

# SZAKDOLGOZAT

**Balázs Viktória Bernadett**

**2022.**



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet  
Élelmiszerkémia és -Analitika Tanszék

Különleges mintaelőkészítési technikák  
összehasonlítása vanília örlemény aflatoxin  
tartalmának meghatározására UHPLC-MS/MS  
módszerrel

Balázs Viktória Bernadett

BUDAPEST

2022.

*Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem*  
*Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet*

**Szak neve: BSc Élelmiszermérnöki**  
**Tartósítóipari technológiák és minőségügy**

**Szakkolgozat készítés helye: Élelmiszerkémia és -Analitika Tanszék**

Hallgató: Balázs Viktória Bernadett

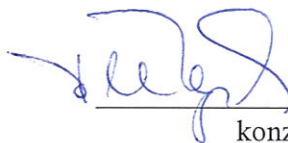
A szakkolgozat címe: **Különleges mintaelőkészítési technikák összehasonlítása vanília  
őrlemény aflatoxin tartalmának meghatározására UHPLC-MS/MS módszerrel**

Konzulens: dr. Üveges Márta és Nagy Katalin  
Külső konzulens esetén tanszéki felelős: -

Beadás dátuma: 2022. 10. 28.

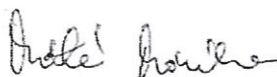


szakkolgozat készítés helyének vezetője  
Dr. Abrankó László



konzulens

Dr. Üveges Márta, Nagy Katalin



Dr. Máté Mónika  
Tartósítóipari technológiák és minőségügy

## Tartalom

1.	Bevezetés .....	1
2.	Célkitűzés.....	3
3.	Irodalmi áttekintés .....	4
3.1	A vanília .....	4
3.2	Az aflatoxinok.....	6
3.3	Mintaelőkészítés.....	8
3.4	Méréstechnika .....	13
3.4.1	Az UHPLC MS/MS készülék .....	13
3.5	Validálás.....	15
4.	Anyagok és módszerek .....	17
4.1	A mintaelőkészítés anyagai, vegyszerei.....	17
4.2	A mintaelőkészítés és mérés eszközei, berendezései .....	18
4.3	Módszerek .....	19
4.3.1	Mérőmódszer .....	19
4.3.2	Mintaelőkészítési módszerek .....	19
4.3.3	A QuEChERS (Q) módszer .....	20
4.3.4	A MycoSpin (M) módszer .....	22
4.3.5	A QuEChERS + MycoSpin (Q+M) módszer.....	23
4.4	A validálás előkészítése .....	24
5.	Eredmények és értékelésük.....	26
5.1	A 90 és 3 perces MycoSpin módszerek összehasonlítása.....	26
5.2	QuEChERS, MycoSpin és QuEChERS + MycoSpin módszerek összehasonlítása ..	27
5.3	A MycoSpin módszer validálása.....	29
5.3.1	Szelektivitás vizsgálat .....	29
5.3.2	Linearitás, mátrixhatás .....	31
5.3.3	LOD, LOQ, mérési tartomány kijelölése .....	34

5.3.4	Visszanyerés vizsgálat és ismételhetőség .....	35
6.	Összefoglalás .....	37
7.	Irodalmi hivatkozások.....	38
8.	Köszönetnyilvánítás .....	44
9.	Nyilatkozatok.....	45

Balázs Viktória Bernadett

## 1. Bevezetés

Már az emberiség történelmének hajnalán felmerült az élelmiszerek tartósítása utáni igény. Mindennapi kényelmünket szolgálja az, ha elkészíthetjük akár egy egész hétre előre ételeinket és később a főzésre szánt időben más, hasznos dologra fordíthatjuk a figyelmünket. Ehhez viszont az élelmiszert megfelelő körülmények között szükséges tárolni, hogy elfogyasztása ne jelentsen egészségügyi kockázatot. Az idők folyamán kifejlődött tartósítási technikákat összefoglaló tartósítóipar ebben nyújt segítséget. A minőségmegőrzési technikák egyike a vízelvonással történő tartósítás. A mikrobák elszaporodásának egyik alapfeltétele megfelelő mennyiségű hozzáférhető víz jelenléte, amelyet a magas víztartalmú élelmiszerek biztosíthatnak. Vízelvonással történő tartósítás során általában a jó eltarthatóság érdekében az élelmiszerek víztartalmát nem csak a mikrobiális romlás határértéke alá állítják be, hanem cél az enzimatis és nem-enzimatis romlási folyamatok megakadályozása is. A fűszerek nagy többségét szárítással konzerválják, esetleg kivonatot készítenek belőle, vagy célzott módon, az élő mikroorganizmusokat pusztítják el. A gyakorlatban a legelterjedtebb tartósítási eljárás a szárítás, ami leggyakrabban a betakarítást követően a fűszer földre való kitergetését és nap általi szárítását jelenti. Ez a módszer a szántóföldi penészek terjedése miatt problémákat vet fel. Egyrészt a földből párolgó nedvesség lecsapódhat a fűszer porózus felületén nedvesítve azt, megfelelő életfeltételeket kínálva a penészgombák számára, másrészt a föld felszíne nem steril, hanem élő anyag, szennyezett penészgomba spórákkal. Nagy a penészesedésnek való kitettség akkor is, amikor a trópusi termőterületekről szállítanak fűszereket tengeri úton. A folyamatosan magas páratartalom nagy kockázatot jelent a szárítmányok penészesedésére nézve. A penészgombák terjedése, az esztétikai hibán túl, önmagában is egészségkárosító lehet, de főleg a mikotoxinok képződése miatt jelent gondot. Ezek az anyagok kis koncentrációban is ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) humán karcinogén, teratogén és mutagén tulajdonságokkal is rendelkezhetnek. Az élelmiszerekben való jelenlétük kimutatása és mennyiségi meghatározása több okból is kihívás elé állítja az analitikusokat. A penészgombák elszaporodásával járó telepképződés jellemzően foltokban valósul meg, így az élelmiszermintákban erősen heterogén a penészek és az általuk termelt mikotoxinok eloszlása. Ezt a jelenséget figyelembe kell vennünk az analízishez szükséges minta mennyiségének meghatározásakor, valamint a mintavételi stratégia kidolgozása során. További nehézséget jelenthet az összetett élelmiszermátrix jelenléte, amely mintatisztítási

lépések alkalmazását igényli, valamint a mikotoxinok mintákban előforduló alacsony koncentrációi, amely az analízishez szükséges műszerezettséget befolyásolja.

Munkám arra irányult, hogy főként az *Aspergillus* törzs által termelt négy féle aflatoxin hatékony és kis koncentrációjú, szimultán meghatározásához egy könnyen reprodukálható, adott mátrixra optimált mintaelőkészítési módszert fejlesszek. Korábbi kutatási eredmények bizonyítják, hogy az eredetileg növényvédőszer-analitikában használt "QuEChERS" mintaelőkészítési eljárás jól alkalmazható vaníliabab fűszerminta esetén, mikotoxinok LC-MS vizsgálata során. (Andráskó, 2021) A Tanszéken korábban már optimalizált QuEChERS mintaelőkészítési módszert hasonlítottam össze egy speciális, kifejezetten mikotoxin vizsgálatokhoz tervezett mintaelőkészítési eszközzel, a MycoSpin technikával. A különböző mintaelőkészítési eljárásokat követően a minták mikotoxin tartalmát UHPLC-ESI-MS/MS segítségével határoztam meg. Célom volt a vanília mátrixra optimális, hatékony mintaelőkészítési módszer kiválasztása, majd ezt követően a választott mintaelőkészítéssel egybekötött mikotoxin mérőmódszer validálása.

## 2. Célkitűzés

Kutatásom során célul tűztem ki a hazánkban is igen kedvelt fűszer, a vanília, aflatoxin tartalmának meghatározására egy lehetőség szerint gyors, könnyen reprodukálható és pontos mintaelőkészítési eljárással egybekötött, Európai Unió szabályozásnak megfelelő, validált analitikai módszer kidolgozását.

A vaníliához hasonló fűszerek leggyakrabban az aflatoxin B1, B2, G1 és G2 módosulatokkal szennyezettek, emiatt ezeket a vegyületeket tűztem ki célvegyületnek. Mikotoxinok specifikus vizsgálatára és mennyiségi meghatározására legelterjedtebben az UHPLC-ESI-MS/MS rendszerek alkalmazhatók. Ezen rendszerekben a mérendő komponensek időben és térben történő elválasztása folyadék fázisban történik, így alkalmazásukat szilárd minták esetén megelőzi valamilyen extrakciós eljárás, amely a célkomponensek oldatba vitelét célozza. Bonyolult élelmiszer-mátrixok esetén, mint amilyen az általam vizsgált vanília őrlemény is, az extrakció során a célvegyületeken kívül számos egyéb mátrixalkotó is oldatba kerül, ezzel nehezítve az analízist. Hasonló analitikai probléma megoldásánál így kulcsfontosságú lépés a saját mátrixra optimált, megfelelő extrakciós hatásfokú mintaelőkészítési módszer kidolgozása. A folyadékminta megtisztítására eltérő elven működő (QuEChERS és a MycoSpin) technikákat próbáltam ki és hasonlítottam össze.

Munkám során az alábbi célokat kívántam elérni:

- A MycoSpin gyári specifikációjában foglalt kétféle extrahálási lehetőség összehasonlítása.
- A QuEChERS, a MycoSpin, valamint a két módszer kombinációjának eredményeképpen kinyert vanília extraktumok aflatoxin-tartalmára kapott LC-MS mérési jelek összehasonlítása, ezek alapján a leghatékonyabbnak bizonyuló mintatisztítási módszer kiválasztása.
- Végül céлом volt az idő, anyag, és munkaigény szempontjából alkalmasabb MycoSpin mintatisztítással egybekötött LC-MS mérőmódszer analitikai teljesítményjellemzőinek validálása vanília őrlemény aflatoxin tartalmának meghatározására a hatályos előírások szerint.



### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 A vanília

A vanília növény a kosborfélék családjába tartozik. (Bory at al., 2007) Az egyetlen orchidea féle, melynek ehető a termése. Ez a nagyjából tizenöt centiméteres bab termés tartalmazza az élelmiszeriparban is felhasznált aromaanyagot. A vanília növény trópusi, szubtrópusi területeken terem, száz körüli faja közül hármat termesztenek. A legillatosabb, a *Vanilla planifolia*, aminek származási helye Mexikó. Az aztékok már kétezer éve is használták ízesítőszerként, Európában a 19. század vége óta termesztik nagyobb mennyiségben. Ekkor fedezték fel, hogyan lehet a Mexikóban őshonos, de Európában nem élő kisméretű kolibrik és méhek segítségével, kézzel megtermékenyíteni a virágokat. (1. ábra)



1. ábra – A vanília virág beporzása (Internet 1.)

A vanília virágok beporzása ma is ugyanazzal a módszerrel, emberi erővel történik. A virágok megtermékenyítése után kilenc hónappal, kézzel szüretelik az érett babokat, melyeket a leszedés után 48 órán belül 65°C-os vízben áztatnak 3 percig és 24 órán keresztül lefedve dunsztolják, majd két lépésben kiszárítják őket. A szárítás első 10 napjában a vanília rudakat tűző napon szárítják, a következő, hónapokon át tartó szárítási szakasz árnyékban valósul meg, jól szellőző helyen. Így alakul ki a jellegzetes aroma, az olajosan csillogó fényes burok alatt. Átlagosan két év telik el a beporzás és a kereskedelmi forgalomba kerülés között. A legerősebb ízesítő tulajdonsággal a termés magjai bírnak, melyekből akár többezer is lehet egy-egy hüvelyben. (Internet 2.).

Az igazi vaníliabab kereskedelmi forgalomban őrleményként és egész rúdként kapható, melyeket a boltok polcain a fűszerek között, áttetsző csomagolásban találunk. Pont emiatt, a vanília első sorban, mint édes ételek és italok ízesítőszerre juthat eszünkbe, hiszen erősíti az

édes és elfedi a keserű ízeket. Ám mindezekon túl használják dohánytermékekhez, aromaterápiában nyugtató és nőknél fájdalomcsökkentő hatása miatt, a kozmetikaiparban parfümök, gyertyák, háztartási légfrissítők illatosítására, gyógyszer alapanyagként a stressz szint csökkentésére, valamint rovarriasztó, szag elfedő szerként és a műanyag iparban is. (Medina et al., 2009) A legtöbb felhasználási területen szintetikusán előállított vegyületeit alkalmazzák, hiszen a kézi feldolgozás, a termelési és a szállítási nehézségek miatt az igazi vaníliabab ára igencsak borsos, 2022-ben 160.000 – 190.000 forintért kaphatunk egy kilogrammot. (Internet 3.) A növény epifiton, azaz fák törzsén támaszkodó, de nem élősködő életmódja miatt a betakarítás sem gépesíthető, tehát a beporzás mellett ezt is emberek végzik. (Medina et al., 2009) Ezekon kívül a száradás során többször ellenőrzik minőséget, a földre, vászonra kiterítve válogatják, osztályozzák a terméseket. (2. ábra) Ez a penészek szempontjából kontaminációs kockázatot jelent.



**2. ábra** - Vaníliabab szárítása (Internet 4.)

Mivel a vanília növény a napos és nedves szubtrópusi-trópusi környezetben terem, a klíma miatt fokozott gombafertőzési kockázatnak van kitéve mind az anya növény, mind a termés. Továbbá a termelőterületekről hajóval szállítják az árut, melynek során különösen fontos, hogy megfelelő csomagolás segítségével megóvjuk a terméket a magas páratartalomtól, ami penészesedést vonhat maga után.

