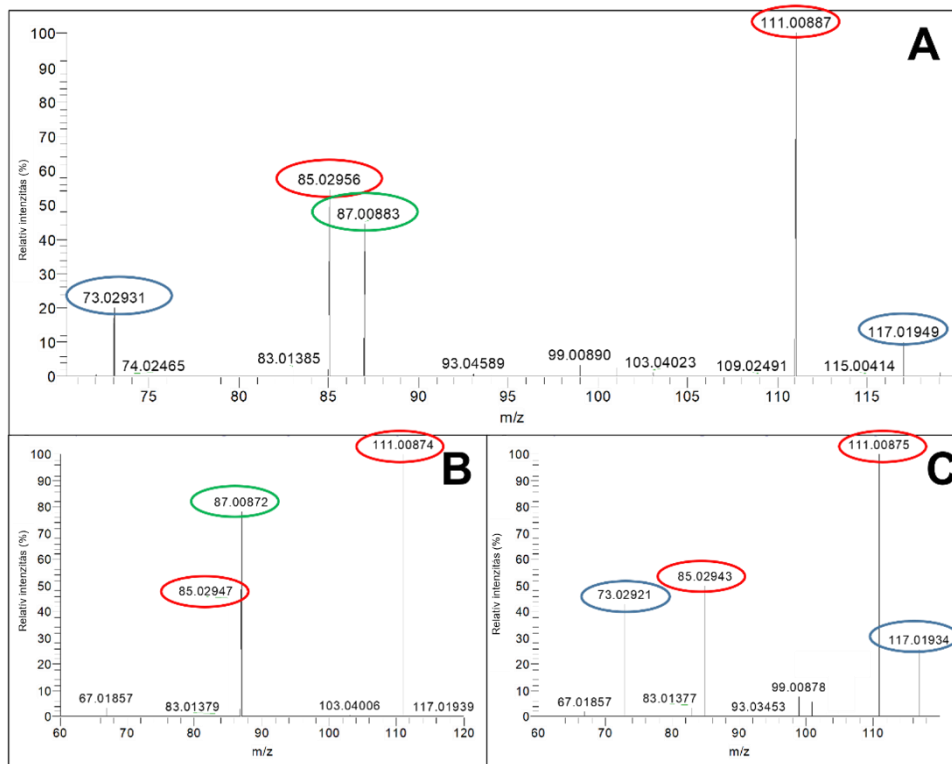
A vegyületek detektálásához negatív ionizációs módot választottunk, mivel a citromsavciklus elemeinek és az aminosavak tömegspektrometriás detektálására leginkább ez az ionizációs üzemmód terjedt el (Al Kadhi et al., 2017). Mivel a polaritásváltást a 6.1 fejezetben részletezett okoknál fogva elvetettük, csak olyan vegyületeket választottunk ki, amelyek negatív ionizációs módban kellően intenzív molekulaiont képeztek.

Belső standardnak egy szintetikus aminosavat, a tienil-alanint választottuk, hiszen élő szervezetben ez a vegyület nem fordulhat elő, ezáltal nem zavarja a mért komponensek detektálhatóságát (Stokka and Flatmark, 2002).

6.2.2 Módszerfejlesztés

A módszerfejlesztés első lépéseként optimalizáltuk a „kromatográfias” körülményeket. Habár célunk kromatográfias elválasztást mellőző FIA módszer kidolgozása volt, a szimmetrikusabb csúcsalak elérése érdekében egy egyszerű előtétoszlopot alkalmaztunk. Mozgófázisként metanol-víz keveréket használtunk tizedszázalékos ecetsav jelenléte mellett, amely elősegítette a vizsgált vegyületek ionizációját. Következő lépésben standard oldatok segítségével meghatároztuk valamennyi komponens molekulaionjának pontos tömegét. Nagy intenzitású addukcionok képződését egyik vegyület esetében sem tapasztaltuk. Elvégeztük a molekulaionok diszkrét energiákon történő fragmentálását, hogy meg tudjuk határozni az összes keletkező fragmentumot.

A fragmensek ismeretében a kiválasztott huszonhárom vegyületet csoportokban soroltuk az alábbi megfontolások figyelembevételével.



7. ábra: Citromsav és izocitromsav MS2 spektruma multiplex mérési körülmények között (A), illetve nem multiplex mérési körülmények között (B: citromsav, C: izocitromsav)

A citromsav és az izocitromsav izobár vegyületek, így egy csoportba kell sorolni őket. Annak ellenére, hogy a két vegyület legintenzívebb fragmense megegyezik (m/z 111,00877), mindkét vegyülethez rendelhetők specifikus fragmensek (citromsav: m/z

87,00873; izocitromsav: m/z 73,0292 és 72,99287), melyek alkalmasak mennyiségi és minőségi meghatározásukhoz (**7. ábra**).

A ketoglutársav és a glutamin szülőionra ($m/z=145,01425$ és $145,06189$) között kevesebb, mint $0,05$ m/z különbség van, így az Orbitrap MS-re jellemző $0,4$ m/z értékű legszűkebb izolációs ablak segítségével a két vegyület nem elválasztható. Ugyanakkor a különböző szerkezetnek és a glutamin nitrogén tartalmának köszönhetően több specifikus fragmenssel is rendelkeznek.

Ugyancsak hasonló szülőion tömeggel rendelkezik az oxálecetsav ($m/z=130,99860$), a glutársav ($m/z=131,03498$) és az aszparagin ($m/z=131,04622$), így a felsorolt vegyületeket egy csoportba soroltuk. Izolálásuk a három szülőion tömegátlagával történt ($m/z = 131,02660$). Külön kiemelendő, hogy az oxálecetsav és a glutársav mennyiségi meghatározására használt fragmensek hasonló tömegűek voltak (m/z 87,00880 és m/z 87,04525) mégis mennyiségi meghatározásra alkalmasnak bizonyultak, ugyanis a közöttük lévő tömegeltérés 419 ppm volt. Ilyen kis tömegeltérésű fragmensek elkülönítése csak nagyfelbontású készülék használat mellett lehetséges.

Több aminosav is rendelkezik $C_2H_4NO_2$ és $C_2H_2NO_2$ elemi összetételű fragmenssel, többek között a szerin, a treonin a triptofán, a tirozin, a glutamin és a hisztidin. Mivel a treoninból és a szerinből csak az említett fragmensek képződtek, így a két vegyületet külön csoportba kellett elhelyezni úgy, hogy az adott csoport ne tartalmazza a triptofánt, a tirozint, a glutamint és a hisztidint. Ez utóbbi vegyületek esetén több intenzív fragmenst is azonosítottunk.

Számos citromsavciklus elemnél (fumársav, almasav, oxálecetsav, citromsav) figyeltük meg az $m/z = 87,00874$ tömegű és $C_3H_3O_3$ elemi összetételű fragmenst, ami az almasav kivételével valamennyi felsorolt vegyület két legintenzívebb fragmensének egyike volt. Ezért ezeket a vegyületeket külön csoportban kellett helyezni. Megfigyeltük továbbá, hogy a ketoglutársav, az izocitromsav és a borostyánkősav egyik legintenzívebb fragmense is azonos ($m/z = 73,02916$) továbbá az aromás fenil-tejsav és tirozin fragmentációs mintája is olyan nagyfokú egyezést mutat, hogy a felsorolt komponenseket nem lehetett egy csoportba elhelyezni.

Az akonitsav legnagyobb intenzitású fragmense ($m/z = 85,02945$) a glutaminsav, a citromsav és az izocitromsav MS2 analízise során is keletkezett. Annak érdekében, hogy nagy érzékenységgel detektálhassuk az akonitsavat, az említett két vegyülettel nem kerülhetett egy csoportba.

A hasonló szerkezet következtében az aszparagin és az aszparaginsav, valamint a glutamin és a glutaminsav fragmentációja több hasonló fragmenst eredményez, így nem szerepelhetnek egy csoportban.

Teljesen egyedi fragmensekkel rendelkezik a citrullin, a nikotinsav, továbbá a kén tartalmú belső standard tienil-analin és a cisztation is. Az ilyen, egyedi fragmentációs mintázattal rendelkező komponensek bármelyik csoportba sorolhatók, ezért elhelyezésüket az határozta meg, hogy az egyes csoportokban szereplő vegyületek száma ne térjen el számottevően.

Érdeemes megjegyezni, hogy a vizsgált vegyületek csoportokba sorolásánál nem csak egy „jó megoldás” létezik, elméletben több olyan csoportfelosztás lehetséges, ahol nincsenek átfedő fragmensek.

A fentiek figyelembevételével kidolgozott módszerben a vegyületeket öt csoportban soroltuk (**2. táblázat**). Az első négy csoportban 5-5 komponens szerepelt, míg az ötödikben három. Vizsgálataink szerint az egyes csoportokon belül a vizsgált fragmensek intenzitása különböző fragmentációs energia mellett nem változott számottevően, ezért az egyes csoportokon belül a fragmentációs energiát nem változtattuk. PRM adatgyűjtési mód alkalmazása mellett 17500-as felbontással (m/z 200) érhető el a legnagyobb érzékenység, ami 64 ms mérési időt vesz igénybe. Figyelembe véve azt, hogy az összes szülőiont 5 csoportba soroltuk, a teljes ciklusidő 320 ms-nak adódott. Mivel egy kromatográfiás csúcshoz a megbízható kvantitatív analízis biztosítása érdekében 10-12 adatpont szükséges, a kidolgozott FIA-PRM-MSX módszer 4 s futási időt jelent. Ez alkalmassá tesz nemcsak FIA-MS módszerek, de UHPLC-MS/MS módszerek alkalmazására.

6.2.3 Módszervalidálás

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk, hogy a multiplex mérési technika hogyan befolyásolja a PRM adatgyűjtést, meghatároztuk a kidolgozott FIA-PRM-MSX és egy hagyományos FIA-PRM módszer linearitását, valamint a detektálás és a meghatározás alsó határát.

6.2.3.1 Szelektivitás vizsgálata

A szelektivitás meghatározásakor olyan standard oldatokat analizáltunk, melyek csak egyetlen vegyületet tartalmaztak nagy koncentrációban (10 $\mu\text{g/ml}$). Az alkalmazott

nagy koncentráció segítségével eldönthettük, hogy az adott szülőionok specifikus fragmensei valóban csak az adott vegyületre jellemzők. A szelektivitást akkor tekintettük elfogadhatónak, ha az egyes vegyületeket csak az őket tartalmazó mintákban tudtuk kimutatni, míg a többi mintában a kimutatási határ alatti jelet kaptunk ($S/N > 3$). A végső módszer sikeresen teljesítette ezt a validálási követelményt.

6.2.3.2 A kimutatás és a detektálás alsó határának meghatározása

Az LLOQ-t standard keverék oldatok segítségével határoztuk meg (**9. táblázat**). Az LLOQ-nak azt a legkisebb koncentrációt tekintettük, ahol az adott kalibrációs szint a kalibrációs egyenes illesztéséhez használható volt, illetve a jel-zaj arány ötnél nagyobbak adódott. Amennyiben lehetőség volt rá a szülőionok kisebb intenzitású fragmensét használtuk az LLOQ értékek meghatározásához.

Annak érdekében, hogy felderíthessük, hogy az alkalmazott MSX technikának milyen hatása van az érzékenységre, a módszert összehasonlítottuk olyan nem MSX módszerekkel, melyek esetén a belső standard mellett csak egy további vegyületet analizált a készülék. Mivel a MSX és a nem MSX módszerekben csak a detektálási mód különbözött (ugyanolyan kromatográfiai körülmények, ionforrás beállítások stb.) az esetleges érzékenység vesztést csak a MSX technikának tulajdoníthattuk.

Az LLOQ értékek meghatározása során azt tapasztaltuk, hogy a MSX technika alkalmazásával három esetben csökkent, tizenkilenc esetben pedig nem változott érdemben az érzékenység (10. táblázat). Az aszparagin, a cisztation és az aszparaginsav esetén 50-60% közötti érzékenység csökkenés jelentkezett a MSX mérési módszer alkalmazása mellett. Az érzékenység csökkenésének oka lehetett, hogy a kérdéses vegyületek a többi vegyületnél keskenyebb félértékszélességű csúccsal rendelkeznek. Annak ellenére, hogy a MSX módszer alkalmazásával csökkent a ciklusidő ahhoz képest, mintha valamennyi vegyületet MSX technika alkalmazása mellett mérnénk, mégse tudott a készülék annyi adatpontot rögzíteni, mint amikor csak egy vegyületet vizsgáltunk a nem MSX mérések során. Azokban az esetekben, ahol nem csökkent az érzékenység, feltehetőleg hasonló mennyiségű adatpontot rögzített a készülék mind a két típusú módszer esetén, így nem változtak érdemben a kimutatási határok.

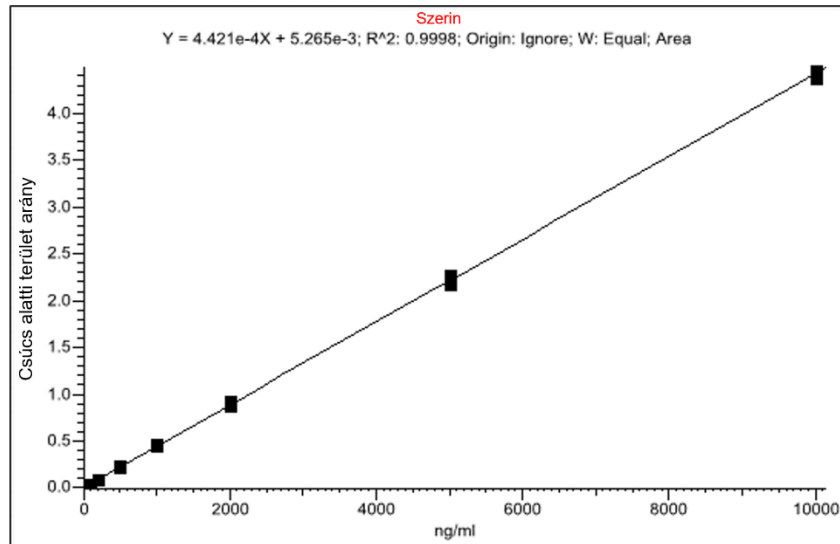
Összességében elmondható, hogy a multiplex mérési technika alkalmazása egyes vegyületeknél csökkentheti az érzékenységet, ám összességben nem jár nagyságrendi érzékenység csökkenéssel.

9. táblázat: LLOQ értékek MSX és nem MSX mérési technika alkalmazása mellett

Komponens	MSX módszer	Nem MSX módszer
	LLOQ [ng/ml]	LLOQ [ng/ml]
Aszparagin	8,2	4,3
Cisztation	4,2	2,8
Glutársav	1,2	1,4
Oxálecetsav	44	42
Aszparaginsav	4,3	1,8
Citrullin	1,1	1,2
Glutamin	9,8	10,1
Ketoglutársav	48,2	48,4
Fenil-tejsav	1,2	1,1
Akonitsav	5,2	9,8
Fumársav	9,1	10,2
Szerin	0,9	0,9
Borostyánkősav	4,8	4,7
Treonin	1,1	1,2
Citromsav	49,7	49,8
Hisztidin	4,9	9,7
Izocitromsav	21,9	19,7
Nikotinsav	81,4	82,4
Tirozin	4,8	4,9
Glutaminsav	20,6	20,3
Almasav	4,6	4,8
Triptofán	5,1	4,9

6.2.3.3 Linearitás és dinamikus tartomány

A MSX módszer alkalmazásakor belső standard használatával valamennyi komponens esetén lineáris kalibrációs egyenest kaptunk. A 10. ábrán a szerin kalibrációs egyenesét tüntettük fel. Az illesztések során nem használtunk súlyozást, és a kalibrációs szintek pontosságának hibahatára $\pm 15\%$ volt, az LLOQ-nál $\pm 20\%$. A kalibrációs egyenesek alsó pontjának az LLOQ értékeket tekintettük, míg az ULOQ (upper limit of quantitation) értéknek annak a legnagyobb koncentrációjú standard oldatnak a koncentrációját, amelyre még érvényes volt az a feltétel, hogy az egyenes illesztésekor kapott R^2 érték nagyobb, mint 0,99.



