

Niko Minkkinen

# Mykotoksiinien LC-MS/MS-moniyhdistemene- netelmän kehitys: LC- ja MS-parametrien optimointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

17.11.2018

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Niko Minkkinen Mykotoksiinien LC-MS/MS-moniyhdistemenetelmän kehitys: LC- ja MS-parametrien optimointi 44 sivua + 2 liitettä 17.11.2018</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalytikko (AMK)</p>
<p>Tutkinto-ohjelma</p>	<p>Laboratorioanalytiikka</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Tullikemisti Meri Kokkonen Yliopettaja Jukka Niiranen</p>
<p>Opinnäytetyö toteutettiin Tullilaboratorion elintarvikkeiden biologisten tutkimusten jaostossa, jonka velvollisuuksiin kuuluu muun muassa erilaisten mykotoksiinien testaus ja valvonta Suomeen tuotavista ei-eläinperäisistä elintarvikkeista.</p> <p>Työn tavoitteena oli aloittaa Euroopan standardointikomitean tekemän mykotoksiinien moniyhdistemenetelmän luonnokseen perustuvan menetelmän kehitys optimoimalla siinä käytettävän UPLC-MS/MS-laitteiston nestekromatografiset ja massaspektrometriset asetukset niin käyttövalmiiksi kuin mahdollista ilman varsinaista validointia tai esikäsitellyn testausta sekä kehitystä. Työn aiheena ollut menetelmä sisälsi yhteensä 50 erilaista mykotoksiinia ja johdannaisyhdistettä, joiden havainnoinnin yhdistäminen yhdeksi menetelmäksi mahdollistaisi Tullilaboratorion valvovan mykotoksiineja nopeammin ja laajemmin verrattuna käytössä oleviin lukuisiin erilaisiin, yhdistekohtaisiin menetelmiin. Uusi menetelmä mahdollistaisi Tullilaboratoriolle myös kyvyn vastata nopeasti mahdollisiin muutoksiin mykotoksiinien lainsäädännössä ja valvonnassa.</p> <p>Menetelmänkehitys kokonaisuudessaan käsitti kaikkien analyttien virittämisen massaspektrometrille sekä nestekromatografisten parametrien optimoinnin tarvittavan kromatografisen erotuksen sekä piikkien muodon saavuttamiseksi 50 yhdisteelle.</p> <p>Yhteensä kaikki viisikymmentä mykotoksiinia ja johdannaisyhdistettä onnistuttiin ionisoidaan ESI-tekniikalla ja kullekin löydettiin ainakin kaksi pilkeionia. Yleisesti ottaen työn tavoitteet saavutettiin ja menetelmä tähän mennessä on pätevä tarkoitukseensa. Tarkoitustussa injektiooliuksessaan analyttien kromatografiset piikit ovat kaikki hyvänmuotoisia ja luettavia vähintäänkin kvalitatiivista määrittystä varten yhtä analyyttiä lukuun ottamatta.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>LC-MS/MS, mykotoksiini, menetelmän kehitys</p>

Author Title	Niko Minkkinen LC-MS/MS Multi-analyte Method for Mycotoxin Detection: the Optimization of LC and MS Parameters
Number of Pages Date	44 pages + 2 appendices 17 November 2018
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Meri Kokkonen, Customs chemist Jukka Niiranen, Principal Lecturer
<p>This study was conducted at the Finnish Customs Laboratory, in the Food Biological Analysis section that is responsible for screening and testing mycotoxins from imported food-stuffs of non-animal origin.</p> <p>The aim of this study was to begin the development of a multiple analyte mycotoxin detection method based on the European Committee for Standardization draft on the subject. The objective was to optimize the LC and MS parameters for the LC-MS/MS equipment to be as finalized as possible without taking sample pre-treatment and preparation into consideration. Altogether the method under development involved 50 analytes and compounds of interest. Combining the measurement of these analytes in a single method has the potential to allow the Customs Laboratory to monitor mycotoxins faster and with a wider scope than with previously used numerous analyte or group specific methods. The new method allows the Customs Laboratory to quickly respond to changes in mycotoxin legislation and monitoring recommendations issued by the European Union.</p> <p>The method development consisted of tuning all of the 50 analytes on the mass spectrometer and optimizing the liquid chromatographic parameters required to obtain the necessary separation and satisfactory peak shapes.</p> <p>In total all 50 analytes were successfully ionized with an ESI technique, and at least two product ions with good response were found for each analyte. When dissolved into their intended injection solution, with the exception of one analyte, the peak shapes were acceptable at least for qualitative analysis. The objectives for this study were fulfilled and so far, the method seems to be applicable for its intended purpose.</p>	
Keywords	LC-MS/MS, mycotoxin, method development

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Mykotoksiinit ja analyysitekniikka	2
2.1	Mykotoksiinit	2
2.1.1	Aflatoksiinit	2
2.1.2	Alternariatoksiinit	4
2.1.3	Enniatiinit	5
2.1.4	Ergotalkaloidit	6
2.1.5	Fumonisiinit	7
2.1.6	Okratoksiinit	9
2.1.7	Trikotekeenit	9
2.1.8	Zearalenoni	11
2.1.9	Muita mykotoksiineja	14
2.2	Nestekromatografia-massaspektrometria	17
2.2.1	Nestekromatografia	17
2.2.2	Massaspektrometria	19
3	Reagenssit ja laitteet	25
3.1	Reagenssit	25
3.2	Laitteet ja tarvikkeet	27
4	Työn toteutus	28
4.1	Mykotoksiinien massaprofiilien virittäminen	28
4.2	Nestekromatografisen menetelmän kehitys	29
4.3	LC-MS-parametrien viimeistely ja esikäsittelytesti	32
5	Tulokset	33
5.1	Mykotoksiinien massaprofiilit	34
5.2	Nestekromatografisen menetelmä	36
5.3	Esikäsittelytesti	39
6	Päätelmät	41
	Lähteet	43
	Liitteet	

Liite 1. Kolonnien ja gradienttien vertailumatriisi

Liite 2. Gradienttien variointia

## Lyhenteet

3-AcDON	3-asetyylideoksinivalenoli
15-AcDON	15-asetyylideoksinivalenoli
ACN	Asetonitrilli
AFB1	Aflatoksiini B1
AFB2	Aflatoksiini B2
AFG1	Aflatoksiini G1
AFG2	Aflatoksiini G2
ALT	Altenueeni
AOH	Alternariol
AME	Alternariol monometyylieetteri
API	Atmospheric Pressure Ionization, ionisaatio ilmanpaineessa
BEA	Beauverisiini
CITR	Sitriniini
DON	Deoksinivalenoli
DON-3-G	Deoksinivalenoli-3-glukosidi
DAS	Diasetoksiskirpenoli
EFSA	Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto
ENN	Enniatiini

ESI	Electrospray ionization, sähkösumutusionisaatio
FB1	Fumonisiini B1
FB2	Fumonisiini B2
FB3	Fumonisiini B3
FUS-X	Fusarenoni-X
HT-2	HT-2-toksiini
IARC	Kansainvälinen syöpätutkimuslaitos
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry, nestekromatografia-massaspektrometria
MeOH	Metanoli
MON	Moniliformiini
MRM	Multiple reaction monitoring, useiden reaktioiden seuranta
NEO	Neosolanioli
NIV	Nivalenoli
OTA	Okratoksiini A
OTB	Okratoksiini B
STG	Sterigmatokystiini
T-2	T-2-toksiini
TEN	Tentoksiini

TEA	Tenuatsoonihappo
U/HPLC	Ultra/high performance liquid chromatography, (Erittäin/)Korkean erotusky- vyn nestekromatografia
ZAL	Zearalanoli
ZAN	Zearalanoni
ZEL	Zearalenoli
ZEN	Zearalenoni



## 1 Johdanto

Tullilaboratorion elintarvikkeiden biologisten tutkimusten jaosto valvoo ja testaa tällä hetkellä pääsääntöisesti yhteensä kolmeatoista mykotoksiinia: neljää aflatoksiinia, kahta fumonisiinia, deoksinivalenolia, okratoksiini A:ta, HT-2- ja T-2-toksiineja, zearalenonia, sitriniiniä ja patuliinia. Valvottuja mykotoksiineja testataan erilaisilla menetelmillä ja tekniikoilla, joiden erilaiset vaiheet voivat olla hyvinkin aikaa vieviä. Jaostolle saapuvat näytteet on usein määrätty analysoitavaksi arvioidun riskin perusteella vain tietyn mykotoksiinin varalta. Yhdistämällä näiden mykotoksiinien menetelmät yhdeksi jaosto kykenisi säästämään työtunteja sekä menetelmän luonteesta johtuen keräämään enemmän tietoa samanaikaisesti useamman mykotoksiinin osalta.

Moniyhdistemenetelmän tarkoituksena olisi ainakin osittain korvata käytössä olevat menetelmät riippuen moniyhdistemenetelmän tarkkuudesta ja herkkyydestä. Yhdistetty kvalitatiivinenkin menetelmä mahdollistaisi jaostolle saapuvien näytteiden nopean seulonnan raja-arvoja ylittävien tai niiden läheisyydessä olevien mykotoksiinipitoisuuksien varalta.

Työssä moniyhdistemenetelmään on valittu edellä mainittujen lisäksi (pois lukien patuliini) yhteensä 38 muuta mykotoksiinia ja johdannaisyhdistettä, jotka ovat jo mahdollisesti seurannassa, harkinnassa valvottavaksi tai muuten relevantteja yhdisteitä mykotoksiinien seurannan kannalta. Tämän tarkoituksena muun muassa olisi mahdollistaa uusien mykotoksiinien valvonnan aloittamisen verrattain nopeasti ja vaivattomasti lainsäädännön muuttuessa.

Työn tavoitteena oli menetelmän nestekromatografisten ja massaspektrometrinen asetusten optimoiminen niin käyttövalmiiksi kuin mahdollista ilman varsinaista validointia tai esikäsitteilyn testausta sekä kehitystä. Alustavasti kehitettävän menetelmän suunniteltiin pohjautuvan Euroopan standardointikomitean (Comité Européen de Normalisation, CEN) mykotoksiinien moniyhdistemenetelmän luonnokseen [1].

## 2 Mykotoksiinit ja analyysitekniikka

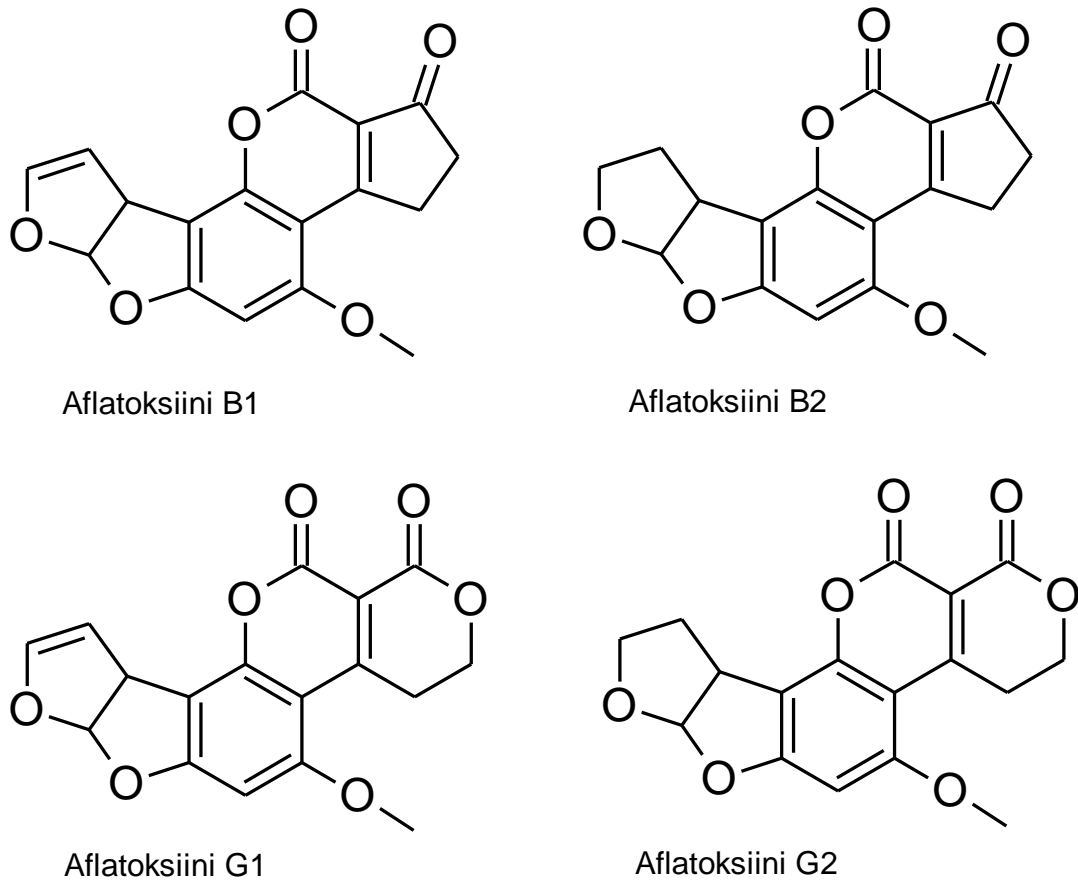
Teoriaosuudessa käydään lyhyesti läpi työssä käytetyt mykotoksiinit ryhmittäin tarkastelun keskittyen lähinnä työssä käytettyjen toksiinien esiintymiseen, mahdollisiin todettuihin tai epäiltyihin haittavaikutuksiin sekä lainsäädäntöön. Laitteiston osalta esitellään yleistason perusteet sekä käytettyjen laitteiden tarkempi toiminta.

### 2.1 Mykotoksiinit

Mykotoksiinit ovat homesienten tuottamia sekundaarisia aineenvaihduntatuotteita, jotka voivat vahingoittaa selkärankaisia organismeja mykotoksikoosin kautta [2, s. 219]. Mykotoksikoosi on yleinen nimitys erinäisten mykotoksiinien aiheuttamille myrkytystiloille, joiden vakavuus voi vaihdella mykotoksiinista tai vaikutuksen kohteen yleisestä terveydentilasta riippuen. Tavallisesti mykotoksiineille voi altistua joko syömällä saastuneita elintarvikkeita, ihokontaktissa homerihmaston kanssa tai hengittämällä sisään toksineja tuottavien lajien itiöitä [3, s. 497–498]. Pääasiallisesti mykotoksiineja tuottavat *Aspergillus*-, *Penicillium*-, *Alternaria*-, *Fusarium*- ja *Claviceps* -sukujen homesienet. Tavallisesti mykotoksiinit päätyvät ravintoketjuun kontaminoitujen viljelykasvien kautta, etenkin viljat, pähkinät, mausteet sekä hedelmät ovat yleisiä kasvualustoja mykotoksiineja tuottaville homesienille. Mykotoksiinien aineenvaihduntatuotteille on myös mahdollista altistua epäsuorasti, jos esimerkiksi liha-, maito- tai munapohjaisten elintarvikkeiden tuotannossa on käytetty kontaminoituja rehuja. Mykotoksiinien läsnäoloon elintarvikkeissa voivat vaikuttaa esimerkiksi tuotantopaikan maatalouskäytännöt, kuten kelvottomat säilytys-, kuljetus- tai pakkausolosuhteet. Erityisesti tuotteen veden aktiivisuus ja lämpötila ovat tärkeitä tekijöitä mykotoksiinien muodostumisessa. [2, s. 219.]

#### 2.1.1 Aflatoksiinit

Aflatoksiinit ovat pääasiassa *Aspergillus flavus* ja *Aspergillus paraciticus* -homeiden tuottamia toksineja ja esiintyvät lähinnä lämpimissä ja kosteissa ilmastoissa. Aflatoksiineja on tyypiltään useita erilaisia, joista yleisimmät ovat B1, B2, G1 ja G2, joiden rakenteet on esitelty kuvassa 1. Aflatoksiineja esiintyy pääasiassa maissi ja pähkinäpohjaisissa tuotteissa tosin ainakin *A. flavuksen* on todettu esiintyvän myös muissa viljelytuotteissa. Aflatoksiinit ovat erittäin pysyviä ja voivat kestää esimerkiksi keittämistä, leipomista tai paistamista. [2, s. 219–220, 223–224]

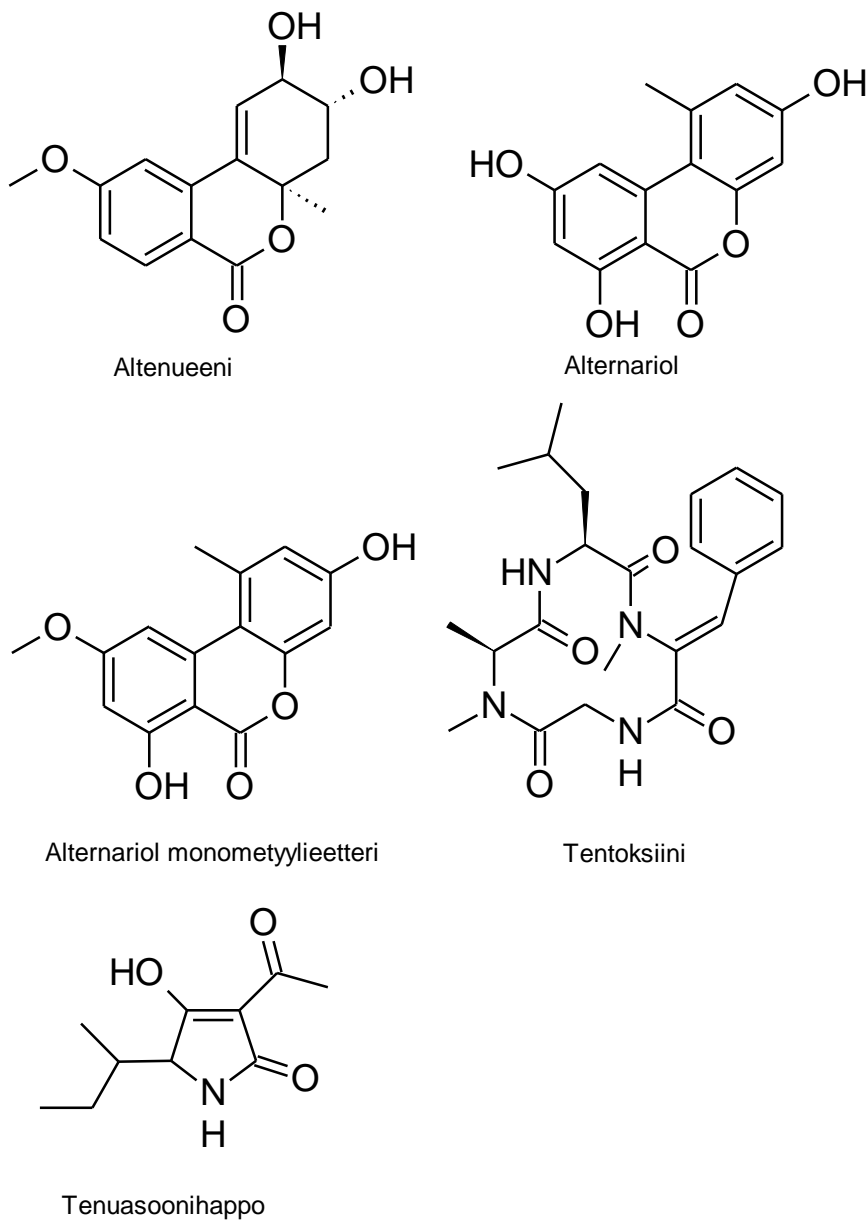


Kuva 1. Aflatoksiinien B1, B2, G1 ja G2 rakenteet [2, s. 221].

Aflatoksiinit ovat hyvin karsinogeenisiä ja genotoksisia yhdisteitä, joiden yleisimpiä kroonisen altistumisen aiheuttamia sairauksia tai oireita ovat maksasyöpä, erinäiset häiriöt lisääntymiselimistössä, immuunijärjestelmässä sekä aivoissa ja keuhkofibroosi. Harvinaisempien akuuttien myrkytystilojen oireina pidetään oksentelua, vatsakipua, aivo- ja keuhkoödeemaa, kuoliota sekä rasvamaksaa. [2, s. 226–227] EU on asettanut aflatoksiineille sallitut enimmäismäärät elintarvikkeissa, joista alin on AFB1:lle 0,10 µg/kg lastenruoissa ja ylin 15,0 µg/kg AFB1:n, AFB2:n, AFG1:n ja AFG2:n summana erinäisissä pähkinöissä [4]. Aflatoksiini B1:tä pidetään yleisesti karsinogeenisimpänä aflatoksiinina, jonka takia EU:n raja-arvoissa on erikseen määritetty AFB1:n ja kaikkien aflatoksiinien summa erikseen [2, s. 226–227].

