



*A kép illusztráció / The picture is illustration*

# Folyadékkromatográfiás hármaskvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometriás (HPLC-MS/MS) módszerek az élelmiszer-vizsgálatokban: kihívások és előnyök.

**Kulcsszavak:** HPLC-MS/MS, Szűrő- és megerősítő módszerek, Mátrixhatás, Izotóphígításos tömegspektrometria

**Rövidítések:** **EMD-IDMS:** Pontosan egyező dupla izotóphígításos módszer (exact-matching double isotope dilution mass spectrometry); **HPLC-MS/MS:** Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt hármaskvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometria (High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry); **HPLC-UV:** Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia UV detektálással; **ID:** Izotóphígítás (Isotope dilution); **IDMS:** Izotóphígításos tömegspektrometria (Isotope dilution mass spectrometry); **ISTD:** Belső standard (Internal standard); **LC:** Folyadékkromatográfia (Liquid chromatography); **LC-MS:** Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (Liquid chromatography – mass spectrometry); **LOD:** Kimutatási határ (Limit of detection); **MH:** Mátrix hatás; **MRL:** Maradékanyag tolerancia határérték (Maximum residue limit); **MRM:** Anyaion – leányion mód (multiple reaction monitoring); **MS:** Tömegspektrometria (Mass spectrometry); **R:** Izotóparány; **Ri:** Izotóparányok aránya; **R<sub>i</sub>átlag:** izotóparányok arányainak átlaga

## 1. Összefoglalás

Az Európai Unióban az Európai Bizottság 37/2010-es rendelete határozza meg az állatgyógyászati szerek maradékainak határértékét az állati eredetű élelmiszerekben. A reziduumok analízise legtöbbször folyadékkromatográfiás elválasztástechnikai megoldást igényel optikai vagy tömegspektrometriás detektálással. Az utóbbi detektálási mód mára széleskörűen elterjedt az élelmiszervizsgáló laboratóriumokban, és nagyfokú szelektivitásának köszönhetően viszonylag egyszerűen alkalmazható komplex min-

<sup>1</sup> Jelenleg: European Commission Joint Research Centre Institute of Reference Materials and Measurements, European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium

<sup>2</sup> Nemzeti Élelmiszer-lánc Biztonsági Hivatal Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság, 1095 Budapest, Mester utca 81.

<sup>3</sup> Agilent Technologies Sales & Services GmbH und Co. KG, Hewlett-Packard-Strasse 8, 76337 Waldbronn, Germany

<sup>4</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Texas A&M University, 1266 TAMU, College Station, TX 77843, USA

<sup>5</sup> Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki kar Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.

Currently: European Commission Joint Research Centre Institute of Reference Materials and Measurements, European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium

<sup>2</sup> National Food Chain Safety Office, Food and Feed Safety Directorate, 1095 Budapest, Mester utca 81.

<sup>3</sup> Agilent Technologies Sales & Services GmbH und Co. KG, Hewlett-Packard-Strasse 8, 76337 Waldbronn, Germany

<sup>4</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Texas A&M University, 1266 TAMU, College Station, TX 77843, USA

<sup>5</sup> Budapest University of Technology and Economics, Faculty of Chemical Technology and Biotechnology, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.

ták mérésére. A folyadékkromatográfiás elválasztással kapcsolt tömegspektrometriás detektálás esetén gyakorlatilag a minta-előkészítést egyetlen szilárd-folyadék extrakcióra és azt követő hígításra vagy oldószercserére lehet leegyszerűsíteni, ha szűrő (screening) módszerként kívánjuk alkalmazni az eljárást. Megerősítő (konfirmációs) módszernek használva az említett kapcsolt technikát, a mintatisztítás (clean-up) nélküli eljárás már csak izotóphígításos módszerrel összekötve valósítható meg az esetek többségében. Ugyanis a viszonylagos egyszerűséggel szemben a folyadékkromatográfiás – tömegspektrometriás módszerek az interferencia nélküli mérés ellenére is alapos optimálást igényelnek mind a minta-előkészítésben, mind az azt követő műszeres analízisben, mert a célkomponensekkel ko-eluálódó és méréstechnikailag láthatatlan mátrixalkotók a meghatározások pontosságát nagymértékben befolyásolhatják. A mátrixhatások kompenzációjára mátrixból felvett, mátrix alapú kalibrációt vagy izotóphígításos módszert szoktak alkalmazni, de ezen eljárások se adnak mindig jó vagy egyáltalán elérhető megoldást, így az optikai detektálás olykor jobbnak bizonyul (pl.: tetraciklinek meghatározása). Az izotóphígításos módszerek egy különleges változata a „pontosan egyező dupla izotóphígításos módszer” (exact-matching double isotope dilution mass spectrometry), amelynek elsődleges helye van kontrolminták referencia értékeinek meghatározásában.

## 2. Bevezetés

A modern szermaradék-vizsgálatok egyik leggyakrabban használt méréstechnikai megoldása a folyadékkromatográfiás elválasztással kapcsolt tömegspektrometriás detektálású készülékek (LC-MS) alkalmazása, amelyek a rutin és kutató laboratóriumokban napjainkra általános eszközzé váltak, köszönhetően sokszínű alkalmazhatóságuknak és robusztusságuknak. Továbbá a hatályos jogszabályok többsége az LC-MS módszerek használatát írja elő [1]. A kapcsolt technikák folyamatos elterjedéséhez az is jelentősen hozzájárult, hogy a forgalmazók közötti állandó verseny eredményeként egyre kedvezőbb áron váltak elérhetővé olyan készülékek, amelyek nagyobb érzékenység és egyszerűbb kezelhetőség mellett kínálnak megoldást az adott analitikai problémákra. Amikor LC-MS mérésről beszélünk, akkor pontosítanunk kell, hogy konkrétan mely technikák alkalmazásáról van szó. Már maga a folyadékkromatográfia (LC) fogalom is magában foglalja mind a vékonyréteg kromatográfiás, mind az ultra hatékony folyadékkromatográfiás elválasztásokat. Ugyanakkor a tömegspektrometriás (MS) detektálás is a kis- és nagyfelbontású készülékektől egészen a hibrid tandem tömegspektrométerekig terjed. Jelen kézirat keretén belül a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás hármass kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometriás (HPLC-MS/MS) mérések kerülnek bemutatásra. A közlemény célja a HPLC-MS/MS mérések alkalmazhatóságának áttekintése célkomponensek vizsgálatára gyakorlati példákon keresztül.

Komplex minták vizsgálatánál az alkalmazott módszer szelektivitása elsődleges fontosságú, aminek biztosítása csakis nagy szelektivitású detektorokkal, vagy komponens-specifikus minta-előkészítési eljárással (pl.: immunaffinitási oszlopok) lehetséges. Még az egy analízátoros MS (single-stage MS) de-

tektor sem képes mindig megfelelő szelektivitást nyújtani, ugyanis mind a meghatározandó szerves vegyületek, mind az azokkal együtt eluálódó mátrixalkotó komponensek az analizátor előtt, az ionforrásban fragmentálódnak. Így a célkomponens retenciós időablakán belül eluálódó mátrixalkotók azonos tömegű (izobár) fragmens ionjaik az analizátorban interferenciát okoznak. Viszont MS/MS detektálás esetén a fragmentáció az ütközési cellában játszódik le, így a molekulát reprezentáló anyai ion – leányion ionátmenetek (MRM átmenetek) nagyfokú szelektivitást biztosítanak. A ko-eluálódó izobár mátrixalkotók fragmentációs mintázata MS/MS detektálás során ugyanis kis valószínűséggel egyezik meg a célkomponens mintázatával, így nem zavar a kémiai háttér a detektálásban. Ennek ellenére az MRM mód se képes teljes specifikusságot garantálni, főképp, ha a mérendő komponenseket a minta-előkészítés és/vagy az MS detektálás miatt származékképzéssel szükséges mérni. Erre példa lehet az állatgyógyászatban tiltott tireosztatikumok, mint tiouracil, metiltiouracil, propiltiouracil, és tapazol mérése vizeletből vagy pajzsmirigyből [2]. Kis molekulásúlyuk (114 – 170 Da) miatt csak egyetlen MRM ionátmenettel mérhetőek, mert MS/MS fragmentációjuk csak egy leányiont eredményez, viszont egyaránt vizsgálhatóak pozitív és negatív ionizációs módban. Itt viszont meg kell jegyeznünk, hogy tiltott szerek egyértelmű és pontos azonosításához két ionátmenettel kell detektálni a komponenseket [1]. Általános eljárássá vált a tireosztatikumok származékozása 3-jodbenzilbromiddal a minta-előkészítési lépés elején, a minta extrakcióját követően. A származékképzés eredményeként nem csak molekulatömegük növekszik meg a tireosztatikumoknak, hanem a bevitt halogéntartalom következtében ionizációjuk is javul, ami nagyobb érzékenységet eredményez. A származékképzés hátránya viszont, hogy a mennyiségi értékeléshez használt legintenzívebb leányion a származékolószer 126 *m/z* értékű fragmense, mely mindegyik tireosztatikum

# Challenges and advantages in food analysis based on high performance liquid chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

Ádám Tölgyesi<sup>1,2</sup>, László Tölgyesi<sup>3</sup>, Lászlóné Békés<sup>2</sup>, Sharma K. Virender<sup>4</sup>, Jenő Fekete<sup>5</sup>

**Keywords:** HPLC-MS/MS, screening and confirmation methods, matrix effect, isotope dilution mass spectrometry

**Abbreviations:** **EMD-IDMS:** Exact-matching double isotope dilution mass spectrometry; **HPLC-MS/MS:** High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; **HPLC-UV:** High performance liquid chromatography with UV detection; **ID:** Isotope dilution; **IDMS:** Isotope dilution mass spectrometry; **ISTD:** Internal standard; **LC:** Liquid chromatography; **LC-MS:** Liquid chromatography – mass spectrometry; **LOD:** Limit of detection; **ME:** Matrix effect; **MRL:** Maximum residue limit; **MRM:** Multiple reaction monitoring; **MS:** Mass spectrometry; **R:** Isotope ratio; **R<sub>i</sub>:** Ratio of isotope ratios; **R'<sub>i,átlag</sub>:** Average ratio of isotope ratios

