

Doktori értekezés Ph.D. fokozat elnyerésére



NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK ÉS AZOK BOMLÁSTERMÉKEINEK VIZSGÁLATI  
LEHETŐSÉGEI ÉLELMISZEREKBE HPLC-(ESI+)MS TECHNIKÁKKAL

**POLGÁR LÁSZLÓ**

Doktori (Ph.D.) értekezése

**Témavezető:**

Dr. Fodor Péter

**Készült:**

Budapesti Corvinus Egyetem

Alkalmazott Kémia Tanszék



*„Ismerjük be, hogy csupán részei vagyunk e nagy műnek,  
s bár fontos a szerepünk, csak a mi kis körünket látjuk,  
de egészében fel nem foghatjuk.  
Az nem von le a mi értéinkből,  
hogy a mi véges agyunk elvész a végtelenben.”*

*- Kabay János*



# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1.</b>	<b>BEVEZETÉS.....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>2.</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>- 11 -</b>
2.1.	A NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK „TÖRTÉNELME” .....	- 11 -
2.2.	NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK CSOPORTOSÍTÁSA .....	- 14 -
2.3.	A NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK HASZNÁLATÁNAK SZABÁLYOZÁSA.....	- 15 -
2.4.	NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEI .....	- 17 -
2.4.1.	<i>A peszticidanalitika fejlődése .....</i>	<i>- 17 -</i>
2.4.2.	<i>Minta-előkészítési technikák .....</i>	<i>- 18 -</i>
2.4.2.1.	Extrakciós/tisztítási technikák és vegyszerek .....	- 19 -
2.4.2.2.	A multikomponenses minta-előkészítések fejlődése .....	- 28 -
2.4.2.3.	Minta-előkészítési technikák magas zsírtartalmú minták vizsgálatára .....	- 33 -
2.4.3.	<i>Műszeres analízis.....</i>	<i>- 35 -</i>
2.4.3.1.	Elválasztástechnika.....	- 35 -
2.4.3.2.	Ionizációs technikák .....	- 37 -
2.4.3.3.	Tömeganalizátorok.....	- 39 -
2.4.3.4.	Adatbázis alapú kereső módszerek .....	- 44 -
2.4.4.	<i>Mérési módszerek validálása, minőségbiztosítása .....</i>	<i>- 46 -</i>
2.4.4.1.	Analitikai módszerek minőségbiztosításának szabályozása .....	- 46 -
2.4.4.2.	Mátrixhatások .....	- 47 -
2.4.4.3.	Mennyiségi meghatározás lehetőségei .....	- 48 -
2.5.	BOMLÁSTERMÉKEK JELENTŐSÉGE ÉS VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEI.....	- 52 -
2.5.1.	<i>A nem célkomponenses módszerek jelentősége .....</i>	<i>- 52 -</i>
2.5.2.	<i>Növényvédő szerek metabolizációja/degradációja.....</i>	<i>- 54 -</i>
2.5.3.	<i>Bomlástermék-kereső módszerek .....</i>	<i>- 55 -</i>
<b>3.</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>- 59 -</b>
<b>4.</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>- 61 -</b>
4.1.	FELHASZNÁLT VEGYSZEREK .....	- 61 -
4.2.	MŰSZEREK .....	- 61 -
4.2.1.	<i>HPLC-MS/MS (QqQ).....</i>	<i>- 61 -</i>
4.2.2.	<i>HPLC-TOFMS.....</i>	<i>- 62 -</i>
<b>5.</b>	<b>EREDMÉNYEK .....</b>	<b>- 65 -</b>
5.1.	MULTIKOMPONENSES MÓDSZER FEJLESZTÉSE NÖVÉNYI OLAJOKBÓL TÖRTÉNŐ NÖVÉNYVÉDŐ SZER VIZSGÁLATOKRA HPLC-MS/MS TECHNIKÁVAL.....	- 65 -
5.1.1.	<i>Bevezetés.....</i>	<i>- 65 -</i>
5.1.2.	<i>Kísérleti körülmények .....</i>	<i>- 66 -</i>
5.1.2.1.	Mérendő komponensek és vizsgált mátrixok kiválasztása.....	- 66 -
5.1.2.2.	LC-MS/MS analízis .....	- 66 -
5.1.2.3.	MS/MS paraméterek optimalálása .....	- 67 -
5.1.2.4.	Minta-előkészítés .....	- 68 -
5.1.2.5.	Mátrixhatás vizsgálata.....	- 68 -
5.1.2.6.	Visszanyerési hatások vizsgálata .....	- 70 -

5.1.3.	<i>Eredmények és értékelésük</i> .....	- 71 -
5.1.3.1.	MS/MS paraméterek optimalása .....	- 71 -
5.1.3.2.	A kromatográfiai elválasztás optimalása .....	- 73 -
5.1.3.3.	Linearitás és mátrixhatások.....	- 75 -
5.1.3.4.	Kimutatási határok vizsgálata (LOD).....	- 77 -
5.1.3.5.	Visszanyerési hatások.....	- 79 -
5.1.4.	<i>Konklúziók</i> .....	- 82 -
5.2.	<b>NAGYFELBONTÁSÚ TÖMEGSPEKTROMÉTER (LC-TOFMS) ALKALMAZÁSA NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK MARADVÁNYAINAK KIMUTATÁSÁRA PONTOS TÖMEG ADATBÁZIS SEGÍTSÉGÉVEL</b> .....	- 84 -
5.2.1.	<i>Bevezetés</i> .....	- 84 -
5.2.2.	<i>Kísérleti körülmények</i> .....	- 85 -
5.2.2.1.	Mérési paraméterek.....	- 85 -
5.2.2.2.	Minta-előkészítés .....	- 87 -
5.2.2.3.	Komponensek azonosításának menete (screening módszer) .....	- 88 -
5.2.2.4.	Az automatizált keresés szűrési feltételeinek kiválasztása .....	- 93 -
5.2.3.	<i>Eredmények és értékelésük</i> .....	- 94 -
5.2.3.1.	A pontos tömeg adatbázis szerkesztése.....	- 94 -
5.2.3.2.	Kereső módszer alkalmazása valódi mintákon.....	- 95 -
5.2.4.	<i>Konklúziók</i> .....	- 99 -
5.3.	<b>NAGYFELBONTÁSÚ TÖMEGSPEKTROMÉTER (LC-TOFMS) ALKALMAZÁSA NEM CÉLKOMPONENSES SZERMARADVÁNY MÉRÉSEKRE; ISMERETLEN NÖVÉNYVÉDŐ SZER BOMLÁSTERMÉKEK AZONOSÍTÁSA</b> .....	- 100 -
5.3.1.	<i>Bevezetés</i> .....	- 100 -
5.3.2.	<i>Kísérleti körülmények</i> .....	- 101 -
5.3.2.1.	Mérési paraméterek.....	- 101 -
5.3.2.2.	Minta-előkészítés .....	- 101 -
5.3.2.3.	Bomlástermékek keresése („fragmentáció-degradáció” technika).....	- 101 -
5.3.3.	<i>Eredmények és értékelésük</i> .....	- 104 -
5.3.3.1.	Propamocarb bomlástermékek fejes saláta ( <i>Lactuca sativa</i> ) mintában .....	- 104 -
5.3.3.2.	Iprodione bomlástermékek körte ( <i>Pyrus communis</i> ) mintában.....	- 107 -
5.3.3.3.	Fenhexamid bomlástermékek fejes saláta mintában.....	- 111 -
5.3.3.4.	A glikozid-származékok jelentősége .....	- 114 -
5.3.3.5.	A kereső módszer előnyei és korlátai .....	- 116 -
5.3.4.	<i>Konklúziók</i> .....	- 120 -
6.	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b> .....	- 123 -
7.	<b>ÖSSZEFOGLALÓ</b> .....	- 125 -
8.	<b>SUMMARY</b> .....	- 127 -
9.	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	- 129 -
10.	<b>MELLÉKLETEK</b> .....	- 140 -

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	Légköri nyomású kémiai ionizáció
API	Atmospheric pressure ionization	Légköri nyomású ionizáció
APPI	Atmospheric pressure photo ionization	Légköri nyomású foto-ionizáció
ASE	Accelerated solvent extraction	Gyorsított oldószer extrakció
CE	Collision energy	Ütközési energia
CEP	Collision cell entrance potential	Ütközési cella belépő feszültség
CID	Collision induced dissociation	Ütközéstől bekövetkező disszociáció
c-SPE	Cartridge SPE	Töltött oszlopos SPE
CXP	Collision cell exit potential	Ütközési cella kilépő feszültség
DBE	Double bond equivalent	Kettős kötés ekvivalens
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane	Dikloro-difenil-triklóretán
DP	Declustering potential	Klasztermentesítő feszültség
DPX	Disposable pipette extraction	Eldobható pipetta extrakció
d-SPE	Dispersive SPE	Diszperzív SPE
ECD	Electron capture detection	Elektron befogásos detektálás
EI	Electron ionization	Elektron ionizáció
EIC/XIC	Extracted ion chromatogram	Extrahált ion kromatogram
EP	Entrance potential	Belépő feszültség
EPI	Enhanced product ion	Érzékeny termékion pásztázás
ESI	Electrospray ionization	Elektrospray ionizáció
FHX	Fenhexamid	Fenhexamid
FID	Flame ionization detection	Lángionizációs detektálás
FPD	Flame photometric detection	Lángfotometriás detektálás
GC	Gas chromatography	Gázkromatográfia
GCB	Graphitized carbon black	Aktív szén; tisztító szorbens
GLY	Glycoside	Glikozid
GPC	Gel permeation chromatography	Gélpermeációs kromatográfia
HPLC	High performance liquid chromatography	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
HS-SPME	Headspace solid phase microextraction	Gőztér szilárd fázisú mikroextrakció
IDA	Information dependent analysis	Információfüggő analízis
IPR	Iprodione	Iprodion
LC		ld. HPLC
LLE	Liquid-liquid extraction	Folyadék-folyadék extrakció
LLP	Liquid-liquid partitioning	Folyadék-folyadék megoszlás
LOD	Limit of detection	Kimutatási határ

LPME	Liquid phase microextraction	Folyadék fázisú mikroextrakció
MAE	Microwave assisted extraction	Mikrohullám segített extrakció
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization	Mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció
MRL	Maximum residue level	Maximális szermaradvány koncentráció
MRM	Multiple reaction monitoring	Többszörös átmenet pásztázás
MS	Mass spectrometry	Tömegspektrometria
MS/MS; MS <sup>n</sup>	Tandem mass mpectrometry	Tandem tömegspektrometria
MSPD	Matrix solid phase dispersion	Mátrix szilárd fázisú diszperzió
MW	Molecular weight	Molekulatömeg
NPD	Nitrogen phosphorus detection	Nitrogén-foszfor detektálás
PRO	Propamocarb	Propamokarb
PSA	Primary secondary amine	Primer szekunder amin; tisztító szorbens
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Poli-tetrafluoroetilén (teflon)
QqQ	Triple quadrupole (MS)	Hármas kvadrupól (MS)
QTOF	Quadrupole-Time-of-flight	Kvadrupól-repülési idő hibrid tandem-MS
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	Gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos (minta-előkészítés)
RSD	Relative standard deviation	Relatív szórás
SAX	Strong anion exchange	Erős anioncserélő
SCX	Strong cation exchange	Erős kationcserélő
SFE	Supercritical fluid extraction	Szuperkritikus fluid extrakció
SLE	Solid-liquid extraction	Szilárd-folyadék extrakció
SPE	Solid phase extraction	Szilárd fázisú extrakció
SPME	Solid phase microextraction	Szilárd fázisú mikroextrakció
TOF-MS	Time-of-flight MS	Repülési idő MS
TPP	Triphenyl phosphate	Trifenil-foszfát
UV	Ultraviolet	Ibolyán túli sugárzás
WCX	Weak cation exchange	Gyenge kationcserélő



# 1. BEVEZETÉS

Az emberiség már évezredek óta harcot vív a különböző természeti elemekkel, és ebben a harcban csak az az egyed tudott fennmaradni, mely képes volt alkalmazkodni a folyton változó életkörülményekhez, vagy képes volt azokat számára kedvezőbb irányba megváltoztatni. Kezdetben főként az alkalmazkodás volt a jellemző, majd az ember, felismervén képességét a környezet befolyásolására, egyre inkább kezdte saját maga irányítani sorsát. Így tért át például a vadászatról az állattartásra vagy a gyűjtögető életmódról a földművelésre.

Ez a változás egyben azt is jelentette, hogy az embernek addig ismeretlen, új kihívásokkal kellett szembenéznie, mint például a megművelt földet vagy a terményeket veszélyeztető időjárási elemekkel és kártevőkkel. Az előbbivel szemben még a mai napig sem tudunk hatásosan védekezni, ám – köszönhetően a 20. században végbement tudományos fejlődésnek – a kártevők okozta károktól már hatékonyan meg tudjuk védeni a mezőgazdasági terményeket. Ennek a védelemnek egyik fontos alapköve a vegyszeres növényvédelem, melynek születése kb. a II. világháború időszakára tehető. Ekkor fedezte fel Paul Hermann Müller a DDT rovarölő hatását (1939), mely felfedezést annak hatalmas mennyiségben történő felhasználása követte. Köszönhetően nagy hatékonyságának – melyet különösen a malária elleni harcban alkalmaztak sikerrel – a DDT nagy népszerűségnek örvendett, Paul Hermann Müller 1948-ban Nobel-díjat kapott felfedezéséért.

Ebben a korszakban a vegyszerek használatának egyedüli célja a kártevők elpusztítása volt, figyelmen kívül hagyva minden egyéb szempontot, mint például a szer nem célszervezetekre gyakorolt hatását, lebomlási idejét, bioakkumulációs képességét stb. Az első ellenvélemények egyike Rachel Carson íróé volt, aki *Néma tavasz* c. nagysikerű könyvével (1962) felhívta a figyelmet a növényvédő szerek által hordozott hatalmas veszélyekre. Többek között e nagy horderejű mű hatására alakult meg számos környezetvédelmi szervezet, illetve kezdődött el a növényvédő szerek használatának törvényi szabályozása, mely végül a DDT betiltásához vezetett (elsőként hazánkban, 1968-ban).

A DDT-t számos újabb növényvédő szer követte, ma már kb. 1000 engedélyezett szer található meg a piacon, melyek forgalmazása és használata azonban szigorú szabályozás alatt áll. Ezen szabályozás egyik fontos mozzanata a növényvédő szerek maradványainak élelmiszerláncban történő kimutatása, az ún. szermaradvány analízis.

Ahhoz, hogy a szermaradványok koncentrációját meghatározhassuk, az analitikusoknak szelektív és – figyelembe véve a nagyszámú engedélyezett szert – sok komponens mérésére alkalmas (ún. multikomponenses) módszereket kell kidolgozniuk. Erre a célra manapság a gáz-, illetve folyadékkromatográfiás elválasztáson alapuló (GC; LC), tömegspektrometriás (MS) detektálást alkalmazó kapcsolt analitikai technikákat alkalmaznak leggyakrabban.

PhD munkám során igyekeztem a fenti céloknak megfelelő, a gyakorlatban jól alkalmazható LC-MS mérési módszereket kidolgozni, validálni és (gyakorlati alkalmazhatóságukat bizonyítandó) valódi mintákon alkalmazni.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK „TÖRTÉNELME”

A mezőgazdasági termelés egyik óhatatlan és szükséges velejárója a terményeket veszélyeztető kártevők elleni védekezés, melyre az emberiség már több ezer évvel ezelőtt is rá volt kényszerítve. Már i.e. 2000 környékén, az ókori Mezopotámia területén élő sumérok is alkalmaztak elemi ként a kártevők irtására, mely kis túlzással élve nevezhető a vegyszeres növényvédelmi technikák hajnalának. Bizonyos értelemben véve a kártevőirtó és riasztó hatással bíró növények alkalmazását is tekinthetjük a növényvédelem első eszközeinek, mely növények ilyen célú felhasználásáról már a hinduk által szentként tisztelt szövegekben, a Védákban is találhatunk említést [Ranga Rao et al. 2007]. Ilyen hatású növény például a fokhagyma, a gyömbér, az agávé, a barátcserje, melyek egytől egyik növényvédelmi szempontból értékes tulajdonsággal rendelkeznek [Secoy et al. 1983].

A középkorban, a 15. századtól kezdve toxikus fémek (ólom, arzén, higany) szervetlen sóit használták ilyen célra, melyek közül számos szert még a 20. században is alkalmaztak. Ilyen például a Magyarországon „Schweinfurti zöld” néven ismert és főként színezőanyagként használt réz-acetát triarzenit, vagy a legnagyobb mennyiségben felhasznált ólomalapú szer, az ólom-arzenát [Peryea 1998]. Talán mondani sem szükséges, hogy az ilyen szerek nagy mennyiségben történő alkalmazása milyen hatással volt a környezetre, egyes termőterületeket teljesen termőképtelenné téve.

A 17. században felismerték a dohánylevél extraktum rovarölő hatását, mely hatást csak később tudták a dohánylevél egyik alkaloidjával, a nikotinnal összekötni. A nikotin-szulfát a mai napig engedélyezett rovarölő szer, melyet növényi eredete révén biogazdaságok is alkalmazhatnak [Yamamoto et al. 1999].

A 19. században fedezték fel a szintén növényi eredetű hatóanyagot, a piretrint, melyet *Chrysanthemum* fajok megszáritott és elporított virágjából sikerült azonosítani [Soderlund et al. 2002]. Az utóbbi két vegyület (nikotin és piretrin) később a növényvédő szer kémia kutatásainak is alapot adott, e két szer analógjainak szintetizálásával születtek meg ugyanis az ún. neonikotinoid és a piretroid növényvédő szerek csoportjai. Szintén a 19. sz.-ban alkalmazták először sikerrel a rézgálicot (bordói lé) peronoszpóra ellen [Johnson 1935].

Az 1950-es évekig a már említett arzénalapú szereket használták a legnagyobb mennyiségben, azonban a DDT rovarölő hatásának felfedezése (1939) következtében egyre inkább a klórozott szénhidrogének nyertek teret a vegyszeres növényvédelemben. A felfedezést követő 20-30 évben hatalmas mennyiségben alkalmazták a DDT szert, továbbá alternatívájaként megjelentek a hozzá hasonló

szerkezetű (és hasonlóképpen veszélyes) szerek is (pl. lindane, endrin, dieldrin, aldrin, chlordane, endosulfan stb.). Ezen szerek többségének használata manapság már a legtöbb országban tiltott, nem-szelektív hatásmechanizmusuknak, karcinogén, illetve perzisztens mivoltuknak köszönhetően [Rosner et al. 2013].

Figyelembe véve a kifejlesztett új hatóanyagok számát, illetve a felhasznált növényvédő szerek mennyiségét, erre az időre tehető a klasszikus értelemben vett vegyszeres növényvédelem születése. Egyre több hatóanyagot szintetizáltak (legnagyobb mennyiségben rovarölő szereket), és ebben az időben jelentek meg az első gyomirtó szerek is, mint például a diklórfenoxi-ecetsav (ismertebb nevén a 2,4-D) [Quastel J 1950], illetve a talajvizek szennyezése miatt sokat bírált triazinok csoportja [Gunther et al. 1970].

A korábban alkalmazott szerek fentebb említett veszélyei következtében a hatóanyag-kutatók igyekeztek hatékony, ám gyorsabban lebomló, nem perzisztens szereket fejleszteni. E kutatás eredményeként születettek meg a szerves foszforsav észter és karbamát rovarölő, a glyphosate gyomirtó, illetve a különböző gombaölő hatású szerek. A két említett rovarölő szer csoport egy a központi idegrendszerben az ingerület-átvitelben szerepet játszó enzimekre, az acetil-kolin észterázra hat, különböző módon. A szerves foszforsav észterek jellemzője a korábbi szerekhez képest a gyorsabb degradáció, így ilyen módon nem jelentenek a környezetre hosszú távú veszélyt, azonban kiemelkedően magas akut toxicitással rendelkeznek, mely rendkívül veszélyessé teszi az ilyen szerekkel való munkát és a velük kezelt növények fogyasztását. A csoport legismertebb és már a legtöbb országban betiltott képviselője a parathion, melyen kívül ismertebbek a malathion, dichlorvos, mevinphos, monocrotophos, dimethoate stb. hatóanyagok. A második, szintén gyakran alkalmazott rovarölő szer csoport a karbamátok csoportja, mely a szerves foszforsav észterekhez hasonlóan hat, ám mérsékeltebb akut toxicitással jellemezhetőek. Ismertebb képviselői a carbaryl, oxamyl, aldicarb, methomyl stb. hatóanyagok.

A 1970-es években, a már említett piretrin szer analógjainak szintetizálásával megszületett a szintetikus piretroidok csoportja, melyek különösen hatékony, környezetbarát és szelektív hatásmechanizmusuk révén hívták fel magukra a figyelmet. A piretroidok nagy hátránya azonban, hogy ellenük gyorsan alakul ki rezisztencia a célfajokban, mely nagyban korlátozza alkalmazásuk sikerét. A csoport legismertebb képviselői a deltamethrin, cypermethrin, resmethrin és lambda-cyhalothrin hatóanyagok.

Szintén az 1970-es években merült fel a gondolata olyan szelektív rovarölő szerek kifejlesztésének, melyek a rovarok szaporodási és vedlési folyamataiba avatkoznak be, melynek köszönhetően nagyon kedvező humán-toxicológiai profillal rendelkeznek. Az ilyen szereket nevezik rovarnövekedés-szabályozó szereknek, s ebbe a csoportba tartoznak a juvenil hormon hatású szerek (pl. pyriproxyfen,

methoprene, fenoxycarb stb.), a vedlési hormon agonista szerek (pl. tebufenozide, halofenozid stb.), illetve a kitinszintézist gátló benzoil-fenil urea csoport tagjai (pl. diflubenzuron, novaluron, teflubenzuron stb.). Köszönhetően magas fokú szelektivitásuknak és kedvező toxicitás profiljuknak, ezeket a szereket már a mai modern integrált növényvédelemben is sikerrel alkalmazzák, igaz, főként kiegészítő kezelésként [Dhadialla et al. 2010].

Az 1980-as években fedezték fel a neonikotinoidok csoportját, melyeket a mai napig és egyre nagyobb mennyiségben alkalmaznak azok mérsékelt melegvérűekre gyakorolt toxicitása és kedvező környezetbeli viselkedésük miatt. Legismertebb képviselője a csoport elsőként felfedezett tagja, az imidacloprid, mely manapság a legnagyobb mennyiségben alkalmazott rovarölő szer [Jeschke et al. 2010]. Néhány éve azonban kételyek merültek fel a neonikotinoid szerek egyéb, nem célszervezetekre gyakorolt hatásával kapcsolatban. Ezek közül kiemelendő a méhekre gyakorolt káros hatásuk, mely nagy valószínűséggel a méhek immunrendszerének gyengítése révén azok patogén vírusokkal szembeni érzékenységét növelő, szinergista hatásként magyarázható [Bacandritsos et al. 2010].

Ahogy ebből a rövid és a teljesség igényét nélkülöző áttekintésből is látható, a klasszikus értelemben vett vegyszeres növényvédelem születése óta eltelt kb. 80 évben számos növényvédő szer csoportot fedeztek fel, melyek némelyike akár 30-40 képviselővel is „büszkélkedhet”. Ma kb. 1000 engedélyezett szer kapható kereskedelmi forgalomban, melynek köszönhetően szermaradványok egy nagyon széles palettája lelhető fel a különböző növényi eredetű élelmiszereinkben. A következő fejezetekben ezen szerek csoportosítását, alkalmazásuk törvényi szabályozását, a szermaradványok mérési lehetőségeit, illetve bomlástermékeik jelentőségét mutatom be részletesebben.

## 2.2. NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK CSOPORTOSÍTÁSA

Az előző fejezetben említett több száz növényvédő szert különböző szempontok alapján tudjuk csoportosítani. Ilyen szempont lehet a szerek biokémiai hatásmechanizmusa, kémiai szerkezete, a kijuttatás módja vagy a szerrel megcélzott élőlények csoportja.

Értelemszerűen a különböző csoportok között számos átfedést figyelhetünk meg, egy hatóanyag több csoportba is besorolható (például a thiabendazole hatóanyagot főként gombaölő szerként alkalmazzák, viszont parazitaölő hatással is bír.) Szoros összefüggés áll fenn továbbá a szerek kémiai szerkezete és biokémiai hatásmechanizmusa között is, mely egyben a hatásosan kezelhető célszervezetek csoportját is meghatározza. (Így például a szerves foszforsav észterek és karbamát szerek általában acetil-kolin észteráz gátló szerek stb.). A kémia szerkezet azonban nem minden esetben határozza meg egyértelműen a szer hatásmechanizmusát, melyre példaként említhető a fenoxycarb hatóanyag, mely annak ellenére, hogy egy karbamát szer, juvenil hormon hatással bír.

Nem céлом, hogy dolgozatomban az összes szempontú csoportosítást bemutassam, viszont fontosnak tartom, hogy a legegyszerűbb, célszervezet alapján történő besorolás csoportjai közül a legfontosabbakat említés szintjén felsoroljam:

- gyomirtó szerek (herbicidek)
- rovarölő (inszekticid), illetve növekedést gátló szerek
- gombaölő szerek (fungicidek)

---

- algaölő szerek (algcidek)
- atkaölő szerek (akaricidek)
- rágcsálóíró szerek (rodenticidek)
- madárirtó és riasztó szerek (avicidek)
- baktériumölő szerek (bakteriocidek)

(A szaggatott vonal felett a három leggyakrabban alkalmazott csoport látható; az összes felhasznált növényvédő szer összesen kb. 90%-a [Grube et al. 2011]).