### 2.1.2 Alternariatoksiinit

Alternariatoksiinit ovat pääasiallisesti *Alternaria*-suvun homesienten tuottama toksii-ryhmä, johon tunnetaan kuuluvan ainakin yli 70 erilaista yhdistettä [2, s. 223]. Alternaria-toksiineja esiintyy lähinnä hedelmissä ja vihanneksissa, mutta niitä tavataan myös muissa viljelykasveissa mukaan lukien oliiveissa ja auringonkukansiemenissä, tosin yleisesti ottaen alternariatoksiinien tutkimus etenkin esiintyvyyden suhteen on ollut niukkaa [2, s. 226; 5, s. 6]. Työssä käytettyjen alternariatoksiinien rakenteet on havainnollistettu kuvassa 2.

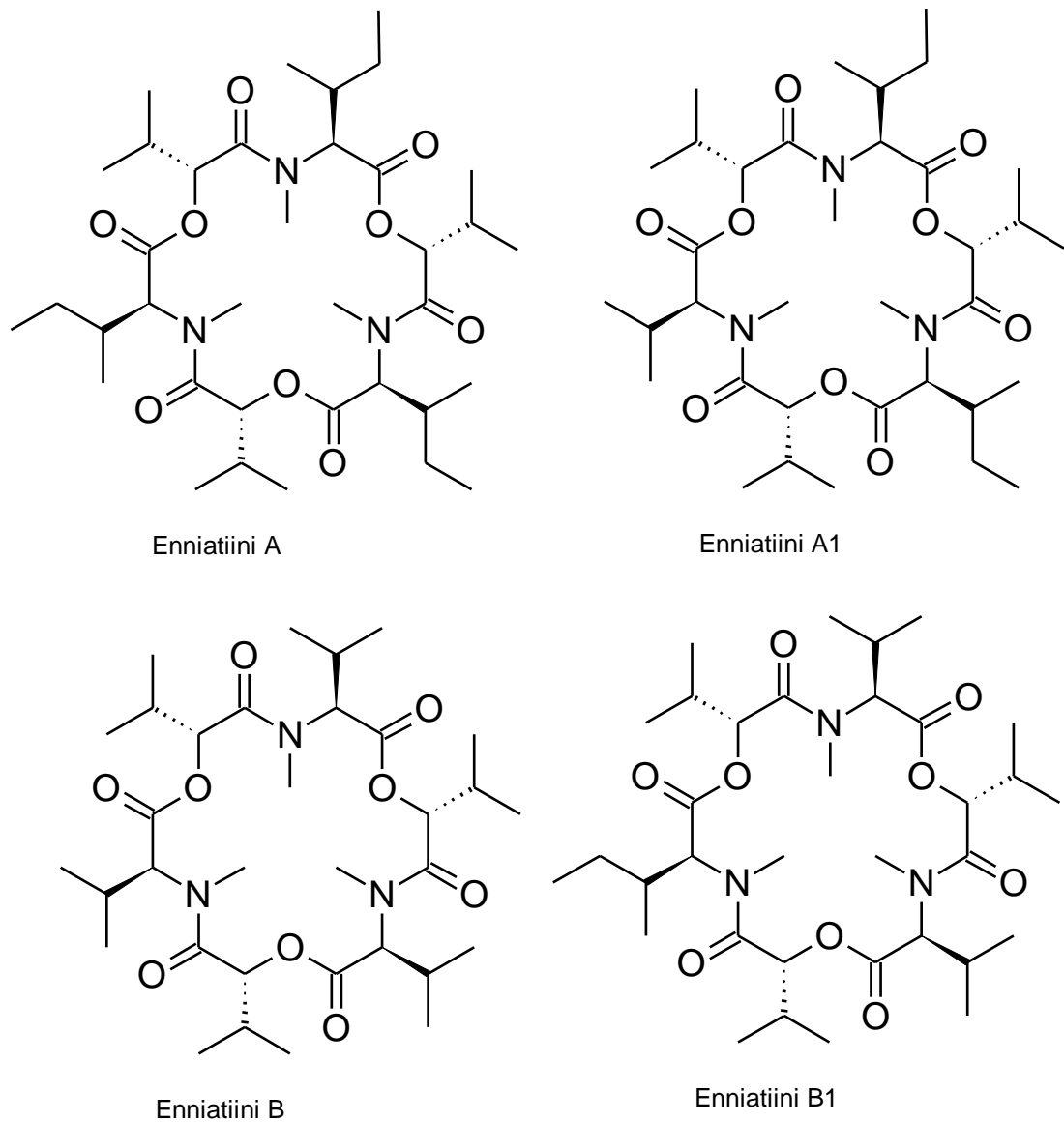


Kuva 2. Työssä käytettyjen alternariatoksiinien rakenteita.

Useimpien alternariatoksiinien tunnetaan olevan sytotoksisia nisäkkäille, ja osa on myös mutageenisia tai sikiöille ja kehitykselle haitallisia [5, s. 6]. Tällä hetkellä EU ei ole asettanut rajoituksia alternariatoksiinien pitoisuuksille [4].

### 2.1.3 Enniatiinit

Enniatiinit ovat ryhmä syklisiä mykotoksiineja, joita tuottavat esimerkiksi *Fusarium*-suvun homeet *F. avenaceum*, *F. trincinctum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* ja *F. langsethiae* [2, s. 222]. Enniatiinit jakavat samankaltaisen rengasrakenteen ja erilaisia enniatiinityyppejä on löydetty useita (A, A1, B, B1, B2, B3, B4, D, E, F ja G), joista A, A1, B ja B1 ovat yleisimpiä Euroopassa (kuva 3). Enniatiineja esiintyy pääasiassa erilaisissa viljoissa, mutta niitä voi myös esiintyä monissa muissa tuotteissa kuten kahvissa, pähkinöissä tai hedelmissä. [6, s. 1–2]



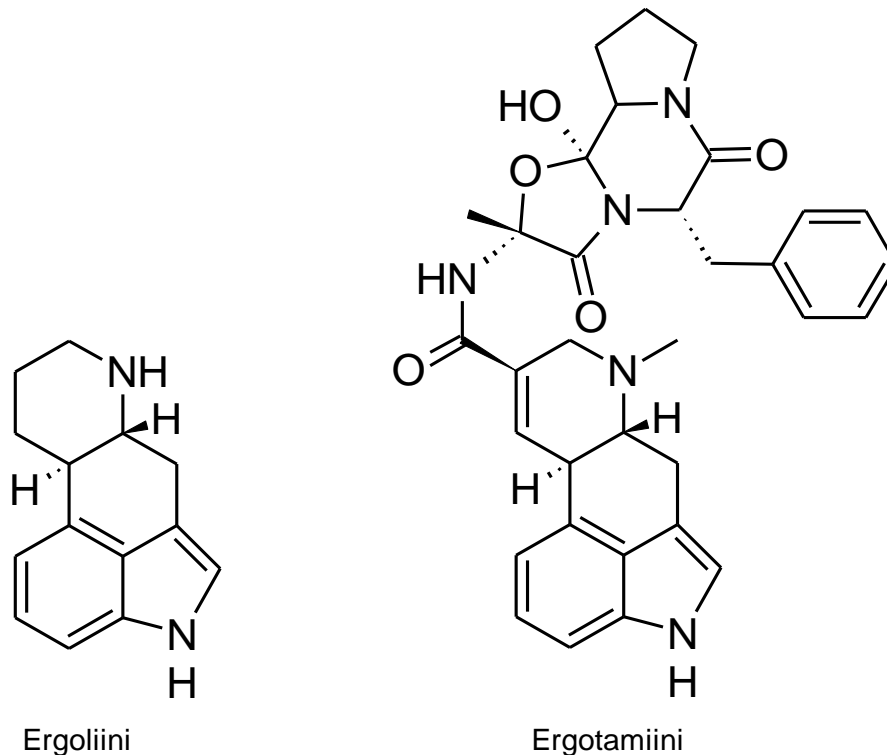
Kuva 3. Enniatiinien A, A1, B ja B1 rakenteet

Enniatiinien on todettu olevan vahvasti sytotoksisia nisäkkäille kuitenkin Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen EFSA:n mukaan akuutin altistumisen riski on pieni. Kroonisen altistumisen haittavaikutuksista ei ole vielä varmaa dataa, eikä EU ole asettanut enniatiinipitoisuuksille raja-arvoja elintarvikkeissa. [4; 6, s. 1–2.]

#### 2.1.4 Ergotalkaloidit

Ergotalkaloidit ovat laaja ryhmä yhdisteitä, joita tuottavia *Claviceps*-suvun homesieniä voidaan tavata erityisesti heinissä, esimerkiksi hirssissä, durrassa ja rukiissa [2, s. 223; 7, s. 23–25; 8, s. 3]. Ominaista *Claviceps*-kasvustoissa ovat niiden rihmastopahkat, jotka

toimivat sienten ravinnevarastoina ja suojoina [7, s. 23–25; 9]. Kaikki ergotalkaloidien rakenteet pitävät sisällään niille ominaisen tetrasyklisen ergoliinirenkaan, jonka rakenne on esitetty kuvassa 4 [9].



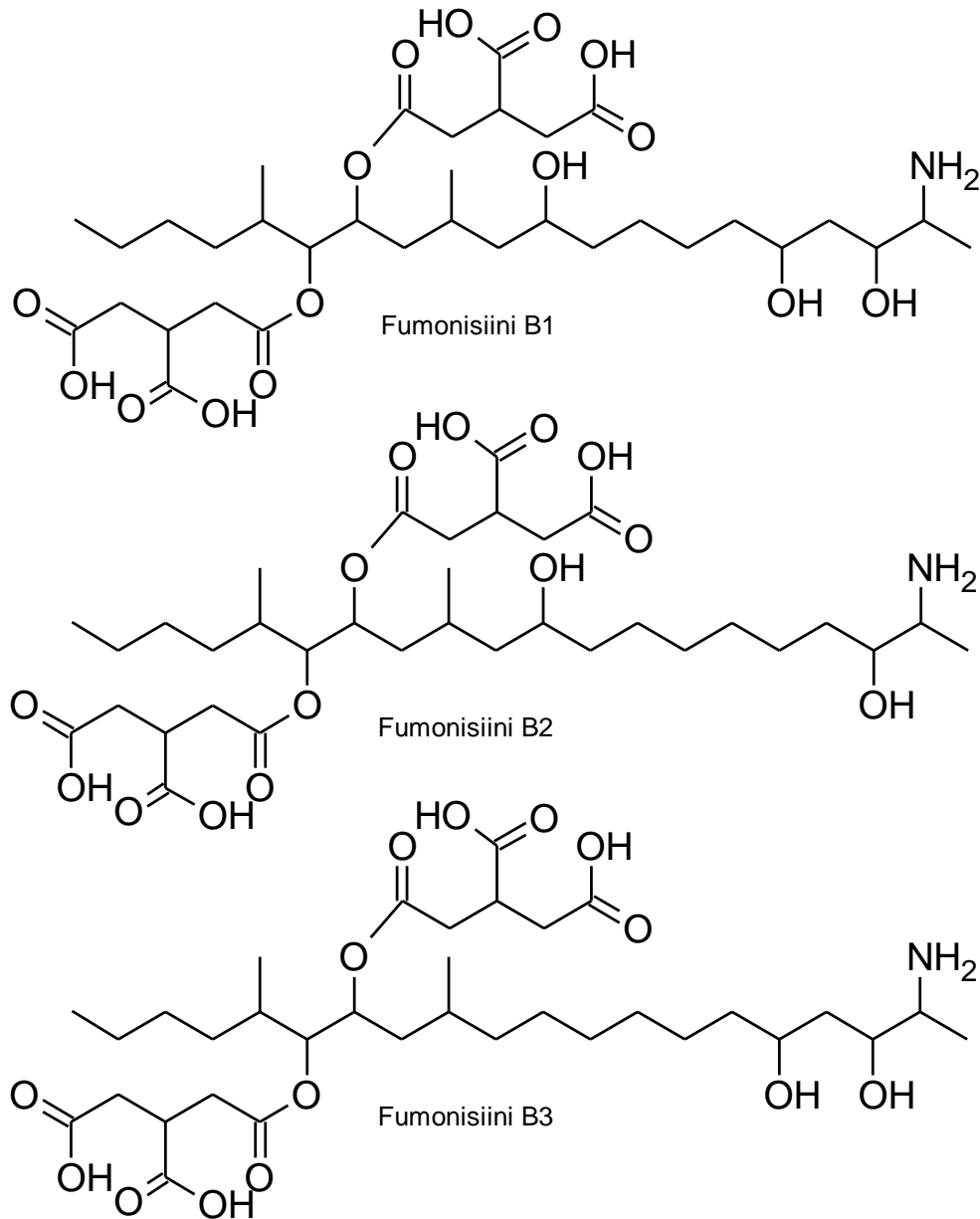
Kuva 4. Ergoliinin ja ergotamiinin rakenteet.

Ergotalkaloidien samankaltaisuus hermoston välittäjäaineiden kanssa on syy alkaloidien monipuolisiin oireisiin. Alkaloidista riippuen altistumisen oireisiin saattaa kuulua esimerkiksi hallusinaatioita, keskushermoston sekä ruoansulatusjärjestelmän häiriöitä tai kuolio. [9.] Jotkin ergotalkaloidit ovat myös vasokonstriktiviisiä, mikä on johtanut niiden lääketieteelliseen käyttöön [7, s. 23–25]. EU ei ole asettanut enimmäismäärärajoituksia ergotalkaloideille elintarvikkeissa tai muissa tuotteissa, tosin aihe on ollut jo esillä EFSA:ssa [4; 7, s. 23–25].

### 2.1.5 Fumonisiinit

Fumonisiinit ovat pääasiassa *Fusarium verticillioides*- ja *Fusarium proliferatum* -lajien tuottamia toksiineja, joita tunnetaan yhteensä ainakin 12 erilaista. Tunnetuimpia fumoni-

siineja ovat B-tyyppin fumonisiinit B1, B2 ja B3. Fumonisiinia esiintyy lähinnä vain maississa ja harvoin riisissä tai durrassa. [2, s. 221, 224; 7, s. 25–28.] Kuvassa 5 on esitelty FB1, FB2 ja FB3:n rakenteet.



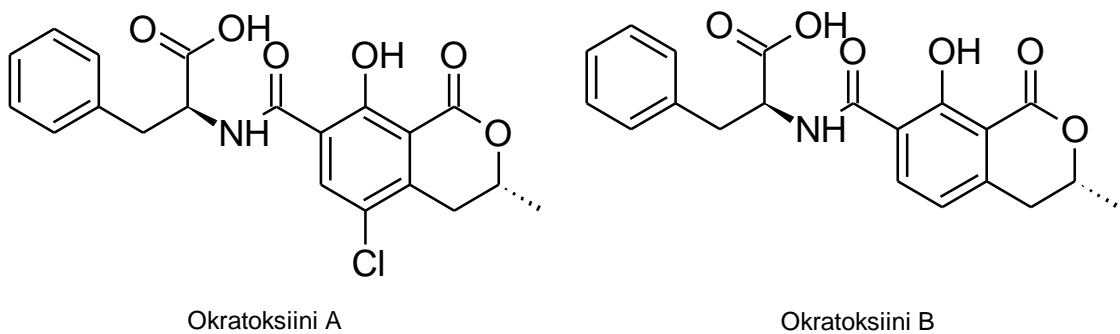
Kuva 5. Fumonisiinien B1, B2 ja B3 rakenteet.

Fumonisiinit ovat kroonisesti ja akuutisti toksisia useille eläinlajeille, erityisesti hevoseläimille ja kaneille, joille fumonisiinit aiheuttavat leukoencefalomalasiaa. Fumonisiinien toksisuudesta ihmisille ei ole suoraa näyttöä, ne ovat luokiteltu ihmisille todennäköisesti karsinogeenisiksi. [2, s. 228; 10, s. 2066.] EU on asettanut maissituotteiden B1 ja B2 yhteenlasketuille fumonisiinipitoisuuksille ylärajoja tuotteiden tyypistä riippuen [4].



### 2.1.6 Okratoksiinit

Okratoksiinit ovat pääasiallisesti useiden eri *Aspergillus*-homeiden sekä joidenkin *Penicillium*-lajien tuottamia toksiineja, joita esiintyy erilaisissa viljoissa sekä myös esimerkiksi kahvipavuissa, kaakaossa, kuivatuissa hedelmissä, viinissä ja mausteissa [2, s. 224; 3, s. 504-505]. Okratoksiinit voivat kestää erilaisia ruoanvalmistusmetodeja, sillä okratoksiinit tuhoutuvat vasta oltuaan useita minuutteja yli 250 °C:ssa [2, s. 221]. Okratoksiinien A ja B rakenteet on esitetty kuvassa 6. Vaikka okratoksiineja on useita eri tyyppisiä, ovat ne usein reaktiotuotteita okratoksiini A:lle. Usein muita okratoksiineja tavataan vain suurien pitoisuuksien kontaminaatioissa [11, s. 41–42; 12 s. 771-773].

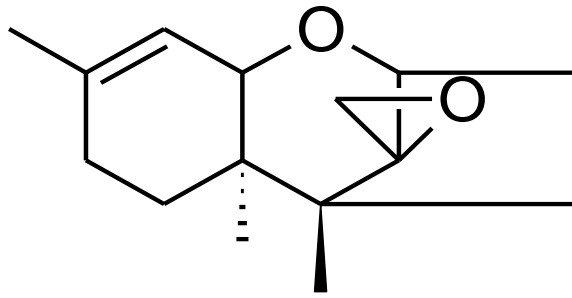


Kuva 6. Okratoksiini A:n ja B:n rakenteet.

Okratoksiinien tunnetaan olevan vahvoja munuaistoksiineja ja niiden epäillään olevan yhteydessä Balkanien endeemiseen nefropatiaan [2, s. 227–228]. Tarpeeksi suurina pitoisuuksina okratoksiinit voivat myös olla vahingollisia maksalle [7, s. 31–34]. Okratoksiinit on luokiteltu mahdolliseksi karsinogeeniksi (2B) IARC:n toimesta ja EU on asettanut Okratoksiini A:n pitoisuuksille enimmäismäärärajoituksia erilaisille elintarvikkeille niiden tyypistä riippuen, ja ne vaihtelevat välillä 0,5–80 µg/kg [4; 13].

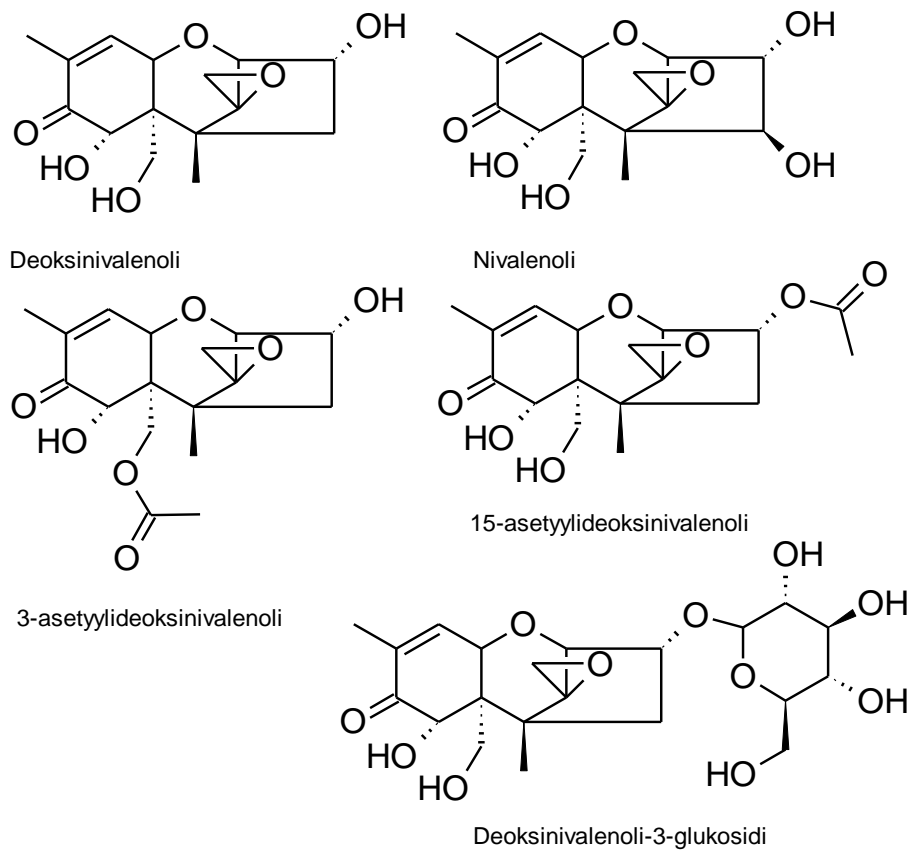
### 2.1.7 Trikotekeenit

Trikotekeenit ovat laaja ryhmä rakenteellisesti samankaltaisia mykotoksiineja, jotka jakavat 12,13-epoksitrikot-9-eeni -rengassysteemin, joka on havainnollistettu kuvassa 7. Trikotekeenejä tuottavat muun muassa suvut *Fusarium*, *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichiderma* ja *Trichitecium*. [2, s. 222; 4; 14, s. 803.]



