



SZENT ISTVÁN EGYETEM

MINTAELŐKÉSZÍTÉSI MÓDSZEREK KIDOLGOZÁSA
ÉS REFERENCIAANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSA
MÓDOSULATANALITIKAI CÉLOKRA

DERNOVICS MIHÁLY

doktori értekezésének tézisei

Készült a Szent István Egyetem
Alkalmazott Kémia Tanszékén

Budapest, 2003

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fekete András
Egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Budai Campus, Élelmiszertudományi Kar,
Fizika-Automatika Tanszék

Témavezető: Dr. Fodor Péter
Tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Budai Campus, Élelmiszertudományi Kar,
Alkalmazott Kémia Tanszék

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

1.1. A MÓDOSULATANALITIKA LÉTREJÖTTÉNEK OKAI ÉS FEJLŐDÉSE A KEZDETEKTŐL NAPJAINKIG

A higany esetében (Minamata-öböl, Japán, 1956) mutatkozott meg először, hogy ugyanazon elem eltérő oxidációs állapotú vagy eltérő ligandummal bíró formái akár végletekig különböző módon viselkednek az élő szervezetben. Egyidőben a higannyal, a króm élettani kutatásainak eredményei talán még nagyobb szenzációt keltettek a tudományos berkekben, hiszen a 6 vegyértékű formájának kiemelkedően rákkeltő jellege miatt toxikusnak tartott elem 3 vegyértékű állapotáról 1959-ben derítették ki, hogy fontos szerepet játszhat a glükóz-anyagcsere szabályozásában. A sort az arzén folytatta: 1977-ben Edmonds és Francesconi kutatópárosnak sikerült egy rákféléből izolálni az arzenobetaint, az első olyan szerves arzénvegyületet, melynek bizonyítottan nincs toxikus hatása, s amely feloldotta a tengeri eredetű élelmiszerek arzéntartalma és ennek ellenére veszélytelen fogyasztásuk között feszülő ellentmondást. Csupán 6 évet kellett várni az újabb – ez esetben negatív – példára: az elemi állapotban és szervesen sóiban veszélytelennek számító ón hajófestékekhez kevert tributil-származéka a célszervezetek közé nem tartozó élőlényeknél (pl. osztriga) genotoxikusnak bizonyult. Végül, de nem utolsósorban a szelént és a vasat kell megemlítenünk, amelyek az eddig ismertek, koncentrációtól részben független, „toxikus-létfonosságú” /króm(VI) vs. króm(III)/, „toxikus-valószínűleg nem toxikus” /általában az arzén vs. arzenobetain; szerves ón-származék vs. szerves ón/ ill. „kiemelten toxikus-kevésbé toxikus” /metil-higany vs. szerves higany/ minőségi megközelítéseket új elemmel ötvözték: a koncentrációtól kiemeltebben függő, „biológiailag jobban elérhető és/vagy biológiailag jobban hasznosuló és/vagy járulékosan jó/rossz hatást mutató/nem mutató” tulajdonságok megállapításával.

Az előző példák egyértelműen jelezték, hogy egy adott elem teljes koncentrációjának megismerése többé már nem nyújt elegendő információt a vizsgált mintáról, lett légyen szó akár élelmiszerről, talajmintáról vagy öntözővízről – bármiről, amelyben a kérdéses elemnek egy vagy több, valamilyen szempontból kritikus kémiai-fizikai-élettani jellemzővel bíró formája fordulhat elő. Kialakult egy új, több tudományágat érintő szakterület, mely az analitikai-környezeti-élelmiszer-klinikai kémia, a biokémia és az élettan határmezsgyéjén helyezkedik el: a módosulatanalitika („speciation analysis”). A sok közös terület és a részbeni átfedések miatt egy ideig ugyanakkor nem volt teljesen világos az új, külön tudományág létének létjogosultsága, és helyzetének tisztázásához szükséges nevezéktani definíciók is hiányoztak még. Végül a IUPAC 2000-ben végre közzé tette a pontos megnevezéseket, amelyeket konkrét példákkal látott el a lehető legpontosabb értelmezés végett. A definíciók szerint „egy elem kémiai módosulata („chemical species”) az elem egy adott formája, amelyet izotópösszetétele, vagy elektron- / oxidációs állapota, és/vagy komplex vagy molekuláris szerkezete határoz meg”; a módosulatanalitika pedig „azon analitikai tevékenységek összessége, melyek egy adott mintában lévő, egy vagy több egyedi kémiai módosulat minőségi és/vagy mennyiségi meghatározására irányulnak”. A korábban említett, Hg-Cr-As-Sn-Se-Fe elemek mellé időközben felzárkóztak a platinafémek (Pd, Pt), a nikkell és az ólom is, tovább bővítve a módosulatanalitika célterületét.

