

TÖLGYESI Ádám¹DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2022/1-1-HUN>

Érkezett: 2021. augusztus – Elfogadva: 2022. február

Egy LC-MS/MS alapú élelmiszer-vizsgálati módszer nemzetközi szabványosítása: egységesen elfogadott vizsgálati eljárás kidolgozása *Alternaria* toxinokra

Kulcsszavak: mikotoxin, izotóphigításos tömegspektrometria (LC-IDMS), szabványosítás, citrinin, validálás, HorRat-érték, Horwitz-Thompson egyenlet

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Az *Alternaria* toxinoknak több mint hetven fajtája létezik, de kutatók szerkezetileg eddig még csak párat azonosítottak közülük. Jelen közlemény célja egy majdnem tíz éves folyamat bemutatása, amelynek során nemzetközi szabványt dolgoztunk ki öt *Alternaria* toxin élelmiszermintákból történő szimultán vizsgálatára. Ez a hosszú folyamat magában foglalja a szabvány igényének a kialakulását, a szabványosítási pályázat kiírásán és elbírálása mellett a módszer kidolgozását, annak érvényesítését, valamint dokumentációját. A dolgozat főképp a vizsgálati módszer kialakítására és validálására összpontosít, amely a folyamat leghosszabb és legmunkaigényesebb része, de az összkép megértése végett az első és a végső lépések hangsúlyozása szintén szükséges. A szabvány kidolgozása felelősségteljes feladat mind a szabványt készítő, mind pedig a szabvány validálásában és annak dokumentációjában résztvevők részéről, a laboratóriumok megrendelői ugyanis a szabványos módszerek használatát várják el tőlük. Másfelől az egyedi, saját kidolgozású módszereket választó laboratóriumok a szabványmódszerrel történő összemérésük során bizonyosodhatnak meg eljárásuk pontosságáról és precizitásáról. A közel tíz éven keresztül zajló folyamatban az eredeti vizsgálati módszer több változtatáson is átesett; ezeknek a javításoknak a célja a minél egyszerűbb és reprodukálhatóbb eljárás volt. Így jutottunk el a származékképzésen át az izotóphigításos tömegspektrometria alkalmazásáig. Fontos hangsúlyozni, hogy a szabványosítás egyik célja az, hogy a jogszabályokban előírt élelmiszerszennyezők vizsgálatához egy megfelelő vizsgálati módszer álljon a hatósági laboratóriumok rendelkezésére, amely eljárás ugyan bármelyik laboratórium számára elérhető, viszont kérdéses, hogy a vizsgálat költsége fedezi-e annak alkalmazását. Ebből adódik, hogy nem feltétlenül a legköltséghatékonyabb vizsgálatot ajánlja a szabvány, ami a magán laboratóriumokban konfliktust okozhat a laboratórium szakmai és gazdasági irányítói között. Az *Alternaria* toxinokra kidolgozott folyadékromatográfiás izotóphigításos tömegspektrometriai (LC-IDMS) szabványmódszer végső formáját valószínűleg 2021 végén fogja jóváhagyni és közzéadni az Európai Szabványügyi Bizottság (CEN) (a szabvány a cikk beküldése óta megjelent: CEN EN 17521:2021 Foodstuffs - Determination of *Alternaria* toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS. A szerk.). A szabvány a tenuazonsav (TEA), altenuane (ALT), alternariol (AOH), tentoxin (TEN) és alternariol monometil éter (AME) meghatározását tartalmazza.

¹ Mertcontrol Kft.

2. Bevezetés

Világviszonylatban az Európai Unió (EU) belül a legszigorúbbak az élelmiszerekben jelenlévő természetes (például növényi toxinok) vagy mesterséges (például maradékanyagok) szennyezőkre vonatkozó jogszabályok, amelyek a szennyezők maximálisan megengedett értékeit, határértékeit állati és növényi eredetű élelmiszerekben vagy takarmányokban szabályozzák. Az EU 1881/2006-os rendelete tartalmazza a mezőgazdasági terményeken élő penészgombák másodlagos anyagcsere termékeiből élelmiszerekben megjelenő ún. mikotoxin- határértékeket [1]. A rendelet folyamatosan bővül: míg kezdetben csak olyan „klasszikus” toxinok szerepeltek benne, mint a deoxinivalenol (DON), az aflatoxinok (B1, G1, B2, G2, M1), a fumonizinek (B1 és B2) vagy a patulin, addig 2013-ra már a T-2, HT-2, 2016-ra pedig a citrinin is helyet kapott a szabályozott toxinok rendeletében. A komponenskör folyamatosan bővül; a folyamatot megelőzi egy az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) részéről megfogalmazott tudományos vélemény, valamint további hatástanulmányok. Ezek figyelembe veszik mind a termelők gazdasági szempontjait, mind a toxinok rövid- és hosszútávú egészségügyi kockázatait. Az *Alternaria* toxinokra egyelőre nincs szabályozás, a megengedett határértékek ALT, AOH és AME vonatkozásában 1 és 10 µg/kg között, a TEA és TEN esetén pedig 10 és 1000 µg/kg tartományban várhatók. Az érintett élelmiszerek a gabonák (elsődlegesen a búza), a paradicsom alapú élelmiszerek (paradicsomlé vagy -püré) valamint a napraforgómag és a hasonló alapanyagokból készült termékek [2].