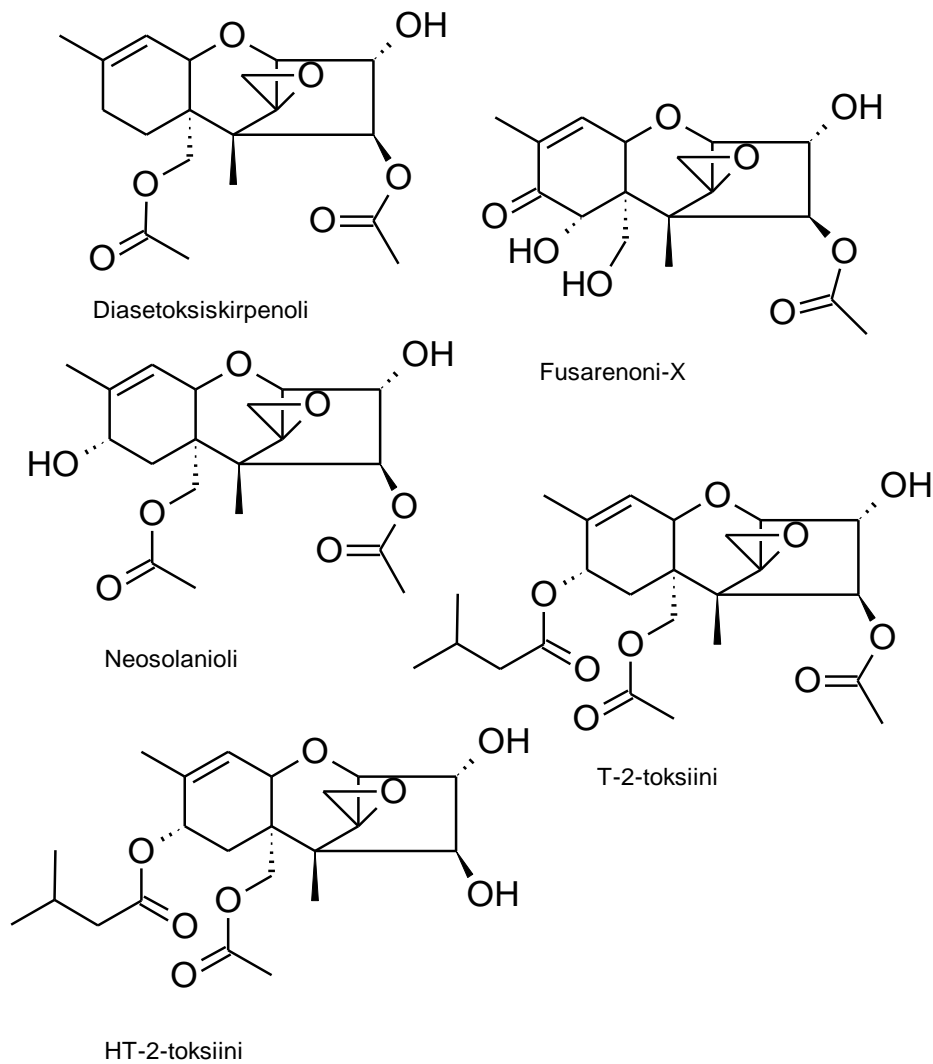
Kuva 7. Trikotekeenien yleinen rengassysteemi.

Työssä käytettiin yhteensä kymmentä erilaista trikotekeeniä, joiden rakenteet on esitetty kuvissa 8 ja 9. Deoksinivalenoli sekä HT-2- ja T-2-toksiinit ovat trikotekeeneistä parhaiten tunnettuja, joista deoksinivalenoli on toistaiseksi ainoa, jolle on määritelty pitoisuuksien enimmäismäärät elintarvikkeissa EU:n lainsäädännössä. HT-2- ja T-2-toksiinit ovat tällä hetkellä seurannassa ilman määritettyjä raja-arvoja. [2, s. 228–229; 4; 15.] Trikotekeenejä esiintyy kuitenkin ympäri maailmaa monipuolisesti erilaisissa viljelykasveissa, erityisesti viljoissa [16, s. 7–11].



Kuva 8. Trikotekeenien rakenteita.

Trikotekeenisille yhdisteille altistuminen voi aiheuttaa runsaasti erilaisia oireita ihmisissä ja eläimissä, kuten ihon ja ruoansulatuselimistön ärsytystä, kuolion, erilaisia hematologisia häiriöitä, ripulia, oksentelua tai vahinkoa hematopoieettisille soluille. Altistuminen trikotekeneille voi myös johtaa kuolemaan. Trikotekeenit ovat hyvin sytotoksisia eukaryoottisoluille ja toimivat vahvoina inhibiittoreina DNA:n ja RNA:n synteesissä. [16, s. 25–29.]

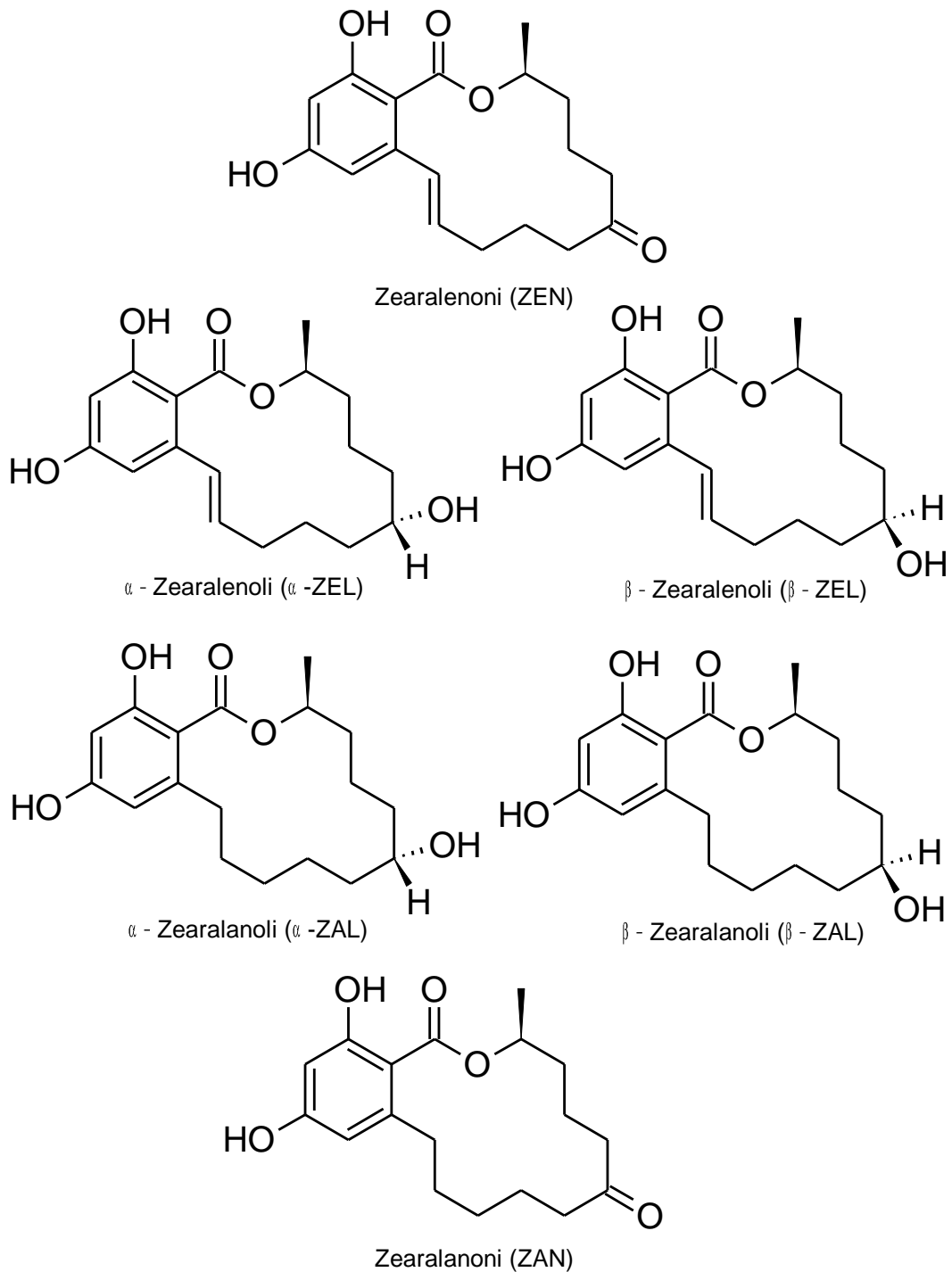


Kuva 9. Trikotekeenien rakenteita.

### 2.1.8 Zearalenoni

Zearalenoni (tai vaihtoehtoisesti kirjoitettuna tsearalenoni) on useiden *Fusarium*-lajien, muun muassa *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* ja

*F. incarnatum* tuottama mykotoksiini [2, s. 222]. Pääasiallisesti zearalenonia löytyy maisista, mutta sitä voi myös esiintyä esimerkiksi vehnässä, ohrassa tai durrassa [2, s. 224; 7, s. 43–45]. Usein zearalenonia esiintyy yhdessä trikotekeenien ja muiden *Fusarium*-suvun tuottamien toksiinien kanssa [17]. Olosuhteiden puolesta zearalenonia tuottavat homesienet suosivat verrattain viileitä ja luonnollisesti kosteita kasvuympäristöjä [2, s. 222; 17]. Zearalenonilla on viisi muuta luonnossa esiintyvää aineenvaihduntatuotetta:  $\alpha$ - ja  $\beta$ -zearalenoli,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -zearalanoli ja zearalanoni, joiden rakenteet on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10. Zearalenonin,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -zearalenolin,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -zearalanolin ja zearalanonin rakenteet.

Zearalenoni on lämpöstabili ja kestää lämpötiloja 150 °C:seen asti, myös emäksisten olosuhteiden on havaittu pienentävän pitoisuuksia. Zearalenoni on akuutisti toksinen vain verrattain suurissa määrissä ja sen LD<sub>50</sub> arvioidaan olevan 2000–20 000 mg/kg riippuen kohdelajista. [2, s. 228.] Estrogeenireseptoreihin helposti sitoutuva Zearalenoni voi ihmisillä johtaa kehityshäiriöihin kuten esimerkiksi puberteetin ennenaikaistumiseen [2 s.

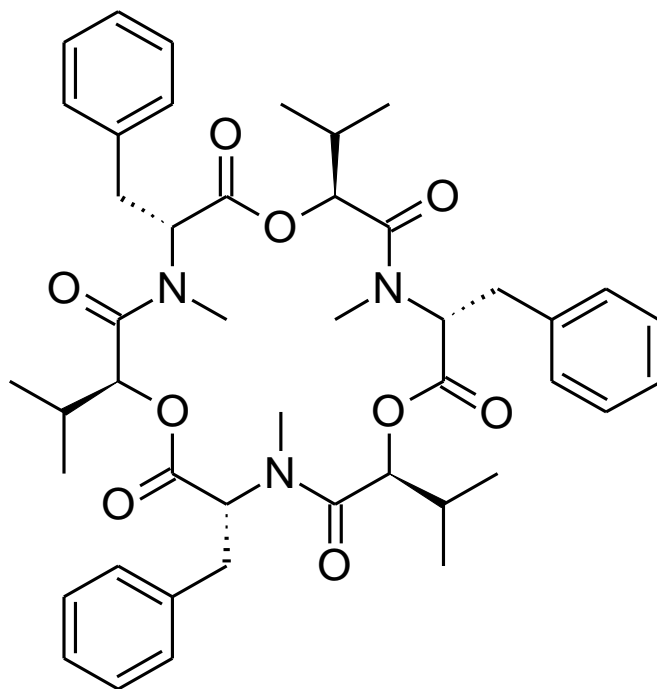
228; 7, s. 43–45]. Eläimillä kroonisen altistumisen on havaittu olevan karsinogeenistä, genotoksista sekä haitallista lisääntymiselle ja immuunijärjestelmälle [2, s. 228]. EU on asettanut zearalenonille enimmäispitoisuuksia erilaisille tuotteille rajojen vaihdellen 20–400 µg/kg tuotteesta riippuen [4].

### 2.1.9 Muita mykotoksiineja

Muita yleisesti esiintyviä yksittäisiä mykotoksiineja, joiden haittavaikutuksista sekä esiintyvyydestä on melko vähäisesti tietoa. Sitriiniin hyvin spesifiä raja-arvoa lukuun ottamatta EU ei ole asettanut näille mykotoksiineille raja-arvoja ainakaan toistaiseksi.

#### 2.1.9.1 Beauverisiini

Beauverisiini on rakenteeltaan (kuva 11) enniatiineja muistuttava joidenkin *Fusarium*-suvun jäsenten tuottama toksiiini. Beauverisiinia tuottavia homesieniä esiintyy lähinnä vilja- ja maissipohjaisissa tuotteissa. [18, s. 1–2.]



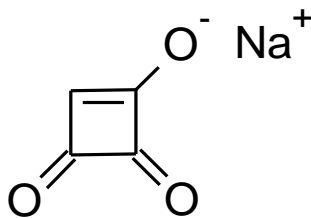
Beauverisiini

Kuva 11. Beauverisiinin enniatiineja muistuttava rakenne.

Beauverisiinin tunnetaan olevan sytotoksinen enniatiinien tapaan, tosin samoin kuin enniatiinien kanssa, beauverisiinin haittavaikutuksista ei ole kattavaa tietoa [18, s. 14]. EU ei ole asettanut rajoituksia beauverisiinille [4].

#### 2.1.9.2 Moniliformiini

Moniliformiini on rakenteeltaan epätavallisen pieni mykotoksiini ja vahva happo. Moniliformiinia tuottavat useat *Fusarium*-suvun jäsenet, kuten *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* ja *F. verticillioides* [2, s. 223]. Moniliformiinia on havaittu ainakin kaurassa, vehnässä, rukiissa ja maississa, mutta sen ominaisia esiintymisolosuhteita ei tunneta [7, s. 30–31].



Moniliformiini

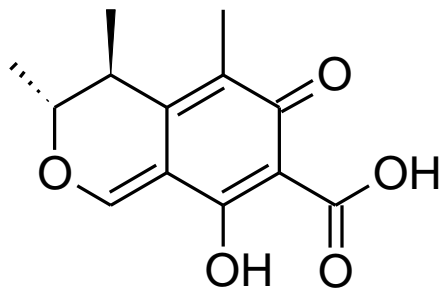
Kuva 12. Moniliformiinin rakenne. Natriumionin tilalla voi myös olla kaliumioni [18, s. 16].

Yhtäkään moniliformiinin aiheuttamaa mykotoksikoosin esiintymää ei ole tiedossa ja kaikki tieto toksisuudesta on peräisin kokeellisista tutkimuksista [7, s. 30–31]. Testien perusteella altistumisen oireiksi luetaan masennus, ataksia ja vaikeutunut hengitys. Tarkkaa moniliformiinin toksisuuden mekanismia ei myöskään tunneta. [19, s. 28–31, 55–58.] EU ei ole asettanut moniliformiininille minkäänlaisia rajoituksia [4].

#### 2.1.9.3 Sitriiniini

Poikkeuksellisen värikäs mykotoksiini, sitriiniini, on liuksena ja kiinteänä kirkkaan keltaista. Sitriiniini on useiden *Penicillium*- ja joideinkin *Aspergillus* -homesientien tuottama mykotoksiini, joka alun perin sai nimensä *Penicillium citrinum* -lajin mukaan. Sitriiniiniä esiintyy erilaisissa viljoissa, kuten vehnässä, ohrassa, kaurassa, riisissä ja maississa. [7, s. 17–18.] Sitriiniinä tavataan usein okratoksiini A:n kanssa, sillä suurin osa sitriiniiniä

tuottavista sienistä tuottaa myös okratoksiini A:ta [2, s. 227; 7, s. 17–18]. Sitriniinin rakenne on esitetty kuvassa 13.



Sitriniini

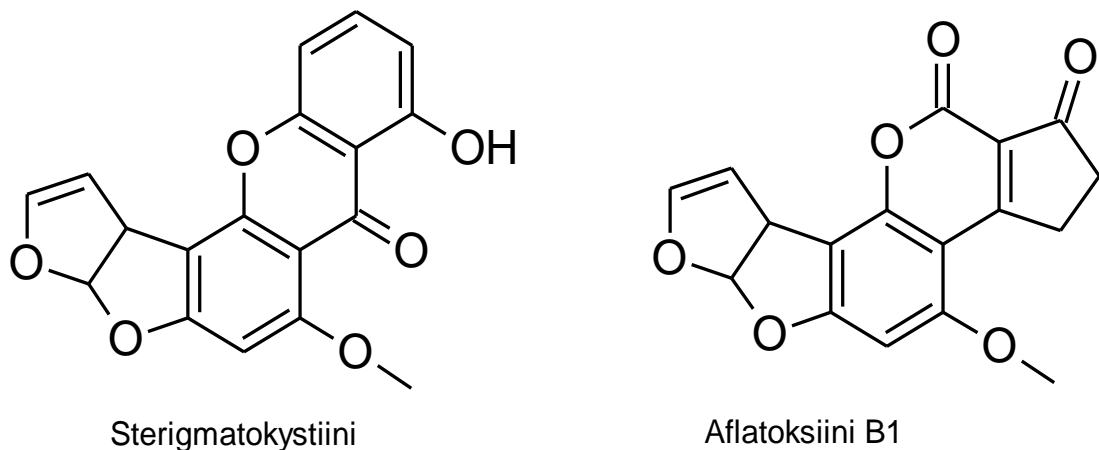
Kuva 13. Sitriniinin rakenne.

Sitriniinin tunnetaan olevan munuaistoksiini ja erityisesti haitallinen siipikarjalle. Korkeat sitriniinipitoisuudet voivat myös vaikuttaa haitallisesti maksaan. Ihmisten altistumisesta sitriniinille ei kuitenkaan ole kattavaa tietoa, eikä EU ole asettanut laajamittaisia rajoituksia sitriniinipitoisuuksille elintarvikkeissa, tosin *Monascus purpureus* -punahiivalla fermentoidulle riisille EU on asettanut sitriniinille enimmäispitoisuudeksi 2000 µg/kg. [4; 7, s. 17–18.]

#### 2.1.9.4 Sterigmatokystiini

Sterigmatokystiini on rakenteellisesti samankaltainen mykotoksiini verrattuna aflatoksiineihin ja toimii välituotteena aflatoksiinien biosynteesissä. Sterigmatokystiiniä tuottavat pääasiassa useat *Aspergillus*-suvun homesienet, ja sitä on tavattu esimerkiksi juustossa, oluessa, maapähkinöissä, viljatuotteissa, riisissä ja chilissä. [20, s. 106–107.]





Kuva 14. Sterigmatokystiinin ja aflatoksiini B1:n rakenteet.

Sterigmatokystiinin tunnetaan olevan kroonisesti altistuttaessa ainakin genotoksinen ja karsinogeeninen eläinkokeiden perusteella. Akuutin toksisuuden tunnetaan vaikuttavan voimakkaasti maksaan. [20, s. 112.] Sterigmatokystiini on luokiteltu mahdollisesti karsinogeeniseksi (2B) IARC:n mukaan, ja tällä hetkellä EU ei ole asettanut rajoituksia sterigmatokystiinille elintarvikkeissa tai muissa tuotteissa [4].

## 2.2 Nestekromatografia-massaspektrometria

Nestekromatografia-massaspektrometriasta (LC-MS) on tullut viime vuosina hyvin yleinen analyttisen kemian työkalu. LC-MS-yhdistelmätekniikka liittää nestekromatografian erottelukyvyn sekä massaspektrometrian selektiivisyyden ja spesifisyyden, mikä mahdollistaa monimutkaistenkin näyttematriisien analysoinnin haluttujen yhdisteiden osalta. LC-MS-tekniikka soveltuu laajalle joukolle yhdisteitä, minkä ansiosta samassa analyysissä voidaan erottaa ja detektoida lukuisia, kemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaisia, yhdisteitä.