A kezdetben egymástól elszigetelten fejlődő, elemenként tárgyalt módosulatanalitika mára egységes egészévé vált és felbecsülhetetlen értékű új ismeretanyaggal járult hozzá ahhoz, hogy munkakörülményeink, élelmiszereink, gyógyszereink biztonságosabbak legyenek, hogy környezetünk védelmét korszerűbb tudományos háttérrel biztosíthassuk és megérthessünk számos olyan biokémiai folyamatot, melyek szervezetünk működésében káros vagy épp ellenkezőleg, hasznos élettani hatást válthatnak ki. Értekezésemben ezen kutatások két jellegzetes szereplőjének, a szelénnek és az arzénnek módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárásainak ismertetésére került sor, valódi minták elemzésének tükrében – köztük egy olyan mintáé is, amely remélhetőleg az első természetes eredetű Se-módosulatanalitikai referenciaanyagként fog elterjedni.

1.2. CÉLKITŰZÉSEIM

A Se- és As-módosulatanalitika olyannyira fiatal tudományágnak számít, hogy egyszerre több, kiforratlanságából eredő „Achilles-sarokkal” bír; doktorandusztársaimmal együtt mindhármunknak jutott egy-egy: Ipolyi [2003] (módosulatanalitikai minőségbiztosítás) és Stefánka [2003] (módosulatanalitikai mintabeviteli technikák) mellett én a szinte minden mérési folyamatot megelőző mintaelőkészítés területén kutatva vittem végbe a PhD munkámhoz illeszkedő vizsgálataimat. Kutatási tevékenységem az időközben csatlakozó módosulatanalitikai feladatokkal együtt csiszolódott össze a következő három kérdéskörbe, melyek átszótták négy éves munkámat, és PhD értekezésben teljesebben ki:

- milyen módon lehet fejleszteni a Se- és As-módosulatanalitikai mintaelőkészítést az enzimes módszerek kiterjesztésével, ill. bír-e általános létjogosultsággal az enzimek használata ezen a területen?
- lehet-e általános, könnyen követhető és viszonylag egyszerű „receptet” nyújtani a szerves eredetű, Se- és As-tartalmú minták módosulatanalitikai mintaelőkészítéséhez?
- elő lehet-e állítani természetes vagy mesterséges eredetű módosulatanalitikai referenciaanyagot a rendelkezésre álló felszereltséggel?

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A VIZSGÁLT MINTÁK BEMUTATÁSA

A minták jellegzetesnek tekinthetők abban az értelemben, hogy a Se- és As-módosulatanalitika „kedvelt” alanyai:

- As-tartalmú zöldalga (*Chlorella vulgaris*)
- As-tartalmú lepényhal (*Pleuronectes platessa*)
- Se-tartalmú élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Se-tartalmú csiperkegomba (*Agaricus bisporus*)
- Se-tartalmú brazil dió (paradió; *Bertholletia excelsa*)

Általában több forrásból, eltérő eredetű és összes elem (As, Se) tartalmú, de azonos csoportba tartozó minták is elemzésre kerültek, hogy általános következtetéseket lehessen levonni a vizsgálatok után.