8. ábra: A szerin kalibrációs egyenese MSX módszer alkalmazásával

A **10 táblázatban** foglaltuk össze a kiválasztott központi metabolitok meghatározására kidolgozott MSX és nem MSX módszerre jellemző dinamikus tartományokat. Megállapíthatjuk, hogy a vegyületek jelentős részében a MSX módszer csak viszonylag szűk tartományban biztosít lineáris kalibrációt. A doktori munkám során alkalmazott FIA módszerekre általánosan jellemző, hogy alkalmazásukkal csak szűk dinamikus tartomány érhető el (Zubaidi et al., 2019). Ennek oka, hogy az injektált mintákban található komponensek egy időpontban lépnek be a készülék ionforrásába, így jelentős ionelnyomó, vagy ionerősítő (ion enhancement) hatás éri a mért komponenseket, ami miatt a kalibrációs egyenesek szűk tartományban illeszthetők lineárisan. Ezen a problémán segít a belső standard alkalmazása. A belső standardra hasonló mértékben érvényes az ionforrásban tapasztalható ionelnyomó/ionerősítő hatás, így alkalmazásával korrigálni tudjuk a nagyobb koncentrációjú kalibrációs minták esetén tapasztalható intenzitás csökkenést/növekedést. Az általuk alkalmazott szintetikus aminosav, a tienil-analin belső standard segítségével sok hasonló szerkezetű aminosav (pl. szerin, triptofán, treonin) esetén kaptunk akár három nagyságrendet átölelő tartományban is lineáris kalibrációs egyenest. Ezzel szemben a kis tömegű szerves savak esetén csak egy, másfél nagyságrendben bizonyult lineárisnak a kalibráció. A jelenség oka az lehet, hogy a szóban forgó vegyületekre nagyobb mértékben érvényesültek az ionforrásban tapasztalt ionelnyomó/ionerősítő hatások, mint a belső standardra. Annak érdekében, hogy a vizsgált vegyületek számát ne növeljük, csak egy belső standardot alkalmaztunk.

10. táblázat: Dinamikus tartomány és R² értékek alakulása MSX és nem MSX módszer esetén

Komponens	Multiplex módszer		Nem multiplex módszer	
	Dinamikus tartomány [ng/ml]	R ²	Dinamikus tartomány [ng/ml]	R ²
Aszparagin	20-5000	0,9989	10-1000	0,9998
Cisztation	10-200	0,9980	5-100	0,9978
Glutársav	5-500	0,9970	5-500	0,9994
Oxálecetsav	100-1000	0,9937	100-2000	0,9942
Aszparaginsav	10-1000	0,9938	5-500	0,9994
Citrullin	5-500	0,9962	5-500	0,9952
Glutamin	20-5000	0,9974	20-5000	0,9920
Ketoglutársav	100-1000	0,9962	100-1000	0,9951
Fenil-tejsav	5-500	0,9980	5-500	0,9997
Akonitsav	10-2000	0,9953	20-2000	0,9974
Fumársav	20-1000	0,9944	20-1000	0,9923
Szerin	10-10000	0,9998	10-10000	0,9994
Borostyánkősav	20-200	0,9962	20-100	0,9910
Treonin	5-10000	0,997	5-10000	0,9996
Citromsav	100-1000	0,9987	100-1000	0,9982
Hisztidin	20-500	0,9957	20-500	0,9985
Izocitromsav	50-500	0,9928	50-200	0,9911
Nikotinsav	100-10000	0,9970	100-10000	0,9999
Tirozin	10-5000	0,9992	10-5000	0,9980
Glutaminsav	50-1000	0,9944	50-1000	0,9938
Almasav	10-200	0,9994	10-200	0,9921
Triptofán	10-10000	0,9979	10-10000	0,9990

Amennyiben szélesebb dinamikus tartomány elérése a cél a szerves savak esetén is, egy további, a szerves savakkal hasonló szerkezettel rendelkező belső standard módszerbe illesztésével ez a probléma orvosolható. A belső standardok számának növelése ugyanakkor növeli az ionforrásba egy időben belépő anyagmennyiséget, így további ionelnyomó hatást okoz, ezáltal csökken az érzékenység. Esetünkben a módszerfejlesztés során a nagyobb érzékenységet tekintettük elsődlegesnek a dinamikus tartománnyal szemben, ezért alkalmaztunk egy belső standardot. A dinamikus tartomány növelhető kvadratikus illesztés alkalmazásával (Gu et al., 2014), ugyanakkor ez a típusú illesztés nagyobb pontatlanságot okoz a minták mérése során. Nagy koncentrációknál egy másik lehetőség a dinamikus tartomány növelésére a vizsgált szülőionok és fragmensek

egy kevésbé intenzív izotópjának figyelembevétele (Trobiani et al., 2017). A technika alkalmazását a módszerfejlesztés során elvetettük, ugyanis annak érdekében, hogy egy vegyület több izotópját is detektálni tudjuk, a kvadrupólt nagy izolációs ablak mellett kell használni, ami megnöveli a zaj nagyságát, ezáltal rontja az érzékenységet, és csökkenti a módszer megbízhatóságát.

Összevetve a MSX és a nem MSX módszerek alkalmazása esetén kapott dinamikus tartományokat megállapíthatjuk, hogy a MSX technika alkalmazása önmagában nem eredményez szűkebb dinamikus tartományt. A szerves savak esetén tapasztalt szűk kalibrációs tartományok a nem tökéletesen megválasztott belső standardnak köszönhetők.

6.2.3.4 Alkalmazás biológiai mintákon

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a fejlesztett módszer alkalmazhatóságáról, biológiai mintákon teszteltük. Három modell organizmust választottunk ki, a fonalas gomba *A. nidulanst*, a növény *A. thalianát* és a HO-1-N-1 humán karcinóma sejt vonalat. A biológiai mátrixokból a vizsgált vegyületeket irodalmi példák alapján nyertük ki (Zhang et al., 2019; Sotelo-Silveira et al., 2015; Zhou et al., 2020).

Valamennyi elkészített mintát ötször injektáltunk, majd a metabolitok koncentrációját 5 párhuzamos analízis eredményeként határoztuk meg. Azt tapasztaltuk, hogy a sikeresen kimutatott vegyületek esetén minden esetben tíz százalék alatti szórással tudjuk detektálni a komponenseket. A növényi és humán sejt mintákban minden metabolit mennyiségét öt százaléknál kisebb szórással tudtuk meghatározni, a fonalas gomba extraktumokban több komponens mennyiségi meghatározása esetén is öt és tíz százalék közötti szórást tapasztaltunk. Összességében elmondható, hogy a fejlesztett módszer a sikeresen detektált komponenseket kellő precizitással képes kimutatni (**11. táblázat**).

Az *A. nidulans* extraktumokban a legtöbb komponenst kimutattuk a nikotinsav és a citrullin kivételével, annak ellenére, hogy a gomba mind a két vegyületet termeli (El-Sayed et al., 2019) (Vatsala et al., 1976). A nikotinsav sikertelen detektálásának oka feltehetőleg a magas LLOQ értékben keresendő. A detektált metabolitok mennyisége nagyságrendileg megegyezett a rokon *A. niger* micéliumában található ugyanezen metabolitok mennyiségével (Jernejc et al., 1992, Lameiras et al., 2015).

11. táblázat: Különböző biológiai mintákban kimutatott metabolitok mennyisége

	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HO-1-N-1 humán sejtvonals
Komponens	Mennyiség az extraktumban [ng/mL]	Mennyiség az extraktumban [ng/mL]	Mennyiség az extraktumban [ng/mL]
Aszparagin	120 ($\pm 6,7$)*	1008 (± 3)	-
Cisztation	80 ($\pm 4,6$)	-	-
Glutársav	12 ($\pm 8,9$)	-	-
Oxálecetsav	12657 ($\pm 4,8$)	12925 ($\pm 3,3$)	5623 ($\pm 4,9$)
Aszparaginsav	344 ($\pm 7,9$)	1390 ($\pm 2,4$)	1190 ($\pm 1,8$)
Citrullin	-	220,6 ($\pm 3,7$)	-
Glutamin	8462 (± 5)	8191,7 ($\pm 2,9$)	14691 ($\pm 1,2$)
Ketoglutársav	147 ($\pm 4,6$)	197,1 ($\pm 3,3$)	1058 ($\pm 1,2$)
Fenil-tejsav	6 ($\pm 5,2$)	-	-
Akonitsav	125($\pm 2,2$)	26,2 (± 3)	219 ($\pm 4,6$)
Fumársav	580 ($\pm 2,5$)	3161,7 ($\pm 2,3$)	2671 ($\pm 3,6$)
Szerin	135 ($\pm 6,3$)	739,6 ($\pm 3,7$)	338 ($\pm 4,8$)
Borostyánkősav	36411 ($\pm 4,1$)	1508,1 (± 3)	953 ($\pm 1,6$)
Treonin	280 ($\pm 6,8$)	2932,1 ($\pm 4,4$)	346 ($\pm 3,4$)
Citromsav	1547 ($\pm 1,7$)	296,1 ($\pm 5,1$)	2160 ($\pm 2,9$)
Hisztidin	1052 ($\pm 2,4$)	-	1126 (± 2)
Izocitromsav	75 ($\pm 4,5$)	-	-
Nikotinsav	-	-	-
Tirozin	81 ($\pm 7,3$)	22,3 ($\pm 4,1$)	-
Glutaminsav	8462 (± 5)	2079,4 ($\pm 1,7$)	1650 ($\pm 1,1$)
Almasav	1252 ($\pm 4,6$)	1184,2 ($\pm 3,9$)	2312 ($\pm 2,1$)
Triptofán	40 ($\pm 8,1$)	13,2 ($\pm 4,2$)	23,1 ($\pm 2,7$)

*:Minden érték öt ismétlés átlaga. Átlag (\pm RSD%)

Kevesebb komponenst mutattunk ki a növényi eredetű extraktumban és humán karcinóma sejtekben. A sikertelen kimutatások oka részben a magas LLOQ értékekben keresendő, amely (a későbbi fejezetben részletesen tárgyalt) a mátrixhatásra vezethető vissza. Továbbá az alkalmazott extrakciós módszerek általános eljárások, amelyek egyes komponensek esetében nem rendelkeznek megfelelő hatékonysággal a keresett komponensek kimutatásához. A felsorolt faktorok egymást erősítő hatása vezethetett például a glutársav és a fenil-tejsav sikertelen kimutatáshoz, melyeket a humán karcinóma sejtek nagyon kis mennyiségben tartalmaznak (Gerstner et al., 2005 Li et al., 2019).

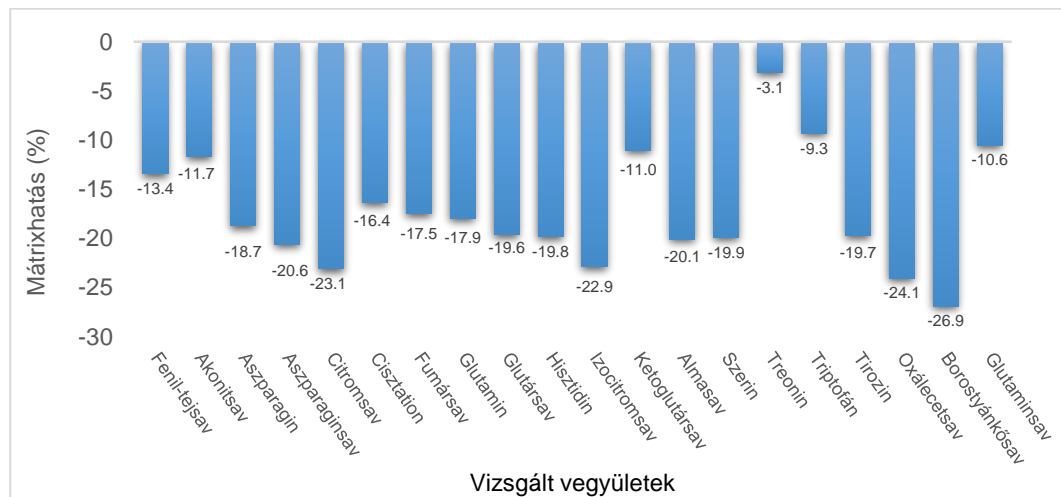
A módszer alkalmazhatóságát támasztja alá, hogy *A. thaliana* levelek vizsgálata során az általunk meghatározott koncentrációkhoz hasonló mennyiségben detektálták a citromsavciklus elemeit (Lee et al., 2020). Aminosavak és citromsavciklus elemek tekintetében ugyancsak nagyságrendileg azonos mennyiséget mutattak ki HeLa sejtvonal lizálását követően (Chen et al., 2016).

6.2.4 Mátrixhatás vizsgálata

A módszerben szereplő komponensek esszenciálisak a vizsgált biológiai rendszerekben, így nem lehet olyan extraktumot készíteni, amelyek ne tartalmazzák a mért vegyületeket. Ezért az összetett mátrixszal rendelkező minták esetén megszokott mátrix-azonos kalibrációs oldatsorozatok elkészítésére nem volt lehetőség. Ugyanakkor elengedhetetlen volt a mátrixhatás vizsgálata, hogy megismerjük, mekkora pontatlanság adódik abból, hogy a minták nagy mennyiségben tartalmazzanak mátrixkomponenseket, míg a kalibrációs oldatsorozat tiszta oldószerben készült. A mátrixhatás meghatározása során a Matuszewski által kidolgozott utólagos extrakciós adagolást követő összehasonlításos módszert alkalmaztuk (Matuszewski et al., 2003). Az eljárást során első lépésben a vizsgált extraktumokat két részre osztottuk. Az egyik részhez öt térfogat százalék mennyiségben belső standardot adtunk, majd a fejlesztett módszerrel meghatároztuk benne a vizsgált komponensek koncentrációját. A meghatározott koncentrációk alapján egy olyan oldatot készítettünk, amely a belső standard mellett akkora koncentrációban tartalmazta a vizsgált komponenseket, hogy azokat a minta másik részletéhez öt térfogatszázalék egységben adva, a mintában lévő koncentráció ötven százalékkal növekedjen. Ezek után az adalékolt mintában kapott csúcsalatti területből kivontuk a kiindulási mintában kapott csúcs alatti területet, majd a kapott eredmény és az adalékolt mennyiséghez tartozó csúcs alatti terület hányadosát vettük **(5.2.8 fejezet)**. A könnyebb értelmezhetőség érdekében a kapott eredményeket százalékos értékben fejeztük ki. Amennyiben a mátrixhatás negatív előjelű, a mátrixnak ionelnyomó hatása van az adott komponensre, míg ha pozitív előjelű, a mátrixnak jelintenzitás növelő hatása van az adott komponensre. A vizsgálati módszer jellegéből adódóan csak azokban az esetekben tudtuk meghatározni a mátrixhatást, ahol sikeresen kimutattuk a komponenset a mintákból.

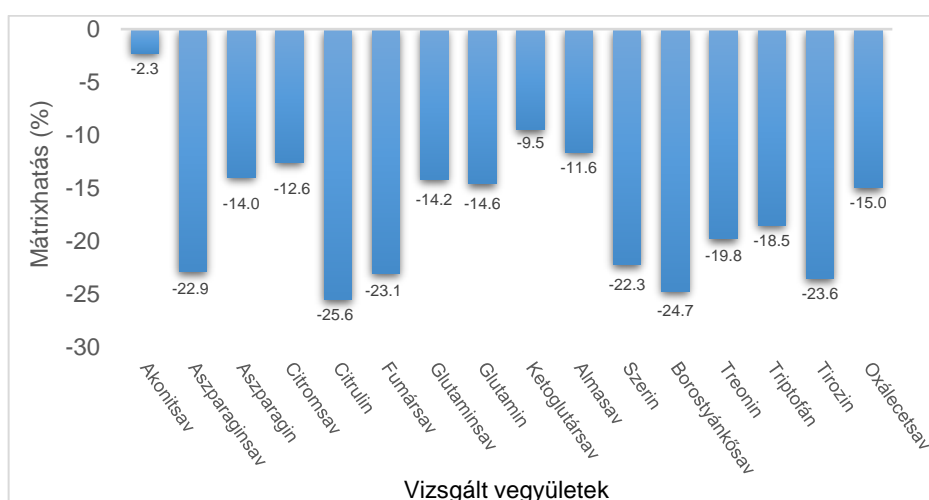
Mint az várható volt, az eredmények szerint a biológiai mintákban lévő háttérkomponensek jelcsökkentő hatásának köszönhetően a legtöbb komponenst a nominálisnál kisebb koncentrációban detektáltuk a mintákban.