## 2.3. A NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK HASZNÁLATÁNAK SZABÁLYOZÁSA

Magyarország 2004-es EU csatlakozását megelőzően az emberi fogyasztásra szánt élelmiszerek vegyi szennyezőinek (köztük a növényvédő szerek) megengedhető maximális értékét az addig hatályban lévő 17/1999. (VI.16.) EüM rendelet [Jogszabály\_1] szabályozta. Az EU csatlakozást követően ezt a rendeletet felváltotta az EU-ban már 1991 óta hatályban lévő, a növényvédő szerek forgalomba hozatalát szabályozó 91/414/EGK irányelv [Jogszabály\_2].

Az EU tagállamok között a növényvédő szerek szabályozása 2008-ig nem volt egységes, EU-szinten harmonizált. 1976 óta több mint 45000 uniós határértéket határoztak meg 245 növényvédő szerre. A számos nem szabályozott növényvédő szer/mintatípus kombinációra a tagállamok, a fogyasztók védelme érdekében, egyedi, nemzeti határértékeket szabhattak meg. A nagyszámú és egyes esetekben tagállamonként eltérő határértékek egységesítését szolgálta a 2008. szeptember 1-től hatályba lépett, teljesen harmonizált határértékrendszer bevezetése, mely már minden tagállamra kiterjedő, egységesített határértéket szab meg. A 91/414/EGK irányelv számos módosítása közül kiemelendő a 396/2005/EK rendelet [Jogszabály\_3], mely mellékletei (számos információ mellett) tartalmazzák az említett harmonizált határértékeket, különböző termékcsoportokra bontva. A rendelet mellékletei (Annex) az alábbi információkat tartalmazzák:

- **Annex I:** azon termékek listája, melyekre a meghatározott határértékek (*maximum residue level*; MRL) vonatkoznak. Több mint 315 mintatípust tartalmaz, főként zöldségeket, gyümölcsöket, de megtalálhatók benne a gabonafélék, fűszerek és állati eredetű termékek is. 2013 márciusában az Annex I-et felváltotta a 212/2013/EU rendelet [Jogszabály\_4]; a 396/2005/EK rendeletet ennek megfelelően módosították.
- **Annex II:** a 2008. szeptember 1.-je előtt is létező MRL értékek listája, illetve azok konszolidációja.
- **Annex III:** az ún. átmeneti vagy ideiglenes MRL értékek listája, mely a korábban csak nemzeti szinten meghatározott határértékeket tartalmazza.
- **Annex IV:** azon növényvédő szerek listája, melyekre (az általuk jelentett csekély veszélyre való tekintettel) nem határoztak meg MRL értéket.

Az Annex II, III, illetve IV-ben felsorolt MRL értékek megtalálhatóak a 149/2008/EK és a 839/2008/EK rendeletekben [Jogszabály\_5, Jogszabály\_6].

- **Annex V:** a lista azon növényvédő szereket fogja tartalmazni, melyekre az alapértelmezett 0,01 mg/kg határértéktől eltérő MRL érték fog vonatkozni. A listát még nem publikálták.
- **Annex VI:** a lista a feldolgozott élelmiszerek vizsgálata során alkalmazandó átszámítási faktorokat fogja tartalmazni. A listát még nem publikálták.
- **Annex VII:** a lista azon füstölőszerként alkalmazott szerek listáját tartalmazza, melyek esetében a tagállamok a korábbi melléletekben szereplő határértékeknél magasabb MRL értéket állapíthatnak meg. Az ebben a mellékletben szereplő információkat a 260/2008/EK rendelet [Jogszabály\_7] tartalmazza.

Amennyiben egy növényvédő szer egyik fent említett mellékletben sem szerepel, abban az esetben rá az alapértelmezett 0,01 mg/kg MRL érték vonatkozik (ld. 396/2005/EK rendelet, 18. cikk 1b).

2009 októberében a 91/414/EGK tanácsi irányelvet hatályon kívül helyezte az azóta hatályban lévő 1107/2009/EK rendelet [Jogszabály\_8].



## 2.4. NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEI

### 2.4.1. A peszticidanalitika fejlődése

A növényvédő szer vizsgálatok születése az 1960-as évekre tehető, arra az időre, amikor az első ellenvélemények és aggályok merültek fel a DDT, illetve rokonvegyületeinek használatával kapcsolatban. Az azóta eltelt kb. fél évszázadban hatalmas változások mentek végbe a tudomány minden területén, így a növényvédelem és az analitikai kémia területén is jelentős fejlődést figyelhetünk meg. Természetes módon a két tudományág fejlődése között szoros párhuzamot vehetünk észre. A növényvédelmi kémia fejlődésével egyre több hatóanyag került piacra, amellyel a növényvédő szer analitikának lépést kellett tartania. A '60-as, '70-es években mindössze néhány tíz hatóanyag volt kereskedelmi forgalomban, melynek köszönhetően a szermaradvány mérések során elegendő volt kisszámú komponens mérésére alkalmas módszerek fejlesztése. A módszerekkel mérhető komponensek számának természetesen elsősorban nem a forgalomban lévő szerek száma, hanem annál inkább a (mai szemmel) fejletlenebb technikai és műszeres háttér szabott határokat. Ahogy viszont egyre nagyobb számban jelentek meg az újabb hatóanyagok, egyre sürgetőbb igényné vált a sok komponens mérésére alkalmas módszerek fejlesztése. Ehhez szükség volt a növényvédelmi kémia fejlődését követő, a számítástechnika és automatizálás területén tett előrelépésekre. Mivel azonban ez utóbbi fejlődés lassabban következett be, a növényvédő szer analitika kezdeti szakaszát az akkor rendelkezésre álló technikai eszközök és mérési módszerek szűk korlátainak feszegetése jellemezte. Ezen korlátok közül a legfontosabb az akkor alkalmazott detektálási technikák kevésbé szelektív mivoltában keresendő. Elválasztási technikaként gázkromatográfiát alkalmaztak, melyet nitrogén-foszfor (NPD), elektronbefogós (ECD), lángfotometriás (FPD) vagy lángionizációs (FID) detektálás követett. A felsorolt detektorok hátránya, hogy a velük mérhető komponensek köre erősen korlátozott, csak meghatározott kémiai tulajdonsággal rendelkező szerek csoportja mérhető velük (pl. nitrogén-, foszfor- vagy halogéntartalmú szerek stb.). A kevésbé szelektív detektálás mellett a minták nem megfelelő tisztítása is gondot jelentett, melynek köszönhetően jelentős mátrixhatásokkal kellett számolni az ilyen típusú méréseknél.

Az említett két problémakör leküzdése közül az első (detektorok) az analitikai kémiához szorosan kapcsolódó műszergyártás és -fejlesztés feladata volt, míg a minta-előkészítés kérdését az analitikusoknak kellett megoldaniuk. A mérőműszerek területén történt fejlődést a későbbiekben bővebben tárgyalom, elsőként azonban a növényvédő szerek analízisének talán legkritikusabb pontjáról, a minta-előkészítésről beszélek bővebben.

## 2.4.2. Minta-előkészítési technikák

Minta-előkészítésnek nevezzük azon lépések sorozatát, melyek eredményeként a laboratóriumba érkezett mintából a mérendő komponenseket mérhetővé tesszük, azokat egy a mérőműszerrel kompatibilis oldószerbe juttatjuk, és melynek végén a mérőműszernek megfelelő tisztaságú és koncentrációjú mintaextraktumot kapunk. Ebből a leírásából kitűnik, hogy a minta-előkészítésnek több célja van:

- **Extrakció:** első és legfontosabb, hogy a mérendő komponenseket extraháljuk a mintából, azok az oldószer fázisába kerüljenek. Ennél a lépésnél ideális eredményt az jelentene, ha az összes vizsgálandó komponens extrahálna, míg az összes többi egyéb, mátrixból származó molekula hátramaradna. Ilyen ideális eset azonban szinte soha nem fordul elő, mindig számolnunk kell egyrészt a minta extraktumba a mérendő komponensekkel ko-extrahálódó mátrixkomponensekkel, továbbá azzal, hogy a kinyerés legtöbb esetben nem teljes, ráadásul annak határfoka minden komponensre nézve más és más.
- **Tisztítás (clean-up):** Az extrakciós lépést követően az extraktum mátrixkomponensektől való megtisztítása több szempontból is fontos. Egyrészt az ilyen komponensek, a detektálási technikától függően, kisebb-nagyobb mértékben befolyásolhatják a vizsgálandó komponensek analízisét. Másrészt pedig, a nagyobb anyagmennyiségek injektálása hátrányosan befolyásolhatja a műszerek állapotát, azok gyakoribb karbantartását téve szükségessé (pl. GC esetében az ún. *liner*, LC esetén az előtét kolonna gyakori cseréje, MS ionforrás gyakoribb tisztítása stb.). Érdemes kiemelni viszont, hogy egy ilyen tisztítási lépés során nem feltétlenül csak a zavaró komponenseket távolíthatjuk el a mintából, hanem velük együtt a mérni kívánt növényvédő szerek maradványait is. Fontos tehát, hogy ismerjük az alkalmazott tisztítási lépések mérendő komponensekre gyakorolt hatását (ld. később, az 5.1. fejezetben).
- **Koncentráció beállítása:** A minta-előkészítés harmadik funkciója a vizsgálandó komponensek koncentrációjának a beállítása. Mivel minden mérőműszer meghatározott koncentrációtartományban működik megbízhatóan, illetve lineáris mérési tartományuk is meghatározott keretek közé esik, a bejuttatott minta koncentrációjának is ebbe a tartományba kell esnie. Az extraktum koncentrációját alapvetően a vizsgált mintamennyiség és a felhasznált oldószer aránya, illetve a hígítási lépések szabják meg, azonban, ha a koncentráció valamilyen okból nem megfelelő, változtatása két irányba történhet: (i) hígítás, melyre egyrészt akkor lehet szükség, ha a mintában túl nagy koncentrációban van jelen a mérendő komponens, mely így már meghaladja a mérés technika lineáris szakaszának maximum értékét.

Hígítást alkalmazhatunk továbbá abban az esetben is, amennyiben a mátrix-komponensektől származó zavaró hatás megnehezíti vagy lehetetlenné teszi egy komponens detektálását. Ebben az esetben a mintahígítás hatására csökken a zavaró komponensek mennyisége (természetesen a mérendő is), mely kedvező hatással lehet a jel/zaj viszonyra. (ii) Másik eshetőség, amikor a mérendő komponens túl kis mennyiségben található meg a mintában. Ebben az esetben lehetőségünk van a vizsgált komponens koncentrációját megnövelni, betöményíteni. Erre abban az esetben lehet szükség, ha a vegyület koncentrációja a mintában a kimutatási (vagy mennyiségi meghatározási) határ közeli vagy az alatti, továbbá egy nagyobb koncentráció elérésével megerősíthetünk egy feltételezett találatot (pl. amennyiben a kezdeti minta koncentrációja túl alacsony egy fragmentációs tandem-MS vizsgálathoz stb.).

- **Származékképzés:** Bizonyos esetekben, a vizsgálandó komponens fiziko-kémiai tulajdonságai miatt az önmagában rosszul, vagy egyáltalán nem vizsgálható egy adott mérés technikával. Ebben az esetben a minta-előkészítés részeként azt átalakíthatjuk a mérőműszer által mérhető formára (pl. GC mérések során a poláros, nem illékony komponenseket származékképző reagensekkel apolárosabb, így illékonyabb, tehát jobban mérhető komponensekké alakíthatjuk).

#### **2.4.2.1. Extrakciós/tisztítási technikák és vegyszerek**

Az alábbiakban a növényvédő szermaradvány vizsgálatok során leggyakrabban alkalmazott analitikai technikákat és az általánosan használt vegyszereket, reagenseket mutatom be.

##### **2.4.2.1.1. Analitikai technikák**

###### ***Szilárd-folyadék extrakció (SLE)***

Szilárd vagy félszilárd (pl. gyümölcs-püré) minták esetében a kellőképpen homogenizált mintát egy a mérni kívánt komponensek extrahálására alkalmas szerves oldószerrel elkeverik, mely során a növényvédő szerek az oldószer fázisába kerülnek. A kinyerési hatások javítható az extrakciós lépés ismétlésével, illetve a kinyerhető komponensek köre szélesíthető különböző oldószer használatával. A legismertebb SLE-n alapuló technika a QuEChERS módszer (ld. később).

### ***Folyadék-folyadék extrakció (LLE)***

Folyékony minták esetében alkalmazható eljárás, mely során egy a mintával nem elegyedő oldószert használnak. A módszer alapja, hogy a mérendő komponensek, a két fázis közötti megoszlási hányadosuknak megfelelően, az oldószer fázisába vándorolnak. Ehhez szükséges, hogy a megfelelő oldószert vagy oldószerkeletet alkalmazzuk, mely polaritása révén alkalmas a vizsgálandó szermaradványok extrahálására. A komponensek oldószerbe történő vándorlásának megkönnyítése érdekében különböző szerves sókat adhatunk a mintához. A módszer nagy hátrányként említendő meg jelentős oldószerigénye, a gyakori mátrix-komponensek okozta interferenciák és egyes esetekben a nehezen kezelhető emulziók képződése.

A tradicionális LLE egyes hátrányait kiküszöbölendő a '90-es évek végén kifejlesztették az ún. folyadék fázisú mikro-extrakciót (LPME), melyhez már nagyon kis mennyiségű szerves oldószer is elegendő (egyres változataiban elegendő egyetlen csepp [Jeannot et al. 1996]), továbbá automatizálható és on-line összeköthető kromatográfiás (főként GC) technikával [Lambropoulou et al. 2007].

### ***Szilárd fázisú extrakció (SPE)***

Szilárd fázisú extrakció során a megkötni kívánt komponensek valamilyen szilárd szorbenshez kötődnek. A továbbiakban az SPE két fajtáját ismertetem, melyeket előszeretettel alkalmaznak növényvédő szer vizsgálatok során.

(i) diszprezív-SPE (d-SPE): ebben a formájában főként mintatisztítási céllal alkalmazzák az SPE-t, mely során különböző tisztító szorbenseket diszpergálnak (innen az elnevezés) a mintába, melyek megkötik a zavaró mátrix-komponenseket. A leggyakrabban alkalmazott szorbens a primer szekunder amin (PSA), melyet általános tisztító szorbensként számos minta-előkészítési technikában (így a legismertebb QuEChERS módszerben is) alkalmaznak.

(ii) cartridge-SPE (c-SPE): ezen módozatában az SPE szorbent (általában) egy fecskendőbe töltik, melyre a töltet kondicionálását követően rátöltik a mintát. A kondicionálást követően a mintát olyan oldószerral mossák, mely nem eluálja a mérendő komponenseket, viszont lemossa az egyéb, zavaró komponenseket, majd a mosást követően megfelelő oldószerral eluálják a célkomponenseket. A technika előnyeként említendő meg, hogy egyrészt mintatisztításként is funkcionál, mivel eltávolítja a mintából az interferenciát okozó egyéb komponenseket. Másrészt pedig alkalmazásával növelhetjük a mérendő komponens koncentrációját az extraktumban, mivel a szilárd fázison megkötött anyagokat kis mennyiségű oldószerral is le tudjuk mosni. A leggyakrabban alkalmazott c-SPE szorbensek az alkil-lánccal (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) vagy poláros csoporttal (-CN, -NH<sub>2</sub>) módosított szilikabázisú szerek, a Florosil, az aktív szén és a porózus polimerek (pl. sztírol-divinilbenzol).

Érdemes rövid említést tenni egy szintén SPE-alapú technikáról, az „eldobható pipetta extrakció”-ról (*disposable pipette extraction*; DPX). A DPX technika lényege, hogy az SPE szorbens egy pipettahegy végében található, a célkomponensek azon kötődnek meg. A módszer előnye egyszerűségében és gyorsaságában rejlik, melyhez különösen kevés szerves oldószerre van szükség. Guan és mtsi. sikeresen alkalmazták a technikát klórozott szénhidrogén és szerves foszforsav észter rovarölő, továbbá gombaölő szerek vizsgálatára különböző zöldség- és gyümölcsmintákban. A legtöbb komponensre jó kinyerési hatásokokat értek el, mely alól azonban kivételt képeztek a polárosabb szerek (pl. acephate, methamidophos) [Guan et al. 2010].

### ***Mátrix szilárd fázisú diszperzió (MSPD)***

Ezt a technikát alkalmazva kis mennyiségű mintát (kb. 1 g) dörzsmozsárban alaposan összekevernek hasonló mennyiségű (néhány gramm) szorbenssel, mely leggyakrabban valamilyen módosított felületű szilika (C<sub>18</sub>, aminopropil stb.) szorbens. A módszer elve, hogy a szilika alapnak köszönhetően a dörzsölés során a szorbens szétroncsolja a mintát, a célkomponensek pedig adszorbeálódnak a felületmódosító láncokhoz [Barker 2000]. Az extrakciót követően a homogén mintát egy miniatűr oszlopra töltik, majd megfelelő oldószerrel (általában acetonitril vagy metanol) eluálják a komponenseket. Tisztább minták elérése érdekében az MSPD technikát gyakran kombinálják SPE tisztítással, mely során az MSPD extrakciót követően a mintát egy c-SPE tisztításnak vetik alá valamely az extrahálótól eltérő tulajdonságú szorbenst alkalmazva (pl. nagy zsírtartalmú minták esetében Florosil) [Ferrer et al. 2005]. A módszer előnye, hogy alkalmazása egyszerű, nem időigényes, kis mennyiségű mintát igényel (ám pontosan emiatt felértékelődik a megfelelő mintavétel és homogenizálás kérdése), továbbá kevés szerves oldószer szükséges hozzá. Hátrányként említendő meg, hogy a technika automatizálása nem megoldható.

### ***Folyadék-folyadék megoszlás (LLP)***

Bár az LLP szoros értelemben véve nem egy önálló, sokkal inkább kiegészítő minta-előkészítési technika, említése, annak széleskörű alkalmazása miatt, mindenképpen szükséges. Az LLP eljárás lényege, hogy a mérendő komponensek két folyadék fázis között oszlanak meg, mely során, jól megválasztott extrakciós paraméterek mellett, azok az oldószer fázisába vándorolnak. Az LLP egyik, már említett változata, amikor egymással nem elegyedő folyadékok alkotják a két fázis (pl. LLE esetében).

Ettől eltérő megoldás, amikor a két fázist egymással egyébként elegyedő folyadékok alkotják, melyek fázisokra való szétválását a mintához adagolt valamilyen segédanyaggal (szervetlen sók, fruktóz stb.) érik el. Egyes esetekben (például a minta magas cukortartalma miatt) ez a szétválás segédanyagok hozzáadása nélkül is megtörténik. A legismertebb LLP-n alapuló minta-előkészítési technika a QuEChERS.

#### **2.4.2.1.2. Oldószerek**

A manapság leggyakrabban alkalmazott minta-előkészítési technikák ún. multikomponenses eljárások, melyek számos hatóanyag extrahálására alkalmasak. Mivel az ilyen módszereknél cél a lehető legtöbb komponens kinyerése, a megfelelő oldószer kiválasztása kritikus pont lehet a módszerfejlesztés során. A megfelelő oldószer kiválasztásakor különböző szempontokat kell szem előtt tartanunk:

- az alkalmazott extraháló szernek a vizsgálandó komponensek széles palettáját kell lefednie, ráadásul úgy, hogy azok fiziko-kémiai tulajdonságai nagyban különbözhetnek
- jól elválaszthatónak kell lennie a minta víztartalmától
- lehetőleg olcsónak és környezetbarátnak kell lennie
- alacsony toxicitással rendelkezzen
- kompatibilisnek kell lennie valamely gyakran alkalmazott elválasztástechnikával (GC, LC, gélpermeációs kromatográfia stb.)
- megfelelő tisztaságban álljon rendelkezésre
- ne zavarja a detektálást (pl. acetonitril az NPD-t, metilén-klorid az ECD-t stb.)

A felsorolt kritériumokat figyelembe véve az acetonitril, a metanol, az etil-acetát és az aceton oldószerek azok, melyek leginkább számításba jöhetnek. Ezek közül a metanolnak a legkisebb a gyakorlati alkalmazhatósága, mely annak köszönhető, hogy gyengébb oldószer lévén egyes hatóanyagcsoportokat kisebb hatásfokkal tud extrahálni. Ettől függetlenül több publikációban található metanolos extrakción alapuló minta-előkészítést [Granby et al. 2004, Klein et al. 2003], továbbá lehetséges extraháló oldószer alternatívaként összehasonlító tanulmányokban is szerepel, ám általában nem vele érik a legjobb eredményeket [Mol et al. 2008].

Az acetonitril és az aceton vízzel jól elegyedő oldószerek, melynek következtében az extrakció során egy fázis alakul ki. Ez alól kivételt képeznek a nagy szénhidrát tartalmú minták, melyek esetében az acetonitril külön fázist alkot. Az acetonitril előnyeként említendő meg, hogy szervetlen sók hozzáadásával könnyen elválasztható a vizes fázistól, míg ugyanez aceton esetében apoláros

ko-szolvens (pl. hexán vagy petróleum éter) hozzáadását igényli. Az acetonitril további előnye, hogy egyéb apolárosabb szolvensekkel jól elváló fázisokat ad, mely szükség esetén további mintatisztítási lépés beiktatását teszi lehetővé [Argauer et al. 1997]. Szintén előnyös tulajdonsága, hogy különböző vízelvonó hatású sók (pl. nátrium-szulfát, magnézium szulfát) segítségével a szerves fázis könnyen vízteleníthető [Schenck et al. 2002a]. Végül, de szintén előnyként említhető meg a GC és LC technikákkal való kompatibilitása is.

Az etil-acetát szintén GC kompatibilis oldószer, azonban alkalmazhatósága LC elválasztást alkalmazva erősen korlátozott. Mivel fordított fázisú folyadékkromatográfia esetén etil-acetátos mintát nem célszerű injektálni, a minta-előkészítés végén mindenképpen szükséges egy oldószerváltási lépés beiktatása, időigényesebbé és bonyolultabbá téve ezzel az eljárást. Ezzel magyarázható, hogy az etil-acetátot főként GC detektálási technikát alkalmazva használják oldószerként [Agüera et al. 2000, Fenoll et al. 2007], ahol a kevésbé poláros jelleg és az elpárologtatás során tapasztalható kisebb térfogat-növekedés kifejezett előnyt jelent. Alkalmazása egyes esetekben kifejezetten szükséges, például NPD detektálás esetében, ahol acetonitril használata egyáltalán nem is lehetséges [Aysal et al. 2007]. Lehotay és mtsi. a gazdasági válság következtében felszökő acetonitril árak miatt vizsgálták az acetonitril etil-acetáttal történő helyettesítésének lehetőségét, mely során hasonló eredményeket értek el mindkét oldószerral. Az etil-acetáttal GC technikát alkalmazva jobban reprodukálható eredményeket értek el, azonban néhány pH-érzékeny és főként LC-vel mérhető komponensre rosszabb eredményeket kaptak. Vizsgálták a ko-extrahálódott minta-komponensek mennyiségét is, melyben citrom minta esetében etil-acetáttal, míg borsó és almapüré minták esetében acetonitrillel értek el jobb eredményt [Lehotay et al. 2010].

Az acetont az említett oldószerek közül a legkevésbé toxikus, továbbá ára is kedvezőbb a többi oldószerekhez viszonyítva. A legismertebb acetont alkalmazó módszer az ún. Luke-módszer (ld. később), de ezen kívül is számos tanulmányban használták extraháló oldószerként vagy önmagában [Sannino et al. 2005], vagy egyéb apoláros oldószerekkel elegyítve [Lacassie et al. 1998, Otero et al. 2003]. Ezen kívül összehasonlító tanulmányokban is vizsgálták extraháló oldószerek alternatívaként [Anastassiades et al. 2003, Mol et al. 2008]. Díez és mtsi. árpa mintában vizsgálták a különböző minta-előkészítések és oldószerek gyomirtó szerek kinyerésére gyakorolt hatását. Apoláros és közepesen poláros komponensekre az acetont alkalmazó módszerekkel érték el a legjobb kinyeréseket, míg a savas és polárosabb karakterű komponensekre alacsonyabb értékeket kaptak. Különbséget figyeltek meg továbbá a tisztán acetont, illetve az acetont majd apoláros oldószerekbe történő átrázást alkalmazó eljárások között is, melyek közül az utóbbi bizonyult általánosabban alkalmazható eljárásnak [Díez et al. 2006].

### **2.4.2.1.3. *LLP-t elősegítő és víztelenítő sók***

Abban az esetben, amikor az LLP-ben résztvevő folyadékok egymással elegyednek, különböző anyagok mintához adásával érhetjük el a fázisok szétválását. Ez az eljárás nem új a növényvédő szer analitikában, már a '70-es években kifejlesztett Luke-módszer is alkalmaz nátrium-kloridot az LLP lépés befolyásolására. Amíg az acetont alkalmazó módszerek esetében leggyakrabban nátrium-klorid és valamilyen egyéb apoláros ko-szolvens hozzáadásával tartják kézben a megoszlást [Luke et al. 1975], addig az acetonitrilt alkalmazó módszerek esetében elegendő csak a megfelelően megválasztott só hozzáadása [Cook et al. 1999, Lehotay et al. 2001]. A csak sókat alkalmazó eljárás előnye, hogy a reagensek olcsók, továbbá a hozzáadott apoláros ko-szolvensek elhagyásával a mintát nem hígítjuk tovább, és nincs szükség annak későbbi eltávolítására sem. Anastassiades és mtsi. számos szervesen oldható és fruktózt hasonlítottak össze víz-acetonitril rendszerben, vizsgálva azok hatását az acetonitriles fázis mennyiségére és víztartalmára, illetve ezek egy poláros növényvédő szer (methamidophos) kinyerési hatásfokára gyakorolt hatását. Megfigyelhető volt, hogy magnézium-szulfátot alkalmazva (i) az acetonitriles fázis víztartalma a legkisebbnek, míg (ii) térfogata a legnagyobbnak adódott a többi sóval elért eredményekhez viszonyítva. Figyelembe véve, hogy a legmagasabb kinyerési hatásfokot is ezzel a sóval érték el, levonható a következtetés, miszerint (i) a magnézium-szulfát különösen alkalmas az LLP-t használó módszerek esetében a fázisok szétválasztására, továbbá (ii) az LLP során mind a szerves fázis térfogata, mind pedig annak víztartalma befolyásolja a növényvédő szerek extrakcióját [Anastassiades et al. 2003].