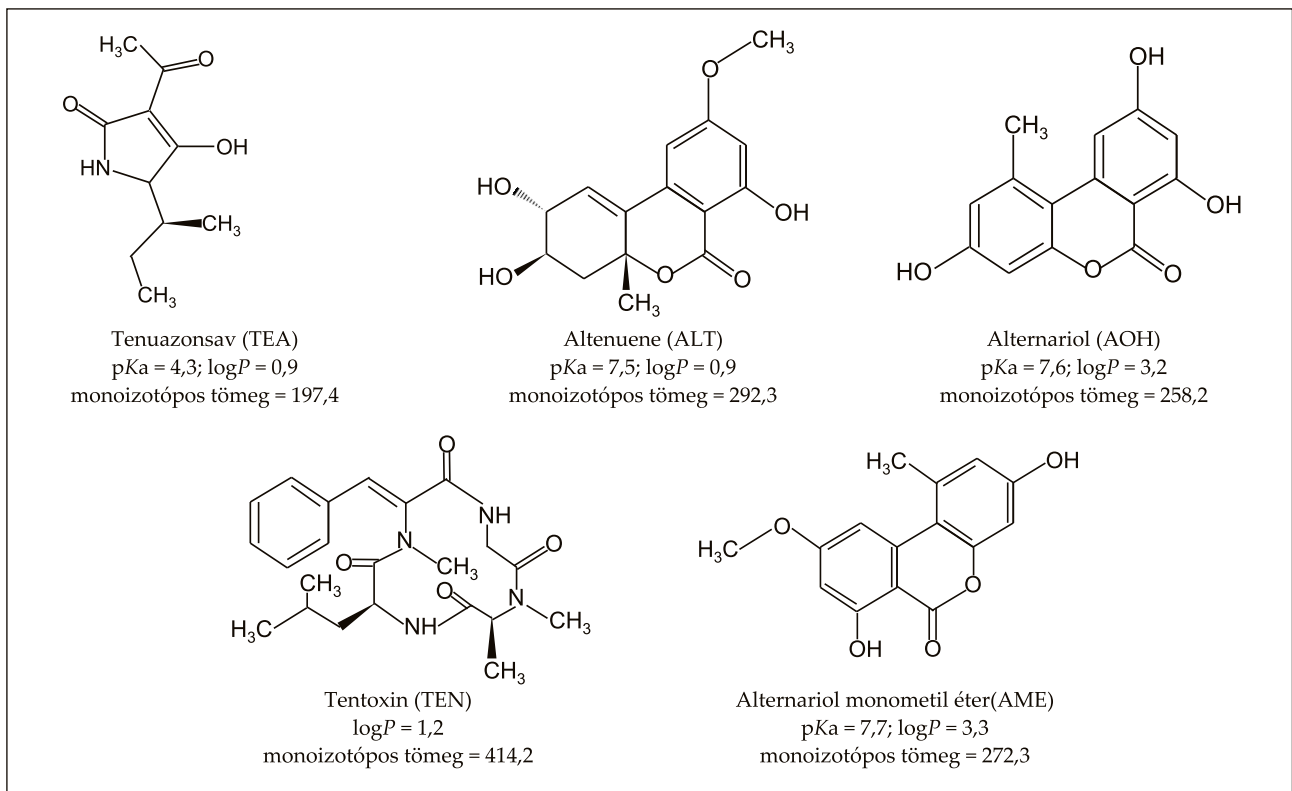
Az *Alternaria* toxinokra vonatkozó EFSA jelentés „*Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of Alternaria toxins in feed and food*” címmel 2011-ben jelent meg [2], és 97 oldalon keresztül taglalja jelenlétüket a különféle élelmiszerekben, humán és állati egészségre vonatkozó vizsgálatukat és lehetséges kockázatukat. A jelentés további célja felhívni a figyelmet a jövőbeli szabályozásokra és egységes vizsgálati módszer kialakítására. Ennek megfelelően a CEN 2013 tavaszán kiírt mikotoxin szabványosítási pályázatában pályázható szabványosítási eljárásként megjelent az *Alternaria* toxinok búzából, paradicsomból és napraforgó magból folyadékromatográfiás tandem tömegspektrometriai (LC-MS/MS) módszer segítségével történő vizsgálata.