2.2. A FELHASZNÁLT ENZIMEK ÉS VEGYÜLETEK BEMUTATÁSA

A végrehajtott elemzések során számos enzim használatát kísértem végig, fehérjebontó (pepszin, tripszin, pronáz E, XIV-es típusú proteáz), sejtfalbontó (drizeláz, lysing enzim), lipidbontó (VII-es típusú lipáz) készítmények alkalmasságát vizsgálva. Bizonyos mintáknál sor került proteáz inhibitorok (PMSF, inhibitor koktél) adagolására is. Általános mintaelőkészítési közegként foszfát-, citrát- és TRIS-pufferek szolgáltak.

2.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK BEMUTATÁSA

Célszerűnek tűnt kidolgozni egy általános enzimes mintaelőkészítési eljárást, amely kellően rugalmas ahhoz, hogy akár a korábban még nem vizsgált és szakirodalom által sem említett mintákhoz is fogódzót nyújtson. Ez a megközelítés végül egy 3 kezelési szintre épülő módszerben öltött testet:

a, puffereelt közeggel vagy ioncserélt vízzel végrehajtott extrakció a könnyen kinyerhető módosulatok (pl. szervesen Se-, As-vegyületek) oldatba viteléhez;

b, enzimes sejtfalbontás, amelynek célja a sejtfalhoz kötött vagy sejtfal által elzárt módosulatok hozzáférhetővé tétele – ezt a lépést a fehérjehidrolízis szelektív gátlásával lehet kiegészíteni;

c, enzimes lipid- és/vagy fehérjehidrolízis, amely egyrészt a mátrix bontásával, másrészt a módosulatokat kötő fehérjék hidrolízisével járulhat hozzá a kinyerési hatások növeléséhez.

Természetesen ezeket a lépéseket következetesen és nem szigorúan követendő receptként kellett alkalmazni, hiszen a minta jellege olykor egyértelműen feleslegessé teheti valamelyik szint mintaelőkészítésbe történő beillesztését. Másrészt a fent bemutatott, szekvenciális elrendezés lehetővé teszi, hogy lépésenként határozzuk meg a Se- vagy As-mérleget, s így kiiktathassuk a hatástalannak-feleslegesnek bizonyuló kezeléseket. Fontos megemlíteni az adalékolás műveletét is, amely lényeges részét képezte az elvégzett mérések minőségbiztosításának.

A Se-módosulatanalitika fejlődését gátló tényezők között első helyen szokták megemlíteni a referenciaanyagok teljes hiányát, amely bonyolulttá, olykor szinte kivitelezhetetlenné teszi a mérések validálását. Számos kísérlet látott napvilágot arról, milyen módon lehetne előállítani megfelelő alapanyagot, amelyből alacsonyabb vagy magasabb szintű referenciaanyag készülhet; kutatásaim során én is több irányban végeztem vizsgálatokat, mesterségesen szelénnel dúsítva élesztőt, tejsavbaktériumot, ill. jellemeztem a természetű cég által szelénnel kiegészített komposzton előállított csiperkegombát is. Ezek a kísérletek nem hozták meg a várt eredményt; legfőbb problémaként a törzsszelekciót és kis léptékből adódó inhomogenitást, ill. a nem kielégítő módosulatazonosítási arányt lehet megnevezni.

A mesterségesen dúsított alapanyagok után a figyelem a természetes eredetű, nagy Se-tartalmú minták felé fordult, és így került sor a brazil dió (paradió) vizsgálatára, amely ideális választásnak bizonyult.

3. EREDMÉNYEK

3.1. AZ ENZIMES MINTAEŁKÉSZÍTÉSI MÓDSZEREKKEL FOLYTATOTT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Az arzéntartalmú alga- és halminták enzimes mintaelőkészítésének kritikai vizsgálata során elért eredmények

Az arzén módosulatanalítika leggyakrabban alkalmazott mintaelőkészítési módszere a metanollal végzett extrakció, ugyanakkor számos közlemény látott napvilágot az enzimes eljárások bevezetéséről. Kísérleteim során az enzimes mintaelőkészítés alkalmazásának létjogosultságát vizsgáltam meg sejtfal- és fehérjebontó készítményeken keresztül, alga- és lepényhalmintákat kezelve. Az enzimes módszereket mind egylépéses, mind pedig szekvenciális kialakításban teszteltem, és párhuzamosan metanolos extrakciót is végrehajtottam, majd egy ill. többváltozós statisztikai eljárásokkal értékeltem ki az eredményeket, melyek egyértelmű mátrixfüggőségre utaltak: az algaminta esetén a sejtfalbontás növelte a kinyerési hatásfokot, míg a lepényhal esetében egyik enzim használata sem bizonyult indokoltnak.

A szelénnel dúsított élesztőminták vizsgálata során elért eredmények

Az üzemi fermentációval előállított, szelénvel dúsított élesztő a szelént hordozó volta miatt mindenképpen bontásra kerülő fehérjetartalma mellett jelentős mennyiségben tartalmaz(hat) a fermentáció és az előkezelés jellegétől függően többé-kevésbé feltárt sejtfal ill. lipid komponenseket. Ezen alkotók gátolhatják a módosulatanalitikai mintaelőkészítés folyamatát, korlátozva az extraháló oldatok és enzimek hozzáférését a különböző Se-módosulatokhoz. Ebből következik, hogy amennyiben az említett összetevőket – pl. enzimes módszerrel – lebontjuk, elvileg javítani lehet a szakirodalmi adatok alapján gyakran nem kielégítő kinyerési hatásfok értékeket. Mindezekén túl, a megfelelő fehérjebontó enzim kiválasztása is csökkentheti a mintából nem kinyerhető Se-módosulatok mennyiségét.

Kísérleteim során megállapítottam, hogy a vizsgált élesztőminták esetén a sejtfal- ill. lipidbontó enzimek használata nem járult hozzá szignifikáns mértékben a kinyerési hatásfok növeléséhez, és alkalmazásuk annak ellenére sem indokolt, hogy a több enzim szekvenciális használatára építő módszer számos (elméleti) előnyt rejt magában.

A fehérjebontó enzimek összehasonlítása során sikerült kiválasztani a szakirodalomban leggyakrabban említett, Sigma gyártmányú „proteáz XIV” enzimhez képest költséghatékonyabb és egyszerűbben kezelhető enzimet (pronáz-E, Merck), melynek használata más típusú mintánál is ideálisnak bizonyult.

A szelénsóval kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódó eredmények

A magyarországi talajok többnyire kevés szelént tartalmaznak, így hagyományos élelmiszereinkből általában alig lehet biztosítani a minimális napi szelénbevitelt. Ezen problémára kínálhat megoldást a különböző szelénforrással kiegészített komposzton termesztett csiperkegomba. Először szerves szelén segítségével dúsított csiperkegomba-mintát vizsgáltam abból a célból, hogy egyrészt Se-módosulatanalitikai mintaelőkészítést dolgozzak ki, másrészt

megállapíthassam, a szakirodalomban legtöbbször nehezen hozzáférhető Se-tartalmúként jellemzett gomba vajon mesterséges dúsítás esetén is rossz ételmi szelénforrásnak bizonyul-e.

Az élesztőmintákkal ellentétben a csiperkegomba enzimes feltárásánál a szekvenciális módszer használata bizonyult a legalkalmasabbnak, amelynek segítségével 75%-os kinyerési hatásfokot értem el. Mivel a felhasznált enzimek (pepszin, tripszin) a biológiai hozzáférhetőség modellezésére is lehetőséget adtak, az elért eredmény a szelén kiemelkedő biológiai hozzáférhetőségéről is tanúskodik, jelezve, hogy az ilyen módon dúsított gomba alkalmas lehet ételmi szelénbevitelre is.

A mintaelőkészítés és mérés folyamatának minőségbiztosítását az adalékolás műveletével oldottam meg, melynek végrehajtásával egyrészt igazolni tudtam a gombamintában eredetileg jelen lévő ill. a hozzáadott Se-módosulatok eltérő extrakciós tulajdonságait, másrészt közvetett módon azonosítottam az egyik kinyert Se-módosulatot (Se(IV)).

A Se-tartalmú élesztővel kiegészített komposzton termesztett, Se-dúsított gomba módosulatanalitikai vizsgálatához kapcsolódó eredmények

Bár a szerves szelénforrást (Se-dúsított élesztő) tartalmazó komposzton termesztett gomba nagyságrendileg azonos mennyiségben tartalmazott szelént, a mintaelőkészítési művelet optimalizálását célzó kísérletsorozatomban az előző csiperkemintához képest jelentős különbségeket tárt fel. A kinyerési hatásfok tekintetében a sejtfalbontással kiegészített szekvenciális enzimes módszerrel sikerült a legnagyobb, közel 90%-os értéket elérnem, azonban a kinyert Se-módosulatokat az egy lépéses, kizárólag fehérjebontásra építő mintaelőkészítés során lehetett a legnagyobb mértékben azonosítani. Ezen jelenség mögött valószínűleg a csiperke fehérjetartalmának korábbi mintákhoz képest eltérő méreteloszlása áll, amely a többlépéses módszereknél alkalmazott centrifugálási műveletek során a szelént hordozó komponensek eltávolításában – s így a szekvenciális mintaelőkészítés következő lépésénél kisebb hozzáférhető Se-tartalomban – öltött testet.

A sejtfalbontás műveletének a teljes Se-kinyerésre gyakorolt hatását szelektív fehérjegtáplálás alkalmazásával tettem egyértelművé és indokolttá: proteáz inhibitor vegyületek segítségével sikerült igazolni, hogy a sejtfalbontási művelet során a szignifikánsan megnövekedett kinyerési hatásfok mögött nem járulékos fehérjebontás áll, hanem attól független, kizárólag a csiperke sejtfalára ható enzimaktivitás. Fontos kiemelni, hogy a különböző sejtfalbontó enzimkészítmények eltérő Se-módosulatok felszabadításához járultak hozzá.

3.2. A MÓDOSULATANALITIKAI REFERENCIAANYAG ELŐÁLLÍTÁSÁT CÉLZÓ VIZSGÁLATAIM EREDMÉNYEI

Kísérleteim első szakaszában mesterségesen szelénrel dúsított, fermentációval előállított élesztő- és tejsavbaktérium mintákat vizsgáltam abból a szempontból, hogy alkalmazhatóak-e módosulatanalitikai referenciaanyag előállításának céljára. Bár a fermentációs folyamat azzal az előnnyel járt, hogy bizonyos keretek között szabályozni lehetett a végtermék szeléntartalmát, a létrejövő biomassza nem bizonyult megfelelőnek a kitűzött célra történő felhasználásra. Ezt

követően fordultam a brazil dió alkalmazása felé, amely természetes eredetű szeléntartalmánál fogva megfelelő alapanyagként szolgált a kísérletekhez. Ezen csonthéjas termés ugyanakkor kiemelkedő (71 m/m %) zsírtartalommal is rendelkezik, amelyet el kellett távolítani (Soxhlet-extrakcióval) ahhoz, hogy hosszú ideig stabil termékhez juthassak. A kialakított RM-alapanyagon az általános előállítási műveletsort kellett végrehajtani, amely magába foglalta a mintaelőkészítés megtervezését és végrehajtását, az előzetes és végső Se-módsulatanalitikai méréseket (HPLC-UV-HG-AFS csatolt rendszer), aprítást, homogenizálást, méret szerinti osztályozást, tárolási kísérlet megtervezését, sterilizálást és stabilizálást, végül pedig a homogenitási és stabilitási mérések végrehajtását és kiértékelését. A kísérlet végül sikerrel zárult: a brazil dió alapú laboratóriumi referenciaanyag alkalmasnak bizonyult Se-módsulatanalitikai minőségbiztosítási célokra. A munka értékét tovább növeli, hogy a szakirodalom szerint eddig ez az első és egyetlen ilyen jellegű referenciaanyag.

3.3 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

- Arzénnel dúsított algaminta vizsgálatával igazoltam, hogy sejtfalbontó (drizeláz) enzimes kezeléssel szignifikáns mértékben növelni lehet mind az összes arzén, mind pedig az As-módosulatok kinyerését. Többváltozós statisztikai módszer (RSM) segítségével igazoltam, hogy természetes (nem dúsított) As-tartalmú halminta módosulatanalitikai mintaelőkészítése során fehérjebontó enzimmel (tripszinnel) végzett kezeléssel nem lehetett szignifikánsan nagyobb As-kinyerési hatásfokot elérni az enzimet nem alkalmazó módszerek használatához képest.
- Megállapítottam, hogy az üzemi fermentációval előállított, többek között szárítással stabilizált és a szemcseméretet tekintve az általános LRM követelményeknek megfelelő Se-dúsított élesztő nem szubsztrátspecifikus fehérjebontó enzimmel végrehajtott módosulatanalitikai mintaelőkészítésénél a sejtfal- ill. lipidbontó enzimek használata szignifikánsan nem növelte a Se-kinyerési hatásfokot. Se-dúsított élesztőn végzett, egy lépéses enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítés segítségével összehasonlítottam a szakirodalomban legtöbbször jegyzett fehérjebontó enzimkeveréket (XIV-es típusú proteáz; Sigma) az ugyanazon fonalas baktérium által előállított, eltérő tulajdonságokkal bíró pronáz enzimmel (Merck). Az elvégzett statisztikai elemzés alapján megállapítottam, hogy a két enzimmel elérhető kinyerési hatásfok szignifikáns mértékben különbözik: a Merck-féle enzim használatával nagyobb mennyiségű szelén extrahálható.
- Elsőként alakítottam ki egy olyan szekvenciális enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítési eljárást, amelynek segítségével a szelénsóval kiegészített komposzton termesztett gomba szeléntartalma 75%-ban kinyerhetővé vált. Adalékolással és az azt követő szekvenciális enzimes módosulatanalitikai mintaelőkészítéssel igazoltam, hogy a Se-módosulatok egy része nem az elméletileg várható módon (jelen esetben vizes extrakcióval) nyerhető vissza a mintából: a fehérjemátrix bontása szükséges az adalékolt mennyiség oldatba viteléhez. Adalékolási eljárás segítségével közvetett módon bizonyítottam, hogy a módosulatanalitikai mérések során azonosított Se-módosulatok közül legalább az egyik, a Se(IV) mennyiségi meghatározása valódi értékre vezetett.
- Megállapítottam, hogy Se-dúsított gombamintánál a többlépéses, sejtfalbontó enzimes kezelést is tartalmazó mintaelőkészítési módszerrel szignifikánsan nagyobb kinyerési hatásfokot lehet elérni a csupán fehérjebontó enzimre építő vagy pufferezt közegű extrakciókhoz képest, még abban az esetben is, amikor a sejtfalbontó enzimkeverék fehérjebontó aktivitását szelektíven gátoltam. Két különböző inhibitor vegyület alkalmazásával, statisztikai kiértékelés segítségével igazoltam, a sejtfalbontás során valóban lejátszódott fehérjebontás; mindez azt jelenti, hogy a fehérjebontás gátlásával megkülönböztethetővé tettem a sejtfalbontás szelénkinyerésre gyakorolt hatását. A „lysing” enzim használatával más módszerekkel nem kinyerhető Se-módosulatot tettem hozzáférhetővé a fehérjebontó kezelés számára. Ez a módosulat a HPLC-vizsgálatok segítségével (retenciós idő alapján) végrehajtott azonosítás során SeCys₂-nek bizonyult.

- Megállapítottam, hogy a kiemelkedő (71 m/m %-os) zsírtartalmú brazil diót szerves oldószerrel végrehajtott, folyadék-szilárd extrakció segítségével zsírtalanítani lehet úgy, hogy a minta szeléntartalma számottevő mértékben nem csökken. Elkészítettem a Se-módsulatanalitika első laboratóriumi referenciaanyagát, amelyhez a zsírtalanított brazil dió készítmény megfelelő alapul szolgált, mivel (a) minőségi és mennyiségi meghatározásra egyaránt alkalmas mértékben tartalmaz SeMet-t, amely napjaink egyik leginkább tanulmányozott szelénmódsulata, tehát a referenciaanyag készítése valós igényre épül; (b) könnyen, kellő finomságúra őrölhető és jól homogenizálható, amelyet az összes Se és SeMet homogenitásvizsgálata igazol; (c) a SeMet-tartalom kielégítő mértékben stabil maradt mind a γ -besugárzás, mind pedig a különböző hőmérsékletű tárolás során; (d) a Se-módsulatanalitikában legtöbbször alkalmazott, egy lépéses enzimikus kezeléssel az elkészített referenciaanyag közel 100%-os határfokkal tárható fel, nagy megbízhatóságú mintaelőkészítést téve lehetővé.

4. JAVASLATOK

A dolgozatban bemutatott, enzimek használatára építő, általános módsulatanalitikai mintaelőkészítés alkalmas arra, hogy korábban még nem vizsgált, biológiai eredetű minták elemzéséhez kiindulási alapként szolgáljon mind a szelén, mind pedig az arzén módsulatanalitika területén.

A brazil dióból készített Se-módsulatanalitikai referenciaanyag (LRM) felhasználható minden olyan Se-módsulatanalitikai minta mérésének minőségbiztosításánál, amellyel összetételét tekintve hasonlóságot mutat, így például a fehérje-, összes szelén- és SeMet-tartalom tekintetében a leggyakrabban vizsgált Se-módsulatanalitikai minta, a Se-dúsított élesztő eseténél is.

5. KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Impakt faktoros folyóiratcikkek

- 2001.: Zs. Stefánka, I. Ipolyi, **M. Dernovics**, P. Fodor:
Comparison of sample preparation methods based on proteolytic enzymatic processes for Se-speciation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) samples
Talanta, 2001; (55) 437-447
- 2002.: **M. Dernovics**, Zs. Stefánka, P. Fodor:
Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002; 372 (3) 473-480
- 2003: E. T. Bodó, Zs. Stefánka, I. Ipolyi, Cs. Sörös, **M. Dernovics**, P. Fodor:
Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se-speciation
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003; 377 (1) 32-38

Impakt faktor nélküli folyóiratcikkek

- 2001: Varga Erzsébet, Kovács Melinda gyh., **Dernovics Mihály**, Csedő Károly, Pais István:
Szelénnel kezelt fokhagyma [*Allium sativa* L.] vizsgálata
Orvostudományi Értesítő. Az Erdélyi Múzeum-Egyesület Orvostudományi Szakosztályának Közleményei, Kolozsvár, Románia, 2001; (74) 347-351
- 2002: Varga Erzsébet, Olasz Emőke, **Dernovics Mihály**, Péter Katalin, Eșianu Sigríd, Csedő Károly:
A Filipendula ulmariae L. Maxim herba (réti legyezőfü) ásványianyag-tartalma
Orvostudományi Értesítő. Az Erdélyi Múzeum-Egyesület Orvostudományi Szakosztályának Közleményei, Kolozsvár; Románia, 2002; (75) 2-3:212-215
- 2003: Stefánka Zsolt, **Dernovics Mihály**, Ipolyi Ildikó, Mátyás András, Abrankó László, Fodor Péter:
HPLC-UV-HG-AFS módszer szeleno-aminosavak és szervesetlen szelén specieszek meghatározására
Anyagvizsgálók Lapja, 2003; (13) 1:23-27

Konferenciakiadvány, magyar nyelvű, teljes

- 2000.: **Dernovics Mihály** és Fodor Péter:
Szerves eredetű minták előkészítése Se-speciációhoz
43. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Zalaegerszeg, 2000. június 26-28. (előadás alapján)
- 2001.: **M. Dernovics**, Zs. Stefánka, I. Ipolyi, P. Fodor:
Mintaelőkészítési módszerek összehasonlítása szelénnel dúsított csiperkegomba módosulatanalitikai vizsgálatához
44. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Baja, 2001. június 25-27. (előadás alapján)
- 2001.: Zs. Stefánka, **M. Dernovics**, I. Ipolyi, P. Fodor:
Mintabeviteli technikák összehasonlítása biológiai minták szelénspeciációjánál
44. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Baja, 2001. június 25-27. (előadás alapján)
- 2003.: Sörös Csilla, Rác László, Schäffer Richárd, Németh Lajos, **Dernovics Mihály**, Fodor Péter:
Extraktív technikák összehasonlítása gombaminták arzénmódosulatainak meghatározásában.
46. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Szeged, 2003. június 30.-július 2. (előadás alapján)
- 2003.: Stefánka Zsolt, Abrankó László, **Dernovics Mihály**, Nicolas H. Bings, Fodor Péter:
Induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrométer alkalmazási lehetőségei a nyomelem analitikában tranziens jelek esetén.
46. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Szeged, 2003. június 30.-július 2. (előadás alapján)

Konferenciakiadvány, magyar nyelvű, összefoglaló

- 2000.: Fodor P., Stefánka Zs., Ipolyi I., **Dernovics M.**:
Enzimes mintaelőkészítés módosulatanalitikai célokra
"A ma diákjai — a jövő tudósai" rendezvény, ELTE-Lágymányos, 2000. november 6. (poszter)
- 2001.: Stefánka Zs., **Dernovics M.**, Ipolyi I., Fodor P.:
Biológiai minták előkészítése As-, Se-speciációs célokra
"Tavaszi Szél 2001" Doktorandusz Világtalálkozó; Gödöllő, 2001. április 20-22. (poszter alapján)

Konferenciakiadvány, nemzetközi konferencia, összefoglaló

- 2000.: **M. Dernovics**, P. Fodor:
Enzymatic sample preparation for speciation analysis
10th Biennial National Atomic Spectroscopy Symposium; Sheffield, EK, 2000. július 17-20.
(poszter alapján)
- 2000.: **M. Dernovics**, P. Fodor:
Simultaneous sample preparation for the speciation of arsenic and selenium
4th Euroconference on Environmental Analytical Chemistry, Visegrád, 2000.09.14-19. (előadás alapján)
- 2001.: Ildikó Ipolyi, **Mihály Dernovics**, Zsolt Stefánka, Péter Fodor:
Investigation of matrix effects occurring during the Se speciation of *Agaricus bisporus* with HPLC-HHPN-AFS system
European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (Lillehammer), Norvégia, 2001. február 3-7. (poszter alapján)
- 2001.: Zs. Stefánka, I. Ipolyi, **M. Dernovics**, P. Fodor:
Comparison of sequential sample preparation methods for the Se-enriched *Agaricus bisporus*
Second International Conference on Trace Element Speciation in Biomedical, Nutritional and Environmental Sciences; München, Németország, 2001. május 7-10. (előadás alapján)
- 2001.: P. Fodor, I. Ipolyi, Zs. Stefánka, **M. Dernovics**:
New directions and results on speciation analysis at the Department of Applied Chemistry of the Szent István University
X Hungarian-Italian Symposium on Spectrochemistry – Trace Substances in the Biosphere; 2001. október 1-5., Eger (előadás alapján)
- 2002.: E. T. Bodó, Zs. Stefánka, I. Ipolyi, A. Mátyás, **M. Dernovics**, P. Fodor:
A complex speciation study of a sample with high SeMet-content: Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*)
11th Biennial National Atomic Spectroscopy Symposium; Loughborough, EK, 2002. július 8-11. (előadás alapján)
- 2003.: Bodó, ET., **Dernovics M.**, Stefánka Zs., Fodor P.:
Preparation of a Laboratory Reference Material (LRM) for Selenium Speciation
European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (Garmisch-Partenkirchen), Németország, 2003. január 12-17. A „Quality assurance & standards” poszterszekció konferenciadíjas posztere alapján, száma: P-Qu-008.
- 2003.: Ruiz-Encinar J., Sliwka-Kaszynska, M., Ruzik R., **Dernovics M.**, Szpunar J.:
New sample preparation schemes for characterisation of high molecular Se species in yeast
European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (Garmisch-Partenkirchen), Németország, 2003. január 12-17. Az „Elemental speciation” poszterszekció konferenciadíjas posztere alapján, száma: P-EI-034.