A hozzáadott só(k)nak a fázisok megoszlásának befolyásolásán kívül egy másik fontos szerepe is van, mégpedig a szerves fázis polaritásának és ezen keresztül az extrakció szelektivitásának a befolyásolása. A szintén gyakran alkalmazott nátrium-klorid adagolásával tovább fokozható a fázisok szétválása, melynek következtében csökken a szerves fázis víztartalma s ezáltal polaritása. Ennek köszönhetően az extrakció szelektivitása (mely megmutatja, hogy az extrakció specifikus-e a mérendő komponensekre, vagy egyéb, mátrixból származó komponensek is kerülnek-e az extraktumba) változhat, mivel az oldószer fázisa így kevésbé tudja „befogadni” a polárosabb komponenseket. Figyelembe véve, hogy a vizsgált minták nagy mennyiségben tartalmaznak poláros mátrix-komponenseket, a szerves fázis polaritásának megfelelő kézbentartásával csökkenthető az extraktumba kerülő és a mérést esetlegesen zavaró egyéb komponensek mennyisége. Nem szabad azonban szem előtt téveszteni, hogy ezáltal a polárosabb természetű növényvédő szerek kinyerését is befolyásoljuk, mellyel egy az analitikus számára nem ismeretlen kompromisszumos helyzetet teremtünk a tiszta extraktum és a megfelelő kinyerési hatásfokok között.



Sókat nem csak a fázisszétválás elősegítésére alkalmazhatunk, hanem a kapott extraktum víztartalmának megkötésére is. Erre különösen GC technikák esetén van szükség, ahol a minta kis víztartalma is nagyban megnehezítheti az analízist, továbbá egyes peszticidek kinyerését is ronthatja [Schenck et al. 2002a]. Az említett cikkben Schenck és mtsi. a gyakran alkalmazott nátrium-szulfát [Fillion et al. 2000, Sheridan et al. 1999] és a magnézium-szulfát sók vízmegkötő képességét vetették össze, s eredményeik alapján arra a megállapításra jutottak, hogy utóbbi jóval alkalmasabb a szerves fázis víztelenítésére.

#### **2.4.2.1.4. Tisztító szorbensek**

A minta extraktumok tisztítását leggyakrabban valamilyen SPE tisztító szorbens alkalmazásával érik el, mely során a zavaró mátrixkomponensek a szorbenshez kötődnek, míg a mérendő komponensek az oldatban maradnak. Ezek alapján össze is foglalható a szorbensekkel szemben támasztott követelmény, miszerint nagy affinitással kötődjenek hozzá az eltávolítandó komponensek, miközben a növényvédő szerek elhanyagolható részét kösse meg a mintából. Alkalmazásuk az SPE technikánál bemutatott módokon lehetséges, azaz vagy por alakban a mintához adagoljuk (d-SPE), vagy egy kis oszlopot töltünk meg vele (c-SPE), melyre rátöltjük a mintát.

A különböző szorbenseket a köztük és a megkötött anyag között lejátszódó kötődési mechanizmus módja alapján tudjuk csoportosítani. Ezek alapján megkülönböztetünk fordított fázisú (pl. C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, fenil, stb.), normál fázisú (pl. módosítatlan szilika, diol, aminopropil, PSA stb.), ioncserés (pl. SAX, SCX, WCX stb.), illetve kevert módú szorbenseket. Ezen kívül, nagy megkötőképességének köszönhetően, aktív szén (*graphitized carbon black*; GCB) is gyakran használnak. A vizsgált minták komplexitásának köszönhetően gyakori, hogy ezen szorbensek valamely kombinációját alkalmazzák. Schenk és mtsi. például GCB és PSA, Fillion és mtsi. C<sub>18</sub>, GCB és -NH<sub>2</sub>, Sheridan és mtsi. pedig GCB, PSA és SAX szorbensek kombinációját alkalmazták zöldség- és gyümölcsminták extraktumának tisztítására [Fillion et al. 2000, Schenck et al. 1999, Sheridan et al. 1999].

Schenk és mtsi. egy tanulmányban összehasonlították a leggyakrabban alkalmazott SPE szorbensek tisztító hatását. A tanulmány tárgyát a GCB, a fordított fázisú C<sub>18</sub>, SAX, a PSA és az -NH<sub>2</sub> szorbensek képezték. A mintákat GC-ECD és GC-MS technikával vizsgálták. Eredményeik azt mutatták, hogy az -NH<sub>2</sub> és PSA szorbensek önmagukban is alkalmasak friss zöldség- és gyümölcsminták megfelelő fokú tisztítására, míg a többi vizsgált szorbenssel nem értek el megfelelő hatásfokú tisztítást [Schenck et al. 2002b].

Az említett szorbensek közül az alábbiakban a PSA, GCB és C<sub>18</sub> szorbenseket mutatom be röviden.

A **PSA** egy szilika alapú szorbens, melyben a szilícium atomhoz egy N-propil-etiléndiamin csoport kapcsolódik. Hasonló szelektivitással rendelkezik, mint az –NH<sub>2</sub> szorbens, azonban a két aminos csoport (egy primer és egy szekunder) jelenlétének köszönhetően nagyobb ionkapacitással rendelkezik. A PSA egyrészt normál fázisú szorbensként, másrészt pedig gyenge anion cserélő szorbensként (pK<sub>a</sub> 10,1 és 10,9) is funkcionál [Moldoveanu et al. 2002]. Poláros szorbens lévén nagy hatékonysággal köt meg poláros anyagokat, hidrogén-hidat kialakítva bármely –OH, –SH vagy –NH csoporttal rendelkező komponenssel, melynek köszönhetően különösen alkalmas zsírsavak, egyéb szerves savak, fenolok és szénhidrátok megkötésére. Kiemelkedő szelektivitása révén különösen nagy sikerrel alkalmazható multikomponenses minta-előkészítések (pl. QuEChERS) során, ahol a cél a poláros mátrix-komponensek megkötése a szerves oldószer fázisából.

A **C<sub>18</sub>** egy 18 szénatomos alkilánccal módosított szilika alapú szorbens, mely fordított fázisú mechanizmusban kapcsolódik a megkötött molekulákkal. C-SPE eljárások esetében az egyik legkevésbé szelektív szorbensként tartják számon, mivel vizes közegben szinte az összes apoláros természetű komponenst megköti. Ennek köszönhetően jól alkalmazható széleskörű monitorozó (*wide-scope screening*) mérések során, ahol cél a lehető legtöbb komponens lefedése. D-SPE szorbensként alkalmazva (amely esetben a szerves oldószer fázisához adjuk) feladata az apoláros mátrixkomponensek megkötése. Mivel ebben az esetben az extraktum szerves oldószer tartalma magas, nem kell a célkomponensek szorbensen való megkötődésétől tartanunk. Mint minden módosított felületű szilika szorbensnek, így a C<sub>18</sub> alkalmazhatóságának is határt szab a közeg pH-ja. Kis pH értéknél (pH<2) az alkilánccok hidrolízisével kell számolnunk, míg nagy pH értéknél (pH>9) a szilika alap oldódásának veszélye áll fenn (csakúgy, mint a szilika alapú kromatográfiás oszlopok esetében).

Az aktív szén (**GCB**) szorbenseket általában nem porózus formában alkalmazzák, melyhez a megkötött molekulákat London-féle diszperziós erők kötik. A szorbent planáris szerkezetű, hat szénatomos gyűrűk alkotják, melyek egymással kapcsolódva rétegeket alkotnak, mely rétegek szintén kapcsolódnak egymáshoz [Beyer et al. 2010].

SPE szorbensként történő alkalmazása szintén gyakori a növényvédő szer analitikában, mely annak köszönhető, hogy segítségével komponensek széles köre (köztük nagyon poláros komponens is) köthető meg nagy víztartalmú oldatokban [Borra et al. 1986]. Erősen hidrofób jellegének köszönhetően a célkomponensek vízmolekulával történő lecserélődésének esélye elhanyagolható, melynek köszönhetően a GCB a vízmintákból történő növényvédő szer analízisek széles körben alkalmazott (c-SPE) szorbense [Martínez et al. 2000, Soriano et al. 1998]. Ilyen típusú mérések során a vizsgált

vízmintát a szorbenságyra töltik, a mérendő komponensek megkötődnek a szorbensen, majd azokat kis mennyiségű szerves oldószerrel mossák le. Ennél a technikánál azonban gyakran felmerülő problémát jelent egyes komponensek túl erős kötődése a szorbenshez, mely alacsony kinyerési hatásfokokat eredményezhet [Soriano et al. 1998].

D-SPE szorbensként alkalmazva nagy hatékonysággal köt meg planáris szerkezetű komponenseket, például fenolokat, szterolokat, karotinoidokat és a növények zöld színanyagát, a klorofillt. Ilyen terű alkalmazása leginkább magas olajtartalmú minták esetében gyakori [Hernando et al. 2007, Walters 1990]. A szorbens kiemelendő hátránya (mely c-SPE-ben alkalmazva is problémát jelent), hogy a zavaró komponenseken kívül egyes célkomponenseket is erősen megköt a mintából, mely különösen igaz a planáris szerkezetű növényvédő szerekre (pl. thiabendazole, cyprodinil, spinosad, phosalone stb.). Ez a problémakör az 5.1. fejezetben is felmerül, bővebb tárgyalása ott olvasható.

#### **2.4.2.1.5. A pH érték szabályozása**

A számos növényvédő szer között nagy számban találhatunk olyan komponenseket, melyek valamely funkciós csoportjuk révén képesek protolitikus reakcióban részt venni. Ennek következtében, a mintaoldat vagy az extraktum pH értékétől függően, különböző formában lehetnek jelen (semleges vagy ionizált), mely formák különböző fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Mivel a növényvédő szerek extrahálására szerves oldószereket használnak, az ionizált forma nagyobb polaritása például a szer kisebb hatásfokú kinyeréséhez vezethet. Erre példaként említhető a gyakran alkalmazott gombaölő szer, az imazalil, mely bázikus tulajdonsága révén alacsonyabb pH érték mellett ionizálódik, melynek következtében apoláros oldószerrel történő kinyerése kisebb hatásfokú lehet.

Problémát jelentenek továbbá a különböző pH-érzékeny komponensek, melyek külön odafigyelést igényelnek egy multikomponenses módszer fejlesztésekor (beleértve az extrakciós közeg pH-ját, a minta és az oldatok tárolását stb.). Ilyen problémás komponens például a magasabb pH értéknél gyorsan bomló chlorothalonil, captan, dichlofluanid stb. [Anastassiades et al. 2003].

Ezek alapján és figyelembe véve a pH-függő komponensek nagy számát belátható, hogy egy multikomponenses módszer esetében nem hagyható figyelmen kívül a rendszer (minta, extraktum stb.) pH értékének szabályozása. Különösen igaz ez, ha figyelembe vesszük, hogy a leggyakrabban vizsgált különböző zöldség- és gyümölcsmintákban megfigyelhető pH érték meglehetősen széles skálán mozog, a savas karakterű citromtól (pH ~2,5) a közel semleges saláta vagy spárga mintákig (pH ~6,5). Mivel a minta-előkészítési technikák egyik fő célja a robusztusság (melyre a különböző minták hatásától való mentesség jellemző), egyes komponenscsoportok megfelelő analízise céljából elkerülhetetlen a pH érték befolyásolása.

Erre a célra a legcélszerűbb valamilyen puffer alkalmazása, mely segítségével pontosan és stabilan tudjuk a minta pH értékét szabályozni. Figyelembe véve, hogy a legtöbb növényvédő szer savas közegben stabilabb, mindenképpen savas puffer alkalmazása javasolt. A pontos pH érték megválasztásakor azonban körültekintően kell eljárunk, szem előtt tartva a mérendő komponensek pKa értékét, illetve azt, hogy hajlamosak-e degradációra alacsony vagy magasabb pH érték hatására. További szempont továbbá, hogy az alkalmazott puffer illékony legyen, mivel a manapság leggyakrabban alkalmazott detektálási technika, az LC-MS illékony pufferek használatát követeli meg. Ezen szempontok alapján a leginkább számításba jöhető pufferek az acetát (pH= $\sim$ 3,5-5,5), a citrát (pH= $\sim$ 3-6) és a formiát (pH= $\sim$ 3-5) pufferek *(zárójelben az adott pufferrel még jó pufferkapacitás mellett elérhető pH tartományok szerepelnek)*.

#### **2.4.2.2. A multikomponenses minta-előkészítések fejlődése**

A növényvédő szer analitikában a minta-előkészítést gyakran nevezik a vizsgálatok „Achilles-sarkának” vagy szűk keresztmetszetének (*bottleneck*), mely elnevezések találóan jellemzik a folyamat kritikus mivoltát. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy a minta-előkészítés során elkövetett hibát később már nem lehet korrigálni. Másrészt pedig ez a növényvédő szer analízis egymást követő lépéseinek azon mozzanata, mely leginkább korlátokat szab az adott módszerrel mérhető komponensek számának. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy bármennyire kifinomult és érzékeny detektálási technikát is alkalmazunk, mely akár több ezer komponens detektálását is lehetővé tenné, amennyiben a minta-előkészítés során azok nem kerülnek a vizsgált extraktumba, nem lesznek kimutathatóak. A minta-előkészítés fontosságát mi sem mutatja jobban, mint a témában megjelent számos fejlesztés és a már meglévő módszerek módosítása, mely fejlődés szorosan kapcsolódik az adott időszakban mérendő szermaradványok számához és azok fiziko-kémiai tulajdonságához.

A '60-as években használt módszerek főként az apoláros klórozott szénhidrogének kinyerésére fókuszáltak. **Mills módszerét** alkalmazva [Mills et al. 1963] a növényvédő szereket acetonitrillel extrahálták ki az alacsony zsírtartalmú mintákból, melyet a kinyert szereket apoláros oldószerbe (petróleum éter vagy hexán) történő átrázatása követett. Ennek köszönhető a módszer nagy előnye, miszerint a minta víztartalmán kívül a poláros mátrix-komponensek (szerves savak, sók, szénhidrátok stb.) sem kerülnek bele az extraktumba.

Az újabb, polárosabb természetű hatóanyagok (pl. szerves foszforsav észterek) elterjedésével azonban a méréseket kiszolgáló minta-előkészítéseknek is lépést kellett tartania, így szükség volt az új, poláros komponensek kinyerésére is alkalmas technikák kifejlesztésére.

Az 1970-es években Mills módszerét egyre inkább felváltotta a „dutch (holland) módszer”-ként is ismert **Luke-módszer** [Luke et al. 1975], majd ennek az 1981-ben bemutatott „miniatürizált” és korszerűsített változata [Luke et al. 1981]. Luke acetonitril helyett acetont használt az első extrakció során, melyet egy diklórmetán és petróleum éter eleggyel történő folyadék-folyadék megoszlási lépés követ, mely során a minta víztartalma hátramarad. Azért, hogy a poláros szerekre is jó kinyerési hatásfokot érjen el, a vizes fázishoz nátrium-kloridot adagolt, mely elősegítette a komponensek szerves fázisba történő vándorlását. A szerves fázisba esetlegesen átkerült kis mennyiségű víz megkötésére nátrium-szulfát sót használt. A módszert és annak néhány módosított változatát sokáig nagy előszeretettel alkalmazták a növényvédő szer analitikában [Hiemstra et al. 2007, Lacassie et al. 1998, Pizzutti et al. 2007]. Ahogy azonban a környezetvédelmi szempontok az analitikai kémia területén is kezdtek dominálni („zöld analitika”), a módszer nagy oldószerigénye és a felhasznált szerves oldószerek veszélyessége egyre inkább háttérbe szorította a módszert, és újabb multikomponenses technikák kidolgozására ösztökélte az analitikusokat. Manapság Luke módszere főként az újabb eljárások összehasonlítási alapjaként található meg az irodalomban [Díez et al. 2006, Mol et al. 2008].

A növényvédő szer analitika utóbbi egy évtizedének talán legjelentősebb fejlesztése a 2003-ban bemutatott és szintén acetonitrilt alkalmazó **QuEChERS** módszer volt [Anastassiades et al. 2003]. Az elnevezés az angol *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe* (gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos) szavak akronímája, melyek jól kiemelik a maga nemében korszakalkotó módszer előnyeit. A korábbi eljárásokkal szemben a QuEChERS módszer fejlesztésekor szempont volt a lehető legkevesebb szerves oldószer felhasználása, a korábbi technikákhoz viszonyított egyszerűség, és mindemellett azon cél szem előtt tartása, hogy jó kinyerési hatásfokot érjen el a lehető legtöbb komponensre. A módszer alapvetően két fő lépésből áll: (i) acetonitrillel végzett szilárd-folyadék extrakció, mely során a mérendő komponensek az oldószer fázisába kerülnek, melyet egy (ii) d-SPE tisztítási lépés követ, mely célja a ko-extrahálódott mátrixkomponensek eltávolítása. Az egymással egyébként jól elegyedő acetonitril és víz két fázisra való szétválását a mintához adagolt sók (magnézium-szulfát és nátrium-klorid) teszik lehetővé (ún. kisózási effektus).

A vizsgálat során 10,0 g homogenizált mintához 10 ml acetonitrilt adagolunk, melyhez szükség esetén kísérő sztenderdet is adhatunk. Ezt követően 4,0 g magnézium-szulfátot és 1,0 g nátrium-kloridot adunk a mintához, melyet követően alaposan összerázzuk, majd centrifugáljuk. A folyadék-folyadék megoszlási lépést követően az acetonitriles felülúszóhoz 150 mg magnézium-szulfátot és 25 mg PSA tisztító szorbens adagolunk ml-enként, majd rázatás, centrifugálás és szűrés után vagy közvetlenül injektáljuk a mintát, vagy (LC vizsgálatok esetében) oldószert váltva vizsgálhatjuk azt.

A módszer imént bemutatott első verzióját az irodalomban „eredeti QuEChERS” néven találhatjuk meg, mely elnevezés annak köszönhető, hogy a módszert kifejlesztő két analitikus (M. Anastassiades és S. J. Lehotay), külön irányba folytatva kutatómunkájukat továbbfejlesztették a módszert.

Lehotay és mtsi. az „eredeti QuEChERS” módszer validálása során 229 növényvédő szert vizsgáltak narancs és saláta mintákban [Lehotay et al. 2005a]. A számos értékes eredmény közül kiemelendő az eltérő mátrixok kinyerési hatásfokra gyakorolt hatásának vizsgálata. A vizsgált szerek túlnyomó többségére jó kinyerési hatásfokokat (90-110%) értek el, függetlenül attól, hogy a savas karakterű narancs vagy a közel semleges kémhatású saláta mintában vizsgálták-e őket. Néhány komponens esetében azonban különbséget fedeztek fel, attól függően, hogy melyik mátrixban vizsgálták őket. Egyes komponensekre (pl. asulam, furalaxyl, furmecyclox) a savasabb narancs mátrixban, míg másokra (pl. pymetrozine, acephate, methamidophos) a magasabb pH-jú saláta mintában értek el magasabb kinyerési hatásfokokat. A legszembetűnőbb különbség a furmecyclox, illetve a pymetrozine szerek esetében volt észrevehető; előbbi esetében narancs mintából kb. 100%-os hatásfokot értek el, míg saláta mintából egyáltalán nem sikerült kinyerni, utóbbi esetében pedig saláta mintában kb. 80%-os, míg narancs mintában mindössze kb. 25%-os kinyerési hatásfokot értek el.

Ezekre az eredményekre alapozva Lehotay egy újabb tanulmányában ezen növényvédő szerek megfelelő kinyerését tűzte ki célul, melynek eszközéül a minta pH értékének pufferrel történő szabályozását választotta. Erre a célra acetát puffert alkalmazott: a vizsgált 15 g mintához 15 ml 1% ecetsavat tartalmazó acetonitrilt adott, illetve a korábban használt nátrium-klorid sót nátrium-acetátra cserélte (1,5 g), mellyel a minta pH-ját kb. 4,5-es értékre állította be. A tanulmányban különböző pH értékre (pH 2-től 7-ig) beállított narancslé mintákat vizsgált, és összehasonlította az „eredeti” és az „acetát-pufferelt QuEChERS” módszerekkel kapott kinyerési hatásfokokat. A korábban problémásabb és a minta pH értékétől erősen függő kinyerési hatásfokokat adó komponensekre (pl. acephate, pymetrozine, chlorotalonil stb.) magas, stabil és a minta pH-jától független kinyerési hatásfokokat értek el [Lehotay et al. 2005b]. Ez a módszer később hivatalos AOAC módszerként (AOAC Official Method 2007.01) is megjelent.

Míg Lehotay acetát puffert használt, addig Anastassiades citrát puffer használatát javasolta [Anastassiades et al. 2007]. A módszer ezen változatában 10 g mintához 10 ml acetonitrilt adott, melyhez a 4,0 g magnézium-szulfát és az 1,0 g nátrium-klorid mellett 1,0 g trinátrium-citrát (dihidrát) és 0,5 g dinátrium-hidrogén-citrát (szeszkvihidrát) sót adagolt, mellyel a minta pH értékét kb. 5,5-re állította be. Ez a módszer („citrát-pufferelt QuEChERS”) később hivatalos CEN (European Committee for Standardization) módszerként is megjelent (Standard Method EN 15622:2008).

Egy összehasonlító tanulmány 32 reprezentatív növényvédő szert vizsgált három mintamátrixban, vizsgálva a különbséget a három QuEChERS technika között. Mindhárom módszerrel jó kinyerési hatásokokat értek el a legtöbb hatóanyagra, a kevés megfigyelhető különbség az „acetát-pufferelt QuEChERS” felé billentette a mérleg nyelvét [Lehotay et al. 2010]. Érdekes azonban megjegyezni, hogy a két módszer között észrevehető kismértékű különbségek főként kiragadott példákra alapulnak, melyek elhanyagolhatónak mondhatóak az egyébként mindkét módszerrel elérhető kiemelkedő teljesítményt figyelembe véve.

A technika sikeres és univerzális mivoltát mi sem bizonyítja jobban, mint a 2003-as bemutatása óta megjelent hatalmas számú publikáció, mely valamilyen QuEChERS-alapú minta-előkészítési eljárást alkalmaz (*a sciencedirect.com keresőoldalon a quechers szót beírva a keresés 769 találatot eredményez; 2014. májusi állapot*). A három alapvető verzióján kívül számos egyéb, „házi” fejlesztésű módosítását is megjelentették a módszernek, a mérni kívánt hatóanyagok és a különböző vizsgált mintatípusok tulajdonságainak megfelelően azt. Érdekes továbbá megemlíteni, hogy a technika nem maradt meg a növényvédő szer analitika keretein belül, egyéb szermaradvány mérések során alkalmazott minta-előkészítési eljárások alapjaként is szolgált. Így például mikotoxin, nikotin, melamin és antibiotikum maradványok vizsgálata során is alkalmaztak már QuEChERS-alapú technikát [Aguilera-Luiz et al. 2011, Lozano et al. 2012, Romero-González et al. 2011, Wang et al. 2012].

Végezetül érdemes említést tenni az utóbbi években egyre gyakrabban alkalmazott, kifejezetten egyszerű minta-előkészítési eljárásáról, a közvetlen injektálásos (ún. *dilute-and-shoot*) módszerről, melynek alkalmazását az utóbbi években végbement műszeres fejlődés tette lehetővé. Alapvető analitikai összefüggés ugyanis, hogy minél szelektívebb az alkalmazott detektálási technika, annál kevésbé fontos probléma a minta-előkészítés szelektivitása, és fordítva. Ez azt jelenti, hogy a korábban alkalmazott, kevésbé szelektív detektálási módok (pl. GC-ECD, NPD stb.) körülményes, összetett és sokszor valamely kémiai csoportra specifikus minta-előkészítés alkalmazását tették szükségessé, melyek azon túl, hogy időigényesek és költségesek voltak, korlátozták a mérhető komponensek körét is. Az utóbbi években végbement technikai fejlődésnek köszönhetően a manapság alkalmazott

detektálási technikák jóval szelektívebbek és érzékenyebbek, mely jelentősen leegyszerűsített, célratörő minta-előkészítések alkalmazását tette lehetővé. Antoine de Saint-Exupéry-t idézve: „*A technika mindig a primitívtől a bonyolulton keresztül fejlődik az egyszerűig*”. Ennek az egyszerűségnek ékes példája a közvetlen injektálós módszer, mely során a mintát (folyadék esetén) vagy az extraktumot minden további tisztítási lépés nélkül, azt csak hígítva injektálják a műszerbe [Ferrer et al. 2011b]. Ez az eljárás több szempontból is előnyös: (i) a kevesebb injektált mintamennyiségnek köszönhetően a mérőműszer kevésbé szennyeződik be, így csökkenthető a műszerkarbantartás gyakorisága, illetve (ii) a detektálás során, a kevesebb mátrixkomponens injektálásának köszönhetően, javul a jel/zaj viszony. Mivel azonban a hígítás hatására csökken a mérendő komponens koncentrációja is, az eljárás alkalmazhatóságának a mérőműszer érzékenysége szab határt. Ezt a módszert így elsősorban célkomponenses vizsgálatok során és főként (azok kiemelkedő érzékenysége miatt) hármaskvadrupól elrendezésű tandem-MS készülékekkel alkalmazzák. A csökkenő növényvédő szer koncentráció hatását ellenben bizonyos mértékig ellensúlyozza a csekélyebb mátrixhatás okozta jelnövekedés, így (kiindulási koncentrációtól függően) akár a minták 100x-os hígítása is elvégezhető [Ferrer et al. 2011a]. Az említett cikkben Ferrer és mtsi. három zöldségmátrixban (paradicsom, narancs és póréhagyma), különböző mértékű hígításokat alkalmazva vizsgálták a mátrixhatásokat. Annak ellenére, hogy az alkalmazott műszerek érzékenysége lehetővé tette az akár 100x-os hígítást is, a szerzők már a 15x-ös hígítást is megfelelőnek találták, mivel ilyen arányú hígítás még a legnagyobb háttérzajt okozó póréhagyma mintánál is szignifikánsan csökkentette a mátrix jelbefolyásoló hatását. A nagymértékű hígításnak köszönhetően az egész analitikai eljárás jelentősen leegyszerűsíthető, mivel ilyen híg oldatoknál elhanyagolható a mátrix okozta jelváltozás, lehetővé téve ezzel a jóval egyszerűbb oldószerben történő kalibrációt. Ezt alátámasztandó a már említett cikkben Ferrer és mtsi. 110 különböző zöldség- és gyümölcsmintát vizsgáltak, mely során összevetették a tiszta oldószerben, a hígítás nélküli extraktumban, illetve a 15x-ös hígítás utáni extraktumban felvett kalibrációs egyenesek meredekségét. Az esetek túlnyomó többségében közel azonos eredményeket (20%-nál kisebb eltérés) értek el a hígított mintához illesztett és a tiszta oldószerben elvégzett kalibrációval. Egyes hatóanyagok esetében viszont jelentős (40%-nál nagyobb) különbséget figyeltek meg, melyet már semmiképp nem lehet figyelmen kívül hagyni, azok vizsgálatokor ajánlott valamely mátrixhatást kiküszöbölő méréstechnikát alkalmazni. A módszer számos előnye mellett, annak talán egyedüli hátrányként említendő meg a kimutatási határok bizonyos mértékű romlása, mely megköveteli az újabb gyártmányú, kiemelkedően nagy érzékenységgű (és természetesen drágább) műszerek használatát.