### 3.2 Az aflatoxinok

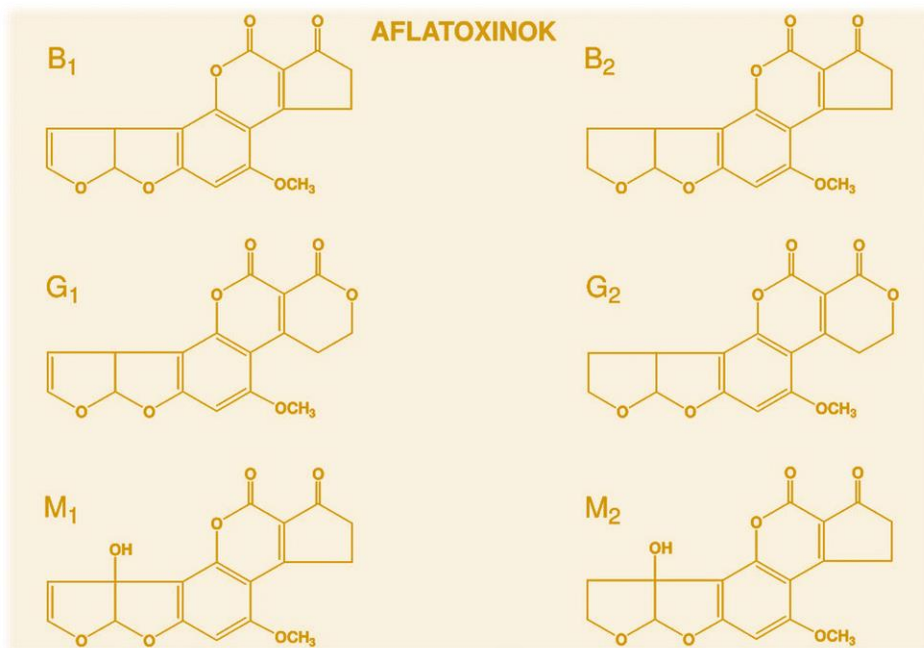
A fonalas gombák által, szekunder metabolitként termelt, a gerinces élőlényekre káros hatást kifejtő toxinokat mikotoxinoknak nevezzük. (Richard, 2007) A miko- előtag a gomba eredetű származásra utal, a toxin pedig mérgeanyagot jelent. Az etimológiai szótár szerint mindkét szórésztlet görög eredetű. (Internet 5.) (Internet 6.) A magyar lakosságnak a „mikotoxin” szó a 2004-es pirospaprika botrányával kapcsolatban csengethet ismerősen. (Internet 7.), ekkor a Hungarikumnak számító, forgalomban lévő fűszer pirospaprikában mutattak ki aflatoxin szennyezést. A Magyarországon megtermelt minőségi pirospaprikát Dél-Amerikából, Dél-Afrikából és Spanyolországból származó, toxinnal szennyezett paprikával hígították, gyakran a valódi eredet megjelölése nélkül. A botrány bekerült a médiába és így köztudatba a penészes ételek fogyasztásának újabb kockázati tényezőjeként épült be a mikotoxin szennyezettség.

Az Élelmiszer- és takarmánybiztonsági riasztási rendszer, a RASFF, 2010 és 2019 közötti adatait elemző kutatás szerint, (Alshannaq, 2021) az élelmiszerekben, és takarmányokban található leggyakoribb, legtoxikusabb és legrákkeltőbb mikotoxinok az aflatoxinok. Az USA-ból az EU-ba importált termékek jelentései közül a mikotoxin szennyezettség miatti értesítések 95%-a vonatkozott élelmiszerre és 5%-a takarmányra. A takarmányra történő bejelentések mindegyike aflatoxin szennyezettség miatt történt. Ez az adat azért fontos, mert a fűszerek a takarmányokhoz hasonlóan kerülnek betakarításra, szárításra és szállításra, emiatt a kitétséjük az aflatoxin szennyezésre hasonló kell, hogy legyen.

A NÉBIH szerint a gombatoxinok közül az emberi szervezetre az aflatoxinok, az ochratoxin-A, a patulin, a DON, a zearalenon, a fumonizinek, a T-2 és a HT-2 toxin a legkárosabbak. Az élelmiszerekben törekedni kell a mikotoxinok minél teljesebb kizárására. Mivel a legtöbb élelmiszer alapanyag eleve szennyezett, valamint a spórák a levegőben is megtalálhatók, a zéró tolerancia nem megoldás. Ezért maximális megengedhető mennyiség van meghatározva minden élelmiszer típushoz, a legjellemzőbb mikotoxinokra. (Internet 8.)

Az aflatoxinok az *Aspergillus flavus* gombáról kapták nevüket, rövidítésük az „AF” is innen ered. A B1 és B2, valamint G1 és G2 rövidítés az angol blue és green szavakból származik, mivel ezek az aflatoxinok ultraibolya fényben kék és zöld színnel fluoreszkálnak. Az M rövidítés az angol milk, azaz tej szóra utal. Ez a forma az aflatoxin B-vel vagy G-vel szennyezett takarmányt fogyasztó szarvasmarhák tejében fordul elő. (Bezerra da Rocha, 2014, De Ruyck, 2015)

Szerkezetüket tekintve az M1 és az M2 dihidro-, a B1 a B2, a G1 és a G2 és tetrahidrofuranofuránok. A 3. ábrán látható szerkezetüknek megfelelően, a több összekapcsolt gyűrű miatt vízben alig, szerves oldószerekben kiválóan oldódnak.



3. ábra - Aflatoxinok szerkezete (Internet 9.)

Először az *Aspergillus flavus* gombából mutatták ki jelenlétüket. Ettől függetlenül több penészgomba faj elő tudja állítani ugyanazt a mikotoxint illetve, egy-egy faj, különböző toxinok előállítására is képes lehet a környezeti paramétereiktől függően. (Varga et al., 2014) (Internet 10.) Ahogyan Pickova és munkatársai (2021) is megállapították az aflatoxinok a legpotensebb ismert gomba eredetű toxinok.

Az International Organisation of Spice Trade Associations (IOSTA, vagyis a Fűszerkereskedelmi Szövetségek Nemzetközi Szervezete) megalkotott egy általános iránymutatást a fűszerek és konyhai fűszernövények helyes mezőgazdasági gyakorlatáról. A leírás szerint, a fűszerek biztonsága az ellátási lánc biztonságosságától függ. A kiáltványban az első helyen vannak a mikotoxinok, mint az élelmiszer biztonságát veszélyeztető anyagok. (Internet 11.) Krónikus hatásként a hepatocelluláris karcinóma (májrák, mely az aflatoxinok májban történő metabolizációja miatt alakul ki) és az immunszuppressziós hatás emelhető ki. (Gong et al., 2016)

Fontos látni, hogy csak akkor lehet egy élelmiszer biztonságos, ha az ahhoz felhasznált alapanyagok, beleértve a fűszereket is, ellenőrzésre kerülnek a felhasználás előtt, valamint ha a szabályozási rendszer egységes nemzeti és nemzetközi szinten egyaránt. Csak így válik eredményessé a riasztási rendszer, a RASSF intézménye is.

A termékek hatásági ellenőrzése abban az esetben releváns, ha a vizsgált komponensekre egészségügyi határérték is vonatkozik. Az 1881/2006 EK rendelet második, mikotoxinokról szóló szakasza szerint a megengedett AFB1 koncentráció 5 µg/kg, és az aflatoxin B1, B2, G1 és G2 együttes mennyisége 10 µg/kg lehet a fűszerekben. (Internet 12.) A rendeletben szereplő táblázat kivonatát az 1. táblázatban láthatjuk.

**1. táblázat** - Aflatoxinok határértéke fűszerekben (1881/2006 EK)

Élelmiszerek		Felső határértékek (µg/kg)		
2.1.	Aflatoxinok	B1	A B1, B2, G1 és G2 összege	M1
2.1.9.	Az alábbi fűszerfajták: Capsicum spp. (annak szárított termései, egészben vagy őrleményként, beleértve a chilit, a chiliport, a cayenne-t és a paprikát) Piper spp. (annak gyümölcsei, beleértve a fehér- és a feketeborsot) Myristica fragrans (szerecsendió) Zingiber officinale (gyömbér) Curcuma longa (kurkuma)	5,0	10,0	-

A bébiételek esetében a rendelet még szigorúbb, az aflatoxinokra vonatkozó együttes határérték, 0,1 µg/kg. Ezek az igen alacsony egészségügyi határértékek olyan analitikai mérés technikák kidolgozását igénylik, amelyek segítségével biztonságosan meghatározható az élelmiszerek aflatoxin tartalma extrém alacsony koncentrációtartományokon is.

### 3.3 Mintaelőkészítés

Az analitikai mérés technikák összetett minták esetén, például élelmiszer, környezeti vagy biológiai mintáknál, hatékony mintaelőkészítési és mintatisztítási lépéseket igényelnek. A mintaelőkészítés folyamata során, a felhasznált oldószerek használatával, melyben a meghatározni kívánt mikotoxinok oldódnak, számos másik komponens is extrahálódik, ami hatással lehet a mérőműszer teljesítményére és a mérendő komponensek által szolgáltatott jel intenzitására. A fermentált vaníliabab fűszer egy különösen összetett mátrixnak tekinthető. A mátrixhatás vagy zavaró hatás az analitikai vizsgálatok során alkalmazott fogalom. A mintából a mintaoldatba kerülő komponensek a mérés során, indirekt módon befolyásolhatják a mérendő jel nagyságát. Tapasztalatok szerint a zavaró komponensek általában jelcsökkenést okoznak. (Záray, 2005) Az említett mintamátrix zavaró hatása okozza a tiszta analitikai standard és a minta oldatok eltérő jelét. A zavaró hatásnak két típusa ismert, az egyik a vak vagy additív zavarás, ebben az esetben a mintaoldat koncentrációtól független a hiba nagysága. A hiba mértéke csökkenthető, ha a

standard oldatoknál a mátrixot minél tökéletesebben utánzó közeget használunk, ez a mátrix illesztés. A másik típusú zavaró hatás, a mátrix vagy multiplikatív zavarás, mely a minta koncentrációval arányos, ezt standard addíciós módszerrel tudjuk kiküszöbölni. (Tatár és Záray, 2012)

Az összetett élelmiszermintákban kis mennyiségben jelenlévő aflatoxin komponensek meghatározásakor is szükség van mintatisztítási lépésekre a mérés előtt. Az általános kémiai mintaelőkészítési módszerek négy csoportba sorolhatók, ezek az elválasztás, a dúsítás vagy hígítás, a származékképzés és a roncsolás. Ezek közül az aflatoxinok vizsgálatához általában az első két csoportba eső technikák használatosak. Az extrakció során, ha szükséges, az elválasztani kívánt komponensből származékot képzünk, majd a minta komponenseit megosztjuk két egymással érintkező fázisban a megoszlási egyensúly alapján, végül elkülönítjük a fázisokat. Ezzel elválaszthatjuk a zavaró komponenseket és átvihetjük a mérendő mintát alkalmasabb fázisba. A legismertebb elválasztási módszerek a folyadék-folyadék extrakció, a csapadékképzés, az ioncsere, az adszorpció és deszorpció, a desztilláció, az abszorpció, a dialízis és a szilárd mintákból való kioldás. (Galbács, 2010) A következőkben néhány olyan mintatisztítási technikát ismeretetek, amiket napjainkban is széles körben alkalmaznak fűszerek mikotoxin tartalmának meghatározása során. Ezek a folyadék-folyadék extrakció, a QuEChERS, a szilárd fázisú extrakció, a MycoSpin és a "dilute and shoot" technika.

A folyadék-folyadék extrakció (liquid-liquid extraction, LLE) "többkomponensű" folyadékelegy vagy oldat célkomponenseinek elválasztására szolgáló művelet, melyhez egy alkalmas, szelektív extrahálószer használunk. A szelektív oldószer kiválasztásakor törekedni kell arra, hogy az a célkomponens közegével ne elegyedjen, attól könnyen elválasztható legyen. Az extrakció elvégzése után kapott fázisok az extraktum, (a célkomponens a szelektív oldószerben) és a raffinátum (az eredeti hordozószer, minimálisan hátramaradt mérendő komponenssel és extrahálószerrel) lesznek. A szelektív oldószer kiválasztásánál szempont lehet az alacsony gőznyomás a párolgási veszteségek minimalizálása érdekében, a kémiai stabilitás, az alacsony ár, valamint az, hogy ne legyen korrozív, toxikus vagy gyúlékony. Az elválasztás sikerességét a megoszlási hányados, a szeparációs faktor és az egyensúlyi görbe jellemzik. A megoszlási hányados megadja, hogy az elválasztás után az értékes anyag mekkora része került a szelektív oldószer fázisába a raffinátumhoz képest. A szeparációs faktor az oldat relatív dúsulását adja meg az extrahálószerben. Az egyensúlyi görbe az extrahálendő komponens eloszlását mutatja meg a raffinátum és az extraktum között háromszög diagramban. (Benkovits et al., 2018)

A folyadék-folyadék extrakció mellett nagy jelentőséggel bír az élelmiszeranalitikában a szilárd-folyadék extrakció. Ennek egy speciális változata az ún. QuEChERS módszer, ami az angol quick, easy, cheap, effective, rugged és safe (azaz gyors, könnyű, olcsó, hatásos, robusztus és biztonságos) szavakból összeálló mozaikszó. Ez egy szabványos mintaelőkészítési módszergyűjtemény gyümölcs és zöldség minták növényvédőszer-tartalmának meghatározásához (MSZ EN 15662:2018). Előnye a korábbi hagyományos módszerekkel szemben, hogy jobb a kinyerés hatásfoka (Perestrelo et al., 2019). A módszer egyes lépései módosíthatók és optimálhatók a szélesebb körű alkalmazhatóság növelése érdekében. Számos tudományos publikációban olvasható, hogy mikotoxinok kinyerésére is alkalmazzák a legkülönbözőbb mintatípusokból. Bessaira és társai (2019) például fűszerekből, diófélékből, tejporból, szárított gyümölcsökből, gabonafélékből és bébiételekből származó minták mikotoxin tartalmát vizsgálták, melyhez a QuEChERS-szel készítették elő a mintákat.

Folyadék halmazállapotú minták, illetve mintaextraktumok tisztítására széles körben alkalmazzák a szilárd fázisú extrakciót (SPE: solid phase extraction). Melynek célja a minta/mintaoldat tisztítása és a célvegyületek dúsítása. Ez a tisztítási eljárás az oszlopkromatográfiához hasonlít, mert az SPE töltetek különböző típusú vegyületek megkötésére alkalmas szorbenseket tartalmaznak. Anyagi minőségüktől függően lehetnek normál, fordított, ioncserés és kevert módú töltetek. Töltettípus választásunkat a mintamátrix és a célkomponens tulajdonságai határozzák meg. A töltet felülete tekinthető állófázisnak, amely fölött áramló folyadék a mozgófázis (eluens). A normál módú töltet a célkomponenstől eltérő polaritású alkotókat köti meg és a hasonlóakat engedi át, míg a fordított módú a célkomponenst köti meg. (Tölgyesi, 2017)

Vass (2017) PhD munkájában az SPE töltetek csoportosítása olvasható. Ez alapján létezik c-SPE (c=cartridge), d-SPE, azaz deszorpciós-SPE, ekkor a szilárd szorbenst a mintaextraktumhoz adják tisztítási céllal, valamint az MPSD (matrix-solid phase dispersion - mátrix szilárd fázisú diszperzió) módszer, amikor a mintához azonos mennyiségű szorbenst adva fizikai hatással roncsolják a mintát és segítik elő a szorpciót.

Az SPE mintatisztítási technika egyik speciális képviselője a MycoSpin, ami a kifejezetten mikotoxin-vizsgálatokhoz lett kifejlesztve. Az eszköz egy adszorbens keveréket tartalmazó patron, melyben az SPE töltete a zavaró mátrix komponenseket köti meg, a mikotoxinokat pedig átengedi. Ezáltal különböző mikotoxinok egymás melletti kimutatását teszi lehetővé a zavaró mátrixelemek eltávolításával. Vass csoportosítása alapján a MycoSpin a c-SPE, vagyis töltött oszlopos szilárd fázisú extrakciós töltetnek felel meg,

hiszen egy zárt mintatartóban van elhelyezve a szorbenskeverék, amin a centrifugális erőnek köszönhetően folyik át a tisztítandó minta. A MycoSpin elsősorban gabona minták tisztításához lett kifejlesztve a 35 éves mikotoxin kutatási tapasztalattal rendelkező Romer Labs által, és ők is forgalmazzák. A termék képe a teljes készlettel együtt a 4. ábrán látható. (Internet 13.)