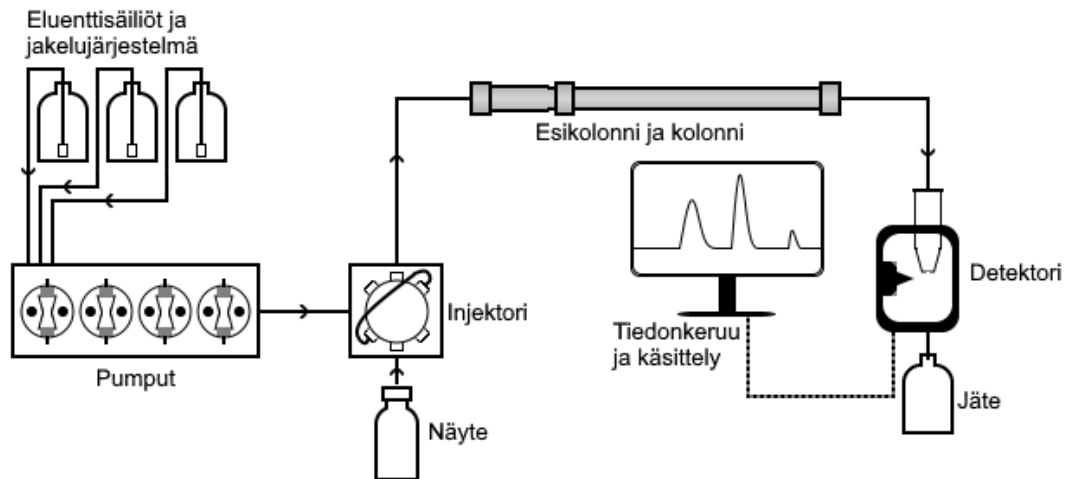
### 2.2.1 Nestekromatografia

Nestekromatografia on analyysi-, puhdistus ja eristystekniikka, joka perustuu analysoidavan näytteen sisältämien yhdisteiden erilaisiin fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin, ja siten niiden eriäviin affiniteetteihin liikkuvaa- ja stationäärifaasia kohtaan. Nestekroma-

tografiassa näytteen komponenttien erottuminen tapahtuu kolonnissa, jossa stationääri-faasin lävitse virtaava liikkuva faasi kantaa jatkuvasti stationäärifaasiin tarttuvan ja liikkuvaan faasiin eluoituvan näytteen kolonnin läpi detektorille. Näytteen komponentit tulevat kolonnista ulos eri aikoihin riippuen niiden tasapainosta liikkuvan faasin ja stationäärifaasin välillä. Tähän tasapainoon vaikuttavat liikkuvan faasin ja stationäärifaasin koostumukset sekä vähemmässä määrin kolonnin lämpötila. [21, s. 140–141.]

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia ja erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (High performance liquid chromatography, HPLC) näyte syötetään injektorilla korkealla paineella pumpattavaan nestefaasiin, joka kulkeutuu kolonniin kapillaareja pitkin. Kuvassa 15 on esitetty yleinen pelkistetty HPLC:n rakenne. HPLC mahdollistaa myös liikkuvan faasin koostumuksen muuttamisen ajon aikana, mikä mahdollistaa esimerkiksi monen komponentin näytteiden retentioaikojen hienosäädön. HPLC:ssa käytettyjä kolonnityyppejä ovat esimerkiksi normaalifaasi- ja käänteisfaasikolonnit. Normaalifaasikromatografiassa stationäärifaasi on poolinen ja usein koostuu esimerkiksi alumiinioksidista tai silikasta, kun taas liikkuva faasi koostuu poolittomista tai keskipoolisista liuottimista. Käänteisfaasikromatografiassa puolestaan stationäärifaasi on pooliton ja tavallisesti silikaan tai polymeeriin sidottu oktadekyyli, muu hiili- tai fenyyl-, syano- tai aminoryhmä. Käänteisfaasikromatografiassa liikkuvana faasina toimivat pooliset liuottimet, kuten asetonitriili, metanoli tai vesi. HPLC stationäärifaasien partikkelikoko on tavallisesti luokkaa 3–10  $\mu\text{m}$  ja systeemin vastapaineen yläraja on noin 35 000 kPa. [21, s. 153–177; 22, s. 171–179.]



Kuva 15. Pelkistetty HPLC:n rakennekaavio. Kuva on piirretty lähteen [21, s. 153] kuvan perusteella.

HPLC:sta kehittynyt erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (Ultra high performance liquid chromatography, UHPLC) on peruseriaatteiltaan hyvin samankaltainen HPLC:hen verrattuna. Tyypillistä UHPLC:lle on pienemmät alle  $2\ \mu\text{m}$ :n kolonnien partikkelikoot, jotka puolestaan vaativat suuremmat, tyypillisesti yli 40 000 kPa, paineet UHPLC-systeemiin. Pienemmällä partikkelikoolla ja suuremmalla virtausnopeudella voidaan saavuttaa kapeammat kromatografiset piikit, suurempi herkkyys ja nopeammat analyysit kuin HPLC-tekniikalla. Tavallisesti UHPLC:ssa myös näytetilavuudet ovat pienempiä, alle  $10\ \mu\text{l}$ :n kokoluokkaa. [21, s.176–177.]

## 2.2.2 Massaspektrometria

Massaspektrometria on herkkä ja spesifinen mittaustekniikka, jossa näytemolekyylit ensiksi ionisoidaan, erotellaan mahdollisesti syntyneet molekyylioniit, adduktit tai fragmentit niiden massa-varaussuhteiden mukaan ja lopuksi mitataan eri massa-varausarvojen intensiteetti valitulla detektorilla. [22, s. 15.]

### 2.2.2.1 Sähkösumutus-ionisaatio

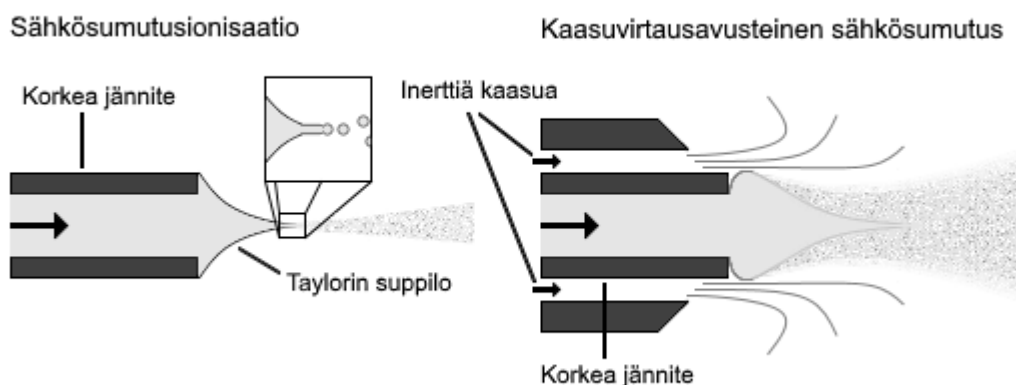
Ionisaation tarkoitus massaspektrometriassa on antaa analyyteille sähköinen varaus sekä LC:tä käytettäessä saattaa ne kaasufaasiin. Ionisaatiometodeja on monia erilaisia ja niiden avulla tuotettavat positiiviset ja negatiiviset ionit voivat ionisaatiomenetelmästä

riippuen fragmentoitua prosessin aikana. Ionisaatiotekniikoita, jotka eivät yleensä fragmentoi kohdemolekyylejä kutsutaan pehmeiksi ionisaatiotekniikoiksi ja vastaavasti usein fragmentoivia menetelmiä kutsutaan koviksi ionisaatiomenetelmiksi. LC-MS tekniikan yhteydessä tavallisimmin käytetään pehmeitä ESI-, APCI- tai APPI-ionisaatiotekniikoita. [22, s. 68–78, 173.]

Sähkösumutus-ionisaatio (electrospray ionization, ESI) on pehmeä ionisaatiotekniikka, jonka avulla pystytään tuottamaan sekä positiivisia että negatiivisia lähtöioneja. Sähkösumutus-ionisaatiossa näyte virtaa liuottimessa kapillaaria pitkin sen päähän, jossa näyte liottimiseen pisaroituu korkean jännitteen vaikutuksesta (kuva 16). Pisaroitumisen johtuu korkean elektrostaattisen kentän aiheuttamasta eluentsivöhykkeen kapenemisesta suppilomaisesti, ilmiötä kutsutaan Taylorin suppiloksi. Nykyään sähkösumutuksessa käytetään lähes poikkeuksetta kuitenkin pisaroinnissa avustavaa inerttiä suihkun suuntaista kaasuvirtausta, joka johdetaan näytekapillaarin ympäriltä kapillaarin päähän (kuva 16). Kaasuavusteinen sähkösumutus sallii korkeamman syötettävän virtausnopeuden (2–10 µl/min vrt. 2–1000 µl/min). [22, s. 68–78.] Yleisiä lähtöioneja on listattu taulukossa 1 niiden massasiirtymien kera.

Taulukko 1. Yleisiä molempien ESI-tilojen lähtöioneja.

ESI-tila	Lähtöioni	Massa-varaus (m/z)
Positiivinen	[M+H] <sup>+</sup>	M + 1,008
Positiivinen	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	M + 18,04
Positiivinen	[M+Na] <sup>+</sup>	M + 22,98
Positiivinen	[M+K] <sup>+</sup>	M + 39,09
Negatiivinen	[M-H] <sup>-</sup>	M - 1,008
Negatiivinen	[M+Na-2H] <sup>-</sup>	M + 20,97
Negatiivinen	[M+Cl] <sup>-</sup>	M + 34,97
Negatiivinen	[M+K-2H] <sup>-</sup>	M + 39,95
Negatiivinen	[M+HCOO] <sup>-</sup>	M + 45,00



Kuva 16. Sähkösumutus-ionisaation ja kaasuvirtausavusteisen sähkösumutuksen kaaviokuvat.

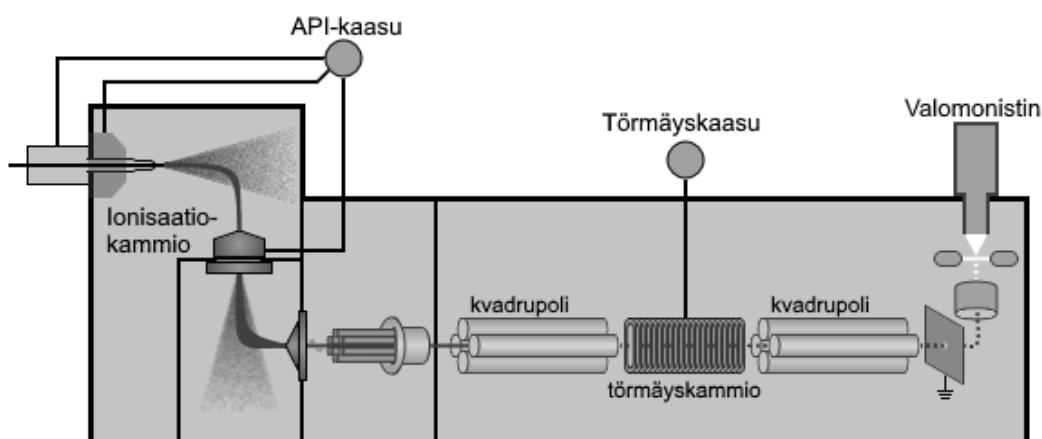
Varautuneen pisaran muodostuttua siitä alkaa haihtua liuotinta, jonka johdosta pisaran varaustiheys kasvaa. Pisara hajoaa pienemmiksi pisaroiksi varaustiheyden saavutettua Rayleighin raja-arvon, mikä toistuu, kunnes pisara on tarpeeksi pieni luovuttaakseen yksittäisen lähtöionin kaasufaasiin. Kaasufaasissa lähtöioni on kuitenkin vielä liuotinmolekyylien ympäröimänä ryväsionina, jotka hajotetaan ja kerätään massaspektrometriin, joko verhokaasun ja keräyslevyn tai jonkin muun menetelmän avulla. [22, s. 68–78.] Mahdollisten adduktien synnyn edistämiseksi ionisaatiossa ajoliuokseen voidaan myös lisätä suoloja, kuten esimerkiksi ammoniumformiaattia muurahaishapon kanssa [23].

#### 2.2.2.2 Kvadrupolianalysaattorit

Molekyyli-ionit, adduktit ja ionisoituneet fragmentit johdetaan massa-analysaattorille, joista yleisimpiä ovat kvadrupolit [22, s. 28]. Kvadrupolit ovat sähkömagneettisia suodatimia, jotka seulovat ioneja niiden massa-varaussuhteiden perusteella. Kvadrupolit koostuvat neljästä yhdensuuntaisesta elektrodista, joihin johdetuilla jännitteillä niiden välille saadaan aikaan säädeltävissä oleva sähkökenttä. Sähkökenttä saa sen läpi kulkevissa ioneissa aikaan kulkusuunnalle kohtisuoran värähdysliikkeen, jonka voimakkuus määräytyy elektrodien jännitteiden ja ionin massa-varaus -suhteen perusteella. Tarpeeksi voimakas värähdysliike saa ionin joko törmäämään elektrodiin tai muuten poistumaan suoralta lentoradaltaan. Kvadrupoleja voidaan käyttää myös törmäyskammioina johtamalla siihen törmäyskaasua ja käyttämällä elektrodeissa pelkästään vaihtojännitettä. [22, s. 27–34.]

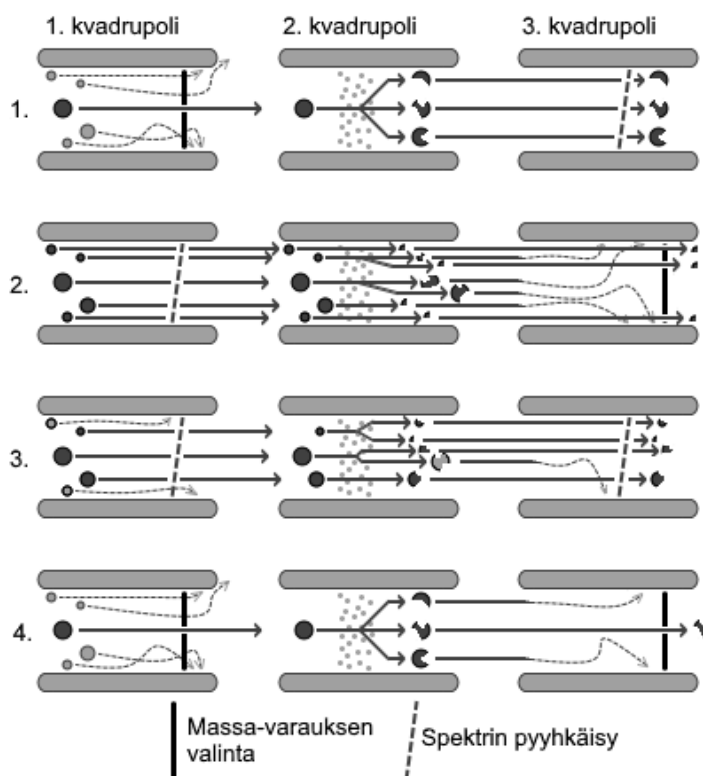
## Kolmoiskvadrupoli - tandemmassaspektrometria

Tandemmassaspektrometria perustuu kolmen kvadrupolin yhteistoimintaan, jossa ensimmäinen ja viimeinen kvadrupoli toimivat massa-analysointilaitteina ja keskimäinen törmäyskammiona. Keskimäisessä törmäyskammiossa lähtöionien törmätessä sinne johdettuun inerttiin kaasuun, lähtöionit fragmentoituvat ja nämä fragmentit jatkavat kolmannelle kvadrupolille. [22, s. 32–34.] Törmäyskammiona voi toimia kvadrupolin sijaan myös muunlaiset ioniohjaimet [24]. Esimerkki kolmoiskvadrupolin rakenteesta löytyy kuvasta 17.



Kuva 17. Watersin Xevo TQ -massaspektrometrin pelkistetty rakenne. Kyseinen malli käyttää poikkeuksellisesti Scanwave-törmäyskammiota.

Analysoivat ensimmäinen ja kolmas kvadrupoli pystyvät joko ”pyyhkäisemään” (sweep) koko spektrin läpi päästään vuorotellen massa-varaus -suhteen perusteella validit lähtöionit läpi tai valitsemaan yhden tietyn massa-varaus -suhteen läpipäästettäväksi. Näin ollen erilaisia pyyhkäisytekniikkoja on yhteensä neljä: 1. valitsee ja 3. pyyhkäisee, 1. pyyhkäisee ja 3. valitsee, molemmat pyyhkäisevät tai molemmat valitsevat (kuva 18). [22, s. 32–34.]



Kuva 18. Tandemmassaspektrometrian erilaisia pyyhkäisytekniikoita. Kuva on piirretty lähteen [22, s. 33] kuvan perusteella.

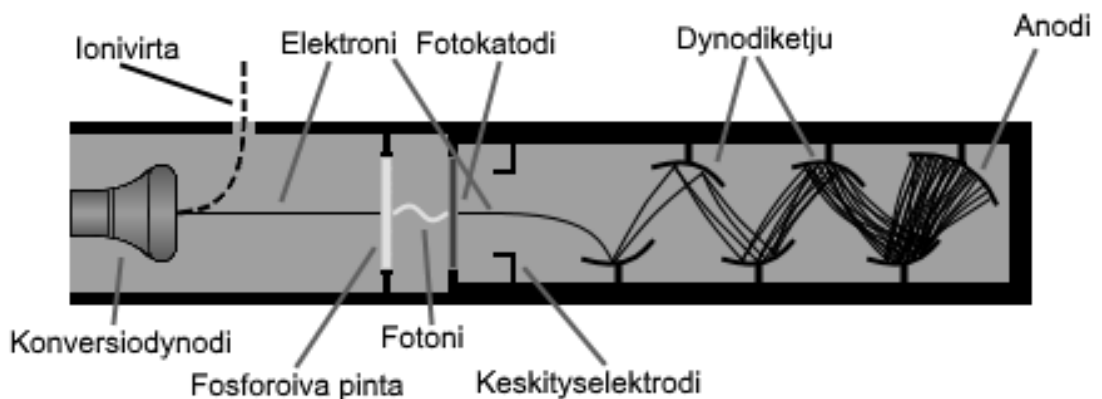
Kuvan 18 ensimmäinen tekniikka, tuoteionipyyhkäisy, mahdollistaa tietyn lähtöionin tuoteionien spektrin mittaamisen; kuvan 18 toinen tekniikka, lähtöionipyyhkäisy, mahdollistaa tietyn hajoamistuotteen lähtöionien havaitsemisen; kuvan 18 kolmas tekniikka, neutraalipalan lohkeamispyyhkäisy, puolestaan mahdollistaa neutraalien lohkeamien havaitsemisen, kun pyyhkäistävien kvadrupolien välinen massaero on vakio ja kuvan 18 viimeinen tekniikka mahdollistaa tarkan tiettyjen lähtö- ja tuoteionien tarkkailun. Kuvan 18 viimeistä tekniikkaa kutsutaan valittujen reaktioiden seurannaksi (selected reaction monitoring, SRM), jonka avulla voidaan tarkasti tunnistaa haluttuja yhdisteitä, jos niiden massa-varaus -suhteet ja hajoamistuotteet ovat tunnettuja. Vaihtelemalla ensimmäisen ja kolmannen kvadrupolin valittuja massa-varaus -suhteita voidaan tällä tekniikalla havainnoida useampia yhdisteitä samanaikaisesti (multiple reaction monitoring, MRM). [22, s. 32–34.]

### 2.2.2.3 Detektorit

Massaspektrometriassa detektorien tehtävänä on havaita ja vahvistaa massa-analysaattoreista tulevien ionien signaali ja muuttaa se digitaaliseen muotoon. Yleisimpiä massaspektrometriassa käytettyjä detektoreja ovat Faraday-kuppi, elektronimonistin, mikrokanavalevy, valomonistin, valokuvauslevy ja suora virran mittaus. [22, s. 96–102.]

#### Valomonistin Daly-detektorissa

Näyteionin saapuessa Daly-detektorille se aluksi iskeytyy korkeajännitteiseen konversiodynodiin, minkä seurauksena syntyy purkaus sekundaarisia elektroneja. Nämä elektronit jatkavat matkaansa korkeajännitteiselle fosforoivalle pinnalle, joka elektronien siihen törmätessä emittoi fotoneja. Emitteroitut fotonit muutetaan valomonistinputkella fotokatodin avulla takaisin elektroneiksi, jotka tämän jälkeen vahvistetaan useiden dynodien avulla ja lopulta havaitaan anodilla. Valomonistimen etu tavalliseen elektronimonistimeen verrattuna on sen pitkäikäisyys, sillä detektorin herkimvät osat ovat erillisessä vakuuissa fosforoivan pinnan takana. [22, s. 96–102.]



Kuva 19. Valomonistimen toimintaperiaate osana Daly-detektoria massaspektrometrissä.



### 3 Reagenssit ja laitteet

Alla olevissa luvuissa on listattu työssä käytetyt reagenssit, analyytit ja laitteet asetuksiin.

#### 3.1 Reagenssit

Työssä käytetyt reagenssit olivat laadultaan kaikki LC-MS laatuluokkaa, jos kyseisen reagenssin kohdalla se oli mahdollista. Taulukossa 2 on listattu työssä käytetyt reagenssit, jotka eivät olleet analyytteja.

Taulukko 2. Työssä käytettyjen reagenssien tiedot. Laboratorioveden osalta on listattu puhdistamiseen käytetyn laitteen malli ja valmistaja.

	Valmistaja	Lot	CAS
Ammoniumformiaatti	Fluka	BCBK7847V	540-69-2
Asetonitrili	VWR	12K211512	75-05-8
Etikkahappo	Fluka	BCBS3388V	64-19-7
Laboratoriovesi	Millipore, Milli-Q Integral 5, ultra-pure		
Magnesiumsulfaatti	Sigma-Aldrich	MKBR2243V	7487-88-9
Metanoli	Merk	-	67-56-1
Muurahaishappo	VWR	-	64-18-6

Työssä käytetyistä viidestäkymmenestä mykotoksiinista suurin osa tilattiin erityisesti menetelmän kehitystä varten. Jo valvonnassa olevien mykotoksiinien osalta työssä käytettiin laboratorion säilyttämiä liuoksia. Mykotoksiinien käyttötiedot on listattu taulukossa 3.