### 2.4.2.3. Minta-előkészítési technikák magas zsírtartalmú minták vizsgálatára

A növényvédő szer kémia születése óta a leggyakrabban vizsgált mintatípusok között jellemzően a környezeti minták (víz, talaj), illetve a magas víztartalmú zöldség- és gyümölcsminták voltak megtalálhatóak. Mivel azonban növényvédő szereket nem csak magas víztartalmú (tehát valamelyest egyszerűbb mátrixú) növények esetében alkalmaznak, szükségessé vált az egyéb, problémásabb mátrixú minták vizsgálata is. Analitikai kémiai szempontból ilyen, nagy kihívást jelentő minták a magas zsírtartalmú élelmiszerek is, például az olajnövények magvai (napraforgómag, repcemag stb.), a magas olajtartalmú termékek (pl. olíva, avokádó stb.), illetve ide sorolandó a feldolgozott élelmiszerek közé tartozó étkezési célú növényi olajok csoportja is.

Az említett élelmiszertípusokkal kapcsolatban felmerülő analitika problémák gyökere a minták komplexitásában, magas zsírtartalmában keresendő (olajok esetében kb. 100% triglicerid tartalom). Mint minden mérés során, így ezen minták vizsgálata során is cél, hogy a lehető legtöbb komponenst tudjuk vizsgálni, magas kinyerési hatásokkal, és lehetőleg mátrixkomponensektől mentes oldatban. Ehhez azonban, igazodva a vizsgált minták bonyolult összetételéhez, általában valamilyen szintén összetettebb minta-előkészítési/tisztítási eljárást kell alkalmaznunk. Az utóbbi évtizedben végbement jelentős műszeres fejlődésnek köszönhetően már kijelenthető, hogy az ilyen típusú minták esetében nem a detektálás jelenti a fő problémát, hanem a már megfelelő tisztaságú extraktumok és a még megfelelő kinyerési hatások érzékeny egyensúlyának megteremtése. Ennek elérése azonban egyes esetekben kifejezetten bonyolult lehet, figyelembe véve, hogy már kis mennyiségű zsírsav is nagymértékben ronthatja a műszerek állapotát, illetve jelentős detektálási interferenciákat okozhat. Problémát jelenthet továbbá a minták apoláros jellege is, mely az apoláros, lipofil célkomponensek (pl. klórozott szénhidrogének) megfelelő kinyerését nehezíti meg.

Az említett nehézségek áthidalására számos analitikai technika és kifejlesztett módszer áll rendelkezésre, melyek közül a gélpermeációs kromatográfiát (GPC), az SPE-t, illetve az LLE-t alkalmazzák leggyakrabban [García-Reyes et al. 2007a]. Szem előtt tartva azonban a mérőműszerek mátrixkomponensekre való érzékenységet, a tisztább minta extraktumok elérése érdekében ajánlott az említett technikák valamely (leggyakrabban az LLE és vagy a GPC vagy valamely szorbens alapú tisztítás) kombinációját alkalmazni.

Az LLE lépéshez leggyakrabban acetonitrilt és hexánt alkalmaznak, mely során általában acetonitrillel telített hexánban oldják az olaj mintát, majd hexánnal telített acetonitrillel rázatják. Tekintve, hogy ez a technika nem kellőképpen szelektív, az így kapott extraktumot további tisztítási lépéseknek kell alávetni. A GPC során az extraktumot egy porózus polimer töltettel ellátott oszlopra injektálják, melyen a növényvédő szerek elválnak a nagy molekulatömegű zsírsavaktól. A módszer előnye, hogy a

megfelelő műszeres háttérrel (szoftver és frakciószedő) megoldható a technika automatizálása. Hátrányaként említendő meg ellenben, hogy nem minden esetben oldható meg vele a növényvédő szerek mátrixkomponensektől történő elválasztása, mely további (pl. Florosil SPE oszlopos) tisztítási lépés beiktatását teszi szükségessé. Hátrányt jelent továbbá az elúció során alkalmazott nagy mennyiségű toxikus oldószer is (pl. etil-acetát, ciklohexán stb.). Említett hátrányai ellenére számos publikáció példázza a módszer sikeres alkalmazhatóságát [Garrido Frenich et al. 2007, Sánchez et al. 2006]

A GPC alternatívjaként különböző SPE-alapú technikákat is alkalmazhatunk, mellyel kiküszöbölhető a GPC esetében felmerülő nagy oldószerigény jelentette hátrány, azonban ez esetben több manuális munkát igénylő folyamattal kell számolni. LLE-t követő SPE tisztításon alapuló módszer a Garrido-Frenich és mtsi. által javasolt eljárás, mely során a szerzők az acetonitrillel történő LLE lépést követően Florosil oszlopon végzett SPE tisztításnak vetették alá a mintát [Garrido Frenich et al. 2008]. Hasonló eljárást alkalmaztak Aramendía és mtsi. is, azonban ők az acetonitrillel végzett LLE-t megelőzően hexánban oldották fel az olaj mintát [Aramendía et al. 2007]. Szintén LLE+SPE-alapú technika a korábban már bemutatott QuEChERS módszer is, melynek számos variációja közül néhányal a magas olajtartalmú minták előkészítésére is találtak megoldást [Cunha et al. 2007, Hernando et al. 2007]. A módszer a dolgozatomban szempontjából fontos vonatkozású, részletesebb bemutatása az 5.1.2.4. fejezetben olvasható.

Szintén szorbens alapú technikának tekinthető az MSPD eljárás, melyet ugyancsak sikerrel alkalmaztak magas olajtartalmú és olaj minták vizsgálatára. Ferrer és mtsi. olíva és olíva olaj mintát vizsgáltak, melyek előkészítésére aminopropil szorbenssel végzett MSPD extrakciót végeztek, melyet egy Florosil oszlopon acetonitril eluenssel végzett SPE tisztítás követett [Ferrer et al. 2005].

A fentebb bemutatott módszereken kívül számos egyéb eljárás is alkalmazható. Ezeket az alábbiakban, kevésbé gyakori alkalmazásuk miatt, csak felsorolásszerűen említem meg:

- alacsony hőmérsékleten végzett zsír kicsapás [Lentza-Rizos et al. 2001]
- mikrohullámmal segített extrakció; MAE [Fuentes et al. 2008]
- gyorsított oldószeres extrakció; ASE [Fernández Moreno et al. 2006]
- szuperkritikus fluid extrakció; SFE [Ono et al. 2006]
- gőztér szilárd fázisú mikroextrakció; HS-SPME [Tsoutsis et al. 2004]

### **2.4.3. Műszeres analízis**

A növényvédő szer analízisek minta-előkészítést követő lépése a minta extraktumok műszeres vizsgálata. Ahogy azt már korábban is említettem, a növényvédő szer kémia és a műszeres analitika műszaki háttérének technikai fejlődése szoros kapcsolatot mutat. A kezdetben kevés és sokszor azonos kémiai tulajdonságokkal bíró célvegyületek vizsgálatához elegendőnek bizonyultak az akkoriban rendelkezésre álló kevésbé érzékeny és szelektív detektálási technikák. A mérendő komponensek számának drámai növekedésével azonban szükségessé váltak a multikomponenses módszerek, melyek megkerülhetetlen feltétele volt a sok komponens mérésére alkalmas mérőműszerek fejlesztése.

Ebben a fejezetben az MS detektálással végzett növényvédő szer mérések három fontos lépésének, a kromatográfiás elválasztásnak, az ionizációnak és a detektálásnak mutatom be a lehetséges alternatíváit.

#### **2.4.3.1. Elválasztástechnika**

Az élelmiszerminták összetettségéből adódóan, bármely detektálási technikát is válasszuk, mindenképpen szükséges valamilyen elválasztástechnika alkalmazása. A mai növényvédő szer analitikában a két leggyakrabban alkalmazott kromatográfiás technika a folyadék- (LC) és a gázkromatográfia (GC). A '60-as évektől kezdve jellemzően GC-n alapuló technikákat alkalmaztak túlnyomó többségben, melynek oka főként az akkoriban alkalmazott szerek fiziko-kémiai tulajdonságaiban keresendő. Az akkor használt szerek ugyanis jellemzően apoláros, nem hőérzékeny és illékony komponensek voltak, mely tulajdonságoknak köszönhetően azok gázkromatográfiás elválasztással sikeresen mérhetőek voltak. A komponensek detektálására főként ECD, NPD és FID detektorokat alkalmaztak, melyek sikeres alkalmazásának kulcsa szintén az akkor alkalmazott szerek kémiai tulajdonsága volt (pl. ECD-vel jól mérhetőek a klórozott szénhidrogének, NPD-vel a foszforsav észterek). Az említett műszerek maximálisan néhány tíz komponens mérését teszik lehetővé, mely, a növényvédő szer kémia fejlődési tempóját figyelembe véve, egyre szűkebb korlátnak bizonyult. Az előbbi technikák háttérbe szorulása nem csak az említett hátrányaiknak volt köszönhető, hanem a tömegspektrometriás (MS) detektálás egyre szélesebb körű elterjedésének is. Kb. a '70-es évektől kezdve egészen napjainkig a gázkromatográfiás elválasztást tömegspektrometriás detektálással alkalmazó technika (GC-MS) a növényvédő szer analízisek egyik alapkövének tekinthető. A technika a korábbi detektálási módokkal szembeni előnyei: (i) alkalmazásának jóval kevésbé szabnak határt a mérendő komponensek fiziko-kémiai tulajdonságai, melynek köszönhetően jóval több (akár >200) komponens mérhető vele; (ii) míg a korábban alkalmazott detektálási technikák esetében a találatok

megerősítésére újabb mérésre volt szükség (más kolonnán vagy másik detektort alkalmazva), addig a GC-MS esetében a meghatározás és megerősítés egy méréssel elvégezhető; (iii) a leggyakrabban alkalmazott elektron ionizációval (EI) jellegzetes és karakterisztikus fragmensekben gazdag spektrumot kapunk, ráadásul kimagasló műszerről műszerre történő reprodukálhatósággal, mely lehetővé teszi univerzális spektrumkönyvtárak létrehozását és azok azonosítási célú felhasználását.

LC-n alapuló technikákat jóval ritkábban alkalmazták, melynek oka egyrészt az akkoriban rendelkezésre álló detektorok kisebb érzékenysége és szelektivitása, másrészt a mérhető komponensek korlátozott köre volt (előbbi főként UV-VIS-re, utóbbi a fluoreszcens detektálásra jellemző). A jóval érzékenyebb és szelektívebb MS detektorok LC-vel történő kapcsolása sokáig (kb. a '90-es évek végéig) nem volt megoldott, melyre megoldást a légköri nyomáson történő ionizációs technikák (*atmospheric pressure ionization*; API) jelentettek (ld. köv. fejezet). Ennek köszönhetően ugyanis megvalósíthatóvá vált az LC-MS műszerkapcsolás, mely a korábbi LC detektorokhoz képest több nagyságrendnyi érzékenység- és szelektivitásbeli javulást eredményezett. Ennek következtében az LC-MS technikák a korábban szinte csak GC-t alkalmazó növényvédő szer analitika újabb és hasonlóan fontos eszközévé váltak

Az LC jelentőségének növekedését ellenben nem csak a műszertechnika fejlődése, hanem a növényvédő szer kémia fejlődési iránya is indukálta. Ahogy fentebb említettem, a korábban alkalmazott szerek főként apoláros, illékony és hőstabil vegyületek voltak, melynek köszönhetően jól mérhetőek voltak GC-s elválasztás-technikával. Az újabban kifejlesztett növényvédő szerek ellenben egyre inkább poláros, nem illékony és hőérzékeny vegyületek voltak, minek következtében azok GC-vel történő mérése nehézkes (pl. származékképzés szükséges) vagy egyáltalán nem is lehetséges.

Alder és mtsi., a két elválasztástechnika növényvédő szer analitikai alkalmazhatóságát összehasonlítandó, 500 növényvédő szert vizsgáltak GC-EI-MS, illetve LC-MS/MS technikákkal, és összevetették a két műszer által lefedett mérhető komponensek körét. Az 500 vizsgált szerből 135 nem volt mérhető GC-vel, míg ez a szám LC esetében csak 47 volt (melyek közül 33 a tipikusan GC-vel mérhető komponensek körébe tartozó klórozott szénhidrogén volt) [Alder et al. 2006]. A cikk második konklúziója az LC-MS/MS technika nagyobb érzékenysége volt, mely kijelentést azonban, az alkalmazott méréstechnikákat figyelembe véve, óvatosan kell kezelnünk. A 2006-ban íródott cikkben ugyanis a szerzők az akkor még általuk kiforratlannak ítélt GC-MS/MS és GC-TOFMS technikák helyett egy „*single-MS*” készüléket hasonlítottak össze egy LC-tandemMS készülékkel, melynek egyenes következménye az utóbbival elérhető nagyobb szelektivitás és érzékenység. Az azóta eltelt kb. 8 évben végbement műszeres fejlődésnek köszönhetően az említett, akkor még kiforratlannak ítélt GC-s detektálási technikák is teret nyertek [Hernández et al. 2011, Mezcua et al. 2009a], továbbá újabbak

(pl. a többdimenziós GCxGC [van der Lee et al. 2008]) is megjelentek, így ma már aligha jelenthető ki egyértelműen, hogy valamelyik elválasztástechnika jobb vagy rosszabb lenne a másiknál. Mivel a mérendő növényvédő szerek között mindig is lesznek csak GC-vel, illetve csak LC-vel mérhető komponensek, elmondható, hogy ez a két technika karöltve, egymást kiegészítve képezi a növényvédő szer analitika alapjait. Azt pedig, hogy a kettő közül melyiket válasszuk, alapvetően a mérendő komponensek fiziko-kémiai tulajdonsága (és sok esetben a rendelkezésre álló készülék) határozza meg.

#### **2.4.3.2. Ionizációs technikák**

A növényvédő szer mérések során a leggyakrabban alkalmazott detektálási technika kétségtelenül a tömegspektrometriás (MS) detektálás. Mivel az MS technika a mérendő komponenseket ionizált formában méri, a detektálást megelőzően azokat valamilyen módon ionizálni kell.

A mérendő komponenssel közölt ionizációs energia nagysága alapján kétféle ionizációs technikát különböztetünk meg: a lágy és kemény ionizációt. Kemény ionizáció esetén a molekulával közölt energia akkora, hogy annak néhány kötése felszakad, és belőle kisebb tömeg/töltésű fragmentumok keletkeznek. Ezzel szemben lágy ionizációt alkalmazva alig vagy egyáltalán nem fragmentálódik az anyamolekula, miáltal jóval egyszerűbb, kevesebb szerkezetre utaló információt tartalmazó spektrumot kapunk, melyben főként a molekulaiont fedezhetjük fel.

GC-MS esetében a két legfontosabb ionizációs technikát említem meg:

- elektron ionizáció (EI): Az EI a GC-MS mérések leggyakrabban alkalmazott (kemény) ionizációs technikája, mely során a minta gáz formában érkezik az ionforrásba, ahol nagy energiájú elektronokkal bombázzák a molekulákat. Ennek következtében azok ionizálódnak (legtöbbször elektron kilépéssel, így általában pozitív ionok keletkeznek), illetve a nagy energiának köszönhetően fragmentálódnak, mely a molekulára jellemző spektrumot eredményez. Egyes esetekben a fragmentáció oly nagymértékű, hogy maga az anyamolekula nem is látszik a tömegspektrumban, csak annak fragmentumjai. Az EI egyik nagy előnye, hogy a kapott spektrumok magas fokú reprodukálhatósága révén lehetővé teszi spektrumkönyvtárak létrehozását [Hoffmann et al. 2007].
- kémiai ionizáció (CI): Az EI-vel szemben a CI lágy ionizációs technika, alkalmazásával főként a molekulaion jelenik meg kismértékű fragmentáció mellett. Következésképp az EI és CI ionforrásokra, mint egymást kiegészítő technikákra tekinthetünk. CI esetében a mérendő molekulák nem elektronokkal, hanem a reagensgáz (általában metán, izobután vagy ammónia) elektronok által ionizált molekuláival ütköznek, melyek kisebb kinetikai energiájának köszönhető a kisebb mértékű fragmentáció. Az EI-hoz hasonlóan szintén lehetőség van pozitív

és negatív töltésű ionok létrehozására is. Negatív ionizációt ritkábban, általában nagy elektronegativitású elemeket tartalmazó molekulák esetében alkalmaznak. Az EI-vel szembeni hátrányként említendő meg, hogy jóval kevésbé robusztus technika (pl. ugyanazon molekula spektruma különböző lehet eltérő reagengázokat alkalmazva) [Hoffmann et al. 2007].

A tömegspektrometria gázkromatográfiával történő csatolása kb. már a '70-es években megoldott volt, azonban folyadékkromatográfiával történő csatolására több évtizedet kellett még várni. Ennek oka a két műszer eltérő működési paramétereiben keresendő: (i) míg az MS detektáláshoz gázfázisú ionokra van szükség, addig az LC oldalról nagy mennyiségű, folyadékfázisú oldat érkezik; (ii) a két műszer jelentősen eltérő nyomáson (MS nagy vákuumban, míg az LC légköri nyomáson) működik. Ezek áthidalását a légköri nyomáson történő ionizáció (API) feltalálása tette lehetővé, melyek közül a légköri nyomású kémiai ionizáció (*atmospheric pressure chemical ionization*; APCI) és különösen az electrospray ionizáció (ESI) nyitott új távlatokat a növényvédő szer analitikában.

- Az LC-MS mérések során leggyakrabban alkalmazott ionizációs technika az **ESI**, ahol az LC oldalról érkező folyadékáram egy fém kapillárison halad át, melyre nagyfeszültséget (ált. 3-6 kV) kapcsolnak. A kapilláris és a tőle kb. 0,3-2 cm-re lévő, földpotenciálon lévő belépő rés között fennálló feszültségkülönbség hatására elektromos mező jön létre, mely a kapillárisból kilépő folyadékcsepp felületén töltéseltolódást eredményez. Ennek hatására, továbbá az ionforrás fűtéséből adódó deszolvatáció következtében a folyadékcseppek kisebb, töltéssel rendelkező cseppeké esnek szét, mely folyamat (az ún. Coulomb-taszítás) többszöri lejátszódása végül a gázfázisú kvázi-molekulaiont eredményezi. Különböző illékony addítívek, például ecetsav vagy hangyasav hozzáadásával csökkenthető a porlasztás kezdeti szakaszában keletkezett cseppek mérete, továbbá protondonorként a pozitív töltésű molekulaionok ionizációs hatásfokát is javítják. A keletkező ionok töltésétől függően a pozitív és negatív ESI módokat különböztetjük meg. Pozitív módban proton(ok) felvételével jönnek létre a molekulaionok, ahol a felvett protonok számától függően akár többszörösen töltött ionok is keletkezhetnek (mely a nagy molekulatömeggel rendelkező molekulák, például fehérjék vizsgálata során jelent előnyt). Ezen kívül más kationok, például  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  ionok felvételével is képződhetnek adduktok. Negatív módban az ionizáció proton(ok) kilépésével, illetve anionok (pl.  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) felvételével történhet meg (bár az utóbbi eset ritkább). Az ESI technika nagy előnye, hogy nem illékony, hőérzékeny vegyületek mérésére is alkalmazható [Hoffmann et al. 2007]. Hátrányként az ionizációs hatásfok mátrixtól függő változása említendő meg, mely témát a 2.4.4.2. fejezetben mutatom be bővebben.

- Az **APCI** technika során a folyadékáramot (0,1-től akár 2 ml/perc) egy kapillárison vezetik át, mely végén porlasztógáz segítségével finom aeroszolt hoznak létre. Az ionizáció egy az ionforrásban elhelyezett tűn létrejövő korona kisülés hatására megy végbe, mely során leggyakrabban egyszeresen töltött ionok jönnek létre. A technika elsősorban kis molekulatömegű (<1500 Da), poláros és mérsékelten apoláros, hőstabil molekulák mérésére alkalmas [Hoffmann et al. 2007].
- Az API ionforrások közül a legújabb technika a légköri nyomású foto-ionizáció (*atmospheric pressure photoionization*; **APPI**). Ebben az esetben az LC oldalról érkező folyadékáramot porlasztják, majd a finom permetet UV lámpával (leggyakrabban kripton lámpával) sugározzák be. A besugárzás során a fotonok által közvetített energia olyan gázfázisú reakciókat eredményez, melyek eredményeképp ionizálódnak a molekulák. A technika előnye, hogy alkalmazásával olyan (főként apoláros) molekulák is mérhetőek, melyek ESI vagy APCI ionforrással nem [Hoffmann et al. 2007].

### 2.4.3.3. Tömeganalizátorok

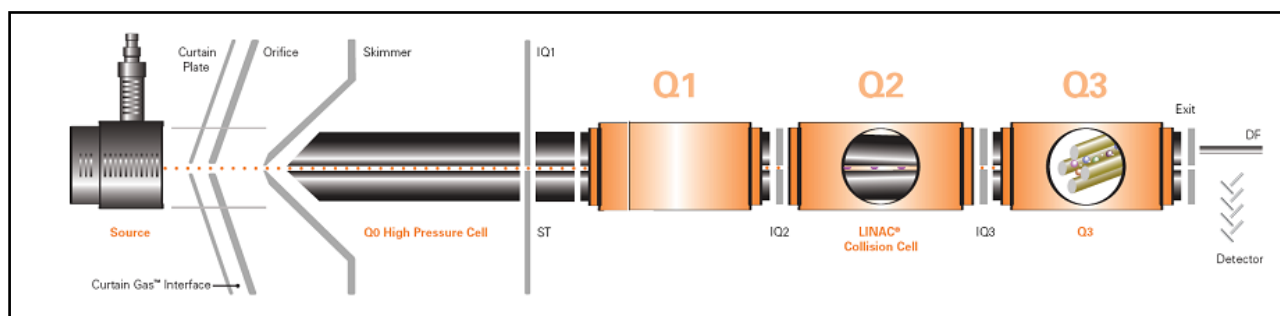
A mérendő komponensek ionizációját azok detektálása követi. Az alábbiakban a növényvédő szer analízisek során leggyakrabban alkalmazott tömeganalizátorokat mutatom be röviden.

MS detektálás során a tömeganalizátorok a mérendő komponenseket azok tömeg/töltés ( $m/z$ ) aránya alapján választják el. A tömeganalizátorok az ún. felbontás ( $R$ ) értékkel jellemezhetőek.

$$R = m/\Delta m$$

ahol  $\Delta m$  az egymás melletti, már felbontott csúcsok között megfigyelhető tömegkülönbség,  $m$  pedig az első csúcs tömege. (Megj.: felbontás egy csúcsra is számolható, ebben az esetben a  $\Delta m$  érték a csúcs félértékszélességével egyezik meg.) Felbontásuk alapján kis és nagy felbontású tömeganalizátorok különböztethetők meg. Általánosságban a 10,000 alatti felbontással rendelkező műszereket kis, míg az e felettieket nagy felbontásúnak minősítik.

- **Kvadrupól tömeganalizátor (Q):** Négy párhuzamos fém rúdból áll, melyekre váltófeszültség kapcsolható. A folyamatosan változó feszültséggel elérhető, hogy csak egy adott  $m/z$  értékű ion tudjon végighaladni az analizátoron, egy spirális pályát bejárva. Kis felbontású, nominális tömeget mérő technika, melyet önmagában (*single-MS*) ritkán alkalmaznak, melynek oka az alacsony szelektivitás.
- **Hármas kvadrupól tömeganalizátor (QqQ):** Ez a detektálási technika a növényvédő szer analitika jó értelemben vett „igáslovának” is nevezhető, mely elnevezést rendkívüli népszerűségének és elterjedtségének köszönheti. A három kvadrupól sorba kapcsolásával jelentősen nagyobb szelektivitás és érzékenység érhető el, mint a *single-MS* kvadrupól készülékkel, mely nagymértékben javítja a kimutatási határokat is. Elrendezésüknek köszönhetően (ld. 1. ábra) többféle mérési módban használhatóak, így számos analitikai feladatra kínálnak megoldást.



1. ábra Hármas-kvadrupól elrendezésű MS/MS műszer sematikus ábrája

A leggyakrabban alkalmazott mérési módok a következők:

– „*Full-scan*” (teljes pásztázási) mód:

Ezen üzemmódjában a műszer három kvadrupólja közül csak egy (általában az első) kvadrupól működik tömegszűrőként, mely egy meghatározott tömegtartományt pásztáz és rögzít. A többi kvadrupól feladata mindössze az ionok fókuszálása, továbbjuttatása a detektor felé. Ezen mód hátránya, hogy a kvadrupól tömeg-analizátorok által mérhető nominális tömeg nem szolgáltat elegendő információt egy ionról, mely bonyolult mintamatrixok esetében szelektivitási problémákat okoz. További hátránya, hogy a nagy ciklusidő következtében kevésbé érzékeny detektálást tesz lehetővé.



– **MRM (Multiple Reaction Monitoring) mód:**

Ez a mód egyike a hármaskvadrupól elrendezésű tandem-MS készülékeknek leggyakrabban alkalmazott üzemmódoknak. Ebben az esetben az első kvadrupól csak az előre meghatározott tömeg/töltés értékű ionokat engedi tovább, mely ionok a második kvadrupólban (ütközési cellában) nagy mozgási energiájú nitrogén molekulákkal ütközve darabjaira esnek (fragmentálódnak). Az így keletkező termékionok (fragmensek) ezután a harmadik kvadrupólba jutnak, ahol szintén csak az előre meghatározott tömeg/töltés értékű ionok jutnak tovább a detektor felé. Egy ilyen prekursor ion-termékion átmenetet nevezünk MRM átmenetnek. Mivel egy adott molekula műszerben történő fragmentációja meglehetősen egyedi, a módszer szelektív analízist tesz lehetővé a különböző MRM átmenetek monitorozása révén.

*Érdemes megjegyezni, hogy egyes műszergyártók ezt a módot SRM-ként nevezték el (Selected Reaction Monitoring), mely elnevezés ugyanezt az üzemmódot takarja. Fontos továbbá megjegyezni, hogy a növényvédő szer analitika területén félreértésre adhat okot mind az „MRM” mind pedig az „SRM” rövidítések használata, mivel hasonlóképp rövidíthetjük a sokkomponenses (Multi-Residue Method), illetve az egykomponenses (Single-Residue Method) módszereket is. Dolgozatomban én az MRM rövidítést fogom alkalmazni, mely alatt minden esetben az itt bemutatott üzemmódot értem.*

– **„Product ion scan” mód:**

A műszer ezen üzemmódját alkalmazva lehetőségünk van egy adott prekursorion teljes termékion spektrumának felvételére. A prekursorion kiválasztása az első kvadrupólban történik, majd a második kvadrupólban (ütközési cellában) történő fragmentációját követően az ionból keletkező termékionokat (fragmenseket) a harmadik kvadrupól analizálja teljes pásztázási (*full-scan*) módban. A módszer nagy előnye, hogy egy molekula fragmentációs képe (termékion spektruma), mintegy a molekula „ujjlenyomata” alkalmazható annak azonosításához. Ehhez rendelkezniünk kell egy spektrumkönyvtárral, melyben a célkomponensek különböző ütközési energiánál felvett termékion spektrumai találhatóak meg, s mely spektrumokkal az ismeretlen ion termékion spektrumát összehasonlítva megerősíthető a találat. Ilyen spektrumkönyvtárakat a műszergyártóktól tudunk beszerezni, illetve a felhasználó maga is készíthet, továbbá bővítheti a már meglévő könyvtárakat. A módszer további előnye, hogy alkalmazásával sztenderdek használata nélkül tudunk azonosítani jelentős számú növényvédő szert, amely (tekintve az analitikai sztenderdek árát) egy különösen fontos szempontnak tekinthető.

A módszer hátránya, hogy mivel a harmadik kvadrupól *full-scan* módban üzemel, a teljes tömegspektrum pásztázása jelentős időt vesz igénybe (akár másodperceket is), amely nagyobb

számú komponens vizsgálata során információvesztéshez, illetve az érzékenység romlásához vezethet.

*(Hibrid ioncsapdás hármaskvadrupól készülékek esetében lehetőség van az ún. EPI módban történő mérésre, mely a termékionok nagyobb érzékenységgel történő detektálását teszi lehetővé. Ehhez a műszer a fragmentációt követően a termékionokat becsapdázza, majd az így összegyűjtött ionokat juttatja a Q3-ba.)*

– **MRM és EPI módok kombinációja:**

A *product ion scan* és EPI módok fentebb említett hátrányát (a nagy ciklusidő miatti kisebb érzékenység) kiküszöbölendő, illetve valamelyest mérséklendő alkalmazhatunk kombinált mérési módszereket is, melyek során kombinálhatjuk az MRM és EPI módok előnyeit. Az ilyen méréseket hívhatjuk IDA (*Information Dependent Analysis*; információfüggő analízis) méréseknek, mivel ilyenkor a műszer csak akkor „kapcsol át” az időigényes EPI módba, ha a célkomponens jelenléte feltételezhető, melyre egy az MRM módban monitorozott átmenet bizonyos szintű intenzitása utalhat.

– **Semleges veszteség:**

Ebben az üzemmódban mindkét kvadrupól (Q1 és Q3) teljes pásztázási módban működik, az ütközési cellában pedig fragmentáció történik. A két tömegspektrométer a teljes tömegtartományt pásztázza egy a felhasználó által megadott tömegkülönbséggel. Detektálás abban az esetben történik, ha az első kvadrupólból kilépő és az ütközési cellában fragmentálódó ionból az anyaiionnál ezzel a meghatározott értékkel kisebb tömegű fragmentumok keletkeznek. Ez a detektálási mód jellegzetes tömegvesztések szűrésére alkalmas, így például sikerrel alkalmazható egyes növényvédő szer bomlástermékek kimutatására is [Steen et al. 2001].

– **Prekurzor ion keresés:**

Ebben az üzemmódban a harmadik kvadrupól egy adott  $m/z$  értékre van beállítva, míg az első kvadrupól teljes pásztázási módban működik. Ilyen beállítások mellett azon molekulák detektálhatóak, melyek fragmentációja a meghatározott  $m/z$  értékű fragmentumot eredményezi. A módszer alkalmazásával jellegzetes molekuláris tömegű vagy funkcionális csoporttal rendelkező molekulák mutathatóak ki (így pl. az  $m/z$  70 fragmentum jelenléte a triazol-származék gombaölő szerek, az  $m/z$  157 fragmentumé a szerves foszforsav észterek jelenlétére utalhat stb.).

- **Repülési idő tömeganalizátor (time-of-flight; TOF-MS):**

TOF-MS mérések során az ionforrásban keletkezett ionokat egy ismert energiájú elektromos mező segítségével felgyorsítják. Mivel az ion sebessége annak haladása során nem változik, továbbá az általa megtett úthossz ismert, az ion gyorsításától annak detektorba való érkezéséig eltelt időt mérve kiszámítható az ion sebessége. Ennek ismeretében kiszámolható a vizsgált ion tömege.

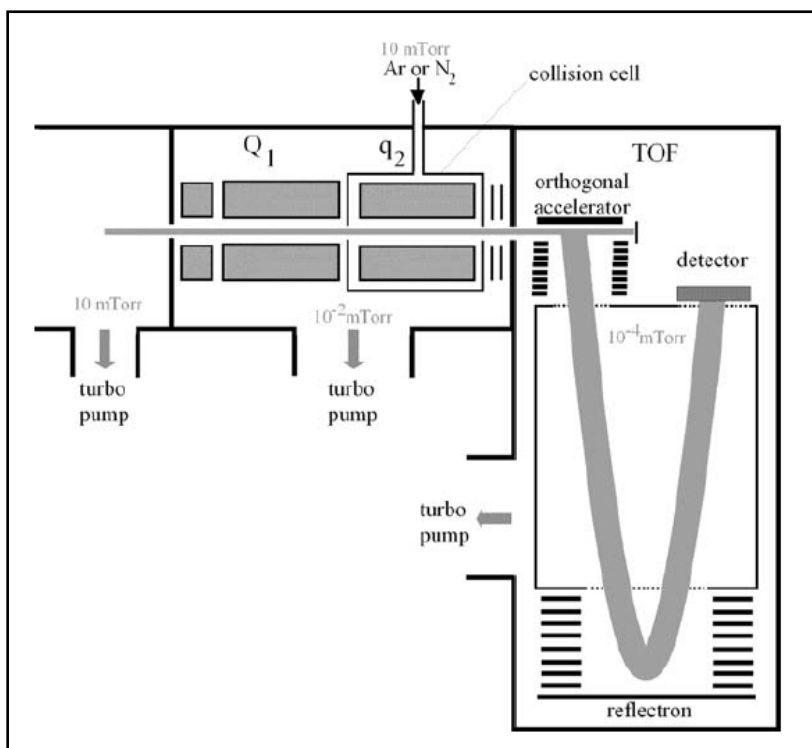
A TOF-MS műszereket nagy tömegpontosság és nagy felbontóképesség jellemzi, melynek köszönhetően sikeresen alkalmazhatóak ismeretlen molekulák szerkezetazonosításában. További előnyük az elméletileg korlátlan tömegtartomány, illetve hogy pulzáló működésükből adódóan sikeresen alkalmazhatóak MALDI ionforrással. Hátrányként említendő meg a hármas-kvadrupól készülékekhez viszonyított korlátozottabb lineáris tartomány, melynek következtében a technika kevésbé alkalmas mennyiségi meghatározásokra [Hoffmann et al. 2007]

- **Kvadrupól-repülési idő tömeg-analizátor (QTOF-MS):**

Egy komponens tömegspektrometriás azonosításához szinte elengedhetetlen feltétel a karakterisztikus fragmensionok vizsgálata. TOF-MS készülékek esetében (lévén *single-MS* készülékről van szó) a forrásban történő fragmentáción kívül nem áll rendelkezésre más lehetőség a molekulák szerkezetének feltérképezésére. Ezzel szemben a QTOF-MS, mely egy hibrid tandem-MS készülék, ötvözi a TOF-MS és a hármas kvadrupól műszerek előnyeit. Rendelkezik a TOF-MS készülékek minden előnyös tulajdonságával (nagy tömegpontosság és felbontóképesség), melyek mellett lehetőség van tandem-MS mérések elvégzésére is. A készülékre tekinthetünk úgy, mint egy hármas kvadrupól készülékre, melyben a  $Q_3$  helyén egy TOF-MS található.

Elrendezéséből adódóan hasonló mérési módokban üzemeltethető, mint egy hármas kvadrupól műszer: irányított MS/MS ion extrakció révén az MRM módhoz hasonló eredmény érhető el (ahol a fragmensionok mérése nagy tömegpontossággal történik), illetve felvehetjük egy kiválasztott  $m/z$  értékű ion teljes termék ion spektrumát (szintén nagy tömegpontossággal). Ezen kívül *single-MS* (csak TOF) módban elérhető az összes, TOF-MS készülékekkel kivitelezhető mérési mód.

Mivel a műszer képes a teljes tömegspektrum nagy tömegpontossággal történő rögzítésére, továbbá az ütközési cellában nagy hatékonyságú, célzott fragmentáció végezhető el, a QTOF készülékek a széleskörű kereső módszerek és az ismeretlen komponensek azonosításának hasznos eszközei [Grimalt et al. 2010].



2. ábra QTOF-MS műszer sematikus ábrája (forrás: Grimalt, 2010)

#### 2.4.3.4. Adatbázis alapú kereső módszerek

A sok komponensre lefedő kereső módszerek szempontjából a folyadékkromatográfia a gázkromatográfiával szemben rendelkezik egy nagy hátránnyal: amíg GC-MS technikák esetében, a fragmentáció nagyfokú reprodukálhatóságának köszönhetően, egy találat megerősítésére rendelkezésre állnak univerzális spektrumkönyvtárak, addig LC-MS technikáknál kevés ilyen könyvtár érhető el. Ennek oka főként az, hogy az LC-MS mérések során lejátszódó fragmentáció (legyen szó akár a *single-MS* készülékeknél a forrásban, vagy a tandem-MS készülékeknél az ütközési cellában történő fragmentációról) reprodukálhatósága meglehetősen alacsony, továbbá a különböző műszergyártók készülékeivel felvett spektrumok is nagymértékben különbözhetnek egymástól [Alder et al. 2006].

Ezt a hátrányt valamelyest kiegyenlítik a nagyfelbontású, pontos tömegmérést lehetővé tevő műszerek. A pontos tömegmérés eredményei ugyanis függetlenek a használt műszertől és mérési paraméterektől, melynek köszönhetően teljesül a könyvtár/adatbázis alapú keresések egyik alapfeltétele, a jó reprodukálhatóság.

A pontos tömeg adatbázison alapuló keresés első lépése az adatbázis (az alkalmazott szoftver által kezelhető formátumban történő) megszerkesztése. Az adatbázis általában a vizsgálandó molekulák nevét, azok összegképletét és (amennyiben rendelkezésre áll a molekula sztenderdje) retenciós idejét

tartalmazza. Egy találat megerősítése céljából gyakran egy adott molekula fragmensei is szerepelnek az adatbázisban.

Az adatbázis létrehozását követi a műszeres analízis és az adatfeldolgozás. Előbbi során a nagy információtartalmú teljes tömegspektrumot veszik fel, utóbbi során pedig a felvett adathalmazban keresik a lehetséges növényvédő szermaradványokat, illetve azok bomlástermékeit. Az ilyen típusú keresések esetében tehát először az LC-MS mérés történik meg, majd csak ezután keresnek a teljes tömegspektrumban (kvázi cél) komponenseket. Ezt a fajta megközelítést Hernández és mtsi. *post-target* keresésnek nevezték el, utalva arra, hogy az adatrögzítés nem, csak az adatfeldolgozás történik célkomponenses módon [Hernández et al. 2005]. A komponensek keresése céljából a szoftver kiszámolja az adatbázisban szereplő összegképletekhez tartozó (de)protonált forma  $m/z$  értékét, majd kiextrahálja az ezen érték körüli, a felhasználó által megszabott szélességű tömegtartományhoz tartozó kromatogramot (*extracted ion chromatogram*; EIC). Ez a tömegtartomány általában 5-20 mDa-ig terjed, melyet befolyásol a minta összetettsége, illetve az alkalmazott műszer tömegpontossága. A kiextrahált kromatogramban a szoftver csúcsokat keres, mely keresést számos, felhasználó által beállítható paraméter alapján végez. Ilyen paraméter lehet egy bizonyos jel/zaj viszony, csúcsterület stb., mely alatt figyelmen kívül hagyja a csúcsokat. Amennyiben rendelkezésre áll egy komponens sztenderdje, lehetőség van megadni retenciós időablakot is. Az így megtalált komponens azonosítását a pontos tömegmérés által nyújtott információk teszik lehetővé. Ilyen információk a pontos tömeg, az izotópmintázat és a legintenzívebb fragmensek, melyek ismeretében egyes esetekben sztenderd nélkül is nagy biztonsággal azonosítható egy molekula.

*(Egyes esetekben a keresést célszerű nem csak a protonált formára elvégezni, hanem a nátrium- és kálium-adduktokra is, mivel előfordulhat, hogy utóbbiak jóval nagyobb arányban jelennek meg a spektrumban. Ezzel elkerülhető az esetlegesen alacsony intenzitású hidrogén-addukt okozta téves negatív eredmény, azonban ezáltal jelentősen megnő az adatfeldolgozás ideje is. Nem minden komponens esetében érdemes tehát az  $[M+Na]^+$  és az  $[M+K]^+$  ionok vizsgálata. Azt viszont, hogy mely komponenseknél szükséges, az analitikusnak előzetes tapasztalataira, illetve irodalmi adatokra támaszkodva kell eldöntenie.)*

Adatbázis alapú kereső módszereket számos esetben alkalmaztak már sikerrel élelmiszerek, vízminták szerves szennyezőinek (köztük növényvédő szerek) kimutatására, melyek egytől egyig jól példázzák a nagyfelbontású, pontos tömegmérésre alkalmas műszerekben rejlő, különösen a széleskörű kereső módszerek során előnyt jelentő óriási potenciált [Díaz et al. 2012, Ferrer et al. 2006, Gómez-Ramos et al. 2011, Grimalt et al. 2010, Mezcua et al. 2009b].

## 2.4.4. Mérési módszerek validálása, minőségbiztosítása

### 2.4.4.1. Analitikai módszerek minőségbiztosításának szabályozása

A növényvédő szermaradvány mérések minőségbiztosításának egyik fontos alapköve az alkalmazott analitikai módszer validálása. Ennek szabályozását az ISO:17025 szabvány [Szabvány\_1], továbbá az ezt kiegészítő, minőségbiztosítási irányelveket tartalmazó SANCO/12495/2011 [Jogszabály\_9] dokumentumok látják el.

Gyakorlati útmutatásokkal és konkrét (javasolt) határértékekkel az utóbbi szolgál, melyek közül az alábbiakban a legfontosabbakat emelem ki.

Egy komponens azonosításához az alábbi szempontokat kell figyelembe venni:

- A módszer lehetőleg vizsgálja a (kvázi)-molekulaiont
- Magasabb tömeg/töltés értékű ionok általában több információt hordoznak (ezzel szemben pl. a vízvesztéssel járó fragmentáció magas m/z érték esetén sem informatív)
- Az izotópmintázat vizsgálata kiemelkedően hasznos információt szolgáltat

A különböző típusú, így különböző szelektivitással bíró MS készülékekre eltérő követelményeket határoz meg a dokumentum. Az alábbi táblázatban az egyes MS készülékekre javasolt követelményeket mutatom be:

**1. táblázat** Különböző MS technikákhoz javasolt követelmények komponensek azonosításához

	Single-MS	Nagyfelbontású single-MS	MS/MS
<b>Jellemző rendszer</b>	Kvadrupól, ioncsapda	TOF-MS, Orbitrap	Hármas-kvadrupól, Q-TOF
<b>Követelmény</b>	≥3 diagnosztikus ion (lehetőleg a kvázi-molekulaion is)	≥2 diagnosztikus ion (lehetőleg a kvázi-molekulaion is) Tömegpontosság: <5ppm Legalább 1 fragmension	≥2 termék ion

További követelmény a vizsgált ionok intenzitásaránya, melyet egy adott csúcs a legintenzívebb, ún. báziscsúcsához viszonyított jelintenzitásából számolhatunk. Elvárás, hogy a mintában megfigyelt intenzitásarány (egy meghatározott tőrés határon belül) egyezzen meg a mátrixhatásra korrigált sztenderd oldatban megfigyelt értékkel. Az LC-MS mérésekhez javasolt követelményeket az alábbi táblázat mutatja be.

## 2. táblázat LC-MS mérésekhez javasolt intenzitásarány követelmények

Relatív intenzitás (a báziscsúcs %-a)	Követelmény
> 50%	±20%
20%-50%	±25%
10%-20%	±30%
≤ 10%	±50%

Egy multikomponenses módszer validálásának fontos lépése a kinyerési hatások meghatározása. A SANCO dokumentum ilyen módszerek esetében elfogadási kritériumként a 70-120%-os tartományt határozza meg. Amennyiben egy komponensre kapott kinyerési hatásfok ebbe a tartományba esik és jól reprodukálható ( $RSD \leq 20\%$ ), nem szükséges az eredményt a hatásfok értékkel korrigálni.

### 2.4.4.2. Mátrixhatások

A növényvédő szer analitika területén az LC-MS műszerkapcsolást leggyakrabban ESI ionforrás alkalmazásával oldják meg. Ennek az ionforrásnak (az egyébként kevés) hibája közül az egyik, hogy egy adott komponensre adott válaszjel erősen függ a ko-eluálódó egyéb, legtöbbször mátrixból származó komponensektől. Ezt a jelenséget *mátrixhatásnak* nevezik.

A mátrixhatás jelentősége abban rejlik, hogy az ionizációt befolyásoló hatások csak a mintában jelentkeznek, a sztenderd oldatokban nem. Ennek következtében mennyiségi meghatározások során, amennyiben külső sztenderd kalibrációt alkalmazunk, alul- vagy felülbecsüljük a minta koncentrációját. Egy megfelelően pontos LC-(ESI)MS módszer fejlesztéséhez tehát elengedhetetlen, hogy a mátrixhatásokat minimalizáljuk, illetve számításba vegyük [Niessen et al. 2006].

A mátrixhatások meghatározásának több módja ismert. Klötzel és mtsi. az ún. *mátrixhatás profil* módszert alkalmazták, mely során vak mintamatrixot injektáltak a kromatográfiás oszlopra. Az oszlopból kilépő folyadékáramba egy T-elosztó segítségével sztenderd keverék oldatot keverték, és vizsgálták a célkomponensek intenzitását. Ugyanezt elvégezték oly módon, hogy a vak mintamatrix helyett tiszta oldószert injektáltak. A két injektálás között megfigyelhető jelintenzitásbeli különbség a mátrixhatásra vezethető vissza [Klotzel et al. 2005].

Másik lehetőség a mátrixhatások mennyiségi kimutatására, amikor a tiszta oldószerben és a vak mintamatrixban felvett kalibrációs egyenesek meredekségét hasonlítják össze. Bármilyen az oldószerben felvett egyenestől eltérő meredekség jelcsökkentő vagy jelnövelő hatásra utal.

Mátrixhatás különösen a bonyolultabb összetételű minták (pl. fűszerek, citrusfélék, hagyma stb.) esetében figyelhető meg, azonban szinte minden mintában számolnunk kell valamilyen mértékű jelváltoztató hatással.

Elkerülhetetlen és a mennyiségi meghatározások során hibát okozó mivolta miatt mindenképpen szükséges a mátrixhatások csökkentésére, illetve a velük való korrigálásra törekedni. Az ehhez szóba jöhető technikák alapvetően három csoportba sorolhatóak: (i) minta-előkészítés változtatása, (ii) mérési paraméterek változtatása, illetve (iii) mátrixhatást kiküszöbölő kalibrációs technikák. Ezek közül a fontosabbakat említem meg felsorolás szinten:

- szelektívebb minta-előkészítés
- minta hígítása [Kruve et al. 2009]
- ionizációs mód változtatása (ESI+ helyett ESI-, vagy fordítva, ESI helyett APCI)
- kromatográfiai paraméterek változtatása (más mozgófázis és/vagy additív, hosszabb oszlop, lassabb gradiens felfutás stb.)
- izotópjelölt belső sztenderd alkalmazása
- mátrixhoz illesztett vagy sztenderd addíciós kalibráció alkalmazása
- (ún. *Echo-technika* alkalmazása [Alder et al. 2004])

#### 2.4.4.3. Mennyiségi meghatározás lehetőségei

A kvantitatív mérések elengedhetetlen feltétele a kalibráció, mely során a mintában kapott jelintenzitást hasonlítjuk össze az ismert mennyiségű sztenderdet tartalmazó oldatban kapott jelintenzitással. A kalibrációt többféleképpen végezhetjük el, melyek közül a legfontosabbak a következők:

- **külső kalibráció:** a kalibráció legegyszerűbb módja, mely során a vizsgált komponenseket ismert mennyiségben tartalmazó sztenderd oldathoz hasonlítjuk a minta oldatokat. A sztenderd oldatban a komponensek tiszta oldószerben vannak feloldva. A technika előnye annak egyszerűségében rejlik, mivel egyetlen kalibrációval számos mintát tudunk vizsgálni. Hátránya azonban, hogy az előző pontban említett mátrixhatásokat teljes mértékben figyelmen kívül hagyja. Létjogosultsága a növényvédő szer analitikában emiatt csak olyan, validálás során kimért adatokkal alátámasztott esetekben lehet, amikor a mátrix jelváltoztató hatása elhanyagolható (pl. néhány célkomponens mérése, *dilute-and-shoot* minta-előkészítés). Gyakorlati jelentősége a multikomponenses növényvédő szer meghatározások területén jóformán nincs.



- **mátrix-illesztett kalibráció:** az egyik leggyakrabban alkalmazott kalibrációs eljárás, mely során a vizsgálni kívánt komponensektől mentes mintán elvégezzük a minta-előkészítést, majd a kapott extraktumot dúsítjuk különböző koncentrációszintekre. Mivel az így kapott kalibrációs sor is tartalmazza a mérést befolyásoló mátrixkomponenseket, ugyanolyan mátrixhatás terheli a sztenderd és a minta oldatot. Ennek köszönhető, hogy az így végzett kalibrációval kiküszöbölhető, vagy legalább elfogadható szintre mérsékelhető a mátrixhatás. Az ok, amiért mégsem lehet minden esetben teljesen kiküszöbölni a mátrixhatást az az, hogy a kalibrációhoz választott vak minta összetétele nem feltétlenül egyezik meg a vizsgált mintáéval (pl. narancs és narancs között is van eltérés). Az eljárás további hátránya, hogy egyes esetekben (különösen sok komponens vizsgálata esetén) nehéz lehet vak minta találása, továbbá az összes vizsgált mátrixban fel kell venni a kalibrációs egyenest, amely jelentősen megnöveli a vizsgálat idejét (mind a laboratóriumi munka idejét, mind pedig a műszeridőt). Az eljárás utóbb említett hátrányára megoldást jelent az aktuális SANCO dokumentum által is engedélyezett reprezentatív mátrixok használata. Ennek értelmében elegendő a kalibrációt egy a többi mintát jól reprezentáló mátrixban felvenni, és ehhez viszonyítani a mintákat. A megfelelő reprezentatív mátrixok kiválasztásához a SANCO dokumentum tesz ajánlást, azonban az eljárás rutinban történő alkalmazása előtt mindenképpen ajánlott elvégezni annak ilyen terű validálását.
- **sztenderd addíció I.:** Az eljárás lényege, hogy (hasonlóan a mátrix-illesztett kalibrációhoz) a minta-előkészítés során kapott extraktumhoz adagolnak sztenderd keveréket, különböző koncentrációszintű kalibrációs pontokat kialakítva ezzel. Az eljárás előnye, hogy a kalibráció a minta saját mátrixában történik, így korrigálható a mátrixhatás. Az egyes mintatípusokban felvett kalibrációkat más, hasonló típusú mátrixhoz mátrix-illesztett kalibrációs egyenesként fel lehet használni, csökkentve ezzel az analízis teljes idejét. A módszer hátrányaként említendő meg, hogy olyan esetben, amikor növényvédő szert már eleve tartalmazó mintához adagoljuk a sztenderdet, a mintában eredetileg jelenlevő és a hozzáadott többletmennyiség összesen már kívül eshet a mérőműszer lineáris tartományán. Ebben az esetben a minta hígítása és újbóli vizsgálata szükséges.

- **sztenderd addíció II.:** a SANCO dokumentum által szintén sztenderd addícióként nevezett eljárást főként határérték körüli eredmények megerősítő méréséhez, illetve abban az esetben ajánlják, ha nem hozzáférhető megfelelő vak minta.

A vizsgált mintát három (vagy több) részre osztják. Ezek közül egyet megvizsgálunk önmagában, a többi részhez pedig sztenderd keverék oldatot adagolnak, különböző koncentrációjú kalibrációs pontokat kialakítva ezzel. A fő különbség az eddig leírt és ezen eljárás között, hogy ebben az esetben a minták dúsítását még az extrakciós lépés előtt végzik el, melynek köszönhetően az eredményeket nemcsak a mátrixhatásokra, hanem az extrakciós lépés kinyerési hatásfokára nézve is korrigálja.

*(Megj.: Dolgozatomban a sztenderd addíció kifejezés alatt minden esetben a fentebb leírt „sztenderd addíció I.” eljárást értem.)*

- **izotóppal jelzett belső sztenderd:** az eljárást a mennyiségi meghatározások legjobb eszközeként tartják számon. Az izotóppal jelzett sztenderdek a tömegüket leszámítva minden fiziko-kémiai tulajdonságukban megegyeznek célkomponenssel. Ennek köszönhetően a két komponens ugyanúgy viselkedik a minta-előkészítés, a kromatográfiás elválasztás stb. során. MS detektálás esetén az izotóppal jelzett sztenderd így tökéletes eszköze a kvantitatív meghatározásnak, mivel segítségével teljes mértékben kiküszöbölhető az összes, egyébként a pontosságot rontó tényező (pl. kinyerési hatásfok, mátrixhatás, ionizációs hatásfok vagy injektálási térfogat ingadozása, pontatlan térfogatmérésből származó hibák stb.) hatása. Az eljárás számos előnye mellett hátrányként említendő meg, hogy eltérő tömegük miatt a sztenderdekre is be kell állítani komponensenként legalább két pásztázandó MRM átmenetet. Ennek káros hatása a multikomponenses módszerek esetében mutatkozik meg, mivel ezáltal jelentősen csökkenhet a vizsgálható komponensek száma. Másik, de talán még fontosabb hátrány az izotóppal jelzett sztenderdek rendkívül magas ára, mely miatt a technika főként a kisszámú komponenst vizsgáló módszerek (egy adott növényvédő szer csoport, mikotoxin mérések stb.) eszközeként lelhető fel az irodalomban [Li et al. 2013, Marín et al. 2009, Zachariasova et al. 2010].

- **(kísérő sztenderd:** a klasszikus értelemben vett belső sztenderddel történő kalibráció multikomponenses módszerek esetében, a nagyszámú vizsgált komponens jelentősen eltérő tulajdonsága, továbbá a különböző mátrixhatások miatt, nem kivitelezhető. Érdemes azonban említést tenni a szinte minden mérés során használt ún. kísérő sztenderdek (*surrogate standard*) alkalmazásáról. Kísérő sztenderdeknek nevezzük azt a mintához adott komponenst, mellyel célunk, hogy az analitikai eljárás során bekövetkezett kisebb pontatlanságokat (pontatlan térfogatmérés, injektálási térfogat vagy kinyerési hatásfok ingadozása stb.) kimutassuk, korrigáljuk. Kísérő sztenderdet az analízis bármely fázisában adhatunk a mintához (akár többet is), lépésről lépésre vizsgálva ezzel a mérési eljárást, leggyakrabban mégis az extrakciós lépés előtt, illetve az injektálást megelőzően adják a mintához. A kísérő sztenderddel szemben támasztott követelmények: (i) a minta ne tartalmazza, (ii) ne szerepeljen a célkomponensek között, (iii) legyen stabil a mérés teljes ideje alatt, (iv) legyen jól mérhető a használt mérés technikával, illetve, (v) amennyiben az eredményeket korrigáljuk a kísérő sztenderdre, kinyerési hatásfoka minden mintatípusban legyen 100% vagy akörüli.

A növényvédő szer analitikában leggyakrabban alkalmazott kísérő sztenderd a TPP (trifenil-foszfát), ám az izotóppal jelzett sztenderdek is megfelelnek erre a célra.)

## 2.5. BOMLÁSTERMÉKEK JELENTŐSÉGE ÉS VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEI

### 2.5.1. A nem célkomponenses módszerek jelentősége

Általánosságban elmondható, hogy manapság a növényvédő szer analitika területén túlnyomó többségben célkomponenses módszereket alkalmaznak, melyek célkomponensek egy (bizonyos szempontok alapján) előre meghatározott körét vizsgálják. A mérésekhez legtöbbször GC-MS, GC-MS/MS, illetve LC-MS/MS készülékeket alkalmaznak, leggyakrabban MRM mérési módban, kihasználva az ezen műszerek által nyújtott előnyöket (széles mérési tartomány, nagy érzékenység és nagyfokú szelektivitás) [Alder et al. 2006, Cervera et al. 2010, Frenich et al. 2004, García-Reyes et al. 2007b, Hiemstra et al. 2007, Kmellár et al. 2008, Picó et al. 2004, Polgár et al. 2012]. Az ilyen módszerekkel vizsgált komponensek száma általában kb. 100-200, mely számnak az említett mérőműszerek tulajdonsága szab határt. Az MRM módban monitorozott átmenetek száma ugyanis korlátozott, mivel a kvadrupól-alapú készülékek egyszerre csak egy átmenetet tudnak vizsgálni. Túl nagyszámú komponens vizsgálata esetén ez a ciklusidő oly mértékű növekedéséhez vezethet, mely már kedvezőtlenül befolyásolja a kromatográfiás csúcs alakját, továbbá a túl kevés pontból felvett csúcs információ-vesztéssel is jár. Ennek köszönhető, hogy MS/MS készülékekkel a maximálisan mérhető komponensek száma kb. 300. *(Érdemes megjegyezni, hogy ez a szám egyes esetekben tovább növelhető időablakok bevezetésével. Az eljárás lényege, hogy a teljes kromatográfiás futtatási időt több szakaszra osztjuk, melyekben lehetőségünk van különböző MRM átmenetek vizsgálatára. Ennek köszönhetően egy adott átmenetet csak abban az időablakban szükséges monitorozni, melyben a komponens retenciós ideje található. Ezzel az eljárással jelentősen csökkenthető a ciklusidő, melynek köszönhetően (i) megnövelhető a maximálisan mérhető komponensek száma, (ii) a több adatpontból adódóan javul a mérés reprodukálhatósága, illetve gyors UPLC módszerek esetén sem lép fel információ-vesztés és (iii) hosszabb ideig van mód egy adott átmenet monitorozására, mely érzékenységbeli javulást eredményez. Az eljárás sikeres alkalmazásának azonban elengedhetetlen feltétele az időablakok óvatos optimalálása, a kromatográfiás módszer robusztussága, továbbá a komponensek retenciós idejének ismerete).*

Az ilyen célkomponenses módszerek nagy hátránya, hogy a vizsgált komponenseken kívül minden más komponensre „vak”. Legtöbbször emiatt a ritkán használt vagy betiltott szerek nem szerepelnek a vizsgált komponensek listáján, melynek következtében egy ilyen szert tartalmazó minta vizsgálata során garantált a téves negatív eredmény. A célkomponenses módszerek alkalmazhatóságának további gátat szab, hogy a bomlástermékekről meglehetősen kevés információ áll rendelkezésre, továbbá kevés a hozzáférhető bomlástermék sztenderd is.

Figyelembe véve az elmondottakat, továbbá azt, hogy egyes bomlástermékek hasonló perzisztenciával és toxicitással bírhatnak, mint az alapmolekulák [Belfroid et al. 1998], továbbá egyes esetekben az alapmolekulánál nagyobb koncentrációban találhatóak meg a mintákban [Hernández et al. 2008a], belátható, hogy mindenképpen szükséges nem célkomponenses módszerek fejlesztése és rutinban történő alkalmazása. Az utóbbi években a növényvédő szer bomlástermékek vizsgálata egyre fontosabb témává vált. Számos publikáció született, melyekben ismeretlen bomlástermékeket azonosítottak [Ibáñez et al. 2006, Picó et al. 2007, Soler et al. 2007, Thurman et al. 2005], melyek közül néhány később be is került az adott komponens MRL definíciójába (pl. fenthion és annak oxigén analógja, azok szulfoxid- és szulfonszármazékai, fenthion-ban kifejezve).

Ismeretlen molekulák (pl. növényvédő szer bomlástermékek, a hatóanyag szintetizálása során keletkező melléktermékek stb.) kimutatásához és azonosításához (kevés kivételtől eltekintve) nem elegendő a hármas-kvadrupól készülékek által nyújtott információ. Ennek oka részben a technika kisebb felbontóképessége, melynek következtében a technika nem képes az izobár (azonos nominális tömeggel bíró) komponensek megkülönböztetésére, másrészt pedig a pásztázó módban elérhető kisebb érzékenység. Ezen hátrányai a technikát összetett mátrixú élelmiszerminták esetében alkalmatlanná teszik ismeretlen molekulák nem célkomponenses vizsgálatára. Erre a célra mindenképpen nagy felbontóképességű és pontos tömegmérést biztosító készülék szükséges, melyek közül leggyakrabban TOF-MS, illetve QTOF-MS műszereket alkalmaznak [Díaz et al. 2012, Gómez-Ramos et al. 2011, Hernández et al. 2009, Hernández et al. 2008a, Soler et al. 2007]. Az ilyen készülékekkel elérhető nagy tömegpontosság ( $\Delta m < 5 \text{ ppm}$ ) és felbontóképesség ( $\sim 10.000$ ), illetve a pásztázó módban elérhető nagy érzékenység már elegendő ismeretlen molekulák összegképletének meghatározására és (informatív fragmentáció esetén) azok szerkezetazonosítására is. Mivel a (Q)TOF-MS technikával a teljes pásztázási módban mérhető komponensek száma gyakorlatilag korlátlan, az ilyen műszerek a nem célkomponenses mérések kifejezetten alkalmas eszközei.

## 2.5.2. Növényvédő szerek metabolizációja/degradációja

Élelmiszer-biztonsági és analitikai szempontból a növényvédő szerek bomlásirányának, illetve a bomlástermékek keletkezési módjának nincs jelentősége. Ettől függetlenül fontosnak tartom, hogy dolgozatomban, ha röviden is, de ejtsek néhány szót a növényvédő szerek bomlási mechanizmusáról.

Egy növényvédő szer kijuttatását követően a környezetben szinte rögtön megkezdődik annak bomlása, melyet számos tényező idéz elő. Ezek közül élelmiszer-biztonsági vonatkozása főként a (i) kezelt növény felületén környezeti tényezők hatására végbemenő bomlásnak, illetve (ii) a magában a kezelt növényben *in vivo* végbemenő metabolizációnak van. Ezen kívül, bár kisebb mértékben, a kezelt növény felületén élő baktériumok lebontó folyamatainak eredményeképp is keletkezhetnek bomlástermékek [Lénárt et al.].

A bomlási reakciók közül kiemelendő a fény hatására lejátszódó fotodegradáció. Ennek mértéke nagyban függ a növényvédő szertől (mennyire fotostabil), a besugárzás időtartamától, a szer kijuttatási formájától (pl. egy felületen ható szer jobban fog bomlani, mint egy talajból felszívódó) és számos egyéb tényezőtől (pl. üvegházban kisebb mértékű a bomlás, mint fóliasátorban, mivel az üveg kiszűri az UV sugarak egy részét). A kezelt növény lebontó folyamatainak következtében végbemenő bomlás, a lebontó folyamatok összetettségéből adódóan, meglehetősen sokféle reakciót takar. Csoportosításuk a reakciók időbeni sorrendjének megfelelően történik. Ezek alapján megkülönböztetünk I., II., illetve III. fázisú reakciókat. Az I. fázisú reakciókban az alapmolekula egy vagy több, főként oxidációs, redukciós, illetve hidrolízises folyamaton esik át, mely reakció(k) terméke egy polárosabb, vízdékonyabb és általában kevésbé toxikus bomlástermék. Az I. fázisú reakciók leggyakrabban lejátszódó fajtája az oxidáció, melyek általában valamilyen enzim (leggyakrabban citokróm P450 monooxygenáz, peroxidázok és polifenol oxidázok) hatására mennek végbe. II. fázisú reakcióban vagy az alapmolekula vagy egy I. fázisú reakcióban keletkezett bomlástermék vesz részt, mely során annak egy poláros molekulával (általában valamilyen cukor, aminosav vagy glutation) történő konjugációja zajlik le. Az így keletkezett bomlástermék polaritása tovább nő, ezzel párhuzamosan fitotoxicitása lényegében megszűnik, továbbá bio-hozzáférhetősége csökken. Az ilyen típusú reakciók enzimeit a glükóztranszferázok, leggyakoribb cukordonoként pedig az uridin difoszfoglükóz vesz részt ilyen konjugációs reakciókban. III. fázisú reakciónak a másodlagos konjugációs reakciókat nevezik, mely során egy II. fázisú bomlástermék további konjugációs reakcióban vesz részt, melyben újabb cukor, aminosav stb. vagy pedig egy almasav kapcsolódik a molekulára [Van Eerd et al. 2003].

*(Megj.: a növényvédő szer bomlástermékekről szóló angol nyelvű irodalomban többféle elnevezést találhatunk, melyek az adott molekula keletkezésének módjára utalnak. A gyakran használt 'metabolite', illetve 'degradation product' mellett a legáltalánosabb elnevezés a 'transformation product', melyre azonban nem találtam megfelelő magyar elnevezést. Mivel munkám során az elsődleges céloom nem a bomlástermékek eredetének felderítése volt, a szövegben konzekvensen a 'bomlástermék' elnevezést fogom használni, melyen minden esetben az előbb említett általános angol kifejezést értem, függetlenül attól, hogy bomlási vagy metabolikus reakcióban keletkezett molekuláról van szó.)*

### **2.5.3. Bomlástermék-kereső módszerek**

A kifejezetten bomlástermékek keresése céljából elvégzett kísérleteket kivitelezés alapján alapvetően kétfajta csoportba lehet sorolni:

(i) korábban már megvizsgált, valamilyen növényvédő szermaradványt tartalmazó „pozitív” minta újbóli vizsgálatával, melyben a benne talált anyamolekula bomlástermékét keresik, kvázi célirányosan. A módszer előnye, hogy valamelyest célirányos mivoltának köszönhetően egyszerűsödik a keresés, mivel csak néhány komponens lehetséges bomlástermékére kell koncentrálni. Ugyanez azonban a módszer hátránya is, mivel az első mérés során kapott esetleges téves negatív eredmény következtében figyelmen kívül hagyhatjuk a mintát. Ilyen eset léphet fel például akkor, ha az alapmolekula már teljesen elbomlott, annak bomlástermékei viszont még megtalálhatóak a mintában.

(ii) beállított laboratóriumi vagy szántóföldi kísérlettel, melyben egy (vagy néhány) növényvédő szer bomlásirányát és –kinetikáját vizsgálják. Ily módon lehetőség van ugyanazon mintamátrixból kezelt és kezeletlen (kontroll) mintához jutni, melyek összehasonlításával kiszűrhetőek az esetleges bomlástermékek [Hernández et al. 2008b].

Növényvédő szer bomlástermékek vizsgálata során az első, analitikai szempontból felmerülő kérdés a minta-előkészítés kérdése. Egy célkomponenses módszer esetében, ahol komponensek egy általunk meghatározott körét vizsgáljuk, rendelkezünk némi információval a mérni kívánt komponensek mintából való kinyerhetőségéről. Ezzel szemben egy nem célkomponenses módszerrel mérve (különösen ismeretlen molekulák esetében) ilyen információ nem áll rendelkezésünkre. Emiatt egy bomlástermék-kereső módszer fejlesztésének első fontos feladata a használni kívánt minta-előkészítés helyes megválasztása. A legfontosabb szempont, hogy vele a lehető legtöbb komponens kinyerhető legyen a mintából, tehát mindenképpen valamilyen multikomponenses módszert kell választanunk.

Vízminták vizsgálata során valamely univerzális szorbenst alkalmazó SPE-alapú technikák lehetnek különösen alkalmasak erre a célra, mivel az eljárás velejárá előnyeként az extrakció mellett az esetlegesen kis koncentrációban jelen lévő bomlástermékek dúsítása is megtörténik. Ennek köszönhetően az amúgy kis koncentrációban jelen lévő komponensek is kimutathatóak és azonosíthatóak lesznek [Hernández et al. 2008a, Ibáñez et al. 2008].

Élelmiszerminták esetében az elsődleges szempont szintén az, hogy a minta-előkészítési eljárás a lehető legtöbb komponens kinyerését lehetővé tegye. Erre a célra a korábban ismertetett módszerek közül, azok egyszerűsége és kiemelkedő multikomponenses mivolta miatt, a QuEChERS és a közvetlen injektálós módszer tekintető a legalkalmasabbnak. Az irodalomban ezen kívül fellelhetők egyéb módszerek is (pl. a minta héjának metanollal történő lemosása [García-Reyes et al. 2005, Thurman et al. 2005]), azonban azok alkalmazhatósága inkább a kifejezetten bomlástermék-keresés célzatú, mintsem a „rutin”, nem célkomponenses mérésekre korlátozódik.

A minta-előkészítés mellett a megfelelő mérőműszer kiválasztása is fontos feladat. Erre a célra a nagyfelbontású, nagy tömegpontosságú műszerek (TOF-MS, Orbitrap) alkalmasak.

A mérést követően következik az ilyen típusú vizsgálatok legfontosabb szakasza, az adatfeldolgozás, másik (találó) nevén az adatbányászat, melynek első lépése a lehetséges bomlástermék csúcsok keresése a teljes tömegspektrumban. A feltételezett bomlástermék csúcsok keresése többféleképpen végezhető el:

- **Csúcsok manuális keresése a tömegspektrumban:** az eljárás lényege, hogy a felvett tömegspektrumot manuálisan, csúcsról csúcsra vizsgálják meg lehetséges bomlástermék után kutatva. A módszer nyilvánvaló hátránya, hogy (figyelembe véve a teljes spektrum információgazdagságát) a manuális adatfeldolgozás rendkívül lassú, időigényes folyamat. Ezen felül, mivel a bomlástermékek általában kis koncentrációban vannak jelen a mintákban, azok csúcsai nem minden esetben vehetőek észre. Említett hátrányai ellenére az eljárásnak mégis van létjogosultsága, melyet az ily módon elvégzett sikeres bomlástermék-kutatások is igazolnak [García-Reyes et al. 2005, Thurman et al. 2005]. Érdekes azonban megjegyezni, hogy az említett esetekben a bomlástermék molekulák jellegzetes izotópmintázata jelentősen megkönnyítette azok felfedezését (klórtartalmú imazalil és prochloraz bomlástermékek). Ezek alapján kijelenthető, hogy ez az eljárás főként a jellegzetes izotópmintázattal bíró bomlástermékek esetében vezethet sikerre.



- **Kezelt és kezeletlen minta összehasonlítása:** a bomlástermék-keresés egy érdekes módja, mikor egy vak és egy pozitív mintát hasonlítanak össze. A vizsgálatot általában beállított mezőgazdasági kísérlet előzi meg, mely során csak a vizsgált minták egy részét kezelik a növényvédő szerrel, míg a kezeletlen mintákat kontroll mintaként fogják felhasználni. Az így kapott két mintát megvizsgálják, majd a két eredményt összehasonlítják. Ez az összehasonlítás jelentősen egyszerűsíthető a kifejezetten erre a célra kifejlesztett szoftverek (pl. MetaboLynx; Waters) használatával. Mivel a két minta mindössze annyiban különbözik egymástól, hogy az egyiket kezelték növényvédő szerrel, a másikat nem, az eljárás értelmében a kezelt mintában talált minden olyan csúcsot, mely a kezeletlen mintában nem látható, lehetséges bomlásterméként (vagy alap növényvédő szer molekulaként) kezelnek, és ennek megfelelően további vizsgálatoknak vetnek alá. Ezt az eljárást is sikerrel alkalmazták már korábban, pl. fenthion [Picó et al. 2007] és buprofezin [Grimalt et al. 2007] bomlástermékeinek azonosítására.
- **„Fragmentáció-degradáció”:** Az eljárás alapelve egy olyan megfigyelés, miszerint hasonlóság áll fenn egy molekula természetben történő bomlása, illetve az MS készülékben történő fragmentációja között. Ennek az az oka, hogy mindkét esetben a molekula leggyengébb kötése fognak felszakadni a legnagyobb valószínűséggel. Ennek a megfigyelésnek a gyakorlati haszna abban rejlik, hogy egy növényvédő szer molekula fragmensionjait vizsgálva annak bomlástermékei felfedezhetőek lesznek. Ehhez a fragmensionok kromatogramját kell megvizsgálni. Abban az esetben, ha több csúcsot figyelünk meg, az egy olyan molekula jelenlétére utal, mely egy az alapmolekulával közös (vagy legalábbis azonos  $m/z$  értékű) fragmensionnal bír, tehát az egy feltételezhető bomlástermék. García-Reyes és mtsi. sikerrel alkalmazták a technikát amitraz (körte) és malathion (bors) bomlástermékek azonosítására [García-Reyes et al. 2007c]. A módszer sikeres alkalmazásának kulcsa, hogy előzetes információval rendelkezünk az alap növényvédő szer molekula fragmentációs útvonaláról.
- **Diagnosztikus fragmens alapú keresés:** Ez a technika szoros összefüggésben áll az imént ismertetett „fragmentáció-degradáció”-val, valamelyest annak alapjának tekinthető. Ez a technika is fragmensionok, még hozzá a diagnosztikus fragmensionok vizsgálatán alapszik. Diagnosztikus fragmensionnak nevezzük azokat a fragmenseket, melyek jellegzetesek egy adott molekulára, illetve molekulacsoportra. Az ilyen fragmensek monitorozásával kimutathatók az azonos molekularészletet vagy funkciós csoportot tartalmazó molekulák (pl. egy adott csoportba tartozó növényvédő szerek vagy azonos fragmensenel bíró bomlástermékek). Így például az  $m/z$  70,0400 és 125,0153 fragmensionok a triazol, az  $m/z$  142,9926 fragmension a szerves foszforsav-észter növényvédő szerek diagnosztikus fragmensionjai stb. [Lacina et al. 2010].

A technika nem csak a növényvédő szer kutatások hasznos eszköze, hanem bármilyen, azonos molekuláris szerkezettel bíró vegyületcsoport (pl. hasonló szerkezetű gyógyhatású hatóanyagok) vizsgálatára is alkalmas [Zheng et al. 2009].

- **Prediktív MRM lista:** A legújabb hármaskvadrupól készülékek szoftvere már lehetővé teszi az ún. prediktív MRM vizsgálatokat. Az ilyen mérések során a szoftver a molekula szerkezete és az előzetes fragmentációs információk alapján olyan MRM átmeneteket generál, melyek az adott molekula feltételezett bomlástermékeire jellemző. A módszer segítségével az egyébként főként célkomponens vizsgálatokra alkalmas hármaskvadrupól készülékekkel is sikeresen kutathatók a növényvédő szer bomlástermékek. Az eljárás a növényvédő szer analitikában egyelőre nem túl elterjedt, melynek oka egyrészt annak újdonsága lehet, továbbá, hogy a nem célkomponens vizsgálatokhoz az analitikusok első választása továbbra sem a hármaskvadrupól készülék. A módszert főként a gyógyszerkutatásban alkalmazzák sikerrel, ennek ellenére növényvédő szer analitikai vonatkozású eredményekről is számoltak már be [Yasuor et al. 2010], rámutatva az eljárás jövőbeni elterjedésének lehetőségére.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Ahogy azt az irodalmi áttekintésben is bemutattam, az egyre növekvő növényvédő szer felhasználás miatt jelentősen felértékelődött az élelmiszerláncban történő szermaradvány-vizsgálatok fontossága. Figyelembe véve az engedélyezett (így tehát mérendő) hatóanyagok számát belátható, hogy a mai növényvédő szer analitika egyik legfontosabb feladatának a sok komponens kimutatására alkalmas ún. multikomponenses módszerek fejlesztése tekinthető.

Ennek megfelelően munkám során céлом volt az ilyen céloknak megfelelő LC-MS módszerek fejlesztése.

1. Multikomponenses módszer fejlesztése növényi olajok növényvédő szer tartalmának meghatározására LC-MS/MS technikával. Ebben a témakörben az alábbi célokat tűztem ki:

- mérendő komponensek kiválasztása és az MS/MS detektálás optimalálása
- kromatográfiás elválasztás optimalálása
- a „módosított QuEChERS” minta-előkészítési eljárás alkalmazhatóságának vizsgálata növényi olaj mintákon
- különböző d-SPE szorbenskombinációk a módszer teljesítmény-jellemzőire gyakorolt hatásának vizsgálata
- a kifejlesztett módszer validálása

2. Automatizált, adatbázis alapú kereső módszer fejlesztése élelmiszerek növényvédő szer tartalmának meghatározására nem célkomponenses módon LC-TOFMS technikával. Ebben a témakörben az alábbi célokat tűztem ki:

- nagyszámú komponenst tartalmazó teoretikus pontos tömeg adatbázis létrehozása, mely lehetőség szerint tartalmazza a célkomponensek fragmenseit is
- keresési feltételek kiválasztása irodalmi adatok alapján
- a kifejlesztett kereső módszer alkalmazása valódi élelmiszermintákon
- az automatizált keresés hatékonyságának értékelése ugyanazon minták LC-MS/MS és LC-TOFMS módszerrel kapott eredményeinek összevetésével

3. Szisztematikus, adatbázis alapú növényvédő szer bomlástermék-kereső módszer fejlesztése LC-TOFMS technikával. Ebben a témakörben az alábbi célokat tűztem ki:

- az előző pontban létrehozott adatbázist felhasználva szisztematikusan, gyorsan és egyszerűen használható bomlástermék-kereső eljárás fejlesztése fragmensionok monitorozása révén
- a kifejlesztett módszer alkalmazása valódi élelmiszermintákon
- növényvédő szer bomlástermékek keresése nem célkomponenses módon
- az esetlegesen detektált (lehetséges) bomlástermékek azonosítása

A fent leírt célokat megvalósítva, reményeim szerint, a gyakorlatban jól alkalmazható módszereket tudok kifejleszteni, melyek lehetővé teszik:

- (i) a bonyolult összetételű olajmintákban történő növényvédő szer vizsgálatokat,
- (ii) a nem célkomponenses, széleskörű keresést, mellyel átfogóbb képet kaphatunk a minta szennyezettségéről, illetve
- (iii) növényvédő szerek (akár ismeretlen) bomlástermékeinek kimutatását és azonosítását.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. FELHASZNÁLT VEGYSZEREK

A mérések során felhasznált nagy tisztaságú növényvédő szer sztenderdeket a Sigma-Aldrich cégcsoporttól (Schnelldorf, Németország) szereztem be. Az egyéni sztenderd oldatokat ezekből a (többnyire) kristályos szerekből készítettem el szerves oldószerben feloldva őket. Erre a célra HPLC-tisztaságú acetonitrilt alkalmaztam (Merck; Darmstadt, Németország). Amennyiben a sztenderd nem oldódott fel acetonitrilben (feloldatlan kristályszemcsék maradtak az üvegben, az oldat opálössé vált stb.), az újból bemért szert dimetil-formamidban (DMF; Merck) oldottam fel. Az így kapott sztenderd oldatok koncentrációi kb. 1000-3000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ -nek adódtak, mely oldatokat mélyhűtőben,  $-18^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

A hígításokkor, illetve a kromatográfiai elválasztás során eluensként alkalmazott nagy tisztaságú ionmentes vizet ( $>18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ) egy Millipore Milli-Q rendszer szolgáltatotta (Bedford, USA). Az MS készülékben történő ionizációt elősegítendő a vizes eluenshez 0,1 V/V% hangyasavat adtam (Sigma-Aldrich).

A minta-előkészítések során alkalmazott magnézium-szulfát (vízmentes), nátrium-klorid és nátrium-acetát sók, illetve az extrakció során alkalmazott ecetsav a Scharlau cégtől, míg a PSA, GCB és  $\text{C}_{18}$  d-SPE tisztító szorbensek a Sigma-Aldrich cégtől származtak. A mintákat a HPLC rendszerbe történő injektálásukat megelőzően  $0,45 \mu\text{m}$ -es PTFE szűrőn szűrtem át.

### 4.2. MŰSZEREK

#### 4.2.1. HPLC-MS/MS (QqQ)

A tandem-MS mérések során egy hibrid lineáris ioncsapdás hármaskvadrupól elrendezésű MS/MS készüléket alkalmaztam (Applied Biosystems 3200 QTRAP LC/MS/MS system), mely egy TurboV IonSpray ESI ionforrást tartalmazott, melyet pozitív ionizációs módban üzemeltettem.

A tömegspektrométer egy Agilent 1100 HPLC rendszerhez volt kapcsolva (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), mely tartalmazott egy az eluensek gáztalanítására szolgáló ún. vákuum degasser-t, egy kétcsatornás pumpát, egy automata mintaadagolót és egy az analitikai oszlop fűtését szolgáló termosztátot.



*3. ábra Applied Biosystem 3200 QTRAP MS/MS műszer*

Az alkalmazott mérési paramétereket a vonatkozó részeknél taglalom részletesebben.

Az ionforrásban, illetve az ütközési cellában inert nitrogén gázt alkalmaztam. A mérési adatok rögzítését és feldolgozását az Analyst szoftver 1.4.2. sz. verziójával végeztem.

#### **4.2.2. HPLC-TOFMS**

A kromatográfiás elválasztást egy Agilent 1200 HPLC rendszeren végeztem, mely egy vákuum degasser-t, egy automata mintaadagolót és egy kétcsatornás pumpát tartalmazott.

A tömegspektrometriás detektálást egy Agilent 6220 TOF tömegspektrométeren végeztem, mely egy ESI ionforrással volt felszerelve. Méréseimet pozitív ion módban végeztem. A műszer a tömegkorrekciót automatikusan, a folyamatosan bejuttatott kalibráló oldat segítségével végezte el. A kalibráló oldatot a dupla porlasztófejes ESI forrással juttattam a műszerbe, melynek egyik kapillárisán a minta, másikon pedig a kalibráló oldat áramlott kis térfogatárammal (kb.  $10 \mu\text{l perc}^{-1}$ ).

Referenciatömegként purint ( $C_5H_4N_4$ ;  $m/z$  121,050873) és HP-0921 ([hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropentoxo)-phosphazene] ( $C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$ );  $m/z$  922,009798) oldatok keverékét alkalmaztam.

A tömegspektrumok felvételét és az adatok feldolgozását az Agilent MassHunter Software B.04.00 Build 4.0.497.0 sz. verziójával végeztem.



**4. ábra** Agilent 6220 TOF-MS műszer





## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. MULTIKOMPONENSES MÓDSZER FEJLESZTÉSE NÖVÉNYI OLajokból TÖRTÉNŐ NÖVÉNYVÉDŐ SZER VIZSGÁLATOKRA HPLC-MS/MS TECHNIKÁVAL

#### 5.1.1. Bevezetés

Disszertációm ezen részében egy olyan multikomponenses módszer fejlesztését és validálását mutatom be, mely alkalmas növényvédő szerek növényi olaj mintákból történő kimutatására.

A peszticidek azonosítását és mennyiségi meghatározását egy LC-MS/MS hármaskvadrupól készülékkal végeztem MRM módban, minden komponensre két MRM-átmenetet vizsgálva.

A módszerfejlesztés részét képezte az MS/MS paraméterek és a kromatográfiás elválasztás optimalizálása továbbá a megfelelő minta-előkészítési eljárás kidolgozása is. Kiindulópontként egy QuEChERS-alapú minta-előkészítési technikát választottam, mely irodalmi eredmények alapján alkalmasnak bizonyult bonyolult, olajos mintamátrixokból (olíva, avokádó) történő növényvédő szer meghatározásokra [Cunha et al. 2007].

Az említett módszer lényege egy acetonitrillel történő folyadék-folyadék extrakció, melyet egy három különböző szorbenssel végzett d-SPE tisztítási lépés követ. Munkám során célom volt, hogy megtaláljam az optimális szorbenskombinációt, így különböző minta-előkészítési eljárásokat hasonlítottam össze, melyek az alkalmazott d-SPE szorbensekben különböztek egymástól. Alap módszernek választottam az irodalomban található PSA+GCB+C<sub>18</sub> szorbenskombinációt, ezen kívül vizsgáltam a PSA, illetve a PSA+C<sub>18</sub> szorbenskombinációkat. Csökkentve a tisztító szorbensek mennyiségét – értelemszerűen – kevésbé tiszta mintákat kapunk, ezért megvizsgáltam az eltérő tisztítási határfokú eljárások a módszer teljesítmény-jellemzőire gyakorolt hatását. Mindhárom módszerrel vizsgáltam a kimutatási határokat, a mátrixkomponensek jelintenzitásra gyakorolt hatását (mátrixhatás) és az extrakciós eljárás határfokát az egyes célkomponensekre.

## 5.1.2. Kísérleti körülmények

### 5.1.2.1. Mérendő komponensek és vizsgált mátrixok kiválasztása

A növényvédő szerek szabályozását EU-szinten egységesítő, 2008. szeptember 1-jétől hatályban lévő 396/2005 sz. EU rendelet életbelépésével számos korábbi határértéket megváltoztattak, illetve eltöröltek. Az új szabályozási rendszerben már nem határoztak meg határértékeket növényi olaj mátrixokra, azonban olajnövényekre (pl. olíva, napraforgó, repce, szezám) számos MRL értékeket találunk. A vizsgálandó komponensek kiválasztásakor célom volt, hogy olyan vegyületeket válasszak, melyekre az EU meghatározott MRL értékeket ilyen olajnövény mátrixokban. Ezen kívül a módszer fejlesztése ipari célra is történt, így a mérendő komponensek listája tovább bővült.

A mérhető komponensek körét szűkítette azonban, hogy folyadékkromatográfiás elválasztástechnikát alkalmaztam, így az EURL Datapool adatbázist felhasználva [Internet\_1] kiválasztottam a LC-vel mérhető komponenseket.

Az így összeállt lista, mely végül 44 növényvédő szert tartalmazott, a 3. táblázatban látható (ld. 71. old.).

### 5.1.2.2. LC-MS/MS analízis

A műszeres analitikai vizsgálatokat a 4.2.1. pontban bemutatott műszeren végeztem a következő üzemeltetési paramétereket alkalmazva:

#### *a, Folyadékkromatográfiás paraméterek:*

- Analitikai oszlop: Agilent XDB-C<sub>8</sub> (méret: 150 x 4,6 mm, töltetátmérő: 5 μm)  
+ előtétoszlop azonos töltettel (10 mm x 4,6 mm).
- Oszlop hőmérséklet: 30°C
- Injektálási térfogat: 10 μl
- Eluensek: A: ionmentes víz + 0,1 V/V% hangyasav; B: acetonitril.
- Eluens térfogatáram: 600 μl perc<sup>-1</sup>

### ***b, Tömegspektrometriás paraméterek:***

- Fügőny gáz áram: 10 psi
- Ütközési gáz: 5 egység
- Ionforrás feszültség: 5500 eV
- Forrás hőmérséklet: 400°C
- 1. ionforrás gáz áram: 50 psi
- 2. ionforrás gáz áram: 50 psi
- MRM átmenet pásztázási idő: 5 msec
- Vizsgált MRM átmenetek száma: 88

### **5.1.2.3. MS/MS paraméterek optimálása**

Egy MRM átmenet monitorozásakor különböző MS/MS paraméterek állíthatók be. A lehető legmagasabb jelintenzitás elérése érdekében az MRM módszerben vizsgált átmenetekhez optimált detektálási paraméter értékeket kell választanunk, mely értékek meghatározását minden komponensre elvégeztem. E munka első lépéseként minden mérendő komponensből 1-3 mg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú oldatokat készítettem. Mivel nem volt előzetes információm a komponensek kromatográfiás viselkedéséről, a sztenderdek 50/50% acetonitril/víz elegyben készítettem el, mely elegyhez 0,1 V/V% hangyasavat (HCOOH) adtam, mely protondonor lévén elősegíti a komponensek ionforrásban történő ionizációját (pozitív ion módban). Az így elkészített egyedi sztenderd oldatok folyamatos ionforrásba juttatását az erre a célra kialakított eszköz, a fecskendőtü (ún. *syringe*) pumpa segítségével végeztem el. Az oldatokat kis térfogatárammal (10 µl perc<sup>-1</sup>) juttattam az ionforrásba és elvégeztem a műszer által lehetővé tett automatikus optimálási (*quantitative optimization*) méréseket. Ennek első lépéseként az első kvadrupólt teljes pásztázási módban alkalmazva megkerestem a komponens kvázi-molekulaionját, mely a legtöbb esetben hidrogén-addukt [(M+H)<sup>+</sup>] formájában jelent meg legnagyobb intenzitásban. Előfordult azonban, hogy a hidrogén-addukt helyett a molekula Na-adduktja [(M+Na)<sup>+</sup>] jelent meg nagyobb intenzitással. Azonban ilyen esetekben is, a Na-adduktok problematikus fragmentációját figyelembe véve (fragmentáció során általában a nátrium szakad le a töltéssel együtt), mégis a kisebb intenzitású hidrogén-adduktra végeztem el a komponens optimálását. Az automatikus optimálás során a műszer a különböző MS/MS paraméterek változtatása mellett figyeli a (i) kvázi-molekulaion, illetve (ii) a belőle keletkezett fragmensek intenzitását, és rögzíti a legnagyobb intenzitáshoz tartozó optimális értékeket.

#### 5.1.2.4. Minta-előkészítés

A vizsgált olajminták előkészítésére a QuEChERS eljárás három módosított változatát alkalmaztam. A három módszer („A”, „B” és „C” jellel jelölve) a tisztítási lépésben hozzáadott d-SPE szorbensekben különböztek egymástól. Három különböző d-SPE szorbenst használtam: PSA, GCB és C<sub>18</sub> szorbenseket.

**„A” módszer:** A „módosított QuEChERS” eljárás olajos mintákra [Cunha et al. 2007]: az olajmintából kimérünk 3,0 g-ot egy 50 ml-es centrifugacsőbe, majd ehhez hozzáadunk 7 ml vizet. Ezután hozzáadunk 10 ml acetonitrilt, 100 µl 50 µg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú TPP oldatot, 4,0 g vízmentes MgSO<sub>4</sub> és 1,0 g NaCl sót, majd erősen rázzuk 1 percig. Ezt egy centrifugálási lépés követi 3700 perc<sup>-1</sup> fordulatszámon 1 percig. Ekkor – a hozzáadott sóknak köszönhetően (kisózási effektus) – szétválik a vizes, az olajos és az acetonitriles fázis. Legfelül látható az acetonitriles fázis, mely az extrahált peszticideket tartalmazza. Ebből a felülúszóból 5 ml-t átmerünk egy 15 ml-es centrifugacsőbe, majd hozzáadjuk a tisztító szorbenseket (250 mg PSA, 250 mg C<sub>18</sub>, és 250 mg GCB), illetve 750 mg MgSO<sub>4</sub> sót az oldatban található maradék víz megkötésére. Ezt követően a csövet 20 mp-ig kémcsórázóval rázatjuk, majd egy újabb centrifugálás következik 3700 perc<sup>-1</sup> fordulatszámon 1 percig. Ezután a tiszta felülúszót leszűrjük egy 0,45 µm-es PTFE szűrőn, mely célja, hogy az oldatban maradt szilárd szennyeződések kiszűrjünk. A szűrt oldatból 1 ml-t egy 2 ml-es mintatartó edénybe pipetázunk, argon gáz alatt teljes száradásig bepároljuk, majd visszahígítjuk 0,3 ml, a kromatográfiás elválasztáskor alkalmazott acetonitril/víz eleggyel. Köszönhetően a hígítások során alkalmazott hígítási arányoknak, a minta-előkészítés végén kapott tiszta extraktum 1 ml-e a vizsgált olajminta 1 g-ját képviseli.

**„B” módszer:** Az „A” módszer módosítása, kihagyva abból GCB szorbenst.

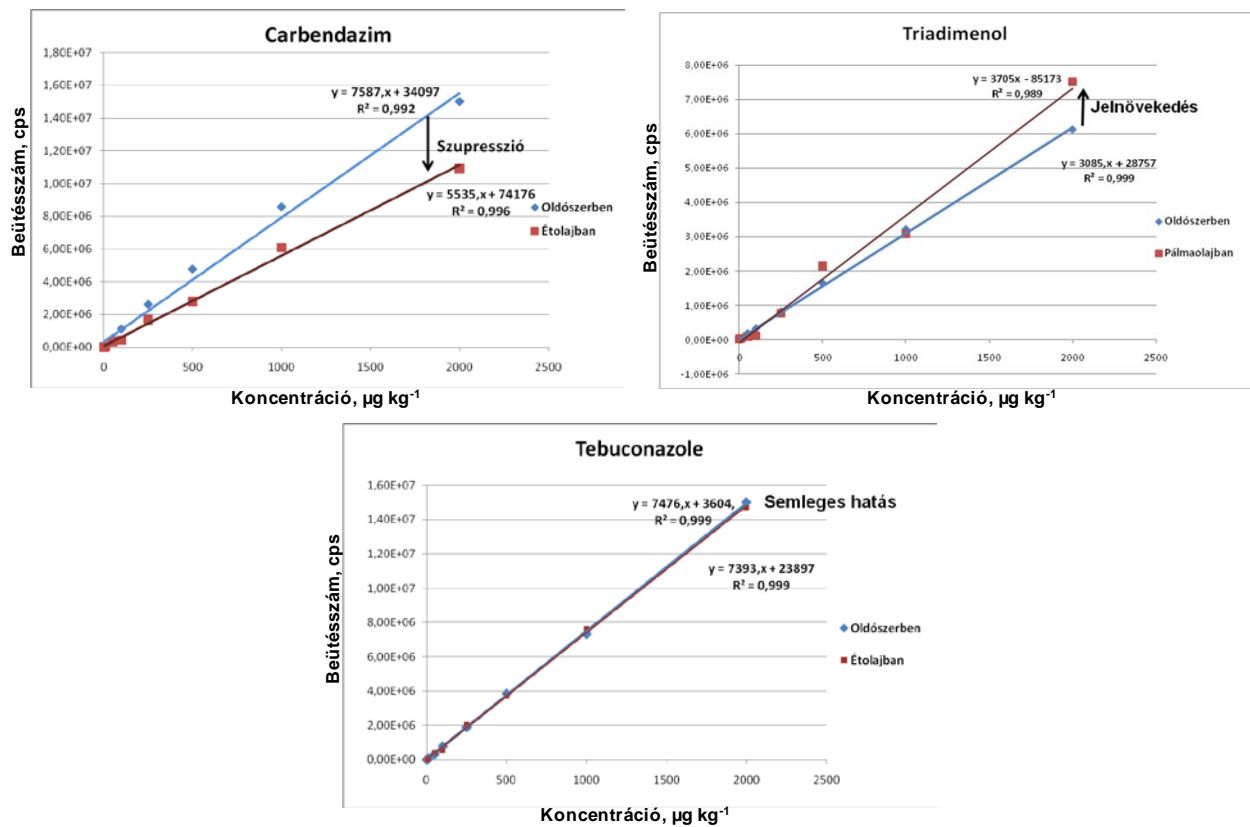
**„C” módszer:** Az „A” módszer módosítása, kihagyva abból a GCB és C<sub>18</sub> szorbenseket.

#### 5.1.2.5. Mátrixhatás vizsgálata

Egy multikomponenses módszer fejlesztésekor az egyik fő szempont a különböző mátrixhatások vizsgálata. Ezt a hatást az extrakció során a mérendő komponensekkel együtt az extraktumba kerülő mátrixkomponensek okozzák. Ugyanis, amennyiben ezek a komponensek a vizsgálandó növényvédő szerrel egyszerre kerülnek a tömegspektrométer ionforrásába, megváltoztathatják az ionizáció hatásfokát. Pozitív ionizációs módban, amennyiben a mátrixkomponens H<sup>+</sup>-donor, javíthatja a célkomponens ionizációját, azonban

ha versengenek a töltésért az ionforrásban (kompetitív helyzet), ronthat az ionizáció hatásfokán, azaz a mérés érzékenységén. Ennek következtében a tiszta oldószerben és a mintában felvett kalibrációs

egyenesek meredeksége különböző lehet, szükségessé téve a mátrixhatások vizsgálatát, illetve azok kiküszöbölését a kalibráció során.



**5. ábra** Példák különböző mátrixhatásokra  
(carbendazim: jelcsökkenés; triadimenol: jelnövekedés; tebuconazole: semleges hatás)

A mátrixkomponensek érzékenységre gyakorolt hatásának (mátrixhatás) vizsgálatához felvettem a mérendő komponensek kalibrációs egyenesét tiszta oldószerben, illetve a vizsgált mátrixokban, és az alábbi képletet alkalmazva számolható volt a mátrixhatás, százalékos formában:

$$MH = \frac{m_{\text{mátrix}} - m_{\text{oldószer}}}{m_{\text{oldószer}}} \times 100,$$

ahol MH a mátrixhatás értéket,  $m_{\text{mátrix}}$  és  $m_{\text{oldószer}}$  pedig a mátrixban, illetve oldószerben felvett kalibrációs egyenes meredekségét jelenti. Nullánál nagyobb érték jelnövelő, nullánál kisebb érték pedig jelcsökkentő hatást jelent. Amennyiben az eredmény 0, a mátrix nem befolyásolja a komponens mérhetőségét.

#### 5.1.2.6. Visszanyerési hatásfokok vizsgálata

Egy extrakciós lépés során célunk, hogy az összes mérendő komponenst kiextraháljuk a mintából, lehetőleg a lehető legkevesebb egyéb, zavaró mátrixkomponens extrahálása mellett. Leggyakrabban azonban ez az extrakció nem teljes (100%-tól eltérő hatásfok), így az extrakciót egy kinyerési, vagy más néven visszanyerési hatásfokkal kell jellemeznünk. Ennek a hatásfoknak az ismerete, így mérése fontos szempont egy multikomponenses módszer fejlesztésekor.

A visszanyerési hatásfokok vizsgálatához elvégeztem a négy vizsgált olajmátrix mérendő komponensekkel történő dúsítását (végső koncentráció:  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , minden komponensre nézve). Ezt követően minden olajmintán elvégeztem az előző pontban bemutatott minta-előkészítést hat párhuzamos mintát készítve, majd mátrixhoz illesztett (ún. *matrix-matched*) kalibrációt alkalmazva meghatároztam a visszanyerési hatásfokokat. A kalibrációs görbéket 6 pontból szerkesztettem meg ( $0-500 \mu\text{l l}^{-1}$ ) oly módon, hogy az egyes olajmintákon elvégeztem a minta-előkészítési eljárást a visszahígítási lépésig, ahol azonban nem a kezdeti eluenssel hígítottam vissza a mintát, hanem a megfelelő koncentrációjú sztenderd keverék oldattal (víz/acetonitril 90/10 arányú eleggyel). Mivel a dúsítási szint  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  volt, a kapott koncentráció eredmény egyben megadta a visszanyerési hatásfokokat százalékos formában.

### 5.1.3. Eredmények és értékelésük

#### 5.1.3.1. MS/MS paraméterek optimalálása

A vizsgált 44 komponensre kapott optimális értékeket az alábbi táblázatban foglaltam össze:

**3. táblázat:** A vizsgált komponensek optimált LC-MS/MS paraméterei

Peszticid	M <sub>w</sub>	Prekurzor ion, m/z	Mennyiségi/Minőségi ion, m/z	DP	EP	CEP	CE	CXP	Retenciósidő, perc
Acephate	183	184	143/95	16	7.5	12	13/29	4/4	4.6
Azinphos-methyl	317	317	132/160	31	4	14	19/13	4/4	14.2
Boscalid	343	343	307/140	56	8.5	16	25/25	10/4	15.2
Carbaryl	201	202	145/127	26	6	14	13/35	4/4	11.3
Carbendazim	191	192	160/132	36	8.5	12	23/39	4/4	5.4
Carbofuran	221	222	165/123	26	6	16	15/29	4/4	11.0
Chlorfenvinphos	359	360	155/98	51	7	18	19/39	4/4	19.0
Cyprodinil	225	226	93/76	41	4	16	43/55	8/4	13.3
Diazinon	304	305	169/153	36	5	16	31/25	4/4	22.1
Dimethoate	229	230	199/125	16	4.5	14	13/25	4/4	8.5
Fenarimol	331	333	81/268	61	8.5	14	47/31	4/4	14.3
Fenhexamid	302	302	97/55	51	4	16	33/59	4/6	15.1
Fenitrothion	277	278	125/109	36	5.5	26	25/25	4/4	17.8
Flusilazole	315	316	247/165	46	3.5	16	23/37	4/4	16.2
Imidacloprid	225	256	209/175	31	4.5	16	19/23	6/4	8.2
Indoxacarb	527	528	249/218	66	4	22	29/23	4/6	25.0
Kresoxim-methyl	313	314	116/206	21	9	14	19/11	4/4	20.0
Malathion	330	331	127/99	26	8	16	17/29	4/4	17.8
Metalaxyl	279	280	220/192	31	4.5	14	17/23	4/4	11.5
Methamidophos	141	142	94/125	31	4.5	10	17/17	4/4	4.1
Methidathion	302	302	145/85	21	5	16	15/27	4/4	14.5
Methiocarb	225	226	169/121	26	9.5	14	13/23	4/4	14.0
Methomyl	162	163	88/106	21	4	10	13/13	4/4	7.0
Mevinphos	224	225	127/193	26	7	14	19/11	4/4	8.7
Monocrotophos	223	224	127/193	26	10	14	19/11	4/4	6.3
Omethoate	212	214	124/183	21	5.5	14	29/15	4/4	5.1
Parathion	291	292	236/264	26	5	12	19/15	4/4	21.1
Phosalone	367	368	182/111	41	9.5	20	19/53	4/4	23.5
Piperonyl butoxide	355	356	177/119	31	4.5	16	17/47	4/4	26.4
Pirimicarb	238	239	71/182	21	5	12	31/21	4/4	7.1
Pirimiphos-methyl	305	306	164/108	31	3.5	16	31/43	4/4	22.1
Prochloraz	377	378	310/70	21	4.5	24	17/45	6/4	13.2
Propiconazole	342	344	161/69	56	5	18	33/33	4/4	17.6 és 17.9*
Propoxur	209	210	168/111	16	6.5	14	11/19	4/4	10.9
Pyraclostrobin	387	388	194/163	26	5	16	17/29	6/4	21.2
Spinosyn A	731	732	142/98	61	10.5	72	41/87	4/4	10.0

Peszticid	M <sub>w</sub>	Prekurzor ion, m/z	Mennyiségi/Minőségi ion, m/z	DP	EP	CEP	CE	CXP	Retenciósi idő, perc
Spinosyn D	745	746	142/98	76	5.5	34	39/89	4/4	10.6
Tebuconazole	307	308	70/125	41	4.5	14	41/45	4/4	15.6
Thiacloprid	252	253	126/98	51	4	16	27/57	4/4	9.2
Triadimefon	293	294	197/225	41	4	14	19/17	4/4	15.7
Triadimenol	296	296	70/99	21	4	12	21/19	4/4	13.1 és 13.5*
Triazophos	313	314	162/119	46	4.5	14	23/47	4/4	17.5
Trifloxystrobin	408	409	186/206	26	7	18	23/19	4/4	25.4
TPP (belső sztd)	326	327	152/215	61	12	12	43/33	4/4	20.8

\*Izomerek

A táblázatban szereplő paraméterek magyarázatai:

**MW:** molekulatömeg

**DP** (*declustering potential*): Ionforrás paraméter. Az ún. *skimmer* és *orifice* közti feszültséget jelenti Volt mértékegységben. Célja, hogy minimalizálja az ionforrásban keletkező ún. molekulaklaszterek számát, melyek az oldószer és a mérendő molekula összekapcsolódásával jönnek létre. Minél magasabb ez az érték, annál kevesebb ilyen klaszter keletkezik, azonban annál nagyobb mértékű fragmentációval kell számolnunk.