4. *Ábra* - MycoSpin patron és készlet (Internet 13.)

A MycoSpin technika létjogosultságát mutatja, hogy egyre több tudományos publikációban jelenik meg mintatisztítási módszerként. Dagnac és munkatársai (2016) például MycoSpin 400-at alkalmaztak kukorica szilázs állati takarmány minták vizsgálatához LC-MS/MS mérés előtt. A MycoSpinnel tisztított mintákat hasonlították össze a kezelés nélküli mintákkal. A mátrix zavaró hatása miatt mátrixillesztett kalibrációval dolgoztak. Megfigyelésük szerint a MycoSpin TM 400 Multitoxin oszlopok, a hozzá tartozó leírás alapján mikotoxinok kinyerésére optimalizálva vannak, ám a fumonizin, az alternariol, az andrastin-A és az enniatin(ok) elnyelődtek a töltetben. Előny, hogy a MycoSpin több toxin együttes meghatározása során az átlagos visszanyerést segítette, de a precizitás csökkent a tisztítás nélküli mintákhoz képest. Egy másik tanulmányban Wang és munkatársai (2015) takarmány mintákban vizsgálták 26 különböző mikotoxin jelenlétét. A minták tisztításához a MycoSpin 400 Multitoxin oszlopokat, a méréshez folyadékkromatográfiás-tandem tömegspektrométert használtak. A mintát a gyártói ajánlás szerint készítették elő, majd a MycoSpin oszlopról eluálódó anyagot, oldószercserét követően vizsgálták. Az eredmények alapján a visszanyerés 61,90-119,5% között, az RSD% pedig 0,8-18,6% között adódott. Egy Shanghaji kutatócsoport aflatoxinok jelenlétét vizsgálta fermentált tea mintákban különböző mintatisztítási technikák segítségével. A MycoSpin 400-at a gyártói leírás szerint használták. Az eredményeket a többi módszerrel összehasonlítva jó hatékonysággal, kis szórással kapták meg. (Haiyan et al., 2021)



A mátrixhatás kiküszöbölhető hígítással is, ez az úgynevezett dilute & shoot, azaz, hígítás és “belövés” (injektálás) módszere, amely a folyadékkromatográfias vizsgálatoknál gyakori. A szilárd minta extrakciója után a kivonatot, hígítást és membránszűrést követően vizsgáljuk. Ez az eljárás csak akkor alkalmazható, ha a célkomponens magas egészségügyi határértékkel rendelkezik. Ellenkező esetben, alacsony koncentrációtartományon dolgozva a hígítási lépés miatt a mérőműszer kimutatási határának közelében bizonytalanná válhat mérésünk. A módszer előnye, hogy több mérendő komponens esetén a különböző oldhatósági paraméterekkel rendelkező komponensek is egy mintából mérhetőek, valamint nem tartalmaz olyan szelekciós extrakciós lépést, amely miatt elveszítenénk komponenseket. (Tölgyesi és Fekete, 2017)

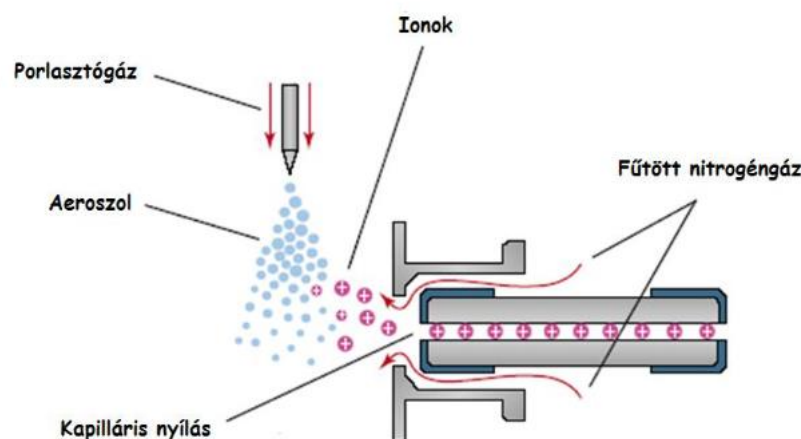
Munkám során Andrászkó és munkatársai (2021) által korábban végzett mikotoxin-méréshez alkalmazott mintatisztítási kísérleteket fejlesztettem tovább. Andrászkóék madagaszkári vanília mintákban 5 különböző mikotoxint vizsgáltak, mely során a “dilute and shoot” és a QuEChERS mintaelőkészítési és mintatisztítási módszereket hasonlították össze. Eredményeikből kiderült, hogy a “dilute and shoot” módszernél alkalmazott hígítás mértéke kevésnek bizonyult a mátrixalkotókban gazdag minta analíziséhez. A nyomnyi mennyiségben jelenlévő mikotoxinok nem voltak mérhetőek, túl nagy volt a mátrixhatás. A QuEChERS-höz kétféle szorbenst használtak a minta tisztításához: a GCB-t (graphitized carbon black) és a PSA-t (primer-szekunder amin). A PSA egy olyan szorbens, melyet általában a cukrok, zsírsavak, szerves savak, lipidek és néhány pigment eltávolítására alkalmaznak, míg a GCB-t a klorofill és más pigmentmolekulák megkötésére használják. A kutatás eredményei szerint az aflatoxin B1, B2, G1 és G2, valamint az ochratoxin-A egymás melletti kimutatására a GCB a megfelelő, ekkor mind az öt toxin mérhető, ám ha csak az aflatoxin meghatározása a cél, a PSA alkalmazásával a jelszupresszó kisebbnek adódott, tehát nagyobb jel értékeket kaptak. Mivel céлом az aflatoxin eltérő formáinak együttes meghatározása volt vanília mintákból, ezért a PSA-val kombinált QuEChERS módszerrel dolgoztam tovább. Munkám során a QuEChERS és a MycoSpin mintatisztítási eljárások hatékonyságát vizsgáltam, összehasonlításukkal pedig céлом volt az optimális mintaelőkészítési módszer meghatározása. Legjobb tudomásom szerint e dolgozat elkészültéig vanília mintára nem történt e tárgyban publikáció.

### 3.4 Méréstechnika

#### 3.4.1 Az UHPLC MS/MS készülék

Az 1960-as nagy angliai pulykavész óta a mikotoxinok kutatása fellendült. A mérési módszerek a vékonyréteg kromatográfiától és az UV- fluoreszcenciás kimutatástól eljutottak olyan szelektívebb mérés technikákig, amelyekkel kis koncentrációban is kimutathatóak a mikotoxinok. A dinamikus fejlődő folyadékkromatográfiás elválasztás és az ionizálható komponensek detektálására alkalmas tömegspektrométer összekapcsolására a 90-es évek közepéig kellett várni. Ez a módszer a legelterjedtebb a kis koncentrációjú, de viszonylag nagy molekulatömegű anyagok mérésére. Az LC-MS technika nem olyan régen, a 2000-es évek óta terjedt el szélesebb körben a mikotoxinok kis koncentrációban való kvantifikálására. A folyamatosan fejlődő folyadékkromatográfiás technikák egyik válfaja az UHPLC vagyis "ultra" nagy nyomáson (max. 1300 bar) működő kromatográfia, melyben az analitikai kolonna kis töltetmérete szolgáltat nagyobb felbontást többkomponensű elegyek vizsgálata során. A legtöbb olyan kutatás, amely ezt a módszert használja a 2010-es évek után jelent meg.

Az UHPLC-ESI-MS/MS működése során a mintaoldat komponensei anyagi minőségüktől függően eltérő módon kötődnek a kromatográfiás állófázishoz, így időben és térben elválasztódnak, emiatt különböző időpontban jutnak a detektorba. A detektor az egyes komponenseket tömeg per töltés ( $m/z$ ) alapján detektálja. A kromatográfiás egységet és a detektort egy ionforrás köti össze. (5. ábra)



5. Ábra – Az ESI ionforrás felépítése (Nász, 2008)

A leggyakrabban alkalmazott ionforrás az ESI (electrospray ionization vagy eletroszpré ionizáció), melyben a mintakomponensek eltérő időben beporlasztódnak, bepárlódnak és

ionizálódnak. Az ionizáció "lág", vagyis a komponensek épen, molekulaionok formájában jutnak tovább a detektorba. A gyakran alkalmazott hármaskvadrupól, vagyis QQQ rendszer, első tagja analízatorként működik, itt történik az anyaionok tömeg per töltés szerinti szűrése. A második tag az ütközési cella, ahol az anyaionok leányionokra fragmentálódnak. Végül a harmadik kvadrupól ezeket a fragmens ionokat detektálja tömeg per töltésük szerint. A komponensek egyértelmű beazonosításához a komponens referencia anyaggal összehasonlított retenciós idejére, valamint a detektorban mért egy anyaionra és két hozzá tartozó leányionra van szükség. (Tölgyesi et al. 2017).

A készülékek késői elterjedésének köszönhetően a mai napig kevés vanília mintából történő aflatoxinra vonatkozó publikáció látott napvilágot. Thanushree és munkatársai 2019-ben összegyűjtötték a fűszerek és a mikotoxinok témájában leggyakrabban alkalmazott vizsgálati módszereket. A kutatásból kiderül, hogy a leggyakoribb mérés technikák a HPLC-FLD, a HPLC-MS/MS, az ELISA, a NIR és a HIS. Ennek a cikknek a segítségével dolgoztam fel a fűszerek aflatoxin-tartalmára irányuló kutatások eredményeit.

Egy olaszországi kutatásban az aflatoxinok és az ochratoxin-A együttes jelenlétét vizsgálták a kereskedelmi forgalomban kapható fűszerekből, HPLC-FLD (fluoreszcenciás detektor) valamint az általam is használt LC-ESI-MS/MS módszerrel. A kísérleti eredmények szerint a vizsgált 130 fűszerből 20-ban aflatoxin, 31-ben pedig ochratoxin-A szennyezés volt kimutatható. Hat mintában tudták kimutatni a két toxintípus együttes jelenlétét, három mintában pedig a 156/2010 EU rendeletben meghatározott egészségügyi határértéknél magasabb OTA mennyiséget mértek. (Prelle et al., 2014)

Egy szerb kutatócsoport szintén aflatoxinok és ochratoxin-A jelenlétét vizsgálta pirospaprika és feketebors mintákban. A mintákat acetonitril-víz elegyben oldották, fecskendőszűrővel szűrték, végül hígították. A komponenseket UHPLC-MS/MS módszerrel analizálták. Az általuk vizsgált, kereskedelmi forgalomban kapható fűszerek nem tartalmazták kimutatható mennyiségben a mikotoxinokat. A pirospaprika minták validálása során megfelelt az uniós előírásoknak. A feketebors minták zavaró mátrix hatása miatt, az AFG1, AFG2 és az OTA komponensekre vonatkozó visszanyerési és a kimutatási határ (LOD) értékek nem feleltek meg a kívánalmaknak. (Škrbić et al., 2013)

Egy iraki kutatócsoport a helyi városi piacról származó 16féle fűszert és gyógynövényt vizsgált, melyeken 10 penészgombatorzshöz tartozó 16 faj jelenlétét mutatta ki, ezek közül a mikotoxin kimutatását diklór-rózsabengáli kloramfincol agaron (DRBC) végezték és a pozitív eredményt adó növényeket ELISA-módszerrel vizsgálták. A vörös tea mintában 150,5 ppb aflatoxin és 387,3 ppb ochratoxin koncentrációt mértek. A legalacsonyabb értéket

pedig a fokhagyma minta adta, ahol az ochratoxin nem volt kimutatható, az aflatoxin pedig 1,4 ppb-s volt. (Toma és Abdulla, 2013)

Hernández-Hierro és munkatársai (2008) egy spanyol boltban talált, mikotoxinnal szennyezett pirospaprika mintát vizsgáltak NIR-rel (near infrared spectroscopy), azaz közeli infravörös spektroszkópiával, referenciaként pedig HPLC-FLD-t használtak. A kapott eredmények szerint a NIR, melyhez nem kell a vizsgált mintát előkezelni és manipulálni, csak egy száloptikai szondát kell a pirospaprika mintára helyezni, alternatívát kínál a lassabb és költségesebb kromatográfiás módszer helyett. Valamint megállapították, hogy az AFB1 egyedüli vizsgálata elegendő lehet a többi toxin előrejelzéseként is.

Egy török kutatócsoport a pirospaprika aflatoxinnal való szennyezettségét vizsgálta hiperspektrális képalkotással (HIS). Az élelmiszerekben található aflatoxin kimutatására halogén és UV megvilágítási forrásokat alkalmaztak, az egyes spektrális sávok energiaértékeit, valamint az egymást követő spektrális sávok különbségeit használták jellemző vektorként. Megfigyelték, hogy magasabb osztályozási teljesítményt értek el kevesebb spektrális sávszámmal, ami lehetővé teszi egyszerűbb gépi látórendszerek tervezését. Megállapították, hogy a halogén gerjesztés jobb, mint az UV a chilipaprikában található aflatoxin kimutatására. A módszer alternatív megoldása lehet az eddig használtaknak. (Ataş et al., 2011)

Az egyetemen zajló, a vanília mikotoxin tartalmával foglalkozó eddigi kutatások során megtörtént az UHPLC-MS/MS mérési módszer optimalizálása, melyet a jelen dolgozat elkészítéséhez felhasználtam. (Varga, 2021, Andrászkó, 2021).

### **3.5 Validálás**

A mérési módszer validálása biztosítja a kísérleti eredmények megfelelőségét és megismételhetőségét. Jogszabályi alapja az Európai Bizottság 401/2006/EK (Internet 14.) rendeletében található, mely az élelmiszerek mikotoxin tartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapításáról szól. A megfelelőséget és a pontos paramétereket az Európai Parlament és a Tanács 882/2004/EK rendelete alapján ellenőrizheti a hatóság. Valamint e rendelet III. mellékletben van felsorolva, milyen paraméterek alapján kell validálni a módszert. (Internet 15.)

A konkrét validálási protokoll a 2002/657/EK Bizottsági Határozatban (Internet 16.) található, ahol az alkalmazandó analitikai módszerekre is kitér a szöveg.

401/2006/EK rendeletében megfogalmazottak szerint abban az esetben, ha az élelmiszerek mikotoxin-tartalmának meghatározásához a közösségi jog szintjén nincs

konkrét módszer előírva, a laboratóriumok bármilyen módszert választhatnak, feltéve, hogy az megfelel az alábbi konkrét kritériumoknak (6. ábra).

a) Alkalmassági kritériumok aflatoxinokra

Kritérium	Koncentrációtartomány	Ajánlott érték	Legnagyobb megengedett érték
Vakminta	Mindegyik	Elhanyagolható	—
Visszanyerés – aflatoxin-M1	0,01–0,05 µg/kg	60–120 %	
	> 0,05 µg/kg	70–110 %	
Visszanyerés – aflatoxin-B <sub>1</sub> , -B <sub>2</sub> , -G <sub>1</sub> , -G <sub>2</sub>	< 1,0 µg/kg	50–120 %	
	1–10 µg/kg	70–110 %	
	> 10 µg/kg	80–110 %	
Pontosság, RSD <sub>R</sub>	Mindegyik	A Horwitz egyenletből levezetve	A Horwitz egyenletből levezetett érték 2-szerese

Az RSD<sub>r</sub> pontosság a szóban forgó koncentráció mellett fennálló RSD<sub>R</sub> pontosság 0,66-szorosaként vehető.