3. Kezdeti (laboratóriumon belüli) vizsgálati módszer

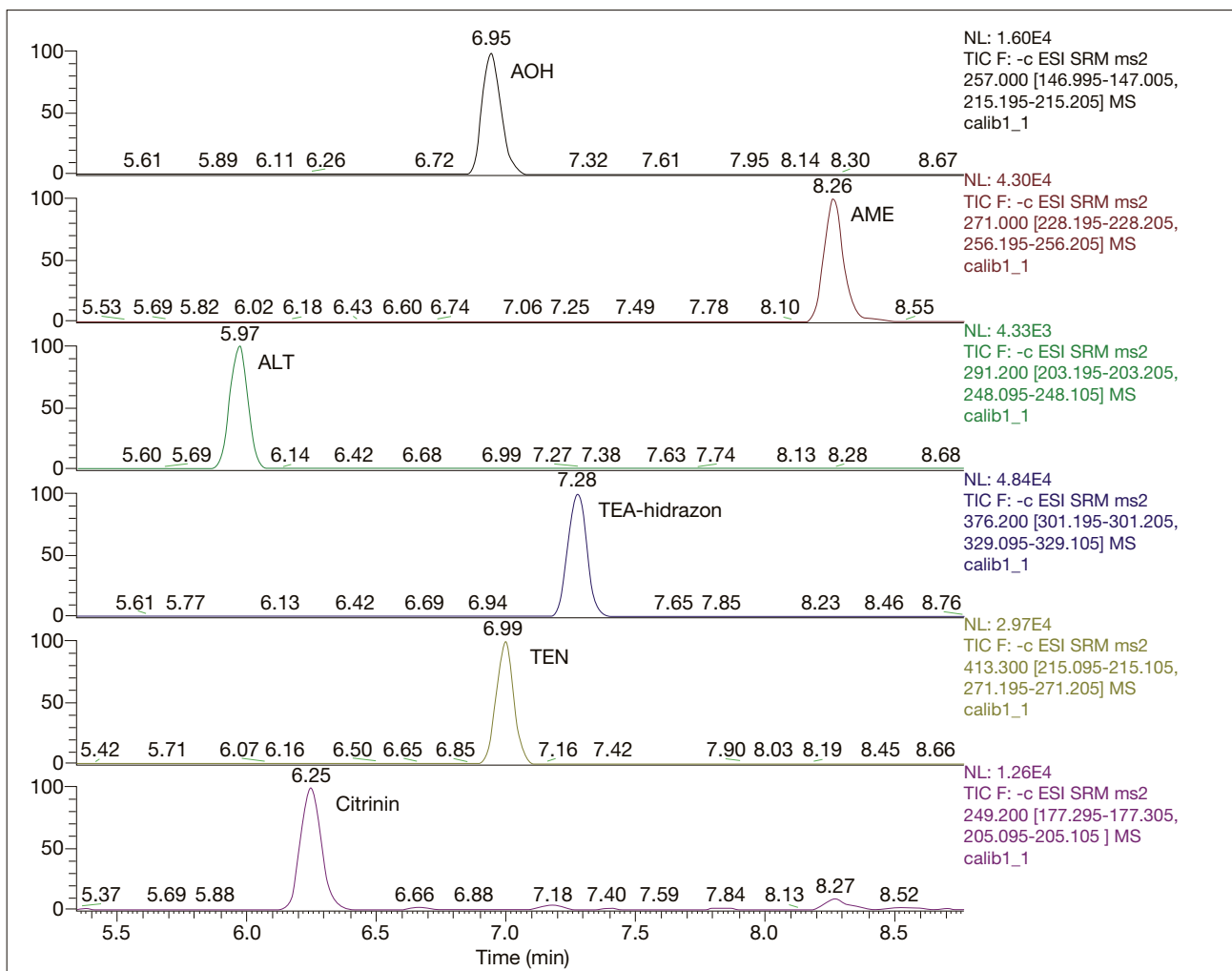
A pályázat alapkövetelménye szerint az aspiráns laboratóriumnak a ISO 17043 sz. szabvány szerinti érvényes akkreditált státusszal kell rendelkeznie, amely a jártassági vizsgálatok szervezésére vonatkozik, valamint egy jól definiált vizsgálati protokollt is jelent, amely teljesíti a laboratóriumon belüli (Single Laboratory Validation) validálásra vonatkozó analitikai teljesítményjellemzőket [3]. Ennek hiányában a laboratóriumnak olyan eljárással kell rendelkeznie, amelyet korábban laboratóriumok közti validálással érvényesítettek. Költségvonatkozása miatt az utóbbi a ritkább eset, viszont az ISO 17043 sz. szabvány követelményeihez képest sokkal hatékonyabban képes bizonyítani a módszer valódi reprodukálhatóságát, ezzel szemben az előbbi validálás csupán a vizsgálat laboratóriumon belüli reprodukálhatóságát (Intermediate Precision) mutatja.

Az European Commission Joint Research Centre (JRC, Geel, Belgium) az EU-n belül működő Közös Kutatóközpont, amely 2017-ig magában foglalta az EU Mikotoxin Referencia Laboratóriumát (EU-RL for Mycotoxins). 2013-ban EU-RL módszerként dolgoztak ki búza, paradicsomlé, valamint napraforgómag esetében egy LC-MS/MS módszert a következő öt, főbb *Alternaria* toxinra (1. ábra): tenuazonsav (TEA), altenuane (ALT), alternariol (AOH), tentoxin (TEN) és alternariol monometil éter (AME) [4]. Az öt toxin közül a TEA-nak van a többi toxintól a legnagyobb mértékben eltérő szerkezete és fizikai-kémiai sajátossága (kelátképző tulajdonság) [5]. Ennek megfelelően a korábbi irodalmak a TEA [5], vagy pedig a többi toxin meghatározására koncentráltak [6], szimultán vizsgálatukra mindenesetre kevesebb figyelem irányult. A mi célunk egy ötkomponenses szimultán vizsgálat volt, amelyet kémiai származékképzéssel valósítottunk meg. A TEA szerkezete aldehid funkciós csoportot tartalmaz, amely jól reagáltatható 2,4-dinitro-fenilhidrazinnal (DNPH), és az így kialakult TEA-hidrazon kromatográfiás szempontból fontos fizikai-kémiai jellemzői (például Log P, oktanol – víz-megoszlás) már sokkal közelebb vannak a többi *Alternaria* toxinéhoz [5]. Kelátképző tulajdonságát származékolt formában elveszíti. A DNPH csak a TEA-val reagál a célkomponensek közül (2. ábra), a többi meghatározását nem befolyásolja [7]. A módszerben kidolgozott extrakciós eljárást toxinokkal természetesen szennyezett rozsmintával végzett kísérleti tervvel alakítottuk ki. A módszerbe bevontuk az *Alternaria* toxinokon felül a citrinint is. Az így kialakított módszer fontosabb jellemzői az alábbiak [4], [7]:

- Hat komponens vizsgálata (TEA, ALT, AOH, TEN, AME és citrinin);
- Mátrixok: gabona, paradicsomlé, hántolt napraforgó mag;
- Minta tömege folyadékmintákra: 1,0 g;
- Extrakciós oldószer folyadékmintákra: 5 mL metanol;
- Minta tömege szilárd mintákra: 2,0 g;
- Extrakciós oldószer szilárd mintákra: 15 mL metanol-víz (70/30, v/v) elegy;