## 1. Summary

In the European Union, maximum residue limits of pharmacologically active substances are determined by Commission Regulation (EU) No 37/2010. Residue analysis usually requires liquid chromatographic separation, coupled with optical or mass spectrometric detection. The latter detection method has become widespread by now in food testing laboratories and, because of its high selectivity, it can be used relatively easily for the measurement of complex samples. In the case of mass spectrometric detection coupled with liquid chromatographic separation, sample preparation can be reduced practically to a solid-liquid extraction, followed by a dilution or a solvent exchange, if the procedure is to be used as a screening method. When using the above-mentioned coupled technique as a confirmation method, in most cases a procedure without clean-up can only be achieved by coupling with an isotope dilution method. This is so, because – despite their relative simplicity and despite being a measurement with no interference – liquid chromatographic-mass spectrometric methods require thorough optimization both in sample preparation and in the subsequent instrumental analysis, because the accuracy of the measurements could be greatly influenced by matrix components that are co-eluted with the target components but which are invisible to the measurement technique. To compensate for matrix effects, matrix-matched calibration or the isotope dilution method is usually used, but even these procedures do not always provide good or even available solutions, and so optical detection sometimes proves to be better (e.g. the determination of tetracyclines). A unique variation of the isotope dilution method is the exact-matching double isotope dilution mass spectrometry, which has a special place in the determination of the reference values of control samples.

## 2. Introduction

One of the most often used measurement techniques in modern residue analysis is the application of mass spectrometric detection coupled with liquid chromatographic separation, which has become a common tool in routine and research laboratories by now, due to their widespread applicability and robustness. Furthermore, the use of LC-MS methods is prescribed by the most of the legislation in force [1]. Another factor that significantly contributed to the continued spreading of coupled techniques has been that, as a result of the constant competition among distributors, instruments providing solutions to the given analytical problem with greater sensitivity and easier handling have become available at more and more affordable prices. When we speak about LC-MS measurements, we have to specify the application of which techniques we are talking about. Even the concept of liquid chromatography (LC) already includes both thin layer chromatography and ultra performance liquid chromatography separations. Also, mass spectrometric (MS) detection ranges from low and high resolution instruments to hybrid tandem mass spectrometers. Within the framework of the current manuscript, high performance liquid chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometric (HPLC-MS/MS) analyses are presented. The purpose of this paper is to review the applicability of HPLC-MS/MS measurements for target compounds analysis through practical examples.

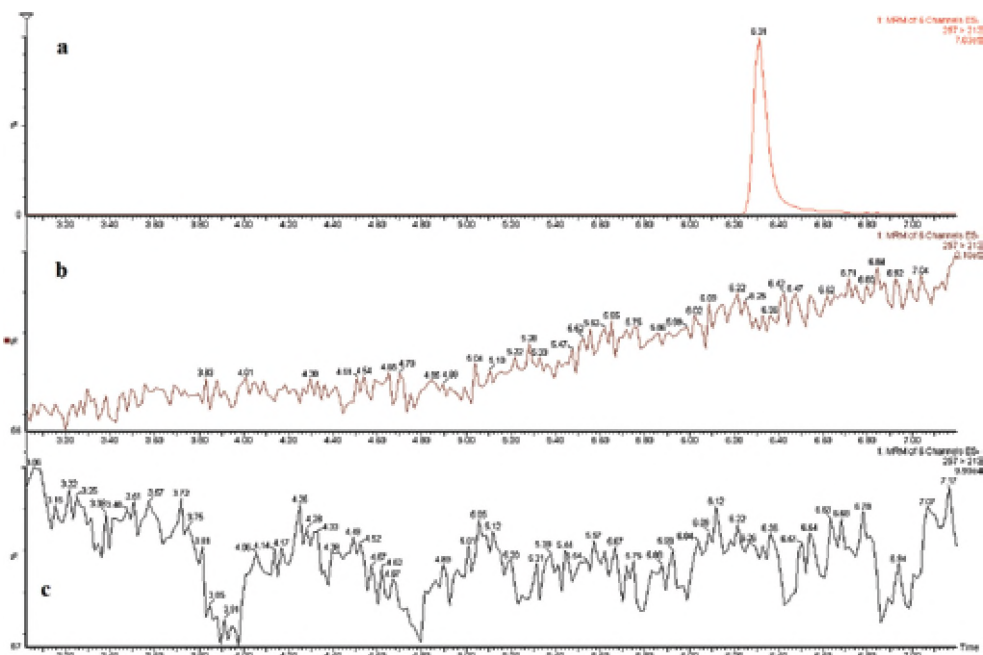
When analyzing complex samples, selectivity of the method used is of utmost importance, and it can only be ensured by highly selective detectors or component-specific sample preparation procedures (e.g. immunoaffinity columns). Even a single-stage MS cannot always provide proper selectivity, because both the organic compounds to be determined, and matrix components coeluted with them fragment in the ion source, before the analyzer. Therefore, interference is caused in the analyzer by isobaric fragment ions of matrix components that elute within the retention time window of the target compound. However, in the case of MS/MS detection, fragmentation occurs in the collision cell, and so a high degree of selectivity is ensured by the MRM transitions representing the molecule. In all likelihood, the fragmentation pattern of coeluted isobaric matrix components will be different from that of the target compound during MS/MS detection, so the chemical background will not interfere with detection. Still, total specificity cannot be guaranteed even by the MRM mode, especially if the component to be measured has to be derivatized because of the sample preparation and/or the MS detection. An example for this is the analysis of thyrostatic substances that are banned in veterinary medicine, such as thiouracil, methylthiouracil, propylthiouracil and tapazole in urine or the thyroid [2]. Due to their low molecular weight (114 – 170 Da), they can only be measured using a single MRM ion transition, because their MS/MS fragmentation results in only one daughter ion, but they can be analyzed in both positive and negative ion mode. It should be noted here that, for the unambiguous and accurate identification of banned substances, components have to be detected with two ion transitions [1]. It has become a general procedure to derivatize thyrostatic substances with 3-iodobenzyl bromide at the beginning of the sample preparation step, following sample extraction. As a result of the derivatization, not only the molecular weight of

fragmentációs tömegspektrumában így megjelenik [2]. Mivel a származékolás a mintatisztítási lépés előtt történik, így a mátrixalkotó komponensek is származékot képezhetnek a 3-jodbenzilbromiddal, ami következtében polaritásuk jelentős mértékben csökken és együtt koncentrálódnak a tireosztatikumokkal a tisztítási lépés(ek) során. Vizelet mátrix esetén jelentős mennyiségű, a tireosztatikumokkal azonos molekulatömegű, mátrix komponens is származékolódik. A mátrix komponensek ez esetben megegyező MRM ionátmenettel ( $X > 126$   $m/z$ ) rendelkeznek és okoznak ezért interferenciát ko-elúció esetén. A kellő szelektivitás eléréséhez a kromatográfiás elválasztás paramétereinek megválasztása ezért döntő fontosságú. A származékképzés elkerülése volt a cél egy most megjelenő publikációban, amelyben a tireosztatikumok MS/MS detektálásához szükséges két ionátmenetet úgy állítottak be, hogy az egyik átmenetet negatív módban, a másikat pozitív módban detektálták [3]. Ehhez viszont olyan készülék szükséges, amely ezt a gyors polaritásváltást ( $< 30$  ms) egyrészt lehetővé teszi, másrészt nem csökkenti a mérés érzékenységét nagymértékben, ugyanis tiltott szerek esetén mindig a lehető legkisebb kimutatási határ (LOD) elérése a cél.

A szelektív analízis hármaskvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometriás detektálás során az ionátmenetek által biztosított. A mennyiségi meghatározást viszont több tényező befolyásolhatja, amelyek közül döntő mértékben a célkomponensekkel egy időben eluálódó mátrix komponensek okozta ún. mátrixhatást (MH) kell kiemelnünk. A mérendő vegyületek ionizációjának határfokát ugyanis a ko-eluálódó mátrixalkotó komponensek megváltoztathatják. A mátrixalkotó vegyületek vagy elnyomják (ion suppression) vagy erősítik (ion enhancement) a célvegyület ionizációját az ionforrásban. A mátrixhatást megszüntetni

teljesen nem lehet, de optimált minta-előkészítéssel és/vagy kromatográfiás elválasztással a mátrixhatás adott mértékig redukálható [4], [5]. Ennek ellenére a HPLC-MS/MS módszerek egyik készülékről másikra történő adaptálásánál problémát jelenthet, hogy a mátrixhatás nem reprodukálható teljes mértékben. Ennek oka lehet, hogy a módszer valójában nem lett teljes mértékben adaptálva (pl.: eltérő HPLC kolonna, mozgófázis alkalmazása, vagy az új készülék eltérő geometriájú ionforrással rendelkezik, amely befolyásolja a mátrixhatás mértékét). Ghosh és munkatársai plazmamintákat vizsgáltak két különböző gyártmányú HPLC-MS/MS készülékkel, de megegyező HPLC és MS/MS beállítások mellett. A mintákban jelenlévő glicerofoszfokolin típusú mátrix komponensek hatását vizsgálták a mérendő akamprozát (acamprosate) vegyület ionizációjára. A készülékek más-más geometriájú elektropray interfésszel rendelkeztek. Míg a Z-spray ionforrás esetében az akamprozát ionizációját a vele együtt eluálódó glicerofoszfokolin teljesen elnyomta, addig az ortogonális ionforrásban minimális ionerősítést figyeltek meg [6].