Megjegyzés:

- Az értékek mind a B<sub>1</sub>-re, mind a B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub> összegére vonatkoznak.
- Ha az egyes B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub> aflatoxinok összegét kell a jegyzőkönyvben rögzíteni, akkor vagy ismerni kell mindegyik aflatoxinnál, hogyan viselkedik az adott analitikai rendszerben, vagy az aflatoxinok viselkedésének azonosnak kell lennie.

6. Ábra – Alkalmassági kritériumok aflatoxinra (401/2006/EK)

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 A mintaelőkészítés anyagai, vegyszerei

A mintaként felhasznált vanília örlemény, mely a 6. ábrán látható, kereskedelmi forgalomból származik, forgalmazója egy magyarországi Kft.



6. Ábra - Vanília örlemény

Az adalékoláshoz a Romer Lab Holding GmbH által gyártott Biopure™ MIX 1 (Aflatoxins) oldatot, egyszerűsítve „afla-mix”-et használtam. A mix az AFB1-re 2,03 µg/ml, az AFG1-re nézve 2,02 µg/ml, az AFB2-re 0,503 µg/ml, az AFG2-re nézve pedig 0,502 µg/ml gyári koncentrációjú. A validálás során használt kalibrációs sor készítéséhez az alacsony aflatoxin koncentrációjú pontokhoz készítettem az alfa-mixből acetonitrillel egy negyvenszeres hígítást. Ezt a továbbiakban „hígított afla-mix”-ként fogom hívni. A felhasznált acetonitril (táblázatokban ACN rövidítéssel szerepel) UHPLC-MS minőségű, a VWR International Ltd. gyártmánya. Az ionmentes vizet a Milli-Q berendezéssel állítottam elő. A QuEChERS módszerhez használt vegyszerek, amelyek az egyes alkotók kicsapásához és a vízmentesítéshez szükségesek:

- Trinátrium-citrát (Alfa Aesar)
- Dinátrium-hidrogén-citrát (Alfa Aesar)
- Nátrium-klorid (VWR International Ltd.)
- Magnézium-szulfát (VWR International Ltd.)

A minta tisztításához a QuEChERS módszerben javasolt primer-szekunder amint, vagyis PSA-t is használtam, ezt a Supelco Inc. gyártja. A felhasznált hangyasav és ecetsav VWR gyártmányú volt. Inert nitrogén gázzal történt a minták evaporálása.

A kromatográfiához használt eluensek készítéséhez szilárd ammónium-formiátot, valamint nagy tisztaságú metanolt használtam fel. Az ammónium-formiát és a metanol

gyártója egyaránt a VWR cég. A mérés során gradiens elúciót alkalmaztam, ehhez előzetesen szükséges volt a mérés során dinamikusan változó arányban jelen lévő A és B eluens elkészítésére. Ehhez szilárd ammónium-formiátból 100 ml-nyi, 0,01 M-os törzsoldatot készítettem. Mind az „A” mind a „B” eluensekből 500 ml-re volt szükség, melyhez az ammónium-formiátos törzsoldatból 25 ml-t, hangyasavból 500 µl-t használtam fel. Majd az „A” eluens lombikját vízzel, a „B” eluensét metanollal állítottam jelre. Az így kapott eluens-oldatok ammónium-formiátra nézve 5 mM-osak, hangyasavra nézve 0,1%-osak lettek.

#### **4.2 A mintaelőkészítés és mérés eszközei, berendezései**

A mintaelőkészítés során az OHAUS E1RR80 típusú analitikai mérleget használtam, a minták homogenizálására és a hatóanyag kinyerés érdekében a KUTESZ 2125-számú rázógéppel történt a rázatás. Centrifugálásra a HermLe Z 206 A típusú, a Dialab Kft által gyártott centrifugát használtam. A 3 perces Mycospin módszernél az erőteljes keverést IKA gyártmányú Ultra-Turrax® berendezéssel valósítottam meg.

A mérés UHPLC 1260 Agilent Ultivo Infinity II. típusú, ultra nagy hatékonyságú folyadék kromatográf segítségével zajlott, amely egy ESI ionforrással felszerelt, Agilent gyártmányú, hármas kvadrupól rendszerű tömegspektrométerrel van összekapcsolva. Az általam használt berendezés képe a 7. ábrán látható.



**7. Ábra** - Az UHPLC-MS/MS készülék

Az elválasztást Eclipse Plus C18 típusú előtét kolonnával felszerelt Eclipse Plus C18 RRHD analitikai kolonnán végeztem. Mindkét kolonna 2,1 cm átmérőjű, 5 cm hosszú és 1,8 µm-es szemcseátmérővel rendelkezik.

## 4.3 Módszerek

### 4.3.1 MÉRŐMÓDSZER

A kromatográfiás-tömegspektrográfiás mérőmódszerhez az Andraskó és munkatársai (2021) által optimált paramétereket alkalmaztam. Ezek alapján a fragmentor feszültség minden esetben 140 V volt. A további adatokat a következő, 2. táblázat tartalmazza.

**2. táblázat – Az alkalmazott optimált paraméterek (Andraskó et al., 2021 nyomán)**

Aflatoxin	Anyaiion (m/z)	1. leányion (m/z)	Ütközési energiája (V)	2. leányion (m/z)	Ütközési energiája (V)
B1	313,1	285,0	22	240,9	42
B2	315,1	259,0	30	286,9	26
G1	329,1	200,1	46	243,0	26
G2	331,1	245,0	30	313,0	26

Az ESI ionforrás optimált paraméterei közül a gáz hőmérséklete 340 °C-nak, az áramlási sebessége 12 l/percnek, a porlasztó nyomása 25 psi-nek a kapilláris feszültsége pedig 2000 V-nak adódott. Minden komponens esetén a legintenzívebb MRM átmeneten kapott eredményeket mutatom be dolgozatomban.

### 4.3.2 Mintaelőkészítési módszerek

A dolgozat első felében a különböző mintaelőkészítési módszereket hasonlítottam össze, hogy a megfelelőt kiválasztva a módszert vanília mátrixra validálhassam, a vizsgálódásom második részeként. Ennek során a QuEChERS és a MycoSpin módszereket alkalmaztam és kombináltam össze. Az előbbi egy szélesebb körben használt, rugalmas mintatisztítási módszer, az utóbbi egy direkt, a mikotoxinokhoz kifejlesztett mintatisztítási eszköz/készlet. A QuEChERS-szel akár több milliliternyi minta is kinyerhető az előkészítés végére, míg a MycoSpin módszernél kevesebb, mint 1 ml a tisztítás utáni végtérfogat a töltet mérete miatt. Így ha egymás után szeretnénk alkalmazni ezt a két tisztítási lépést, a MycoSpin csak a QuEChERS mintatisztítást követheti. Ezek alapján

- a QuEChERS (Q)
- a MycoSpin (M)
- és a QuEChERS + MycoSpin (Q+M) módszereket hasonlítottam össze.

Előzetes vizsgálatot végeztem a MycoSpin gyártói ajánlásában szereplő 90 és 3 perces, „shake” azaz rázatás és „blend” azaz vegyítés, módszerek összehasonlítására. (Internet 13.)



### 4.3.3 A QuEChERS (Q) módszer

Ez a módszer magyar szabványként elérhető. (MSZ EN 15662:2018) Egy rugalmas mintatisztítási eljárás, mely fűszerek, takarmányok peszticid tartalmának vizsgálatára lett kifejlesztve, de apróbb módosításokkal más területeken, például a mikotoxinokhoz is felhasználható, ugyanis alkalmas kis mennyiségben jelen lévő szennyezőanyagok vizsgálatához mintaelőkészítő eljárásként. (Internet 17.)

- Elsőként az örölt vanília mintából mértem 50 ml-es centrifugacsőbe 2 g-ot analitikai mérlegen. Két párhuzamos és egy összehasonlító „vak” mintával dolgoztam.
- A két párhuzamos mintát addicionáltam 160-160 µl „afla mix”-szel. Az aflatoxinokkal való munka során elszívó fülke alatt, valamint megfelelő védőfelszerelés használatával dolgoztam.
- A vanília mintákat 10-10 ml vízzel nedvesítettem, ekkor egy hígán folyó iszapszerű anyagot kaptam.
- Az extrakciós eljárást acetonitril hozzáadásával kezdtem meg, 10 ml-t tettem minden mintához, majd kézi erővel ráztam 1 percig.
- Ezután a nátrium-kloridból, trinátrium-citrátból és dinátrium-hidrogén-citrátból (1:2,5:0,5 arányban) előkészített keverék 2,5 g-ját adtam hozzá a centrifuga csövek tartalmához. Ezeket összefoglaló néven „kis sóknak” nevezi a szakzsargon.
- Majd 4-4 g vízmentes magnézium-szulfátot öntöttem hozzá a mintákhoz.
- Újabb 1 percig ráztam a mintákat, melyek a magnézium-szulfát vízfelvételi reakciója miatt melegedtek. Ezután 5 percig centrifugáltam a mintákat 3000 g-s fordulatszámmon, szobahőmérsékleten.
- A felülúszókból 4-4 ml-t átpipettáztam 15 ml-es centrifuga csövekbe és hozzáadtam mindegyikhez az előre kimért 100 mg PSA-t valamint 600 mg vízmentes magnézium-szulfátot.
- Ekkor a rázóasztalra felszerelve 30 perces rázatás következett, majd újabb 5 perc centrifugálás 3000 g-s fordulaton.
- A felülúszó 2,5 ml-ét 4 ml-es mintatartókba pipettáztam és hozzáadtam 25 µl 5%-os hangyasavas acetonitrilt.
- Nitrogéngáz befúvatásával evaporáltam a mintákat a mikotoxin koncentráció töményítése érdekében, ahogyan a 8. ábrán látható.



8. *Ábra* - Evaporálás nitrogén gázzal

- A szárazra párolt mintákat 50:50 arányú „A”:"B” eluensben vettem vissza, a végtérfogat 500 µl volt.
- Mivel az extraktum, a magas olajtartalmú mátrix miatt, ekkor darabos és opálos volt, átszűrtem fecskendőszűrővel (PTFE, 0,22 µm), hogy a HPLC-s kolonnát kíméljem a felesleges szennyeződésektől.
- Mindkét mintából 3-3 párhuzamos mérést végeztem.(3. táblázat)

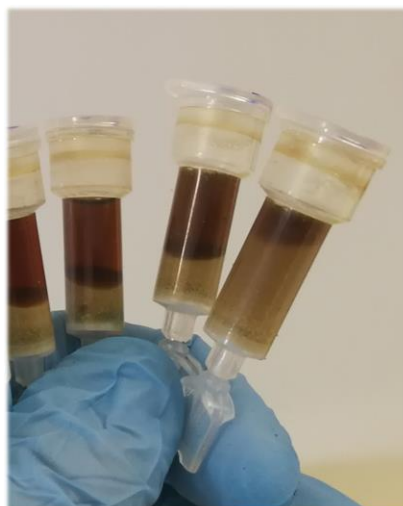
3. táblázat - A QuEChERS módszer lépései és az elméleti koncentrációk

Lépések	Koncentráció			
	<i>AFB1</i>	<i>AFB2</i>	<i>AFG1</i>	<i>AFG2</i>
2 g minta kimérése	-	-	-	-
Nedvesítés 10 ml vízzel	-	-	-	-
160 µl afla-mix hozzáadása	162,4 ng/kg	161,6 ng/kg	40,2 ng/kg	40,2 ng/kg
10 ml acetonitril hozzáadása	32,5 ng/l	32,3 ng/l	8,0 ng/l	8,0 ng/l
1 perc rázás				
2,5 g sókeverék hozzáadása				
4 g vízmentes magnézium-szulfát hozzáadása				
1 perc rázás				
5 perc centrifugálás 6000 rpm-en				
4 ml felülúszó levétele				
100 mg PSA hozzáadása				
600 mg magnézium—szulfát hozzáadása				
30 perc rázás				
5 perc centrifugálás 6000 rpm-en	-	-	-	-
2,5 ml felülúszó levétele				
25 µl 5%-os hangyasavas ACN hozzáadása				
Evaporálás	-	-	-	-
Feloldás 500 µl 50:50 A:B eluensben	162,4 ng/l	161,6 ng/l	40,2 ng/l	40,2 ng/l
Fecskendőszűrés	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l

#### 4.3.4 A MycoSpin (M) módszer

Az általam tesztelt MycoSpin 400 Multitoxin egy kb 1,5 cm hosszú, 0,5 cm átmérőjű átlátszó műanyag henger, amiben speciális SPE töltet található, amely a mikotoxinokat átengedi, de az egyéb szennyező anyagokat visszatartja. A készlet 25 töltetet és hozzá tartozó mintatartót tartalmaz. Használata egyszerű és gyors, de a készlet komolyabb anyagi ráfordítást igényel. A töltethez adott mérésleírásban kétféle minta feltárási technikát is javasolnak, egy 90 perces rázóasztali rázatást vagy egy 3 perces, erőteljes keverést.

- Elsőként az előző módszerhez hasonlóan 2 g vanília őrleményt mértem ki analitikai pontossággal, majd hozzáadtam az afla-mixből 160  $\mu$ l-t és 10 ml 50:50 acetonitril:víz elegyet.
- 90 perc rázógépes ráztatás vagy 3 perc Ultra-Turrax®-os kevertetés után 5 percen át centrifugáltam 6000 fordulat per perc sebességgel, hogy a fázisokat szétválasszam és ki tudjak nyerni 4 ml felülúszót.
- A felülúszóhoz hozzáadtam 200  $\mu$ l ecetsavat és fecskendőszűrés után, nitrogéngáz segítségével bepároltam az oldatot.
- Az evaporáció után 1 ml eredeti oldószerben, azaz 50:50 acetonitril:víz elegyben oldottam vissza a mintát. Így négyszeres töményedés következett be.
- Mivel a minta ezen előkészítések után nem volt valódi oldat, újabb fecskendőszűrés után 800  $\mu$ l tisztított mintát tudtam csak juttatni a MycoSpin-re, az előírt 1 ml helyett. Ez az állapot látható a 9. ábrán.



9. *Ábra* – MycoSpin-ek extraktummal töltve

- 1 perc Vortexelés után letörtem a töltet alját és belehelyeztem a hozzátartozó centrifugacsőbe. 30 másodpercig centrifugáltam 10.000 fordulat per perc sebességgel. Ekkor került át a folyadék a tölteten keresztül a kis centrifugacsőbe.
- A kinyert mintából 250 µl-nyit hígítottam 500 µl-re 50:50 A:B eluenssel. Az így kapott oldatot (4. táblázat) mértem meg a készülékkel.