1. ábra. Alternaria toxinok szerkezete és fontosabb fizikai-kémiai tulajdonságuk



2. ábra. Alternaria toxinok (TEA származékolt formában) és a citrinin LC-MS/MS kromatogramjai

- Származékképző szer: 0,58% DNPH vizes sósavas oldata;
- Stop reagens: 5% (v/v) undekanal metanolban;
- Minta-tisztítás: polimer alapú szilárd fázisú extrakcióval (SPE);
- Minta bepárlás és visszaoldás metanolban;
- Fecskendőszűrés PTFE szűrőn;
- LC-MS/MS elválasztás: savas eluens, C-18-as állófázis és ESI negatív ionizáció (**1. táblázat**);
- Fecskendőszűrés hidrofil PTFE szűrőn;
- Kalibráció: mátrixhoz illesztett kalibráció izotópjelzett belső standard nélkül;

1. táblázat. *Alternaria* toxinok és a citrinin ionátmenetei ESI negatív ionizáció és kémiai származékképzés mellett.

Komponens	Anyaiion (m/z)	Leányionok (m/z)	Ütközési energia (V)
TEA-hidrazon	376	301	15
		329	15
ALT	291	248	20
		203	30
AOH	257	215	20
		147	20
TEN	413	271	15
		215	15
AME	271	256	20
		228	20
Citrinin	249	205	15
		177	20

2. táblázat. *Alternaria* toxinok eredményei jártassági vizsgálatban. A minták (paradicsomlé), illetve a standard oldat is származékképzés után került vizsgálatra.

Minta	Komponens	Detektált koncentrációk (µg/kg mintában és µg/L a standard oldatban)	Hozzárendelt értékek (µg/kg mintában és µg/L standard oldatban)	Z-érték	Értékelés
1	TEA	51,9	53,0	-0,1	Megfelelő
	ALT	<LOQ (25 µg/kg)	9,48	-	Megfelelő
	AOH	16,5	13,9	0,8	Megfelelő
	TEN	9,0	8,29	0,4	Megfelelő
	AME	11,3	11,0	0,1	Megfelelő
2	TEA	28,0	27,0	0,2	Megfelelő
	ALT	<LOD	-	-	Megfelelő
	AOH	6,30	6,58	-0,2	Megfelelő
	TEN	<LOD	-	-	Megfelelő
	AME	1,64	1,56	0,2	Megfelelő
3	TEA	38,4	39,1	-0,1	Megfelelő
	ALT	30,7	30,0	0,1	Megfelelő
	AOH	37,5	36,3	0,1	Megfelelő
	TEN	31,8	27,4	0,7	Megfelelő
	AME	38,8	37,3	0,2	Megfelelő
Standard oldat	TEA	7,90	11,0	-1,3	Megfelelő
	ALT	7,48	8,73	-0,6	Megfelelő
	AOH	8,46	10,2	-0,8	Megfelelő
	TEN	10,9	10,7	0,1	Megfelelő
	AME	11,8	11,4	0,1	Megfelelő

A módszer laboratóriumon belüli validálásán túl részt vettünk egy nemzetközi jártassági vizsgálatban is, amelyet a Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin, Németország), mint Nemzeti Referencia Laboratórium (NRL) szervezett az öt *Alternaria* toxin paradicsomléből történő meghatározására. A vizsgálat során három mintából és egy standard oldatból kellett az öt toxint vizsgálni [7]. Az eredményeinket a **2. táblázat** tartalmazza. Minden közölt érték elfogadható volt, a Z-score értékek -2 és +2 között alakultak. Az eredmények azt mutatták, hogy a pályázatban részünkről ajánlott módszer megfelelőnek bizonyul az *Alternaria* toxinok szabványosítására.