Taulukko 3. Työssä käytettyjen mykotoksiinien tiedot.

Mykotoksiini	Valmistaja	Lot	CAS
3-Asetyylideoksinivalenoli	Romer Labs	S17481A	50722-38-8
15-Asetyylideoksinivalenoli	Romer Labs	S17083G	88337-96-6
Aflatoksiini B1	Romer Labs	L18022D	1162-65-8
Aflatoksiini B2	Romer Labs	L18022D	7220-81-7
Aflatoksiini G1	Romer Labs	L18022D	1165-39-5
Aflatoksiini G2	Romer Labs	L18022D	7241-98-7
Altenueeni	Romer Labs	L17112A	889101-41-1
Alternariol	Romer Labs	L17494A	641-38-3

Alternariol monome-tyylieetteri	Romer Labs	L15521B	26894-49-5
Beauverisiini	Romer Labs	L17222B	26048-05-5
Deoksinivalenoli	Romer Labs	L16454M	51481-10-8
Deoksinivalenoli-3-glukosidi	Romer Labs	L17501B	131180-21-7
Diasetoksiskirpenoli	Romer Labs	L17453D	2270-40-8
Enniatiini A	Sigma-Aldrich	065M4150V	2503-13-1
Enniatiini A1	Sigma-Aldrich	117M4059V	4530-21-6
Enniatiini B	Sigma-Aldrich	047M4003V	917-13-5
Enniatiini B1	Sigma-Aldrich	027M4070V	19914-20-6
Ergokorniini	Romer Labs	L17471G	564-36-3
Ergokorniniini	Romer Labs	L17502C	564-37-4
Ergokristiini	Romer Labs	L17471E	511-08-0
Ergokristiniini	Romer Labs	L17292E	511-07-09
Ergokryptiini	Romer Labs	L17502E	511-09-1
Ergokryptiniini	Romer Labs	L17173B	511-10-4
Ergometriini	Romer Labs	L17353M	60-79-7
Ergometriiniini	Romer Labs	L17173A	479-00-5
Ergosiini	Romer Labs	L17353E	561-94-4
Ergosiniini	Romer Labs	L17094S	596-88-3
Ergotamiini	Romer Labs	L17173F	113-15-5
Ergotamiiniini	Romer Labs	L17471C	639-81-6
Fumonisiini B1	Romer Labs	S16000A	116355-83-0
Fumonisiini B2	Romer Labs	S15071F	116355-84-1
Fumonisiini B3	Romer Labs	L18025A	136379-59-4
Fusarenoni-X	Romer Labs	L17012B	23255-69-8
HT-2 Toksiini	Romer Labs	L16454M	26934-87-2
Moniliformiini	Romer Labs	L17293M	31876-38-7
Neosolanioli	Romer Labs	L17365N	36519-25-2
Nivalenoli	Romer Labs	L17413N	23282-20-4
Okratoksiini A	Sigma-Aldrich	122H4037	303-47-9
Okratoksiini B	Romer Labs	L17394B	4825-86-9
Sitriiniini	Romer Labs	L16431C	518-75-2
Sterigmatokystiini	Romer Labs	L17205A	10048-13-2
T-2 toksiini	Romer Labs	L16454M	21259-20-1
Tentoksiini	Romer Labs	L17303T	28540-82-1
Tenuatsoonihappo	Romer Labs	L17302S	610-88-8
Zearalanoni	Romer Labs	L17365Z	5975-78-0
Zearalenoni	Romer Labs	L16454M	17924-92-4
$\alpha$ -zearalanoli	Sigma-Aldrich	066M4094V	26538-44-3
$\alpha$ -zearalenoli	Sigma-Aldrich	017M4040V	36455-72-8
$\beta$ -zearalanoli	Sigma-Aldrich	067M4004V	42422-68-4
$\beta$ -zearalenoli	Sigma-Aldrich	117M4020V	71030-11-0

### 3.2 Laitteet ja tarvikkeet

Työssä käytetyn LC-MS laitteiston osat on eritelty alla sekä massaspektrometrin yleiset asetukset on esitetty taulukossa 4:

- Xevo TQ tandem MS/MS Massaspektrometri, Waters
  - ZSpray-ionilähde, Waters
  - XDS35i-kierukkakompressori, Edwards
  - typpi 5.0 API-kaasuna, AGA
  - argon törmäyskaasuna, AGA
  
- Acquity UPLC nestekromatografi, Waters
  - Acquity UPLC HSS T3 käänteisfaasikolonni; 2,1 mm x 100 mm; 1,8 µm; Waters
  - Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> käänteisfaasikolonni; 2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm; Waters.

Taulukko 4. Työssä käytetyt Xevo TQ:n yleiset asetukset.

	ESI+	ESI-
Capillary (kV)	3,30	2,75
Desolvation temperature (C°)	500	500
Desolvation gas flow (l/h)	950	950
Cone gas flow (l/h)	50	50
Analyser 1 low mass resolution	2,75	2,73
Analyser 1 high mass resolution	14,48	14,33
Analyser 1 ion energy	0,5	0,3
Analyser 2 low mass resolution	2,87	3,00
Analyser 2 high mass resolution	14,53	14,38
Analyser 2 ion energy	0,5	0,7
Collision gas flow (ml/min)	0,15	0,15
Source temperature (C°)	150	150

Työn suorittamisessa käytettiin myös erinäisiä vortex-sekoittimia, haihduttimia, ravistimia, sentrifugeja, automaattipipettejä ja yleisiä laboratoriolasitavaroita. Analyyttien kanssa kontaktissa olleet lasitavarat pestiin etukäteen rikkihapolla mahdollisten pesuainejäämien tuhoamiseksi.

## 4 Työn toteutus

Alustavasti kehitettävän menetelmän suunniteltiin pohjautuvan Euroopan standardointikomitean (Comité Européen de Normalisation, CEN) mykotoksiinien moniyhdistemenehtelmän luonnokseen [1]. Luonnoksen menetelmässä näyte esikäsitellään uuttamalla se etikkahapolla happamaksi tehdyllä asetoniiniliuokseen ja veden seoksella käyttäen magnesiumsulfaattia faasijakauman aiheuttavana suolana. Uutteesta valmistetaan luonnoksessa injektio-liuos laimentamalla se vedellä, joka johtaa happamaan noin 1:1 ACN-vesi-injektio-liuokseen. Nestekromatografiassa luonnos suosittelee ajoliuoksena käytettävän metanoli-vesigradienttia.

### 4.1 Mykotoksiinien massaprofiilien virittäminen

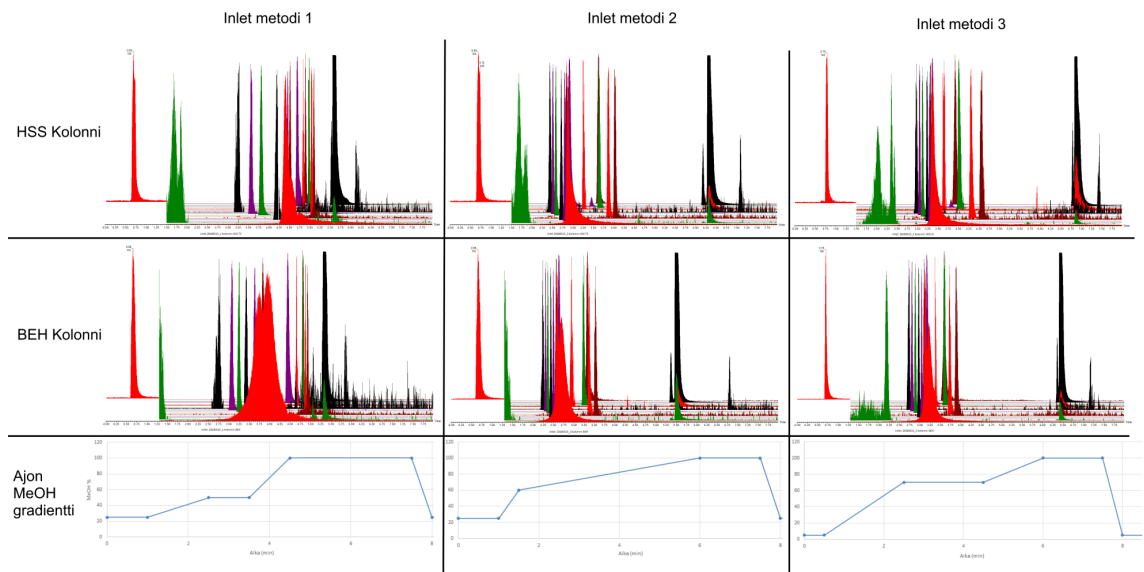
Mykotoksiinien massaprofiilit viritettiin suorainjektiolla analyyttien ollessa liuotettuna mahdollisimman paljon lopullisia ajo-olosuhteita vastaavaan 1:1 metanoli-vesiliuokseen,

joka myös sisälsi 0,1% muurahaishappoa ja 4,8 mmol/l ammoniumformiaattia. Analyytit pyrittiin virittämään 1 µg/ml konsentraatioista, mutta joidenkin mykotoksiinien kanssa alkuperäisten liuosten laimeudesta johtuen tämä ei aina ollut mahdollista. Analyyteilta etsittiin mahdollisia taulukon 1 yleisiä lähtöioneja sekä näille pilkeioneja ESI+ - ja ESI- -ionisaatiotekniikoilla. Viritys tehtiin osittain MassLynx-ohjelmiston IntelliStart-ominaisuudella, joka mahdollistaa yhdisteiden automaattisen virittämisen, ja osittain manuaalisesti niiden yhdisteiden osalta, jotka vaikuttivat aiheuttavan ongelmia automaattisessa virityksessä.

Virityksessä varioitiin massaspektrometrin API-yksikön keräimen jännitettä sekä törmäskammiossa lentävien hiukkasten törmäysenergiaa. API-yksikön keräimen jännitettä säätämällä pyrittiin maksimoimaan mahdollisten lähtöionien vasteet ja törmäysenergiaa säätämällä pyrittiin löytämään suurimmat pilkeionien vasteet. Prosessin nopeuttamiseksi osa analyyteistä viritettiin yhteisistä liuoksista, jos yhdisteiden monoisotoopit olivat tarpeeksi kaukana toisistaan, jotteivat nämä häiritsisi toisiaan. Viritettyjen massaprofiilien perusteella jokaiselle yhdisteelle saatiin määritettyä ainakin yksi lähtöioni, jolle myös löydettiin kaksi pilkeionia. Näitä määritettyjä lähtöioni-pilkeioniprofiileja mitattiin MRM-tekniikalla työn seuraavissa vaiheissa.

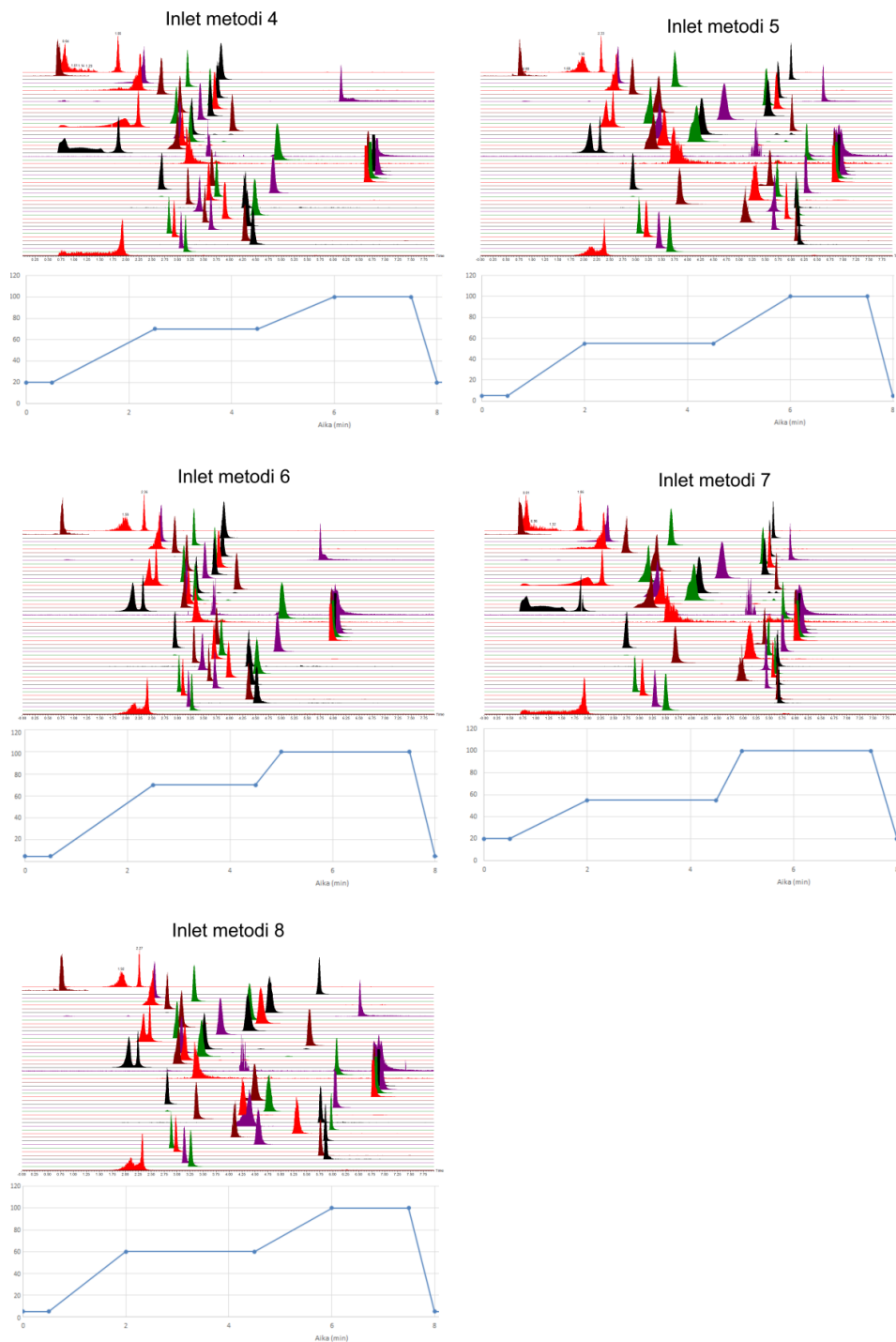
#### 4.2 Nestekromatografisen menetelmän kehitys

Kromatografisen menetelmän kehitys aloitettiin valitsemalla analyyteistä koko työn mykotoksiinien kromatografisia ominaisuuksia edustava kuudentoista toksiinin joukko, jonka perusteella pyrittiin löytämään gradientille ja ajon pituudelle sopiva aloituspiste piikkien muodon ja kromatografisen erottuvuuden perusteella. Edelleen nestekromatografian puolella analyyttien pitoisuuksina pyrittiin pitämään 1 µg/ml injektio-liuoksessa. Ensimmäisten ajojen yhteydessä testattiin erilaisia gradientteja sekä BEH C<sub>18</sub>- ja HSS T3 -kolonnien eroja (kuva 20), minkä jälkeen työn mykotoksiineista testattiin vielä erillisesti läheisten isomeerien kromatografista erotusta samoilla kolonneilla (ergotalkaloidit, zearalenonin eri metaboliitit sekä 15-Ac-DON ja 3-Ac-DON).



Kuva 20. Esimerkki useiden ajojen massaspektrien koosteesta, jossa on vertailtu erilaisten orgaanisten faasien gradienttien sekä kolonnien eroja piikkien muodoissa sekä kromatografisessa erotuksessa. Näiden ajojen perusteella menetelmän kehityksessä päädyttiin käyttämään HSS-kolonnia sekä inlet metodi 3:een perustuvaa gradienttia. Näiden parametrien yhdistelmällä piikkien muoto sekä kromatografinen erotus oli sopivassa tasapainossa. Täysikokoinen kuva löytyy liitteestä 1. Kuvan yhdisteiden kromatogrammit on normalisoitu niiden omiin maksimeihin.

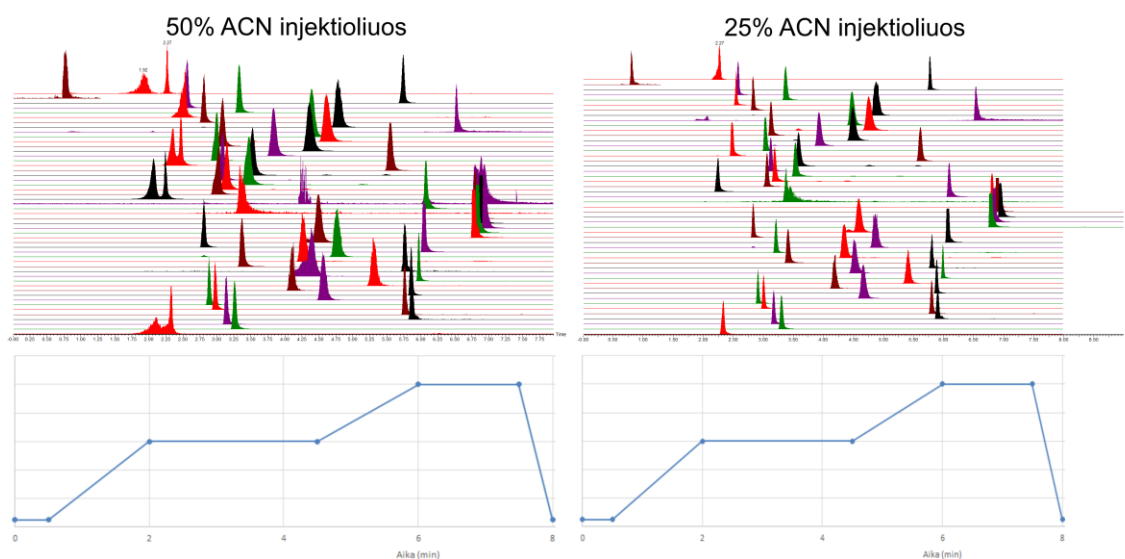
Sopivimman kolonnin löydyttyä nestekromatografisen menetelmän kehitystä jatkettiin jakamalla työn mykotoksiinit viiteen ryhmään, minkä tarkoituksena oli estää isomeerien päällekkäisyydet. Gradientin kehityksen ollessa vielä kesken yhdisteiden retentioajat eivät olleet vielä tarkkaan määritettyjä, joten analyyttien mittauksen aikaikkunoiden tuli käsittää useimmiten koko ajo. Käytössä ollut massaspektrometri myöskään ei kyennyt mittaamaan tarpeeksi useata kanavaa viidellekymmenelle yhdisteelle näiden aikaikkunoiden ollessa päällekkäin. Yhdisteiden jako erillisiin liuoksiin mahdollisti massaspektrometrin mittaavan kaikkia ryhmän yhdisteitä jatkuvasti ja samanaikaisesti. Jatkunutta gradienttien kehitystä on esitetty kuvassa 21 ja liitteessä 2.



Kuva 21. Testattuja gradientteja HSS-kolonnin kanssa. Kuvassa jokainen massaspektri vastaa alemmaa orgaanisen faasin metanoli gradienttia. Kuvan gradientteista kahdeksas gradientti saavutti parhaan kompromissin piikkien muodon ja kromatografisen erotuksen kanssa. Täysikokoinen versio kuvasta löytyy liitteestä 2. Kuvan yhdisteiden kromatogrammit on normalisoitu niiden omiin maksimeihin.

Kaikki mykotoksiinit sisältäneiden ajojen perusteella toksiinien joukosta tunnistettiin muutama ongelmallinen yhdiste (DON, DON-3-G, TEA, ergometriini ja ergometriiniini),

joiden kromatogrammien piikit hajosivat kaikilla tähän asti testatuilla vesi-metanoli gradientteilla. Näiden piikkien stabiloimiseksi ajon eri parametreja varioitiin; ACN ja ACN-MeOH pohjaisia ajoliuoksia, erilaisia gradienttimuutoksia sekä injektoliuoksen muutoksia testattiin useiden ajojen yhteydessä. Lopulta piikkien todettiin pysyvän yhtenäisinä injektoliuoksen sisältäessä enintään noin 25 % ACN:ä, jonka pitoisuus aikaisemmissa testeissä injektoliuoksessa oli 50 %. Kuvassa 22 on havainnollistettu injektoliuoksen vaikutusta.