#### 4. táblázat - A MycoSpin módszer lépései és az elméleti aflatoxin koncentrációk

Lépések	Koncentráció			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
2 g minta kimérése	-	-	-	-
160 µl afla-mix hozzáadása	162,4 ng/kg	161,6 ng/kg	40,2 ng/kg	40,2 ng/kg
10 ml 50:50 acetonitril:víz hozzáadása	32,5 ng/l	32,3 ng/l	8,0 ng/l	8,0 ng/l
90 perc ráztatás vagy 3 perc erőteljes kevertetés				
5 perc centrifugálás 6000 rpm-en				
4 ml felülúszó levétele				
200 µl ecetsav hozzáadása				
Fecskendőszűrés	-	-	-	-
Evaporálás	-	-	-	-
Feloldás 1 ml 50:50 ACN:víz elegyben	130,0 ng/l	129,3 ng/l	32,2 ng/l	32,1 ng/l
800 µl extraktum rátöltése a MycoSpin-re				
1 perc Vortex				
MycoSpin aljának letörése, beleállítás centrifugacsőbe				
30 másodperc centrifugálás 10.000 rpm-en				
250 µl minta kiegészítése 500 µl-re 50:50 A:B eluenssel	65,0 ng/l	64,6 ng/l	16,1 ng/l	16,1 ng/l

#### 4.3.5 A QuEChERS + MycoSpin (Q+M) módszer

Ezen mintaelőkészítésnél a 4.3.3-as pontban szereplő lépéseket ismételt meg új mintabemérésekkel, az evaporálás lépéséig. A különbség, annyi volt, hogy a töményítés megkezdése előtt 150 µl ecetsavat adtam a mintákhoz. Ez után tértem át a QuEChERS módszerről a MycoSpinre. (5. táblázat)

- A bepárolt mintákat 1 ml 50:50 acetonitril:víz elegyben oldottam, és rátöltöttem a MycoSpin töltetre.
- 1 perc Vortexelés után letörtem a MycoSpin töltetek alját és beleállítottam őket a hozzátartozó centrifuga csőbe. A mintákat 30 s-ig 10.000 rpm-en centrifugáltam.
- A folyadék átfolyt a centrifuga csőbe, ahonnan 250 µl-t pipettáztam a mintatartókba és 500 µl-re egészítettem ki a mintákat az „A” és „B” eluensekkel 1:1 arányban.

**5. táblázat** - A QuEChERS + MycoSpin módszer lépései és az elméleti koncentrációk

Lépések		Koncentráció			
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
2 g minta kimérése	Q U E C H E R S	-	-	-	-
Nedvesítés 10 ml vízzel		-	-	-	-
160 µl afla-mix hozzáadása		162,4 ng/kg	161,6 ng/kg	40,2 ng/kg	40,2 ng/kg
10 ml acetonitril hozzáadása		32,5 ng/l	32,3 ng/l	8,0 ng/l	8,0 ng/l
1 perc rázás					
2,5 g sókeverék hozzáadása					
4 g vízmentes magnézium-szulfát hozzáadása					
1 perc rázás					
5 perc centrifugálás 6000 rpm-en					
4 ml felülúszó levétele					
100 mg PSA hozzáadása					
600 mg magnézium—szulfát hozzáadása					
30 perc ráztatás					
5 perc centrifugálás 6000 rpm-en					
3 ml felülúszó levétele fecskendőszűrővel					
25 µl 5%-os hangyasavas acetonitril hozzáadása					
150 µl ecetsav hozzáadása					
Evaporálás	M Y C O S P I N	81,2 ng/l	80,8 ng/l	20,1 ng/l	20,1 ng/l
Feloldás 1 ml 50:50 ACN:víz elegyben					
Fecskendőszűrés					
800 µl extraktum rátöltése a MycoSpin-re					
1 perc Vortex					
MycoSpin aljának letörése, beleállítás centriscsőbe					
30 másodperc centrifugálás 10.000 rpm-en					
250 µl minta kiegészítése 500 µl-re 50:50 A:B eluenssel	40,6 ng/l	40,4 ng/l	10,1 ng/l	10,0 ng/l	

#### 4.4 A validálás előkészítése

A validálást a MycoSpin módszerre végeztem el, a mérés menete megegyezett a 4.3.4. pontban találhatóakkal. Eltérést csak az afla-mix hozzáadásának idejében és mennyiségében volt. Amikor a visszanyerést vizsgáltam összesen hat SPE töltetet használtam fel. Három koncentráció tartományban mértem két-két párhuzamosban. Az összeméréskori mennyiségeket és koncentrációkat a 6. táblázat tartalmazza.

**6. táblázat** – Bemérések a visszanyerésvizsgálathoz

Koncentráció (µg/l)	2,5		5		7,5	
	I.	II.	I.	II.	I.	II.
Minta bemérés (g)	1,9990	1,9980	2,0079	1,9983	1,9985	2,0012
Afla-mix (µl)	6,25		12,5		18,75	

A linearitás, szelektivitás, LOQ, LOD, stabilitás vizsgálataihoz készült mintasorhoz három darab MycoSpint használtam fel, mikotoxin hozzáadása nélkül. A kapott tisztított mintákat összeöntve, és utolsó lépésként „afla-mix”-et adagolva a következő, 7. táblázatban szereplő kalibrációs sort készítettem el.

**7. táblázat** – Mátrixszal terhelt kalibrációs sor

Sorszám	hígított aflamix (µl)	afla mix (µl)	AFB1 (µg/l)	AFG1 (µg/l)	AFB2 (µg/l)	AFG2 (µg/l)	A:B eluens (µl)	mátrix* (µl)	végtérfogat (µl)
0 (vak)	0	-	0	0	0	0	0	200	400
1	4	-	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	200	400
2	8	-	1	1	0,3	0,3	0,3	200	400
3	40	-	5,1	5,1	1,3	1,3	1,3	200	400
4	80	-	10,2	10,1	2,5	2,5	2,5	200	400
5	-	10	50,8	50,5	12,6	12,6	12,6	200	400
6	-	20	101,5	101	25,2	25,2	25,1	200	400

\*MycoSpin-nel megtisztított örlemény extraktum

A mátrixhatás vizsgálatához mátrix mentes kalibrációs sort is készítettem, a fentiekhez hasonlóan, kivéve, hogy a tisztított minta helyett 50:50 A:B acetonitril-víz elegyet használtam fel, ahogyan a 8. táblázatban látszik.

**8. táblázat** – Mátrixmentes kalibrációs sor

Sorszám	hígított aflamix (µl)	afla mix (µl)	AFB1 (µg/l)	AFG1 (µg/l)	AFB2 (µg/l)	AFG2 (µg/l)	A:B eluens (µl)	ACN:víz (µl)	végtérfogat (µl)
0 (vak)	0	-	0	0	0	0	200	200	400
1	4	-	0,5	0,5	0,1	0,1	196	200	400
2	8	-	1	1	0,3	0,3	192	200	400
3	40	-	5,1	5,1	1,3	1,3	160	200	400
4	80	-	10,2	10,1	2,5	2,5	120	200	400
5	-	10	50,8	50,5	12,6	12,6	190	200	400
6	-	20	101,5	101	25,2	25,1	180	200	400
7	-	100	507,5	505	125,8	125,5	100	200	400

## 5. Eredmények és értékelésük

### 5.1 A 90 és 3 perces MycoSpin módszerek összehasonlítása

Elsőként a MycoSpin 400 gyári leírásában szereplő két extrakciós lépést hasonlítottam össze. A töltettípus első használata és a módszerek közötti nagy időkülönbség okozta bizonytalanság miatt végeztem el ezt a kísérletet. Párhuzamosan vizsgáltam az extrakciós lépéseket. 2-2 gramm őrleményhez 160-160 µl „afla-mix”-et, és megfelelő mennyiségű oldószert adtam, az így a kapott oldatok koncentrációja 64 µg/l lett az extraktumban. Az egyik módszer egy 90 perces rázatást írt elő, ezt rázóasztal segítségével valósítottam meg, a másik pedig egy 3 perces erőteljes kevertetést javasolt, melyet a laboratóriumban található Ultra-Turrax® segítségével tudtam megvalósítani. A mintaelőkészítés további lépései megegyeztek a 4.3.4 mintaleírásban szereplőkkel. A vizsgálat során megállapítottam, hogy a MycoSpin módszer két homogenizálási alternatívájának eredményei nagyon hasonlóak. Az LC-MS által az egyes komponensekre kapott MRM átmenetek csúcs alatti területeit összehasonlítva, az eredmények közötti eltérés 10% alatti. (9. táblázat)

9. Táblázat - A 3 perces és a 90 perces MycoSpin módszerek összehasonlítása

Vizsgált komponens	Módszerek		Eltérés
	3 perces/ Ultra-Turrax®	90 perces/ Rázóasztal	
	MRM átmenet csúcs alatti terület		%
AFB1	3174	2964	7,1
AFB2	689	678	1,6
AFG1	1371	1493	-8,2
AFG2	374	347	7,8

A fenti eredmények alapján a toxikológiailag biztonságosabb, 90 perces módszert választottam. Még ha a minta eredetileg nem is tartalmazott nagy mennyiségű toxint, az „afla-mix” hozzáadása után jelentős szennyező forrássá válik. Lemosni a toxinokat a késes készülékről csak bizonytalan hatékonysággal lehet, illetve nem szerencsés a nyitott mintákat szabad levegőn tartani, a kevertetés idejére sem. Ezek alapján a 90 perces verzióval haladtam tovább, a következő kísérletek mindegyikénél ezt alkalmaztam.

## ***5.2 QuEChERS, MycoSpin és QuEChERS + MycoSpin módszerek összehasonlítása***

A Tanszéken folyó korábbi kutatási munka eredményeképpen kiderült, hogy a “dilute and shoot” és a QuEChERS módszerek közül, vanília mátrixra vonatkozóan a QuEChERS mintatisztítási technika nyújt jobb hatásfokot. Andrásó és munkatársainak (2021) munkája alapján, abban az esetben, ha kizárólag aflatoxinok meghatározása a cél, a QuEChERS PSA szorbenssel párosítva tűnik a leghatékonyabbnak. Lehetőségem adódott folytatni ezt a kutatási témát, a mintaelőkészítési feladatok további vizsgálatával. Célkitűzésem szerint a sok lépéses és időigényes módszer helyett, egy hasonló, hatékony és direkt mintatisztítási módszert teszteltem és hasonlítottam össze, mely gabona minták tisztítására lett kifejlesztve, mikotoxin méréshez. Dolgozatom elkészültéig, tudomásom szerint, nem található olyan tudományos publikáció a szakirodalomban, melyben vanília fűszerben MycoSpin segítségével mikotoxin tisztítási kísérletet végeztek volna.

Olyan kísérleti elrendezést állítottam fel, amelyben minden esetben 2 g vanília mintára addicionáltam ismert koncentrációban a négy aflatoxin komponenst. Három eltérő mintaelőkészítési módszerrel két-két párhuzamos mérésben tisztítottam az így elkészített tesztmintákat. Az egyik, az Andrásó és munkatársai (2021) által már korábban alkalmazott QuEChERS módszer, mely mintaelőkészítési lépéseit a 4.3.2. fejezetben, a 3. táblázatban olvashatjuk. A másik elrendezés szerint, a tesztmintákat kizárólag a MycoSpin eszköz segítségével tisztítottam, ennek lépéseit a 4.3.4. fejezet 4. táblázatában foglaltam össze. Harmadik lehetőségként, feltételezve, hogy a két módszer előnyei összeadódnak, együtt alkalmaztam őket, nagyobb mintatisztítási hatásfokot várva. A mérésleírást a 4.3.5. fejezet 5. táblázata tartalmazza. A 3. 4. és 5. táblázatok lépésről-lépésre tartalmazzák az egyes előkészítési módok során elvégzett beavatkozásokat, valamint az aflatoxin komponensek koncentrációinak változását az előkészítési lépések hatására. A három táblázat utolsó sorait összevetve látható, hogy a QuEChERS módszerrel előkészített mintákban adódtak a legnagyobb az aflatoxin komponensek koncentrációi az eltérő hígítási lépések miatt. A MycoSpin közel harmada a QuEChERS esetén tapasztaltnak, a legkisebb pedig a kombinált QuEChERS + MycoSpin mintaelőkészítési módszer esetén adódott. A mintaelőkészítési módszerek hatékonyságát az egyes komponensekhez tartozó MRM átmenetek által szolgáltatott csúcs alatti területek alapján vizsgáltam. Az összehasonlíthatóság érdekében a kiértékelésekor, minden előkészítési művelet esetén (Q, M, Q+M) az összes komponensre (B1, B2, G1, G2), az egységnyi koncentrációra jutó



csúcs alatti terület nagyságát vettem alapul. Ezt a normalizált jelet nevezem a továbbiakban „jel”-nek. A terület adatokat, a hozzájuk tartozó koncentrációkat és a számolt jel eredményeket mind a 4 mikotoxin tekintetében, mérési eljárásonként két párhuzamos adattal (1-gyel és 2-vel jelezve a Módszer oszlopban), a 10. táblázat tartalmazza.