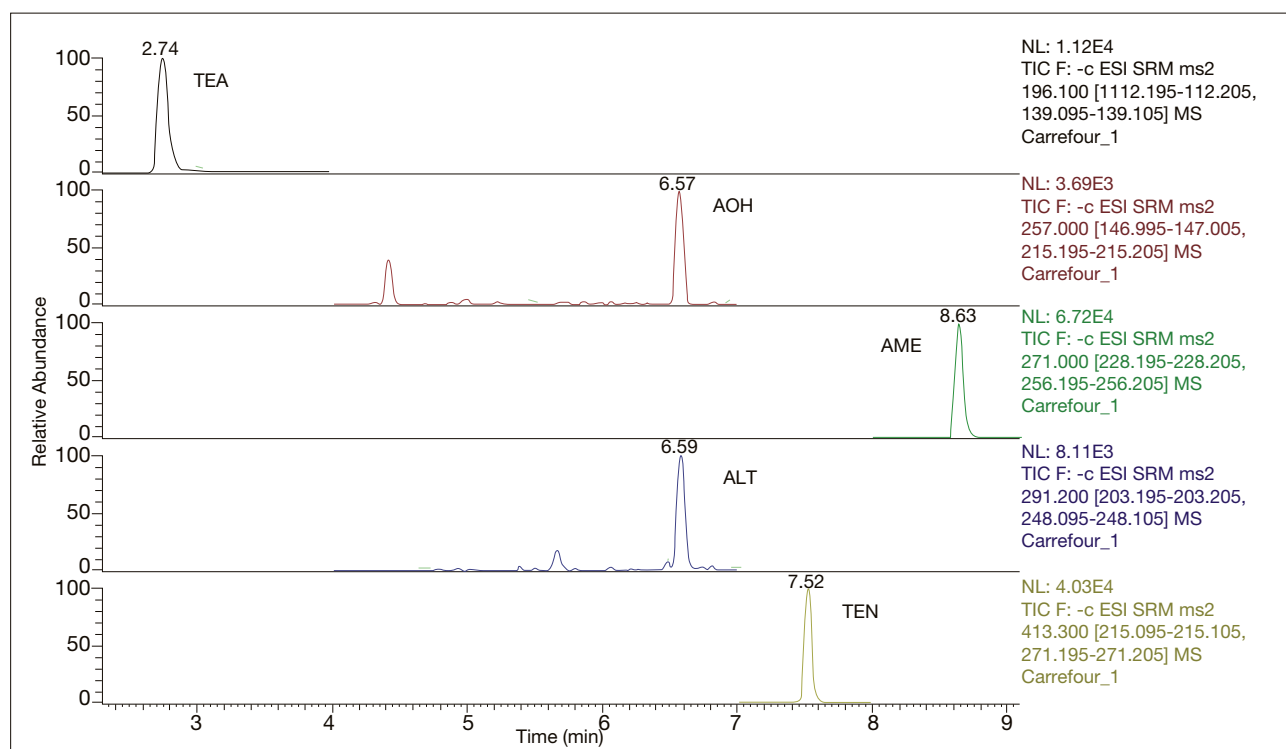
4. A módosított vizsgálati módszer

A JRC által javasolt vizsgálati módszert elfogadta a CEN és a mandátumot (mandate M/520) a JRC-nek adta 2014-ben. A munkacsoport (TC 275 WG 5 „Horizontal Methods for Food – Biotoxins”) azonban a módszerben szereplő kémiai származékképzést azzal az indokkal nem támogatta, hogy az egy további és időigényes lépés a módszerben, csökkentheti a precizitását, ezért javasolt elkerülni. A citrinin meghatározása sem kerülhetett a módszerbe, csak *Alternaria* toxinokat tartalmazhatott a vizsgálat.

A TEA vizsgálható natív formában is, de ehhez a HPLC elválasztást lúgos kémhatású eluenssel kell végezni, ami olyan állófázist igényel, ami pH 9-ig stabil. A módszer valóban egyszerűbbé vált származékképzés nélkül (**3. ábra**), de ehhez lényegesen módosítani kellett az eljárást úgy, hogy a mérési eredmények pontossága ne csökkenjen. A származékképzés hátránya az időigényességen túl a zajsztint emelkedése is volt, ugyanis a DNPH-ből sok mátrixalkotó vegyület származik, amelyek ko-eluálódhatnak a célkomponensekkel, és növelik a zajt az MS/MS készülékben. A módosított módszerben lényegében a HPLC-s elválasztást kellett optimalálni, illetve olyan extrakciós közeget választani, amellyel minden mátrixból a lehető legjobb kinyerést lehet elérni.

Az így kialakított módszer fontosabb jellemzői [8]:

- Öt komponens vizsgálata (TEA, ALT, AOH, TEN és AME);
- Mátrixok: gabona, paradicsomlé, napraforgómag;
- Minta tömege folyadékmintákra: 2,0 g;
- Extrakciós oldószer: 15 mL metanol/víz/ecetsav (80/19/1, v/v/v);
- Minta-tisztítás: polimer alapú szilárd fázisú extrakcióval (SPE);
- Minta bepárlás és visszaoldás 100 µL dimetil-szulfoxidban és hígítás 900 µL vízzel;
- Fecskendőszűrés hidrophil PTFE szűrőn;
- LC-MS/MS elválasztás: lúgos pH-jú eluens (pH 8,7), C-18-as állófázis és ESI negatív ionizáció (**3. táblázat**);
- Kalibráció: mátrixhoz illesztett kalibráció izotópjelzett belső standard nélkül;



3. ábra. *Alternaria* toxinok LC-MS/MS kromatogramjai (10 µg/kg) lúgos kémhatású eluenssel, származékképzés nélkül

Ezt a módosított módszert a munkacsoport elfogadta és laboratóriumon belüli validálása után 2015 tavaszán megkezdődhetett a vizsgálati módszer laboratóriumok közötti validálása is.

3. táblázat. *Alternaria* toxinok ionátmenetei ESI negatív ionizációval származékképzés nélkül.

Komponens	Anyaiion (m/z)	Leányionok (m/z)	Ütközési energia (V)
TEA	196	139 112	15 20
ALT	291	248 203	20 30
AOH	257	215 147	20 20
TEN	413	271 215	15 15
AME	271	256 228	20 20

5. A módszer laboratóriumok közötti validálása

A szabványosítási folyamat legfontosabb része a módszer laboratóriumok közötti validálása, amelynek fő célja a vizsgálat reprodukálhatóságának ellenőrzése és értékelése. Ehhez természetesen szennyezett (alacsony, közepes és magas szintű) és adalékolt mintákban kell meghatározni a toxinok koncentrációit. Egy adott komponens adott mintában lévő koncentrációjának értékeléséhez minimum nyolc független érték szükséges, ugyanakkor csak két laboratórium eredménye zárható ki [9]. Célszerű legalább tizenöt laboratórium részvétele, hogy minden mintához és komponenshez a megfelelő számú eredmény álljon rendelkezésre. A tapasztalat alapján ugyanis a résztvevők közül kb. 2-3 laboratórium nem közöl eredményt, míg egyes mintákhoz és azon belül komponensekhez nem mindig születik megfelelő számú közölt eredmény. Főképp az alacsony koncentrációs szinteken fordulhat ez elő, mert nem minden résztvevő rendelkezik megfelelő érzékenységű készülékkel.