Két általános módja van a mátrixhatás vizsgálatának: kvalitatív és kvantitatív [7]. A mátrixhatás minőségi vizsgálata során arra kaphatunk választ, hogy melyik retenciós időablakban miképp befolyásolják az eluálódó mátrix vegyületek a célkomponens ionizációját. A kvalitatív mátrixhatás meghatározása a célkomponens kolonna utáni (ionforrás előtti) folyamatos infúziójával és ezzel egy időben vak minta kromatográfiás mérésével történik. A célkomponens jele a folyamatos infúzió következtében a detektorban mindaddig állandó, míg a vak mintából eluálódó mátrix komponensek azt el nem nyomják, vagy fel nem erősítik egy adott retenciós időablakban. Egy fontos mikotoxin, az alternariol HPLC-MS/MS analízisének kvalitatív mátrixhatás vizsgálatát mutatja be az **1. ábra**.



1. ábra. Az alternariol HPLC-MS/MS kvalitatív mátrixhatás-vizsgálatának kromatogramja

Figure 1 Chromatogram of qualitative matrix effect analysis of alternariol mycotoxin using HPLC-MS/MS technique

the thyrostatics increases, but their ionization improves because of the halogen content introduced, resulting in higher sensitivity. On the other hand, a disadvantage of derivatization is that the most intense daughter ion used for quantification is the  $m/z$  126 fragment of the derivatizing agent, which then appears in the mass spectra of all thyrostatics [2]. Since derivatization happens before the sample clean-up step, matrix components can also form derivatives with the 3-iodobenzyl bromide, which decreases their polarity significantly, and they concentrate together with the thyrostatics during the clean-up step(s). In the case of urine matrix, a significant amount of matrix components, with molecular weights identical to those of the thyrostatics, are derivatized. In this case, matrix components possess identical MRM ion transitions ( $X > 126 m/z$ ), causing interference in the case of coelution. Therefore, to achieve sufficient selectivity, choosing the right parameters for the chromatographic separation is crucial. Avoiding derivatization was the goal in a publication that is about to appear, in which the two ion transitions necessary for the MS/MS detection of thyrostatics was set in a way, so that one transition was detected in negative mode, while the other in positive mode [3]. To achieve this, one needs an instrument that makes this fast ( $< 30$  ms) polarity switching possible on the one hand, and does not reduce measurement sensitivity to a large extent on the other, because to achieve as low limit of detection (LOD) as possible is always the goal in the case of banned substances.

Selective analysis during triple quadrupole tandem mass spectrometric detection is ensured by ion transitions. However, quantification can be influenced by several factors, of which we have to emphasize mainly the so-called matrix effect (ME), caused by components coeluting with the target compounds. This is so, because the ionization efficiency of the compounds to be determined can be influenced by the coeluting matrix components. Matrix components can either suppress or enhance the ionization of the target compound in the ion source. The matrix effect cannot be eliminated completely, but it can be reduced to a certain degree by optimization of the sample preparation and/or the chromatographic separation [4], [5]. Nevertheless, when adapting HPLC-MS/MS methods from one instrument to another, it might pose a problem that the matrix effect cannot be reproduced completely. The reason for this might be that the method has not actually been fully adapted (e.g. use of different HPLC column or mobile phase, or the ion source has a different geometry, affecting the level of the matrix effect). Plasma samples were analyzed by Ghosh et al., using two HPLC-MS/MS instruments of different manufacturers, but with identical HPLC and MS/MS settings. The effect of glycerocholine type matrix components, present in the sample, on the ionization of the compound to be determined (acamprosate) was investigated. The electrospray interfaces of the instruments had different geometries. While in the case of the Z-spray ion source ionization of acamprosate was completely suppressed by the glycerophosphocholine coeluting with it, minimal enhancement was observed in the orthogonal ion source [6].

There are two general ways to evaluate matrix effect: qualitative and quantitative [7]. During qualitative analysis of the matrix effect, one can obtain answers to how the ionization of the target compound is influenced by eluting matrix components, in which retention time window. Qualitative determination of the matrix effect

is performed by continuous post-column (before the ion source) infusion of the target compound, and by chromatographic measurement of a blank sample at the same time. Due to the continuous infusion, the signal of the target compound in the detector will remain constant, until it gets suppressed or enhanced in a given retention time window by matrix components eluting from the blank sample. Qualitative matrix effect investigation of the HPLC-MS/MS analysis of an important mycotoxin, alternariol, is presented in **Figure 1**.

All three chromatograms (**a**, **b**, **c**) are  $257 > 213 m/z$  MRM chromatograms of alternariol. On the top (**a**) is the chromatogram of a 100 ng/mL standard solution recorded from a solution with no matrix. Retention time of alternariol 6.3 minutes. When recording the middle chromatogram (**b**), LC-MS quality water with no matrix was introduced into the instrument and, at the same time, post-column infusion of a 100 ng/mL solution of alternariol was started. Because of the infusion, the signal for alternariol is continuous in the chromatogram. The increase in the signal after 5 minutes can be explained by the gradient elution used in the HPLC separation, since the increase in the percentage of the organic solvent (modifier) in the mobile phase improves the ionization of the compound in the ion source. In the case of the bottom chromatogram (**c**), it was not neat solvent, but a prepared blank sample (rye) that was injected into the instrument, while post-column infusion of alternariol was still continuous. In the time window (3 to 7.2 minutes) shown in the bottom chromatogram of **Figure 1**, the signal for alternariol is approximately halved ( $9,99e^4/2,1e^5$ ) compared to the middle chromatogram (**b**), which can be explained by the ion suppression caused by the continuously eluting matrix components. Between minutes 3.8 and 4.1, as well as 4.7 and 4.9 the signal for alternariol decreases drastically (**c**), showing significant ion suppression. Since alternariol elutes at 6.3 minutes, naturally, significant matrix effects in these retention time windows do not influence the target compound. In the bottom chromatogram, the signal for alternariol does not change with gradient elution, because not only the ionization of the target compound, but also that of matrix components improves with the increasing ration of the organic modifier.

During post-column infusion, it is worth introducing into the detector not only the target compound, but also its isotopically labeled internal standard (ISTD) analogue, continuously, mixed together in the same solution with the target compound, because this way matrix effects affecting the target compound and the ISTD can be characterized well. This is particularly important if the retention times of the target compound and the ISTD are not identical to the millisecond (e.g. the ISTD contains too much deuterium). Normally, the matrix effect on the target compound and its ISTD should be the same, this is the essence of the isotope dilution method.

Quantitative matrix effect evaluation can be performed easily by comparing the slopes of calibrations recorded with matrix and with neat solvent (without matrix) [8]. The best way to compensate for the matrix effect is to dilute the sample with a stable isotope (ID). This is done by adding the isotopically labeled ( $^2H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ,  $^{18}O$ ) analogue of the target compound to be analyzed to the sample, as the ISTD. The target compound and the ISTD are structurally identical, they only differ in their molecular weights, so their retention times are the same and the two compounds are detected by the MS/MS detector on

Mindhárom kromatogram (a, b, c) az alternariol 257 > 213  $m/z$  MRM kromatogramja. A legfelső (a) egy 100 ng/mL-es standard oldat kromatogramja mátrix nélküli oldatból felvéve. Az alternariol retenciós ideje 6,3 perc. A középső kromatogram (b) felvételénél mátrix nélküli, LC-MS minőségű víz került injektálásra a készülékbe, amellyel egy időben az alternariol 100 ng/mL-es oldatának kolonna utáni infúziója is elindult. Az infúzió következtében az alternariol jele folyamatos a kromatogramon. A jel 5 perc utáni növekedése a HPLC elválasztásban levő gradiens elúcióval magyarázható, ugyanis a szerves oldószer (modifikátor) százalékos arányának emelkedése a mozgófázisban a komponens ionizációját javítja az ionforrásban. A legalsó kromatogram (c) esetén nem tiszta oldószer, hanem előkészített vak minta (rozs) került injektálásra a készülékbe, míg az alternariol poszt-kolonna infúziója továbbra is folyamatos. Az **1. ábra** alsó kromatogramján (c) a bemutatott időablakban (3 – 7,2 perc) az alternariol jele a detektorban kb. felére csökkent ( $9,99e^4/2,1e^5$ ) a középső kromatogramhoz (b) képest, ami a folyamatosan eluálódó mátrixok okozta ionelnyomással magyarázható. 3,8 – 4,1 perc között és 4,7 – 4,9 között az alternariol jele drasztikusan lecsökken (c), jelentős mértékű ionelnyomást mutat. Mivel az alternariol 6,3 percnél eluálódik, így ezen retenciós időablakokban történő szignifikáns mátrixhatások természetesen a célvegyületet nem befolyásolják. Az alsó kromatogramon az alternariol jele nem változik a gradiens elúcióval, ugyanis nem csak a célkomponens, hanem a mátrixalkotók ionizációja is javul a szerves modifikátor arányának növekedésével.

A kolonna utáni infúzió során érdemes nem csak a célvegyületet, hanem annak izotóp jelzett analóg belső standardját (ISTD) is folyamatosan, a célkomponenssel egy oldatban összekeverve, a detektorba juttatni, mert így a célvegyületet és az ISTD-t érő mátrixhatásokat jól lehet jellemezni. Ennek főként akkor van nagy jelentősége, mikor a célvegyület és az ISTD retenciója nem esik milliszekundum pontosan egybe (pl.: túl sok deutériumot tartalmaz az ISTD). Normál esetben a célkomponenst és annak ISTD-jét ugyanannak a mátrixhatásnak kell érnie, ez az izotóphígításos eljárás lényege.

A mennyiségi mátrixhatás értékelését mátrixból és tiszta oldószerből (mátrix nélküli) felvett kalibrációk meredekségeinek összehasonlításával lehet egyszerűen elvégezni [8]. A mátrixhatás kompenzálásának

legjobb módja a minta stabil izotóppal történő hígítása (ID). Ilyenkor a mérendő célkomponens izotóp jelzett ( $^2H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ,  $^{18}O$ ) analógját adjuk a mintához, mint ISTD-t. A célvegyület és az ISTD szerkezetileg azonos, csak molekulatömegük különbözik, így retenciós idejük egybeesik és az MS/MS detektor a két vegyületet különböző ionátmeneteik révén külön csoporton detektálja. A ko-elúció miatt ugyanaz a mátrixhatás éri a célkomponenst és az ISTD-t is, így a válaszjelek aránya a mátrixhatástól független lesz. Az ID módszer hátránya viszont, hogy stabil izotóp jelzett ISTD-ek csak kevés komponens esetén érhetőek el és drágák. Továbbá, hogy ha az ISTD tartalmaz nyomnyi mennyiségű nem jelzett célkomponenst, akkor alacsony koncentrációk mérésénél, illetve vak mintáknál befolyásolhatja az analízist. Így a legtöbb LC-MS mérésnél a mátrixhatás a mátrixból felvett kalibrációval van kompenzálva, ami akkor működik tökéletesen, hogy ha a mátrixhatás azonos típusú minták között (pl. különféle mézkek) jól reprodukálható mintáról – mintára, azaz a relatív mátrixhatás alacsony [8], [9].

### 3. Szűrő (screening) módszerek

HPLC-MS/MS mérések során az esetek többségében multikomponenses meghatározásról beszélünk. Napjainkban tovább erősítik ezt a megállapítást a készülékforgalmazók által bemutatott azon példa metodikák, amelyekkel több száz komponens meghatározását írják le egyetlen HPLC-MS/MS méréssel pl.: peszticidek meghatározása [10]. Kromatográfiai szempontból a célvegyületek különbözőek lehetnek (savas, bázikus, neutrális, ionos jellegűek), ami által más HPLC beállításokkal juthatunk el a különböző jellegű vegyületek optimális elválasztásához, továbbá ionizációjuk is eltérő lehet. Jó példa erre az *Alternaria* toxinok meghatározása. Ezen mikotoxin csoportba több mint 70 féle toxin tartozik, de szerkezetileg még csak néhány toxint azonosítottak napjainkig. A legfontosabb *Alternaria* toxinok, mint alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene, vagy tenuazonic acid mind gyenge savas karakterű vegyület ( $pK_a$ : 4.3 – 7.7) [11]. A tenuazonic acid a csoport többi tagjához képest kiugróan poláros komponens, továbbá kelátkomplexet képez a mozgófázis fémionjaival, ami a kromatográfiai analízisét nagyban megnehezíti [11]. Ezért az irodalomban publikált *Alternaria* LC-MS értekezések szerzői vagy kihagyták a tenuazonic acidot a multimódszerből, vagy csak a Tenuazonsav



A kép illusztráció / The picture is illustration

separate channels, due to their different ion transitions. Because of the coelution, the same matrix effect applies to both the target compound and the ISTD, and so the signal ratio will be independent of the matrix effect. The downside of the ID method is that stable isotopically labeled ISTDs are only available for a few components, and they are expensive. Furthermore, if the ISTD contains trace quantities of unlabeled target compound, it can affect the analysis when measuring low concentrations or blank samples. Therefore, in the case of most LC-MS measurements, the matrix effect is compensated by a calibration recorded with the matrix, which only works perfectly if the matrix effect can be reproduced well from sample to sample among samples of similar type (e.g. different varieties of honey), that is, the relative matrix effect is low [8], [9].

### 3. Screening methods

When we speak about HPLC-MS/MS measurements, in most cases we are talking about multicomponent determinations. Today, this statement is further strengthened by those method examples, presented by the instrument distributors, that describe the determination of several hundreds of components in a single HPLC-MS/MS measurement, e.g. the determination of pesticides [10]. From a chromatographic point of view, target compounds can be different (acidic, basic, neutral, ionic), requiring different HPLC settings for optimal separation of compounds of different character, and their ionizations might be different as well. good example for this is the determination of *Alternaria* toxins. There are more than 70 toxins belonging to this mycotoxin family, but only a few of them have been identified structurally to this day. The most important *Alternaria* toxins, such as alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene, or tenuazonic acid are all compounds with weak acidic characters (pKa: 4.3 – 7.7) [11]. Tenuazonic acid is an extremely polar component, compared to other members of the group, and it forms chelate complexes with metal ions of the mobile phase, which makes its chromatographic analysis very difficult [11]. Therefore, authors of LC-MS *Alternaria* discussions published in the literature either omitted tenuazonic acid from the multimethod, or focused solely on the determination of tenuazonic acid, using 2,4-dinitrophenylhydrazine-based precolumn derivatization [12].

Multimethods are of great importance in the case of screening methods, because during these procedures the goal is not to determine the exact concentrations of the components, but to identify the target compound or target compounds with the appropriate degree of certainty in the given sample at a given concentration level (e.g. around the MRL value). In addition to multicomponent analysis, the advantage of HPLC-MS/MS measurements, compared to other screening methods, is the great degree of selectivity of the separation and the identification of the target compounds with a high degree of certainty, made possible by the retention times of the given components and the intensity ratios of their ion transitions. A screening method can also be performed by using detection with a single ion transition, but in this case identification cannot be considered conclusive, because in the case of complex samples there might come from the matrix isobaric components that can be characterized by the ion transition of the target compound.

Residues of veterinary medicines, i.e., compounds used during treatment (main components) and their metabolites

belong to the most widely studies component group of food contaminants. There are several microbiological and biochemical methods available for the screening analysis of drug residues, such as the 4-dish method, enzyme-linked immunoassays or the biochip method. Of the methods listed, semiquantitative measurements can be achieved by biochemical methods, but the kits or chips necessary for the given measurement only make it possible to determine one (e.g. chloramphenicol, avermectin) or a limited number of components (e.g. only sulfonamides or only tetracyclines) at the same time. On the other hand, in the case of HPLC-MS/MS based screening, components belonging to different groups of veterinary medicines can be analyzed together, following a quick extraction step. Since it is sufficient to identify components by 1 ion transition and the retention time in the case of screening methods with MS/MS detection (this does not mean unambiguous identification), more than 100 components can be measured at the same time. This means that even components belonging to completely different chemical classes can be covered by the method, such as steroids and antibiotics. All this makes it possible to obtain much more information from a screening measurement ( e.g. one can draw conclusions as to what kind of drug was used to treat an animal, based on the active substances determined, such as simultaneous detection of aminoglycosides and corticosteroids).

The HPLC-MS/MS antibiotics screening method published by the Antibiotics Reference Laboratory of the European Union (ANSES, Fougères, Franciaország) describes the determination of 58 components in milk [13]. Components belong to different groups of antibiotics, such as penicillins, cephalosporins, macrolides, lincosamides, aminoglycosides, tetracyclines, quinolones, and sulfonamides, as antibacterial agents, are also included in the method. Determination of the 58 components requires two different extraction steps and two HPLC-MS/MS measurements. The two extractions are necessary because of the different polarities of the compounds, and the extracts are analyzed separately by the method. The two extractions and two injections would make it possible to extend the method to other groups of antibiotics, such as nitroimidazoles or amphenicols, which are all banned substances, with the exception of thiamphenicol. But steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs, and also mycotoxins, of which the measurement of aflatoxin M1 in milk is especially important, could also be analyzed together with the antibiotics. Thus, the analysis of only one sample could provide information about more than ten compound groups. However, this would require continuous switching of ionization modes (positive/negative) within a single measurement. Although the latest instruments can switch polarity with millisecond speed, continuous switching between positive and negative mode would somewhat reduce sensitivity during a multicomponent measurement. Furthermore, selection of the mobile phase would definitely require a compromise, considering that negative and positive ionizations would provide good reproducibility and maximum signal intensity at different eluent compositions. In the multicomponent antibiotics method, aminoglycosides are the most polar compounds, their separation requires the addition of ion pairing reagents (pentafluoropropanoic acid or heptafluorobutanoic acid) to the eluent, which causes the suppression of negative ionization in the ion source, and so selection of the ion pairing reagent in the mobile phase



meghatározására fókuszáltak 2,4-dinitrofenilhidrazin alapú kolonna előtti származékképzést alkalmazva [12].

A multimódszerek a szűrő mérések (screening) esetében bírnak nagy jelentőséggel, mivel ezen eljárások során nem a komponensek pontos koncentrációjának meghatározása a cél, hanem a célkomponens illetve célkomponensek megfelelő bizonyossággal történő azonosítása egy adott mintában és adott koncentrációs szinten (pl.: MRL érték körül). A HPLC-MS/MS mérések előnye más screening módszerekkel szemben, a többkomponenses analízisen túl, az elválasztás nagyfokú szelektivitása és a célkomponensek nagy bizonyossággal történő azonosítása, amit az adott komponensek retenció ideje és ionátmeneteiknek intenzitás aránya tesz lehetővé. Megoldható a szűrő módszer egy ionátmenettel történő detektálással is, de ez esetben az azonosítás nem tekinthető egyértelműnek, mivel komplex minták esetében a mátrixból származhatnak olyan izobár komponensek, amelyek jellemezhetők a célkomponens ionátmenetével.

Az élelmiszerszennyezők egyik legszélesebb körben vizsgált komponenscsoportjába tartoznak az állatgyógyászati szermaradékok reziduuma, azaz a terápia során alkalmazott vegyületek (főkomponensek) és metabolitjaik. Számos mikrobiológiai és biokémiai módszer létezik a reziduumok screening vizsgálatára, mint pl. a 4 csészés módszer, enzimjelzésű immunanalitika, biochip módszer. A felsorolt módszerek közül szemi-quantitatív mérés biokémiai módszerekkel érhető el, de az adott méréshez szükséges kit-ek vagy chip-ek is csak egy (pl. kloramfenikol, avermektin) vagy csak korlátozott számú komponens (pl. csak szulfonamidok, vagy csak terakciklinek) egyidejű mérését teszik lehetővé. Míg HPLC-MS/MS alapú screening esetén az állatgyógyászati szerek különböző csoportjaiba tartozó komponensek egy gyors extrakciós lépést követően együtt mérhetőek. Mivel az MS/MS detektálású szűrő módszerek esetén elégséges a komponenseket 1 ionátmenettel és retenció idővel azonosítani (ez nem jelent egyértelmű azonosítást), akár 100-nál több komponens is mérhető egyszerre. Ez azt jelenti, hogy akár teljesen eltérő kémiai osztályokba tartozó komponenseket is lefedhet a módszer: pl.: szteroidok és antibiotikumok. Mindez lehetővé teszi, hogy egy screening mérésből jóval több információhoz jussunk (pl.: az állat kezelésénél alkalmazott szerre is következtethetünk a meghatározott aktív hatóanyagok alapján, mint az aminoglükozidok és a kortikoszteroidok egyidejű detektálása esetén).

Az Európai Unió Antibiotikum Referencia Laboratóriuma (ANSES, European Union Reference Laboratory, Fougères, Franciaország) által közzétett antibiotikum screening HPLC-MS/MS módszer 58 komponens meghatározókat írja le tejből [13]. A komponensek olyan antibiotikum csoportba tartoznak, mint penicillinek, kefalosporinok, makrolidok, linkozamidok, aminoglükozidok, tetraciklinek, kinolonok, továbbá

szulfonamidok, mint antibakteriális szerek is szerepelnek a módszerben. Két eltérő extrakciós lépés és két HPLC-MS/MS mérés szükséges az 58 komponens meghatározásához. A két extrakció a vegyületek eltérő polaritása miatt szükséges, az extraktumok külön-külön kerülnek analízisre a módszerben. A két extrakció és két injektálás lehetővé tenné a módszer kiterjesztését további olyan antibiotikum csoportokra, mint a nitroimidazolok vagy amfenikolok, amelyek a tiamfenikol kivételével mind tiltott szerek. De szteroid és nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentők, illetve mikotoxinok, amelyek közül az aflatoxin M1 mérése fontos tejből, szintén mérhetőek lennének az antibiotikumokkal együtt. Így egy minta analíziséből több mint tíz vizsgálati irányra kaphatnánk információt. Ehhez viszont szükségessé válna az ionizációs módok (pozitív/negatív) folyamatos váltása egy mérésen belül. Bár a legújabb készülékek már néhány milliszekundum sebességgel váltanak polaritást, többkomponenses mérésnél a pozitív és negatív mód közötti folyamatos váltás a készülék érzékenységét kismértékben lecsökkentené. Továbbá a mozgófázis megválasztása mindenképp kompromisszumot igényelne tekintetében annak, hogy a negatív és pozitív ionizáció más-más eluens összetétel mellett eredményezheti a jól reprodukálható és maximális jel intenzitást. A többkomponenses antibiotikum módszerben az aminoglükozidok a legpolárosabb vegyületek, elválasztásukhoz ionpárképzőt kell az eluenshez adni (pentafluoropropánsavat vagy heptafluorobutánsavat), ami a negatív ionizáció szuppressziójához vezet az ionforrásban, így a mozgófázisban az ionpárképző megválasztása (koncentráció, pH, minőség) döntő a multimódszer alkalmazhatóságánál.

A polaritás váltás miatt alkalmaznak a többkomponenses mikotoxin HPLC-MS/MS méréseknél két injektálást. A mikotoxinok extrakciójára kidolgozott acetonitril/víz/hangyasav (79/20/1, v/v/v) oldószerkegy alkalmazása a minta szilárd – folyadék extrakciójára, lehetővé teszi a minta egyszeri gyors extrakcióját. Az extraktum egy hígítást követően HPLC-MS/MS-sel vizsgálható: első injektálás során pozitív módban mérve a komponensek egy részét, majd a minta második injektálása során negatív módban detektálva a negatív ionizációra optimált célvegyületeket [14]. Ezzel a gyors minta-előkészítéssel és két konsekutív méréssel akár 191 mikotoxin is meghatározható [15], így nincs szükség külön komponens specifikus kit-ekre és chip-ekre. Továbbá jelentősen csökkenthető az idő, eszköz (pl.: szilárd fázisú extrakciós oszlopok) és oldószer igény, ami által összességében napjaink egyik legjobb screening módszere a HPLC-MS/MS.

#### 4. Megerősítő mérések

A reziduumok kis koncentrációban történő meghatározására összetett mintákban az egyik legjobb és leggyakrabban használt technika a HPLC-MS/MS. Használata nagyobb koncentrációk mérése (>100 µg/kg) esetén is indokolt lehet, mikor a célkomponensek detektálása optikai detektorokkal nem va-

(concentration, pH, quality) has a crucial influence on the applicability of the multimethod.

Because of the polarity switching, two injections are used with multicomponent mycotoxin HPLC-MS/MS measurements. A quick extraction is made possible by the use of the acetonitrile/water/formic acid (79/20/1, v/v/v) solvent mixture, developed for the extraction of mycotoxins, for the solid-liquid extraction of the sample. The extract can be analyzed by HPLC-MS/MS, following a dilution step: part of the components are measured in positive mode during the first injection, and then target compounds optimized for negative ionization are detected in negative mode during the second injection of the sample [14]. With this fast sample preparation and two consecutive measurements as many as 191 mycotoxins can be determined [15], and so there is no need for separate component-specific kits and chips. Furthermore, time, equipment (e.g. solid phase extraction columns) and solvent demand can be reduced significantly, which makes HPLC-MS/MS one of the best screening methods today.

#### 4. Confirmation methods

One of the best and most often used techniques for the determination of drug residues in complex samples in low concentrations is HPLC-MS/MS. Its use can also be justified when measuring higher concentrations (> 100 µg/kg), when detection of the target components cannot be achieved by optical detectors, such as in the case of amioglycosides or macrolides. Measurement accuracy is mainly influenced by coeluting matrix components, such as phospholipids, sugars, fats, metabolites, contaminants, degradation products etc. The most efficient tool of compensation for the matrix effect is matrix-matched calibration. The matrix effect on the components to be determined in the calibration sample is nearly identical to the matrix effect on the target compounds in the test sample. Using matrix-matched calibration, effects influencing ionization can be compensated for, but it should be noted that it is impossible to record two identical backgrounds in the case of biological samples, because the concentrations and quality of endogenous components can differ from sample to sample. Compensation for differences in matrix effect between identical samples can be best achieved by the isotope dilution (ID) method. The procedure has been used with great success in elemental analysis since the 1950s and in the determination of organic substances since the 1970s. Matrix effect can be reduced further by suitable sample preparation, sample dilution and by increasing chromatographic resolution [16].

##### 4.1 Isotope dilution methods

###### 4.1.1 Normal isotope dilution method

With the isotope dilution method, the isotopically labeled analogue of the target compound is added to the sample in a given concentration as the ISTD. Because the retention time of the ISTD is the same as that of the compound to be measured (minimal differences may occur due to, for example, different C-H and C-<sup>2</sup>H bond lengths), the matrix effect on the target compound and the ISTD in the ion source will be the same as well. Due to the internal standard procedure, the response (area) ratio of the target compound and the ISTD thus will be independent of the matrix effect. Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) is a very efficient procedure, but its applicability is limited by the fact that there are no available isotopically labeled

standard for each component. Either the labeled analogue of the given component is not available commercially, or, in certain cases, their price is so high that not every laboratory can afford them, because of economic reasons. Other potential problems could be the isotopic purity of the ISTD, its concentration, and the nature of the ISTD (e.g. <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O). A drawback of deuterium-labeled ISTDs is that, in polar media, due to the hydrogen-deuterium exchange, the polarity of the compound changes, and so the retention time of the deuterated ISTD (when <sup>2</sup>H > 3) will not coincide to the millisecond with the retention time of the target compound during reverse phase separation. IDMS can only provide results of suitable quality, if retention times differ minimally, because this is the only way to ensure that the value and direction of the matrix effect will also differ minimally for the target compound and its labeled analogue. Selection of the proper concentration of the ISTD plays an important role, because if the concentration of the component to be measured in the test sample is significantly lower than that of the ISTD added to the sample, ion suppression of the target compound in the ion source can be caused by the latter, therefore, the concentration of the component in the sample will be underestimated. The situation may also occur that the isotopic purity of the labeled standard is not high enough, or labeled compound also contains the isotopically not labeled form, which can lead to overestimation or inaccuracy in the low concentration range, in the case of highly sensitive methods [17].

The determination of carvedilol enantiomers (S and R) in human plasma samples was studied by Wang et al. using an LC-IDMS method, and samples were diluted during the procedure with enantiomeric analogue ISTD components: carvedilol-S-[<sup>2</sup>H]<sub>5</sub> and carvedilol-R-[<sup>2</sup>H]<sub>5</sub> [18]. During sample preparation, only protein precipitation with acetonitrile was applied, and then the sample was derivatized in acetonitrile with 2,3,4,6-tetra-*o*-acetyl-beta-glucopyranosyl isothiocyanate. There was a 0.02 minute (1.2 second) difference observed in the retention times of the carvedilol-S enantiomer and its labeled analogue standard, which could be traced back to the hydrogen-deuterium exchange (*n*=5). This, otherwise minimal difference in the retention times was enough to observe a 25% difference between the matrix effect on carvedilol-S and its ISTD in a given plasma sample [18]. The 25% difference determined could not be observed in all samples. However, it is interesting to note that, in the case of the other enantiomer (carvedilol-R) and its ISTD counterpart (carvedilol-R-[<sup>2</sup>H]<sub>5</sub>), no significant difference in the matrix effects determined for the individual components was caused by the different retention times. Furthermore, even in the case of carvedilol-S, only in one plasma sample out of 18 was the 25% difference observable, although this resulted in a 20% higher concentration in the control sample compared to the reference value. The problem was solved by the authors by using a solid phase extraction clean-up and by dilution of the sample. Recovery of the enantiomers was still acceptable, and the amount of coeluting matrix component(s) could also be minimized in the critical plasma sample.

###### 4.1.2 Exact-matching double isotope dilution method

One of the best and most accurate ways to determine the concentrations of control samples or proficiency testing samples is exact-matching double isotope dilution mass spectrometry (EMD-IDMS), the foundation of which was laid down by Henrion in 1994 [19]. The

lósítható meg, például aminoglükozidok vagy makrolidok esetében. A mérések pontosságát döntően az olyan ko-eluálódó mátrixalkotó komponensek befolyásolják, mint a foszfolipidek, a cukrok, zsírok, a metabolitok, szennyezők, bomlástermékek, stb. A mátrixhatás kompenzálásának leghatékonyabb eszköze a mátrixból felvett kalibráció (matrix-matched calibration). A kalibrációs mintákban a meghatározandó komponenseket érő mátrixhatás közel megegyezik a célkomponenseket a tesztmintákban ért mátrixhatással. Mátrix alapú kalibrációval az ionizációt befolyásoló hatások kompenzálhatóak, de meg kell jegyezni, hogy két teljesen azonos háttérrel nem lehet felvenni biológiai mintáknál, mivel az endogén komponensek koncentrációja és minősége is különbözhet mintáról mintára. Azonos minták közti mátrixhatásbeli eltérések kompenzálása legjobban izotóphígítással (ID) valósítható meg. Az eljárást az 1950-es évektől már az elemvizelésben, míg az 1970-es évektől a szerves anyagok meghatározásában egyaránt nagy sikerrel használják. A mátrixhatás megfelelő minta-előkészítéssel, a minta hígításával és a kromatográfiás felbontás növelésével tovább csökkenthető [16].

#### 4.1 Az izotóphígítási módszerek

##### 4.1.1 Normál izotóphígítási módszer

Az izotóphígítási módszernél a célkomponens izotóp jelzett analógját adalékoljuk a mintához adott koncentrációban, mint ISTD-t. Mivel az ISTD retenciós ideje egybeesik (minimális eltérés előfordulhat, ami pl.: a C-H és C-<sup>2</sup>H eltérő kötési hosszra vezethető vissza) a mérendő komponenssel, így megegyező mátrixhatás éri a célvegyületet és az ISTD-t az ionforrásban. A belső standard eljárásnak köszönhetően a célvegyület és az ISTD válaszjelének (területének) aránya ezért független lesz a mátrixhatástól. Az izotóphígítási tömegspektrometria (IDMS) nagyon hatékony eljárás, de alkalmazhatóságát korlátozza, hogy izotóp jelzett standard nem érhető el minden komponens esetében. Vagy kereskedelmi forgalomban nem beszerezhető az adott komponens jelzett analógja, vagy az esetenként rendkívül magas árak miatt nem minden laboratórium engedheti meg használatukat gazdasági szempontok miatt. További problémát jelenthet az ISTD izotóp tisztasága, koncentrációja és az ISTD jellege (pl.: <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O). A deutérium jelzett ISTD-k hátránya, hogy poláros közegben, a hidrogén – deutérium csere következtében, megváltozik a vegyület polaritása, és így a deuterált ISTD-k retenciós ideje (deutérium csere elválasztásánál nem esik milliszekundum pontosan egybe a célvegyület retenciós idejével). Az IDMS csak akkor szolgáltat mindíg megfelelő minőségű eredményt, ha a retenciós idők csak minimális mértékben különböznek, mert csak így lehet biztosítani, hogy a mátrixhatás értéke és iránya a célvegyületre és annak jelzett változatára nézve minimális mértékben térjen el. Az ISTD koncentrációjának megfelelő megválasztása fontos szerepet tölt be, mivel ha a tesztmintában a mérendő komponens

koncentrációja lényegesen kisebb, mint a mintához adagolt ISTD-é, akkor az utóbbi okozhatja a célvegyület ionszuppresszióját az ionforrásban, azaz alulbecsüljük a komponens koncentrációját a mintában. Az a helyzet is előfordulhat, hogy a jelzett standard nem rendelkezik megfelelő izotóptisztasággal vagy a jelzett vegyület mellett megtalálható az izotóppal nem jelzett forma is, ami a nagyérkenységű módszerek esetében felülbecsléshez, ill. torzításhoz vezethet az alacsony koncentráció-tartományban [17].

Wang és munkatársai karvedilol enantiomerek (S és R) meghatározását vizsgálták emberi plazma mintákban LC-IDMS módszerrel és az eljárás során a mintákat enantiomer analóg ISTD komponensekkel hígították: karvedilol-S-[<sup>2</sup>H]<sub>5</sub> és karvedilol-R-[<sup>2</sup>H]<sub>5</sub> [18]. A minta-előkészítés során csak fehérje kicsapást alkalmaztak acetonitrillel, majd a mintát 2,3,4,6-tetra-*o*-acetilbéta-glükopiranozil izotiocianáttal származékolták acetonitriles közegben. A karvedilol-S enantiomer és annak analóg jelzett standardjának retenciós ideje között 0.02 perc (1.2 másodperc) különbséget figyeltek meg, ami visszavezető volt hidrogén–deutérium (*n*=5) cserére. Ez, az amúgy minimális retenciós időbeli különbség, elegendő volt ahhoz, hogy a karvedilol-S-re és ISTD-jére mért mátrixhatás között 25%-os eltérést tapasztaljanak egy adott plazma mintában [18]. A meghatározott 25%-os különbség nem volt megfigyelhető mindegyik mintában. Érdekes viszont megjegyezni, hogy a másik enantiomer (karvedilol-R) és ISTD párja (karvedilol-R-[<sup>2</sup>H]<sub>5</sub>) esetén a retenciós idő különbség nem okozott szignifikáns eltérést a komponensekre meghatározott egyedi mátrixhatások között. Továbbá a karvedilol-S esetében is csak 18 mintából egy plazma mintában volt megfigyelhető a 25%-os különbség, viszont ez 20%-kal nagyobb koncentrációt eredményezett a kontrollmintában, a referencia értékhez képest. A problémát a szerzők szilárd fázisú extrakciós tisztítással és a minta hígításával oldották meg. Az enantiomerek visszanyerése még megfelelő értéket képviselt, valamint a ko-eluálódó mátrix komponens(ek) mennyiségét is sikerült minimálni a kritikus plazma mintában.

##### 4.1.2 Pontosan egyező dupla izotóphígítási módszer

Kontrollminták, körvizsgálati minták koncentráció meghatározásainak egyik talán legjobb és legpontosabb módja a pontosan egyező dupla izotóphígítási módszer (exact-matching double isotope dilution mass spectrometry, EMD-IDMS), melynek alapjait Henrion dolgozta ki 1994-ben [19]. Az eljárás lényege, hogy a tesztmintát a minta-előkészítés előtt a komponens analóg izotóp jelzett ISTD-jének adott mennyiségével hígítjuk (normál IDMS). A minta HPLC-MS/MS analízisét követően meghatározzuk az izotóp arányt ( $R_{\text{tesztminta}}$ ) a célvegyület és az ISTD kromatográfiás területének az arányaként. Az előzetes mérésből meghatározott  $R_{\text{tesztminta}}$  értékét a mintához adagolt ISTD mennyiségének változtatásával egységnyire (~1 körüli értékre) kell állítani. A minta

essence of the method is that the test sample is diluted with a given amount of the isotopically labeled analogue ISTD of the component before sample preparation (normal IDMS). Following HPLC-MS/MS analysis of the sample, the isotope ratio ( $R_{\text{test sample}}$ ) is determined as the ratio of chromatographic areas of the target compound and the ISTD. The value of  $R_{\text{test sample}}$ , determined by the preliminary measurement, has to be adjusted to a unit value (approximately 1), by varying the amount of ISTD added to the sample. To determine the concentration of the sample, a one-point calibration is used. The calibration sample, which has the same matrix as the test sample and is blank for the target compound, is diluted with the same amount of ISTD as the test sample, and a known amount of reference material is added to it at once before sample preparation (reverse IDMS). The reference material in this case is a known concentration standard solution of the compound to be determined (in ng/g). Since normal and reverse IDMS are used in the method at the same time, we talk about double IDMS. The amount of the reference material added to the calibration sample has to be adjusted, so that the isotope ratio measured in the calibration sample ( $R_{\text{calibration sample}}$ ) will be equal to the isotope ratio measured in the test sample („exact-matching”). The ratio of the isotope ratios ( $R_i = R_{\text{test sample}} / R_{\text{calibration sample}}$ ) can then be calculated. The average ratio of isotope ratios ( $R'_{i, \text{average}}$ ), which is completely independent of the systematic error of the instrumental analysis, can be calculated by ten consecutive analyses (injection) of one test sample and the corresponding calibration sample. Concentration of the  $i^{\text{th}}$  sample can then be calculating by the following formula [5]:

$$w_{x,i} = w_z \frac{m_{y,i} m_{z_c} R'_{i, \text{average}}}{m_{x,i} m_{y_c}}$$

Where  $w_{x,i}$  is the mass fraction of the component on the  $i^{\text{th}}$  sample [ng/g];  $w_z$  is the mass fraction of the component on the reference material [ng/g];  $m_{z_c}$  is the mass of the reference material added to the calibration sample [mg];  $m_{y_c}$  is the mass of the ISTD solution added to the calibration sample [mg];  $m_{y,i}$  is the mass of the ISTD solution added to the  $i^{\text{th}}$  sample [mg];  $m_{x,i}$  is the mass of the  $i^{\text{th}}$  sample [mg];  $R'_{i, \text{average}}$  is the average ratio of isotope ratios, calculated from ten injections. To achieve greater accuracy, addition of the reference material and ISTD solutions has to be performed using an analytical balance.

The advantage of EMD-IDMS over multi-point calibration is that, with this method, evaluation of the sample is independent of the accuracy of lower and higher calibration levels, because there is only a one-point calibration, but this single point matches exactly the concentration of the sample. Moreover, the concentration and purity of the ISTD is not an important factor either, since the same amount of ISTD is added to each sample. The EMD-IDMS procedure makes accurate determination of very low concentrations of target compounds possible, while measurement uncertainty decreases significantly because of the parallel measurements (ten consecutive injections of the test sample and the calibration sample), so 0.197 µg/kg aflatoxin B1 can be detected in cereal-based foods with a precision of 8.9% [5]. EMD-IDMS plays a key role in the determination of the concentrations of proficiency testing sample and control samples, and also in accurate determination of the concentrations of forensic samples. The disadvantage of the method is that it can only be used for the determination of compounds that have available

stable isotopically labeled analogues and the retention time of the ISTD should coincide completely with the retention time of the target compound (e.g.  $^{13}\text{C}$ -labeled). Furthermore, determination of the concentration of a single sample might take several days, depending on how one manages to adjust the isotope ratios of the test sample and the calibration sample to identical values (around 1). Method error can be decreased by repeat injection of the samples (test sample and calibration sample), therefore, it is important in the procedure to have as short instrumental analysis time as possible. Precision is also influenced by the intensity of the measured signals, so it is also important for the concentration of the target compound to be as high as possible in the injected solution of the test sample. This can be achieved most easily by sample enrichment, but at the same time, concentrations of matrix components will increase as well in the injected solution of the test sample, strengthening matrix effects. Therefore, MS detection should be preceded by optimized sample preparation and as good liquid chromatographic separation as possible, to better minimize matrix effects [5]. Although matrix effects are compensated by the ISTD, the reduction of signal intensity in the case of ion suppression is not.

#### 4.2 HPLC-MS/MS vs. HPLC-UV

Despite the fact that HPLC-MS/MS methods belong to the most adequate confirmation methods today, it is not always a technique based on it that can provide the best solution. A good example for this is the determination of tetracyclines in foods of animal origin. Tetracycline type antibiotics are among authorized substances in the EU and, accordingly, they have a substance residue limit value, which 100 µg/kg for meat samples and 300 µg/kg for liver samples [20]. Tetracycline type compounds can be detected easily using UV detectors at a higher, more selective wavelength (~360 nm), and so the determination of the tetracycline content of unprocessed food samples can be achieved easily by an HPLC-UV method, following an extraction and an SPE clean-up [21]. The four tetracycline derivatives listed in the regulation (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline) and their epimers can be measured in one injection without interference by the above-mentioned HPLC-UV method, at the levels prescribed by the EU. However, the accuracy of the highly sensitive and selective HPLC-MS/MS analysis of tetracyclines depends greatly on coeluting matrix components [21]. Even though recovery and precision values calculated during the validation of a pig muscle sample were better for the MS method than for the UV method, the latter resulted in concentrations closer to reference values when measuring reference materials [21]. The reason for this is that, while the validation procedure was performed using spiked samples, the reference sample came from a treated animal. It does not matter the matrix-matched calibration was used during the MS measurement: if the isotopically labeled ISTD is not available, differences in matrix effects between the calibration sample and the test sample can distort the real concentration value. Accordingly, the four tetracycline derivatives and their three epimers would require seven ISTD analogues, which would increase analysis costs significantly and unnecessarily, because coeluting, but not interfering matrix components do not interfere with the measurement, when using the UV method. Furthermore, the HPLC-UV method can also be applied for confirmation in the case of authorized substances [1].

koncentrációjának meghatározásához egy-pontos kalibrációt alkalmazunk. A kalibrációs mintát, mely a tesztmintával megegyező mátrixú és az adott célvegyületre nézve vak, ugyanazon mennyiségű ISTD-vel hígítjuk, mint a tesztmintát és adott mennyiségű referencia anyagot adagolunk hozzá egy időben a minta-előkészítés előtt (fordított IDMS). A referencia anyag ez esetben a meghatározandó vegyület ismert koncentrációjú standard oldata (ng/g dimenzióban). Mivel a normál és a fordított IDMS egyszerre van a módszerben alkalmazva, ezért beszélhetünk dupla IDMS-ről. A kalibrációs mintához adagolt referencia anyag mennyiségét úgy kell beállítani, hogy a kalibrációs mintában mért izotóp arány ( $R_{\text{kalibrációs minta}}$ ) megegyezzen a tesztmintában mért izotóp aránnyal („exact-matching”). Az izotóp arányok aránya ( $R_i = R_{\text{tesztminta}} / R_{\text{kalibrációs minta}}$ ) ezután számítható. Egy tesztminta és a hozzátartozó kalibrációs minta tíz egymás utáni analizisével (injektálásával) számítható az izotóp arányok arányainak átlaga ( $R'_{i, \text{átlag}}$ ), ami teljesen független a műszeres mérésből adódó rendszeres hibáktól. Az  $i$ -edik minta koncentrációja ezek után az álabbi összefüggéssel számítható [5]:

$$w_{x,i} = w_z \frac{m_{y,i} m_{zc} R'_{i, \text{átlag}}}{m_{x,i} m_{yc}}$$

Ahol  $w_{x,i}$  a komponens tömegtörtje az  $i$ -edik mintában [ng/g];  $w_z$  a komponens tömegtörtje a referencia anyagban [ng/g];  $m_{zc}$  a kalibrációs mintához adott referencia anyag tömege [mg];  $m_{yc}$  a kalibrációs mintához adott ISTD oldat tömege [mg];  $m_{y,i}$  az  $i$ -edik mintához adott ISTD oldat tömege [mg];  $m_{x,i}$  az  $i$ -edik minta tömege [mg];  $R'_{i, \text{átlag}}$  az izotóp arányok arányainak átlaga a tíz injektálásból számítva. A referencia anyag és az ISTD oldatának adagolását analitikai mérlegen kell végezni a nagyobb pontosság érdekében.

Az EMD-IDMS előnye a többpontos kalibrációhoz képest, hogy ennél a módszernél a minta értékelése független az alacsonyabb és magasabb kalibrációs szintek pontosságától, mivel csak egy-pontos a kalibráció, viszont ez az egy pont pontosan egyezik a minta koncentrációjával. Ráadásul az ISTD koncentrációja és tisztasága sem lényeges azáltal, hogy minden mintához ugyanaz az a mennyiségű ISTD van adagolva. Az EMD-IDMS eljárás lehetővé teszi a célkomponensek nagyon kis koncentrációban történő pontos meghatározását, miközben a mérési bizonytalanság a párhuzamos mérések (a tesztminta és a kalibrációs minta 10 egymást követő injektálása) következtében lényegesen lecsökken, így akár 8.9%-os precizitás mellett lehet 0.197  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aflatoxin B1-et kimutatni gabona alapú élelmiszerekből [5]. Az EMD-IDMS-nek kiemelt szerepe van körvizsgálati minták és kontrollminták koncentrációjának meghatározásánál, valamint törvényszéki minták pontos koncentrációjának megállapításánál. A módszer hátránya, hogy csak olyan vegyületek meghatározására alkalmas, amelynek stabil izotóp jelzett analógja elérhető és

az ISTD retenciója teljesen egybe esik a célvegyület retenciójával (pl.:  $^{13}\text{C}$  jelzett). Továbbá egy minta koncentrációjának meghatározása akár több napot is igénybe vehet attól függően, hogy a tesztminta és a kalibrációs minta izotóp arányait hogy sikerül azonos (~1 körüli) értékre állítani. A módszer hibája a minták (tesztminta és kalibrációs minta) többszöri injektálásával csökkenthető így fontos az eljárásban, hogy a műszeres analízis idő minél rövidebb legyen. A precizitást a mért jelek intenzitása is befolyásolja, így fontos, hogy a célvegyület koncentrációja minél nagyobb legyen a tesztminta injektált oldatában. Ezt legkönnyebben a minta dúsításával lehet elérni, viszont ezzel egy időben a mátrixalkotó komponensek koncentrációja is nő a tesztminta injektált oldatában, ami a mátrixhatásokat erősíti. Ezért optimált minta-előkészítésnek és minél nagyobb felbontású folyadékkromatográfiás elválasztásnak kell megelőznie az MS-detektálást, hogy a mátrixhatások jobban minimalizálódjanak [5]. Az ISTD a mátrixhatásokat bár kompenzálja, de a jelintenzitás csökkenését ion elnyomás esetén nem.

## 4.2 HPLC-MS/MS vs. HPLC-UV

Annak ellenére, hogy napjainkban a HPLC-MS/MS módszerek a legmegfelelőbb konfirmációs eljárások közé tartoznak, nem mindig az ezen alapuló technika alkalmazása adhatja a legjobb megoldást. Jó példa erre a tetraciklinek meghatározása állati eredetű élelmiszerekből. Az EU-ban a tetraciklin típusú antibiotikumok az engedélyezett szerek közé tartoznak, ennek megfelelően maradékanyag határértékkel rendelkeznek, amely hús mintákra 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , míg máj mintára 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [20]. A tetraciklin típusú vegyületek jól detektálhatóak UV detektorokkal magasabb, szelektívebb hullámhosszon (~360 nm), ezért feldolgozatlan élelmiszerminták tetraciklin tartalmának meghatározása egy extrakciót és egy SPE tisztítást követően jól kivitelezhető HPLC-UV módszerrel [21]. A négy, rendeletben meghatározott tetraciklin származék (oxitetra-ciklin, tetraciklin, klórtetraciklin és doxiciklin) és epimereik, egy injektálással interferencia nélkül mérhető az előző HPC-UV módszerrel az EU által előírt szinteken. A tetraciklinek nagy érzékenységgel és szelektivitással HPLC-MS/MS analízisének pontossága viszont jelentős mértékben függ a ko-eluálódó mátrix komponensektől [21]. Annak ellenére, hogy sertés izom minta validálása során számolt visszanyerés és precizitás értékek az MS módszer esetén jobbnak bizonyultak az UV módszerhez képest, referencia anyagok mérése során az UV módszer eredményezett a referencia értékekhez közelebbi koncentrációkat [21]. Ennek oka, hogy míg maga a validálási folyamat adagolt mintákkal lett kivitelezve, addig a referencia-minta kezelt állattól származott. Hiába alkalmazunk mátrix alapú kalibrációt az MS mérés során, ha izotóp jelzett ISTD nem áll rendelkezésre, a kalibrációs minta és a tesztminta között lévő mátrixhatásbeli különbségek a valós koncentráció értékét torzíthatják. Ennek megfelelően a négy tetraciklin származék és a hozzájuk tartozó

három epimer összesen hét analóg ISTD-t igényelne, ami jelentősen és feleslegesen megnövelné a vizsgálat költségeit, mivel az UV módszer használata során nem zavarják a mérést a ko-eluálódó, de nem interferáló mátrix komponensek. Továbbá a HPLC-UV eljárás is alkalmazható konfirmációra engedélyezett szerek esetén [1].

A két elválasztástechnika (HPLC-MS/MS és HPLC-UV) pontossága közti különbség a minta összetettségével fokozatosan élesedik ki. Míg húsminta vizsgálatkor mindkét módszer elfogadható eredményt adott, addig májmintánál, IDMS hiányában, csak az UV módszerrel lehetett megfelelő értéket meghatározni [21]. Klórtetraciklin tartalmú sertés máj tanúsított referencia-anyag ( $580 \pm 110 \mu\text{g/kg}$ ) MS mérése során a detektált koncentráció, két mérés átlagaként,  $772.5 \pm 0.7 \mu\text{g/kg}$ -nak adódott, míg az UV módszer esetén, ugyancsak két mérés átlagaként,  $584 \pm 21.2 \mu\text{g/kg}$  volt. Míg az MS detektálású módszer precizitása ismét jobbnak adódott, addig csak az UV detektálású koncentráció értékek voltak elfogadhatóak. Az MS mérés torzításának oka ismét a mátrixhatással magyarázható. A kalibrációs máj mintákban nem ugyanazon értékű mátrixhatás érte a klórtetraciklint, mint a referencia anyagban. Az MS módszer pontatlanságának oka ez esetben az is, hogy a módszer hús mintára (mátrixra) lett kidolgozva és validálva. A hús mátrixra kidolgozott MS módszer változás nélküli alkalmazása májmintára a mért koncentrációk erős torzítását eredményezte, ami a hús- és a májminták közti eltérő mátrixhatásokkal magyarázható. Az HPLC-UV módszer szintén húsmátrixra lett optimálva, de ezen technika esetén az eljárás más mátrixra történő alkalmazása nem jelentett problémát, mert a mátrixhatás változása az UV-detektálást nem befolyásolta.

## 5. Következtetések

A HPLC-MS/MS technika napjainkban kiemelt szerepet tölt be az élelmiszer-analitikai szemszögből fontos szerves szennyezők meghatározásában. Szűrő módszerként alkalmazva több vizsgálati irányra (antibiotikum, mikotoxin stb.) kaphatunk információt, akár 100 komponensre is párhuzamosan, az esetek többségében egy extrakciót és egy gyors mérést követően. Fontos szerepe van a HPLC-MS/MS-nek a megerősítő mérésekben is, amelyekben a módszer optimálása az adott mintához, komponensekhez és készülékhez elengedhetetlen. Viszont egy adott HPLC-MS/MS készüléken jól működő módszert nem mindig lehet másik készülékre adaptálni változtatás nélkül, így a HPLC-MS/MS módszerek szabványosítása nagy kihívások elé állítják a szakembereket. Főképp, ha izotóp jelzett ISTD nem áll rendelkezésre a mátrixhatások kompenzálására.

The difference in accuracy between the the two separation techniques (HPLC-MS/MS and HPLC-UV) becomes gradually more pronounced with increasing sample complexity. While acceptable results were provided by both methods when analyzing meat samples, only the UV method was capable of determining suitable values for liver samples, in the absence of IDMS [21]. During MS measurement of a chlortetracycline-containing pig liver certified reference material ( $580 \pm 110 \mu\text{g/kg}$ ), the detected concentration, as the average of two measurements, was  $772.5 \pm 0.7 \mu\text{g/kg}$ , while in the case of the UV method, also as the average of two measurements, it was  $584 \pm 21.2 \mu\text{g/kg}$ . While the precision of the method with MS detection was again better, only concentration values obtained with UV detection were acceptable. The inaccuracy of the MS measurement can again be explained by the matrix effect. The extent of the matrix effect on chlortetracycline was not the same in the calibration liver sample, as it was in the reference material. In this case, another reason for the inaccuracy of the MS method is that the method was developed and validated for meat samples (matrix). Application of the MS method, developed for meat matrix, to liver samples with no modification resulted in a strong distortion of the measured concentrations, which can be explained by the different matrix effects of meat and liver samples. The HPLC-UV method was also optimized for meat matrix, but in the case of this technique, application of the procedure to another matrix was not a problem, because UV detection was not affected by the change in matrix effect.

## 5. Conclusions

Today, the HPLC-MS/MS technique plays a major role in the determination of organic contaminants that are important from a food analytical point of view. When applied as a screening method, it can provide information about several compound groups (antibiotics, mycotoxins etc.), about as many as 100 components at the same time, following an extraction and a quick measurement in most cases. HPLC-MS/MS has an important role in confirmation measurements as well, where method optimization for the given sample, components and instrument is essential. However, a method that functions well on a given HPLC-MS/MS instrument cannot always be adapted to another instrument without modification, and so standardization of HPLC-MS/MS methods poses a great challenge to experts. Especially, if isotopically labeled ISTDs are not available to compensate for matrix effects.

## 5. Hivatkozások / References

- [1] Commission Decision 2002/657/EC. (2002): Off. J. EU L/221.
- [2] Löhmus, M., Kallaste, K., Le Bizec, B. (2009): Determination of thyreostats in urine and thyroid gland by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216. p. 8080–8089
- [3] Pérez-Fernández, V., Marchese, S., Gentili, A., García, M.Á., Curini, R., Caretti, F., Perre, D. (2014): Analysis of antithyroid drugs in surface water by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A* 1367. p. 78–89
- [4] Tölgyesi, Á., Tölgyesi, L., Sharma, V.K., Sohn, M., Fekete, J. (2010): Quantitative determination of corticosteroids in bovine milk using mixed-mode polymeric strong cation exchange solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53. p. 919–928
- [5] Breidbach, A., Ulberth, F. (2014): Two-dimensional heart-cut LC–LC improves accuracy of exact-matching double isotope dilution mass spectrometry measurements of aflatoxin B1 in cereal-based baby food, maize, and maize-based feed. *Anal. Bioanal. Chem.* DOI 10.1007/s00216-014-8003-5
- [6] Ghosh, C., Shinde, C.P., Chakraborty, B.S. (2012): Influence of ionization source design on matrix effects during LC–ESI-MS/MS analysis. *J. Chromatogr. B* 15. p. 893–894
- [7] Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., Michotte, Y. (2009): Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *J. Chromatogr. B* 23. p. 2198–2207
- [8] Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. (2003): Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75. p. 3019–3030
- [9] Tölgyesi, Á., Kovacsics, L., Sharma, V.K., Fekete, J. (2010): Quantification of corticosteroids in bovine urine using selective solid phase extraction and reversed-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 878. p. 1471–1479
- [10] Yang, C.T., Ghosh, D., Beck, J., Humphries, J.K., Akervik, K., McHale, K.J., Gu C. (2009): Screening for 250 Pesticides in Orange Oil and Ginseng Extract by LC-MS/MS Using TraceFinder Software. Thermo Fisher Scientific. [http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Application%20%26%20Technical%20Notes/Mass%20Spectrometry/MS%20Software/AN477\\_63172\\_TSQ\\_orange-oil%281%29.pdf](http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Application%20%26%20Technical%20Notes/Mass%20Spectrometry/MS%20Software/AN477_63172_TSQ_orange-oil%281%29.pdf)
- [11] Siegel, D., Rasenko, T., Koch, M., Nehls, I. (2009): Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization ion-trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Chromatogr. A* 1216. p. 4582–4588
- [12] 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
- [13] Gaugain-Juhel, M., Delépine, B., Gautier, S., Fourmond, M.P., Gaudin, V., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., Sanders, P. (2009): Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. *Food Addit. Contam.* 26. p. 1459–1471
- [14] Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. (2006): Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20. p. 2649–2659
- [15] Varga, E., Glauner, T., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M. (2013): Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Anal. Bioanal. Chem.* 405. p. 5087–5104
- [16] Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D.M., Lu, Z., Mazzeo, J.R. (2007): Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J. Chromatogr. B* 852. p. 22–34
- [17] Matuszewski, B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng, C.M. (1998): Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations. *Anal. Chem.* 70. p. 882–889
- [18] Wang, S., Cyronak, M., Yang, E. (2007): Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43. p. 701–707
- [19] Henrion, A. (1994): Reduction of systematic errors in quantitative analysis by isotope dilution mass spectrometry (IDMS): an iterative method. *Fresenius J. Anal. Chem.* 350. p. 657–658
- [20] Commission Regulation (EU) No. 37/2010. (2010): Off. J. EU L 15/1
- [21] Tölgyesi, Á., Tölgyesi, L., Békési, K., Sharma, V.K., Fekete, J. (2014): Determination of tetracyclines in pig and other meat samples using liquid chromatography coupled with diode array and tandem mass spectrometric detectors. *Meat Sci.* 96. p. 1332–1339