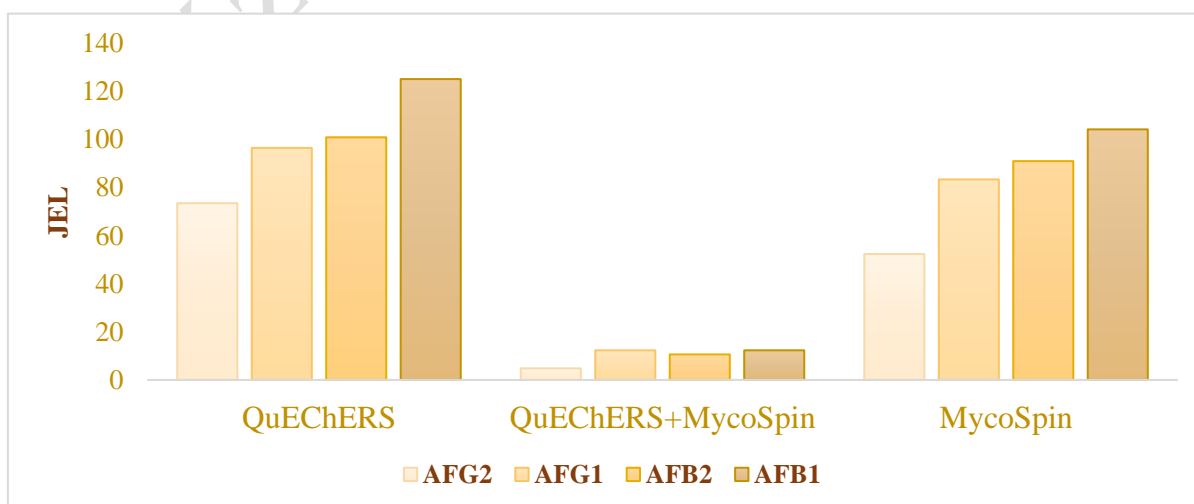
**10. Táblázat** - A QuEChERS, MycoSpin és QuEChERS + MycoSpin módszerek összehasonlítása

Módszer	AFB1			AFB2		
	Koncentráció (ug/l)	Terület*	Jel**	Koncentráció (ug/l)	Terület*	Jel**
Q 1	162,4	20463	126,0	40,2	4042	100,4
Q 2		20142	124,0		4067	101,1
M 1	65,0	6200	95,4	16,1	1239	77,0
M 2		7331	112,9		1686	104,7
Q+M 1	40,6	772	19,0	10,1	161	16,0
Q+M 2		230	5,7		52	5,2
	AFG1			AFG2		
	Koncentráció (ug/l)	Terület*	Jel**	Koncentráció (ug/l)	Terület*	Jel**
Q 1	161,6	15502	95,9	40,2	2955	73,6
Q 2		15651	96,9		2938	73,2
M 1	64,6	5324	82,4	16,1	764	47,6
M 2		5444	84,2		916	57,0
Q+M 1	40,4	673	16,7	10,0	74	7,4
Q+M 2		322	8,0		22	2,2

\*az ebben az oszlopban lévő adatok „vak”-kal korrigált értékek

\*\*Jel: egységnyi koncentrációra vonatkoztatott csúcs alatt terület

A 10. táblázat „Jel” eredményeit grafikusán ábrázolva és a párhuzamos adatokat átlagolva a 10. ábrát kapjuk. A QuEChERS alkalmazása során kapott Jel értékek átlagos RSD% értéke 1,4 %-nak, a MycoSpin esetén 11,5 %-nak, a QuEChERS + MycoSpin módszer esetén 27,1%-nak adódott.



**10. Ábra** - A QuEChERS, MycoSpin és QuEChERS + MycoSpin módszerek összehasonlítása

A diagramban szereplő adatok alapján szembeűnő, hogy amikor a kombinált mintatisztítási műveletet elvégeztem, a mért mikotoxinok mennyisége határozottan csökkent. Ennek az lehet az oka, hogy több tisztítási lépés követte egymást, mely során a komponensek elveszhetnek. Mivel ez a módszer anyag-, idő-, költség és munkaigényes is egyben, ezért a kombinált módszer további alkalmazását elvettem.

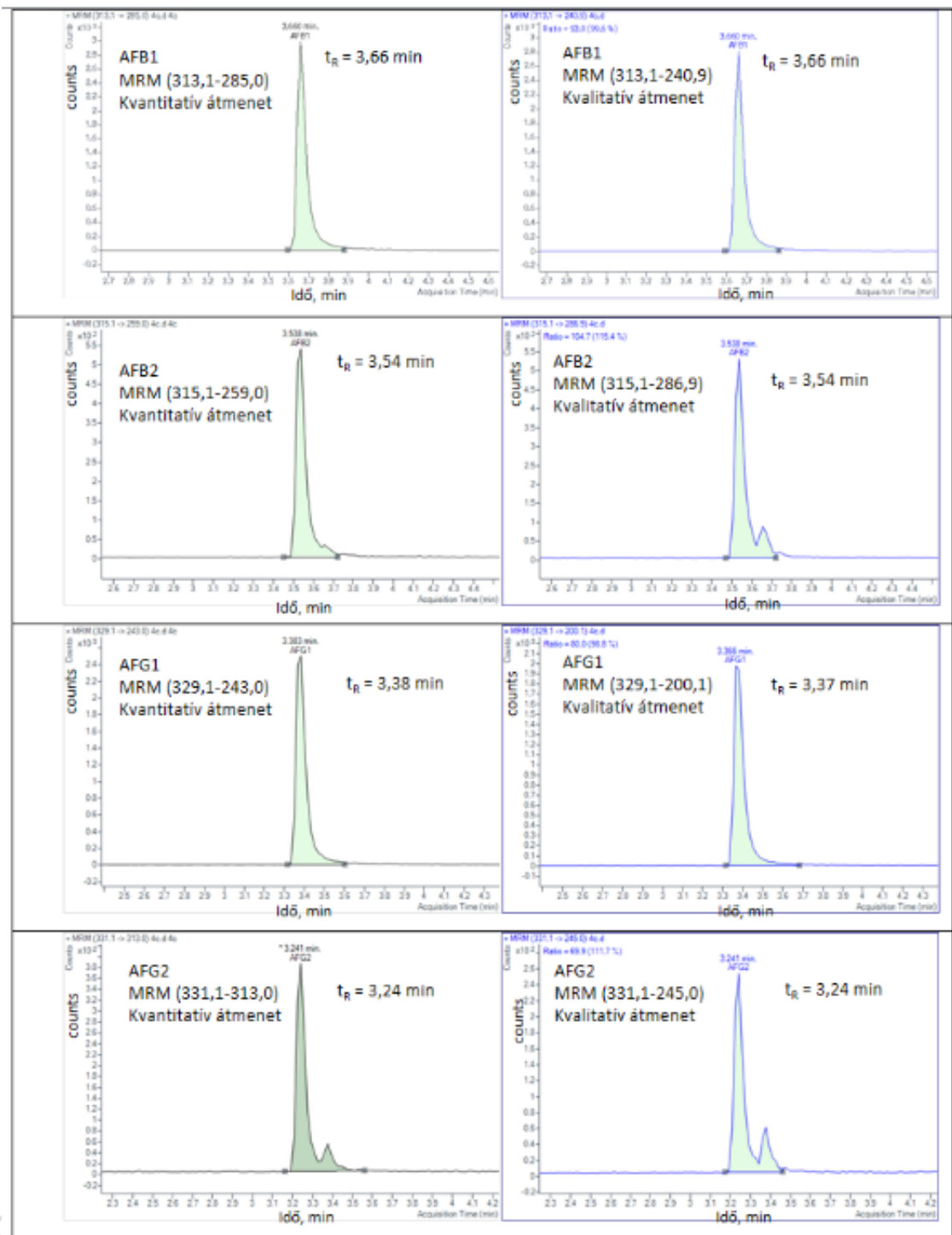
A 10. ábrán látható QuEChERS és MycoSpin módszerekkel jól mérhető jeleket kaptam. Az egyes komponensekre kapott eredmények közötti relatív átlagos eltérés kb. 12%. A QuEChERS mintaelőkészítés időtartama gyakorlott személyzetnek is 4 órát vesz igénybe, rövidítésre nincs lehetőség. Míg a MycoSpin a 90 perces rázatással és az evaporációs lépés beiktatása mellett sem éri el a 4 órát. A kapott eredmények alapján vanília őrlemény aflatoxin-tartalmának meghatározásakor a QuEChERS mintatisztítási módszer kiváltható a MycoSpin módszerrel. Ezért dolgozatom további részében a MycoSpin mintatisztítási technikát alkalmaztam.

### ***5.3 A MycoSpin módszer validálása***

A korábbi fejezetekben optimálisnak ítélt mintaelőkészítés és az Andraskó (2021) által optimalizált LC-MS paraméterek alkalmazásával a módszer analitikai teljesítményjellemzőit szeretném leellenőrizni, melynek eredményei szerepelnek a következő szakaszokban.

#### ***5.3.1 Szelektivitás vizsgálat***

Az UHPLC-MS/MS mérés során az aflatoxin-anyaiionok fragmentálódtak. Minden aflatoxin komponens két MRM átmenetén vizsgáltam. A legintenzívebb, ún. kvantitatív átmenetet használtam fel a kvantifikáláshoz. A második legintenzívebb, kvalitatív átmenet vizsgálata elvárt QQQ-MS/MS technikák alkalmazása során, hiszen a kvalitatív és kvantitatív átmenetek aránya komponens specifikus, így vizsgálatuk újabb szelektivitási tényezőt jelent a komponensek beazonosításához a retenciós időn, valamint az anyaiion m/z értékén túl. A mérést a 4.3.1. fejezetben leírt beállítások mellett végeztem el. A következő, 11. ábrán 10,2 ug/l koncentrációjú, mátrix mentes referenciaoldatban mért négy mikotoxin MRM átmenetei láthatók.



**11. Ábra** – A vizsgált mikotoxinok kvantitatív és kvalitatív MRM átmenetei

Az ábrán látható, hogy a retenciós idők megegyeztek az átmeneteknél és a kirajzolt területek alakja is hasonló.

A 11. táblázatban a relatív ionarány vizsgálatához szükséges adatok szerepelnek. A relatív intenzitás érték azt mutatja meg, hogy a mért leányionok egymáshoz viszonyított aránya mennyire tér el a szakirodalomban szereplőtől.

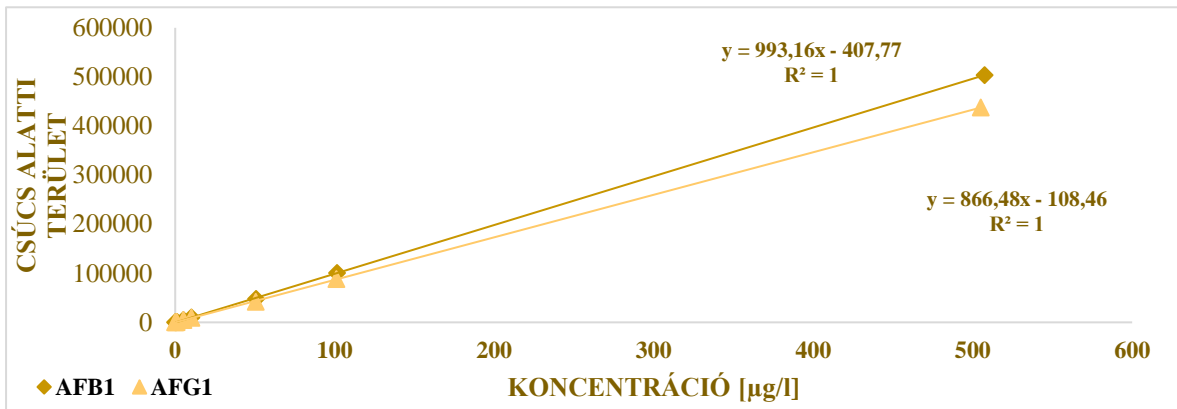
**11 táblázat** - Relatív intenzitáсарányok összehasonlítása

<b>Komponensek</b>	<b>Leányionok intenzitáсарánya a referencia anyagban [%]</b>	<b>Leányionok intenzitáсарánya a mintáimban [%]</b>	<b>Relatív intenzitás eltérések [%]</b>	<b>Maximum tűrés [%]</b>
<i>AFG2</i>	62,6	52,0	16,9	20
<i>AFG1</i>	81,0	76,8	5,2	20
<i>AFB2</i>	90,7	103,6	14,2	20
<i>AFB1</i>	93,4	94,7	1,4	20

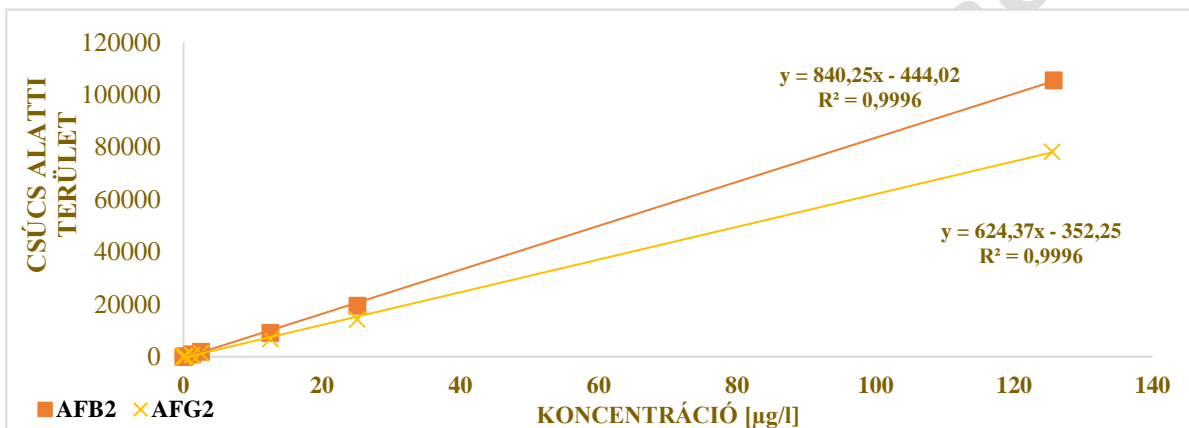
A 96/23/EK irányelv I. mellékletének B. csoportjában felsorolt anyagok megerősítő vizsgálatához minimum 3 azonosítási pontszámra van szükség, ide tartoznak a mikotoxinok is. A 2002/657/EK rendelet szerint LC-MS/MS technika, amely során egy prekursor iont és annak két leányionját azonosítjuk komponensenként, 4 azonosítási pontot szolgáltat, ami megfelel a mikotoxinok mérési követelményének. A rendelet 2.3.3.2 fejezetében szereplő 4. táblázat határozza meg, hogy a detektált relatív intenzitásokhoz mekkora maximum tűrések engedélyezettek tömegspektrometriás technikák esetén. Az általunk mért minden aflatoxin esetén a mért leányionok közti intenzitás arány nagyobb, mint 50%, így  $\pm 20\%$  tűréshatár engedélyezett. A négy aflatoxin módszerbe való optimalása során megállapításra került a komponensek detektált leányionjainak aránya, melyhez a mintáimban mért ionarányokat hasonlítottam. Így megállapítható, hogy a módszer a relatív ionarányt célzó teljesítménykritériumnak megfelel.

### **5.3.2 Linearitás, mátrixhatás**

Elsőként a linearitást vizsgáltam, melyhez a mikotoxin referencia anyagok növekvő koncentrációjú oldatsorát készítettem el a 4.4. fejezet 8. táblázata alapján. Ezek az oldatok kizárólag a négyféle aflatoxin komponens (az afla-mixet) és az oldószereket tartalmazták. Az így kapott oldatokat ezután a 4.3.1 fejezetben bemutatott mérőmódszer paramétereit szerint mértem. Az egyes oldatokban mért komponensek csúcs alatti területeit a koncentráció függvényében kalibrációs diagramokon ábrázoltam, melyek a 12. és 13. ábrán láthatóak.