Amennyiben a validálás során régóta vizsgált komponensek (például DON vagy aflatoxinok) meghatározása a cél, úgy viszonylag egyszerű rutinos laboratóriumokat felkérni a validálásra korábbi körvizsgálatokban történő sikeres szereplésük alapján. Ugyanakkor az *Alternaria* toxinokat a mai napig is nagyon kevés laboratórium vizsgálja, így a validálásra jelentkező laboratóriumok előzetes rutinnal nem mindig rendelkeznek. Ezért szükségessé válik egy ún. elővalidálás (pre-trial) megszervezése, amelyben a validálásban résztvevő laboratóriumok előzetesen elsajátíthatják a módszert. Esetünkben az elővalidálás huszonöt laboratórium részvételével, paradicsomlé mintákat vizsgálva zajlott [8], a résztvevő laboratóriumok közül pedig mindössze három rendelkezett előzetes *Alternaria* LC-MS/MS vizsgálati ismeretekkel. A huszonöt laboratóriumból végül csak tizenhat vett részt a végső validálásban, mert vagy nem küldtek vissza eredményt, vagy az eredményeik szignifikánsan eltértek a konszenzusos átlagtól.

A végső validálás során a tizenhat laboratórium számára az alábbi mintákat küldtük el [8]:

- *Alternaria* toxinokkal természetesen szennyezett gabona: búza, tritikálé és cirok;
- *Alternaria* toxinokkal természetesen szennyezett paradicsomlé: 3 sarzs;
- *Alternaria* toxinokkal természetesen szennyezett napraforgómag: 2 sarzs hántolatlan és 1 magkeverék, ami hántolt és hántolatlan minták keveréke volt;
- Minden mintát két kód (blind replicates) alatt kaptak meg a résztvevők, hogy a laboratóriumon belüli ismételhetőséget is tudjuk értékelni, illetve a reprodukálhatóság vizsgálatához több adat álljon rendelkezésre;
- Az adalékolt minták készítéséhez külön tesztmintákat küldtünk mátrixonként, amelyekhez *Alternaria* toxinokat ismeretlen koncentrációban tartalmazó standard oldatkeveréket is biztosítottunk a résztvevő laboratóriumok számára. Az adalékolt mintákat a laboratóriumok készítették az „adalékolási útmutató” alapján;
- Mátrixonként vakmintákat a mátrixhoz illesztett kalibrációhoz;
- Napraforgómag esetén a vakminta hántolt napraforgó volt, mert a hántolatlan minták magas TEA tartalmúak, így kalibrációra nem alkalmasak;
- A célkomponensek analitikai standardjait, illetve azok standard oldatkeverékét is biztosítottuk, hogy minden laboratórium azonos kalibráló oldatot használjon, ebből eltérés ne adódhasson;

- A minták homogenitását a harmonizált protokoll szerint ellenőriztük az elküldést megelőzően [10];
- A mintaküldéssel egy időben megkezdődött a minták stabilitásvizsgálata különböző hőmérsékleteken és időtartamban;

A CEN által elvárt koncentrációs szintek a validálásban: 1-10 µg/kg ALT, AOH és AME esetén, 10-1000 µg/kg pedig TEA és TEN esetén. A visszanyerést az adalékolt mintákban mért koncentrációkból értékeltük, az adalékolási szintek 2 és 8 µg/kg ALT, AOH és AME esetén, míg 50 és 200 µg/kg TEA és TEN esetén. Ezek a szintek ismeretlenek voltak a résztvevők számára.

A beérkezett eredmények (visszanyeréssel nem korrigált koncentrációk) statisztikai értékelése főképp a reprodukálhatóságot célozta meg [9]. A módszer reprodukálhatóságát jól jellemzi az ún. HorRat érték. A HorRat érték az adott célkomponens adott mintára számolt reprodukálhatóságának és a szervezők által elvárt célreprodukálhatóságnak a hányadosa. Ez utóbbi reprodukálhatósági érték (a „célreprodukálhatóság”) a Horwitz-Thompson egyenletből számolható: 120 µg/kg alatt egységesen 22%, míg felette a klasszikus Horwitz-összefüggés alkalmazható [11]. A HorRat értéknek a validálási kritériumok alapján kettőnél kisebbnek kell lennie; ez a feltétel teljesült is, kivéve a TEA esetében, a héjas napraforgó mintáknál. A **4. táblázat** a TEA-ra számolt HorRat értékeket mutatja különböző napraforgó minták esetén. Míg héjas napraforgóknál a számolt HorRat értékek a koncentrációtól függetlenül egységesen 2,4-nek adódtak [8], addig a hántolt mintákra – amelyek jóval kisebb koncentrációban tartalmazták a TEA-t –, kettő alatti értéket vettek fel. A héjas minták elemzése során tapasztalt alacsonyabb reprodukálhatóság a kalibrációval és a mátrixhatással magyarázható, amely az LC-MS/MS alapú mérések sajátossága, és döntően a módszer precizitását és pontosságát befolyásolja [11]. A validálás során hántolt napraforgó mintát biztosítottunk a kalibrációhoz, mert az kismértékű természetes eredetű TEA szennyezést tartalmazott, szemben a héjassal, amely magas koncentrációban volt szennyezve TEA-val. A héjas és a hántolt napraforgó minták extraktumai lényegesen eltérő mátrixot tartalmaznak, amelyet akár színük alapján is észre lehet venni. Ebből adódóan a hántolt mintából készült kalibráció a héjas napraforgó mintákban lévő mátrixhatást nem tudta kompenzálni, így a detektált koncentrációkat a mátrixhatás lényegesen befolyásolta. Ennek oka, hogy a héjas napraforgó endogén alkotói eltérnek a hántoltétól.