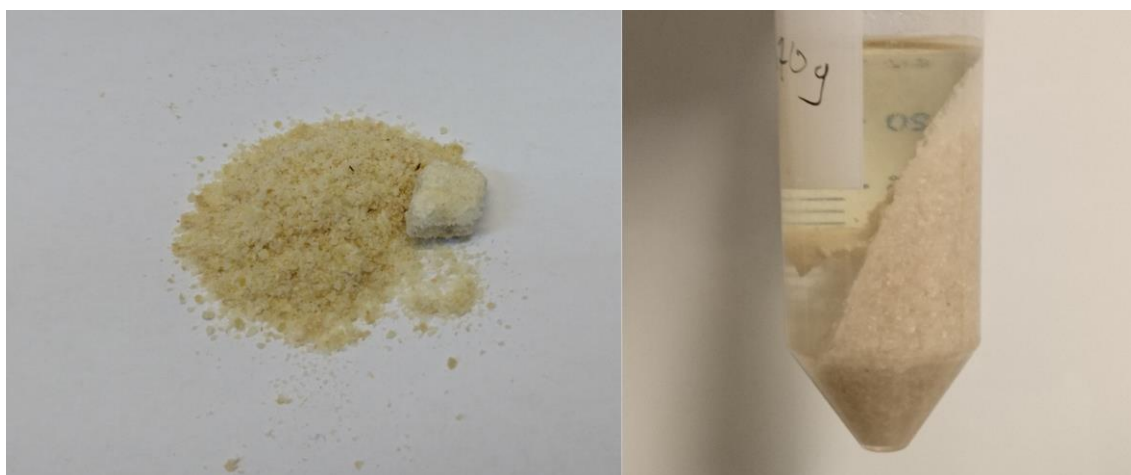
Kuva 22. Kaikkien mykotoksiinien kromatogrammit, jotka on ajettu samalla gradientilla testaten erilaisia injektoliuoksia. 25-prosenttisellä ACN-injektoliuoksella ensimmäisinä eluoituvat piikit eivät ole hajonneita, kuten 50-prosenttisellä ACN-injektoliuoksella, joka on huomattava parannus. Myös ajon keskivaiheilla n. 4 minuutin kohdalla eluoituvien analyttien kromatogrammit ovat terävämpiä. Kuvan yhdisteiden kromatogrammit on normalisoitu niiden omiin maksimeihin.

#### 4.3 LC-MS-parametrien viimeistely ja esikäsittelytesti

Sopivan vesi-metanoligradientin ja injektoliuoskoostumuksen löydyttyä voitiin metodiin määrittää jo tarkemmat retentioajat yhdisteille ja näin pystyttiin suorittamaan ajoja, joissa kaikki analyytit olivat samassa liuoksessa. Määritettyjä gradienttia hiottiin yhä hieman muutaman ajon yhteydessä muuttamalla ajon liikkuvan faasin gradienttia, minkä jälkeen suoritettiin vielä esikäsittelymenetelmän testi CENin luonnoksen mukaisesti käyttämällä Tullilaboratorion säilyttämää durumvehnäjauhonäytettä matriisina, josta on esimerkki kuvassa 23. Esikäsittelyä testattiin seitsemällä näytteellä, joista kolmeen lisättiin kaikkia analyyttejä sisältävää liuosta, kolme muuta toimivat kontrollinäytteinä ilman analyyttejä



ja viimeinen toimi tyhjänä näytteenä ilman analyytejä tai näytematriisia. Mykotoksiinilisäyksen pitoisuus näytteisiin toksiinista riippuen vaihteli 20–100 µg/kg välillä riippuen toksiinien pitoisuuksista erinäisissä standardiliuoksissa, joitain poikkeuksia lukuun ottamatta. Esikäsitelyssä viiteen grammaan näytettä lisättiin 10 ml laboratoriovettä sekä 10 ml 1 % etikkahappoa sisältävää asetonitriliä, minkä jälkeen näyte suspendoitiin liuokseen ravistelemalla mekaanisella ravistimella 30 min ajan. Suspendoinnin jälkeen seokseen lisättiin viisi gramma magnesium sulfaattia ja ravisteltiin voimakkaasti n. 30 sekuntia. Lisäyksen jälkeen näyte sentrifugoitiin 3000 g:ssä viiden minuutin ajan. Syntyneestä ylemmästä ACN-faasista pipetoitiin 50 µl vialiin, johon lisättiin vielä 50 µl:n laboratoriovettä. Vesilaimennos tehtiin, sillä CEN -luonnos arvioi ylemmän ACN faasin sisältävän vain 17 % vettä, joka voi ratkaisevasti vaikuttaa piikkien muotoon. Valmiit näytteet ajettiin LC-MS-parametrien optimoinnin perusteella luodulla ohjelmalla.



Kuva 23. Vasemmalla kuvassa on esikäsittelemätöntä durumvehnäjauhoa ja oikealla esikäsitellyn osalta valmis jauhonäyte, jossa on myös näkyvä ACN-vesifaasin raja hieman etiketin alapuolella. Faaseista ylempi on injektoliuoksessa käytettävä laimennettava näyte.

## 5 Tulokset

Alla olevissa luvuissa esitetään toteutusvaiheessa saatuja tuloksia UHPLC-MS/MS-laitteiston parametreille sekä esikäsitelytestin tulokset.

## 5.1 Mykotoksiinien massaprofiilit

Taulukossa 5 on esitetty mykotoksiinien massaprofiilien virityksessä saatu data, jota käytettiin menetelmän detektioasetuksissa. Suurin osa analyyteistä saatiin ionisoitua positiivisessa ESI-tilassa, tosin muutama analyytti ionisoitui vain negatiivisessa ESI-tilassa. Samoin suurin osa analyyteistä ionisoituivat yksinkertaisiksi protonoituneiksi tai deprotonoituneiksi  $[M+H]^+$  tai  $[M-H]^-$  lähtöioneiksi, vain muutamalla analyytillä erinäiset adduktit saavuttivat vahvemman vasteen. Vaihtoehtoisia pysyviä addukteja, joita ei ole esitetty tässä taulukossa, löytyi etenkin ergotalkaloideille ja enniatiineille.

Taulukko 5. Mykotoksiinien massaprofiilit. Taulukossa on esitetty vain vahvimman vasteen antanut lähtöioni sekä sen kaksi vahvinta pilkeionia.

	Monoisotoppi	ESI-tila	Lähtöioni	Lähtöioni (m/z)	1. pilkeioni (m/z)	2. pilkeioni (m/z)	API-yksikön jännite (cone) (V)	1. Pilkeionin törmäysenergia (eV)	2. Pilkeionin törmäysenergia (eV)
3-Asetyyli-deoksinivale-noli	338,1	ESI+	$[M+H]^+$	339,20	137,08	105,04	20	36	48
15-Asetyyli-deoksinivale-noli	338,1	ESI+	$[M+H]^+$	339,13	90,99	76,69	30	50	44
Aflatoksiini B1	312,0	ESI+	$[M+H]^+$	313,10	284,95	241,14	38	22	36
Aflatoksiini B2	314,0	ESI+	$[M+H]^+$	315,10	287,15	259,10	43	25	28
Aflatoksiini G1	328,0	ESI+	$[M+H]^+$	329,09	243,10	199,94	38	26	38
Aflatoksiini G2	330,0	ESI+	$[M+H]^+$	331,11	313,09	245,04	52	22	28
Altenueeni	292,1	ESI+	$[M+H]^+$	293,15	257,15	275,15	16	15	10
Alternariol	258,1	ESI+	$[M+H]^+$	259,70	185,06	127,99	44	30	44
Alternariol monometyylietteri	272,1	ESI-	$[M-H]^-$	271,00	256,01	227,94	36	22	30
Beauverisiini	783,4	ESI+	$[M+H]^+$	784,40	134,10	244,20	42	27	26
Deoksinivale-noli	296,3	ESI+	$[M+H]^+$	297,16	249,13	203,12	17	10	14
Deoksinivale-noli-3-glukosidi	458,2	ESI-	$[M+HCOO]^-$	503,10	427,17	457,20	24	24	16
Diasetoksis-kirpenoli	366,2	ESI+	$[M+NH_4]^+$	384,23	307,20	105,04	36	24	24
Enniatiini A	681,5	ESI+	$[M+H]^+$	682,53	210,18	228,24	26	18	28
Enniatiini A1	667,4	ESI+	$[M+NH_4]^+$	685,56	668,47	210,18	44	24	27
Enniatiini B	639,4	ESI+	$[M+H]^+$	640,40	196,10	214,10	44	26	55
Enniatiini B1	653,4	ESI+	$[M+H]^+$	654,40	196,10	100,10	28	24	44

Ergokorniini	561,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	562,33	268,20	208,10	22	14	28
Ergokorniini	561,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	562,40	544,40	277,23	26	38	48
Ergokristiini	609,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	610,33	223,18	208,10	18	16	36
Ergokristiini	609,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	610,40	592,37	223,18	30	26	46
Ergokryptiini	575,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	576,40	268,21	208,10	22	16	34
Ergokryptiini	575,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	576,40	558,39	223,18	30	24	30
Ergometriini	325,2	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	326,23	223,14	208,06	18	28	26
Ergometriini	325,2	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	326,23	208,13	223,14	28	32	44
Ergosiini	547,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	548,33	223,18	208,05	22	32	16
Ergosiini	547,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	548,33	223,18	530,34	26	34	46
Ergotamiini	581,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	582,33	223,18	208,05	20	32	16
Ergotamiini	581,3	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	582,33	223,18	564,32	48	40	34
Fumonisiini B1	721,8	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	722,42	334,34	352,34	44	39	44
Fumonisiini B2	705,8	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	706,39	336,36	318,36	48	40	52
Fumonisiini B3	705,4	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	706,50	336,42	109,50	18	16	8
Fusarenoni-X	354,1	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	355,13	175,03	247,11	14	14	14
HT-2 Toksiini	424,5	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	442,31	263,15	215,13	36	24	24
Moniliformiini	97	ESI-	[M-H] <sup>-</sup>	96,95	41,00	79,95	20	10	18
Neosolanioli	382,2	ESI+	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	400,23	185,10	305,12	16	20	12
Nivalenoli	312,1	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	313,20	175,10	91,00	18	20	40
Okratoksiini A	403,8	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	404,11	239,03	101,92	22	24	62
Okratoksiini B	369,1	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	370,20	205,05	187,05	22	24	32
Sitriini	250,1	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	251,07	233,09	205,08	24	16	26
Sterigmatokystiini	324,1	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	325,07	281,12	310,05	40	36	24
T-2 toksiini	466,5	ESI+	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	484,32	185,10	305,14	18	22	12
Tentoksiini	414,2	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	415,30	312,20	302,13	28	20	14
Tenuatsooni-happo	197,1	ESI-	[M-H] <sup>-</sup>	196,00	139,04	112,00	46	22	22
Zearalanoni	320,2	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	321,21	303,22	189,09	20	14	20
Zearalenoni	318,4	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	319,11	283,18	301,17	20	14	10
α-zearalanoli	322,2	ESI-	[M-H] <sup>-</sup>	321,20	277,20	303,20	37	22	22
α-zearalenoli	320,2	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	321,23	303,22	285,22	10	8	10
β-zearalanoli	322,2	ESI-	[M-H] <sup>-</sup>	321,20	277,20	303,20	37	22	22
β-zearalenoli	320,2	ESI+	[M+H] <sup>+</sup>	321,17	303,16	285,16	10	8	12

## 5.2 Nestekromatografinen menetelmä

Menetelmän nestekromatografisten asetusten optimoinnissa päädyttiin taulukoissa 6 ja 7 esitettyihin asetuksiin.

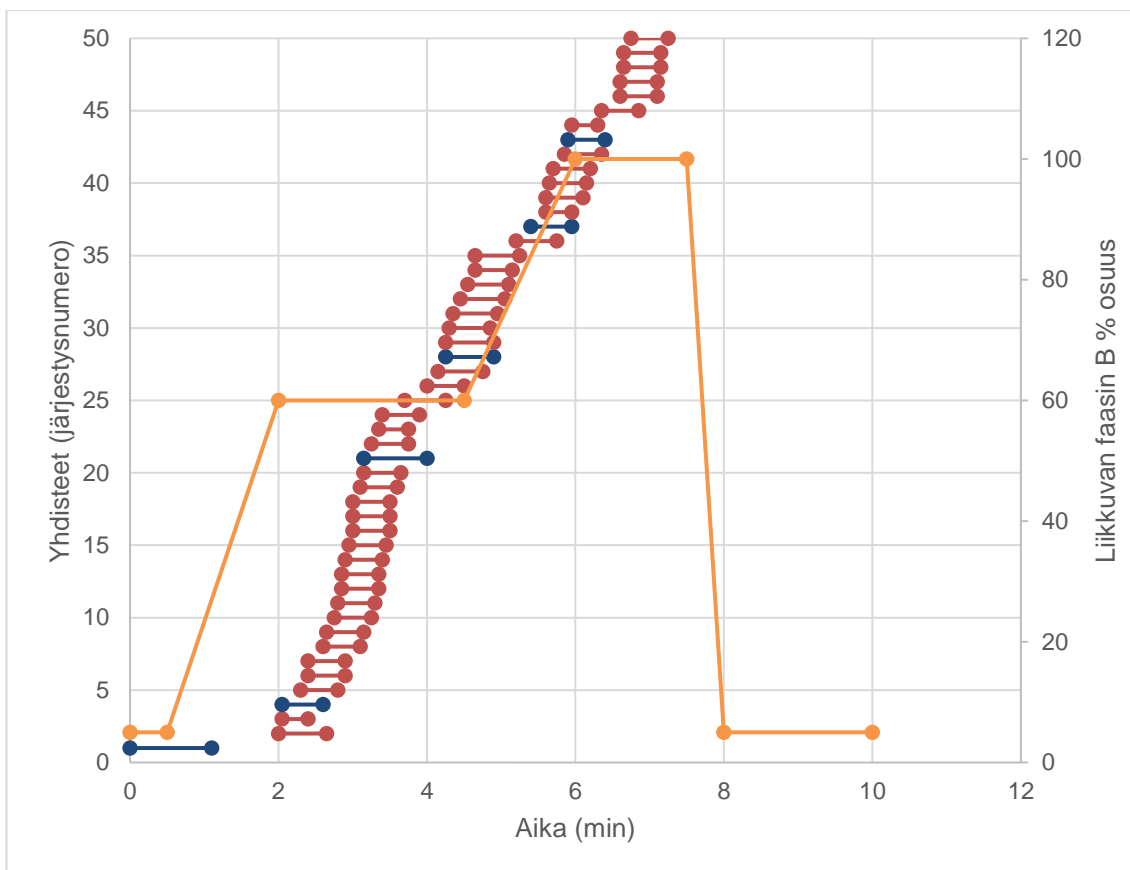
Taulukko 6. Nestekromatografian asetukset.

Kolonnei	Acquity UPLC HSS T3 kolonnei; 2,1 mm x 100 mm; 1,8 µm; Waters
Lämpötila	40 °C
Injektioilavuus	10 µl
Virtausnopeus	0,4 ml/min
Liikkuva faasi A	Vesi + 0,1 % muurahaishappoa ja 4,8 mmol/l ammonium formiaattia
Liikkuva faasi B	Metanoli + 0,1 % muurahaishappoa ja 4,8 mmol/l ammonium formiaattia
Injektioiluos	75 % vettä ja 25 % asetonitriiliuosta sisältäen 1 % etikkahappoa
Ionisaatiomoodi	ES +/- vuorottelu
Injektioneulan pe-suliuokset	900 µl 10 % MeOH, 300 µl 80 % MeOH

Taulukko 7. Nestekromatografian gradientti.

Aika (min)	Liikkuva faasi A (%)	Liikkuva faasi B (%)
0,0	95	5
0,5	95	5
2,0	40	60
4,5	40	60
6,0	0	100
7,5	0	100
8,0	95	5
10,0	95	5

Taulukon 7 gradientti on esitetty kuvassa 24. Kuvassa 24 on myös esitetty taulukon 8 massaspektrometrin retentioaikoihin perustuvat yhdisteiden aikaikkunat.



Kuva 24. Nestekromatografisen liikkuvan faasin MeOH gradientin kuvaaja oranssilla, ESI+ aikaikkunat punaisella ja ESI- sinisellä. Järjestysnumeroita vastaavat yhdisteet löytyvät taulukosta 8.

Taulukko 8 sisältää yhdisteiden retentioaikoihin perustuvat aikaikkunat kronologisessa järjestyksessä. Taulukon arvoilla datapisteiden määrä piikkiä kohti oli keskimääräisesti 12,048.

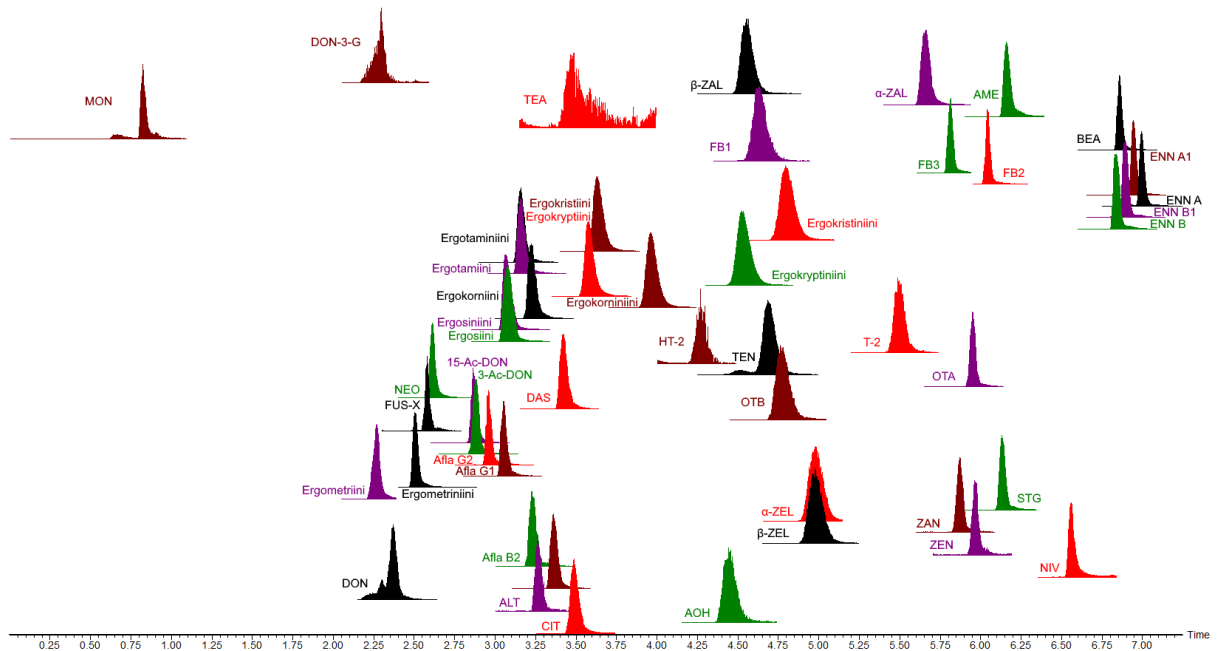
Taulukko 8. Yhdisteiden retentioaikoihin perustuvat aikaikkunat ja varsinaiset retentioajat.