Az *A. nidulans* extraktumok vizsgálata során valamennyi sikeresen kimutatott komponens esetén a mátrixnak ionelnyomó hatása volt. A mátrix jelenlétének köszönhetően tizennégy esetben húsz százaléknál kisebb, míg hat esetben húsz és huszonöt százalék közötti jelintenzitás csökkenést figyeltünk meg (9. ábra)



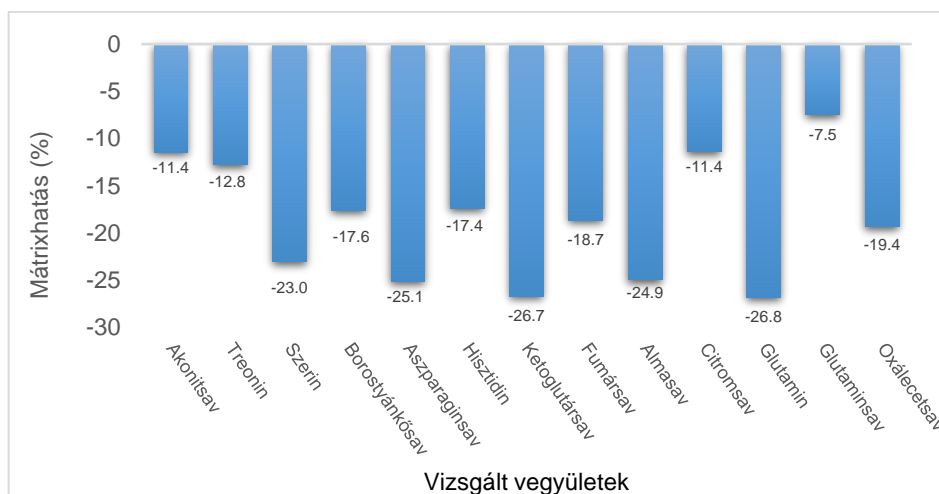
9. ábra: Mátrixhatás *A. nidulans* extraktumokban

Az *A. thaliana* extraktumok vizsgálata esetén tíz esetben tapasztaltunk húsz százaléknál kisebb mátrix okozta ionelnyomó hatást, míg négy esetben volt mínusz húsz és huszonöt százalék közötti a mátrixhatás (10. ábra)



10. ábra: Mátrixhatás *A. thaliana* extraktumokban

A HO-1-N-1 humán karcinóma sejtvonal vizsgálat során csak négy esetben kaptunk húsz és huszonöt százalék között negatív mátrix hatást, míg a többi esetben a mátrixnak nem volt húsz százaléknál nagyobb jelintenzitás csökkentő hatása (**11. ábra**)



11. ábra: Mátrixhatás humán karcinóma sejtekben

Összességében elmondható, hogy a mért komponensek detektálhatóságát a vizsgált rendszerekben a háttérkomponensek nem befolyásolják jelentősen. Ennek oka az lehet, hogy már a standard minták mérése során jelentős a mért komponensek egymásra gyakorolt ionelnyomó hatása összevetve a biológiai mintákban a mátrixkomponensek által kifejtett ionelnyomó hatással.

6.3 Multiplex módszer fejlesztése mikotoxinok mennyiségi meghatározására

6.3.1 Tömegspektrometriás körülmények optimalizálása

Mikotoxinok mennyiségi meghatározására alkalmas multiplex módszer kidolgozásakor első lépésként az optimális eluent választottuk ki. A kiválasztás során a legfontosabb szempont az volt, hogy valamennyi komponenst a lehető legnagyobb jelintenzitással tudjunk detektálni. Aflatoxinok esetén a legnagyobb jelintenzitást úgy tudtuk elérni, ha a keletkező nátrium adduktok képződését visszaszorítottuk. Zhou és munkatársai szerint a proton és ammónium adduktok akkor képződnek a legnagyobb arányban, ha alkalmazott eluens 60-80 százalékban tartalmaz metanolt, illetve 1-10 mmol mennyiségben ammónium ionokat (Zhou and Hamburger, 1995). Tapasztalataink szerint a metanol:víz 1:1 + 5 mmol/l ammónium-formiát + 0,5 % hangyasav összetételű eluens alkalmazásakor volt a legkisebb a keletkező nátrium adduktok mennyisége. Az említett

eluens a vizsgált fumonizinek esetén is a legnagyobb proton addukt intenzitást eredményezte. A trichotecének mérésekor megfigyeltük, hogy a metanol:víz 1:1 + 5 mmol/l ammónium-formiát + 0,3 % hangyasav összetételű eluens segítségével érhető el a legnagyobb jelintenzitás. Az OTA esetében a jelintenzitást csak kis mértékben befolyásolta az eluensek összetétele. A HT2 és T2 analízise során megfigyeltük, hogy a vegyületek proton adduktja kis intenzitással rendelkezett, azonban az alkalmazott eluensben lévő ammónium sók jelenléte nagy mennyiségű ammónium-addukt képződéséhez vezetett, ezért az ammónium adduktot választottuk szülőionnak. Mivel az élelmiszerekben az aflatoxinokra vonatkozik a legalacsonyabb kimutatási határ, azt az eluens összetételt részesítettük előnyben, amely az aflatoxinok mérése szempontjából kedvezőbb volt, így a metanol:víz 1:1 + 5 mmol/l ammónium-formiát + 0,5 % hangyasav összetételű puffert választottuk. A végleges módszer során ettől az összetételtől eltértünk, a metanol:víz 7:3 + 5 mmol/l ammónium-formiát + 0,5 % összetételű oldószert alkalmaztunk. A változtatás okát részletesen a **6.3.4 fejezetben** fejtem ki.

A módszerfejlesztés kezdetén a központi metabolitok analíziséhez is használt előtétoszlop alkalmazását terveztük. A későbbi vizsgálatok során azonban kiderült, hogy pusztán az előtétoszlop alkalmazása mellett a módszer nem elég érzékeny a vizsgált aflatoxinok határértékben történő detektálásához, ezért a mérések során egy rövid C18 töltetű UHPLC oszlopot alkalmaztunk. Az UHPLC oszlopra való váltás indoklását a **6.3.4 fejezet** tartalmazza.

A multiplex módszer fejlesztéséhez elengedhetetlen a vizsgált vegyületek valamennyi fragmensének ismerete, ezért megvizsgáltuk, hogyan változik a komponensek fragmentációja, ha az ütközési energiát (NCE) tíz egységenként változtatjuk a 20 és 90 közötti tartományban. Minden komponens esetében kiválasztottuk azt az optimális fragmentációs energiát, ahol a legnagyobb volt a három legintenzívebb fragmens válaszjele. Valamennyi toxinra kigyűjtöttük az összes detektálható fragmenst az optimálisnak ítélt fragmentációs energiákon.

6.3.2 Multiplex módszer fejlesztése

A MSX módszerhez belső standardnak a természetben nagyon ritkán előforduló trichotechént, a verucarrolt választottuk, mivel fertőzött búzában és kukoricában nem jellemző az előfordulása (Biselli et al., 2005). Így a multiplex módszer kidolgozásakor összesen tizenkét vegyületet kellett figyelembe vennünk.

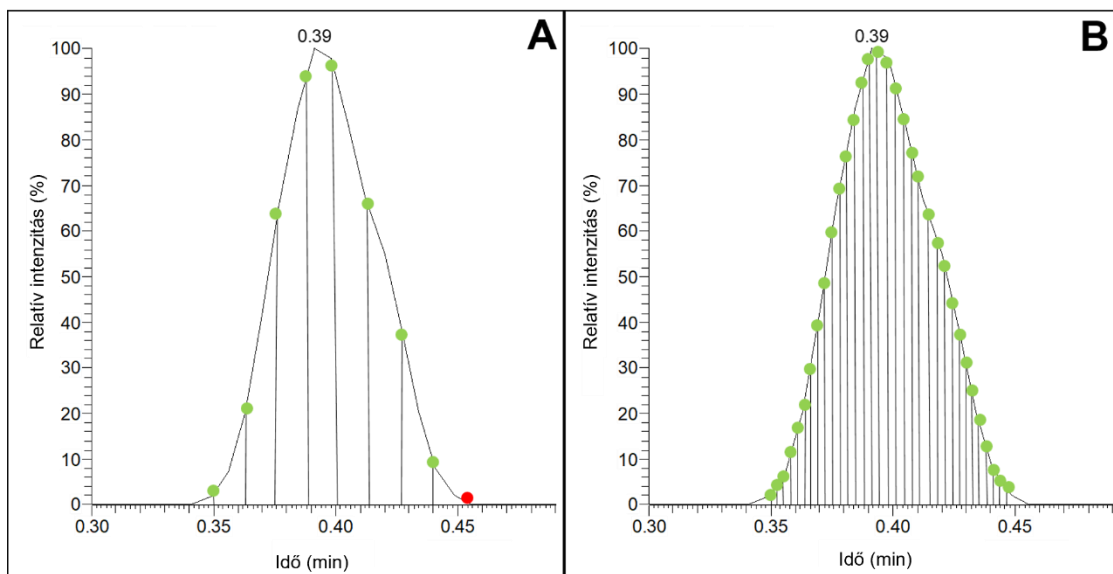
A vegyületek mérési eseményekbe történő osztályozásakor először a szülőionok m/z értékeit vizsgáltuk meg. A megfelelő eluens kiválasztása során megfigyeltük, hogy sok vegyület esetén több addukt ion is képződik, jellemzően nátrium és kálium adduktok. Ennek megfelelően leellenőriztük, hogy a vizsgált vegyületek összes lehetséges szülőionja között található-e olyan páros, ahol a szülőionok tömege közötti különbség kisebb, mint $0,4 m/z$. A DON nátrium és a ZEA proton adduktja között csupán $0,04 m/z$ különbség van, ugyanakkor a DON nátrium ionjának fragmentációja esetén nem keletkezik olyan fragmens, amely a ZEA optimális fragmentációs energia mellett keletkező fragmenseivel azonos lenne. Ugyancsak $0,4 m/z$ -nél kisebb különbség van az AB1 nátrium és DON kálium, az AB1 kálium és AG1 nátrium, az AB2 kálium és AG2 nátrium, az FB1 kálium és FB2 nátrium adduktja között, de a felsorolt adduktok között egyet sem vizsgáltunk a mérések során, így hasonló tömegük nem jelentett problémát a későbbiekben. A HT2 ammónium és az OTA kálium adduktja között csupán $0,2 m/z$ különbség van, de a kiválasztott eluens alkalmazása mellett az OTA kálium adduktjának intenzitása olyan mértékben lecsökkent, hogy a készülék $10 \mu\text{g/ml}$ -es standard koncentráció mellett se tudta kimutatni. A fentiek ismeretében megállapítottuk, hogy a szülőionok m/z értékei nem befolyásolják a mikotoxinok mérési eseményekbe történő sorolását.

A vegyületek fragmentációjának ismeretében a toxinok csoportba sorolásakor az alábbi szempontokat vettük figyelembe:

1. A négy aflatoxin hasonló fragmentációs mintázattal rendelkezik, így nem helyezhetők egy mérési eseménybe.
2. A négy trichotecén alapvázal rendelkező molekulának (DON, T2, HT2 és VOL) a szerkezeti hasonlóságból eredően nincsenek specifikus fragmensei, így különböző csoportokba kell sorolni őket. Ezek alapján a módszernek minimum négy mérési eseményt kellett tartalmaznia.
3. Az aflatoxinok és a trichotechének fragmenseit vizsgálva megfigyeltük, hogy a VOL, HT2 és T2 bármelyik aflatoxinnal egy csoportba helyezhető, ugyanis minden párosítás mellett találtunk nagy intenzitású fragmenseket minden vegyület esetén. A DON azonban csak az AB2-vel kerülhetett egy csoportba. A ZEA esetén specifikus fragmenst csak abban az esetben találtunk, ha a HT2 és az AB1-gyel helyeztük egy csoportba.
4. Az OTA és a két vizsgált fumonizin bármely trichotecén-aflatoxin pár mellé kerülhetett, így ezeket a vegyületeket véletlenszerűen soroltuk csoportokba. A

csoportokon belül az egyes vegyületek fragmentációs energiáit különböző értékre állítottuk be a lehető legnagyobb jelintenzitás elérése érdekében (**4. táblázat**).

A végső módszerben az azonos csoportba tartozó vegyületek egy mérési eseményben szerepelnek, a mérési események összessége pedig a teljes mérési ciklust adja. Mivel a mérések során a felbontást 17500 ($m/z=200$) értékre állítottuk, egy mérési esemény 64 ms volt, míg a teljes ciklus 256 ms-nak adódott, hiszen a vizsgált tizenkét komponenst négy csoportba soroltuk. Összehasonlításképpen, ha valamennyi vizsgált komponenst külön mérési eseménybe helyeztük volna, a teljes mérési ciklus pontosan háromszor ilyen hosszú, 768 ms lett volna. Ebben az esetben a fumonizinek és a DON kivételével egyik kiválasztott mikotoxint sem tudtuk volna a határérték közelében kimutatni sem búza, sem kukorica mátrix esetén, mivel a készülék nem lett volna képes a csúcs definiálásához szükséges 10 adatpont gyűjtésére. A MSX technika alkalmazásával azonban az adatpontok száma megnövekedett, mint az látható a HT2 toxin példáján keresztül bemutatva a **12. ábrán**.



12. ábra: HT2 kimutatás során gyűjtött adatpontok tizenkét vegyület párhuzamos kimutatása esetén. A: MSX technika alkalmazása nélkül, B: MSX technika alkalmazásával

6.3.3 UHPLC-MS/MS módszer fejlesztése

Akárcsak a központi metabolitok mérése esetén a mikotoxinok analízise során is kidolgoztunk egy általánosnak tekinthető módszert, amivel össze tudtuk hasonlítani a MSX módszer teljesítőképességét. Irodalmi példák alapján (De Santis et al., 2019; Narváez et al., 2020) UHPLC-MS/MS módszert fejlesztettünk, C18 töltetű kromatográfiás oszlop alkalmazásával. Az eluens összetétele (5 mmol/l ammónium-

formiát és 0,5% hangyasav) és az ionforrás paraméterei megegyeztek a MSX módszerben alkalmazottakkal. Az oszlop jelenlétének és a gradiens elúciónak köszönhetően valamennyi vegyületet el tudtuk választani, így bár a vegyületek ugyanazon átmeneteit ugyanolyan fragmentációs energia mellett vizsgáltuk, mint a MSX módszer esetén, a készülék egy időben csak egy szülőiont analizált. A végleges módszer tizennyolc perc hosszúságú volt, amely megfelelt egy átlagos multitoxin vizsgálat idejének (Narváez et al., 2020).

6.3.4 Mikotoxin extrakció optimalizálása

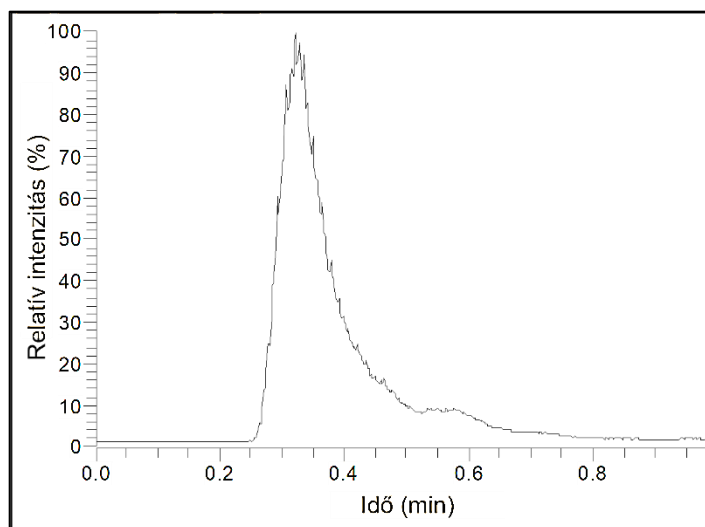
Olyan komplex mátrixokból történő mérések esetén, mint a mikotoxin analízis búzából és kukoricából, a mintaelőkészítés nagy jelentőséggel bír, ugyanis a végső módszer érzékenyégét a mérések során alkalmazott készülék teljesítőképessége mellett a mintaelőkészítés határozza meg legnagyobb mértékben. Ennek megfelelően a mintaelőkészítés valamennyi lépését optimalizáltuk.

Az mintaelőkészítési lépések optimalizálása során toxint nem tartalmazó búzát és kukoricát készítettünk elő, majd az extraktumokhoz mikotoxinokat adagoltunk olyan mértékben, hogy az oldat homogenizálása után kapott minták a mikotoxinokat a határértéknek megfelelő mennyiségben tartalmazzák.

Először a kukorica és búza őrleményt acetonitril:víz:ecetsav oldószer eleggyel extraháltunk, majd a felülúszót injektáltuk az HRMS készülékbe, a központi metabolitok analízise során is alkalmazott előtétkolonna alkalmazása mellett. A fejlesztett multiplex módszerrel azonban egy vizsgált toxint se tudtunk kimutatni a határértékben addíciónált vak mintákból. Ugyanakkor a kidolgozott UHPLC-HRMS módszer segítségével a HT2 kivételével, valamennyi toxint határértékben detektáltuk. Mivel a **6.2.3.2 fejezetben** megállapítottuk, hogy a multiplex technika alkalmazása önmagában nem okoz érzékenység veszteséget, ezért feltételeztük, hogy a mátrixban lévő egyéb komponensek nagy mennyiségére vezethető vissza a kisebb érzékenység. Megfigyeléseink összhangban vannak a szakirodalmi tapasztalatokkal, miszerint a kukorica minták analízise során a jelintenzitás csökkenésének oka az extraktumokban lévő zsírok és pigmentek (Zhang et al., 2018).