4. táblázat. TEA-ra számolt HorRat értékek napraforgóminták esetén mátrixhoz illesztett kalibrációval

	Héjas	Héjas	Héjas	Hántolt	Hántolt
Koncentráció (µg/kg)	804	1102	452	53,0	153
Ismételhetőség (RSD%)	18,8	14,9	15,3	10,4	11,6
Reprodukálhatóság (RSD%)	39,5	38,3	43,7	35,7	25,0
Célreprodukálhatóság (RSD%)	16,5	15,8	18,0	22,0	21,2
HorRat	2,4	2,4	2,4	1,2	1,6

Fontos megjegyezni, hogy a laboratóriumok csak a detektált koncentrációkat közölték; a mért értékeket nem korrigálták visszanyeréssel, szemben a hagyományos körvizsgálatoknál megszokott eljárásrenddel. A különböző laboratóriumok más és más készülékeket használtak, amelyekben eltérő lehetett a héjas napraforgók vizsgálata során jelentkező mátrixhatás. Mivel a hántolt mintából felvett kalibráció a mátrixhatást nem kompenzálta megfelelően, így a résztvevők által mért értékek között nagy különbségek adódtak. Ugyanez a probléma hántolt napraforgók elemzésénél nem jelentkezett, mert a kalibrációban és a tesztmintában hasonló mértékű mátrixhatás jelentkezhetett a minták azonossága miatt. Érdeemes megfigyelni, hogy az ismételhetőség a héjas mintáknál is elfogadható volt (<20%). Ennek oka, hogy ugyanazon minta ismételt elemzésénél ugyanabban a készülékben azonos mátrixhatás jelentkezik, így a laboratóriumok a párhuzamos minták esetén hasonló koncentrációt detektáltak laboratóriumon belül, míg a laboratóriumok közötti értékek eltérők lettek a különböző készülékekben jelentkező eltérő mátrixhatások miatt.

6. A végső módszer izotóphígítással, és a laboratóriumok közötti validálása

Mivel nem minden komponensnél és mintánál sikerült a validálás során a HorRat értéket kettes érték alá vinni, így szükségessé vált a módszer további fejlesztése. Az LC-MS/MS módszerek reprodukálhatósága nagymértékben növelhető izotóphígítással (Isotope Dilution Mass Spectroscopy – IDMS), ami jól kompenzálja a mintáról mintára változó mátrixhatást. Ez esetben a célvegyület stabil izotópjelzett analógiát mint belső standardot (Internal Standard – ISTD) adjuk a mintához. A belső standard fizikai-kémiai tulajdonságai megegyeznek a célkomponens tulajdonságaival (kis polaritásbeli különbség deuterált standardoknál előfordulhat), így a célvegyület és annak izotópjelzett vegyülete ideális esetben azonos retenció időben eluálódik.

A ko-elúció következtében a célkomponenst és annak belső standardját ugyanolyan irányú és mértékű mátrixhatás éri az ionforrásban, így a célvegyület és az ISTD válaszelőjelek (területének) aránya, az izotóp arány (Isotope Ratio – IR) független lesz a mátrixhatástól. Az ISTD nem okoz interferenciát a célkomponens jelenlétében, mert más, a célkomponens m/z értékétől függően kellően távoli (célszerűen legalább +3 Da) m/z értéken detektálható az izotópjelzés következtében.

Ehhez izotópjelölt ISTD-k szükségesek, amelyek 2015-ben még nem voltak elérhetők, ezért első körben mátrixhoz illesztett kalibrációt alkalmaztunk. 2018-ban azonban megjelentek a kereskedelmi forgalomban az *Alternaria* stabil izotópjelölt (¹³C vagy deutérium jelzett) ISTD-k (TEA-¹³C₂, ALT-d₆, AOH-d₃, TEN-d₃ és AME-d₃), így lehetőség nyílt a módszer IDMS technikával történő újra validálására.

A JRC 2018 után az izotópjelölt ISTD-vel kiegészített módszer segítségével megismételte a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti validálást (**5. táblázat**). A koncepció azonos volt az első és a második validálás során is annyi változással, hogy a második eljárás során csak búzaminták szerepeltek a gabonaalapú minták között, illetve a paradicsomalapú minták paradicsompürék voltak. TEA esetén a HorRat értékek 0,40 és 0,66 között alakultak IDMS detektálással héjas mintákban, míg a hántolt mintában 0,53 lett az érték, ami lényegesen jobb, mint az ISTD nélküli értékek (**4. táblázat**). Az előzetes várakozásoknak megfelelően az izotóphígítás a laboratóriumok közötti reprodukálhatóságot nagymértékben javította. A validálás során az elvárt precizitást csak ISTD-vel lehetett elérni, ami az LC-MS mennyiségi vizsgálatok során gyakran előfordul. Ennek oka mindig a mátrixhatás kompenzációja.

5. táblázat. *Alternaria* toxinok és az izotópjelölt ISTD-k ionátmenetei ESI negatív ionizációval.

Komponens	Anyaiion (m/z)	Leányionok (m/z)	Ütközési energia (V)
TEA	196	139 112	-27 -30
TEA- ¹³ C ₂	198	141	-27
ALT	291	214 186	-29 -35
ALT-d ₆	296	189	-35
AOH	257	215 212	-35 -35
AOH-d ₃	260	218	-35
TEN	413	141 271	-25 -22
TEN-d ₃	416	274	-22
AME	271	256 228	-27 -36
AME-d ₃	274	259	-36

7. Dokumentáció

A validálás teljes dokumentációja 2020-ra készült el [12], a szabványtervezettel együtt. A draft szabvány bírálata és javítása hamarosan befejeződik, és várhatóan a 2021. év végén a CEN elfogadja a javasolt szabványt (a szabvány a cikk beküldése óta megjelent: CEN EN 17521:2021 Foodstuffs - Determination of *Alternaria* toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS. A szerk.)