Järjestysnumero	Yhdiste	Aikaikkunan alku (min)	Varsinainen retentioaika (min)	Aikaikkunan loppu (min)
1	Moniliformiini	0,00	0,82	1,10
2	Deoksinivalenoli	2,00	2,37	2,65
3	Ergometriini	2,05	2,27	2,40
4	Deoksinivalenoli-3-glukosidi	2,05	2,30	2,60
5	Fusarenoni-X	2,30	2,58	2,80
6	Ergometriniini	2,40	2,50	2,90
7	Neosolanioli	2,40	2,91	2,90
8	15-Asetyyliideoksinivalenoli	2,60	2,86	3,10
9	3-Asetyyliideoksinivalenoli	2,65	2,88	3,15
10	Aflatoksiini G2	2,75	2,96	3,25

11	Aflatoksiini G1	2,80	3,05	3,30
12	Ergosiini	2,85	3,08	3,35
13	Ergosiniini	2,85	3,07	3,35
14	Ergotamiini	2,90	3,16	3,40
15	Ergotamiini	2,95	3,16	3,45
16	Aflatoksiini B2	3,00	3,22	3,50
17	Ergokorniini	3,00	3,23	3,50
18	Altenueeni	3,00	3,26	3,50
19	Aflatoksiini B1	3,10	3,36	3,60
20	Diasetoksiskirpenoli	3,15	3,42	3,65
21	Tenuatsoonihappo	3,15	3,49	4,00
22	Sitriniini	3,25	3,49	3,75
23	Ergokryptiini	3,35	3,58	3,75
24	Ergokristiini	3,40	3,63	3,90
25	Ergokorniiniini	3,70	3,96	4,25
26	HT-2 Toksiini	4,00	4,27	4,50
27	Alternariol	4,15	4,44	4,75
28	$\beta$ -zearalanoli	4,25	4,56	4,90
29	Tentoksiini	4,25	4,68	4,90
30	Ergokryptiniini	4,30	4,52	4,85
31	Fumonisiini B1	4,35	4,63	4,95
32	Okratoksiini B	4,45	4,76	5,05
33	Ergokristiniini	4,55	4,79	5,10
34	$\alpha$ -zearalenoli	4,65	4,98	5,15
35	$\beta$ -zearalenoli	4,65	4,98	5,25
36	T-2 toksiini	5,20	5,49	5,75
37	$\alpha$ -zearalanoli	5,40	5,65	5,95
38	Fumonisiini B3	5,60	5,82	5,95
39	Zearalanoni	5,60	5,87	6,10
40	Okratoksiini A	5,65	4,95	6,15
41	Zearalenoni	5,70	5,96	6,20
42	Sterigmatokystiini	5,85	6,13	6,35
43	Alternariol monometyylietteri	5,90	6,16	6,40
44	Fumonisiini B2	5,95	6,04	6,30
45	Nivalenoli	6,35	6,56	6,85
46	Enniatiini B	6,60	6,84	7,10
47	Beauverisiini	6,60	6,86	7,10
48	Enniatiini B1	6,65	6,89	7,15
49	Enniatiini A1	6,65	6,95	7,15
50	Enniatiini A	6,75	6,99	7,25

Kuvassa 25 on esimerkki viimeisimmistä ajoista, jossa kaikki analyytit ajettiin samassa liuoksessa edellisten taulukoiden asetuksilla. Ainoa suoranaisesti hajonnut piikki kuuluu TEA:lle. Muita hieman hajonneita piikkejä ovat DON-3-G, DON sekä HT-2. Isomeerit 15-

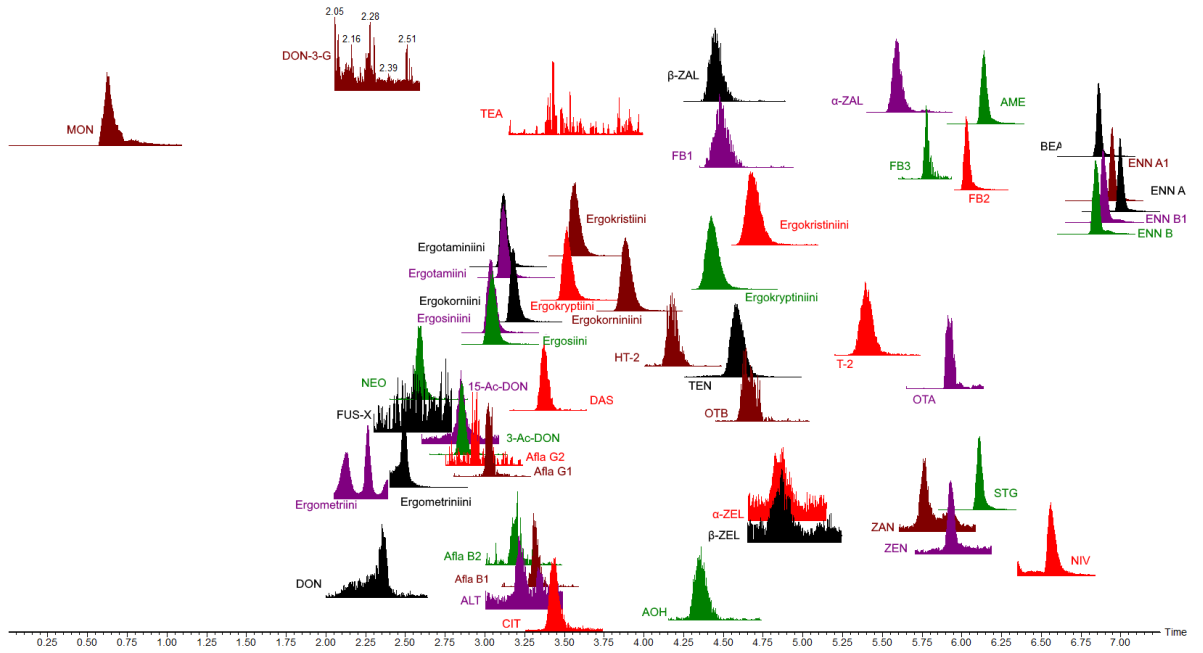
Ac-DON/3-Ac-DON, ergosiini/ergosiiniini, ergotamiini/ergotamiiniini sekä  $\alpha$ -ZEL/ $\beta$ -ZEL eivät juuri erottuneet kromatografisesti, mikä tarkoittaa edellä mainittujen yhdisteiden näkyvän toistensa kromatogrammeissa. Poolinen MON ei juuri pidäyty valittuun kolonniin.



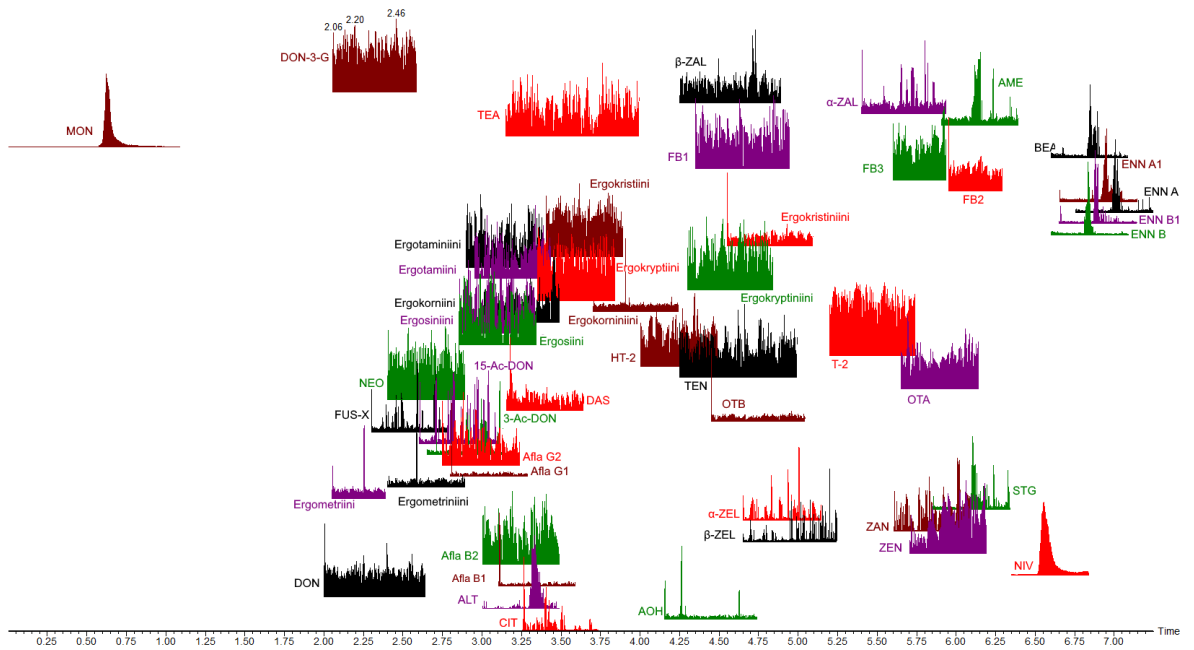
Kuva 25. Kaikkien analyttien kromatogrammit esimerkijajosta. Kaikki kromatogrammit ovat samasta injektioista. Yhdisteiden kromatogrammit on normalisoitu niiden omiin maksimeihin.

### 5.3 Esikäsitelytesti

Kuvissa 26, 27 ja 28 on esitetty esikäsitelytestin kromatogrammit. Lisäsnäytteen kromatogrammeissa on havaittavissa piikkien hajoamista erityisesti aikaisemmin mainittujen ongelmallisten yhdisteiden (DON, DON-3-G, TEA, ergometriini ja ergometriiniini) kohdalla, joka todennäköisesti johtuu lisäsnäytteen injektio-oliuksen ACN-pitoisuudesta, joka CEN-luonnoksen ohjeiden perusteella vielä erillisen vesilaimennoksen jälkeen on suurempi, kuin tavoiteltu 25 %. Nollanäytteen ja blankin kromatogrammeissa ei näy juuri mitään poikkeavaa NIV- ja MON-piikkejä lukuun ottamatta, jotka voivat johtua esimerkiksi "carry over" -ilmiöstä, jossa edellisten ajojen analyytit näkyvät seuraavassa ajossa. Ilmiön syytä on vaikea kommentoida ilman perusteellisempää testausta tai mahdollista validointia. Joidenkin analyttien, kuten DON-3-G:n, TEA:n, FUS-X:n, DON:n sekä  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ZEL:n kohdalla puuttuneet tai vähäiset vasteet saattoivat johtua liian vähäisestä lisäsnäytteen pitoisuudesta.

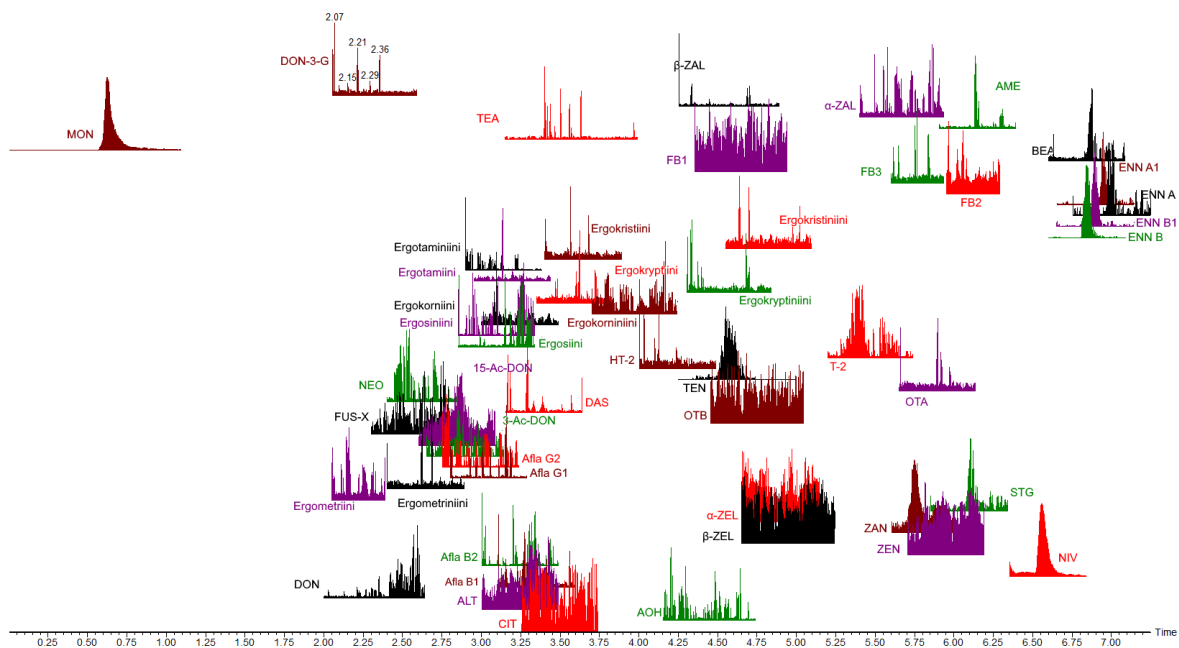


Kuva 26. Esikäsittelytestin lisäsnäytteen kromatogrammit. Yhdisteiden kromatogrammit on normalisoitu niiden omiin maksimeihin.



Kuva 27. Esikäsittelytestin nollanäytteen kromatogrammit. Yhdisteiden kromatogrammit on normalisoitu niiden omiin maksimeihin.





Kuva 28. Esikäsittelytestin blankin kromatogrammit. Yhdisteiden kromatogrammit on normalisoitu niiden omaan maksimeihin.

## 6 Päätelmät

Huolimatta yli viidenkymmenen kemiallisesti erilaisen yhdisteen yhteisen metodin kehittämisen haasteellisuudesta työssä onnistuttiin ionisoimaan kaikki viisikymmentä mykotoksiinia ja johdannaisyhdistettä ESI -tekniikalla ja kullekin löydettiin ainakin kaksi pilkeionia sekä näille yhdisteille löydettiin optimaaliset yhteiset olosuhteet, joiden vallitessa ne onnistuttiin erottamaan tehokkaasti nestekromatografialla. Optimointiprosessissa määritellyssä 25-prosenttisessä ACN-injektiooliuksessaan analyttien kromatografiset piikit ovat kaikki hyvänmuotoisia ja luettavia vähintäänkin kvalitatiivista määrittystä varten te-  
nuatsoonihappoa lukuun ottamatta. Menetelmän sisältämien isomeerien osalta isomeeripareja ergosiini/ergosiniini, ergotamiini/ergotamiini sekä  $\alpha$ -ZEL/ $\beta$ -ZEL ei onnistuttu erottamaan kromatografisesti, joten näiden yhdisteiden kvantitointi onnistuu luotettavasti vain isomeerien summana. Isomeeriparille 15-Ac-DON/3-Ac-DON löydettiin eri pilkeionit, mikä mahdollistaa näiden yhdisteiden spesifin määrittämisen. Yleisesti ottaen työn tavoitteet saavutettiin ja menetelmä tähän mennessä on pätevä tarkoitukseensa.

Kertaalleen toteutetussa esikäsitelytestissä kävi ilmi esikäsitelymetodin olevan osittain yhteensopimaton LC-MS-menetelmän kanssa, sillä esikäsitelyssä talteen otettavan ylemmän faasin ACN-pitoisuutta ei ole tarkkaan määritetty. Faasin ACN-pitoisuus on ilmeisesti huomattavasti suurempi kuin LC-ajon alkupuolen orgaanisen liuottimen osuus, mikä vaikuttaa haitallisesti erityisesti aikaisin ajossa eluoituvien DON:in, ergometriinin ja ergometriniinin piikkien muotoihin. Lopullista näyteliuosta jouduttaisiin laimentamaan näin ollen huomattavasti, jotta päästäisiin 25 %:n ACN-pitoisuuteen. Huomattava injektio-  
liuoksen laimentaminen saattaa myös pienentää vasteita vähäisiltä analyyttien pitoisuuksilta.

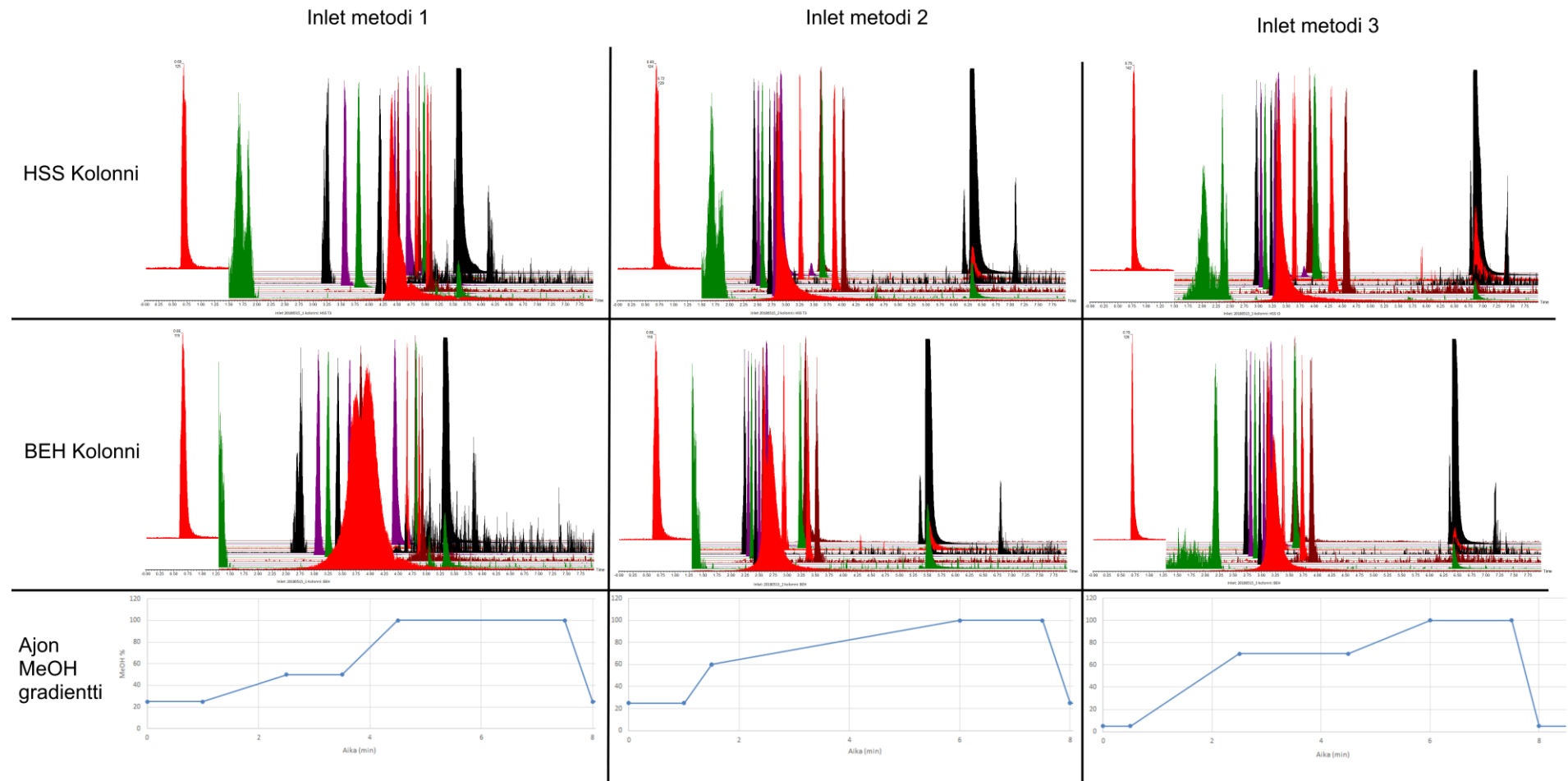
Opinnäytetyön onnistunut LC-MS-parametrien optimointi mahdollistaa tullilaboratorion siirtyvän menetelmän esikäsitelyn tarkempaan kehitykseen sekä lopulta mahdolliseen validointiin sekä menetelmän käyttöönottoon rutiinivalvonnassa. Menetelmän käyttöönotto mahdollistaisi elintarvikkeiden biologisten tutkimusten jaoston valvomaan jo mitattuja mykotoksiineja nopeammin ja vaivattomammin yhdellä menetelmällä, mikä puolestaan vapauttaisi jaoston omia resursseja mahdollisesti joko suuremman näytemäärän seurantaan tai muiden jaostojen käyttöön.

## Lähteet

- 1 Comité Européen de Normalisation Technical Committee 275 (CEN/TC 275). 2018. Foodstuffs — Multimethod for the screening of ochratoxin A, aflatoxin B1, deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B1 and B2 in foodstuffs, excluding foods for infants and young children, by HPLC-MS/MS. Saksa: Comité Européen de Normalisation.
- 2 Marin, S; Ramos, A.J; Cano-Sancho, G & Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. Espanja: Elsevier.
- 3 Bennett, J. W & Klich, M. 2003. Mycotoxins. USA: American Society for Microbiology.
- 4 Komission asetus (EY) N:o 1881/2006, tiettyjen elintarvikkeissa olevien vierasainneiden enimmäismäärien vahvistamisesta. 2006. Euroopan Yhteisöt.
- 5 Kuster, Lilian. 2017. *Alternaria* toxins. Spot on, 5. numero, s. 6.
- 6 Prosperini, Alessandra; Berrada, Houda; Ruiz, María José; Caloni, Francesca; Coccini, Teresa; Spicer, Leon J; Perego, Maria Chiara & Lafranconi, Alessandra. 2017. A Review of the Mycotoxin enniatin B. Verkkoaineisto. *Frontiers in Public Health*. <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2017.00304/full>> 16.11.2016. Luettu 26.6.2018.
- 7 Krska, Rudolf; Richard, John L; Schuhmacher, Rainer; Slate, Andrew B & Whitaker, Thomas B. 2012. *Romer Labs Guide to Mycotoxins*. Englanti: Anytime Publishing Services.
- 8 Schiff, Paul L. 2006. *Ergot and Its Alkaloids*. USA: American Journal of Pharmaceutical Education.
- 9 Ergot Alkaloids. Verkkoaineisto. <<http://www.mycotoxins.info/en/mycotoxins/common-mycotoxins/ergot-alkaloids/>>. Luettu 2.7.2018.
- 10 Yazar, Selma & Omurtag, Gulden Z. 2008. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. Verkkoaineisto. *International Journal of Molecular Sciences*. <<http://www.mdpi.com/1422-0067/9/11/2062>> 31.10.2008. Luettu 24.6.2018.
- 11 Fuchs, Radovan; Hult, Karl; Peraica, Maja; Radić, Božica & Pleština, Radovan. 1984. Conversion of Ochratoxin C into Ochratoxin A In Vivo. USA: American Society for Microbiology.
- 12 Reddy, Lalini & Bhoola, Kanti. 2010. Ochratoxins—Food Contaminants: Impact on Human Health. Verkkoaineisto. *Toxins*. <<http://www.mdpi.com/2072-6651/2/4/771>> 20.4.2010. Luettu 26.6.2018.