Először rövid fordított fázisú kolonna alkalmazásával kívántuk csökkenteni a mátrixkomponensek zavaró hatását (Gray et al., 2016). Olyan izokratikus LC módszer kidolgozása volt a cél, amely a vizsgált komponensek minimális retencióját eredményezi,

így a zavaró komponensektől kis mértékben elválnak, ugyanakkor a módszer kellően gyors tud maradni. Ezt az eddigiekben is alkalmazott ammónium-formiát és ecetsav tartalmú eluensek segítségével szeretnénk volna elérni, csupán a víz-metanol arányt változtattuk. Azt tapasztaltuk, hogy a 7:3 arányú metanol-víz eluensösszetétel mellett a megállapított feltételek teljesülnek. A kromatográfiás oszlop alkalmazásával a teljes módszer 0,6 percről 1 percre hosszabbodott (**13. ábra**). Bár az érzékenység nőtt, továbbra sem tudtuk a vizsgált komponenseket határértékben detektálni.



13. ábra. Egy vizsgált minta teljes ion kromatogramja

Az érzékenység az alkalmazott mintaelőkészítési eljárás módosításával is növelhető. A mintaelőkészítési eljárást a QuEChERS mintaelőkészítés egyes lépéseivel egészítettük ki. Ennek megfelelően az extraktumokat SALLE-nak vetettük alá. SALLE során a kukorica vagy búza extraktumokhoz különböző ásványi és szerves sókat nagy koncentrációban tartalmazó oldatot adtunk, melynek hatására a kapott oldat kétfázisú lett. A felső szerves fázisban a vizsgált komponensek feldúsultak, míg a kiindulási extraktumban található sók és poláris vegyületek az alsó fázisban maradtak. Akárcsak a rövid kolonna alkalmazása, a SALLE mintaelőkészítési lépés bevezetése is jelintenzitás növekedést okozott, de a vizsgált vegyületeket továbbra sem tudtuk határértékben detektálni.

A mátrixkomponensek mennyiségének további csökkentésének érdekében a szakirodalomban több helyen fellelhető dSPE módszert is adaptáltuk (Cunha and Fernandes, 2010), PSA, C18 adszorbens, aktív szén, illetve ezek keverékének hatékonyságát vizsgáltuk dSPE alkalmazása során. Az aktív szén tartalmú szorbens keverékek a trichotechének kimutathatóságát növelték, ugyanakkor az aktív szén a többi

vizsgált toxint megkötötte. A PSA-C18 szorbens keverék alkalmazása valamennyi komponens kimutathatóságát növelte. Ennek ellenére a legalacsonyabb határértékkel rendelkező aflatoxinok és OTA határértékben történő mennyiségi meghatározásához még mindig nem volt elég érzékeny a módszer.

Miután a nyers extraktumokat SALLE és dSPE mintaelőkészítési lépéseknek vetettük alá, a kapott mintákat tízszeresére töményítettük bepárlás és eluensben történő visszaoldás segítségével. A mérések során megfigyeltük, hogy amennyiben tízszeres töményítést alkalmazunk, a legtöbb toxin esetén nem növekedett tízszeresre az egyes komponensek csúcs alatti területe. A jelintenzitás növekedés azonban már elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy valamennyi vizsgált mikotoxint az előírásokban megadott határértékben detektálhassunk. Mivel a mérések során egy rövid kromatográfiás oszlopot alkalmaztunk – még ha nem is történt rajta elválasztás – a fejlesztett módszerre a dolgozatban inentől kezdve PRM-MSX néven hivatkozunk.

6.3.5 Módszer validálása

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a fejlesztett módszer valóban alkalmas a vizsgált mikotoxinok határértékben való kimutatására, a módszert az érvényben lévő EMA útmutató alapján validáltuk. A validálás során meghatároztuk a PRM-MSX módszerre jellemző LLOD és LLOQ értékeket, a dinamikus tartományt, a mátrix hatást és a visszanyerést, valamint a kapott értékeket összevetettük a szakirodalmi példák alapján fejlesztett UHPLC-MS/MS módszer hasonló paramétereivel.

6.3.5.1 Szelektivitás vizsgálata

A szelektivitás vizsgálata során a vizsgálni kívánt mikotoxinokat kimutatható mennyiségben nem tartalmazó búza és kukorica extraktumokat (mátrix-vak mintákat) a fejlesztett módszerrel mérve egyik vizsgált toxin esetén sem tapasztaltunk olyan zavaró jelet, amelynek intenzitása az LLOQ intenzitásának 20 százaléka lett volna. Továbbá, a belső standardra jellemző csúcs alatti terület öt százalékánál nagyobb mennyiségben jelen lévő zavaró komponenst sem találtunk.

Egy további szelektivitás vizsgálatot is elvégeztünk, mely során toxin-vak minták adagolásával olyan mintákat készítettünk, amelyek csak egy toxint tartalmaztak magas koncentrációban. Valamennyi toxint csak abból a mintából tudtuk kimutatni,

amelyben az ténylegesen jelen volt, tehát a kiválasztott specifikus fragmensek csak az adott szülőionból keletkeztek.

6.3.5.2 Kimutatás és meghatározás alsó határának meghatározása

A LLOD és LLOQ értékek meghatározása során toxin-vak extraktumokhoz adagoltuk a belső standardot, illetve toxin-vak extraktumban feloldott mikotoxinokat, így egy mátrix-azonos hígítási sort készítettünk 10000-0,125 µg/kg koncentráció tartományban. Az oldatsorozat segítségével meghatároztuk valamennyi komponensre a LLOD és LLOQ értékeket a PRM-MSX és az UHPLC-MS/MS módszerrel is (**12. táblázat: LLOD és LLOQ értékek kukorica mátrixban µg/kg-ban**). Valamennyi komponens esetén azt a koncentrációt jelöltük meg LLOD értéknek, ahol a kapott jel a zaj minimum háromszorosa volt. Az LLOQ értéknek azt a koncentrációt tekintettük, amely esetén a zaj minimum ötszörösénél nagyobb jelet detektáltunk. Az LLOQ értékek meghatározásánál további szempont volt, hogy a meghatározott koncentráció a későbbiekben illesztett kalibrációs egyenes legalsó illeszthető pontja legyen. Fontos megjegyezni, hogy az LLOD és LLOQ értékek búza, illetve kukorica tömegre visszaszámolva tüntettük fel és a teljes analitikai módszerre vonatkoznak, ami tartalmazza a mintaelőkészítést is a tízszeres töményítési lépéssel együtt.

12. táblázat: LLOD és LLOQ értékek kukorica mátrixban µg/kg-ban

	PRM-MSX		UHPLC-MS/MS		Határérték (µg/kg)
	LLOD (µg/kg)	LLOQ (µg/kg)	LLOD (µg/kg)	LLOQ (µg/kg)	
AB1	1,5	2,8	0,125*	0,2	5
AB2	1,1	2,4	0,125*	0,3	5
AG1	1,4	2,8	0,125*	0,2	5
AG2	2,1	2,8	0,125*	0,3	5
DON	533	640	105	128	1750
FB1	14,4	20	22	30	1000
FB2	9,6	20	21	30	1000
HT2	43	64	42	61	100
OTA	2,4	3,5	0,3	1	5
T2	4,8	10	1,25	4	100
ZEA	41,6	64	1,75	4	200

* Vizsgált koncentrációtartomány alsó pontja

A kukorica mátrixban tapasztalt kimutatási határokat (**12. táblázat**) megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy valamennyi aflatoxin, az OTA és a HTA toxin esetén a multiplex módszer segítségével a határértéknek megfelelő mennyiség fele is megbízhatóan meghatározható. A DON és a ZEA esetén az LLOQ harmada volt az előírt határértéknek. A T2 vizsgálata során tapasztalt kimutatási határ az indikatív mennyiség egy tizede, a két vizsgált fumonizin esetén pedig az LLOQ érték negyvened része az Európai Uniók rendeletekben megszabott határértéknek. Összességében elmondható, hogy a fejlesztett módszer segítségével valamennyi komponens a megszabott határértéknél alacsonyabb koncentrációban határozható meg.

A PRM-MSX módszert az UHPLC-MS/MS módszerrel összehasonlítva kukorica mátrix esetén megfigyelhető, hogy az aflatoxinok és a ZEA meghatározása során közel egy nagyságrenddel jobb érzékenység érhető el UHPLC-MS/MS technika segítségével. Ugyancsak érzékenyebb az UHPLC-MS/MS módszer a DON, az OTA és a T2 vizsgálata esetén. A fumonizinek és a HT2 toxin nagyobb érzékenységgel mutathatók ki PRM-MSX módszerrel, mint UHPLC-MS/MS mérésekkel. Röviden összefoglalva a legtöbb esetben érzékenyebb az UHPLC-MS/MS módszer, de valamennyi toxint a PRM-MSX módszer segítségével is határértékben tudunk mennyiségileg meghatározni. A kisebb érzékenység okát részletesen a **6.3.5.4 fejezetben** tárgyaljuk.

Búza mátrixban vizsgálva a kimutatási és meghatározási határokat (**13. táblázat**) megállapítható, hogy annak ellenére sikerült valamennyi vizsgált vegyületet a határértéknél kisebb kimutatási határral meghatározni, hogy a határérték a legtöbbször alacsonyabb, mint kukorica esetén. Ennek oka lehet, hogy az általunk is alkalmazott QuEChERS mintaelőkészítést követően a búza extraktumoknak kisebb a zsír és pigment tartalma, mint a kukorica extraktumoknak (García-López et al., 2008). A fumonizinekre nem vonatkozik legfelső megengedett határérték búzára, így az említett vegyületeket nem vizsgáltuk. Érdeemes megemlíteni, hogy egyes toxinokat kukorica mátrixhoz képest nagyobb érzékenységgel tudunk kimutatni (DON, OTA, HT2). Összességében elmondható, hogy búza mátrix esetén is alkalmas a módszer minden komponens határértéknél alacsonyabb koncentrációban történő meghatározására.

Akárcsak kukorica mátrix esetén, búza mátrixban is meghatároztuk az LLOD és LLOQ értékeket UHPLC-MS/MS módszer segítségével (**13. táblázat**). Eredményeink szerint a vizsgált aflatoxinok, a ZEA és a DON esetében nagyobb érzékenységet tudunk kromatográfiás elválasztás segítségével elérni. Ugyanakkor HT2, OTA, és T2 esetén a multiplex módszer bizonyult kis mértékben érzékenyebbnek.

13. táblázat: LLOD és LLOQ értékek búza mátrixban µg/kg-ban

	PRM-MSX		UHPLC-MS/MS		Határérték (µg/kg)
	LLOD (µg/kg)	LLOQ (µg/kg)	LLOD (µg/kg)	LLOQ (µg/kg)	
AB1	1,05	1,5	0,125*	0,3	2
AB2	0,4	1	0,15	0,5	2
AG1	0,9	1,5	0,125*	0,3	2
AG2	1,4	1,6	0,15	0,5	2
DON	355	480	280	320	1250
HT2	14,5	20	20	40	50
OTA	1,35	2	3,1	5	5
T2	11	15	8	16	50
ZEA	45,5	60	0,5	2,5	100

*: Vizsgált koncentráció tartomány alsó pontja

Összességében elmondható, hogy a vizsgált toxinok a fejlesztett PRM-MSX módszer segítségével mind kukorica, mind búza mátrix esetén határértékben detektálhatók és mennyiségileg meghatározhatók. A kidolgozott PRM-MSX módszert UHPLC-MS/MS módszerrel összehasonlítva megállapítható, hogy a kromatográfias elválasztást is tartalmazó módszer több vegyület esetén érzékenyebb, de a PRM-MSX módszer is alkalmas valamennyi vizsgált toxint határértékben detektálni.

6.3.5.3 Linearitás és dinamikus tartomány meghatározása

A linearitás és dinamikus tartomány vizsgálatához egy olyan oldatsorozatot használtuk, amely 10000-0,125 µg/kg koncentráció tartományban tartalmazott mátrix-azonos kalibrációs pontokat. A multiplex módszer segítségével mind búza, mind kukorica mátrix esetén lineáris kalibrációs görbéket kaptunk VOL belső standard alkalmazása mellett. Akárcsak a központi metabolitok analízisének, itt is a kalibrációs egyenesek első pontja az LLOQ értéke volt, míg az ULOQ a legmagasabb koncentrációjú még illeszthető mátrix-azonos standard oldat volt. Az R^2 értékek minden vegyület esetében nagyobbak adódtak mint 0,99, így teljesül az EMA útmutató idevonatkozó követelménye (**14. táblázat**)

A multiplex módszer segítségével kapott kalibrációs egyeneseket az UHPLC-MS/MS módszerrel összehasonlítva megállapítható, hogy az R^2 értékekben nincs

számottevő különbség, azaz PRM-MSX módszer alkalmazása esetén nem romlik a kalibrációs egyenes illeszthetősége.

14. táblázat: Linearitás és dinamikus tartomány különböző mátrixok mellett

	Kukorica mátrix				Búza mátrix			
	R ²		Kalibrációs tartomány		R ²		Kalibrációs tartomány	
	MSX.	O.	MP. (µg/kg)	O. (µg/kg)	MSX.	O.	MP. (µg/kg)	O. (µg/kg)
AB1	0,9989	0,9990	2,8-600	0,2-100	0,9977	0,9988	1,5-350	0,3-100
AB2	0,9956	0,9981	2,4-600	0,3-100	0,9967	0,9975	1-350	0,5-100
AG1	0,9977	0,9985	2,8-600	0,2-100	0,9983	0,9981	1,5-350	0,3-100
AG2	0,9973	0,9982	2,8-600	0,3-100	0,9969	0,9984	2-350	0,5-100
DON	0,9937	0,9991	640-9600	128-3500	0,9937	0,9982	480-2400	320-9600
FB1	0,9971	0,9997	20-1200	30-3500	-	-	-	-
FB2	0,9931	0,9998	20-1500	30-3500	-	-	-	-
HT2	0,9931	0,9993	64-5200	61-3500	0,9943	0,9978	20-350	40-240
OTA	0,9986	0,9972	5-600	1-1000	0,9973	0,9999	2-350	8-1400
T2	0,9986	0,9985	10-800	4-250	0,9958	0,9953	15-600	16-480
ZEA	0,9971	0,9981	64-560	4-500	0,9962	0,9984	60-600	2,5-240

MSX.: PRM-MSX módszerrel meghatározott értékek

O.: UHPLC-MS/MS módszerrel meghatározott értékek

A vizsgált aflatoxinok esetén UHPLC-MS/MS módszer segítségével alacsonyabb ULOQ értékeket kaptunk, ugyanakkor az LLOQ értékek is alacsonyabbak voltak. Ezek alapján mind a két módszerre igaz, hogy az aflatoxinok esetén a dinamikus tartomány két, két és fél nagyságrendet ölelt át. A fumonizineket csak kukorica mátrixban vizsgáltuk, hiszen a hatályos jogszabályok csak kukoricára vonatkoznak. Az FB1 és FB2 szélesebb dinamikus tartománnyal rendelkező UHPLC-MS/MS módszer alkalmazása mellett, akár csak a DON és a ZEA. HT2, OTA és T2 esetében nem volt számottevő különbség a két módszer alkalmazása mellett megfigyelhető dinamikus tartományban.

6.3.5.4 Mátrixhatás

Az LC-ESI-MS módszerek alkalmazása esetén összetett mátrixokban a vizsgált komponensek válaszjele csökkenhet, vagy felerősödhet a jelen lévő háttérkomponensek és a vizsgálat tárgyát képező vegyületek közötti, az ionforrásban történő versengésnek köszönhetően.

A mátrixhatás vizsgálatához olyan mintákban vetettük össze az egyes toxinok válaszjelét, ahol a vizsgált toxinok koncentrációja azonos volt, ám az egyik mintasorozatban a komponenseket az eluensben oldottuk, míg a másik oldatsorozat mátrix vak minták utólagos toxinaddíciójával készült. A csúcs alatti területek hányadosából határoztuk meg a mátrix faktort két koncentrációban, az egyik a tapasztalt LLOQ háromszorosa, a másik az ULOQ 80 százaléka volt.