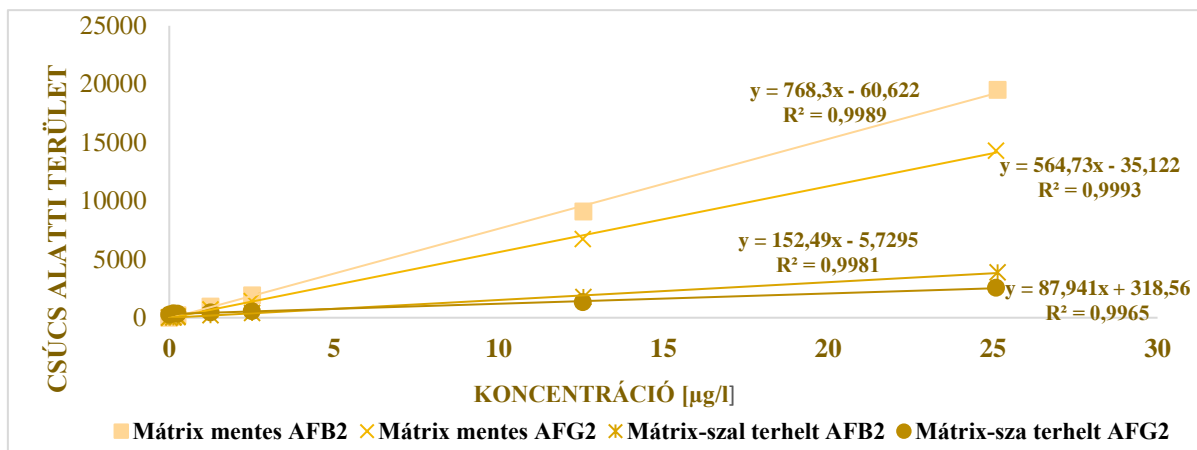
12. *Ábra* – Linearitás vizsgálata a mátrix mentes oldatsorozat segítségével az AFB1 és AFG1 tekintetében



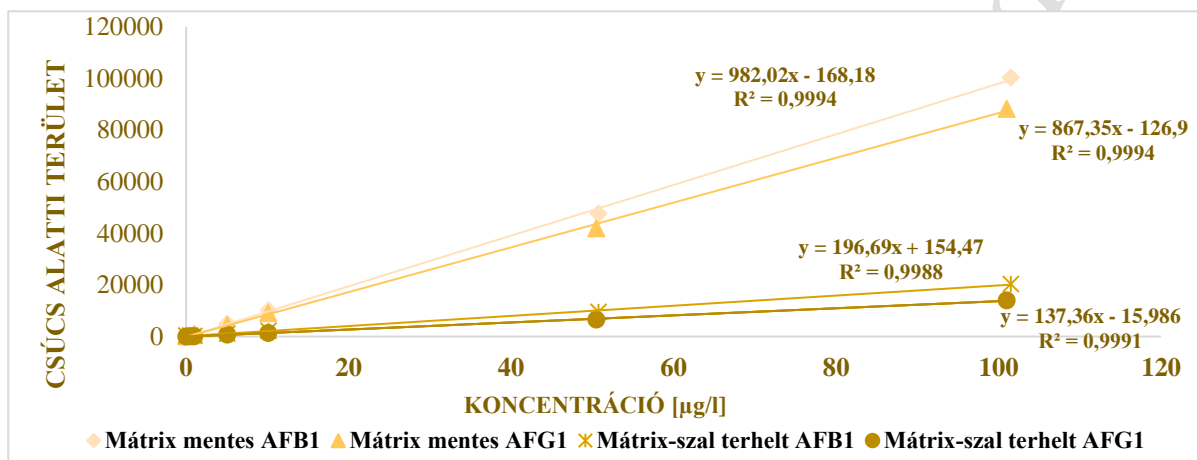
13. *Ábra* – Linearitás vizsgálata a mátrix mentes oldatsorozat segítségével az AFB2 és AFG2 tekintetében

A diagramokon látható, hogy a pontokra illeszthető egyenes két nagyságrenden keresztül lineáris. Minden esetben a determinációs együttható ( $R^2$ ) megfelel a követelményeknek vagyis  $R^2 > 0,99$ .

Az LC-MS mérés technika hatékonyságát befolyásolják a mintamátrix komponensek, ezért következő lépésként mátrix illesztett kalibrációt is készítettem. Ebben az esetben a növekvő koncentrációjú oldatsort a 4.4 fejezet, 7. táblázata szerint állítottam össze. Az így kapott oldatokat LC-MS vizsgálatnak vettem alá és az eredményeket az alábbi, 14. és 15. grafikonokon ábrázolom. Az összehasonlíthatóság érdekében, az előző 12. és 13. ábrán szereplő adatokat is feltüntettem ezeken az ábrákon, az utolsó, legtöményebb pont kivételével.  $R^2 > 0,99$ .



14. Ábra – Mátrixhatás vizsgálata az AFB1 és AFG1 tekintetében



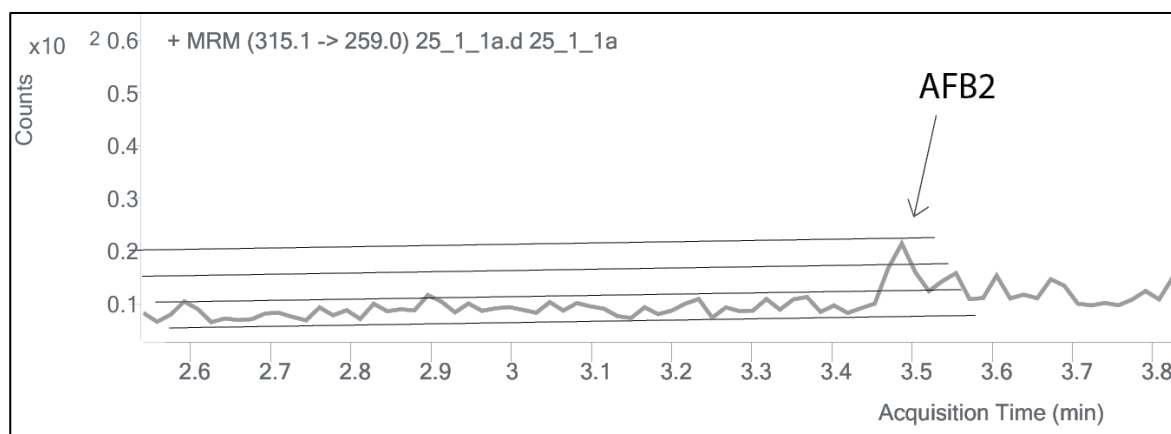
15. Ábra – Mátrixhatás vizsgálata az AFB2 és AFG2 tekintetében

Az analitikai mérőgörbe összehasonlítása során azt tapasztaltam, hogy az egyes komponensek jelét a rendszerben minden esetben mátrix hatás terheli, mely a „Mátrix-szal terhelt” és a „Mátrix mentes” egyenesek meredekségének különbségéből látható. Dagnac és munkatársai (2016) is nagymértékű mátrixhatásból eredő jelszupressziót tapasztaltak vizsgálataik során.

A fenti eredmények alapján a továbbiakban mátrix-illesztett kalibrációval dolgoztam tovább.

### 5.3.3 LOD, LOQ, mérési tartomány kijelölése

Ahogy a 3.5 fejezetben szerepelt, a kimutatási és meghatározási határok megállapításához a vizuális módszert alkalmaztam, mely során a „jel” adatokat a „zaj”-jal hasonlítottam össze. Példaként a 16. ábrán az AFB2 komponens MRM kromatogramján mutatom be az LOD kiértékelését.



16. Ábra – Vizuális LOD kiértékelés az AFB2 komponensnél

A csúcs előtti zajt háromszor mértem fel az AFB2 2,5 µg/l addíciós koncentráció csúcsára. A többi komponens a fenti AFB2-höz hasonlóan lett kiértékelve, valamint az LOQ esetén is így jártam el, annyi különbséggel, hogy a zaj tízszeresének megfelelő csúcsokat kerestem. A kiértékelés során kapott eredményeket a 11. táblázat tartalmazza.

11. Táblázat - Az LOD és LOQ értékek komponensek szerint

	AFB1		AFB2		AFG1		AFG2	
	µg/l	µg/kg	µg/l	µg/kg	µg/l	µg/kg	µg/l	µg/kg
<b>LOD</b>	0,10	0,25	0,10	0,30	0,10	0,25	0,25	0,60
<b>LOQ</b>	0,40	1,0	0,50	1,2	0,40	1,0	1,2	3,1

A 4. táblázatban szereplő hígítási lépések miatt a szilárd anyag koncentrációjának 40%-a a mintaoldat koncentrációja. A méréstartomány kijelölése során a felállított kalibráló egyenesből (7. táblázat) a LOQ alatti pontokat (1. 2. sorszámú) és az 5%-os elhajlást mutató legnagyobb (6.) pontot kihagytam az AFB2 és AFG2 esetén. Így a méréstartomány ebben az esetben 2-50 µg/l a mintaoldatra nézve és 5-125 µg/kg a mátrix-ra nézve. Az AFB1-re és AFG1-re pedig csak az utolsó, (6.) pontot hagytam ki így a méréstartomány ezen anyagok esetében 0,5-101 µg/l az oldatra, és 1,3-253 µg/kg a mátrix-ra nézve.

### 5.3.4 Visszanyerés vizsgálat és ismételhetőség

Mivel mátrixszal rendelkező hitelesített referencia anyag (CRM) nem állt rendelkezésemre, ezért pontosság vizsgálatot a 2002/657/EK Bizottsági Határozat alapján nem tudtam végezni. Ebben az esetben a Határozat értelmében a visszanyerést megerősített vak mátrixos kísérletekkel kell elvégezni. Ez alapján a 4.4 fejezetben leírtak szerint három koncentrációsinten kettő párhuzamos mintát addicionáltam. A határozat előírja, hogy a visszanyerés vizsgálatot az egészségügyi határértéken valamint alatta és felette 50-50%-kal kell elvégezni, ami az AFB1-re nézve kb. 2,5; 5,0 és 7,5 µg/kg koncentrációkat jelent. A visszanyerés vizsgálatra kapott adatokat az egyes komponensek esetében a 12. táblázat tartalmazza.

12. Táblázat – Az átlagos visszanyerések és a hozzá tartozó RSD%-ok (n=6)

AFB1		AFB2		AFG1		AFG2***	
µg/kg*	R%**	µg/kg*	R%**	µg/kg*	R%**	µg/kg*	R%**
2,5	130	0,6	66	2,5	153	0,6	-
5,1	144	1,3	116	5,1	175	1,3	-
7,6	144	1,9	113	7,6	173	1,9	-

\*Referencia addíciós koncentráció \*\* Visszanyerés% \*\*\* Meghatározási határ alatt

A kapott adatok alapján megállapíthatjuk, hogy csak az AFB2 komponens felel meg a 2002/657/EK Bizottsági Határozatban foglaltaknak mindhárom addíciós szinten. A Határozat szerint 1 > µg/kg koncentráció alatt 50-120% között kell lennie a visszanyerésnek, míg 1-10 µg/kg aflatoxin koncentráció közötti minták esetében 70-110% ez az érték. A mért adatok alapján ezzel a minta előkészítéssel és mérő módszerrel a többi komponens visszanyerése nem elégséges a mért koncentráció tartományban. Mivel az „afla-mix”-ben a komponensek nem egyenlő arányban voltak jelen, hanem a 4.1 fejezetben írtak szerint, a B1 és G1 komponensek négyszer töményebbek, mint a B2 és G2, ez a kiértékelés során is meglátszott. Ezekben a koncentrációsinten a MycoSpin technikával nem sikerült az összes komponensre vanília mátrixból megfelelő visszanyerési adatokat kapni.

Az ismételhetőséget azonos mintán, azonos berendezéssel, azonos laboratóriumban, azonos személyzet által, azonos körülmények között kell meghatározni. Az elvégzett vizsgálat eredményeit a 13. táblázat tartalmazza.



**13. Táblázat** – Az ismételhetőség mérésének adatai (n=6)

	AFB1			AFB2			AFG1			AFG2		
<i>Addíciós szint (µg/kg)</i>	2,5	5,1	7,6	0,6	1,3	1,9	2,5	5,1	7,6	0,6	1,3	1,9
<i>Átlag</i>	4,5	1,0	4,5	9,3	8,7	2,5	9,6	10,5	12,3	3,2	13,8	11,7
<i>Szórás</i>	0,37	0,14	0,41	0,89	0,88	0,07	0,58	0,47	0,91	0,31	0,99	0,39
<i>RSD%</i>	8,2	13,6	9,3	9,5	10,2	2,9	6,0	4,5	7,4	9,8	7,2	3,3

A kapott relatív szórás eredmények az első addíciós szinten 6,0-9,2%, a másodikon 4,5-13,6%, a harmadikon 2,9-9,3% között mozogtak. Az ismételhetőségi értékek nem tekinthetők kiugróan nagyoknak.

## 6. Összefoglalás

A fűszerekre leselkedő legnagyobb veszélyt a penészesedéssel összefüggésben álló mikotoxin szennyezés hordozza. Bár megszületett a RASSF riasztási rendszer, a lakosság kevésbé tudatos a mikotoxinok által okozott élelmiszerbiztonsági veszélyeket illetően. Emiatt kiemelkedően fontos a vásárlók tájékoztatása, jobban fel kellene arra hívni a figyelmet, hogy penészgombák anyagcsere termékei az egész termékbe eljutnak, a penészes lekvárról az esztétikai hibát eltávolítva, nem szabadulunk meg a veszélyes mikotoxinoktól és mutagén, karcinogén és teratogén hatásukat az emberi szervezetben kumulálódva csak később fejtik ki. A fűszernövények különleges képviselője a trópusi környezetben termő vanília. Termőterülete két dolog miatt is elősegíti a penészgombák elszaporodását. Egyrészt párás környezetben, terem és a földre kiterítve szárítják, másrészt hajóúton jut el Európába, mely során a nedves levegőnek ugyancsak ki van téve. A vaníliabab komplex összetételének köszönhetően, az őrleményből a mikotoxinokat kioldó oldószerben több további alkotó is extrahálódik, sötétbarna színű mátrixot alkotva, mely megnehezíti az analitikai vizsgálatot. Munkám során a mintatisztítási módszert igyekeztem tökéletesíteni, egyik célom az volt, hogy kiderítsem, tartalmaz-e a kereskedelmi forgalomban kapható vanília őrlemény az előírt egészségügyi határértéknél nagyobb mennyiségben mikotoxinokat. A vizsgálódás során meglepve tapasztaltam, hogy nem volt jelen aflatoxin kimutatható mennyiségben. Érdekes kutatási terület lehet a jövőre nézve, hogy mi okozza ezt. A természet komplex rendszerében elképzelhető a kép, hogy védelmi mechanizmusként a párás trópusi területen honos vanília a szaporításért felelős magját, a babot penészgátló, fungicid hatású anyaggal látja el védelemként.

A kifejlesztett mérőmódszer vanília őrlemény mátrixra lett validálva, de további kísérletekkel egyéb fűszerekhez és fűszernövényekhez is lehetne alkalmazni.

## 7. Irodalmi hivatkozások

**Alshannaq, A. és Yu, J-H.** (2021): *Analysis of E.U. Rapid Alert System (RASFF) Notifications for Aflatoxins in Exported U.S. Food and Feed Products for 2010–2019* DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13020090>.

**Andráskó D. Zs.** (2021): UHPLC-MS/MS módszer optimalizálása és mintaelőkészítési technikák összehasonlítása mikotoxinok meghatározására vanília mintából.