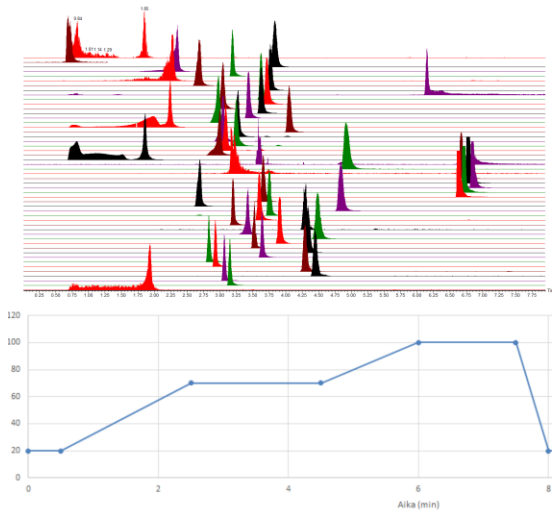
- 13 Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-122. Verkkoaineisto. International Agency for Research on Cancer. <<https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/>> Luettu 26.6.2018.
- 14 McCormick, Susan P; Stanley, April M; Stover, Nicholas A & Alexander, Nancy J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. Verkkoaineisto. Toxins. <<http://www.mdpi.com/2072-6651/3/7/802>> 1.7.2011. Luettu 23.6.2018.
- 15 Lerda Donata. 2011. Mycotoxins Factsheet, 4th edition. Belgia: Euroopan komission yhteinen tutkimuskeskus.
- 16 Pronk, M.E.J; Schothorst, R.C & Van Egmond, H.P. 2002. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. Alankomaat: National Institute for Public Health and the Environment.
- 17 Zearalenone. Verkkoaineisto. <<http://www.mycotoxins.info/en/mycotoxins/common-mycotoxins/zearalenone/>>. Luettu 30.6.2018.
- 18 Fraeyman, Sophie; Croubels, Siska; Devreese, Mathias & Antonissen, Gunther. 2017. Emerging Fusarium and Alternaria Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. Verkkoaineisto. Toxins. <<http://www.mdpi.com/2072-6651/9/7/228>> 18.7.2017. Luettu 5.7.2018.
- 19 Jonsson, Martina. 2017. The Toxicity of Fusarium Mycotoxins Enniatin and Moniliformin. Helsinki: Helsingin yliopisto.
- 20 World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Evaluation of certain contaminants in food. Malta: WHO/FAO.
- 21 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita.
- 22 Ketola, Raimo; Kostianen, Risto; Kotiaho, Tapio & Vainiotalo, Pirjo. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Helsinki: Hakapaino.
- 23 Emmert, Joachim & Leitner, Alexander. 2006. Mobile Phase Additives for LC-MS. Part 3: The Neutral Salts. Analytix 4. numero 2006, s. 9.
- 24 ScanWave - Getting Better Full Scan Data from Tandem Quadrupole MS. 2012 Verkkoaineisto. Waters. <<http://waters.com/waters/library.htm?lid=134678892&cid=514887>> Luettu 18.7.2018.

Kolonnien ja gradienttien vertailutaulukko

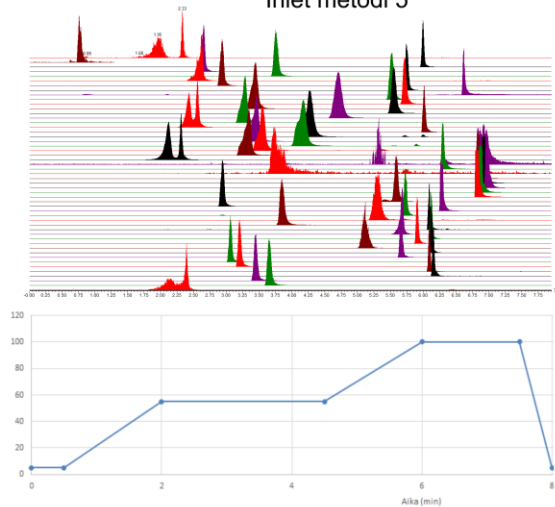


### Gradienttien variointia

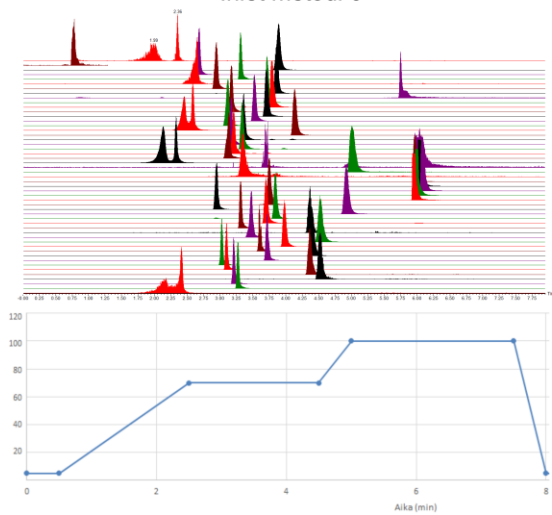
Inlet metodi 4



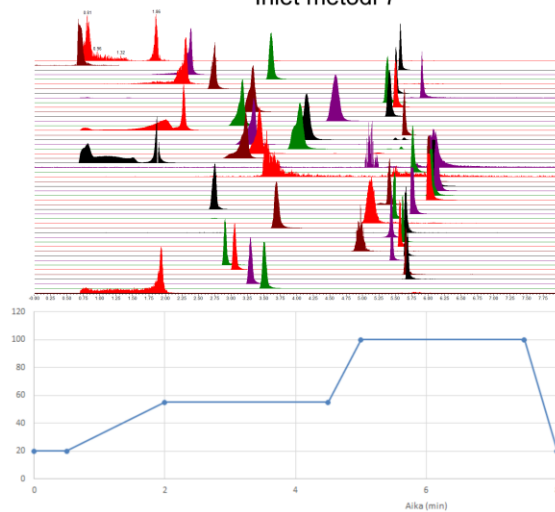
Inlet metodi 5



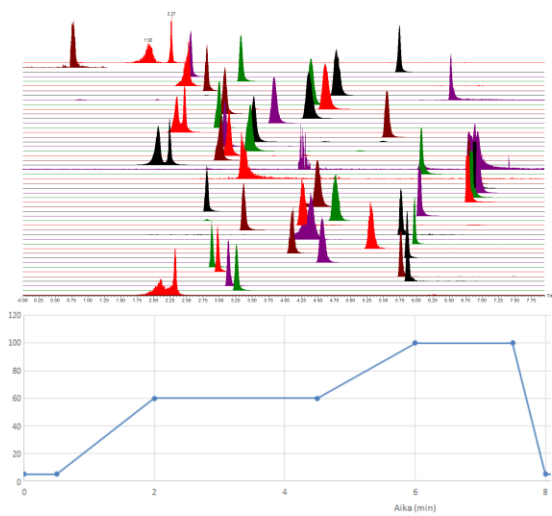
Inlet metodi 6



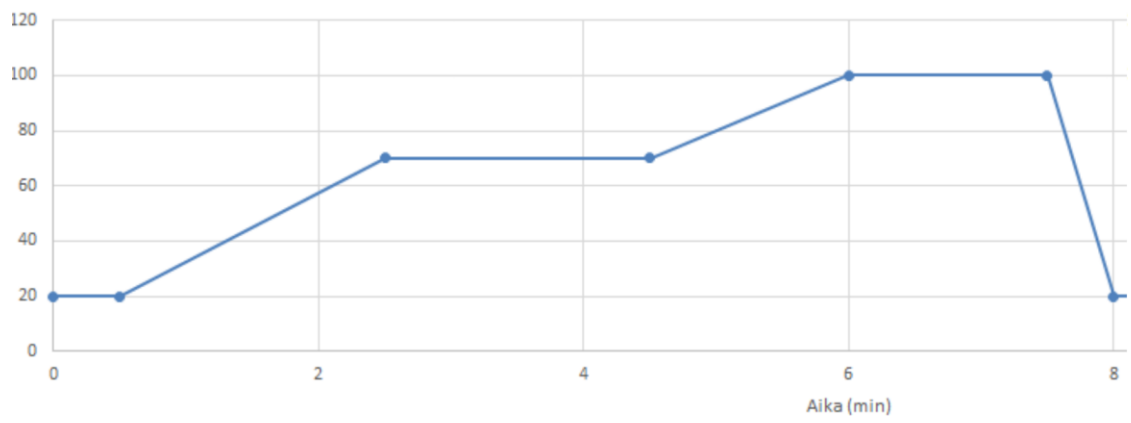
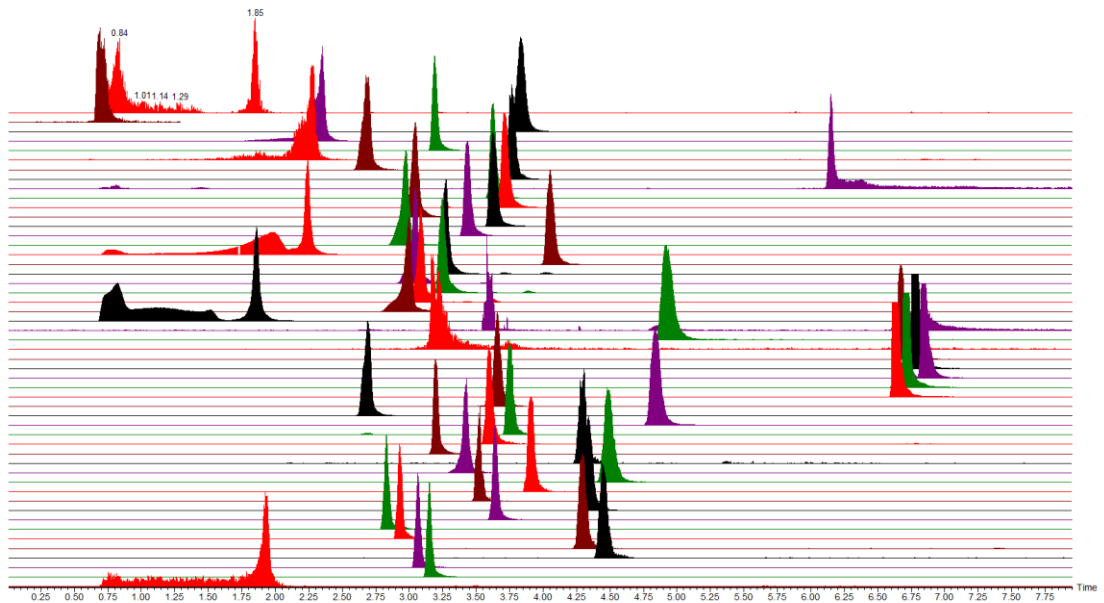
Inlet metodi 7



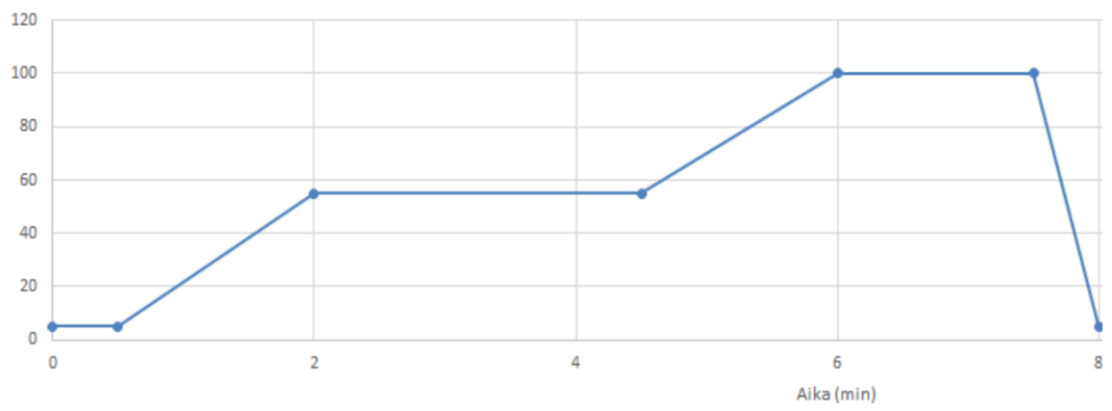
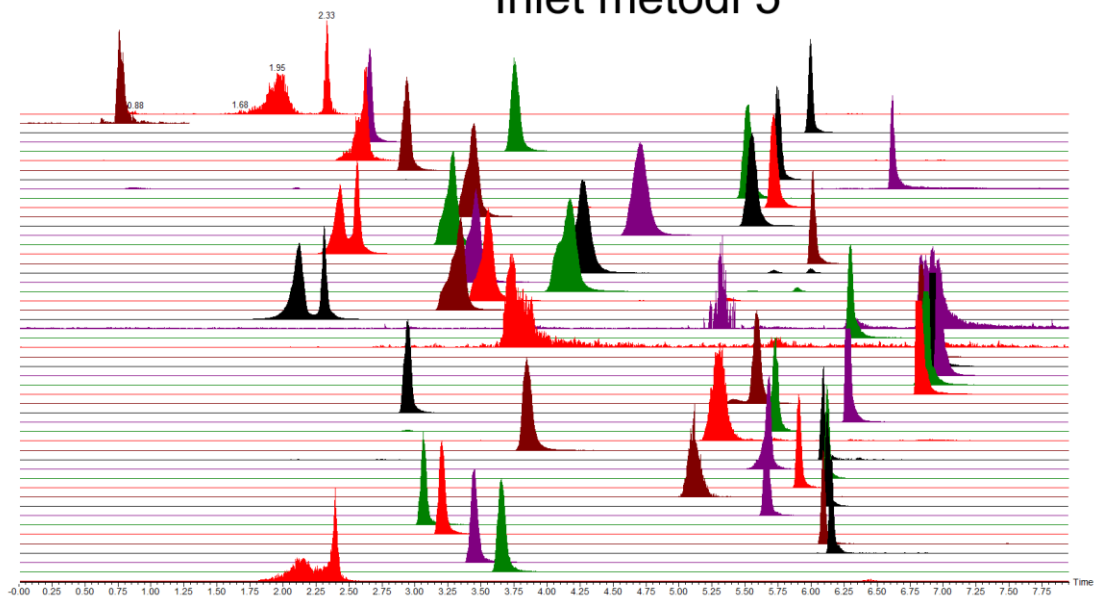
Inlet metodi 8



### Inlet metodi 4

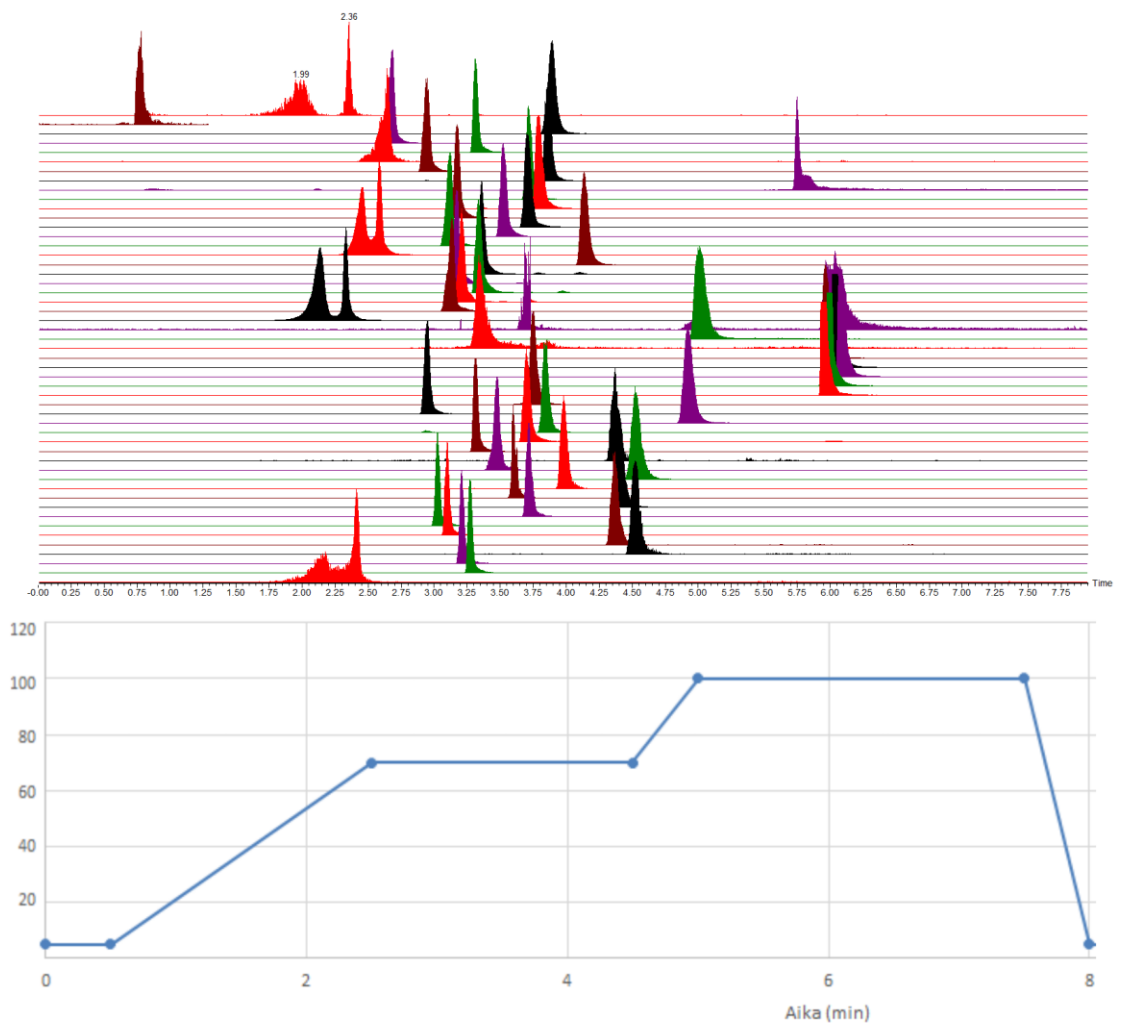


### Inlet metodi 5

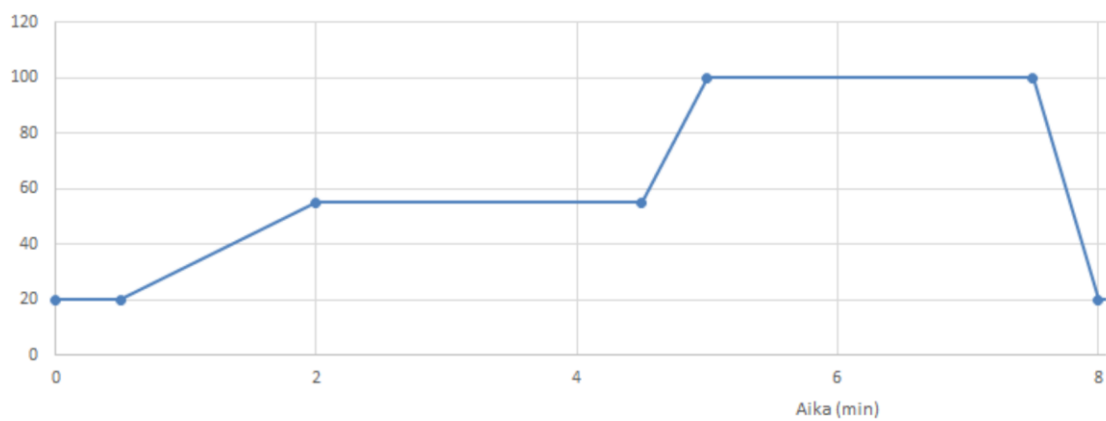
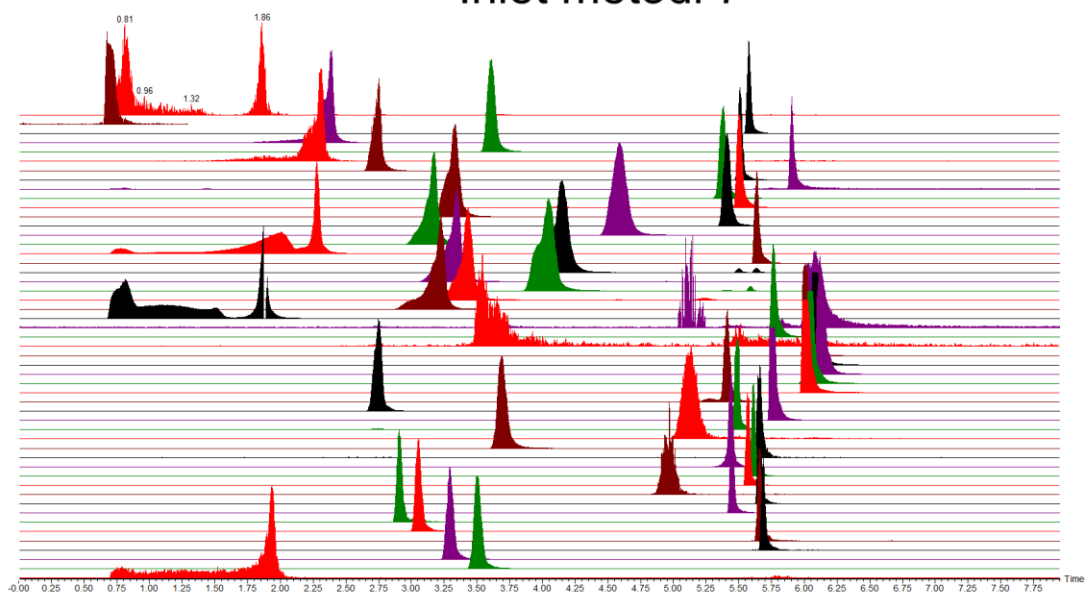




## Inlet metodi 6



### Inlet metodi 7



### Inlet metodi 8