8. Eltérés a szabványmódszertől

Az egyes műszerforgalmazók LC-MS/MS készülékei érzékenység tekintetében jelentős eltéréseket mutathatnak. Ennek egyik fő oka az ionforrásban rejlik [11]. Míg a szabványban ESI (Electrospray Ion Source) ionforrás alkalmazása szerepel, addig a szakirodalomban alig lehet találni olyan applikációt, ahol a készülék ESI ionforrása elegendő hatékonyságot biztosított volna a kívánt kimutatás eléréséhez, így az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation – APCI) alkalmazása vált szükségessé [13]. Egy másik eshetőség, az, amikor a használt készülék olyan nagy érzékenységű, hogy nincs szükség szilárd fázisú tisztításra, dúsításra (Solid Phase Extraction – SPE), hanem a minta extraktumát közvetlenül injektálhatjuk a készülékbe („dilute-and-shoot”) [11], [14]. A szabvány lényege, hogy a benne leírt módszert minden laboratórium tudja azt alkalmazni, így elkerülhetetlen volt az SPE dúsítás alkalmazása az alacsony koncentrációs szint, illetve a hántolatlan napraforgómag minta komplexitása miatt. Amennyiben az első validálás sikeres, úgy valószínűleg mátrixhoz illesztett kalibrációt javasolna a szabvány.

Ugyanakkor az ISTD-k megjelenésével a későbbiek során a laboratóriumok egy csoportja inkább az IDMS használatát preferálná. Ebből a szempontból szerencsés, hogy a szabványban bevezették az IDMS-t, amely egyszerűbb és pontosabb, viszont az ISTD-k beszerzése költségesebb. ISTD hiányában standard addíciót (mint mennyiségi értékelést), is lehet alkalmazni a mátrixhatás megfelelő kompenzációjára, ez viszont időigényes, mert minden mintát minimum négyszer-öttször elő kell készíteni. Mégis vannak laboratóriumok, amelyek ezt a típusú értékelést alkalmazzák.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Carlos Gonçalves-nek a szabványosítási projekt eredményes befejezéséért.

10. Referenciák

- [1] A Bizottság 1881/2006/EK rendelete (2006. december 19.) az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeinek meghatározásáról. Az Európai Unió Hivatalos Lapja, L 364/5. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=HU> (Hozzáférés: 2021.04.12)
- [2] EFSA, European Food Safety Authority, (2011): Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed, EFSA J. 10 p. 1-82. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2605>
- [3] CEN/TR 16059, Food analysis. Performance criteria for single laboratory validated methods of analysis for the determination of mycotoxins.
- [4] Tölgyesi, Á., Stroka, J. (2014): Report on the development of a method for the determination of *Alternaria* toxins and citrinin in wheat, tomato juice and sunflower seeds by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. JRC Technical report <https://op.europa.eu/hu/publication-detail/-/publication/8120d128-d19d-4dfb-bc3b-d3c290eff59a/language-en> (Hozzáférés: 2021.02.24)
- [5] Asam, S., Liu, Y., Konitzer, K., Rychlik, M. (2011): Development of a stable isotope dilution assay for tenuazonic acid, J. Agr. Food Chem. 59 p. 2980–2987. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf104270e>
- [6] Lau, BP-Y, Scott, P.M., Lewis, D.A., Kanhere, S.R., Cleroux, C., Roscoe, V.A. (2003): Liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. J Chromatogr A. 998 p. 119–131. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00606-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00606-X)
- [7] Tölgyesi, Á., Stroka, J., Tamosiunas, V., Zwickel, T. (2015): Simultaneous analysis of *Alternaria* toxins and citrinin in tomato: an optimised method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Food Addit. Contam. 32 p.1512–1522. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00606-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00606-X)
- [8] Tölgyesi, Á., Stroka, J. (2016): Collaborative study report: Determination of *Alternaria* toxins in cereals, tomato juice and sunflower seeds by liquid chromatography tandem mass spectrometry, JRC Technical Report, <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/collaborative-study-report-determination-alternaria-toxins-cereals-tomato-juice-and-sunflower-seeds> (Hozzáférés: 2021.03.14)
- [9] Practical guide to ISO 5725-2:1994 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, Switzerland.
- [10] Thompson, M., Ellison, S.L.R., and Wood, R. (2006): The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. Pure Appl. Chem. 78(1):145–196.
- [11] Tölgyesi, Á. (2021): Gyakorlati példák a folyadékkromatográfiával kapcsolt hármas kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometria élelmiszer-, bio- és textilanalitikai alkalmazására, Kromatográfus különszám, Gen-lab Kft., Budapest, Magyarország https://www.gen-lab.hu/kromatografus_21 (Hozzáférés: 2021.02.07)
- [12] Gonçalves, C., Tölgyesi, Á., Bouten, K., Robouch, P., Emons, H., Stroka, J. (2021): Determination of *Alternaria* toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE and LC-MS/MS – a method validation through a collaborative trial, J. AOAC Inter. 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab094>
- [13] Tölgyesi, Á., Kozma, L., Sharma, V.K. (2020): Determination of *Alternaria* toxins in sunflower oil by liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry, Molecules 25, 1685. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25071685>
- [14] Tölgyesi, Á., Farkas, F., Bálint, M., McDonald, T.J., Sharma, V.K (2021): A dilute and shoot strategy for determining *Alternaria* toxins in tomato-based samples and in different flours using LC-IDMS separation, Molecules 26, 1017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26041017>