15. táblázat: Mátrix faktor és szórása a vizsgált mátrixokban

	Kukorica mátrix				Búza mátrix			
	MSX.		O.		MSX.		O.	
	Mátrix-faktor	RSD% (n=12)	Mátrix-faktor	RSD% (n=12)	Mátrix-faktor	RSD% (n=12)	Mátrix-faktor	RSD% (n=12)
AB1	0,25	17,1	0,78	5,0	0,14	14	0,68	7,6
AB2	0,18	18,5	0,80	5,2	0,19	14,8	0,71	6,5
AG1	0,14	18,5	0,81	11,5	0,16	12,2	0,69	7,1
AG2	0,12	19,9	0,83	8,4	0,07	17,2	0,65	7,0
DON	0,28	17,3	0,64	13,8	0,28	18,6	0,68	14,2
FB1	0,51	14,6	0,78	8,6	-	-	-	-
FB2	0,96	9,4	0,81	13,7	-	-	-	-
HT2	0,35	14,7	0,72	6,8	0,79	14,4	0,79	9,2
OTA	1,11	8,4	0,74	6,9	0,92	14,6	0,86	8,7
T2	0,34	15,9	0,86	9,2	0,42	19,1	0,81	11,2
ZEA	0,64	15,6	0,70	7,8	1,21	9,3	0,79	8,9

MSX.: PRM-MSX módszerrel meghatározott értékek

O.: UHPLC-MS/MS módszerrel meghatározott értékek

A multiplex módszer alkalmazáskor a válaszjel növekedését csak az OTA esetén kukoricában, valamint ZEA esetén búzában tapasztaltuk, minden más vegyület válaszjele csökkent a mátrix komponensek jelenléte következtében. A mátrixhatás nagysága szerint osztályozható: enyhe ($\pm 20\%$ jelintenzitás növekedés vagy csökkenés), közepes (20-50%

közötti jelintenzitás növekedés vagy csökkenés), vagy erős (50%-nál nagyobb jelintenzitás növekedés vagy csökkenés) lehet (Ferrer Amate et al., 2010).

Enyhe mátrixhatást OTA és FB2 esetén tapasztaltunk mindkét vizsgált mátrixban, míg közepes mátrix hatást figyelünk meg FB1 és ZEA esetén. A legnagyobb jelintenzitás csökkenés az aflatoxinok és a DON esetén jelentkezett. Ez összhangban van Bonfiglio és mtsai. által bemutatott eredményekkel, miszerint az egyes komponensek ESI ionforrásban tapasztalható jelcsökkenése vegyületfüggő, a legpolárisabb vegyületekre a legerősebb (Bonfiglio et al., 1999). Továbbá megfigyeltük, hogy az AB2, AG1 és DON toxinok kivételével a mátrix faktor nagysága különbözik az egyes mátrixokban. HT2, T2 és ZEA vegyületek vizsgálata során kukorica mátrix esetén nagyobb jelintenzitást csökkentő hatást tapasztaltunk, mint búza esetén, ami összhangban van Fernandes mtsai. eredményeivel (Fernandes et al., 2015).

A célkomponensek az egyedi mintákban kellő pontossággal akkor határozhatók meg, ha a mátrixhatás megközelítőleg állandó a teljes vizsgált koncentráció tartományban. Az EMA útmutató szerint az egyes komponensekre vonatkozó dinamikus koncentráció tartomány alsó és felső pontján vizsgált mátrix faktor szórása nem lehet nagyobb, mint 20%. Az általunk fejlesztett multiplex módszer teljesítette ezt a feltételt, hiszen a legnagyobb szórás 19,9% volt AFG2 esetén kukorica mátrixban.

A tapasztalt nagy mátrixhatás oka a QuEChERS mintaelőkészítés, és a kromatográfiás elválasztás hiánya lehet. Mikotoxinok gabonákból történő mennyiségi meghatározása során QuEChERS mintaelőkészítés alkalmazása mellett több kutatás is számottevő jelintenzitás növekedésről, vagy csökkenésről számol be (Fernandes et al., 2015, Pantano et al., 2021). Az alkalmazott dSPE technika normál SPE-re történő cseréjével, vagy immunaffinitás alapú töltetek segítségével csökkenthető lenne a mátrixhatás (Woo et al., 2019), de ezen mintaelőkészítési eljárások alkalmazásával a vizsgálatok kivitelezése időigényesebb és költségesebb lenne. Összevetve a PRM-MSX és az UHPLC-MS/MS módszer alkalmazása mellett megfigyelt mátrixfaktor értékeket látható, hogy a PRM-MSX módszerre jellemző nagy mátrixhatás oka a megfelelő kromatográfiás elválasztás hiánya.

6.3.5.5 Visszanyerés

A multiplex módszer precizitását és pontosságát a teljes mintaelőkészítést és a PRM-MSX módszert is magába foglaló visszanyerési kísérletek segítségével határoztuk meg (16. táblázat)

16. táblázat: Az egyes mikotoxinok visszanyerés a vizsgált mátrixokban

	Kukorica mátrix				Búza mátrix			
	MSX.		O.		MSX.		O.	
	Rec.	RSD% (n=12)	Rec.	RSD% (n=12)	Rec.	RSD% (n=12)	Rec.	RSD% (n=12)
AB1	0,86	13,8	0,87	12,7	0,78	9,2	0,81	11,13
AB2	0,81	7,4	0,82	11,4	0,83	8,3	0,79	8,81
AG1	0,76	6,8	0,86	9,9	0,79	8,6	0,88	13,81
AG2	0,74	6,9	0,84	7,8	0,78	8,5	0,81	6,51
DON	0,85	4,9	0,82	6,8	0,71	11,8	0,79	9,15
FB1	0,71	12,1	0,79	7,9	-	-	-	-
FB2	0,75	7,9	0,76	8,7	-	-	-	-
HT2	0,93	6,1	0,88	11,8	0,71	11,3	0,81	9,15
OTA	0,74	7,2	0,81	6,8	0,71	8,4	0,76	7,88
T2	0,91	7,2	0,79	5,8	0,87	16,5	0,81	9,18
ZEA	0,87	8,2	0,91	6,8	0,81	11,4	0,87	12,1

MSX.: PRM-MSX módszerrel meghatározott értékek

O.: UHPLC-MS/MS módszerrel meghatározott értékek

Rec.: Visszanyerés

A visszanyerés vizsgálata során toxin-vak kukorica és búza mintákhoz mikotoxinokat adagoltunk ismert mennyiségben. A vizsgálatokat a határérték 80, illetve 120 százalékának megfelelő két koncentrációban végeztük el. Hat-hat párhuzamos extrakciót végeztünk mindkét koncentráció esetén, így összesen tizenkét extrakció alapján számítottuk ki a meghatározást és a szórást. A visszanyerést az ismert adagolt koncentráció, valamint a mintákban mátrix azonos kalibrációval meghatározott koncentráció hányadosából számoltuk.

A visszanyerés kukorica mátrix esetén 0,71 és 0,93 között, búza mátrix esetén pedig 0,71 és 0,87 között változott kisebb, mint 16,5% szórás mellett, ami megfelel az Európai Bizottság 401/2006/EK rendeletében előírt alkalmassági kritériumnak. Hasonló visszanyerési értékeket kaptunk az UHPLC-MS/MS módszer alkalmazásakor, ami

alátámasztja azt, hogy a visszanyerés elsősorban nem a tömegspektrometriás mérést, hanem az extrakció hatékonyságát hivatott jellemezni. Az értékek bizonyítják, hogy a multiplex technika alkalmazhatósága érdekében alkalmazott több lépcsős extrakció megfelelő hatékonysággal történt.

A kapott visszanyerési értékek nem mutatnak nagy eltérést a szakirodalomban bemutatott értékektől (Zhang and Banerjee, 2020), (De Santis et al., 2019).

Érdekes megvizsgálni, hogy ha a visszanyeréssel normalizáljuk az LLOQ értékeket, hogyan viszonyulnak a normalizált értékek a határértékhez (**17. táblázat**). Amennyiben a normalizált LLOQ értékek jóval magasabbak a határértéknél, a módszer nem lenne alkalmazható. PRM-MSX módszer esetén valamennyi vizsgált komponens magasabb visszanyeréssel korrigált LLOQ értékkel rendelkezik, mint a jogszabályokban megállapított határérték mindkét vizsgált mátrixban, tehát a módszer alkalmas valós minták mikotoxin tartalmának határértékben történő detektálására és mennyiségi meghatározására.

17. táblázat: Visszanyeréssel korrigált LLOQ értékek PRM-MSX módszer esetén

	Kukorica		Búza	
	Normalizált LLOQ (µg/kg)	Határérték (µg/kg)	Normalizált LLOQ (µg/kg)	Határérték (µg/kg)
AB1	3,3	5	1,8	2
AB2	3,0	5	1,2	2
AG1	3,7	5	1,8	2
AG2	3,8	5	1,9	2
DON	752,9	1750	619,2	1250
FB1	28,2	1000	-	-
FB2	26,7	1000	-	-
HT2	68,8	100	25,8	50
OTA	4,7	5	2,6	5
T2	11,0	100	17,0	50
ZEA	73,6	200	71,4	100

7. Összefoglalás

Bár a HRMS készülékek az egyik legkorszerűbb MS technikát alkalmazzák, érzékenységük jelentősen leromolhat, ha az adott mérési ciklus sok mérési eseményből tevődik össze. Különösen igaz ez több komponens egy időben történő detektálása esetén, mint például UHPLC körülmények és FIA mintabevitel mellett. Ezt a problémát hivatott orvosolni az Orbitrap MS-ekben elérhető MSX technika, amely során egy mérési eseményben több szülőion gyűjtése és fragmentálása történik, melyeket egyszerre injektál a készülék az Orbitrap tömeganalizátorba. A MSX technika alkalmazásával csökkenthető a mérési események száma, ezáltal a teljes mérési ciklus hossza, így jobb érzékenység érhető el egy időben eluálódó komponensek esetén.

Számos biológiai folyamatban fontos szerepet játszó, illetve biomarkerként is használható központi metabolitok és a hozzájuk kapcsolódó aminosavak LC-MS alapú méréstechnikája nagy kihívások elé állítja a kutatókat, ugyanis a szokványos állófázisokon ezek a vegyületek nem analizálhatók. Bár vannak kromatográfiás elválasztást nem alkalmazó FIA-HRMS módszerek, a jobb érzékenység miatt ezek kevésbé szelektív mérési üzemmóddal operálnak, amik nem tudnak különbséget tenni az izobár vegyületek között.

Toxikus hatásuk miatt több fonalas gomba által termelt mikotoxinra a hatóságok határértéket állapítottak meg. Az élelmiszerekből ezen alacsony határértékek kimutatására alkalmazható legkorszerűbb eljárások a LC-HRMS technikák.

Doktori munkám során céлом volt Orbitrap MS segítségével olyan FIA-PRM-MSX módszerek fejlesztése, amely segítségével gyors analízisidő mellett tudunk kvantitatív elemzéseket elvégezni adott komponensek csoportjaira.

Első lépésben megállapítottuk azokat a szabályokat, melyek mentén egy FIA-PRM-MSX módszer sikeresen kifejleszhető.

Ezt követően módszert fejlesztettünk központi metabolitok és a hozzájuk kapcsolódó aminosavak mérésére. A módszerfejlesztés során a vizsgált 23 vegyületet öt csoportba soroltuk, így a teljes mérési módszer 36 másodperc hosszúságú volt. A fejlesztett módszer megfelelt a szelektivitási követelményeknek. A FIA-PRM-MSX módszert nem MSX módszerekkel összehasonlítva megállapítottuk, hogy a FIA-PRM-MSX technika alkalmazása nem okoz érzékenység csökkenést, rosszabb linearitást vagy szűkebb dinamikus tartományt.

A módszert különböző biológiai mintákon teszteltük, és sikeresen mutattuk ki a központi metabolitokat és egyes aminosavakat fonalas gomba, humán sejtvonal és növényi extraktumokból.

PRM-MSX módszert fejlesztettünk olyan feldolgozatlan búzában és kukoricában előforduló mikotoxinok kvantitatív meghatározására, amelyek határértékét az Európai Unió meghatározza. A módszerfejlesztés során a vizsgált 12 mikotoxint fragmentációs sajátosságainak megfelelően négy csoportba soroltuk, illetve optimalizáltuk a mintaelőkészítést, a mintabeviteli eljárást is, melynek köszönhetően a teljes módszer egy perc hosszúságú volt. A módszert ezek után az EMA irányelveknek megfelelően validáltuk, illetve összehasonlítottuk egy szakirodalmi példák alapján fejlesztett UHPLC-MS/MS módszerrel. A módszer validálása során megállapítottuk, hogy az alkalmas valamennyi vizsgált mikotoxin határértékben történő mennyiségi meghatározására búza és kukorica mátrixban. Továbbá valamennyi komponens esetén lineáris kalibrációs egyeneseket kaptunk. A mátrixhatás vizsgálata során megállapítottuk, hogy bár a mátrix érzékenyen érinti a módszerünket, a mátrix-faktor szórása minden esetben 20%-nál kisebb volt. A fejlesztett mintaelőkészítési eljárás a jogszabályokban javasolt minimális értékeknél jobb visszanyeréssel rendelkezett valamennyi vizsgált mikotoxinra, alacsony relatív szórás mellett. Amennyiben a megfigyelt kimutatási határokat korrigáltuk a visszanyeréssel megállapítottuk, hogy valamennyi vizsgált komponenst határértéknél kisebb mennyiségben tudunk kimutatni.

Összességében elmondható, hogy a MSX technika alkalmazásával két PRM-MSX módszert fejlesztettünk, amely alkalmas volt tíznél több komponens egymás melletti detektálására egy perces vagy annál rövidebb analízisidő mellett.

8. Summary

The HRMS instruments apply one of the state-of-the-art acquisition techniques, but when the measuring cycle contains many measuring events the sensitivity decreases dramatically. This effect is especially true in the case of simultaneous detection of multiple compounds, applying UHPLC parameters and FIA sample loading. The MSX acquisition technique available in Orbitrap MS is intended to resolve this problem, where several precursors are collected and fragmented in one measurement event, which are injected to the Orbitrap mass analyzer in one portion. Using MSX technique, the number of the measuring events can be reduced, thereby reducing the whole acquisition cycle length, thus better sensitivity can be achieved for co-eluting compounds.

The LC-MS-based measurement technique of central metabolites and their related amino acids, which play an important role in many biological processes and can also be used as biomarkers, presents a great challenge to researchers, as these compounds cannot be analyzed on conventional stationary phases. Although there are FIA-HRMS methods that do not use chromatographic separation, due to their better sensitivity, they operate with a less selective measurement mode, which cannot differentiate between isobaric compounds.

Due to their toxic effect, the authorities have established the highest limit value for mycotoxins produced by filamentous fungi in food. LC-HRMS techniques are the most up-to-date methods that can be used to detect these low limit values in foods.

In my doctoral thesis, my goal was to develop FIA-PRM-MSX methods with the help of Orbitrap MS, which can be used for quantification of the tested compounds with a fast analysis time.

In the first step, we laid out the basic principles that are necessary for the successful development of an FIA-PRM-MSX method.

Then a method for measuring central metabolites and their associated amino acids was developed. During the development of the method, the 23 tested compounds were classified into five groups, so the entire measurement method was 36 seconds long. The developed method successfully fulfilled the selectivity requirements. By comparing the multiplex method with a non-multiplex method, it was found that the use of the FIA-PRM-MSX technique does not cause a decrease in sensitivity, worse linearity, or dynamic range. During the measurement of biological samples, the tested compounds were successfully detected in filamentous fungi, human cells, and plant extracts.

MSX method was also developed for the quantitative determination of mycotoxins with upper limit determined by the European Union in unprocessed wheat and corn. During the development of the method, the 12 investigated mycotoxins were classified into four groups according to their fragmentation characteristics, and the sample preparation and the sample loading procedure were also optimized, thus the entire method was one minute long. The method was validated in according to the EMA guidelines and compared with a UHPLC-MS/MS method developed based on examples from the literature. During the validation of the method, it was found that it is suitable for the quantification of all tested mycotoxins in limit value in a wheat and corn matrix. In addition, linear calibration lines were obtained for all components. During the examination of the matrix effect, high ion suppression effect was detected for the investigated compounds, but the standard deviation of the matrix factor was always less than 20%. The developed sample preparation procedure had a better recovery than the minimum values recommended in the legislation for all tested mycotoxins, with a small standard deviation. If the observed detection limits were corrected by recovery, the corrected LLOQ values for all examined compounds were smaller than the limit values.

Overall, two PRM-MSX methods were developed using MSX technique, which were suitable for the simultaneous detection of more than ten components with an analysis time of one minute or less.

9. Irodalomjegyzék

- Abou-Elwafa Abdallah, M., Nguyen, K.-H., Ebele, A.J., Atia, N.N., Ali, H.R.H., Harrad, S., 2019. A single run, rapid polarity switching method for determination of 30 pharmaceuticals and personal care products in waste water using Q-Exactive Orbitrap high resolution accurate mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1588, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.033>
- Al Kadhi, O., Melchini, A., Mithen, R., Saha, S., 2017. Development of a LC-MS/MS Method for the Simultaneous Detection of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates in a Range of Biological Matrices. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2017, e5391832. <https://doi.org/10.1155/2017/5391832>
- Alshannaq, A., Yu, J.-H., 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int J Environ Res Public Health* 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, 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.
- Bartók, T., Szécsi, A., Szekeres, A., Mesterházy, A., Bartók, M., 2006. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20, 2447–2462. <https://doi.org/10.1002/rcm.2607>
- Beccaria, M., Cabooter, D., 2020. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst* 145, 1129–1157. <https://doi.org/10.1039/C9AN02145K>
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. *The Citric Acid Cycle*. Biochemistry. 5th edition.
- Biselli, S., Wegner, H., Hummert, C., 2005. A multicomponent method for Fusarium toxins in cereal based food and feed samples using HPLC-MS/MS. *Mycotoxin Res* 21, 18–22. <https://doi.org/10.1007/BF02954808>
- Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V., Merkle, K., 1999. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 1175–1185. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19990630\)13:12<1175::AID-RCM639>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19990630)13:12<1175::AID-RCM639>3.0.CO;2-0)
- Bourmaud, A., Gallien, S., Domon, B., 2016. Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications. *PROTEOMICS* 16, 2146–2159. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500543>
- Braicu, C., Puia, C., Bodoki, E., Socaciu, C., 2008. Screening and Quantification of Aflatoxins and Ochratoxin a in Different Cereals Cultivated in Romania Using Thin-Layer Chromatography-Densitometry. *Journal of Food Quality* 31, 108–120. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00187.x>
- Breidbach, A., 2017. A Greener, Quick and Comprehensive Extraction Approach for LC-MS of Multiple Mycotoxins. *Toxins (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9030091>
- Breitkopf, S.B., Ricoult, S.J.H., Yuan, M., Xu, Y., Peake, D.A., Manning, B.D., Asara, J.M., 2017. A relative quantitative positive/negative ion switching method for untargeted lipidomics via high resolution LC-MS/MS from any biological source. *Metabolomics* 13. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1157-8>

- BULLERMAN, L.B., 1979. Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health. *Journal of Food Protection* 42, 65–86. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-42.1.65>
- Büscher, J.M., Czernik, D., Ewald, J.C., Sauer, U., Zamboni, N., 2009. Cross-platform comparison of methods for quantitative metabolomics of primary metabolism. *Anal Chem* 81, 2135–2143. <https://doi.org/10.1021/ac8022857>
- Caneba, C.A., Bellance, N., Yang, L., Pabst, L., Nagrath, D., 2012. Pyruvate uptake is increased in highly invasive ovarian cancer cells under anoikis conditions for anaplerosis, mitochondrial function, and migration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E1036-1052. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00151.2012>
- Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., Stampachiachiere, S., Ventura, S., Laganà, A., 2014. Multiclass analysis of mycotoxins in biscuits by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Comparison of different extraction procedures. *Journal of Chromatography A* 1343, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.009>
- Castaldo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Izzo, L., Tolosa, J., Rodríguez-Carrasco, Y., Ritieni, A., 2019. Target Analysis and Retrospective Screening of Multiple Mycotoxins in Pet Food Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Toxins (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11080434>
- Chekmeneva, E., Correia, G., Dénes, J., Gómez-Romero, M., Wijeyesekera, A., Perenyi, D.R., Koot, Y., Boomsma, C., Want, E.J., Dixon, P.H., Macklon, N.S., Chan, Q., Takáts, Z., Nicholson, J.K., Holmes, E., 2015. Development of nano electrospray high resolution isotope dilution mass spectrometry for targeted quantitative analysis of urinary metabolites: application to population profiling and clinical studies. *Anal. Methods* 7, 5122–5133. <https://doi.org/10.1039/C5AY00850F>
- Chen, W.W., Freinkman, E., Wang, T., Birsoy, K., Sabatini, D.M., 2016. Absolute Quantification of Matrix Metabolites Reveals the Dynamics of Mitochondrial Metabolism. *Cell* 166, 1324-1337.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.040>
- Cunha, S.C., Fernandes, J.O., 2010. 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. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900695>
- Cuykx, M., Negreira, N., Beirnaert, C., Van den Eede, N., Rodrigues, R., Vanhaecke, T., Laukens, K., Covaci, A., 2017. Tailored liquid chromatography–mass spectrometry analysis improves the coverage of the intracellular metabolome of HepaRG cells. *Journal of Chromatography A* 1487, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.050>
- Dalla Pozza, E., Dando, I., Pacchiana, R., Liboi, E., Scupoli, M.T., Donadelli, M., Palmieri, M., 2020. Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology, SI: Cancer Cells & Therapeutic Targets* 98, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.013>
- De Santis, B., Debegnach, F., Gregori, E., Russo, S., Marchegiani, F., Moracci, G., Brera, C., 2017. Development of a LC-MS/MS Method for the Multi-Mycotoxin Determination in Composite Cereal-Based Samples. *Toxins (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9050169>
- De Santis, B., Debegnach, F., Sonogo, E., Mazzilli, G., Buiarelli, F., Ferri, F., Giorgi Rossi, P., Collini, G., Brera, C., 2019. Biomonitoring Data for Assessing Aflatoxins and Ochratoxin A Exposure by Italian Feedstuffs Workers. *Toxins (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11060351>

- Duarte, S.C., Almeida, A.M., Teixeira, A.S., Pereira, A.L., Falcão, A.C., Pena, A., Lino, C.M., 2013. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control* 30, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.002>
- Egertson, J.D., Kuehn, A., Merrihew, G.E., Bateman, N.W., MacLean, B.X., Ting, Y.S., Canterbury, J.D., Marsh, D.M., Kellmann, M., Zabrouskov, V., Wu, C.C., MacCoss, M.J., 2013. Multiplexed MS/MS for Improved Data Independent Acquisition. *Nat Methods* 10, 744–746. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2528>
- El-Sayed, A.S.A., Shindia, A.A., Zeid, A.A.A., Yassin, A.M., Sitohy, M.Z., Sitohy, B., 2019. *Aspergillus nidulans* thermostable arginine deiminase-Dextran conjugates with enhanced molecular stability, proteolytic resistance, pharmacokinetic properties and anticancer activity. *Enzyme and Microbial Technology* 131, 109432. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109432>
- EUR-Lex - 32006R1881 - EN - EUR-Lex [WWW Document], n.d. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/ALL/?uri=CELEX:32006R1881> (accessed 2.21.21).
- Eylem, C.C., Reçber, T., Waris, M., Kır, S., Nemitlu, E., 2022. State-of-the-art GC-MS approaches for probing central carbon metabolism. *Microchemical Journal* 172, 106892. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106892>
- Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.-L., Guilleme, D., 2014. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, UHPLC: Where Are We 10 Years After Its Commercial Introduction?* 63, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007>
- Fernandes, P.J., Barros, N., Santo, J.L., Câmara, J.S., 2015. High-Throughput Analytical Strategy Based on Modified QuEChERS Extraction and Dispersive Solid-Phase Extraction Clean-up Followed by Liquid Chromatography-Triple-Quadrupole Tandem Mass Spectrometry for Quantification of Multiclass Mycotoxins in Cereals. *Food Anal. Methods* 8, 841–856. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9947-y>
- Ferrer Amate, C., Unterluggauer, H., Fischer, R.J., Fernández-Alba, A.R., Masselter, S., 2010. Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices. *Anal Bioanal Chem* 397, 93–107. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3526-x>
- Freire, F.D.C.O., da Rocha, M.E.B., 2016. Impact of Mycotoxins on Human Health, in: Méridon, J.-M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Fungal Metabolites, Reference Series in Phytochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1_21-1
- Fu, Y.-M., Meadows, G.G., 2007. Specific amino acid dependency regulates the cellular behavior of melanoma. *J Nutr* 137, 1591S-1596S; discussion 1597S-1598S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1591S>
- Gallien, S., Duriez, E., Crone, C., Kellmann, M., Moehring, T., Domon, B., 2012. Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics* 11, 1709–1723. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.019802>
- Garcia Whitlock, A.E., Titchenell, P.M., 2020. Glutamine Breakdown as a Potential Metabolic Biomarker for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 10, 195–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.03.001>
- García-López, M., Canosa, P., Rodríguez, I., 2008. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Anal Bioanal Chem* 391, 963–974. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1898-y>

- Gerstner, B., Gratopp, A., Marcinkowski, M., Sifringer, M., Obladen, M., Bühner, C., 2005. Glutaric Acid and Its Metabolites Cause Apoptosis in Immature Oligodendrocytes: A Novel Mechanism of White Matter Degeneration in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Pediatric Research* 57, 771–776. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000157727.21503.8D>
- Gika, H.G., Theodoridis, G.A., Vrhovsek, U., Mattivi, F., 2012. Quantitative profiling of polar primary metabolites using hydrophilic interaction ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1259, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.010>
- Gong, Y.Y., Watson, S., Routledge, M.N., 2016. Aflatoxin Exposure and Associated Human Health Effects, a Review of Epidemiological Studies. *Food Saf (Tokyo)* 4, 14–27. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2015026>
- Gray, N., Adesina-Georgiadis, K., Chekmeneva, E., Plumb, R.S., Wilson, I.D., Nicholson, J.K., 2016. Development of a Rapid Microbore Metabolic Profiling Ultraperformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Approach for High-Throughput Phenotyping Studies. *Anal Chem* 88, 5742–5751. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00038>
- Gu, H., Liu, G., Wang, J., Aubry, A.-F., Arnold, M.E., 2014. Selecting the Correct Weighting Factors for Linear and Quadratic Calibration Curves with Least-Squares Regression Algorithm in Bioanalytical LC-MS/MS Assays and Impacts of Using Incorrect Weighting Factors on Curve Stability, Data Quality, and Assay Performance. *Anal. Chem.* 86, 8959–8966. <https://doi.org/10.1021/ac5018265>
- Guo, K., Li, L., 2010. High-Performance Isotope Labeling for Profiling Carboxylic Acid-Containing Metabolites in Biofluids by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 82, 8789–8793. <https://doi.org/10.1021/ac102146g>
- Holčapek, M., Jirásko, R., Lída, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A, Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part VII* 1259, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072>
- Huang, Y., Tian, Y., Zhang, Z., Peng, C., 2012. A HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 905, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.038>
- Iram, W., Anjum, T., Iqbal, M., Ghaffar, A., Abbas, M., Khan, A.M., 2016. Structural Analysis and Biological Toxicity of Aflatoxins B1 and B2 Degradation Products Following Detoxification by *Ocimum basilicum* and *Cassia fistula* Aqueous Extracts. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01105>
- Jaimez, J., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P., 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *J Chromatogr A* 882, 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00212-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00212-0)
- Jernejc, K., Cimerman, A., Perdih, A., 1992. Composition of *Aspergillus niger* mycelium during growth on productive and unproductive substrates. *Journal of Biotechnology* 25, 341–348. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90166-7](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90166-7)
- Jia, W., Shi, L., Zhang, F., Fan, C., Chang, J., Chu, X., 2019. Multiplexing data independent untargeted workflows for mycotoxins screening on a quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry platform. *Food Chemistry* 278, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.056>
- Jiménez, M., Mateo, R., 1997. Determination of mycotoxins produced by *Fusarium* isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and high-

- performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 778, 363–372. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)00328-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00328-2)
- Jochmanova, I., Pacak, K., 2016. Pheochromocytoma: The First Metabolic Endocrine Cancer. *Clin Cancer Res* 22, 5001–5011. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0606>
- Kathagen-Buhmann, A., Schulte, A., Weller, J., Holz, M., Herold-Mende, C., Glass, R., Lamszus, K., 2016. Glycolysis and the pentose phosphate pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation. *Neuro Oncol* 18, 1219–1229. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov024>
- Kim, D.-H., Hong, S.-Y., Kang, J.W., Cho, S.M., Lee, K.R., An, T.K., Lee, C., Chung, S.H., 2017. Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9030106>
- King, A.M., Mullin, L.G., Wilson, I.D., Coen, M., Rainville, P.D., Plumb, R.S., Gethings, L.A., Maker, G., Trengove, R., 2019. Development of a rapid profiling method for the analysis of polar analytes in urine using HILIC–MS and ion mobility enabled HILIC–MS. *Metabolomics* 15, 17. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1474-9>
- Kölker, S., Christensen, E., Leonard, J.V., Greenberg, C.R., Boneh, A., Burlina, A.B., Burlina, A.P., Dixon, M., Duran, M., García Cazorla, A., Goodman, S.I., Koeller, D.M., Kyllerman, M., Mühlhausen, C., Müller, E., Okun, J.G., Wilcken, B., Hoffmann, G.F., Burgard, P., 2011. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I – revised recommendations. *J Inher Metab Dis* 34, 677–694. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9289-5>
- Kong, W.-J., Liu, S.-Y., Qiu, F., Xiao, X.-H., Yang, M.-H., 2013. Simultaneous multi-mycotoxin determination in nutmeg by ultrasound-assisted solid-liquid extraction and immunoaffinity column clean-up coupled with liquid chromatography and on-line post-column photochemical derivatization-fluorescence detection. *Analyst* 138, 2729–2739. <https://doi.org/10.1039/c3an00059a>
- Kumar, P., Mahato, D.K., Kamle, M., Mohanta, T.K., Kang, S.G., 2016. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Front Microbiol* 7, 2170. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Lameiras, F., Heijnen, J.J., van Gulik, W.M., 2015. Development of tools for quantitative intracellular metabolomics of *Aspergillus niger* chemostat cultures. *Metabolomics* 11, 1253–1264. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0781-z>
- Lee, C.P., Elsässer, M., Fuchs, P., Fenske, R., Schwarzländer, M., Millar, A.H., 2020. The Arabidopsis mitochondrial dicarboxylate carrier 2 maintains leaf metabolic homeostasis by uniting malate import and citrate export. *bioRxiv* 2020.04.28.065441. <https://doi.org/10.1101/2020.04.28.065441>
- Li, C., Li, Y., Sui, L., Wang, J., Li, F., 2019. Phenyllactic acid promotes cell migration and invasion in cervical cancer via IKK/NF- κ B-mediated MMP-9 activation. *Cancer Cell Int* 19. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0965-0>
- Litwack, G., 2018. Chapter 8 - Glycolysis and Gluconeogenesis, in: Litwack, G. (Ed.), *Human Biochemistry*. Academic Press, Boston, pp. 183–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383864-3.00008-9>
- Lorenzi, P.L., Reinhold, W.C., Rudelius, M., Gunsior, M., Shankavaram, U., Bussey, K.J., Scherf, U., Eichler, G.S., Martin, S.E., Chin, K., Gray, J.W., Kohn, E.C., Horak, I.D., Von Hoff, D.D., Raffeld, M., Goldsmith, P.K., Caplen, N.J., Weinstein, J.N., 2006. Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for

- L-asparaginase activity in ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5, 2613–2623. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0447>
- Lu, W., Clasquin, M.F., Melamud, E., Amador-Noguez, D., Caudy, A.A., Rabinowitz, J.D., 2010. Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* 82, 3212–3221. <https://doi.org/10.1021/ac902837x>
- Luo, B., Groenke, K., Takors, R., Wandrey, C., Oldiges, M., 2007. Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1147, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.034>
- MacKay, M.-A.B., Kravtsenyuk, M., Thomas, R., Mitchell, N.D., Dursun, S.M., Baker, G.B., 2019. D-Serine: Potential Therapeutic Agent and/or Biomarker in Schizophrenia and Depression? *Front Psychiatry* 10. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00025>
- Mahato, D.K., Lee, K.E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K.N., Kumar, P., Kang, S.G., 2019. Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02266>
- Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., Horning, S., 2006. Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17, 977–982. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.03.006>
- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M., 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75, 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- McCalley, D.V., 2018. A study of column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 1554, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.016>
- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., Alexander, N.J., 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins (Basel)* 3, 802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.-P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., Horning, S., 2011. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* 10, M111.011015. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011015>
- Michel, D., Gaunt, M.C., Arnason, T., El-Aneed, A., 2015. Development and validation of fast and simple flow injection analysis–tandem mass spectrometry (FIA–MS/MS) for the determination of metformin in dog serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 107, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.012>
- Moldoveanu, S.C., David, V., 2013. Chapter 5 - Retention Mechanisms in Different HPLC Types, in: Moldoveanu, S.C., David, V. (Eds.), *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier, pp. 145–190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385013-3.00005-7>
- Nanita, S.C., Kaldon, L.G., 2016. Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis. *Anal Bioanal Chem* 408, 23–33. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9193-1>

- Narváez, A., Rodríguez-Carrasco, Y., Castaldo, L., Izzo, L., Ritieni, A., 2020. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry for Multi-Residue Analysis of Mycotoxins and Pesticides in Botanical Nutraceuticals. *Toxins (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/toxins12020114>
- Pantano, L., La Scala, L., Olibrio, F., Galluzzo, F.G., Bongiorno, C., Buscemi, M.D., Macaluso, A., Vella, A., 2021. QuEChERS LC–MS/MS Screening Method for Mycotoxin Detection in Cereal Products and Spices. *Int J Environ Res Public Health* 18, 3774. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073774>
- PDF.pdf, n.d.
- Pereira, V.L., Fernandes, J.O., Cunha, S.C., 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 36, 96–136. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.005>
- Pinton, P., Tsybulskyy, D., Luciola, J., Laffitte, J., Callu, P., Lyazhri, F., Grosjean, F., Bracarense, A.P., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P., 2012. Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogen-activated protein kinases. *Toxicol Sci* 130, 180–190. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs239>
- Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P., 2010. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins (Basel)* 2, 613–631. <https://doi.org/10.3390/toxins2040613>
- Rauniyar, N., 2015. Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci* 16, 28566–28581. <https://doi.org/10.3390/ijms161226120>
- Rodríguez-Carrasco, Y., Moltó, J.C., Mañes, J., Berrada, H., 2014. Development of a GC–MS/MS strategy to determine 15 mycotoxins and metabolites in human urine. *Talanta* 128, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.072>
- Rola, R., Kowalski, K., Bieńkowski, T., Studzińska, S., 2020. Improved sample preparation method for fast LC-MS/MS analysis of vitamin D metabolites in serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 190, 113529. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113529>
- Sargeant, K., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A., Allcroft, R., 1961. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Veterinary Record* 73, 1219–1223.
- Schaarschmidt, S., Faulstich, C., 2021. The fate of mycotoxins during secondary food processing of maize for human consumption. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, 91–148. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12657>
- Sidoli, S., Fujiwara, R., Garcia, B.A., 2016. Multiplexed data independent acquisition (MSX-DIA) applied by high resolution mass spectrometry improves quantification quality for the analysis of histone peptides. *Proteomics* 16, 2095–2105. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500527>
- Sidoli, S., Kori, Y., Lopes, M., Yuan, Z.-F., Kim, H.J., Kulej, K., Janssen, K.A., Agosto, L.M., da Cunha, J.P.C., Andrews, A.J., Garcia, B.A., 2019. One minute analysis of 200 histone posttranslational modifications by direct injection mass spectrometry. *Genome Res* 29, 978–987. <https://doi.org/10.1101/gr.247353.118>
- Simões, R.V., Serganova, I.S., Kruchevsky, N., Leftin, A., Shestov, A.A., Thaler, H.T., Sukenick, G., Locasale, J.W., Blasberg, R.G., Koutcher, J.A., Ackerstaff, E., 2015. Metabolic plasticity of metastatic breast cancer cells: adaptation to changes in the microenvironment. *Neoplasia* 17, 671–684. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.08.005>

- Sotelo-Silveira, M., Chauvin, A.-L., Marsch-Martínez, N., Winkler, R., de Folter, S., 2015. Metabolic fingerprinting of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00365>
- Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Scholten, J.M., 2008. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25, 472–489. <https://doi.org/10.1080/02652030701552964>
- Stokka, A.J., Flatmark, T., 2002. 3-(2-Thienyl)-L-Alanine as a Competitive Substrate Analogue and Activator of Human Phenylalanine Hydroxylase, in: Milstien, S., Kapatos, G., Levine, R.A., Shane, B. (Eds.), *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates: Proceedings of the 12th International Symposium on Pteridines and Folates*, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, June 17–22, 2001. Springer US, Boston, MA, pp. 109–113. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0945-5_18
- Sudarsan, S., Dethlefsen, S., Blank, L.M., Siemann-Herzberg, M., Schmid, A., 2014. The Functional Structure of Central Carbon Metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* 80, 5292–5303. <https://doi.org/10.1128/AEM.01643-14>
- Synakiewicz, A., Sawicka-Zukowska, M., Adrianowska, N., Galezowska, G., Ratajczyk, J., Owczarzak, A., Konieczna, L., Stachowicz-Stencel, T., 2017. Amino acid profiles as potential biomarkers for pediatric cancers: a preliminary communication. *Biomarkers in Medicine* 11, 619–627. <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0102>
- Tan, B., Lu, Z., Dong, S., Zhao, G., Kuo, M.-S., 2014. Derivatization of the tricarboxylic acid intermediates with O-benzylhydroxylamine for liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Analytical Biochemistry* 465, 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.027>
- Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U.S., Sugiura, Y., Ueno, Y., 1988. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.* 36, 979–983. <https://doi.org/10.1021/jf00083a019>
- Tang, D.-Q., Zou, L., Yin, X.-X., Ong, C.N., 2016. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass Spectrometry Reviews* 35, 574–600. <https://doi.org/10.1002/mas.21445>
- Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., Yuan, Z., 2018. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* 112, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002>
- Themelis, T., Gotti, R., Gatti, R., 2017. A novel hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of underivatized amino acids in alimentary supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 145, 751–757. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.001>
- Tiller, P.R., Romanyshyn, L.A., Neue, U.D., 2003. Fast LC/MS in the analysis of small molecules. *Anal Bioanal Chem* 377, 788–802. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2146-0>
- Tima, H., Brückner, A., Mohácsi-Farkas, C., Kiskó, G., 2016. *Fusarium* mycotoxins in cereals harvested from Hungarian fields. *Food Addit Contam Part B Surveill* 9, 127–131. <https://doi.org/10.1080/19393210.2016.1151948>

- Traag, W.A., van Trijp, J.M., Tuinstra, L.G., Kok, W.T., 1987. Sample clean-up and post-column derivatization for the determination of aflatoxin B1 in feedstuffs by liquid chromatography. *J Chromatogr* 396, 389–394. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)94080-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)94080-4)
- Trobbiani, S., Stockham, P., Scott, T., 2017. Increasing the linear dynamic range in LC-MS: is it valid to use a less abundant isotopologue? *Drug Test Anal* 9, 1630–1636. <https://doi.org/10.1002/dta.2175>
- Tsochatzis, E., Papageorgiou, M., Kalogiannis, S., 2019. Validation of a HILIC UHPLC-MS/MS Method for Amino Acid Profiling in Triticum Species Wheat Flours. *Foods* 8, 514. <https://doi.org/10.3390/foods8100514>
- van der Laan, T., Kloots, T., Beekman, M., Kindt, A., Dubbelman, A.-C., Harms, A., van Duijn, C.M., Slagboom, P.E., Hankemeier, T., 2019. Fast LC-ESI-MS/MS analysis and influence of sampling conditions for gut metabolites in plasma and serum. *Scientific Reports* 9, 12370. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48876-w>
- Vatsala, T.M., Shanmugasundaram, K.R., Shanmugasundaram, E.R., 1976. Role of nicotinic acid in pyridoxine biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Biochem Biophys Res Commun* 72, 1570–1575. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(76\)80193-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(76)80193-3)
- Wang, J., Chow, W., Chang, J., Wong, J.W., 2017. Development and Validation of a Qualitative Method for Target Screening of 448 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Using UHPLC/ESI Q-Orbitrap Based on Data-Independent Acquisition and Compound Database. *J. Agric. Food Chem.* 65, 473–493. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05034>
- Wang, J., Leung, D., Chow, W., Chang, J., Wong, J.W., 2018. Target screening of 105 veterinary drug residues in milk using UHPLC/ESI Q-Orbitrap multiplexing data independent acquisition. *Anal Bioanal Chem* 410, 5373–5389. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0847-z>
- Wang, Q., Gao, P., Wang, X., Duan, Y., 2014. The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Scientific Reports* 4, 6802. <https://doi.org/10.1038/srep06802>
- Wannop, C.C., 1961. The Histopathology of Turkey “X” Disease in Great Britain. *Avian Diseases* 5, 371–381. <https://doi.org/10.2307/1587768>
- Westrop, G.D., Williams, R.A.M., Wang, L., Zhang, T., Watson, D.G., Silva, A.M., Coombs, G.H., 2015. Metabolomic Analyses of *Leishmania* Reveal Multiple Species Differences and Large Differences in Amino Acid Metabolism. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136891>
- Willacey, C.C.W., Naaktgeboren, M., Lucumi Moreno, E., Wegrzyn, A.B., van der Es, D., Karu, N., Fleming, R.M.T., Harms, A.C., Hankemeier, T., 2019. LC-MS/MS analysis of the central energy and carbon metabolites in biological samples following derivatization by dimethylaminophenacyl bromide. *Journal of Chromatography A* 1608. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460413>
- Woo, S.Y., Ryu, S.Y., Tian, F., Lee, S.Y., Park, S.B., Chun, H.S., 2019. Simultaneous Determination of Twenty Mycotoxins in the Korean Soybean Paste Doenjang by LC-MS/MS with Immunoaffinity Cleanup. *Toxins* 11, 594. <https://doi.org/10.3390/toxins11100594>
- Wright, M.J., Wheller, R., Wallace, G., Green, R., 2019. Internal standards in regulated bioanalysis: putting in place a decision-making process during method development. *Bioanalysis* 11, 1701–1713. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0169>
- Zhang, B., Chen, X., Han, S.-Y., Li, M., Ma, T.-Z., Sheng, W.-J., Zhu, X., 2018. Simultaneous Analysis of 20 Mycotoxins in Grapes and Wines from Hexi

- Corridor Region (China): Based on a QuEChERS–UHPLC–MS/MS Method. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23081926>
- Zhang, K., Banerjee, K., 2020. A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods. *Toxins (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/toxins12090539>
- Zhang, K., Zhang, X., Bai, Y., Yang, L., Wu, T., Zhang, J., Li, L., Zhang, H., Wang, H., 2019. Optimization of the sample preparation method for adherent cell metabolomics based on ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal. Methods* 11, 3678–3686. <https://doi.org/10.1039/C9AY00326F>
- Zhou, B., Ma, C., Ren, X., Xia, T., Li, X., 2020. LC-MS/MS-based metabolomic analysis of caffeine-degrading fungus *Aspergillus sydowii* during tea fermentation. *J Food Sci* 85, 477–485. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15015>
- Zhou, S., Hamburger, M., 1995. Effects of solvent composition on molecular ion response in electrospray mass spectrometry: Investigation of the ionization processes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 9, 1516–1521. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290091511>
- Zhu, J., Djukovic, D., Deng, L., Gu, H., Himmati, F., Abu Zaid, M., Chiorean, E.G., Raftery, D., 2015. Targeted serum metabolite profiling and sequential metabolite ratio analysis for colorectal cancer progression monitoring. *Anal Bioanal Chem* 407, 7857–7863. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8984-8>
- Zubaidi, F.A., Choo, Y.-M., Tan, G.-H., Myron, P., Cornelia, C., 2019. High-throughput flow injection analysis-MRM3 (FIA-MRM3) spectrometry for alternative fast screening of the isomeric methamphetamine and phentermine in blood for forensic toxicology cases in Malaysia. *Toxicology Research and Application* 3, 2397847319831368. <https://doi.org/10.1177/2397847319831368>
- Zubarev, R.A., Makarov, A., 2013. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 85, 5288–5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, aki lehetővé tette, hogy PhD dolgozatomat a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékén készítssem el

Szeretném megköszönni a Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatását, amiért finanszírozták kutatási munkámat.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Varga Mónikának és Dr. Szekeres Andrásnak, akik hozzáértésükkel türelmükkel és hasznos tanácsokkal láttak el, valamint elindítottak azon a szakmai úton, amit mai napig járok. Külön szeretném nekik megköszönni a bizalmat amiért kezdőként oda mertek állítani a bonyolult és drága készülékek elé.

Szeretném megköszönni az Elválasztástechnikai Csoport valamennyi munkatársának a szakmai és emberi segítségüket. Külön szeretném megköszönni Bartal Attilának, Dr. Endre Gábornak, Dr. Váradi Orsolyának, Dr Aruna Vigneshwarinak, Dr Adiyadolgor Turbatnak, Papp Dórának és Hegedűs Zsófiának, az évek során nyújtott segítséget, jó kedved és vidámságot, amit a velük töltött közös munka során élhettem át.

Köszönet illeti szakdolgozóimat, Agócs Anikót, Nagy Nikolettet, Száz Enikőt, akik munkájukkal nagyban hozzájárultak kutatásaimhoz.

Külön köszönettel tartozom Dr. Vadovics Máténak, Dr. Takács Istvánnak, Dr. Marik Tamásnak és Dr. Anuar Zhumakayevnek, amiért részt vehettem kutatásaikba, ezzel is további tapasztalatokat és ismereteket szerezve.

Emellett köszönetemet szeretném kifejezni a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi volt és jelenlegi munkatársának, akik bármilyen módon segítettek a dolgozatban ismertetett kutatási eredmények létrejöttét.

Külön köszönettel tartozom családomnak, szüleimnek, testvéremnek, akik hosszú éveken át szeretettükkel és támogatásukkal segítették tanulmányaimat.

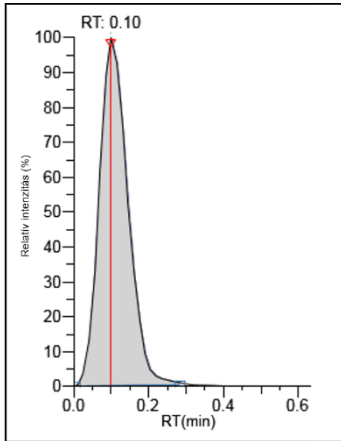
Végül de nem utolsó sorban külön szeretném megköszönni gyermekeimnek Odettnek és Máténak valamit feleségemnek Leonóranak azt a sok támogatást, segítséget és türelmet, ami nélkül doktori dolgozatom nem készülhetett volna el.

Doktori disszertációm az „Új utak a természetes anyag alapú gyógyszerkutatásban: rendszermetabolomikai megközelítések növényi és mikrobiális eredetű bioaktív terpenoidok felkutatására" (GINOP-2.2.1-15-2016-00012) és a

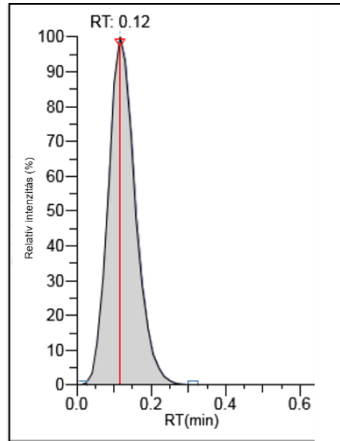
"Mikrobiális génbankoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum" (GINOP-2.3.3-15-2016-00006) projektek támogatásával készült.

11. Mellékletek

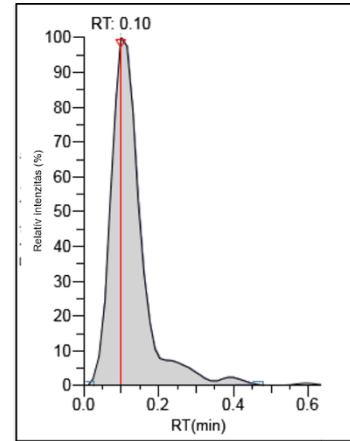
1. Melléklet. Központi metabolitok analizésére fejlesztett FIA-PRM-MSX módszerben vizsgált vegyületek extrahált ion kromatogrammjai



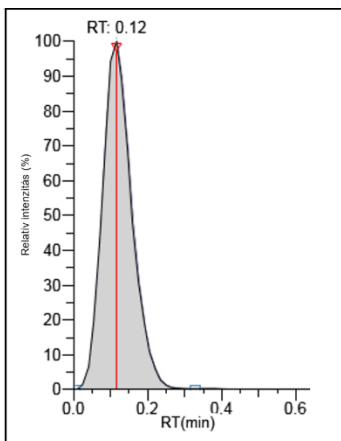
Aszparagin



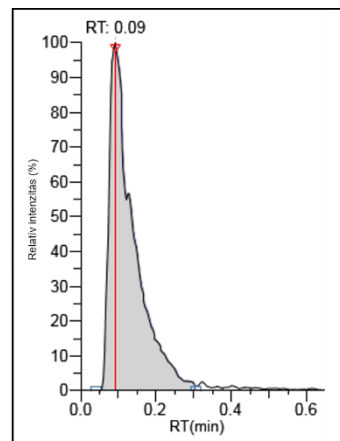
Glutársav



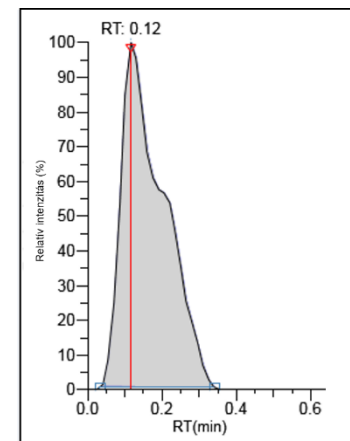
Cisztation



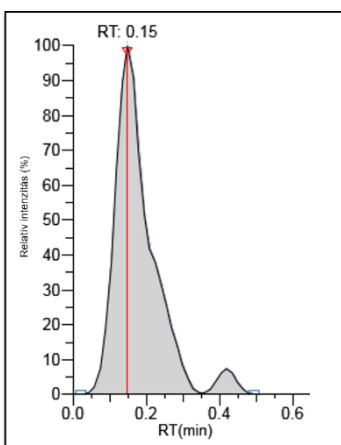
Tienil-alanin



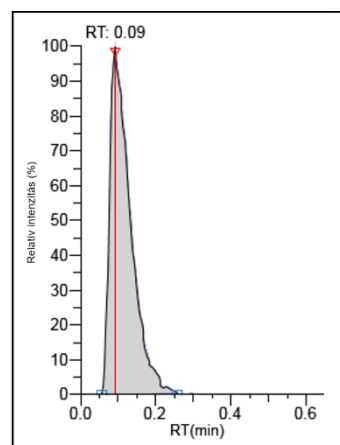
Aszparaginsav



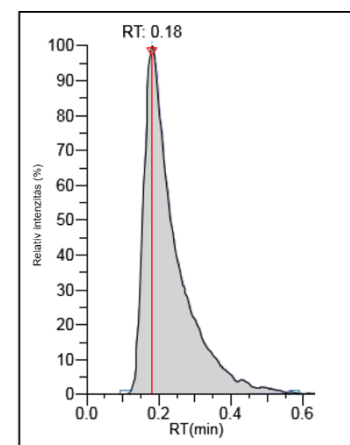
Oxálcetsav



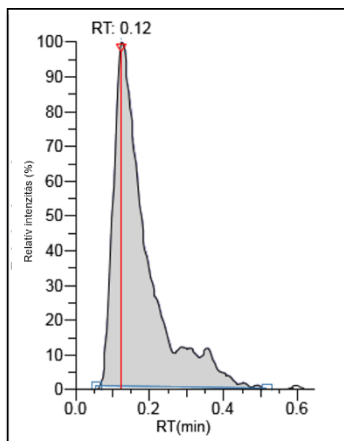
Akonitsav



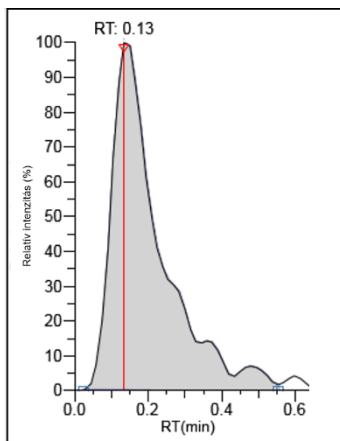
Glutamin



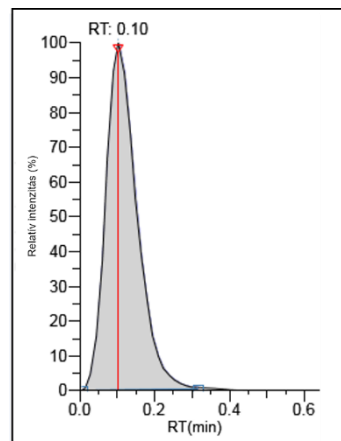
Fenil-tejsav



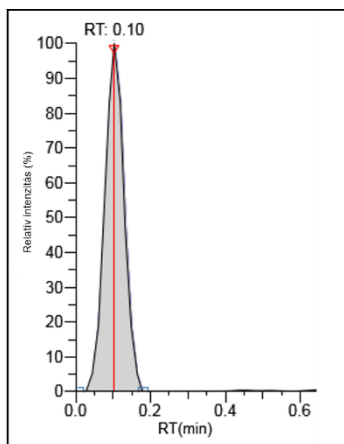
Ketoglutársav



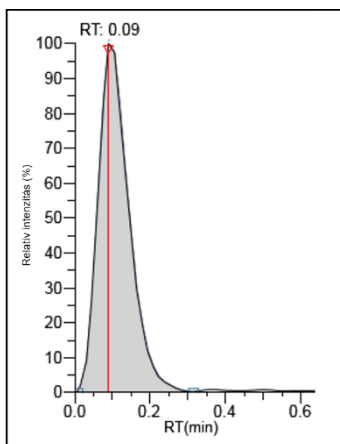
Fumársav



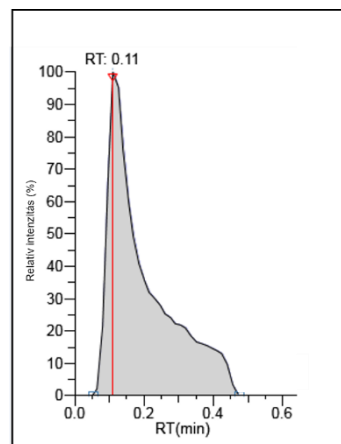
Szerin



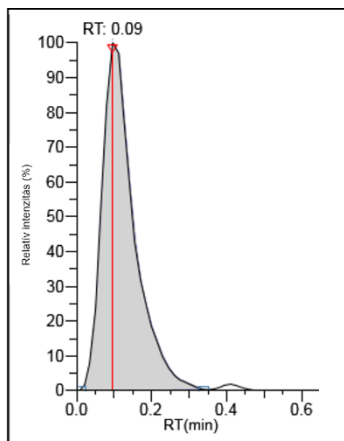
Borostyánkősav



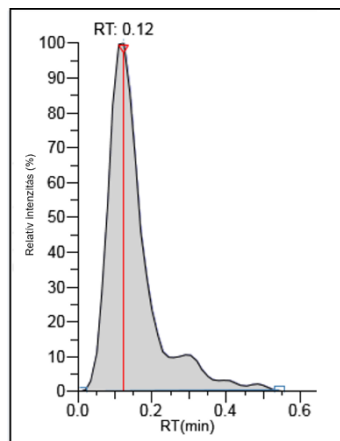
Treonin



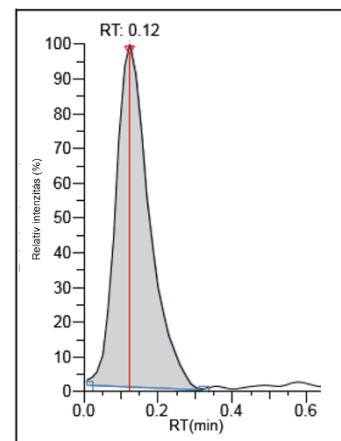
Citromsav



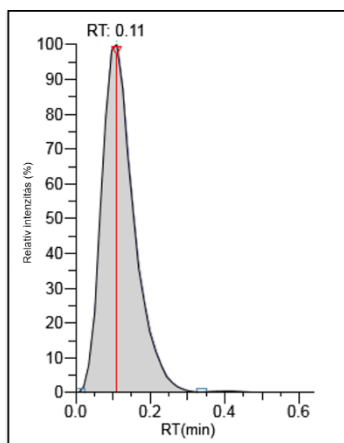
Hisztidin



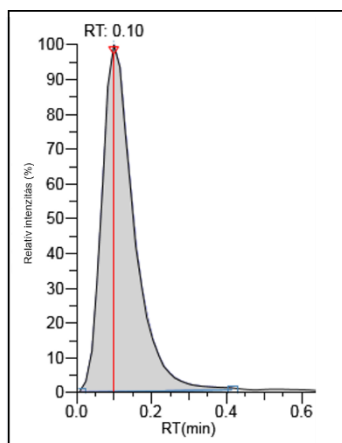
Izocitromsav



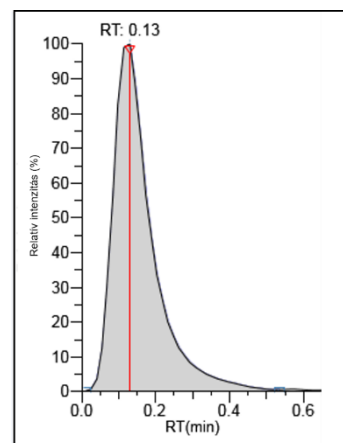
Nikotinsav



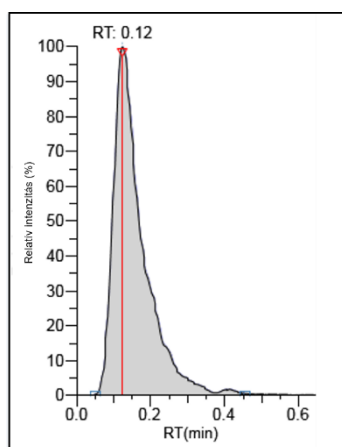
Tirozin



Glutaminsav

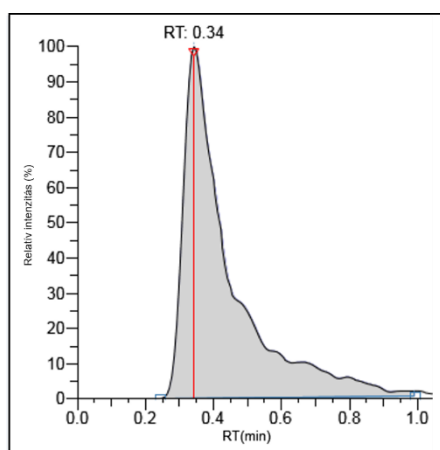


Almasav

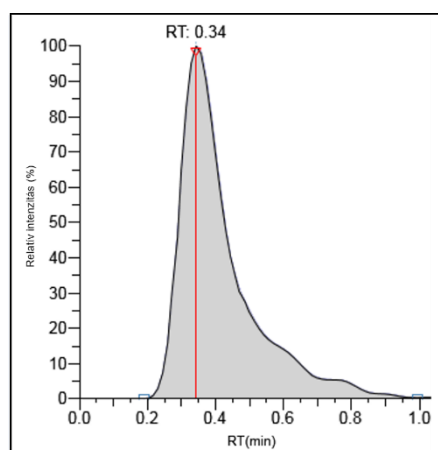


Triptofán

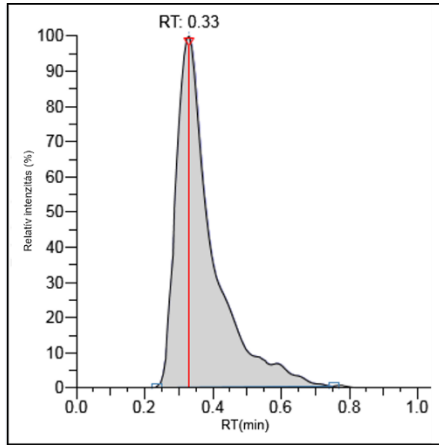
2. Melléklet. Mikotoxinok analizésére fejlesztett PRM-MSX módszerben vizsgált vegyületek extrahált ion kromatogrammjai



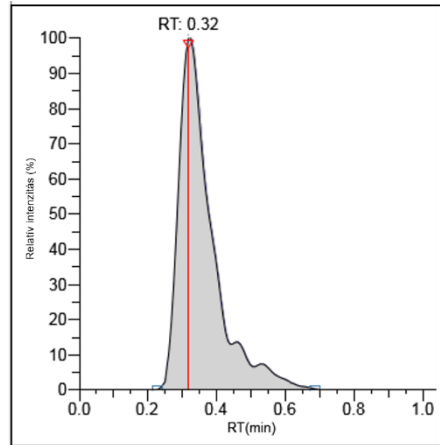
AB1



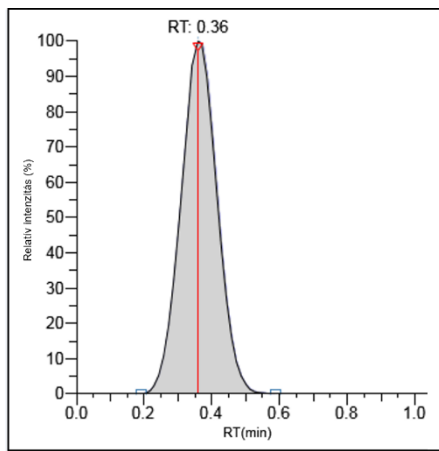
AB2



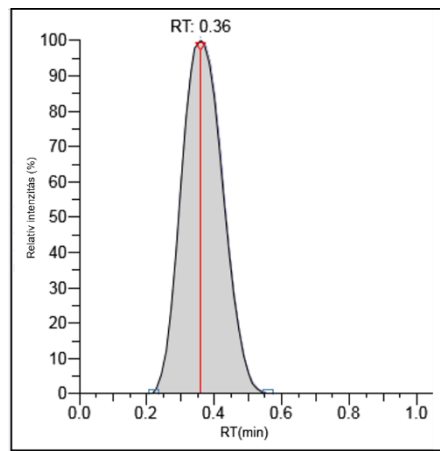
AG1



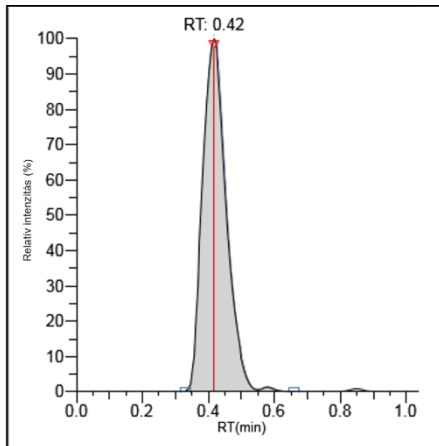
AG2



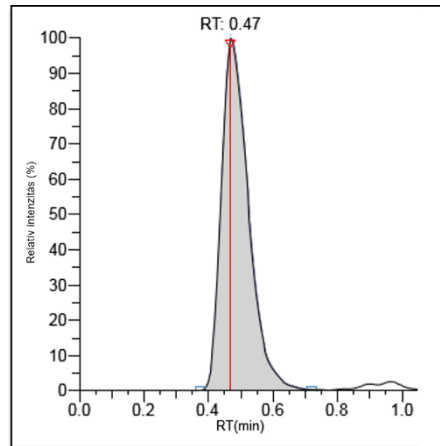
FB1



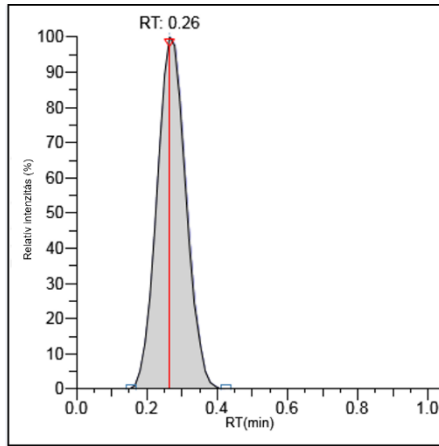
FB2



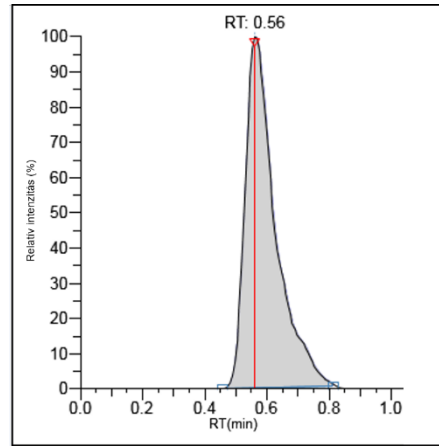
HT2



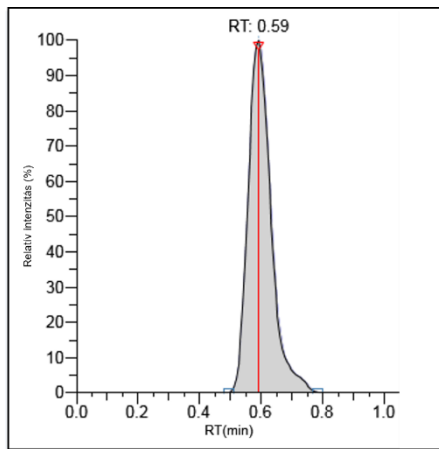
T2



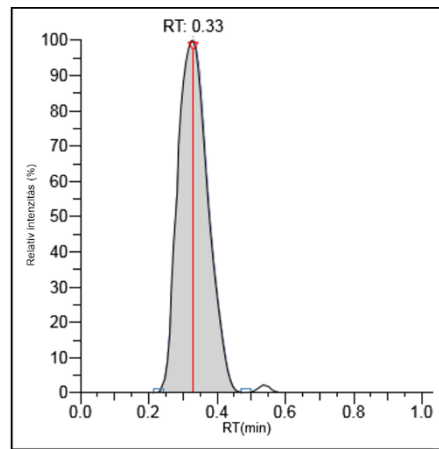
DON



OTA



ZEA



VOL