**Andráskó D., Varga E., Balázs V. B., Nagy K., Üveges M.** (2021) *Development and optimization of an UHPLC-MS/MS method for the determination of mycotoxins from vanilla spice samples* A Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly (LOV) Tudományos Ülésszak tanulmányai c. konferencia kiadvány, ISBN: 9789632699882

**Ataş, M., Yardimci, Y., Temizel, A.** (2011): *A new approach to aflatoxin detection in chili pepper by machine vision* DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2012.06.001>

**Benkovits B., Böhm Á., Kis G. D., Kiss D.** (2018): *Folyadék folyadék extrakciók - Biotermékek izolálása házifeladat* BME Vegyész-mérnöki és Biomérnöki Kar, [http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/bioelvalmuveletek/2018/Small%20projects/Folyad%C3%A9k-Folyad%C3%A9k%20extrakci%C3%B3k\\_j.pptx.pdf](http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/bioelvalmuveletek/2018/Small%20projects/Folyad%C3%A9k-Folyad%C3%A9k%20extrakci%C3%B3k_j.pptx.pdf)  
Elérés: 2022.09.26.

**Bezerra da Rocha, M. E., Freire, F. O., Maia F. E. F., Guedes, M. I. F., Rondina, D.** (2014): *Mycotoxins and their effects on human and animal health*. 159-165. old. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>.

**Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.-F., Besse, P.** (2007): *Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge* DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9260-3>

**Cerutti, P., Alzamora, S. M.** (1996): *Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées* DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00026-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00026-7)

**Dagnac, T., Latorre, A., Lorenzo, B. F., Llompарт, M.** (2016): Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1243806>

**Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P.** (2005) *Effect of pH on the Inhibition of Listeria spp. by Vanillin and Vanillic Acid* DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1472>

**De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I., De Saeger, S.** (2015): *Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans* Short review. 32-41. old. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.003>

**Evangelista, A. G., Bocate, K. C. P., Meca, G., Luciano, F. B.** (2021): Combination of allyl isothiocyanate and cinnamaldehyde against the growth of mycotoxigenic fungi and aflatoxin production in corn DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15760>

**Galbács G.** (2010): Műszaki analitikai kémia, Mintavétel, mintaelőkészítés diasor <http://www2.sci.u-szeged.hu/inorg/Muszaki%20analitikai%20kemia%202010%20-%20Bevezetes%20%28ea%201%29.pdf> Elérés: 2022. 09.26.

**Gong Y. Y., Watson, S., Routledge, M. N.** (2016) *Aflatoxin Exposure and Associated Human Health Effects, a Review of Epidemiological Studies* DOI: <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2015026>

**Haiyan, Z., Na, L., Zheng, Y., Dianzhen, Y., Lan, W., Kunbo, W., Xinlin, W., Aibo, W.** (2021): Development and validation of the one-step purification method coupled to LC-MS/MS for simultaneous determination of four aflatoxins in fermented tea DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129497>

**Hernández-Hierro, J. M., Gracia-Villanova, R. J., González-Martín, I.** (2008): Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.049>

**Ilisz I.** (2013): *Illusztrált segédanyag a modern műszeres analitikai kémia oktatásához*, jegyzet, 2. fejezet: Mintaelőkészítő módszerek, Szilárdfázisú mikroextrakció, Szegedi Tudományegyetem DOI: 10.15170/TTK.2015.00001

**Illueca, F., Vila-Donat, P., Calpe, J., Luz C., Meca G., Quiles M. J.** (2021): Antifungal Activity of Biocontrol Agents In Vitro and Potential Application to Reduce Mycotoxins (Aflatoxin B1 and Ochratoxin A) DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13110752>

**Internet 1.** *Vanília virág megtermékenyítése* kép [https://en.norohy.com/content/uploads/2021/01/Pollinisation\\_1-scaled.jpg](https://en.norohy.com/content/uploads/2021/01/Pollinisation_1-scaled.jpg) Elérés: 2022. 10. 23.

**Internet 2.** *Látogatás egy vaníliatermelőnél* online újságcikk - <https://ng.24.hu/termeszett/2015/12/16/latogat-as-egy-vaniliatermelonel/> Elérés: 2022. 08.16.

**Internet 3.** *2022-es madagaszkári vanília árak* cikk - <https://www.selinawamucii.com/insights/prices/madagascar/vanilla/> Elérés: 2022. 10. 26.

**Internet 4.** *Vaníliababok szárítása napon* kép <https://www.goldenatlas-exp.com/vanilla.html> Elérés: 2022. 09. 27.

**Internet 5.** *A myco- előtag jelentése*, Online etimológiai szótár [https://www.etymonline.com/search?q=myco&ref=searchbar\\_searchhint](https://www.etymonline.com/search?q=myco&ref=searchbar_searchhint) Elérés: 2022. 09. 26.

**Internet 6.** *A toxin szó jelentése*, Online etimológiai szótár [https://www.etymonline.com/search?q=toxin&ref=searchbar\\_searchhint](https://www.etymonline.com/search?q=toxin&ref=searchbar_searchhint) Elérés: 2022. 09. 26.

**Internet 7.** *Paprikabotrány* online újságcikk HVG Kiadó Zrt. (2004): <https://hvg.hu/evkronikaja/200452-53HVGFriss271>. Elérés: 2022. 09. 26.

**Internet 8.** *Mikotoxinok jelentősége az élelmiszerláncban* <https://portal.nebih.gov.hu/-/kerdezz-felelek-az-elelmiszerlancban-elofordulo-mikotoxinok-jelentosegerol>. Elérés: 2022. 09. 26.

**Internet 9.** *A mikotoxinok jelentősége az élelmiszeriparban* diasor, Kép (szerkesztve) <https://docplayer.hu/17245454-A-mikotoxinok-jelentosege-az-elelmiszergazdasagban.html> Elérés: 2022. 09. 26.

**Internet 10.** *„Alltech- mikotoxin összefoglaló kiadvány”* [https://www.alltech.com/sites/default/files/9710\\_Spot\\_Mycotoxins\\_Lead\\_Magnet\\_HUN\\_PROOF\\_4.pdf](https://www.alltech.com/sites/default/files/9710_Spot_Mycotoxins_Lead_Magnet_HUN_PROOF_4.pdf). Elérés 2021. december 7.

**Internet 11.** International Organisation of Spice Trade Associations (2013) *„General Guidelines For Good Agricultural Practices On Spices & Culinary Herbs”* <https://www.esa-spices.org/download/iosta-gap-final.pdf> Elérés: 2022. 10. 11.

**Internet 12.** *“1881/2006/EK rendelet - Az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról”*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=HU>. Elérés 2021. december 1.

**Internet 13.** *A Romers Lab honlapja* <https://www.romerlabs.com/> Elérés: 2022. 08. 16.

**Internet 14.** *“401/2006 EK rendelet - Az élelmiszerek mikotoxintartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapításáról”* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0401&from=N> L Elérés: 2022. 09. 27.

**Internet 15.** *“882/2004 EK rendelet - A takarmány- és élelmiszerjog, valamint az állategészségügyi és az állatok kíméletére vonatkozó szabályok követelményeinek történő*

megfelelés ellenőrzésének biztosítása céljából végrehajtott hatósági ellenőrzésekről”  
[https://asvanyvizek.hu/js/tinyMCE/plugins/filemanager/files/2012/882\\_2004\\_EK\\_rendelet.pdf](https://asvanyvizek.hu/js/tinyMCE/plugins/filemanager/files/2012/882_2004_EK_rendelet.pdf)  
Elérés: 2022. 09. 27.

**Internet 16.** “2002/657/EK határozat - a 96/23/EK tanácsi irányelvnek az analitikai módszerek elvégzése és az eredmények értelmezése tekintetében történő végrehajtásáról”  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=CELEX%3A02002D0657-20040110>  
Elérés: 2022. 09. 27.

**Internet 17.** MSZ EN 15662:2018 szabvány. Növényi eredetű élelmiszerek. Peszticid szermaradékok meghatározásának multimódszere acetonnitriles extrakciót/szétválasztást és diszperziós SPE-tisztítást követő GC- és LC-alapú vizsgálattal. Moduláris QuEChERS módszer.  
[http://www.mszt.hu/web/guest/webaruhaz?p\\_p\\_id=msztwebshop\\_WAR\\_MsztWAportlet&p\\_p\\_lifecycle=1&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column1&p\\_p\\_col\\_pos=1&p\\_p\\_col\\_count=2&msztwebshop\\_WAR\\_MsztWAportlet\\_ref=168415&msztwebshop\\_WAR\\_MsztWAportlet\\_javax.port](http://www.mszt.hu/web/guest/webaruhaz?p_p_id=msztwebshop_WAR_MsztWAportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&msztwebshop_WAR_MsztWAportlet_ref=168415&msztwebshop_WAR_MsztWAportlet_javax.port)

**Jin, W. Mujumdar, A. S., Zhang, M.** (2017): *Novel Drying Techniques for Spices and Herbs: a Review* DOI: <https://doi.org/10.1007/s12393-017-9165-7>

**Medina, J. D. L. C., Jiménez, R. C. G., García, H. S.** (2009): *Vanilla: Post-harvest Operations* Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 1-45. oldal

**Nász Sz.** (2008): *Gyulladáscsökkentők meghatározása felszíni vizekből LC-MS-MS módszerrel* TDK dolgozat ELTE, Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium Analitikai Kémiai Tanszék

**Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira J. A. M., Silva, C., Medina, S., Camara, J.S.** (2019): *QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends* DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>

**Pickova, D., Ostry, V., és Malir, F.** (2021): „*A Recent Overview of Producers and Important Dietary Sources of Aflatoxins*” DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13030186>.

**Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M., L.** (2014): *Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices commercialized in Italy* DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.013>.

Romero-Cortes, T.; Pérez España, V.H.; López Pérez, P.A.; Rodríguez-Jimenes, G.D.C.; Robles-Olvera, V.J.; Aparicio Burgos, J.E.; Cuervo-Parra, J.A. (2019): *Antifungal activity of vanilla juice and vanillin against Alternaria alternate.* DOI: <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1586776>

**Richard, J. L.** (2007) *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview*  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>

**Škrbić, B., Koprovica, S., Godula, M.** (2013): Validation of a method for determination of mycotoxins subjected to the EU regulations in spices: The UHPLC–HESI–MS/MS analysis of the crude extracts DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.004>

**Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P.S. et al.** (2021): *Food preservation techniques and nanotechnology for increased shelf life of fruits, vegetables, beverages and spices* DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01126-2>

**Tatár E., Záray Gy.** (2012): *Környezetminősítés* Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Typotex Kiadó, 19-20. oldal, ISBN 978-963-279-544-7

**Thanushree M.P., Sailendri, D., Yoha, K.S., Moses, J.A Anandharamakrishnan, C.** (2019): *Mycotoxin contamination in food: An exposition on spices* 69-80. oldal  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.010>

**Toma, F. M., Abdulla, N. Q. F.** (2013): Isolation and Identification of Fungi from Spices and Medicinal Plants DOI: <http://dx.doi.org/10.19026/rjees.5.5648>

**Tölgyesi Á. és Fekete J.** (2017): Folyadékkromatográfias hármas kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometriai módszerek gyakorlatban: példák élelmiszer- és bioanalitikai alkalmazásokra. Budapest : Gen-lab Kft. ISSN: 2415-9042.

**Varga E., Fodor P., Sörös Cs.** (2021): *Multi-mycotoxin LC-MS/MS method validation and its application to fifty-four wheat flours in Hungary*  
DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1862424>

**Varga J., Szigeti Gy., Baranyi N., Szekeres A., Kocsubé S.** (2014): *Mikotoxinok, mikotoxigén gombák, micetizmusok*, Szegedi Tudományegyetem, Jegyzet, 6. oldal

**Vass A.** (2017): *Peszticid analitikai eljárások fejlesztése* Doktori PhD értekezés Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék, Budapest

**Vial, J., Jardy, A.** (1999): *Experimental Comparison of the Different Approaches To Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method* DOI: <https://doi.org/10.1021/ac981179n>

**Wang R.-G., Su X.-O., Cheng F.-F., Wang P.-L., Zhang, W.** (2015): Determination of 26 Mycotoxins in Feedstuffs by Multifunctional Clean-up Column and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(15\)60807-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(15)60807-6)

**Xu P., Mekonen T., Mingsheng D.** (2021): *Isolation and identification of fungi found in contaminated fermented milk and antifungal activity of vanillin*  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.02.011>

**Záray Gy.** (2005): *Az elemanalitika korszerű módszerei*, Akadémiai Kiadó, Budapest, Első magyar nyelvű kiadás 255-260. oldal, ISBN 963 05 8243 0

**Zubay P., Nagy R.** (2020): *Szuperkritikus fluid extrakció*, Bio Membrane Technology Kft. <https://biomembrane.eu/szuperkritikus-fluid-extrakcio/> Elérés: 2022. 09. 26.

Balázs Viktória Bernadett



## 8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni konzulenseimnek, Dr. Üveges Márta egyetemi adjunktusnak és Nagy Katalin PhD hallgatónak, akik idejüket rám szánták és energiájukkal segítették a kísérletek összeállítását, elvégzését valamint a kapott eredmények szakszerű és precíz kiértékelését. Szakmaszeretettelükkel, lendületükkel példát mutattak munkám során.

Valamint hálás vagyok Firisz Zsuzsannának, aki a QuEChERS mintaelőkészítés gyakorlati, technikai lépéseiben látott el jó tanácsokkal.

Köszönettel tartozom az Élelmiszerkémia és –Analitika Tanszéknek, ahol korszerű technikai feltételeket biztosítottak dolgozatom elkészítéséhez.

Balázs Viktória Bernadett

## 9. Nyilatkozatok

### NYILATKOZAT

#### a szakdolgozat nyilvános hozzáféréseiről és eredetiségéről

A hallgató neve: Balázs Viktória Bernadett  
A Hallgató Neptun kódja: CTR35C  
A dolgozat címe: Különleges mintaelőkészítési technikák összehasonlítása vanília örlemény aflatoxin tartalmának meghatározására UHPLC-MS/MS módszerrel  
A megjelenés éve: 2022  
A tanszék neve: Élelmiszerkémia és -Analitika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

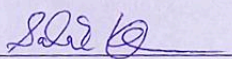
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: Budapest, 2022. 11. 02.

  
Balázs Viktória Bernadett

<sup>1</sup> A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

<sup>2</sup> A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

## KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Balázs Viktória Bernadett (Neptun-azonosító: CTR35C) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem\*<sup>2</sup>

Kelt: Budapest, 2022.10.28.



---

Nagy Katalin  
Belső konzulens

---

<sup>1</sup> A megfelelő aláhúzendó.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendó.

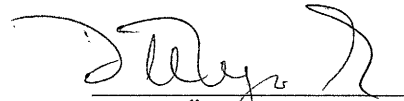
## KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Balázs Viktória Bernadett CTR35C konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem<sup>\*2</sup>

Kelt: Budapest, 2022. október 28.



dr. Üveges Márta  
Belső konzulens

---

<sup>1</sup> A megfelelő aláhúzendó.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendó.