

# KROMATOGRÁFUS

kromatográfiai folyóirat

KROMATOGRÁFUS

**Tumorterápiában  
alkalmazható peptidek  
bomlástermékeinek vizsgálata  
HPLC módszerrel**

**Az analitikai QbD alkalmazása a  
módszerfejlesztésben**

**Harc az eluensgőzök ellen**

**Növényvédő szerek mérése élelmiszerekből  
SFE-SFC-MSMS rendszerrel**

**Körvizsgálati minták referencia értékeinek  
meghatározása pontosan egyező  
dupla izotóphígításos  
módszerrel**

# ZB-FAME

The Fast FAME GC Column



- Reduce traditional run times up to 75%
- Improve separation of cis/trans FAME isomers
- Suitable with AOAC, AOCS, and IOC methods

# Tartalomjegyzék

**4.** Tumorterápiában alkalmazható peptidok bomlástermékeinek vizsgálata HPLC módszerrel  
*Mező Gábor, Enyedi Kata Nóra*

**8.** Az analitikai QbD alkalmazása a módszerfejlesztésben  
*Szabó-Ecsedi Anita, Tonka-Nagy Péter, Horváth László*

**10.** Együttműködési lehetőségek a beszerzési központokkal a hazai piacon. Laboratóriumi beszerzések trendjei  
*Tolnay Anita*

**12.** (U)HPLC kolonnáink védelme  
I.rész: A kolonna mosása  
*Imrik Péter, Urbán-Szabó Krisztina*

**14.** Növényvédő szerek mérése élelmiszerekből SFE-SFC-MSMS rendszerrel  
*Sigrid Baumgarten*

**23.** Körvizsgálati minták referencia értékeinek meghatározása pontosan egyező dupla izotóphígításos módszerrel  
*Tölgyesi Ádám, Tölgyesi László*

**30.** Harc az eluensgőzök ellen  
*Keresztfalvi Alex*

## Kromatográfus

IV. évfolyam 1. szám

Nyomdai előkészítés:  
Mogyorósi Eszter  
mogyorosi.eszter@gen-lab.hu

Nyomdai munka:  
Real Press Nyomda

Szakmai szerkesztők:

Kormány Róbert  
Tölgyesi Ádám  
Imrik Péter

Kiadja:  
Gen-Lab Kft.

ISSN 2415-9042

A szerkesztőség elérhetőségei:

Cím: H-1119 Budapest,  
Hadak útja 41.  
Tel.: (36-1) 206-2455  
Fax: (36-1) 206-2451

Email: info@gen-lab.hu  
Web: www.gen-lab.hu

*Real Press Nyomda*

0. ábra: 20 éves a Gen-Lab, ezért nyáron új fotópályázatot hirdetünk és emellett megjelenik a Kromatográfus folyóirat meglepetés különszáma is!



# Tumorterápiában alkalmazható peptidok bomlástermékeinek vizsgálata HPLC módszerrel

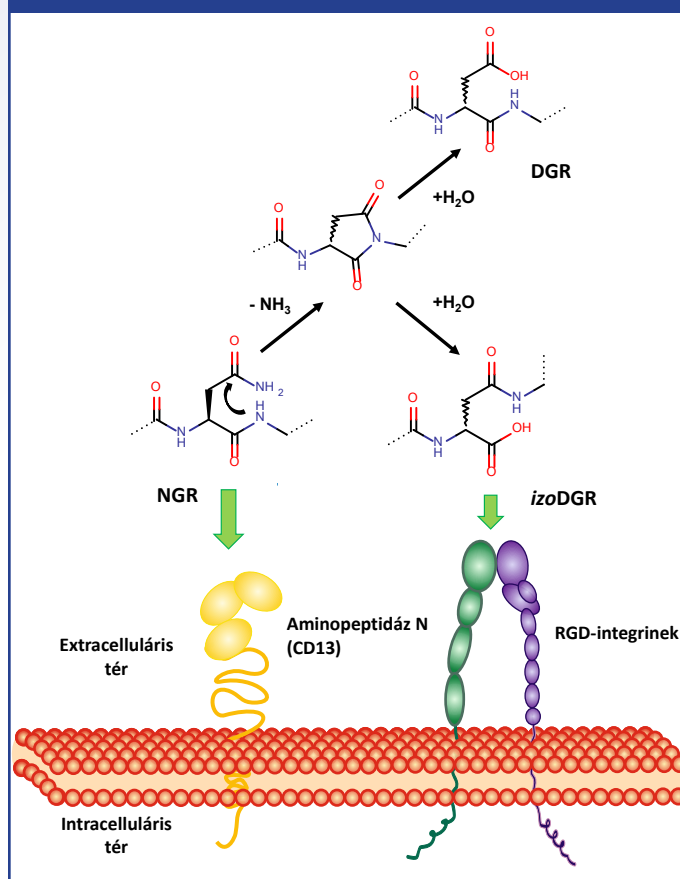
Mező Gábor, Enyedi Kata Nóra  
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport,  
1117 Budapest, Pázmány P. stny. 1/A

## Bevezető

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) kiegészítve a tömegspektrometriával (MS) fontos szerepet töltenek be a peptidalapú gyógyszerjelöltek stabilitásvizsgálatában. Munkánk során egy igen érdekes és az utóbbi időben nagy jelentőségre szert tett vegyületcsaláddal az NGR (Asn-Gly-Arg) peptidszekvenciát tartalmazó vegyületekkel foglalkoztunk. A NGR peptidoknak az ad jelentőséget, hogy nagy affinitással tudnak kötődni egy membránkötött enzimhez. Az aminopeptidáz N (APN vagy CD13) nagy mennyiségben jelenik meg a daganatok vérellátását biztosító újonnan képződött ereken. Ezért jó target molekulák lehetnek a célzott tumorterápiában, és az NGR peptidok, illetve a velük készült konjugátumok hatékonyak lehetnek a tumornövekedés gátlásában. Egy molekula, amelyben egy NGR peptid mint irányító molekula egy fehérjéhez (tumor nekrozis faktor; TNF) kapcsolódik, már a klinikai kipróbálás fázisában van [1].

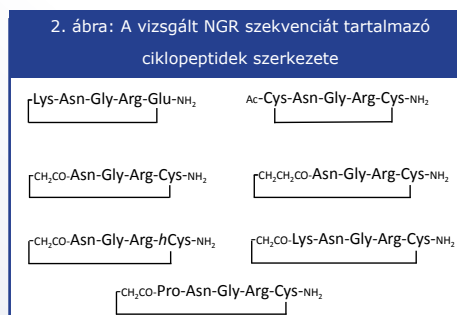
Azonban az NGR peptidok egy különleges tulajdonsággal rendelkeznek. Az aszparagin (Asn) aminosav oldallánca ammónia kilépése közben kapcsolódhat a szekvenciában őt követő glicin (Gly) N-atomjához, melynek során szukcinimid-gyűrű alakul ki (1. ábra) [2]. Bár a reakcióban ammónia lép ki, a folyamatot elsősorban bázis katalizálja azáltal, hogy a Gly N-atomjáról proton távozik és az így kialakuló erős nukleofil tudja az aszparagin oldallánc funkciós csoportjának deamidációját végrehajtani. Azonban az így kialakult szukcinimidet tartalmazó vegyület nem stabil és víz hatására hidrolizál, amelynek során a- illetve b-aszpartil-származék keletkezik, általában 1:3 arányban. A b- vagy izoaszpartil-származékok (izoDGR) szintén hatásosak lehetnek a célzott tumorterápiában, mert egy másik fontos receptorhoz, az RGD (Arg-Gly-Asp szekvenciát felismerő) integrin receptorokhoz képesek kötődni, ezáltal szintén gátolni tudják a daganatnövekedést és a metasztázisok kialakulását (1. ábra). Ezért minden NGR alapú peptid és peptidkonjugátum esetén igen nagy jelentősége van annak, hogy ezek stabilitását, illetve átalakulását időben ismerjük, és meghatározzuk az átalakuláskor kapott termékek mennyiségét.

1. ábra: Az NGR peptidok átalakulása és a vegyületek receptorfelismerő képessége



## Vizsgált anyagok, körülmények

Munkánk során két irodalomból ismert ciklusos NGR peptid (egy amid-kötést és egy diszulfidhidat tartalmazó ciklopeptid (c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> és Ac-c[CNGRC]-NH<sub>2</sub>), továbbá 5 új tioéter-kötést tartalmazó ciklopeptid (c[CH<sub>2</sub>CO-NGRC]-NH<sub>2</sub>, c[CH<sub>2</sub>CO-KNGRC]-NH<sub>2</sub>, c[CH<sub>2</sub>CO-PNGRC]-NH<sub>2</sub>, c[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-NGRC]-NH<sub>2</sub>, c[CH<sub>2</sub>CO-NGR<sub>h</sub>C]-NH<sub>2</sub>) stabilitását vizsgáltuk meg különböző körülmények között (2. ábra) [3-5]. A tiszta vizes oldat mellett három, a szintézisek (pl. hatóanyag konjugálás) szempontjából releváns puffer oldatban (0,2 M NH<sub>4</sub>OAc puffer (pH 5), PBS (pH 7,3) és 0,1 M Tris-puffer (pH 8,1)) szobahőmérsékleten, valamint az *in vitro* biológiai vizsgálatokat reprezentáló sejtenyésztő médiumban 37°C-on vizsgáltuk az anyagokat [5]. A változásokat HPLC segítségével követtük és a termékeket MS segítségével, illetve referencia anyagok (Asn helyett Asp-t tartalmazó ciklopeptid variánsok) vizsgálatával azonosítottuk.

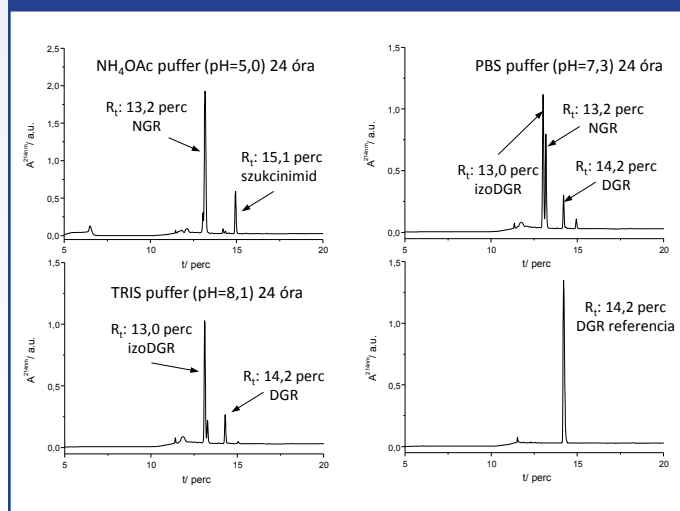


Az analitikai HPLC méréseket KNAUER 2501 HPLC rendszeren (KNAUER, Bad Homburg, Németország) végeztük Phenomenex Luna® C18 (5 µm, 100Å, 250 x 4,6 mm) oszlop használatával. Az alkalmazott gradiens: 0 perc 0 % B; 5 perc 0 % B; 50 perc 90 % B (ahol az A eluens: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O és eluens B: 0,1% TFA/MeCN-H<sub>2</sub>O (80:20, V/V)), valamint a folyási sebesség 1 mL/perc volt. A csúcsokat 214 nm-nél detektáltuk.

## Eredmények

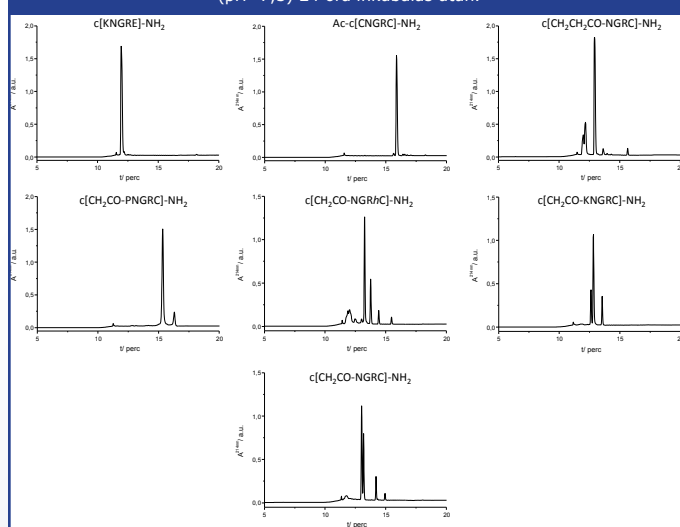
A stabilitási vizsgálatokból néhány, az irodalmi adatokkal összeeső általános megállapítást tehettünk. Ezek szerint valamennyi anyag stabil volt desztillált vízben, ugyanakkor puffer oldatokban az esetek többségében megfigyelhettük a deamidálásból származó bomlástermékeket. A puffer oldatok pH-jának emelésével a bomlás minden esetben növekedett, míg az *in vitro* biológiai vizsgálatokat mimikáló médiumban a magasabb hőmérsékleten (37°C-on) történt inkubálás során volt a legjelentősebb az átalakulás. Azonban az egyes vegyületek stabilitásában jelentős különbségeket tapasztaltunk. A deamidációra legérzékenyebb ciklopeptidnek a ciklusban 15 atomot tartalmazó tioéter-kötésű vegyület (c[CH<sub>2</sub>-CO-NGRC]-NH<sub>2</sub>) bizonyult. Ez a ciklopeptid már enyhén savas (pH 5) puffer oldatban is részben átalakult. Ez a vegyület egyben alkalmas volt arra, hogy demonstráljuk, hogy a szukcinimid gyűrűt tartalmazó átmeneti termék a savas körülmények között jobban stabilizálódik, mint semleges és enyhén lúgos körülmények között (**3. ábra**). A szukcinimid-gyűrűt tartalmazó csúcs (R<sub>t</sub>=15,1 perc) könnyen azonosítható volt a tömegspektruma alapján, mivel a kiindulási vegyülethez (R<sub>t</sub>=13,2 perc; [M+H]<sup>+</sup> = 488,4) képest az ammóniavesztésnek megfelelő ([M+H]<sup>+</sup> = 471,4) tömeget mértünk. A szukcinimid-gyűrű felbomlása után két új csúcs volt detektálható 13,0 és 14,2 perces retenciós időknél. Mindkét csúcs molekulatömege [M+H]<sup>+</sup> = 489,4 volt, ami igazolja az Asn átalakulását Asp-vá, de ebből még nem lehetett megállapítani, hogy a két csúcs közül melyik tartozik az aszpartil- illetve az izoaszpartil-vegyülethez. Ennek a kérdésnek az eldöntésére referencia vegyületet (c[CH<sub>2</sub>-CO-DGRC]-NH<sub>2</sub>) állítottunk elő. A referencia ciklopeptid retenciós ideje 14,2 perc volt. Tehát a kiindulási vegyülethez képest az izoaszpartil-származék csúcsa egy kissé előbbre tolódott, míg az aszpartil-származék csúcsa a kiindulási Asn-t és a szukcinimid-gyűrűt tartalmazó csúcsok között volt detektálható. Ezt a tendenciát, amelyet néhány irodalmi adat is alátámaszt, valamennyi vegyületünk esetében igazoltuk.

3. ábra: A c[CH<sub>2</sub>-CO-NGRC]-NH<sub>2</sub> ciklopeptid stabilitásának vizsgálata különböző pH-jú puffer oldatokban és a keletkezett termékek azonosítása.



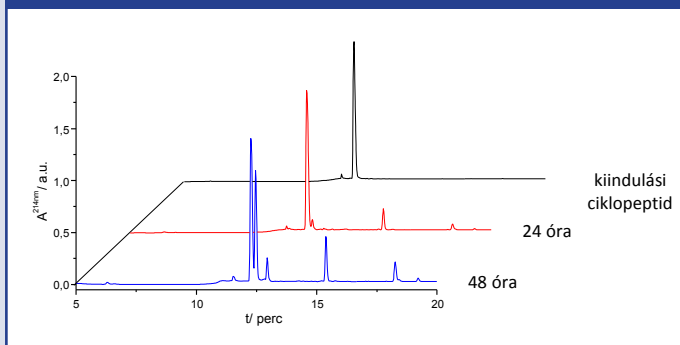
A ciklopeptid stabilitásának sorrendje a vizsgálatok alapján a következő volt: c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> > Ac-c[CNGRC]-NH<sub>2</sub> > c[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-NGRC]-NH<sub>2</sub> > c[CH<sub>2</sub>CO-PNGRC]-NH<sub>2</sub> > c[CH<sub>2</sub>CO-NGRHC]-NH<sub>2</sub> > c[CH<sub>2</sub>CO-KNGRC]-NH<sub>2</sub> > c[CH<sub>2</sub>-CO-NGRC]-NH<sub>2</sub> (**4. ábra**). A legstabilabbnak bizonyult, a ciklusban 17 atomot tartalmazó, amid-kötésű ciklopeptid még enyhén bázikus közegben sem változott 48 óra alatt, és csak a sejtkultúra médiumban 37°C-on mutatott bomlást. Meg kell jegyezni, hogy míg az összes többi anyag teljes mértékben elbomlott ilyen körülmények között 24 óra alatt, a c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> ciklopeptid bomlása 48 óra elteltével sem volt teljes (**5. ábra**).

4. ábra: Az előállított ciklopeptid stabilitásának összehasonlítása PBS pufferben (pH=7,3) 24 óra inkubálás után.



5. ábra: A c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> ciklopeptid stabilitásának vizsgálata DMEM sejttenyésztő médiumban 37°C-on 24 és 48 óra elteltével.

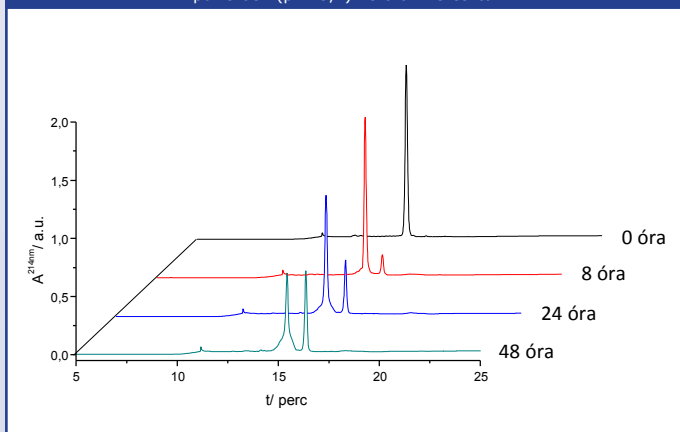
A 15 perc után eluálódó csúcsok a médiumból származnak.



Érdekes megfigyelést tettünk a ciklusban 18 atomot tartalmazó c[CH<sub>2</sub>CO-PNGRC]-NH<sub>2</sub> vegyület bomlásakor. Míg a többi anyag esetén a bomlást követően az Asp/izoAsp arány az irodalomban leírt 1:3 arányhoz közelített, a prolint tartalmazó ciklopeptid esetén kizárólag az Asp származékot tudtuk detektálni ( $R_{t(Asn)}=15,4$  perc,  $R_{t(Asp)}=16,3$  perc) (6. ábra). Az Asn-származékhoz tartozó csúcs alja ugyan kiszélesedett, azonban nem sikerült az izoAsp-származékot kimutatni „off-line” HPLC-MS technikával. (Lehet, hogy egy jó felbontású „on-line” HPLC-MS megoldhatja ezt a problémát).

A csúcstalp-szélesedést más oszlopok segítségével (Aeris™ 3,6 m, 150 x 4,6 mm oszlopok: PEPTIDE XB-C18 (100 Å), WIDEPORÉ XB-C18 (200 Å), WIDEPORÉ XB-C8 (200 Å), WIDEPORÉ C4 (200 Å)) sem sikerült elválasztani. Minden esetre kijelenthetjük, hogy ezen vegyület esetén a fő bomlás termék az Asp-t tartalmazó ciklopeptid.

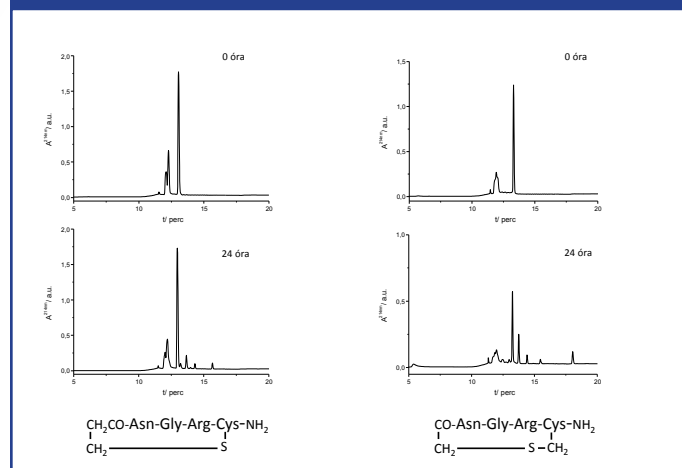
6. ábra: A c[CH<sub>2</sub>CO-PNGRC]-NH<sub>2</sub> ciklopeptid stabilitásának vizsgálata TRIS pufferben (pH=8,1) 48 órán keresztül



Jelentős stabilitásbeli különbséget tapasztaltunk a két azonos ciklusméretű (16 atom a ciklusban) tioéter-kötést tartalmazó ciklopeptid esetében. Az egyikben egy, az N-terminálisra beépített propargil-csoport kapcsolódik a C-terminális cisztein tiolcsoportjához, míg a másik esetben egy acetyl-csoport homociszteinhez. Így csak a kénatom

helyezete változik a ciklusban (7. ábra). Ez azonban jelentős stabilitási különbséget okozott, vagyis az utóbbi lényegesen könnyebben deamidálódott szukcinimid képződésén keresztül, ahogy ezt a HPLC kromatogramok is mutatják (7. ábra). Ennél a két vegyületnél különösen jelentős mennyiségben detektáltunk 16 Da-nal nagyobb tömegű komponenst, ami megelőzte elúciós sorrendben a többi komponens csúcsát. Mint kiderült, ezek a csúcsok a tioéter-kötés oxidált formái (szulfoxid), ami azonban csak a HPLC oszlopon keletkező műtermék.

7. ábra: A c[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-NGRC]-NH<sub>2</sub> és c[CH<sub>2</sub>CO-NGRhc]-NH<sub>2</sub> a ciklusban azonos atomszámú ciklopeptidek stabilitásbeli különbsége TRIS pufferben (pH=8,1) 24 óra elteltével



A fenti stabilitási vizsgálatok eredményeiből arra következtettünk, hogy a stabilitás a szerkezet függvénye lehet. NMR vizsgálatokkal igazoltuk is, hogy az Asn oldalláncának karbonil szénatomjának és a Gly aminocsoportjának távolsága (távolság növekedésével nő a stabilitás) és a ciklopeptid gerinckonformációját stabilizáló hidrogénkötések jelenléte és száma (flexibilisebb molekula könnyebben bomlik) az a két fő tényező, ami befolyásolja az NGR ciklopeptidek stabilitását.

## Összefoglalás

Az NGR szekvenciát tartalmazó peptidek, különösen ezek ciklikus variánsai alkalmasak lehetnek önmagukban, vagy hatóanyaggal konjugált formájukban a célzott tumorterápiában. Azonban az NGR peptidek nem enzimatis úton könnyen bekövetkező deamidációja miatt ezeknek a konstrukcióknak a stabilitását – elsősorban biológiai körülmények között – vizsgálni kell. Érdekes a stabilitási vizsgálatok során a keletkező komponensek milyenségére és mennyiségére is tekintettel lenni, mivel a keletkező izoDGR származék akár potenciális hatómolekula is lehet, míg a DGR származék nem. Vizsgálataink mindenképpen hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a célzott tumorterápiára alkalmas egy vagy esetleg egyszerre két célpontot is támadni képes ciklikus NGR peptideket tervezzünk.

## Referenciák

1. Corti, A.; Curnis, F. (2011) Tumor vasculature targeting through NGR-peptide-based drug delivery systems. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 1128–1134.
  2. Geiger, T., Clarke, S. (1987) Deamidation, isomerisation, and racemisation at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. *J. Biol. Chem.* 262, 785–794.
  3. Colombo, G. és mtsai. (2002) Structure-activity relationship of linear and cyclic peptides containing NGR tumor-homing motif. *J. Biol. Chem.* 277, 47891–47897.
  4. Negussie, A. H. és mtsai. (2010) Synthesis and in vitro evaluation of cyclic NGR-peptide targeted thermally sensitive liposome. *J. Control. Release* 143, 265–273.
  5. Enyedi, K. N. és mtsai. (2015) Development of cyclic NGR peptides with thioether linkage: structure and dynamics determining deamidation and bioactivity. *J. Med. Chem.* 58, 1086–1817.
- A kutatást az OTKA (K 104045) és a GEN-LAB támogatta.

# HUNGALIMENTARIA 2017

A Nemzeti Élelmiszerbiztonsági Hivatal és a WESSLING Hungary Kft. 2017-ben ismét megrendezi az élelmiszerek vizsgálatával, ellenőrzésével foglalkozó szervezetek, gyártók és forgalmazók két évente esedékes tudományos seregszemléjét, a 20 éve, 1997-ben alapított

**HUNGALIMENTARIA 2017 KONFERENCIÁT ÉS KIÁLLÍTÁST**, immár tizenegyedik alkalommal.

A konferencia időpontja: **2017. április 26-27.**

Helyszín: Aquaworld Resort Budapest Hotel, 1044 Budapest, Íves út 16.

A konferencia aktuális jelmondata: **„Terítéken az élelmiszerek és csomagolóanyagaik”**

Tudományos seregszemlének 2017. április 26-án egy délelőtti plenáris tanácskozással kezdjük.

Ebéd után és másnap 3-3 szekcióban folytatjuk az előadásokat a következő tárgykörben: *kémiai és érzékszervi analitika; mikrobiológia, molekuláris biológia; szabályozás, engedélyezés, ellenőrzés.*

# Az analitikai QbD alkalmazása a módszerfejlesztésben

Szabó-Ecsedi Anita<sup>1</sup>, Tonka-Nagy Péter<sup>2</sup>, Horváth László<sup>1</sup>

Egis Gyógyszergyár Zrt.

<sup>1</sup>: Készítmény analitikai fejlesztési lab.2

<sup>2</sup>: Készítmény analitikai fejlesztési lab.3

A Quality by Design (QbD) koncepció alkalmazása a minősítő analitikai módszerek fejlesztésében is egyre elterjedtebb, mitöbb már ezen a területen is elvárás. Az International Conference on Harmonization (ICH) Q8 és Q11 irányelvei a gyógyszerhatóanyagok és készítmények fejlesztési irányait egyértelműen megfogalmazzák. A QbD módszer egy holisztikus és szisztematikus gyógyszeripari fejlesztési modell. A QbD koncepció szerint a konkrét elvárásokat (hatósági szabályozás, piaci és felhasználói igények) már a tervezési fázisban figyelembe veszik, meghatározzák a céltermék sajátságait, majd a készítményt és a gyártási folyamatot oly módon tervezik és fejlesztik, amely által biztosíthatóak ezek, a termékre vonatkozó előre meghatározott követelmények. A QbD szemlélet szerinti gyógyszerészeti fejlesztés legfontosabb lépése annak feltérképezése, megértése, hogy a folyamatban részt vevő egyes anyagok, módszerek, gyártási lépések, illetve maga a gyártási folyamat, hogyan és milyen mértékben hatnak a tervezett végtermékre, elsősorban annak minőségére [5]. Az analitikai QbD (AQbD) szerinti módszerfejlesztés célja az, hogy egy olyan módszert fejlesszünk, mellyel a készítmény minőségét analitikai oldalról garantálni tudjuk. A hagyományos megközelítéssel szemben, az AQbD koncepció alkalmazásának előnyei számosak. Például, azoknál az analitikai módszereknél, melyeknél az AQbD elveit alkalmazzák a módszerfejlesztés során lecsökkennek az OOT (trenden kívüli) és az OOS (specifikáción kívüli) eredmények a robusztusabb módszernek köszönhetően. A QbD elvek mentén fejlesztett analitikai módszer paraméterei a módszer robusztus design terén (MODR) belül átjelenés nélkül változtathatók (FDA) [2].

Az analitikai QbD eszközeit és életciklusát láthatjuk az **1. ábrán**. Az AQbD koncepciónk első lépése az analitikai cél profil meghatározása. Az ATP-nek megfelelő, és rendelkezésre álló analitikai eljárás kiválasztása után a következő lépésként a kritikus módszer és felhasználói minőségi jellemzőket határozzuk meg. Ezt követi a kockázatbecslés elvégzése, majd ez alapján a módszer optimalizálása és fejlesztése, a módszer robusztus design terének és a kontrol stratégiának a kijelölése. Végül a módszer validálásával és a Tudástár felállításával zárul a módszerfejlesztés [1,2,4].

A módszerfejlesztést analitikai cél profilt (ATP) megállapításával kezdjük. A gyakorlatban mindez nem más, mint az analitikai eredmény maximálisan megengedhető bizonytalanságának kitűzése és annak a tartománynak a megadása, amin belül a tervezett analitikai módszernek pontosan és torzítatlanul kell eredményt szolgáltatnia. Az ATP felállítása során megfogalmazzuk a módszer célját is, mely később a módszer választását, a tervezést és a fejlesztést is befolyásolni fogja. Mindehhez bemenő információ a készítmény összes paramétere, a cél piac, az előzetes ismeretek és a rutin laborok mérési igényei is (ATP=QTPP).

Az ATP alapján kiválasztott analitikai módszer kritikus minőségi jellemzőinek meghatározása (CQA) a következő lépés. Az elérendő részletesebb minőségi jellemzőket mindenkor a módszer kritikus módszer jellemzői (Critical Method Attributes, CMA), és a módszert alkalmazó laboratóriumok által támasztott felhasználói elvárások határozzák meg (Method Operation Intent). A CMA-kat az ICH Q2 ajánlásai, és a belső módszervalidálási ajánlások határozzák meg, melyek teljesülésére nézve kockázatelemzéseket kell végezni. A felhasználó elvárásai közé tartozhat például a rendelkezésére álló készülékek típusai, az oldatok stabilitásával szemben támasztott követelmények és a felhasználók számára optimális mérési idő meghatározása.

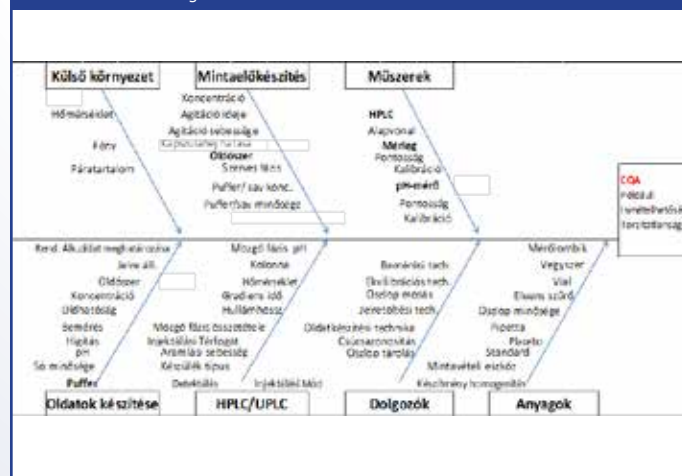
**Összegyűjtjük a módszert befolyásoló összes lehetséges tényezőt** és halszálka diagramon (**2. ábra**) ábrázolva ok-okozati viszonyba állítjuk a kritikus módszer jellemzőivel (CQA).

A kockázatbecslés során ezeket a paramétereket osztályozzuk, és kockázati szintekbe soroljuk be [1,2,4].

1. ábra: Az AQbD életciklusa(1,2)



2. ábra: Halszálka diagram





A tényezőket értékeljük természetük szerint (CNX osztályozás) és becsüljük hatásukat, kockázatukat (Risk assessment, FMEA) a módszer teljesítőképességére nézve. A tényezők CNX besorolásában három osztályt különböztetünk meg: a kézben tartandókat (controlled; C), a lehetséges zavaró hatásúakat (noise; N) és a kísérletileg meghatározandókat (eXperimented; X). A **3. ábrán** láthatjuk, hogy hogyan kell egy kiválasztott paraméternek a kockázatbecslését és a CNX osztályba besorolását elvégezni. Ezt az összes, a halszájka diagrammon összegyűjtött paraméterre el kell végezni [1,2].

3. ábra: Kockázatbecslés

Paraméter	CMA	Eltérés oka	Eltérés hatása	S	F	D	RPN	Javasolt intézkedés	CNX
<b>Oldószer típusa</b>									
Szerves fázis mennyisége Mintaelőkészítés során	Módszerpontosság	Nem oldódik fel benne a hatóanyag. A szennyezők. A tabletta/kapszula nem esik szét megfelelően a rázatás során	Érzékeny lesz az aktuális beoldás hatákonyságára	3	1	2	6	Több oldószer kipróbálása a megfelelő megtalálásáig DoE	X
	Torzítatlanság		Kisebb koncentráció, mint a tényleges vagy ugráló eredmények.	3	1	1	3		

A módszerfejlesztés folyamán eltérő módon kezeljük majd a CNX szerint különböző osztályokba sorolt paramétereket. A kézben tartandó paraméterek (C) esetében nincs lehetőség, vagy szükség a paraméter változtatás okozta hatás vizsgálatára (pl.: kioldó közeg előírt 37 °C hőmérséklete). A zavaró hatások közé (N) soroljuk a véletlenszerű, illetve az analitikus által közvetlenül nem befolyásolható paramétereket (pl. vegyszer minősége, labor hőmérséklete). A meghatározandó paramétereket (X) egy vagy több paraméteres kísérlet-tervezés szerinti kísérletekkel állapítjuk meg.

A módszer paramétereit kockázati osztályokba is be kell sorolnunk. Ehhez legalább elemezni kell az események bekövetkezésének gyakoriságát (F), a lehetséges következmények súlyosságát (S), valamint annak észlelhetőségét (D). A magas kockázati osztályba sorolt tényezőkkel kiemelten foglalkozni kell, a cél az, hogy a módszerfejlesztés során minél alacsonyabb értékre csökkentsük a kockázatokat. A kockázatértékelést a módszerfejlesztés főbb mérföldköveinél megismételjük, és vizsgáljuk az egyes hatások kockázatának változását. A módszerfejlesztési jelentésnek a fent részletezett elemzéseket tartalmaznia kell. Az elfogadható és a nem elfogadható kockázati osztályok határait a kockázati rangsor érték (Risk Priority Number; RPN) alapján határozzuk meg:  $RPN = F \cdot S \cdot D$ . Az osztályokba sorolás skáláját és az alkalmazott számértékeket szabadon megválaszthatjuk.

A mintaelőkészítés optimalizálására és a robusztus tér megtalálására kísérlettervezést és statisztikai kiértékelést (pl.: Statistica szoftver) alkalmazunk. Az alkalmazott oldószer és a rázatási sebesség optimalizálására másodfokú terveket tudunk készíteni, melyet kísérlettervezéssel értékelünk ki. Az elemzés végén a program segítségével megkeressük az illesztett felület szélsőértékét [3,4]. A HPLC módszer optimalizálása és fejlesztése után, egy erre alkalmas szoftver segítségével állapítjuk meg a módszer robusztus design terét (pl. DryLab), mely hatékonyan segíti a gradiens idő, az eluens összetétel és a kolonna hőmérséklet optimális beállításainak feltérképezését. A kísérlettervezéssel és a szoftver segítségével

meghatározott robusztus régióon belül kijelölünk néhány pontot, melyeken a szükséges verifikálást elvégezzük. Ha ezt a verifikálást elvégeztük, akkor sikeresen meghatároztuk a módszer robusztus design terét (MODR). Az analitikai módszer paraméterei az MODR-en belül átjelentés nélkül változtathatók [2].

Legvégül felállítjuk a kontroll stratégiát és elvégezzük a végső kockázatbecslést [4]. A kontroll stratégia felállítása az eddigi információk elemzésével történik (pl. Rendszeralkalmasság ellenőrző oldat). A fejlesztés elején készített táblázatot legkésőbb ekkor újra elő kell vennünk, és a kijelölt paraméterekre a kockázatbecslést újra el kell végezzük. A kockázatoknak csökkenniük kell az alkalmazott lépések hatásaként. Ezzel a végső kockázatbecsléssel bizonyítjuk be, hogy a módszer megfelel a kitűzött céloknak és a kritikus paramétereket a módszerfejlesztéskor figyelembe vettük.

A módszer validálása a robusztus térből kiválasztott egy vagy több ponton történhet. A validálás során statisztikai módszereket kell alkalmazni például a linearitás, a kiterjesztett ismételtetés és a mátrix hatás vizsgálatok kiértékelésekor. Az így fejlesztett, megfelelő mélységben ismert analitikai módszer transzferálása kevesebb analitikai problémát vethet fel.

A módszer életciklusának követése során szükséges felállítani egy Tudástárat, melyben folyamatosan gyűjtjük azt, hogy milyen problémák merülnek fel és azokra milyen eddigi kísérleteink, illetve megoldásaink vannak [1,2].

Az AQbD egy hatékonyan működtethető eszköztárat ad a fejlesztő analitikusok számára. Az elsöre bonyolult rendszer hamar gyakorlattá tud válni és ezáltal a módszer teljes körű ismeretét, a problémák megoldását hatékonyan tudja segíteni.

#### Referenciák

1. N.V.V.S.S. Raman, Useni Reddy Mallu, Hanimi Reddy Bapatu: Review Artical, Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance Manufacturing
2. R. Peraman, K. Bhadraya, Y. P. Reddy: Review Artical, Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics
3. C. Hubert, S. Houari, E. Rozet, P. Lebrun, Ph. Hubert: Towards a full integration of optimization and validation phases: An analytical-quality-by-design approach
4. Yubing Tang, Ph.D.: Quality by Design Approaches to Analytical Methods, FDA Perspective
5. Pallagi Edina, Paál Tamás, Csóka Ildikó: A Quality by Design (QbD) bemutatása és alkalmazási lehetőségeinek ismertetése a nano-rendszerű gyógyszer technológiai fejlesztésekben.

# Együttműködési lehetőségek a beszerzési központokkal a hazai piacon

## Laboratóriumi beszerzések trendjei

*Tolnay Anita  
Lab-Ex Kft.*

Az 1989-90-es rendszerváltást követően, a szervezeteknek alanyi jogon megítélt szabad kereskedelmi lehetősége markáns változásokon ment keresztül napjainkig, köszönhetően az elmúlt évtizedben folyamatosan módosításra kerülő központi beszerzésekről alkotott kormányrendeleteknek, továbbá az új keretszabályokat tartalmazó közbeszerzési törvénynek, valamint az egyre komplexebbé váló gazdasági környezet bonyolult struktúrájának. A változások ütemének felgyorsulása, turbulenciája, a nemzetközi piacok globalizációja révén a piaci verseny éleződéséhez és a kockázati tényezők növekedéséhez vezetett, különösen a beszerzések területén.

A laboratóriumi piac szervezeti vásárlói legnagyobb részt a költségvetési szervek (Non-profit) (egyetemi kutató intézetek, kórházak központi laboratóriumai, Akadémiai kutatóintézetek, Nébih, NAIK, stb.) valamint versenyszféra szereplői (For-profit - B2B) (gyógyszergyárak, magánlaborok, kontrakt laboratóriumok, stb.) közül kerülnek ki. A szervezeti piacok beszerzéseire a nagyobb volumenű vásárlások, a hosszú komplex vásárlási folyamat, a központosított döntéshozatal, a nagy vásárlók hatalmi pozíciójának gyakorlása jellemző, melyet komplex/összetett piackutatás előz meg, majd a kikényszerített kedvezményekkel erősen lenyomott/csökkentett árki alakítás követ. A folyamatok során jelentős hozzáadott érték tartalmat képviselhet a szakmai tapasztalat, mely elősegíti a beszerzéssel kapcsolatos kockázatok csökkentését, és megalapozza a hosszú távú bizalmi kapcsolatokra törekvést, valamint a normalizált, szerződéses kapcsolatok kialakítását.

A hatékonyabb beszerzési együttműködést szolgáló vállalati stratégia a business marketing, mely a vevő és eladó érdekeit egyaránt szem előtt tartva segít a vevőkapcsolatok kialakításában, ápolásában, figyelembe véve a mindkét fél számára előnyös célokat, adottságokat, technológiákat és erőforrásokat. A beszerzési folyamatot megelőző piacszegmentáció a vevői értékteremtésre épül. A makroszegmentálást elsősorban az ágazati besorolás, azaz a potenciális vásárló szervezet fő tevékenysége határozza meg.

A mikroszegmentáció során az eladó már a meglévő üzleti kapcsolatára alapozva, - kiemelve a kölcsönös együttműködés előnyeit -, figyelembe veszi a vásárlói szervezet beszerzéssel összefüggő tényezőit, a beszerzési központ

(Buying Center) adottságait, összetettségét, továbbá a beszerzési döntésekben résztvevők egyéni jellemzőit. A minél sikeresebb együttműködés érdekében az eladónak fel kell térképeznie az adott beszerzési központ magatartására ható külső- és belső tényezőket. Miután a vevő beszerzési döntését számos tényező formálhatja, elengedhetetlen az alábbi változókra kiemelt figyelmet fordítani az eredményes beszerzés érdekében. Erős hatással van a döntésre a vevő beszerzési központja és az értékesítő személy között kialakult interperszonális kapcsolat, a döntésben résztvevő egyének személyes szempontjai (motiváció, pozíció, hatáskör, végzettség, kockázatvállalási hajlandóság) továbbá egyéb szervezeti változók, úgymint a beszerzési funkció szervezeti megoldása, célok, elérendő eredmények, valamint külső környezeti hatások mérlegelése.

A beszerzési folyamat komplexitása a globalizációval, a világpiac egyre növekvő összefonódásával mind inkább élesebbé válik a laboratóriumi piaci szegmensben is. A gyártói piacon érzékelhető, évről-évre növekvő számú konkurens vállalat megjelenése, főként a fejlődő BRIC országok előretörése révén, Kína vezetésével, hatalmas árharcot eredményezett. A multinacionális cégek leányvállalatainak megjelenése a lokális piacokon mind gyártói, mind felhasználói oldalról, nemzetközi keretmegállapodásokat valamint központi szállítási szerződéseket szült.

Tekintve, hogy az üzleti életet mindinkább a hektikusan változó környezet jellemzi, kiszámíthatatlan jövővel és jelentős számú bizonytalansági tényezővel a háttérben, az idő folyamán a növekvő verseny intenzitása következtében egyre szűkül a piacok potenciális felvevőképessége, melynek révén a megszokott piaci mechanizmusok átstrukturálódnak. A beszerzési folyamat során a döntési jogkörrel rendelkező személyekkel, alszervezetekkel a minél hatékonyabb együttműködés kialakítása az értékesítési folyamatba beépített vevőközpontú, megkülönböztető, egyedi értéknövelt szolgáltatásokban rejlik. A forgalmazó cégeknek kiemelt célként kell megvalósítaniuk ügyfélkörüknek nyújtott, magas szintű szakmai tanácsadásukat és az értékesített műszerek, berendezések használatához szükséges applikációs konzultációkat. A hosszú távú bizalmi alapokra épülő modern üzleti partnerkapcsolatok kiépítésére való törekvés elengedhetetlen feltétele a megfelelő szakmai végzettséggel (előmenetellel), kiváló kommunikációs készséggel és kimagasló értékesítési vénával rendelkező „keresztfunkcionális” kereskedői csapat felépítése és integrációja. Az ügyfelek szükségleteit figyelembe vevő, testre szabott árajánlat során alkalmazott árképzésnél célszerű a piacvezérelt módszert követni, mely egyidejűleg érvényesíti a vevő által meghatározott észlelt értéket valamint a versenytársak alkalmazott árait.

A sikeres együttműködés kulcsa, hogy az eladó segítse a vevő problémájának megoldását, járuljon hozzá a vevő versenyképességének növeléséhez. Kiemelt jelentőségű marketingkommunikációs stratégia a vevőkkel tartott aktív, személyes kapcsolattartás, mely mindemellett, hogy az egyik legköltségesebb stratégia, egyben kétségtelenül a leghatékonyabb eszköznek bizonyul a tudományos piacon.

kizárólag a LAB-EX-nél!

FALCON  
ANALYTICAL SYSTEMS & TECHNOLOGY



Úttörő a GC-k között:

# CALIDUS MINI GÁZKROMATOGRÁF

Az amerikai Falcon cég **Calidus** nevű **hordozható mini GC**-je a hagyományos, terjedelmes gáz-kromatográfokhoz képest egyszerűbben kezelhető, **tizedakkora méretű, tizedakkora energiaszükségletű**, ráadásul **pontosabban és tízszer gyorsabban mér**, mint egy hagyományos GC.

Felhasználási területek



élelmiszeripar



petrolkémia



gyógyszeripar



olajipar



környezetvédelem

A készülék **1 vagy 2 kolonnával** is felszerelhető **soros vagy párhuzamos mérésre akár kétféle detektorral**, továbbá **mintaváltóval bővíthető**. Kemometriás szoftverrel szállítva másik készülékből származó **kromatogramok illeszthetők** a mini GC mérési eredményeihez.

A Calidus gáz-kromatográf további kiemelkedő előnye, hogy akár laboratóriumi körülmények között, akár beépítve (processz méréstechnikához, akár ATEX kivitellel) vagy mobil laborkivitelben is használható.



Beépíthető verzió



Mobil laborkivitelben

## Látogasson el rendezvényünkre tavasszal!

Előadások és próbamérések keretében ismerkedjen meg közelebbről a hordozható mini GC-vel! Jelezze részvételi igényét kollégáinknál vagy regisztráljon az eseményre a **www.labex.hu** oldalon!

Amennyiben felkeltettük érdeklődését, forduljon hozzánk bizalommal!

**Kapcsolattartó:** Dr. Kárpáti Péter

**Mobil:** +36-30-486-7255

**E-mail:** karpati.peter@labex.hu

labex  
Your lab solution partner



Laboratóriumi használatra

# (U)HPLC kolonnáink védelme

## I.rész: A kolonna mosása

Imrik Péter, Urbán-Szabó Krisztina  
Gen-Lab Kft.

Cikkünket úgy is kezdhetnénk, miszerint megkérdeztünk több gyakorló háziasszonyt, miként távolíthatók el a legdurvább szennyeződések. Ennek ellenére mostani írásunkban inkább a HPLC oszlopok karbantartásáról és egy igen költséghatékony megoldásról értekezünk. Az utóbbi 10-15 évben rengeteget fejlődött a kolonnatechnológia. Az UHPLC technika megjelenésével egyidőben (2004) megjelentek a 2  $\mu\text{m}$  alatti szemcseátmérőjű töltetek. Néhány évvel ezután a mai napig nagy népszerűségnek örvendő harmadik generációs héjszerkezetű töltetek (2007) is elérhetővé váltak a felhasználók számára. Ezek a kis szemcseátmérőjű tölteteket tartalmazó kolonnák sokkal érzékenyebbek a mechanikai szennyezők jelenlétére. Oszlopaink élettartama a kémiai behatások (pl.: pH) mellett nagyban függ a mintából, oldószerekből és a készülékből származó egyéb mechanikai szennyezők jelenlététől is, ha nem ezektől a leginkább.

Nézzük meg a rendszerben megtalálható különféle szennyeződések és próbáljuk csoportosítani őket:

1. Oldhatatlan mechanikai szennyezők (pl.: por, pumpafej tömítés darabok)
2. Az adott oldószer összetételben nem oldható szennyeződések (pl.: kicsapódott fehérje)
3. Biológiai eredetű szennyeződések (pl.: baktérium, gombák)
4. Kémiaailag az állófázison megkötődő szennyeződések

A legtöbb esetben gyakorló analitikusként betartjuk a legáltalánosabb szabályokat, miszerint az adott állófázis milyen pH tartományban illetve milyen oldószer összetétel mellett használható. Ennek ellenére, aki dolgozott már HPLC oszloppal az tudja, hogy sajnos egyszer elérkezik az az időpont amikor egy oszlop nem tudja biztosítani a módszerben elvárt elválasztást (csúcsalak, szelektivitás, megfelelő nyomásesés, alapvonal).

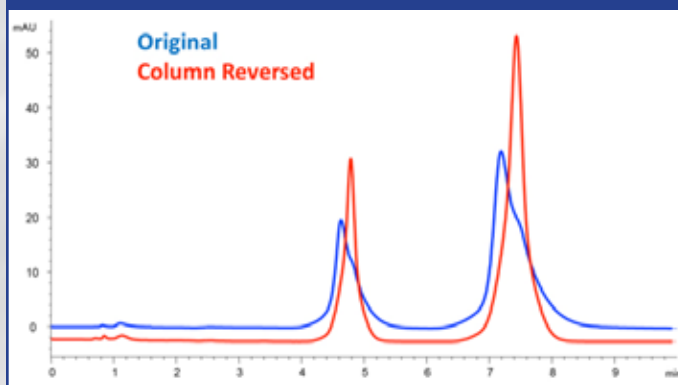
Ebben a részben kimondottan a kolonna töltetet lezáró fritt eltömődésével, mint élettartamot csökkentő folya-

mattal szeretnénk foglalkozni. Tapasztalataink alapján az esetek többségében ez okozhatja az oszlop élettartamának a leromlását. Ez az élettartamot negatívan befolyásoló hatás felismerhető az alábbi könnyen észlelhető szimptomákból:

1. Nyomás folyamatos növekedése, ez lehet lassú és drasztikus folyamat is
2. A csúcsok (összes) felhasadása és vagy jelentős „tailing” megjelenése (**1. ábra**)

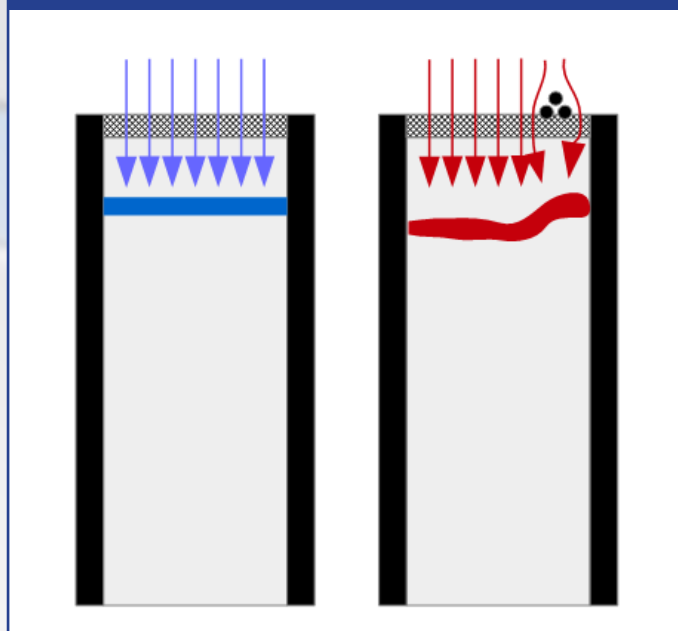
Jellemzően a fenti anomáliákhoz nem társul jelentős változás a szelektivitásban és a retenciók időiben.

1. ábra. Tailinges és felhasadt csúcsok (kék), kiindulási kromatogram (piros)



Miért is jelentkezik a fent említett két jelenség, ha az oszlop frittje eltömődik a használat során? Tekintve, hogy a megfelelő csúcsalak alapfeltétele az injektált minta egyenletes feljutása és éles zóna kialakulása a töltetágyon, az eltömődött fritt meggátolja (**2. ábra**), negatívan befolyásolja ezt a folyamatot. Egy egyszerű példával szemléltetve, ha egy azonos képességekkel rendelkező csoportot indítunk el egy futóversenyen de néhány versenyző elé a startvonalnál beállítunk egy betonfalat, amelyen át kell mászni vagy meg kell kerülni, a mezőny versenyzői nagy időeltéréssel fognak a célba érni, holott normális esetben közel azonos idő alatt teljesítenék a távot.

2. ábra. Az eltömődött fritt meggátolja a minta egyenletes feljutását az oszlopra.



A gyártók számtalan megoldást kínálnak az élettartam növelése érdekében az egyszerű mechanikai előtétteken (in-line szűrő) keresztül a fázist is tartalmazó védőkolonnáig. A fent részletezett esetben is természetesen kiváló megoldás lehet az előtétiszűrő vagy az előtétkolonna használata. Ha ezt a megoldást választjuk legyünk körültekintőek, hogy a szemcseátmérőnek megfelelő védőrendszert válasszunk. Ökölszabályként alkalmazhatjuk, hogy 3µm vagy nagyobb szemcseátmérő esetén 0,5µm-es előtét, ennél kisebb töltetnél pedig 0,2µm-es pórusátmérőjű frittel szerelt szűrőt alkalmazunk. A védőkolonnánál egyszerűbb a helyzetünk, mivel pontosan az adott oszlopnak dedikált védőkolonnát ki tudjuk választani a kínálatból.

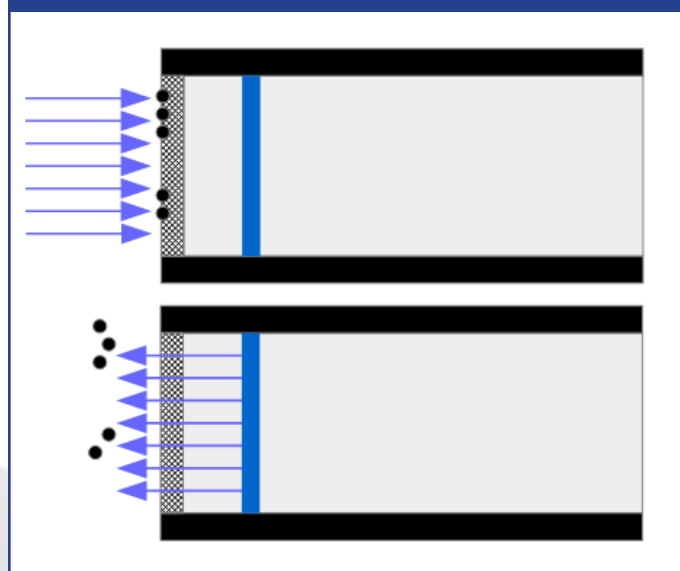
Sajnos ezen kiegészítők elterjedése az eleve magas (U) HPLC oszlopok beszerzési ára mellett, mint plusz (egy-egy márka esetében akár jelentős) bekerülési költség jelentkezik, ami sokszor azt eredményezi, hogy az elvárt költséghatékonyság miatt nem kerül beszerzésre.

Amennyiben használunk védőkolonnát és/vagy előtétiszűrőt és a fenti szimptomák jelentkeznek, egyszerűen cseréljük ki a védőeszközt a rendszerben. Ha nem használtunk semmilyen preventív kiegészítőt a HPLC oszlophoz, még mindig megpróbálkozhatunk a fritt felületén vagy pórusaiban felhalmozódott szennyezők lemosásával. Régebbi oszlopok esetében sokszor használt megoldás volt egyszerűen a fritt kicserélése az oszlopvég lezáró felnyitása után. A jelen kor modern töltésű oszlopainál sajnos ez nem járható út.

Az oszlopok mosásánál mindig kihangsúlyozzuk, hogy az oszlopokat fordítva kössük be, távolítsunk el minden esetleg használt kiegészítőt (előtétoszlop, előtétiszűrő) az oszlopról.

Ennek az a nagyon egyszerű oka, hogy a használat közben minden a rendszerben található, majd a fritten fennakadó szennyezők (pl.: oldhatatlan mechanikai szennyeződések) normál használati irányba nem vagy csak nehézkesen, hosszú idő alatt távolíthatók el (3. ábra). Továbbá a legtöbb előtétoszlop és előtétiszűrő általában nem használható megfordítva. Fontos, hogy a mosás megkezdése előtt - a megfordítást követően - az oszlop ne legyen bekötve a detektorba, feleslegesen ne mosuk be az oszlopon lévő szennyeződések az UV vagy a mérgező MS detektorunkba. Erre a célra használjunk egyszerűen egy főzőpoharat és bármilyen kapillárisal vezessük ide a mosásánál használt oldószerkeletet. Igaz, a legtöbb modern HPLC oszlop használható - a töltési eljárásnak köszönhetően - megfordítva is, de folyamatos használat mellett kialakult töltetanyag elrendezésnek nem használ a másik oldalról történő hirtelen nyomással való sokkolása. Ezért a mosásnál használjunk mindig alacsonyabb - ajánlott a megszokott áramlási sebességet a mosás folyamán 1/2-1/3 értéken tartani. Amennyiben a mosás célja csak a fritt eltömődésének megszüntetése, tökéletesen megfelelő a módszerben használt kiindulási oldószerkelet használata módosítók (puffer, sav, ionpárpépző) nélkül. Nincs szükség egyéb oldószerkeletből álló mosóelegy összeállítására és hosszas egymásba történő átmosogatásra, mint a teljes oszlopmosási eljárásnál. Szintén ökölszabályként alkalmazhatjuk, hogy a mosáshoz elegendő 20-40 oszloptérfogat oldószer átáramoltatása a megfordított HPLC oszlopon.

3. ábra. Normál, használati irányban nem, azonban fordított irányban eltávolíthatóak a lerakódott szennyeződések a fritt felületéről.



Az oszloptérfogat könnyen kiszámítható az alábbi képlettel:

$$V = (\pi \cdot d^2) / 4 \cdot L \cdot 0,7$$

(ahol  $d$ : oszlopátmérő [mm],  $L$ : az oszlop hossza [mm],  $V$ : oszloptérfogat [mm<sup>3</sup>], 0,7: az oszlop térfogatából kivonandó tömör szilika rész (30%).)

A mosás után a legtöbb esetben jelentős javulás tapasztalható. Abban az esetben ha látunk ugyan javulást, de az csak kis mértékű a kiindulási állapothoz képest, megismételhetjük a fenti mosási protokollt hosszabb időtartammal, illetve magasabb szerves oldószer tartalom mellett.

Ha az oszlopkat sikerült megfelelően visszamosunk de az első pár injektálást követően újra jelentkeznek a fritt eltömődésre utaló jelek, vizsgáljuk meg a rendszerünket, hogy nincs-e egy állandó forrásunk (pl.: szűretlen/nem megfelelő pórusátmérővel szűrt foszfát puffer) a szennyezők folyamatos utánpótlására.

A következő részben az előtétiszűrők használatának előnyei mellett az eluens és minták szűrése kerül részletezésre.

# Növényvédő szerek mérése élelmiszerekből SFE-SFC-MSMS rendszerrel

Sigrid Baumgarten

Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Németország

fordította: Vincze Lajos, Dr. Kvellár Béla

Simkon Kft.

**Kulcsszavak:** SFE-SFC-MSMS, növényvédő szerek maradékai, szuperkritikus folyadék extrakció (SFE), szuperkritikus folyadékkromatográfia (SFC), tömegspektrometria, QuEChERS, hidrofil interakciós kromatográfia

## Összefoglalás

Tanulmányomban növényvédő szerek élelmiszerekből történő mérését mutatom be szuperkritikus folyadék extrakció (Supercritical Fluid Extraction – SFE) és szuperkritikus folyadékkromatográfia (Supercritical Fluid Chromatography – SFC) online kapcsolatával és tandem tömegspektrometriás detektálással. Továbbá, szerves klórtartalmú peszticidek szuperkritikus extraktumát GC-MS/MS analízisnek is alávettem. Az SFC hatékony technikának bizonyult növényvédő szerek mérésére széles kémiai struktúra, polaritás és molekulatömeg tartományban. 100-féle peszticid-molekulát extraháltam és mértem különböző élelmiszer mátrixokból online SFE-SFC-MS/MS technikával. A teljes folyamatra nézve jó ismételhetőség jellemző 1-10 ng/g koncentráció tartományban. Az LOQ értékek 0,1-10 µg/L tartományba estek. A rendszer konfigurációja lehetővé teszi, hogy automatikusan offline SFC-re váltsunk. Az így nyert extraktumokat GC-MS vizsgálatra bocsátva, a legtöbb szerves klórtartalmú növényvédő szerre jó pontosság (80-125 %) érhető el.

## 1. Bevezetés

A növényvédő szerek emberi szervezetre gyakorolt káros hatása nagy bizonytalanságot hordoz, mert alacsony koncentrációban, hosszú ideig tartó kitettség lehetséges, ezért a növényvédő szerek mérése fontos, és kihívást jelent a laboratóriumok számára. Következésképpen, szerte a világon szigorúbb élelmiszerbiztonsági szabályozást sürgetnek, amivel nyomást gyakorolnak a növényvédőszer-vizsgáló laboratóriumokra azért, hogy bővítsék a célkomponensek listáját és alacsonyabb koncentrációkat tudjanak detektálni [1].

A növényvédőszer-analitikában főként a GC-MS és LC-MS technikákat használják. A komponensek széles fizikokémiai tulajdonsága miatt gyakran két külön technika – a GC-MS/MS és az LC-MS/MS – alkalmazására van szükség. Általánosságban az LC-t részesítik előnyben poláros és nem illékony komponensek, míg a GC-t az illékony komponensek mérésére alkalmazzák [2]. A gyakorlatban növekvő igény van egy olyan összetett rendszerre, ami egyszerre sok eltérő tulajdonságú növényvédő szert képes detektálni és a minta-előkészítő egységet is magában foglalja.

**„Külön előny az, hogy a minta extrakcióját szuperkritikus fluidum alkalmazásával végzik el.”**

A szuperkritikus fluidumok karakterisztikájukat tekintve hasonlítanak a gázokra és a folyadékokra is: alacsony viszkozitás, nagy diffúzivitás és oldhatóság jellemző rájuk. A széndioxid szuperkritikus állapotúvá válik relatíve alacsony hőmérsékleten és nyomáson (31,1°C és 7,38MPa). Alacsony toxicitása, inertsége, elérhetősége és alacsony ára miatt a szuperkritikus széndioxidot széles területen alkalmazzák [3]. Az általánosan alkalmazott analitikai módszerek offline minta-előkészítést biztosítanak, amit kromatográfiai analízis követ.

Az általunk alkalmazott berendezés jelentősen csökkenti a minta-előkészítésre fordított időt és csökkenti a manuális munka által bevezethető hiba lehetőségét is [4]. Ez az új technika automatizálja a minta-előkészítést: a mintamátrix szuperkritikus fluid extrakciója után a minta emberi beavatkozás nélkül kerül az analitikai kolonnára. A szuperkritikus extrakció (SFE) gyakran és sikerrel használható extrakciós módszer, amely alkalmas növényvédő szerek maradékainak kivonására élelmiszer mátrixból. A szuperkritikus széndioxid (SC-CO<sub>2</sub>) működő SFE-rendszer előnye az, hogy kevés szerves oldószert fogyaszt, kevésbé toxikus és a SC-CO<sub>2</sub>-t használat után könnyű eltávolítani az előkészített mintából.

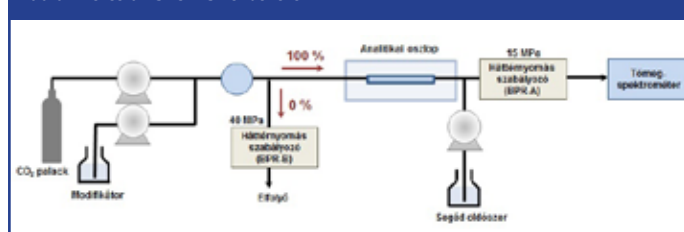
Az általunk használt berendezés egy online rendszerben kombinálja az SFE és SFC technikát, ezért az egész folyamat az extrakciótól a célvegyületek méréséig teljesen automatikus. Továbbá, poláros szerves módosítókat (metanol) is adagolhatunk a szuperkritikus széndioxidhoz, ezért a rendszert széles polaritás-tartományba tartozó komponensek extrahálására és mérésére használhatjuk [5, 6]. Habár a cél az, hogy egy egyedi rendszerünk legyen online SFE-SFC-MS kapcsolattal, szükség szerint az SFE-t más módszerekkel is lehet kombinálni. A rendszer lehetőséget ad az SFE offline alkalmazására is [7, 8].

## 2. Anyag és módszer

### 2.1. SFC-MS/MS: Széles polaritási tartományba tartozó peszticidek mérése különféle mátrixokból

A kísérleteket a Nexera UC online SFE-SFC-MS rendszerrel (Shimadzu Corporation, Japán) végeztem. A berendezés működési elvét az **1. ábra** szemlélteti. A szuperkritikus széndioxidot a szerves poláros oldószerrel (modifikátorral) együtt áramoltatjuk keresztül az analitikai rendszeren, ahol az analitikai oszlopon történik a gradiens elválasztás. A tömeg szerinti elválasztást és detektálást LCMS-8050 hármass kvadrupol tömegspektrométeren végeztem (Shimadzu Corporation, Japán). Az analitikai beállításokat az **1. táblázat** tartalmazza.

1. ábra. Mérés az SFC-MS rendszeren



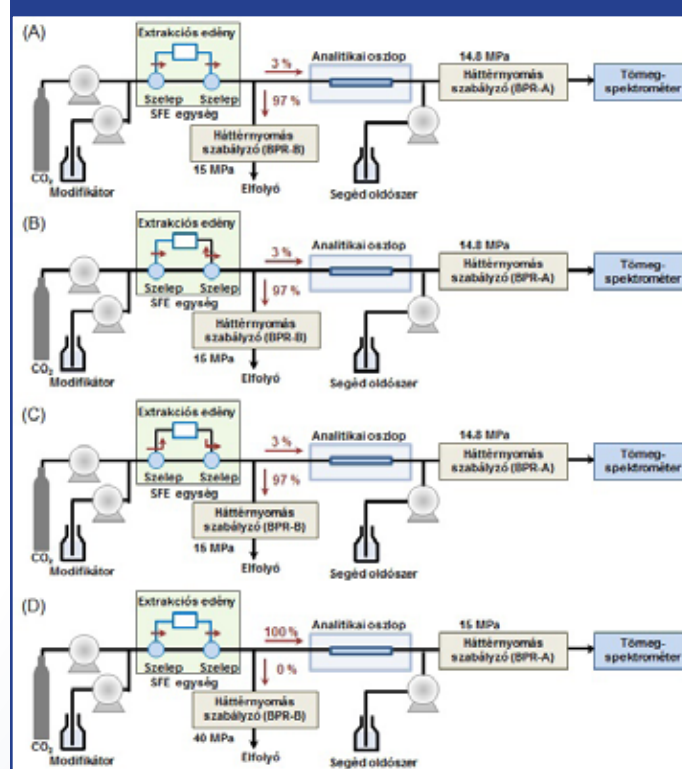
1. táblázat. Az SFC-MS módszer analitikai beállításai

SFC kondíciók (Nexera UC rendszer, Shimadzu)	LCMS 8050
	Ionizáció: Elektrospray (ESI)
	Polaritás: Pozitív
Oszlop: 2-Ethylpyridine 150x4,6mm, 5µm	Kapilláris feszültség: (2 - 4) kV
Mozgó fázis: CO <sub>2</sub>	Porlasztógáz áramlási sebesség: 3L/perc
Módosító (B): 0.1 %w/v ammónium formiát metanolban	Fűtött gáz sebessége: 10L/perc
Gradiens: 0 - 90 %B 7 perc alatt	Szárítógáz sebessége: 10L/perc
Áramlási sebesség: 3mL/perc	Desolvation Line hőm.: 250°C
Háttérnyomás szabályozók (BPC): (A) 15MPa, (B) 40MPa	Heat block hőm.: 400°C
	Interface hőm.: 300°C
	MRM: 46 event, 92 MRM átmenet

### 2.2. SFE-SFC-MS/MS: peszticidek mérése élelmiszerekben

Az online SFE-SFC-MS rendszer működési elvét a **2. ábra** szemlélteti. A mintával megtöltött extrakciós edényt az SFE egységbe kell helyezni, majd 40°C-ra kell fűteni (**2A ábra**). Ezután kell az extrakciós edénybe pumpálni a szuperkritikus állapotban lévő széndioxidot. A töltés után az áramlást leállítjuk, hogy a komponensek statikusan extrahálódjanak (**2B ábra**). A statikus extrakció idejének lejártá után az extraháló szert átáramoltatjuk az extrakciós edényen, aminek következtében egy dinamikus extrakciós folyamat is végbe fog menni (**2C ábra**). A dinamikus extrakciós lépés során a mintából kivont komponensek az analitikai oszlopba jutnak. Élelmiszerekből nagy mennyiségű szennyező anyag is extrahálódik, ami káros lehet az analitikai oszlopra és a tömegspektrométerre nézve is. Ezért egy beépített áramlásosztó szerkezet révén a teljes extraktumnak csak egy kis része kerülhet az analitikai oszlopra és a tömegspektrométerbe. A dinamikus extrakciót követően az extraháló szer áramlása csak az oszlop és tömegspektrométer irányába megy végbe (**2D ábra**).

2. ábra. Analízis-utak az online SFE-SFC-MS rendszeren



A növényvédő szerek élelmiszerekből történő kivonására és a minták előkészítésére napjainkban a leggyakrabban az ún. QuEChERS (gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, állékony és megbízható – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) módszert használják. A módszer ugyan az egyszerűséget és a gyorsaságot részesíti előnyben, ennek ellenére számos lépést tartalmaz,

mint amilyen a reagensek hozzáadása, az oldószeres extrakció, a tisztítás szilárd fázisú folyadék extrakcióval és centrifugálás. Ezzel szemben az online SFE-SFC-MS rendszer csak egy keverési lépést igényel: 1g élelmiszer mintát 1g vízmentesítő anyaggal kell összekeverni, majd az extrakciós edénybe helyezni (**3. ábra**). Ilyen módon a rendszer javítja a laboratórium mintaátteresztő képességét, csökkenti a környezetterhelést és véd a minta-előkészítésből származó emberi hibáktól is. Az erre a célra fejlesztett mintatálca-váltóval összesen akár 48 minta is extrahálható folyamatosan. Kísérleteim során barnarizs, eper és olaj mintákat (1g) dúsítottam 100 peszticidet tartalmazó különböző koncentrációjú (10 – 2000 µg/l) mix oldatokkal (100 µl), ami 1-200 µg/kg dúsítási koncentrációt jelent. Az analitikai beállításokat a **2. táblázatban** foglaltam össze.

3. ábra. Minta-előkészítés



2. táblázat. Az SFE-SFC-MS rendszer analitikai kondíciói

SFE kondíciók (Nexera UC rendszer, Shimadzu)	SFC kondíciók (Nexera UC rendszer, Shimadzu)
Mozgófázis: CO <sub>2</sub> (A)	Oszlop: UC-RP 5 µm (250x4,6 mm)
Mozgófázis modifikátora (B): 0.1 %w/v ammónium formiát metanolban oldva	Mozgófázis: CO <sub>2</sub> (A)
Áramlási sebesség: 5ml/perc	Mozgófázis modifikátora (B): 0.1 %w/v ammónium formiát metanolban oldva
Extrakció:	Áramlási sebesség: 3ml/perc
0 - 1 perc statikus mód (5 %B)	Gradiens: 0% (0perc)
1 - 3 perc dinamikus mód (5 %B)	→10%(10perc) →30%(14perc)
Extrakciós edény hőm.: 40°C	→ 40% (14.01-17perc)
Háttérnyomás szabályozók (BPC): (A) 14.8MPa	Oszlop hőm.: 40°C
(B) 15MPa	Háttérnyomás szabályozó (BPC):
(split arány: 3 %)	(A) 15MPa, (B) 40MPa
Make-up: 0.1 %w/v ammónium formiát metanolban	Make-up: 0.1 %w/v ammónium formiát metanolban (0.4 ml/min)

## LCMS 8050

Ionizációs mód: Elektrospray (ESI)

Polaritás: pozitív és negatív

Kapilláris feszültség: (2 - 4) kV

Nebulizer gas áramlás: 3L/perc

Heat gas áramlás: 10L/perc

Drying gas áramlás: 10L/perc

Desolvation Line hőm.: 250°C

Heat block hőm.: 400°C

Interface hőm.: 300°C

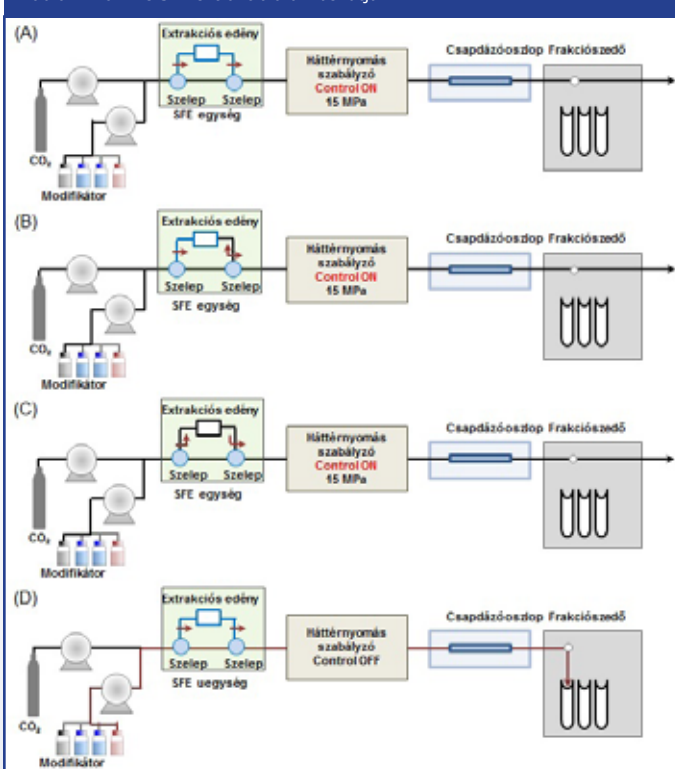
MRM (multiple reaction monitoring):

103 event, 206 MRM átmenet

## 2.3. SFE offline-GC-MS/MS: Szerves klórtartalmú peszticidek mérése élelmiszer mátrixból

A **4. ábra** az offline SFE rendszer működését szemlélteti. A mintával megtöltött extrakciós edényt az SFE egységbe helyeztük és 40°C-ra fűtöttük (**4A ábra**). Ezt követően az edényt szuperkritikus széndioxiddal töltöttük fel és a célkomponenseket statikus körülmények között hagytuk extrahálódni (**4B ábra**). Ezután következett a dinamikus extrakció, aminek során szuperkritikus széndioxidot pumpáltunk át az extrakciós edényen (**4C ábra**). Az extraktumot a csapdázó oszlopon kötöttük meg, majd frakciószedőbe eluálva gyűjtöttük össze a kivonatokat (**4D ábra**). A frakcionált mintákat egy triple quad detektorral ellátott gázkromatográfval választottuk el (GCMS-TQ8040, Shimadzu Corporation, Japán). Az analitikai beállításokat a **3. táblázatban** közöljük.

4. ábra. Az offline SFE extrakció áramlási útja





Offline SFE:	GCMS-TQ8040
Extrakciós edény: 5ml	
Extrakciós oldószer: CO <sub>2</sub> + metanol (5%)	Oszlop: Rxi-5 30 m× 0.25 mmID, df = 0.25 µm
Áramlási sebesség: 5ml/perc	Minta injektálása: Splitless (250°C, Sampling time 1.00 min), high-pressure injection
Hőmérséklet: 60°C	
Háttérnyomás szabályozó: 15 MPa	Kontrol mód: Linear velocity (He, 47.2 cm/sec)
Extrakciós idő: 8 min (statikus extrakció → dinamikus extrakció)	Oszlop termosztát hőmérséklete: 50°C (1perc) → (25°C/perc) → 125°C→(10°C/perc) → 300°C (15 perc)
<u>Csapdázási kondíciók</u>	
Csapdázó oszlop: C18 (50x4.6mm,5µm)	Injektálási mennyiség: 1µL
Hőmérséklet: 50°C	Ionforrás hőm.: 200°C
<u>Kinyerési kondíciók</u>	Interfész hőm.: 250°C
Elúciós oldószer: aceton/hexán = 50/50	Oldószervágási idő: 90s
Áramlási sebesség: 2ml/perc	Detektor feszültség: 2kV
Hőmérséklet: 60°C	Mód: MRM (29 event, 58 MRM átmenet)
Frakcionálási idő: 2 min (12 - 14 perc)	

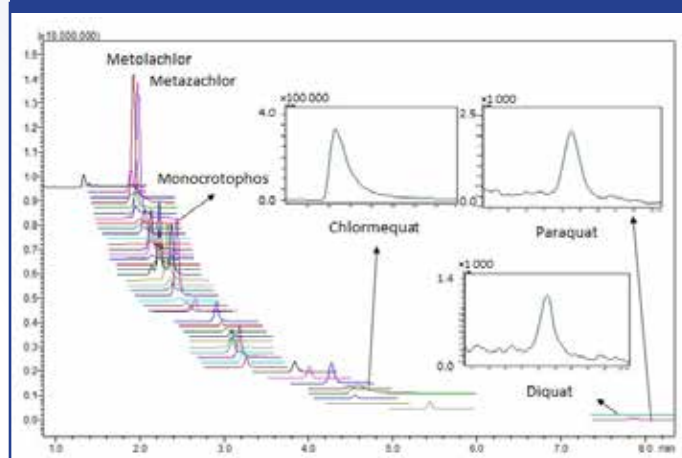
### 3. Eredmények

#### 3.1. SFC-MS/MS: Széles polaritás-tartományú peszticidek mérése különböző mátrixokból

A kvaterner aminok a hagyományos fordított fázisú oszlopon kevés esetben rendelkeznek az elválasztásukhoz szükséges retenciával. Elválasztásukra egy alternatív technika, a hidrofíli interakciós kromatográfia (HILIC – Hydrophilic interaction chromatography) használatát javasolják, amivel a nagyon poláros és hidrofíli komponensek mérhetők [9]. Annak elkerülésére, hogy két módszert is használni kelljen, az SFC rendszer lehetőséget nyújt a poláros és nem poláros peszticidek egy futásban való mérésére. Próbaképpen eltérő szerkezetű, polaritású és molekulatömegű peszticideket választottam a vizsgálathoz. Acetonitrilben (+1% ecetsav) oldva különböző koncentrációban (0,1 – 250 µg/l) készítettem peszticid sztenderd oldatokat, amelyeket az **1. táblázatban** szereplő beállításokkal vizsgáltam meg. Az 50 µg/l-es minta kromatogramját az **5. ábra** szemlélteti.

A kvaterner aminok a gradiens végén eluálódnak. Az LOD és LOQ értékeket a **4. táblázat** tartalmazza, az LOQ értékek 0,1 - 10 µg/L közé estek.

5. ábra. SFC kromatogram 50 µg/L



4. táblázat Kimutatási (LOD) és mennyiségi mérőhatárok (LOQ)

Komponens	Log Kow - oktanol-víz megoszlási állandó logaritmusa	Retenció idő (perc)	R2	Tartomány (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	RSD (n=3) 50 µg/L
Aldicarb	1.1	2.1	0.99	1-250	1.0	1.0	4.05
Aldicarb sulfone	-0.6	2.9	0.99	0.1-250	<0.1	0.5	4.01
Aldicarb sulfoxide	-0.2	3.1	0.98	10-250	10.0	10.0	5.58
Atraton	2.7	2.0	0.99	0.5-250	0.1	0.5	4.69
Atrazindesethyl - desisopropyl	-0.1	4.7	0.99	1-250	1.0	5.0	6.69
Atrazine	2.6	2.4	0.99	0.5-100	0.1	0.5	6.18
Atrazine-desethyl	1.5	3.2	0.99	0.1-100	0.1	0.1	6.17
Chlormequat	-3.8	4.7	1.00	0.5-250	0.5	0.5	2.19
Chloroxuron	3.5	4.5	0.99	0.5-250	0.1	0.5	10.67
Chlorpyrifos-ethyl	5.3	2.0	0.98	5-250	1.0	5.0	2.03
Chlorpyrifos-methyl	4.3	2.0	0.98	1-250	0.5	1.0	2.64
Chlortholuron	2.4	3.8	0.99	5-250	5.0	5.0	2.71
Crimidine	1.3	2.5	0.98	5-250	5.0	5.0	7.70
Cyanazine	2.2	3.1	1.00	0.5-250	<0.1	0.5	6.11
Dimethoate	0.8	3.1	0.99	0.5-250	0.1	0.5	4.40
Diquat	-4.6	7.9	1.00	5-250	5.0	5.0	6.24
Diuron	2.7	4.6	0.99	0.5-250	<0.1	0.5	0.78
Fenthion	4.2	2.1	0.98	5-250	1.0	5.0	2.03
Fenuron	1.0	3.3	0.99	0.1-250	<0.1	0.1	6.29
Imidacloprid	0.8	5.5	0.99	0.5-250	<0.1	0.5	2.72
Isoproturon	2.9	3.2	0.99	0.5-250	0.1	0.5	3.88
Linuron	3.2	3.0	0.99	1-250	0.5	1.0	6.56
Malathion	2.4	1.9	1.00	0.1-250	0.1	0.1	10.34
Metamitron	0.7	4.0	0.99	0.5-250	<0.1	0.5	5.33
Metazachlor	2.4	2.0	0.99	0.1-100	<0.1	0.1	3.19
Methabenzthiazuron	1.9	2.6	0.99	5-250	5.0	5.0	3.69
Methacifos	1.9	1.3	0.98	5-250	5.0	5.0	10.12
Methiocarb	2.9	3.1	0.99	1-250	1.0	5.0	8.75
Metobromuron	2.4	2.5	0.99	1-250	<0.1	0.5	4.61
Metolachlor	2.9	1.9	0.99	1-250	0.1	1.0	4.84
Metribuzin	1.7	3.0	0.98	1-250	1.0	1.0	8.21
Monocrotophos	-0.2	2.4	0.99	0.1-250	<0.1	0.1	3.94
Monolinuron	2.3	2.4	0.99	0.5-250	0.5	1.0	6.29
Omethoate	-0.9	2.3	0.99	0.1-250	<0.1	0.1	2.58
Oxadiazon	4.8	1.9	1.00	0.1-250	0.1	0.5	4.38
Paraquat	-4.5	7.9	1.00	10-250	5.0	10.0	11.63
Phosphamidon	1.3	1.9	0.99	0.5-250	0.1	0.5	8.01
Pyrimiphos-methyl	4.2	2.0	0.99	0.5-250	0.1	0.5	4.92
Prometryn	3.5	2.1	0.99	0.5-100	<0.1	0.5	5.18
Propazine	2.9	2.1	0.99	0.1-250	<0.1	0.1	4.60
Propham	2.6	2.1	0.91	10-250	5.0	10.0	7.84
Pymetrozine	-0.2	4.3	0.98	0.1-250	<0.1	0.1	3.74
Sebuthylazine	3.1	2.2	0.99	0.1-250	<0.1	0.1	5.95
Simazine	2.2	2.6	0.99	1-250	0.5	1.0	4.47
Terbutylazine	3.2	2.2	1.00	0.1-250	<0.1	0.1	5.61
Terbutyn	3.7	2.2	0.99	0.5-250	0.1	0.5	0.29

#### 3.2. SFE-SFC-MS/MS: peszticidek mérése élelmiszerekből

A mintákat (eper, barna rizs és olaj) a 100 peszticidet tartalmazó mix oldattal addicionáltam, amelyekhez vízmentesítő anyagot adtam, majd a **2. táblázatban** feltüntetett analitikai kondíciókkal végeztem a kromatográfiai elválasztást. Az extrakciótól a mérésig az

online SFE-SFC-MS rendszert használva mintánként 45 perc alatt tudtuk elvégezni az egész analitikai vizsgálatot. A 100 komponensre jó ismételtelőséget értem el 1 – 10 ng/g tartományban (**5. táblázat**). A **6-8. ábrákon** néhány peszticid kalibrációs egyeneseit mutatom be különböző mátrixokból mérve.

5. táblázat. Ismételtelőségi adatok (barna rizs)

Komponens	RSD % (n=3) 10 µg/Kg	Komponens	RSD % (n=3) 10 µg/Kg
Acephate	5,6	Imidacloprid	5,8
Atrazine	7,31	Iprodione	3,3
Azinphos methyl	1,61	Isoprothiolane	7,73
Azoxystrobin	2,36	Linuron	12,52
Boscalid	2,79	Malathion	4,85
Bromophos	6,45	Malaoxon	11,42
Carbaryl	12,34	Metconazole	3,84
Carbendazim	4,8	Methacrifos	5,6
Carbofuran	4,22	Methamidophos	2,28
Carboxine	13,44	Methomyl	0,4
Chlorfenvinphos	0,94	Metribuzin	10,62
Chlorothalonil	5,31	Omethoate	5,1
Chlorpropham	9,35	Paclbutrazole	3,15
Chlorpyrifos	10,9	Parathion-methyl	9,1
Chlorpyrifos methyl	8,42	Penconazole	3,98
Cyhalothrin	12,87	Pendimethalin	4,38
Cypermethrin	2,74	Permethrin	6,71
Cyproconazole	1,73	Phorate	1,64
Cyprodinil	6,45	Phorate sulfone	3,18
Deltamethrin	0,29	Phorate sulfoxide	0,89
Demeton-S methyl	4,9	Phosalone	14,01
Diazinon	0,64	Phosmet	3,8
Dichlovos	6,3	Phosphamidon, mixture of E+Z	7,58
Difenoconazole	8,8	Piperonyl butoxide	12,84
Diflubenzuron	0,64	Pirimicarb	4,19
Dimethoate	12,6	Prochloraz	2,03
Disulfoton	1,07	Procymidone	6,2
Disulfoton sulfone	5,4	Propiconazole	3,83
Epoxiconazole	4,47	Pyraclostrobin	3,75
Ethion	0,42	Pyridaphenthion	6,35
Ethoprophos	2,95	Pyrimethanil	3,6
Etrifos	9,45	Quinoxifen	6,51
Fenamiphos	8,14	Quinoxifen	14,42
Fenamiphos sulfone	18,42	Spiroxamine	7,25
Fenamiphos sulfoxide	4,42	Tebuconazole	7,36
Fenbuconazole	8,8	Tebufozide	7,21
Fenhexamid	2,64	Terbufos	4,45
Fenitrothion	14,9	Terbufos sulfone	11,42
Fenprovidin	8,38	Tetrachlorvinphos	8,24
Fenthion	8,59	Thiabendazole	9,98
Fenthion sulfone	6,16	Thiacloprid	4,42
Fenthion sulfoxide	4,67	Thiamethoxam	4,19
Fenvalerate	7,15	Thiodicarb	11,66
Fipronil	7,24	Triadimefon	5,84
Fludioxonil	4,93	Triadimenol	11,49
Fluquinconazole	2,19	Triazophos	4,41
Flusilazole	4,25	Tricyclazole	4,84
Flutriafol	8,58	Trifloxystrobin	4,83
Fonofos	5,76	Triticonazole	4,25
Hexaconazole	2,9	Vinclozolin	2,4
Imazalil	6,3		

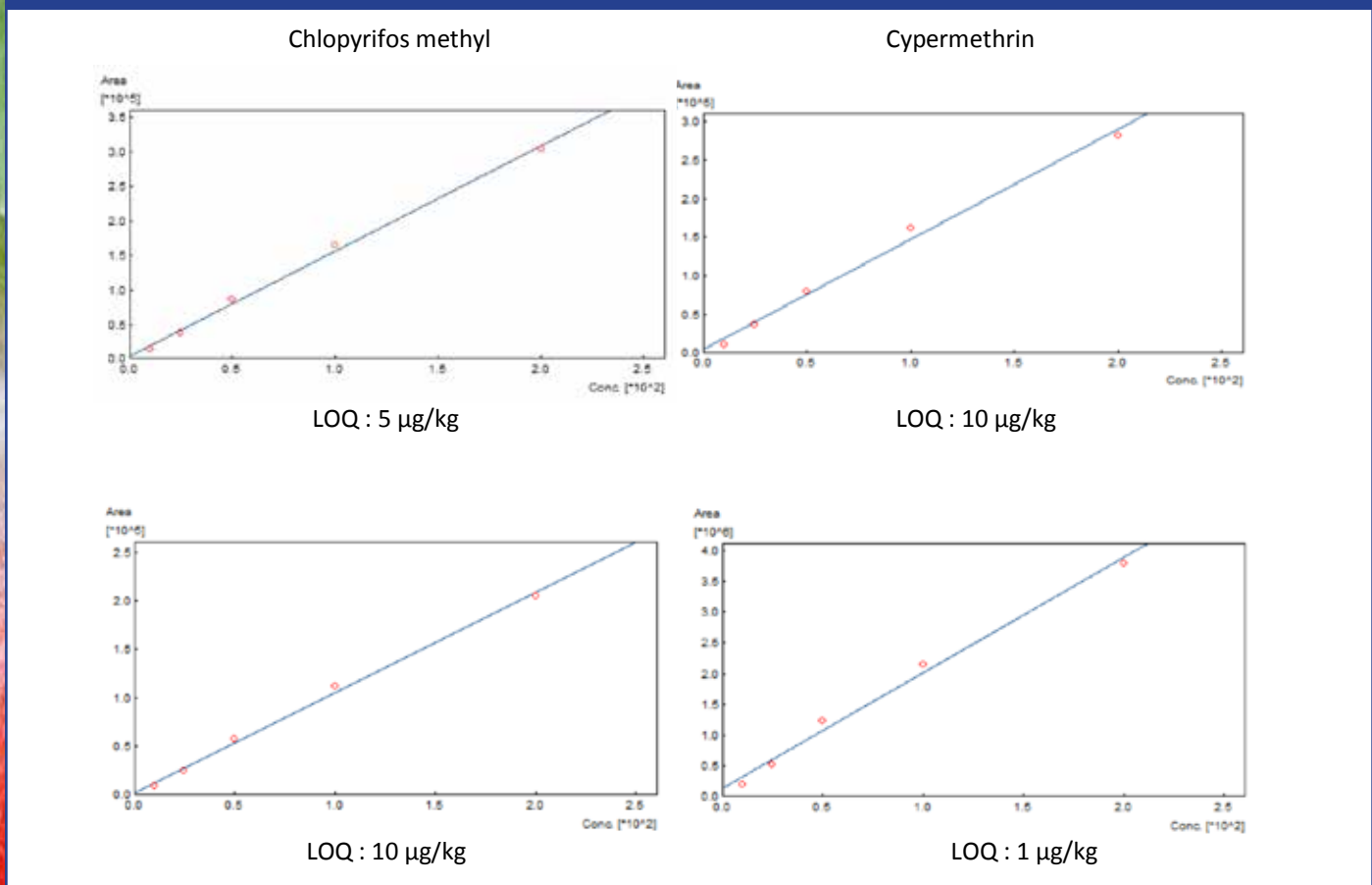
### 3.3. SFE offline-GC-MS/MS: szerves klórtartalmú peszticidek mérése élelmiszer mintákban

A szerves klórtartalmú peszticidek gyengén polárosak, hőstabilak és illékonyak. Következésképpen meghatározásuk hagyományosan gázkromatográfiával történik elektronbefogásos (ECD) vagy tömegszelektív (MS) detektorral kapcsolva. [10]. A vizsgálatokhoz a készülék-együttest offline SFE módban használtam. A GC-MS/MS kalibrációs egyeneseket 10 – 200 µg/l tartományban vettem fel. Lisztet addicionáltam peszticid sztenderd oldattal úgy, hogy a minta növényvédőszer tartalma 100 ng/g lett. Az addicionált mintákat SFE extrakciónak vettem alá (a mérés körülményeit lásd a **3. táblázatban**). Az extrakció után a méréseket GC-MS/MS rendszerrel végeztem. Ezzel a technikával a szerves klórtartalmú vegyületek 80 – 125% visszanyeréssel mérhetőek vissza (**6. táblázat**). A 100 ng/g-ra dúsított minta kromatogramját a **9. ábra** szemlélteti.

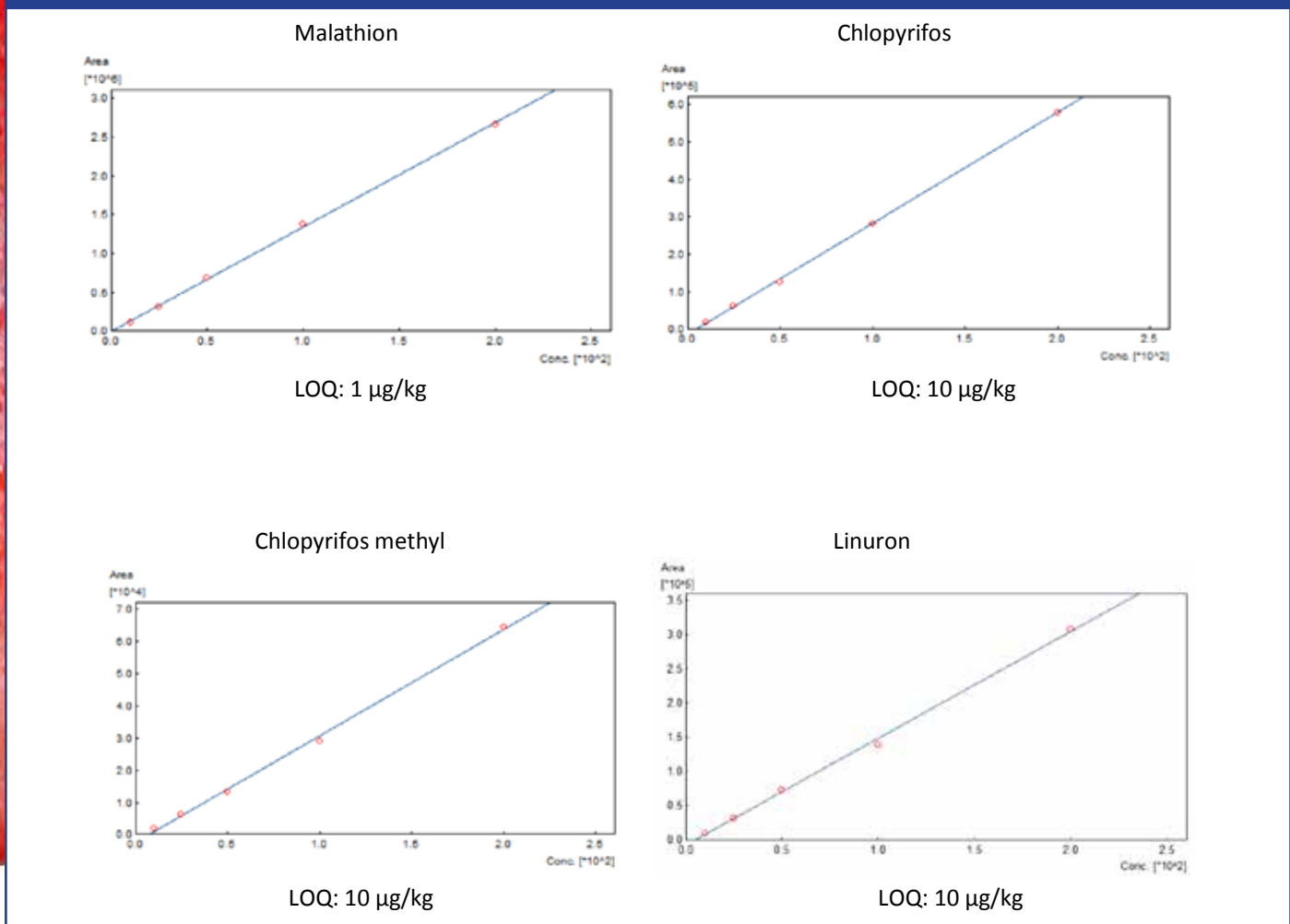
6. táblázat. Kinyerési hatások értékek: sztenderd GC-MS-sel mérveés dúsított lisztminta offline SFE és GC-MS/MS-sel

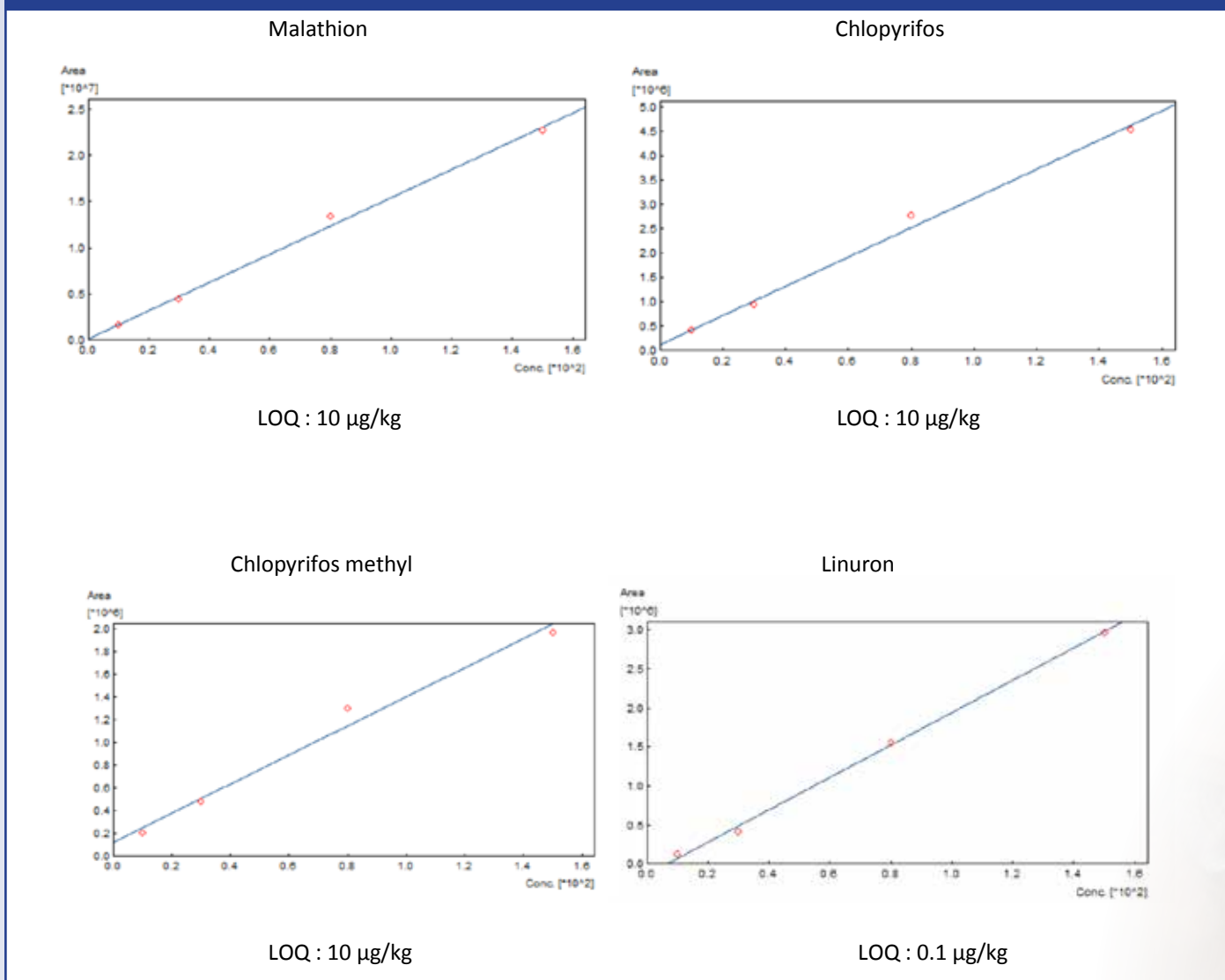
Komponens	Visszanyerési hatások (%)	%RSD (n=3)
Aldrin	70	0,7
BHC-alfa	73	6,2
BHC-beta	73	5,9
Bifenthrin	103	3,5
Chlordane-trans	76	1,6
Chlordane-cis	84	3,3
Chlorothalonil	28	6,4
Cypermethrin	101	3,9
DDD o,p	101	1,2
DDD p,p	56	2,9
DDE o,p	74	2,4
DDE p,p	79	2,3
DDT o,p	102	1,2
DDT p,p	96	11,3
Diclofop-methyl	123	3,4
Diieldrin	78	2,2
Endosulfan alfa	73	2,5
Endosulfan beta	95	0,7
Endrin	77	2,3
Fenvalerate I	84	4,7
HCB	71	1,2
Heptachlor	66	2,3
Heptachlor epoxide	88	3
Lindane	75	3,3
Methoxychlor	150	1,7
Mirex	103	5,4
Permethrin I	124	5,2
Permethrin II	119	7,5
Phenothrin	101	3,7

6. ábra. Kalibrációs egyenesek eper mátrixban

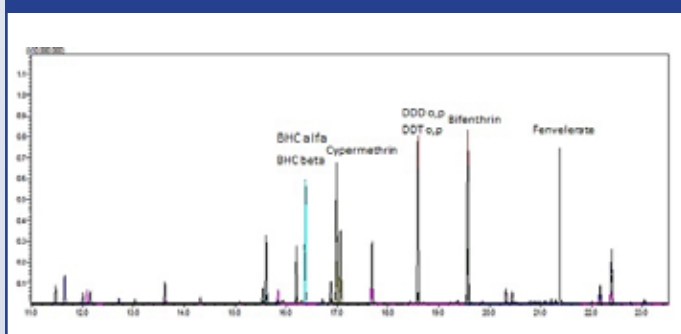


7. ábra. Kalibrációs egyenesek barna rizs mátrixban





9. ábra. A 100 ng/g extrahált peszticidek GC-MS/MS kromatogramja



#### 4. Következtetések

A szuperkritikus folyadék kromatográfia (SFC) hatékony elválasztástechnikai módszer, ami széles polaritás-tartományba tartozó növényvédő szereket képes egyszerre meghatározni. Munkámban bemutattam az online-SFE-SFC-MS rendszer működését, ami egyazon rendszerben kapcsolja a szuperkritikus folyadék extrakciót és a kromatográfiát. A készülékrendszert növényvédő szerek extrakciójához és méréséhez alkalmaztam. Egy példán keresztül bemutattam, hogy a rendszerrel az offline SFE-re való váltás is lehetséges, így a mintákat GC-MS/MS-sel is mérni tudjuk. A közel 100 hatóanyagra rendkívül jó elválasztást, visszanyerést, jó detektálhatóságot és ismételhetőséget kaptam.

A berendezés kiváló lehetőséget nyújt a **különböző polaritású** peszticidek élelmiszermintákból történő méréséhez.

## Referenciák

1. H. V. Botitsi, S. D. Garbis, A. Economou and D. F. Tsiipi, *Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices*, *Mass Spectrometry Reviews* 2011, 30, 907-939.
2. L. Alder, K. Greulich, G. Kempe and B. Vieth, *residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? Mass Spectrometry Reviews* 2006, 25, 838-865
3. M. Ishibashi, T. Ando, M. Sakai, A. Matsubara, T. Uchikata, E. Fukusaki, T. Bamba. *High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry*. *J. Chromatogr. A* 1266: 143-148, 2012.
4. William Hedgepeth, Ken Tanaka, *A New Standard in Analytical Workflow Design*, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, Maryland Pittcon 2016
5. *Application of Nexera UC SFE pre-treatment system for extracting pesticide residues from soil*, Shimadzu, application note L 503
6. *Using the Nexera UC online SFE-SFC-MS system to analysis residual pesticides in agricultural product*, Shimadzu, application note L 497
7. Takanari Hattori , Takero Sakai , Yoshihiro Hayakawa, *Efficient extraction of residual pesticides in agricultural products and soils for GC/MS and LC/MS analysis using supercritical fluid extraction*, Kyoto 604-8511, Japan ASMS 2016 poster Thp 342
8. *Analysis of residual of pesticides in agricultural products using Nexera UC Off-line SFE-GS/MS system*, Shimadzu, application note L 503
9. David R. Baker, Eric Capodanno , Mikael Levi Shimadzu Corporation, *Highly Polar Pesticide Multi-Residue Analysis in Food Safety by LC-MS/MS*, Shimadzu, application note C 118
10. Barriada-Pereira, M.; Gonzalez-Castro, M. J.; Muniategui-Lorenzo, S.; Lopez-Mahia, P.; Prada-Rodriguez, D.; Fernandez-Fernandez, *Organochlorine pesticides accumulation and degradation products in vegetation samples of a contaminated area in Galicia (NW Spain)*. *E. Chemosphere* 2005, 1571-1578.



*Nexera UC: a szuperkritikus folyadék extrakció és kromatográfia következő korszaka*

# Az analitika svájci bicskája

## Egyesített kromatográfia

Az új *Nexera UC* egyesített kromatográf az SFC és az LC elválasztási technológiák előnyeit egyesíti az MS/MS detektálással. Az SFE/SFC/MS platform egyesíti az egyszerű és gyors on-line minta előkészítést a korszerű kromatográfiai analízissel és a nagy érzékenységű detektálással.

- **A világon a legelső egyesített és teljesen automatizált rendszer** szuperkritikus folyadék extrakció (SFE) és szuperkritikus folyadék kromatográfia (SFC) kombinációja
- **Az első univerzális rendszer** applikációk széles területe, élelmiszer ellenőrzés, környezetvédelmi analízis, gyógyszeripari alkalmazások
- **Módszer fejlesztési opció** speciális módszerfejlesztési konfiguráció akár 12 oszloppal is

- **Gondtalan, nagy hatékonyságú minta előkészítés** akár 48 mintáig, egyszerű on-line transzfer a kromatográfiai és MS rendszerbe



# Körvizsgálati minták referencia értékeinek meghatározása pontosan egyező dupla izotóphígításos módszerrel

Tölgyesi Ádám<sup>1,2\*</sup>, Tölgyesi László<sup>3</sup>

Email: [tolgyesi83@gmail.com](mailto:tolgyesi83@gmail.com)

Tel.: +36 30 96 89 346

Jelenleg: <sup>1</sup>Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság, 1095 Budapest, Mester utca 81.

<sup>2</sup>European Commission, Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements, European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium

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

A közlemény a XLVII. Kromatográfias Továbbképző Tanfolyamon (Szeged, 2016) elhangzott előadás alapján készült.

## Összefoglalás

A szerves célkomponensek tesztmintákból történő mennyiségi meghatározásra több általános eljárás is a rendelkezésünkre áll, mint a külső vagy belső standard alapú kalibráció, esetleg standard addíció. Továbbá, a stabil izotópjelzett komponensek növekvő elterjedésével szélesedik azon vegyületek köre, melyek mennyiségi értékelése az ún. izotóphígításos módszerrel nagy bizonyossággal valósítható meg. A pontosan egyező dupla izotóphígításos módszer az izotóphígításos tömegspektrometria egyedi alkalmazása szerves vegyületek meghatározására. A módszer egyik fő alkalmazási területe a körvizsgálati minták referencia értékeinek meghatározása. Az eljárás lényege, hogy a tesztmintát és a kalibrációs mintát, melyekben mért izotóp arány pontosan megegyezik, egy szekvencián belül felváltva injektáljuk többször egymás után a készülékbe. Az izotóp arányok arányaiból egy átlagszámítást követően egyszerűen számítható a célkomponens koncentrációja a mintában. A pontosan egyező dupla izotóphígításos tömegspektrometria (exact-matching double isotope dilution mass spectrometry) nem rutin analitikai eljárás, célja nem a gyorsaság, hanem a célkomponensre kidolgozott analitikai módszer pontosságának növelése a mérési bizonytalanság csökkentése révén.

**Kulcsszavak:** Izotóphígításos tömegspektrometria; LC-MS; GC-MS; Körvizsgálat; Referencia érték

**Rövidítések:** **EMD-IDMS:** Pontosán egyező dupla izotóphígításos módszer (exact-matching double isotope dilution mass spectrometry); **EURL for Mycotoxins:** Európai Unió Mikotoxin Referencia Laboratóriuma (European Union Reference Laboratory for Mycotoxins); **GC-MS:** Gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (Gas chromatography – mass spectrometry); **IDMS:** Izotóphígításos tömegspektrometria (Isotope dilution mass spectrometry); **IR:** Izotóp arány (isotope ratio); **ISTD:** Belső standard (internal standard); **LC-MS:** Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (Liquid chromatography – mass spectrometry); **LOQ:** Meghatározási határ (Limit of quantification); **MS:** Tömegspektrometria (Mass spectrometry); **MRM:** Anyaion – leányion mód (multiple reaction monitoring); **MS:** Tömegspektrometria (Mass spectrometry); **MS/MS:** Hármaskvadropol rendszerű tandem tömegspektrometria (Triple quadrupol tandem mass spectrometry); **R':** Izotóp arányok aránya; **R'<sub>átlag</sub>:** Izotóp arányok arányainak átlaga

## Bevezetés

A rutin analitikai feladatokat ellátó laboratóriumok számára a körvizsgálatokban való részvétel nagy fontossággal bír, mivel a laboratórium adott vizsgálatra vonatkozó teljesítőképessége a körvizsgálati eredményekkel is jellemezhető. A körvizsgálat tervezése, lebonyolítása és értékelése ezért a szervező laboratóriumra egy komoly és felelősségteljes feladatot ró, amely a nagyfokú szervezési és korszerű mérés technikai eszközök alkalmazását kívánja meg. A szervező laboratórium feladatkörébe tartozik a minta homogenitásának és stabilitásának igazolása, illetve a mintához hozzárendelt érték meghatározása is.

A körvizsgálati minták hozzárendelt értékeit többféleképpen is meghatározhatjuk, például a beérkezett eredmények robusztus átlagaként (konszenzusos érték) a statisztikailag szignifikánsan eltérő értékek (outlier) kizárását követően. A konszenzusos értéken alapuló meghatározásnál viszont csak statisztikai eszközökkel tudjuk igazolni, hogy az átlag számításából kizárt laboratóriumok nem megfelelőek. Ellenben az is előfordulhat, hogy pont a kizárt laboratóriumok adtak jó eredményt, így a hozzárendelt érték megadása referencia értéken keresztül megbízhatóbb lehet. Ez utóbbi esetben a szervező laboratórium a saját mérései alapján határozza meg a mintához hozzárendelt értéket, amit referencia értéként definiálnak. Jelen kézirat a referencia érték egyik legpontosabb meghatározási módját mutatja be.

A körvizsgálati minták referencia értékeinek folyadékkromatográfias – tömegspektrometriás (LC-MS) meg-

határozása szerves célkomponensek esetén izotóphígítási tömegspektrometriával (isotope dilution mass spectrometry, IDMS) valósul meg, ha létezik a célvegyület stabil izotóp jelzett analógja, ami belső standardként (internal standard, ISTD) használható a mérés során. Az LC-MS technika a népszerűségét annak köszönheti, hogy a kromatográfiás elválasztást a nagyselektivitású tömegspektrometriás detektálással (mass spectrometry, MS) ötvözi, mely a célvegyületek analízisét még a nagy komplexitású mátrixokban is lehetővé teszi. A kapcsolt technika hátránya, hogy az MS célkomponensekre adott analitikai válaszjelét az analátokkal egy időben eluálódó mátrix komponensek jelentősen befolyásolhatják. Ugyanis koelúció esetén az ionforrásban a mátrixot alkotó vegyületek a célkomponensek ionizációját részlegesen vagy teljesen elnyomhatják, esetleg felerősíthetik azt, melynek mértéke mintáról-mintára változhat, így a módszer pontossága torzul. Az IDMS előnye, hogy a mintához adagolt izotópjelzett standard, ami a célvegyülettől csak az izotópjelzésben különbözik ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), ideális esetben milliszekundum pontossággal azonos időben eluálódik a célvegyülettel és a célkomponenst ért mátrixhatást kompenzálja. Mivel a célvegyületet és az annak analóg izotópjelölt származékát ugyanaz a mátrixhatás éri az együttes elúció következtében, így analitikai válaszjeleik (kromatográfiás csúcsterületeik) hányadosa, az izotóp arány (ion ratio, IR) a mátrixhatástól független lesz (**1. képlet**).

### 1. képlet

$$\text{IR} = A_{\text{célkomp}} / A_{\text{jelölt STD}}$$

ahol,

IR: izotóp arány

$A_{\text{célkomp}}$ : a célkomponens kromatográfiás csúcsterülete.

$A_{\text{jelölt STD}}$ : az analóg izotópjelölt standard kromatográfiás csúcsterülete.

IDMS esetén minden mintához azonos mennyiségű ISTD van adagolva, így normál IDMS-t alkalmazva a kalibráció a célkomponens koncentrációjának függvényében ábrázolt izotóp arányokból adódik. Hátrányként jelentkezik, hogy több nagyságrendeket átfogó kalibrációnál (pl.:  $10^3$ ) az alacsonyabb kalibrációs pontoknál mért kisebb izotóp arányokat az ISTD torzíthatja, ha az alkalmazott ISTD kismennyiségben tartalmaz nem jelölt célkomponenst is. Ezenfelül, a célvegyülettel közel egy időben eluálódó nagyobb koncentrációjú izotópjelzett analóg standard a nem jelzett komponens jelét a jelentős koncentráció különbség miatt negatívan is befolyásolhatja az ionforrásban bekövetkező ionelnyomás miatt. Az utóbbi esetben az ISTD úgy viselkedik, mint egy jelentős mennyiségben jelenlévő mátrixalkotó, ami hasonló protonaffinitással bír, ha pozitív ionizációs módban mérünk,

mint a nem jelzett célkomponens [1]. Ezen problémák kiküszöbölhetőek a pontosan egyező dupla izotóphígítási tömegspektrometria (exact-matching double isotope dilution mass spectrometry, EMD-IDMS) alkalmazásával.

Napjainkban a mikotoxinok jelenléte a mezőgazdasági terményekben világszintű problémát jelent, ezért a mikotoxinok minőségi és mennyiségi meghatározására egyre növekvő igény mutatkozik. Az izotópjelzett komponenseket forgalmazó cégek így elsők között a stabil  $^{13}\text{C}$  jelzett mikotoxin standardok széleskörű elérhetőségét biztosították. Ezáltal lehetőség nyílt az EMD-IDMS teljes körű alkalmazására. Ugyanis az EMD-IDMS alkalmazhatóságának feltételei {(i) megfelelő készülék, (ii) jól meghatározott mérési módszer a célkomponens mérésére a tesztmintából, (iii) referencia anyag, (iv) vakminta, (v) stabil izotópjelzett STD} közül az izotópjelzett STD elérhetősége a legszűkebb keresztmetszett.

### Az EMD-IDMS módszer elve

A módszer alkalmazása során a tesztminta mennyiségi értékelését mátrixra illesztett egy-pontos kalibrációval végezzük. A kalibrációs pontban mért izotóp arány „pontosan egyezik” a tesztmintában mért izotóp aránnyal. A tesztmintát és a kalibrációs mintát egy szekvencián belül többször, felváltva injektálva a készülékbe, a műszeres mérésből adódó véletlenszerű hibák mértéke nagyban csökkenthető. Így nő a pontosság és redukálódik a mérési bizonytalanság [2, 3].

### Az EMD-IDMS alkalmazhatóságának feltételei

Az EMD-IDMS kapcsolt technikát igénylő kvantitatív mérési módszer, ami lehet gázkromatográfiával vagy folyadékromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS, LC-MS). Mivel mennyiségi meghatározáson van a hangsúly, a hármas kvadrupol alapú tömegspektrométer (MS/MS) alkalmazása lehet a legmegfelelőbb, ami a rendszer nagyfokú érzékenységre és szelektivitására vezethető vissza. A méréshez elengedhetetlenül szükséges a célkomponens adott mátrixra kidolgozott robusztus analitikai módszere, ami teljesíti a lefektetett minőségbiztosítási elvárásokat. Ezen felül lényeges, hogy ne csak adagolt (spike), hanem valódi szennyezést tartalmazó (incurred) mintákra is pontos eredményt adjon az eljárás. Ez utóbbi azért is bír nagy fontossággal, mert a gyakorlatban sokszor lényeges különbség lehet egy adagolt és egy valódi szennyezést tartalmazó minta között. Míg a valódi minták esetén a célkomponensek a sejtek közti pórusokban helyezkednek el, addig az adagolt minták a felületükön tartalmazzák a célvegyületeket. Ezért lényeges az adott mérési módszer hatékonyságának ellenőrzése és igazolása körvizsgálati ill. hitelesített referencia vagy kontroll minták analízisével. Alternatív



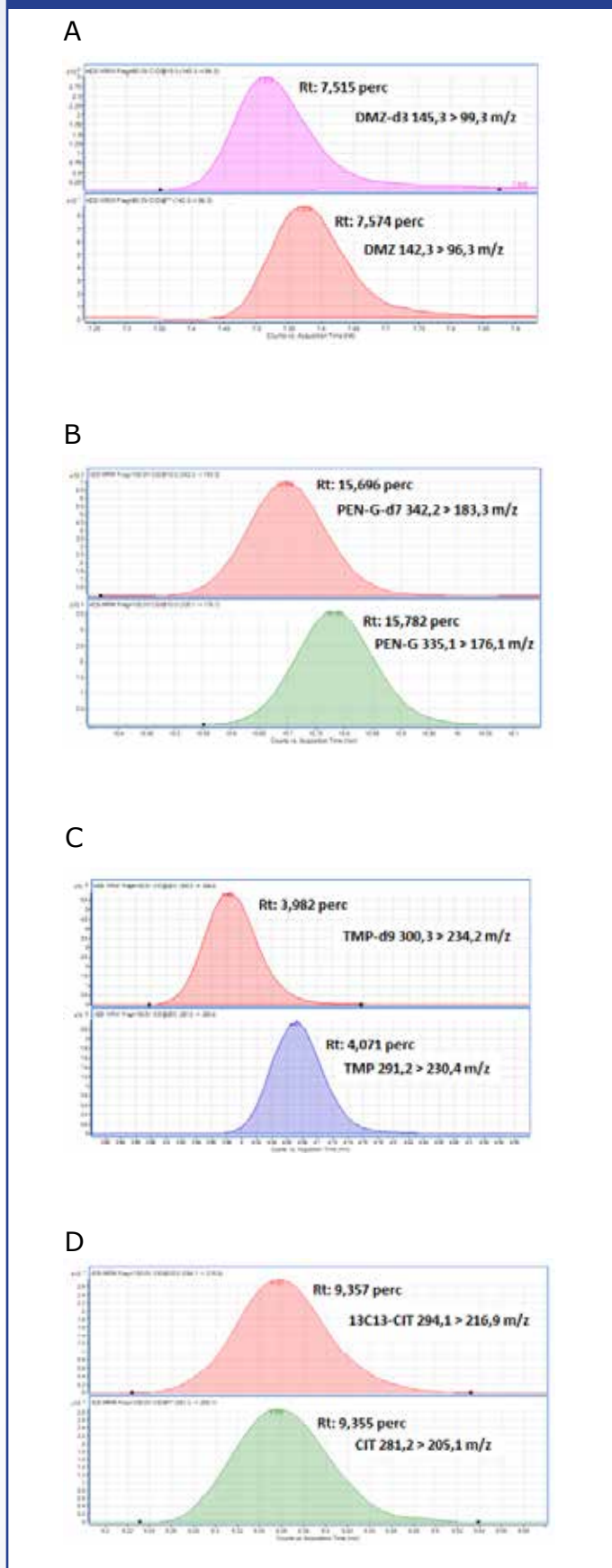
megoldásként szabvány módszerek is alkalmazhatók, melyek analitikai teljesítményjellemzői laborok közötti validáláson alapul, de napjainkban még csak kevés számú LC-MS és GC-MS szabvány módszer érhető el.

Egy adott komponens mennyiségi értékelése nem végezhető el referencia anyag nélkül. Ez esetben a referencia anyag a célkomponens megfelelő tisztaságú analitikai standardja, melynek bizonytalansága ismert, azaz dokumentált. Az analitikai standardok egy részének tisztasága nem mindig egyezik a tanúsítványokon szereplő értékkel, ezért célszerű a referencia anyag törzsoldatának pontos koncentrációját fotometrikusan ellenőrizni, illetve a standard oldat bizonytalanságát meghatározni.

Mivel az EMD-IDMS az izotóp arányok mérésén alapul, az izotópjelzett analóg, melynek jellege meghatározó, nélkülözhetetlen az eljárásból. Bár számuk egyre növekszik, még mind a mai napig csak kevés vegyület stabil izotópjelzett változata érhető el kereskedelmi forgalomban. A kört tovább szűkíti, hogy a deutérium ( $^2\text{H}$ ) jelzésű standardok nem preferáltak. A deutérium standardok polaritása a deutérium szám függvényében egyre jobban eltér a nem jelzett célvegyülettől (**1. ábra**). Ennek oka a C-H és C- $^2\text{H}$  kötés eltérő polaritására vezethető vissza. A polaritás különbség miatt a célkomponens retenciója nem fog milliszekundum pontossággal egybeesni az izotópjelzett analóggal és így az IDMS lényege részben elveszik, a célvegyületet és a hozzá tartozó jelölt standardot az ionforrásban nem ugyanaz a mátrixhatás éri minden pillanatban. A  $^{13}\text{C}$  jelzett vegyületeknél ez a probléma nem jelentkezik, így a  $^{13}\text{C}$  jelzett standardok a legmegfelelőbbek az IDMS-hez, viszont napjainkban csak korlátozott vegyület esetén érhetőek el.

Az **1. ábra** a célvegyület és annak izotópjelölt analógjának retenció időkülönbségét mutatja a deutériumszám függvényében. Az **1.A ábrán** a dimetridazole (DMZ) és a dimetridazole- $[\text{D}_3]$  (DMZ- $\text{d}_3$ ) MRM kromatogramjai láthatóak. A retenció idő különbség 0,059 perc a célkomponens ( $142,3 > 96,3 \text{ m/z}$ ) és az ISTD ( $145,3 > 99,3 \text{ m/z}$ ) között. Az **1.B ábrán** a penicillin G és a penicillin G- $[\text{D}_7]$  (Pen-G- $\text{d}_7$ ) MRM ionátmenetei láthatóak, a retenció idő különbség a jelöletlen ( $335,1 > 176,1 \text{ m/z}$ ) és jelölt ( $342,2 > 183,3 \text{ m/z}$ ) vegyület között 0,086 perc. Az **1.C ábrán** a trimetoprim (TMP) és a trimetoprim- $[\text{D}_9]$  (TMP- $\text{d}_9$ ) MRM kromatogramjai láthatóak. A retenció idő különbség 0,089 perc a célkomponens ( $291,2 > 230,4 \text{ m/z}$ ) és az ISTD ( $300,3 > 234,2 \text{ m/z}$ ) között. A példák jól demonstrálják, hogy a molekulába bevitt deutériumok számával nő a polaritásbeli különbség és így a retenció időbeni különbség is a célvegyület és az analóg ISTD között. Az alsó kromatogram (**1.D ábra**) a citrinin ( $281,2 > 205,1 \text{ m/z}$ ) és a  $^{13}\text{C}13$ -citrinin ( $294,1 > 216,9 \text{ m/z}$ ) ionátmeneteit mutatja. A célkomponens és  $^{13}\text{C}$  jelzett analógja milliszekundum pontosságra együtt eluálódik, a 120 milliszekundumbeli eltérés a retencióban az MS/MS detektorban beállított dwell time-mal egyezik meg.

1. ábra: A retenció idő különbségek változása az izotópjelzés függvényében.



### Az EMD-IDMS mérés kivitelezése

A „pontosan egyezés” akkor valósul meg, mikor a teszt-mintában mért izotóp arány ( $IR_{\text{teszt}}$ ) megegyezik a kalibrációs mintában mért izotóp aránnyal ( $IR_{\text{kalib}}$ ) [4]. Ezáltal

az izotóp arányok arányai ( $R'$ ), amit a **2. képlettel** számítunk, 1 lesz.

## 2. képlet

$$R' = IR_{\text{teszt}} / IR_{\text{kalib}}$$

ahol,

$R'$ : az izotóp arányok arányai.

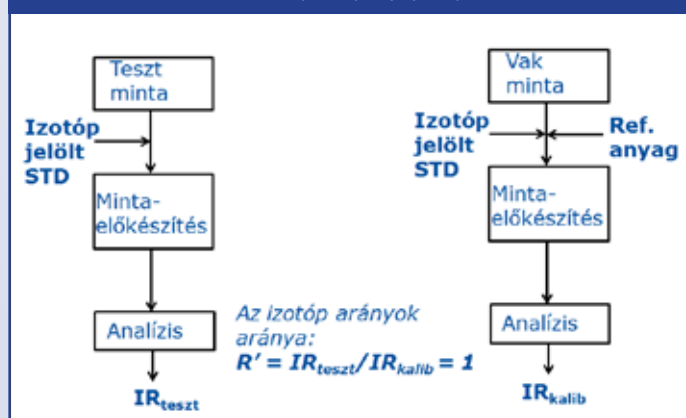
$IR_{\text{teszt}}$ : a tesztmintában mért izotóp arány.

$IR_{\text{kalib}}$ : a kalibrációs mintában mért izotóp arány.

A gyakorlatban ez azt jelent, hogy a kalibrációs ponthoz tartozó koncentráció megegyezik a tesztminta koncentrációjával. Az EMD-IDMS folyamatát a **2. ábra** szemlélteti: tesztmintát, ami a célkomponenst természetes eredetű szennyezésként tartalmazza, számolt mennyiségű izotópjelzett standarddal hígítjuk. A kalibrációs mintához egyező mennyiségű jelzett standardot adagolunk és számolt mennyiségű referencia anyagot adunk még hozzá. A két mintát (tesztminta és kalibrációs minta) az előkészítést követően műszeresen többször, felváltva injektáljuk a GC- vagy LC-MS/MS-be. A célkomponens és az izotópjelzett standard válaszjeleinek arányát (**1. képlet** alapján) számoljuk. Ha a származtatott izotóp arányok értéke megegyezik, akkor a „pontosan egyezés” esete áll fenn és az  $R'$  értéke 1 lesz.

Ehhez viszont ismernünk kell a tesztmintához és a kalibrációs mintához adagolandó izotópjelzett standard és a referencia anyag mennyiségét, melyek pontos értékét előzetes mérésekből kell meghatározni.

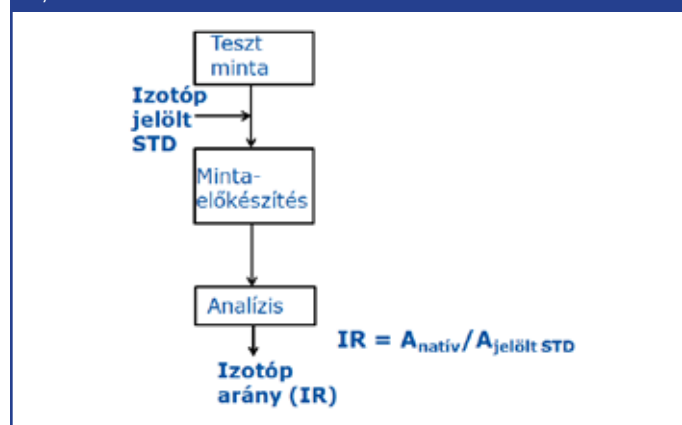
2. ábra: Az EMD-IDMS kivitelezése. Az izotóp arányok aránya ( $R'$ ) a tesztmintában és a kalibrációs mintában mért izotóp arányok ( $IR$ ) hányadosaként adódik.



Elsőként az izotópjelzett standard azon mennyiségét kell meghatározni, mellyel a tesztminta és a kalibrációs minta hígításra kerül majd (**3. ábra**). A célkomponens becsült koncentrációja a tesztmintában ismert (pl.: a homogenitás vizsgálatból vagy előzetes szűrőmérésből). Ennek a koncentrációnak a függvényében el kell dönteni,

hogy milyen  $IR$  értéket kívánunk beállítani a tesztmintában. Ideális esetben az izotóp arányt 1-re állítjuk, de magas szennyezettség esetén az  $IR$  értéke lehet akár 2; 5 vagy 10 is, mert az jelzett standard törzsoldatának koncentrációja hasonló vagy kisebb, mint a minta szennyezettsége (pl.: fumonizin toxinok esetén). A magasabb izotóp arány nem jelent problémát, mert mind a tesztmintában, mind a kalibrációs mintában ugyanaz az arány kerül beállításra. A tesztmintát a számolt mennyiségű izotópjelzett standarddal adagoljuk (normál IDMS) és az analízist követően meghatározzuk az izotóp arányt. Ha a számolt mennyiségű izotópjelzett standarddal nem sikerül a kívánt izotóp arányt beállítani, akkor addig kell a jelzett standard mennyiségét változtatni, míg a várt értéket el nem érjük (**3. ábra**). Ez minden esetben egy új minta, ill. minták előkészítésével és adagolásával jár.

3. ábra: Az izotópjelölt standard mennyiségének meghatározása. Az izotóp arány a jelöletlen (natív) célkomponens és a jelölt standard területének hányadosaként adódik.

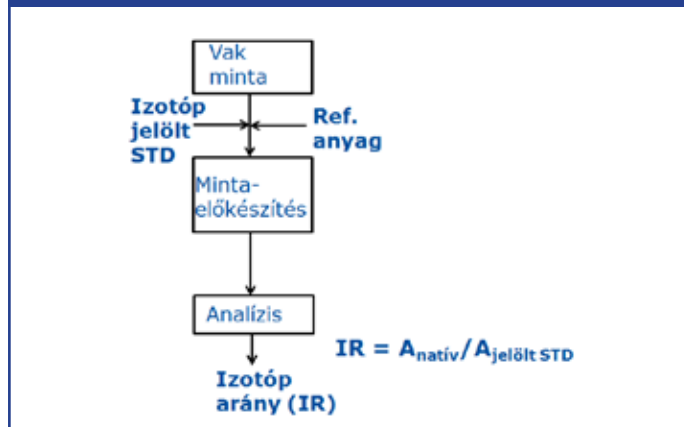


Miután meghatároztuk az izotóphígításhoz szükséges jelzett standarddal mennyiségét a cél izotóp arányhoz, akkor a kalibrációs mintához adagolandó referencia anyag mennyiségét kell kimérni úgy, hogy a kalibrációs mintában kapott  $IR$  megegyezzen a tesztmintában beállított értékkel (**4. ábra**). A mátrixra illesztett kalibrációhoz használandó vak mintát hígítjuk az előzőleg a tesztmintánál kimért mennyiségű izotópjelzett standarddal, majd számolt mennyiségű referencia anyaggal adagoljuk a vak mintát (fordított IDMS). Az előkészítést követően mérjük az  $IR$ -t. Ha nem a kívánt izotóp arányt kapjuk, akkor egy új kalibrációs mintának az előkészítése szükséges, amit úgy adagolunk referencia anyaggal, hogy az  $IR$  értéke a tesztmintánál beállított érték legyen. A méréseket a várt  $IR$  érték eléréséig folytatjuk.

A módszerben egyszerre van jelen a normál és a fordított IDMS (**3. és 4. ábra**), ezért nevezzük az eljárást dupla izotóphígítási módszernek [2]. Az izotópjelzett standarddal és a referencia anyag mennyiségének kimérését követően határozhatjuk meg a tesztminta pontos koncentrációját. Összesen két mintát kell előkészíteni: a tesztmintát és a kalibrációs mintát. Mindkettőt hígítjuk

a meghatározott mennyiségű izotópjelzett standard oldattal, valamint a kalibrációs mintához a számolt mennyiségű referencia anyag oldatát is adagoljuk. Az oldószert elpárolgatását követően előkészítjük a mintákat a műszeres analízishez (**2. ábra**). A mintákban mérjük az IR-eket és egyezés esetén a tesztminta pontos koncentrációja egy egyszerű képlettel számítható [2].

4. ábra: A referencia anyag mennyiségének meghatározása. Az izotóp arány a jelöletlen (natív) célkomponens és a jelölt standard területeinek hányadosaként adódik.



### A tesztminta koncentrációjának meghatározása

Az EMD-IDMS lényege, hogy a tesztmintát és a kalibrációs mintát többször, egymást felváltva injektáljuk a készülékbe. Ezáltal gyakorlatilag párokat képzünk az injektálások során: első, második, harmadik, stb. (**1. táblázat**). Minden injektálásból meghatározzuk az izotóp arányt a kalibrációs mintában és a tesztmintában, majd kiszámítjuk az egyes párokban az izotóp arányok arányait ( $R'$ ). Az izotóp arányok mérésének precizitásától függően a gyakorlatban 5 – 10 pár mérés szükséges. Az **1. táblázat** 6 párból mutatja a tesztminta koncentrációjának meghatározását. A mennyiségi értékeléshez szükséges izotóp arányok arányainak átlagát ( $R'_{\text{átlag}}$ ) a párokból adódó  $R'$ -ök átlagolásával kapjuk. A minta koncentrációját ezek után Breidbach és Ulberth képletével számolhatjuk (**3. képlet**) [2]:

### 3. képlet

$$w_{X,i} = w_Z \frac{m_{Y,i} m_{Zc} R'_{\text{átlag}}}{m_{X,i} m_{Yc}}$$

ahol,

$w_{X,i}$  = A célkomponens koncentrációja [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] az i-edik mintában.

$w_Z$  = A célkomponens koncentrációja [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] az referencia anyag oldatában.

$m_{Zc}$  = A kalibrációs mintához adott referencia anyag oldatának tömege [mg].

$m_{Yc}$  = A kalibrációs mintához adott jelzett standard oldatának tömege [mg].

$m_{Y,i}$  = Az i-edik mintához adott jelzett standard oldatának tömege [mg].

$m_{X,i}$  = Az i-edik minta tömege [mg].

$R'_{\text{átlag}}$  = Az izotóp arányok arányainak átlaga.

A jelzett standard oldatának koncentrációja nem szerepel a képletben, ismerete az által válik másodlagossá, hogy mind a tesztmintánál, mind a kalibrációs mintánál egyforma mennyiségű és koncentrációjú jelzett standardot tartalmazó oldatot adagolunk ugyanazon mennyiségű célkomponenshez. Így az izotópjelzett standard oldatában levő jelöletlen célkomponens mennyisége a mintákban mért IR-eket egyformán befolyásolja és az  $R'$  ezáltal független a jelzett standard oldatának célkomponens tartalmától.

1. táblázat: Az izotóp arányok arányainak ( $R'$ ) és átlagának ( $R'_{\text{átlag}}$ ) számítása.

Szekvencia	Injektálás	IR	$R' = \frac{\text{IR}_{\text{teszt}}}{\text{IR}_{\text{kalib}}}$	$R'_{\text{átlag}} = \frac{R'_1 + R'_2 + R'_3 + R'_4 + R'_5 + R'_6}{6}$	RSD%
Kalibrációs minta	1.	0,98765	$R'_1 = 0,98765/0,96587$	1,014229	2,2
Tesztminta		0,96587	$= 1,02255$		
Kalibrációs minta	2.	1,02354	$R'_2 = 1,02354/1,00214$		
Tesztminta		1,00214	$= 1,021354$		
Kalibrációs minta	3.	0,99658	$R'_3 = 0,99658/0,97856$		
Tesztminta		0,97856	$= 1,018415$		
Kalibrációs minta	4.	0,96877	$R'_4 = 0,96877/0,97001$		
Tesztminta		0,97001	$= 0,998722$		
Kalibrációs minta	5.	1,10214	$R'_5 = 1,10214/1,05554$		
Tesztminta		1,05554	$= 1,044148$		
Kalibrációs minta	6.	0,97895	$R'_6 = 0,97895/0,99874$		
Tesztminta		0,99874	$= 0,980185$		

### A mérési hiba számítása

A módszer mérési bizonytalanságát a **3. képletben** szereplő tényezők méréséből adódó hibák adják.

A mennyiségi értékeléshez szükséges 6 paraméter közül 4 tömegmérés, amit ha analitikai mérlegen végzünk, a tömegeket többször megmérve, akkor a tömegmérésből adódó hiba nagyságrendekkel kisebbnek adódik, mint a másik két tényező (referencia anyag oldata és az  $R'_{\text{átlag}}$ ) bizonytalansága. Míg a referencia anyag bizonytalansága adott, addig az  $R'_{\text{átlag}}$  hibája az izotóp arányok precízebb mérésével csökkenthető. Az  $R'_{\text{átlag}}$  a párokból adódó  $R'$

átlagaként számolható (**1. táblázat**). Fontos, hogy az  $R'$  értékek szórása is meghatározásra kerüljön. A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy egy mérés akkor megfelelő, ha az  $R'$  értékekből számolt relatív szórás értéke nem haladja meg a 3%-ot.

Minden tényező, ami növeli a jel/zaj arányt, egyben növeli az izotóp arányok precizitását. Azaz minél nagyobb a jel, annál stabilabb és jobban reprodukálható. A jelintenzitás növelését több módon is elérhetjük. Például, ha nem hígítjuk túlságosan meg a mintát és így a célkomponens koncentrációja a tesztminta injektált oldatában nem lesz túl kicsi. Napjainkban egyre gyakoribb az ún. „dilute and shoot” módszer alkalmazása a célvegyületek meghatározására, ami a készülékek folyamatosan növekvő érzékenységére vezethető vissza. Az eljárás során a minta extrakcióját követően az extraktumot hígítjuk (dilute) és a mintatisztítási lépést (clean-up) elhagyva injektáljuk (shoot) a mintát a készülékbe. Ilyenkor célszerű a mintát nem túlzottan meghígítani; viszont az extrakciónál figyelembe kell venni, hogy az extrakciós oldószer / minta arány ne legyen túl kicsi, mert az negatívan befolyásolja az extrakció hatásfokát. Ellenben, ha a hígítással csökkenteni tudjuk a célvegyületet érő mátrixhatást (ionelnyomást) az ionforrásban, akkor jelentős jelintenzitás növekedést érhetünk el. Redukálhatjuk az ionelnyomás mértékét szelektív kromatográfiai elválasztással, esetleg több dimenziós (ortogonális) elválasztással is [2]. Megfelelő mintatisztítási lépést alkalmazva a mátrixból származó komponensek száma/koncentrációja szintén redukálható, ami ugyancsak jelintenzitás növekedéséhez vezethet, mivel csökken a célkomponensekkel interferáló mátrixalkotók koelúciójának valószínűsége. Az alacsony dwell time (akár 20 ms) alkalmazása ugyan csökkenti a jel/zaj arányt, viszont a jel reprodukálását növeli és integrálhatóságát javítja azáltal, hogy több mintavételi pont fogja reprezentálni a kromatográfiai csúcst. Minden további mérés technikai eszköz, amely az IR-ek mérésének precizitását növeli, az az EMD-IDMS mérési bizonytalanságát csökkenti. A mérési bizonytalanságot Breidbach és Ulberth szerint az **4. képlettel** számíthatjuk [2].

#### 4. képlet

$$u_c(w_{x,i}) = w_{x,i} \times \sqrt{\left(\frac{u(w_z)}{w_z}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{y,i})}{m_{y,i}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{z,c})}{m_{z,c}}\right)^2 + \left(\frac{u(R'_{\text{átlag}})}{R'_{\text{átlag}}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{x,i})}{m_{x,i}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{y,c})}{m_{y,c}}\right)^2}$$

#### A módszer alkalmazása

Az EMD-IDMS egy kiváló mérés technikai eljárás körvizsgálati minták referencia értékeinek meghatározására, ha a célvegyület stabil izotópjelzett analógja elérhető. Az Európai Unió Mikotoxin Referencia Laboratóriuma (EURL for Mycotoxins, Geel, Belgium) által szervezett körvizsgálatokban a referencia értékek ezzel a módszerrel kerülnek meghatározásra [4-6]. A 2015-ös körvizsgálat

során természetes eredetű szennyezést tartalmazó vörös rizsben kellett citrinin tartalmat mérni két szinten (alacsony/magas) [6]. A referencia érték meghatározásához egy napon hat párhuzamos mintát kell mérni és a mérések átlaga adja a hozzárendelt értéket.

A magas citrinin tartalmú mintánál az izotóp arányok 11-re voltak beállítva. Az izotóp arányok mérését követően az  $R'$ -ök számíthatók és az  $R'$ -ök átlagaként az  $R'_{\text{átlag}}$ . Az  $R'_{\text{átlag}}$  értéke a magas szennyezetségű minta esetén 1,02695 volt és relatív szórása 2,19%, tehát kisebb, mint 3%. Az első minta koncentrációja a magas koncentráció szintű minták közül  $1114 \pm 10 \mu\text{g/kg}$ -nak adódott. A hat párhuzamos minta átlagából számított referencia érték a magas citrinin tartalmú körvizsgálati mintára  $1142 \pm 23 \mu\text{g/kg}$  [6]. A módszer mérési bizonytalansága tehát 2%.

Az alacsony citrinin tartalmú körvizsgálati minta a meghatározási határ környékén ( $\text{LOQ} \sim 10 \mu\text{g/kg}$ ) tartalmazta a citrinint. Az  $R'_{\text{átlag}}$  értéke az első alacsony szennyezetségű minta esetén 0,99943-nak adódott, relatív szórása 3,21%-nak (tehát nagyobb, mint 3%), ami az alacsony koncentrációval, a meghatározási határ körüli méréssel magyarázható. A jel/zaj értéke alig volt nagyobb 10-nél, így a jelek reprodukálhatósága alacsonyabb volt, mint a magas citrinin tartalmú minta esetén. Az alacsony citrinin tartalmú minta esetén az első mintára számolt koncentráció  $12,7 \pm 0,56 \mu\text{g/kg}$  volt, a hat minta átlaga pedig  $13,8 \pm 1,06 \mu\text{g/kg}$  [6]. A mérési bizonytalanság így 7,7% az alacsony citrinin tartalmú mintára. A példa jól mutatja, hogy az EMD-IDMS hibája a jel/zaj viszonytól nagymértékben függ. A magas citrinin tartalmú minta két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban tartalmazta a citrinint és a mérési bizonytalanság negyed akkora volt, mint az alacsony tartalmú mintában. Az LOQ szinten mért 7,7%-os mérési bizonytalanság ugyanakkor az alacsony koncentráció szinthez képest nem számít jelentősnek.

#### Az EMD-IDMS előnyei

Míg az EMD-IDMS nem sorolandó a rutin analitikai eljárások közé, addig a normál IDMS a minden napi analitikai gyakorlat tárgyát képezi. Ennek ellenére az EMD-IDMS használata előnyösebbnek bizonyulhat, ha az alkalmazásához szükséges feltételek adottak. Az egy-pontos kalibrációból kifolyólag az alacsonyabb és magasabb kalibrációs szintek pontossága nem befolyásolja a tesztminta értékelését. Továbbá, a tesztmintában mért izotóp arány egyezik a kalibrációs mintában mérttel, ezáltal az izotópjelölt standard oldatának koncentrációja csak másodlagos. Míg normál IDMS esetén a kalibrációs pontok és a tesztminta általában kétszer kerül injektálásra, addig az EMD-IDMS esetében ez az érték akár 5 – 10 között is változhat, ami a műszeres mérésből adódó véletlen hiba mértékét csökkenti.

Mikotoxin analízis során elég gyakori, hogy egy adott minta előkészítése több lépésből tevődik össze, melyek során az egyik lépésben hígítjuk, a következőben pedig dúsítjuk a mintát. Normál IDMS esetén ezek a lépések gyakran számítási hibákhoz vezethetnek, mivel maga a kalibráció mátrixot nem tartalmazó tiszta oldószerben készül. Az EMD-IDMS eljárást alkalmazva viszont nem kell se a hígításokat se a dúsításokat figyelembe venni a minta értékelése során, mert a tesztminta és a kalibrációs minta is ugyanazon az előkészítésen megy keresztül.

#### Referenciák

1. Kostianen, R., Kauppila TJ. (2009): Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1216. p. 685-699.
2. Breidbach, A., Ulberth, F. (2015): 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.* 407. p. 3159-3167
3. Mackay, L.G., Taylor, C.P., Myers R.B., Hearn, R., King, B. (2003): High accuracy analysis by isotope dilution

mass spectrometry using an iterative exact matching technique. *Accred. Qual. Assur.* 8(5). p. 191-194.

4. Kroeger-Negoita, K., Bouten, K., Breidbach, A., Bratinova, S., Stroka, J. (2013): Report on the 2013 Proficiency Test of the European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, for the Network of National Reference Laboratories - Determination of Patulin in Apple Juice. [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC85347/13.11.25\\_pt%202013%20pat\\_report\\_draft\\_revjs\\_revbdc\\_revkk\\_revfu\\_revjs\\_revkk.pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC85347/13.11.25_pt%202013%20pat_report_draft_revjs_revbdc_revkk_revfu_revjs_revkk.pdf)

5. Kujawski, M., Mischke, C., Stroka, J. (2014): Report on the 2014 Proficiency Test of the European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, for the Network of National Reference Laboratories - Determination of Aflatoxin B1 in Copra (Coconut powder). [https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/JRC91908\\_PT-2014.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/JRC91908_PT-2014.pdf)

6. Tölgyesi, Á., Stroka, J. (2016): Report on the 2015 Proficiency Test of the European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, for the Network of National Reference Laboratories - Determination of Citrinin in Red Yeast Rice. JRC technical report. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/report-2015-proficiency-test-european-union-reference-laboratory-mycotoxins-network-national>

**EuroFoodChem XIX Conference**  
Central Role of Food Chemistry within the Food Science  
October 4-6, 2017 - Budapest, Hungary

**Idén ősszel, október 4-6 között kerül megrendezésre a XIX. EuroFoodChem konferencia, mely egy kétévente megrendezésre kerülő nagy hagyományokkal rendelkező európai konferenciasorozat része, mely az élelmiszertudomány és élelmiszerkémia alábbi újdonságaira összpontosít:**

- Élelmiszerösszetevők kémiai kölcsönhatásai
- Tárolás során bekövetkező kémiai változások
  - Bioaktív összetevők és mikrotápanyagok
    - Aromák, színezékek és adalékok
  - Funkcionális élelmiszerek és összetevők
    - Új élelmiszerek és nano-összetevők
  - Élelmiszer hamisítás és nyomon követés
  - Új élelmiszerkémiai és analitikai módszerek

**Várjuk szeretettel jelentkezését akár hallgatóként, akár előadóként!**

**Részletek és jelentkezés: <http://www.eurofoodchem2017.mke.org.hu/>**

**Meghosszabbított előadás bejelentési határidő!!!**

# Harc az eluensgőzök ellen

Keresztfalvi Alex  
Polinvent Kft.

A folyadékkromatográfias gyakorlatban különösen fontos az egyes modulok (automata mintaadagoló, kromatográfias oszlop(ok), detektor(ok)) közötti csatlakozások szivárgásmentes, tökéletesen zárt állapotának biztosítása, valamint annak folyamatos figyelése. Érdemes azonban ezt a figyelmet kiterjeszteni az eluenses üvegekre, illetve a detektorokat elhagyó, főlegessé vált hulladék oldószerrelegyre is. Ezek az illékony, többnyire alacsony forrásponttal rendelkező jellemzően szerves oldószerek könnyedén elpárolognak, kipárolognak a tároló/gyűjtő edényeinkből, ha azok nincsenek megfelelően lezárva. Így a laborlevegő is egyre szennyezettebbé válik. Ezt a problémát hivatottak orvosolni az első és második ábrán látható biztonsági kupakok.

1. ábra: biztonsági kupakkal zárt eluenstartó



Az **1. ábra** egy eluenses üveget záró biztonsági kupakot mutat. A piros kupakba épített fehér teflon tömbnek két nyílása van: az egyikben távozik a mozgófázis, a másikra pedig egy olyan záró szelep van csatlakoztatva, ami a levegőt beengedi és szálló por tartalmát megszüri, viszont az eluens gőzöket az üvegben tartja.

A **2. ábrán** lévő biztonsági kupak a HPLC legutolsó, nyitott pontját, az edényzetet zárja.

2. ábra: biztonsági kupak az eluenshulladék gyűjtő üvegen



Ennek felépítése hasonló az eluenstároló edénynél használt biztonsági kupakhoz, a különbséggel, hogy itt az egyik csatlakozáson keresztül befolyik a hulladék, a másik, kimeneti oldalon pedig az eluensgőzök kötődnek meg egy kifejezetten erre a célra kialakított adszorbens töltettel rendelkező szűrőn. A gyártó mérési adatai alapján a **2. ábrán** látható szűrőt, (illetve az **1. ábrán** látható záró szelepet is) javasolt megfelelő időközönként cserélni (eluens szűrőt 6 havonta, ezt a típusú szűrőt mely 25-30g adszorbent tartalmaz 3 havonta).

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a szűrő a három hónap

alatt valójában mennyi anyagot képes megkötni, ezért a felszerelést követően hetente egyszer, négy tizedes pontosságú analitikai mérleggel megmértük a szűrő tömegét. A mérési eredményeket a **3. ábrán** látható diagram ábrázolja. A folyadékkromatográfias mérések során főleg műanyagipari monomereket és polimereket vizsgáltunk méretkizárásos kromatográfiával, ennek megfelelően a hulladék jelentős részét HPLC minőségű tetrahidrofurán (későbbiekben THF) alkotta. A kevés maradék részt szintén HPLC minőségű acetonitril és ultranagy tisztaságú víz tette ki, ez idő alatt volt, de kis számú fordított fázisú mérés is, illetve kis mennyiségben izopropil-alkohol és diklórmetán, az automata mintaadagoló és a detektorok tisztításából adódóan.

A vizsgált időszak alatt mindössze csak egyszer kellett hulladékgyűjtő üveget cserélni, összesen körülbelül öt liternyi hulladék eluens keletkezett. Az egymást követő két üveget természetesen ugyanaz a szűrő zárta. A laboratórium éjszakai és nappali hőmérséklete 21 - 24°C között ingadozott.

A szűrő tiszta, kiindulási tömege a hulladékgyűjtő üveghez csatlakoztatáskor, azaz 2016. október 13-án 81,8372 g volt. Ekkor az üveg már tartalmazott kis mennyiségű (~100-200ml) THF hulladékot. A HPLC működése közben percenként egy milliliter hulladék oldószer került a gyűjtőbe. Ugyan az ünnepek előtt megtelt az első üveg, és lecseréltük a másodikra, de gondoskodtunk róla, hogy abba is kerüljön hulladék, így a szűrő szilveszter napján is „dolgozhatott”.

Már az első pár hétben kirajzolódni látszott a telítési görbe, máris 1-2 százalékkal növekedett az össztömeg. A három hónap leteltkor jól láthatóan a görbe telítésbe hajlott és 2017. január 13-án a végeredmény 85,8347 grammra, ami közel négy gramm megkötött eluensgőzt jelent.

A három hónap tesztidőszak után kezdtünk bele nagyobb oldószerigényű mérésekbe, de ennek ellenére tovább hagytuk a szűrőt a hulladék üvegeken, mert kíváncsiak voltunk az esetleges további terhelhetőségére. Az igénybevétel itt már intenzívebb lett ugyanis növeltük a méretkizárásos kromatográfias módszerünk szelektivitását azzal, hogy több eltérő molekulatömeg-tartományú kolonnát (összesen hármat) kötöttünk sorba a kolonnatermosztátban, így az áramlási sebességet is megnövelhettük a korábbi 1 ml/percről 2 ml/percre és több nap is volt mikor nyolc órán keresztül működött a HPLC. Ez pár nap alatt eredményezett annyi hulladékot, mint az előző három hónap összesen. Két hét alatt a tömegnövekedés további egy százalékot ugrott, vagyis körülbelül még 1 gramm hulladék THF-gőzt kötött meg a szűrő. Mivel ezek szerint még mindig nem értük el a telítési görbe végét, így a tömegméréseket tovább folytatjuk és örülünk, hogy nem a szervezetünknek kell felvenni a harcot, ezekkel az egészségre ártalmas hulladék oldószergőzökkel.

3. ábra: az alkalmazott eluensgőz-záró szűrő használat közbeni tömegnövekedése három hónap alatt



# TARTSON LÉPÉST

## AZ ÉLELMISZER-BIZTONSÁG EGYRE SOKASODÓ KIHÍVÁSAIVAL!

**Rendelje meg, és olvassa rendszeresen  
az Élelmiszervizsgálati Közleményeket!**



- Kizárólag tudományos cikkekkel, kétnyelvű formában és megújult külsővel jelentkezik negyedévente a 60 éves múltra visszatekintő folyóirat
- Előfizetőink a [www.eviko.hu](http://www.eviko.hu) oldalról is letölthetik a kéziratokat teljes terjedelmükben

**Csatlakozzon Ön is az olvasótáborunkhoz, amelynek tagjai vizsgálólaboratóriumok, élelmiszer-előállítók, -forgalmazók, hatósági szervezetek, kutatóintézetek, egyetemek munkatársai.**



[www.eviko.hu](http://www.eviko.hu)