**EP** (*entrance potential*): Belépő feszültség – a keletkezett ionokat fókuszálja és „tereli” a magasabb nyomású Q<sub>0</sub> régióban (ld. 1. ábra, 40. old.).

**CEP** (*collision cell entrance potential*): Ütközési cella belépési feszültség – az ionok mozgatásáért felelős feszültség.

**CE** (*collision energy*): Ütközési energia – a prekurzor ionnal közölt energia az ütközési cellában. Minél magasabb ez az érték, annál nagyobb fokú fragmentációra számíthatunk.

**CXP** (*collision cell exit potential*): Ütközési cella kilépési feszültség – az ütközési cellából kilépő ionokat mozgatásáért felelő feszültség.

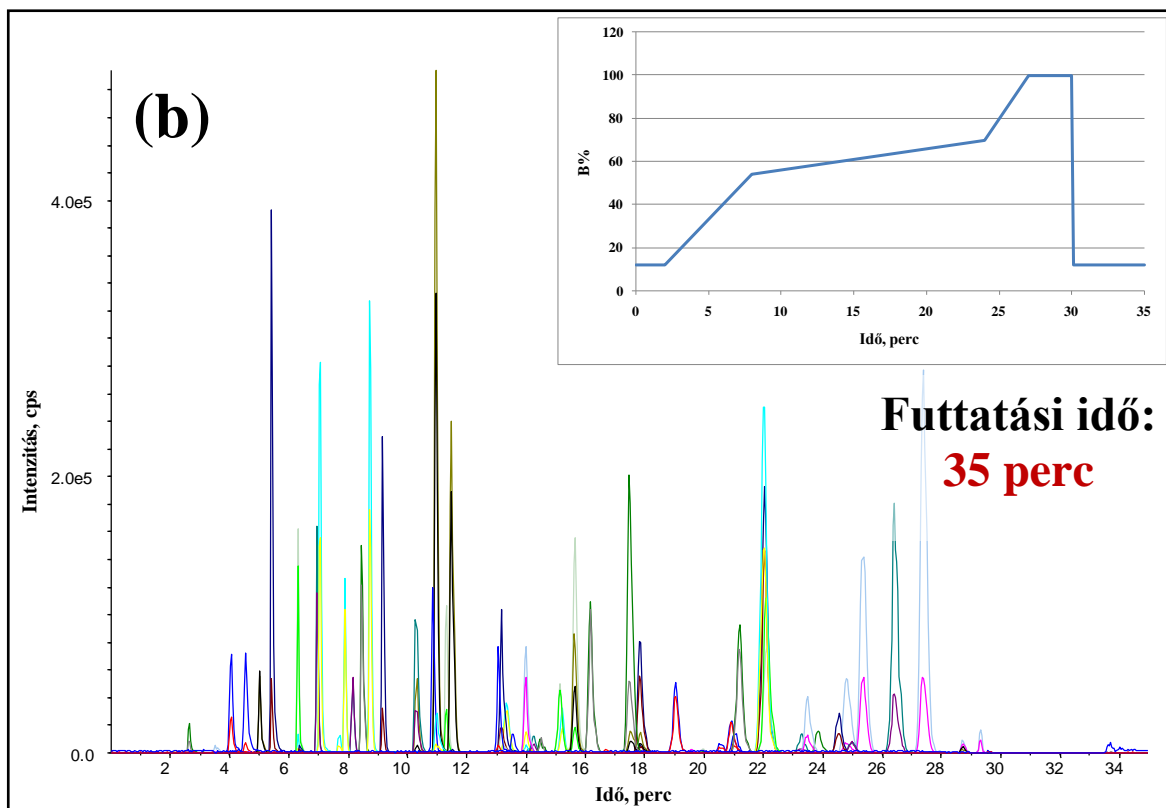
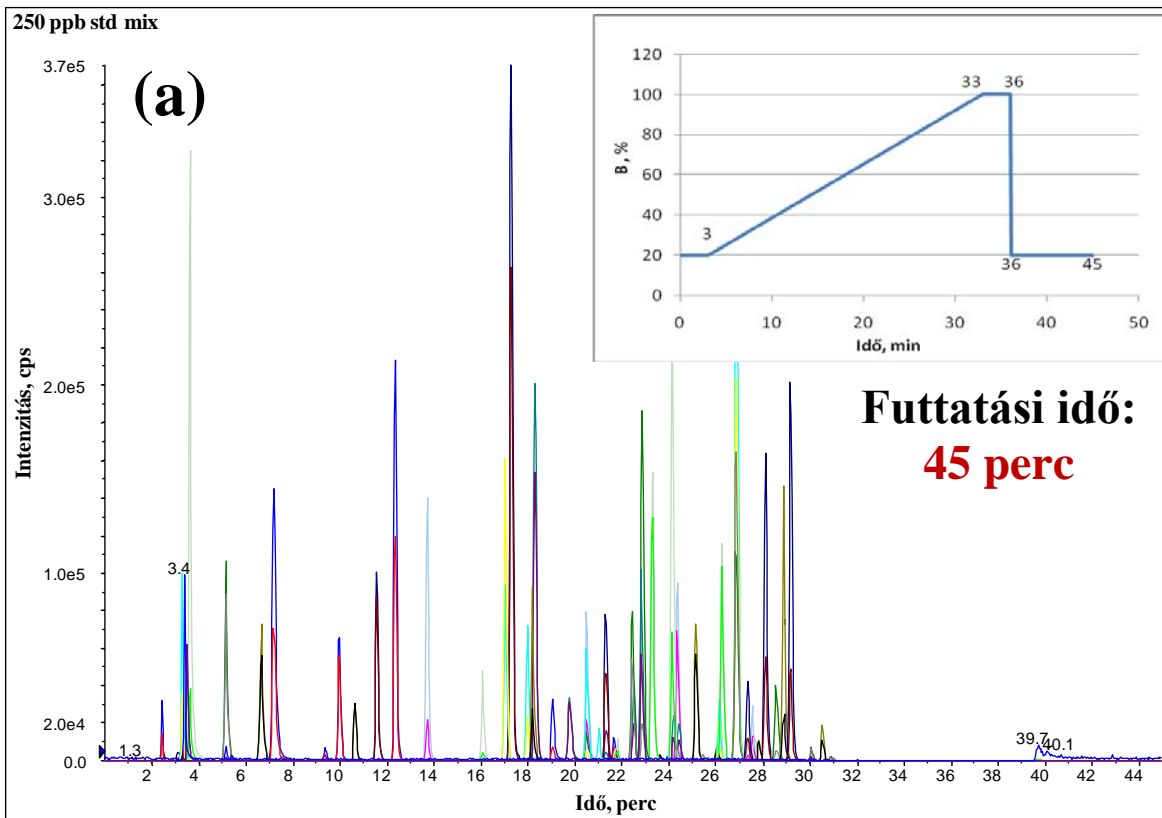
(Megjegyzés: A mérendő komponensek listája eredetileg 50 komponenst tartalmazott, azonban hat komponenst nem sikerült optimalnom, mivel azok nem ionizálódtak az ionforrásban. A következő komponenseket töröltem a listáról: carbosulfan, chlorpyrifos, fenpropathrin, glyphosate, novaluron és propargite.)



### 5.1.3.2. A kromatográfiás elválasztás optimalizálása

Köszönhetően a tandem-MS technika nagy szelektivitásának a kromatográfiás elválasztás fontossága valamelyest mérséklődik az ilyen típusú készülékek esetében. A műszer ugyanis akár teljes ko-elúció esetén is képes szelektíven monitorozni több átlapoló komponenst is, mely egy kevésbé szelektív detektorral (pl. UV-VIS) nehezen vagy egyáltalán nem lenne megoldható. Ez azonban nem jelenti azt, hogy egy MS/MS módszer fejlesztése során figyelmen kívül lehetne hagyni az elválasztás problémáját, mivel az egyszerre az ionforrásba jutó komponensek befolyásolhatják egymás ionizációját. Emiatt, bár nem legfontosabb szempontként, de mindenképpen érdemes jó elválasztást elérni a vizsgálandó komponensekre nézve.

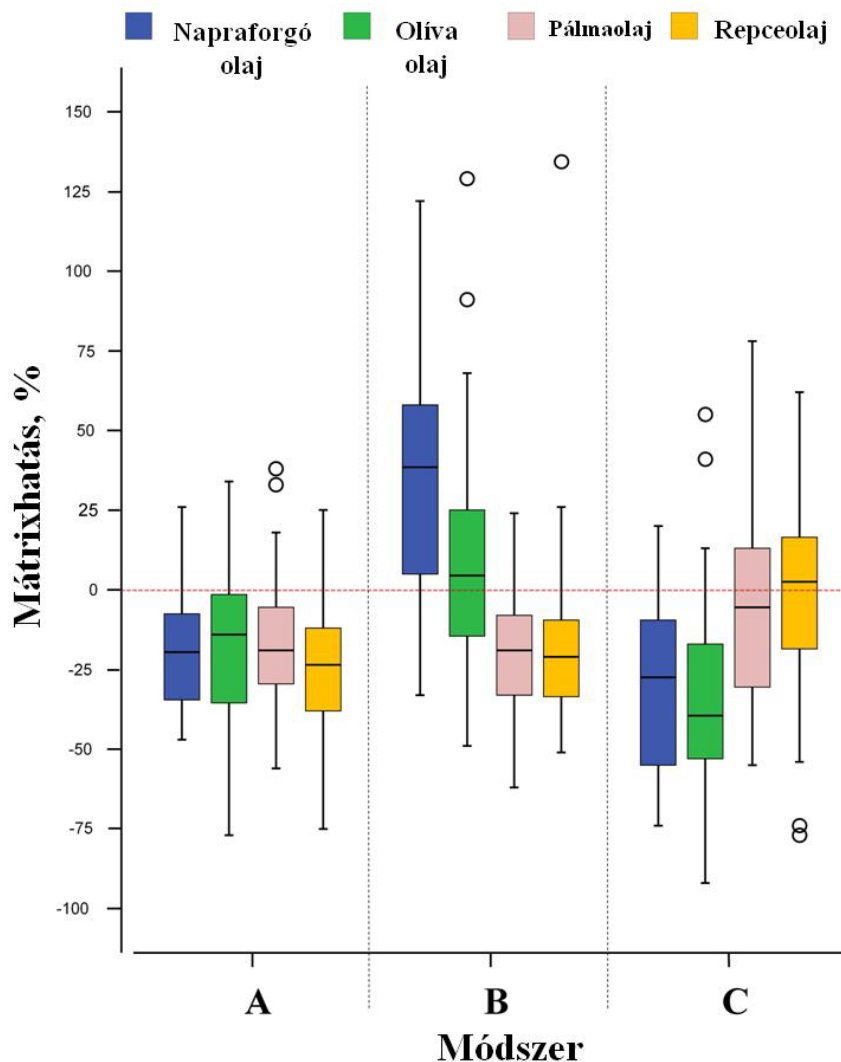
Multikomponenses módszerről lévén szó a vizsgált molekulák fiziko-kémiai tulajdonságai (fordított fázisú kromatográfia esetében legfontosabbként a polaritás) nagyban eltérhetnek egymástól, mely nem teszi lehetővé izokratikus elúció alkalmazását. Méréseim során így gradiens elúciót alkalmaztam, ahol az elválasztás hatékonyságát legkönnyebben a mozgó fázis összetételével tudjuk befolyásolni. Kiindulásként egy lineáris felfutású, 45 perces gradiens programot használtam (ld. 5. ábra, felül). Az így kapott kromatogramon látható, hogy a mérés elején, illetve különösen a 20. perc után számos komponens összecúszott, ezért egy többlépcsős gradiens programot próbáltam ki (ld. 5. ábra, alul). A kezdeti szerves eluens arányát csökkentettem 12%-ra, illetve a kiindulási izokratikus szakaszt egy gyors felfutású szakasz követi, melyet az eddig összetorlódott komponensek szétválasztása céljából egy kisebb meredekségű szakasz követ. Ezáltal az új módszerrel, lépcsős gradienst alkalmazva sikerült jobb elválasztást elérnem, illetve a kiindulási 45 perces futtatási időt is sikerült 35 percre csökkentenem, így későbbi méréseim során ezt a gradiens programot alkalmaztam.



6. ábra 250  $\mu\text{g l}^{-1}$  koncentrációjú sztenderd keverék oldat kromatogramjai a kiindulási (a) és a végső (b) gradiens programot alkalmazva

### 5.1.3.3. Linearitás és mátrixhatások

A kapott mátrixhatás értékeket a Mellékletek I. táblázatban foglaltam össze, és a 7. ábra szemlélteti.



*7. ábra Mátrixhatások eloszlása a négy vizsgált olajmátrixban a háromféle módszert alkalmazva. A legrobosztusabb módszernek az „A” módszer bizonyult; csökkentve a tisztítás hatásfokát (B és C módszerek) magasabb hatásokat figyelhetünk meg (a körök kiugró értékeket jelölnek)*

Megfigyelhető, hogy a legalacsonyabb mátrixhatásokat (nem meglepően) a legmagasabb fokú tisztítás eredményezte („A” módszer). Ebben az esetben mérsékelt mátrixhatás értékeket figyelhetünk meg. Az adatok középértékei minden vizsgált olajminta esetében (-)25%-nál nagyobbak adódtak, szűk eloszlási tartomány jellemezte őket, illetve az esetek többségében jelcsökkentő hatás volt megfigyelhető.

A GCB szorbens elhagyása a napraforgó olaj esetében jelentősen magasabb mátrixhatás értékeket eredményezett, azonban ezzel a módszerrel főként jelnövelő hatások érvényesültek ennél az olajmátrixnál. Repce és pálmaolaj esetében a GCB szorbens elhagyása nem okozott változást az „A”

módszerhez képest, a két módszerrel azonos mátrixhatások voltak megfigyelhetőek ebben a két olajmintában.

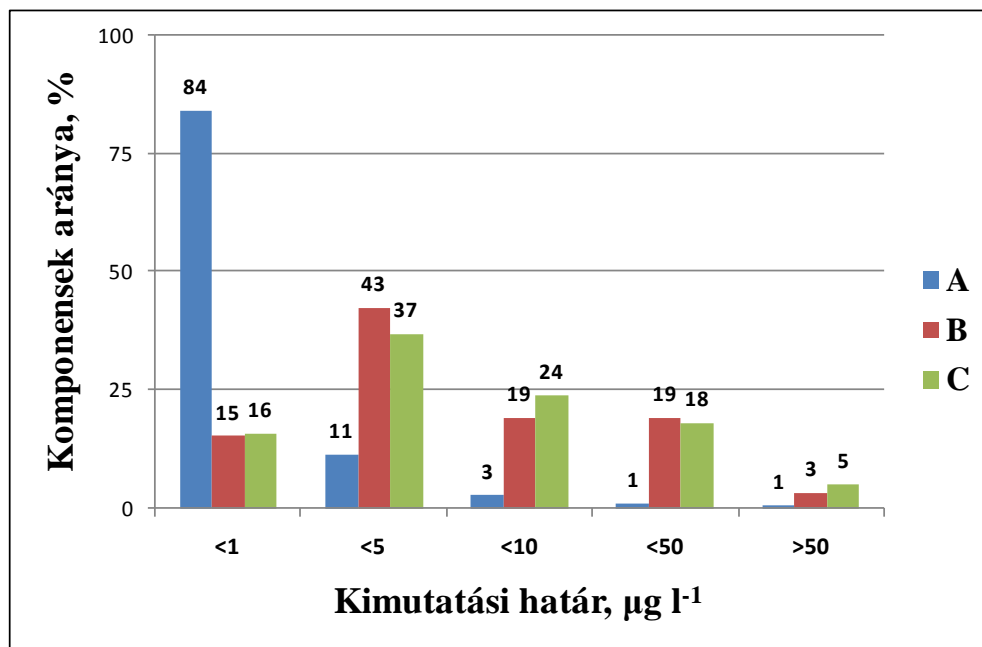
A GCB és C<sub>18</sub> szorbenseket elhagyva a napraforgó és olíva olaj esetében jelentősebb mátrixhatásokat figyelhetünk meg (mátrixhatások középértéke -25% és -40% a napraforgó, illetve olíva olaj mátrixban). Főként jelcsökkentő hatás érvényesült, s az értékeket széles eloszlási tartomány jellemzi. Pálma és repceolaj esetén is változást figyelhetünk meg az előző két módszerhez képest. A mátrixhatások középértékei 0 körüli értékek (semleges hatás) adódtak, azonban az értékeket az eddigieknél jelentősen szélesebb eloszlási tartomány jellemzi.

Általánosságban elmondható, hogy – ahogy az várható volt – a legmérsékeltőbb mátrixhatás értékeket a legnagyobb hatásfokú tisztítás eredményezte („A” módszer). Ezzel a módszerrel olajmintától függetlenül mérsékelt mátrixhatásokat figyelhetünk meg. Csökkentve a tisztítás mértékét jelentősebb hatások érvényesültek, különösen a napraforgó és olíva olaj esetében. Az eredményekből látható, hogy ezen két olajmátrixnál kiemelt fontosságú a tisztítás hatásfoka, kisebb hatásfokú tisztítás esetén jelentősen nagyobb mátrixhatásokkal kell számolnunk. Repce és pálmaolaj esetében ekkora különbség nem volt megfigyelhető a különböző módszerek között, kijelenthető tehát, hogy ezek az olajmátrixok robusztusabban mérhetőek, mérésüket kevésbé befolyásolja a tisztítás hatásfoka.

A kapott eredményeket figyelembe véve elmondható, hogy a mátrixhatások szempontjából az „A” módszer bizonyult a legmegfelelőbbnek, köszönhetően a vele (olajmintától függetlenül) elérhető mérsékelt mátrixhatásoknak.

#### 5.1.3.4. Kimutatási határok vizsgálata (LOD)

A módszer validálása során vizsgáltam a módszer érzékenységét és minden olajmátrixban meghatároztam a kimutatási határokat. A kapott eredményeket a 4. táblázatban foglaltam össze és a 8. ábrán szemléltetem.



8. ábra Kimutatási határok összehasonlítása a három módszerrel

A legszembevetőbb különbség az „A”, illetve a másik két módszer között vehető észre. Látható, hogy az „A” módszerrel az esetek 84%-ában a komponensek még  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  koncentráció alatt is kimutathatóak voltak, míg a „B” és „C” módszerrel ennél magasabb kimutatási határokat mértem, azonban az esetek 77%-ában a kimutatási határok még így is  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  vagy az alattinak adódtak. A 4. táblázatban látható a mért kimutatási határok és a releváns olajnövényekre (napraforgómag, olíva olajkészítés céljára, repcemag és pálma gyümölcs) meghatározott EU határértékek összehasonlítása. Észrevehető, hogy néhány komponens esetében a módszer érzékenysége nem megfelelő, ezekre ugyanis magasabb kimutatási határokat mértem, mint a meghatározott határértékek (táblázatban félkövérrel jelölve). Ezeket a komponenseket tehát a határérték közeli koncentrációban a kidolgozott módszerrel és eszközökkel nem tudtam megfelelően detektálni. Érdeemes azonban újra megemlíteni, hogy mivel növényi olajokra nem határoztak meg határértékeket, a kimutatási határokat olajnövények határértékeivel hasonlítottam össze, mely, bár lehet informatív, de nem feltétlenül jelenti, hogy a módszer alkalmatlan lenne az adott komponensek mérésére növényi olajokból.

**4. táblázat** Kimutatási határok a négy vizsgált olajmátrixban és azok összehasonlítása a releváns olajnövényekre meghatározott határértékekkel (a félkövérrel jelölt értékek nem megfelelő érzékenységet jelölnek)

Peszticid	Kimutatási határok, $\mu\text{g l}^{-1}$															
	étolaj			olivaolaj				repceolaj				pálmaolaj				
	MRL (napraforgó mag)	A	B	C	MRL (olíva)	A	B	C	MRL (repcemag)	A	B	C	MRL (pálma gyümölcs)	A	B	C
Acephate	50*	10	50	50	20*	10	50	50	50*	10	50	50	50*	5	<b>100</b>	50
Azinphos-methyl	50*	1	50	50	50*	10	10	50	50*	5	50	50	50*	10	50	50
Boscalid (Nicobifen)	1000	1	10	10	50*	1	5	10	1000	1	10	10	50*	1	50	10
Carbaryl	50*	1	10	5	50*	1	5	10	50*	1	5	10	50*	1	5	5
Carbendazim	100*	1	5	5	100*	1	5	1	100*	1	5	5	100*	1	5	5
Carbofuran	100	1	1	1	20*	1	5	1	100	1	5	1	50*	1	1	1
Chlorfenvinphos	50*	1	50	50	20*	1	<b>50</b>	10	50*	1	10	50	50*	1	50	50
Cyprodinil	50*	1	50	10	50*	1	10	50	50*	1	50	50	50*	5	50	10
Diazinon	20*	1	10	5	10*	1	5	1	20*	1	5	1	20*	1	1	1
Dimethoate	50*	1	10	10	2000	1	1	1	50*	1	5	5	50*	1	1	5
Fenarimol	20*	1	50	10	20*	5	50	50	20*	5	<b>50</b>	<b>50</b>	20*	5	<b>50</b>	<b>50</b>
Fenhexamid	100*	1	5	50	50*	1	5	5	100*	1	5	5	100*	1	5	5
Fenitrothion	10*	5	<b>50</b>	<b>100</b>	10*	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	10*	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	10*	5	<b>100</b>	<b>50</b>
Flusilazole	100	1	1	10	20*	1	1	1	100	1	5	5	20*	1	1	5
Imidacloprid	100	5	5	10	1000	1	100	10	100	1	10	50	50*	1	50	5
Indoxacarb	50*	1	50	<b>100</b>	20*	1	<b>50</b>	<b>50</b>	50*	1	10	<b>100</b>	20*	1	<b>50</b>	<b>100</b>
Kresoxim-methyl	100*	5	50	50	50*	5	<b>100</b>	<b>100</b>	100*	5	50	100	100*	50	100	100
Malathion	20*	1	10	5	20*	1	10	5	20*	1	10	5	20*	1	10	10
Metalaxyl	100*	1	5	1	50*	1	5	10	100*	1	5	1	100*	1	5	5
Methamidophos	10*	1	5	5	10*	1	5	5	10*	1	10	5	10*	1	5	5
Methidation	50*	5	5	50	20*	5	<b>50</b>	10	50*	5	10	50	50*	1	10	50
Methiocarb	100*	1	5	5	200	1	5	5	100*	1	5	5	100*	1	5	5
Methomyl	50*	1	5	5	50*	1	5	5	50*	1	5	5	50*	1	5	5
Mevinphos	10*	1	5	1	10*	1	5	1	10*	1	5	5	10*	1	1	1
Monocrotophos	-	1	10	5	-	1	5	10	-	1	10	10	-	5	5	5
ld.	ld.				ld.				ld.				ld.			
Omethoate	dimethoate	5	5	5	dimethoate	5	10	50	dimethoate	1	10	5	dimethoate	1	50	10
Parathion	50*	1	50	50	50*	1	50	50	50*	5	10	10	50*	5	50	50
Phosalone	50*	1	50	50	50*	1	5	10	50*	1	10	10	50*	1	50	10
Piperonyl-butoxide	-	1	5	50	-	1	1	10	-	1	50	10	-	1	10	10
Pirimcarb	500	1	1	1	1000	1	1	5	200	1	1	5	100	1	5	1
Pirimphos-methyl	50*	1	1	1	50*	1	5	5	50*	1	1	1	50*	1	1	5
Prochloraz	500	1	5	10	50*	1	5	1	500	1	5	5	100*	1	5	5
Propiconazole	100*	1	5	10	50*	1	5	5	100*	1	10	10	100*	1	5	10
Propoxur	50*	1	5	5	50*	1	50	50	50*	1	10	10	50*	1	10	5
Pyraclostrobin	300	1	5	5	20*	1	5	1	200	1	10	50	20*	1	5	10
Spinosyn A	20*	1	5	5	20*	1	5	5	20*	1	5	5	20*	1	10	5
Spinosyn D		1	10	5		1	10	10		1	10	5		1	10	10
Tebuconazole	50*	1	1	5	50*	1	1	1	500	1	1	1	50*	1	5	5
Thiacloprid	50*	1	5	1	4000	1	5	1	300	1	5	5	50*	1	5	5
TPP	-	1	1	10	-	1	1	1	-	1	5	5	-	1	5	10
Triadimefon		1	5	5		1	1	5		1	5	5		1	5	5
Triadimenol	200*	1	5	5	100*	1	1	5	200*	1	5	10	200*	1	5	10
Triazophos	10*	1	1	5	10*	1	1	5	10*	1	5	1	10*	1	5	1
Trifloxystrobin	50*	1	5	10	300	1	1	10	50*	1	10	10	50*	1	1	5

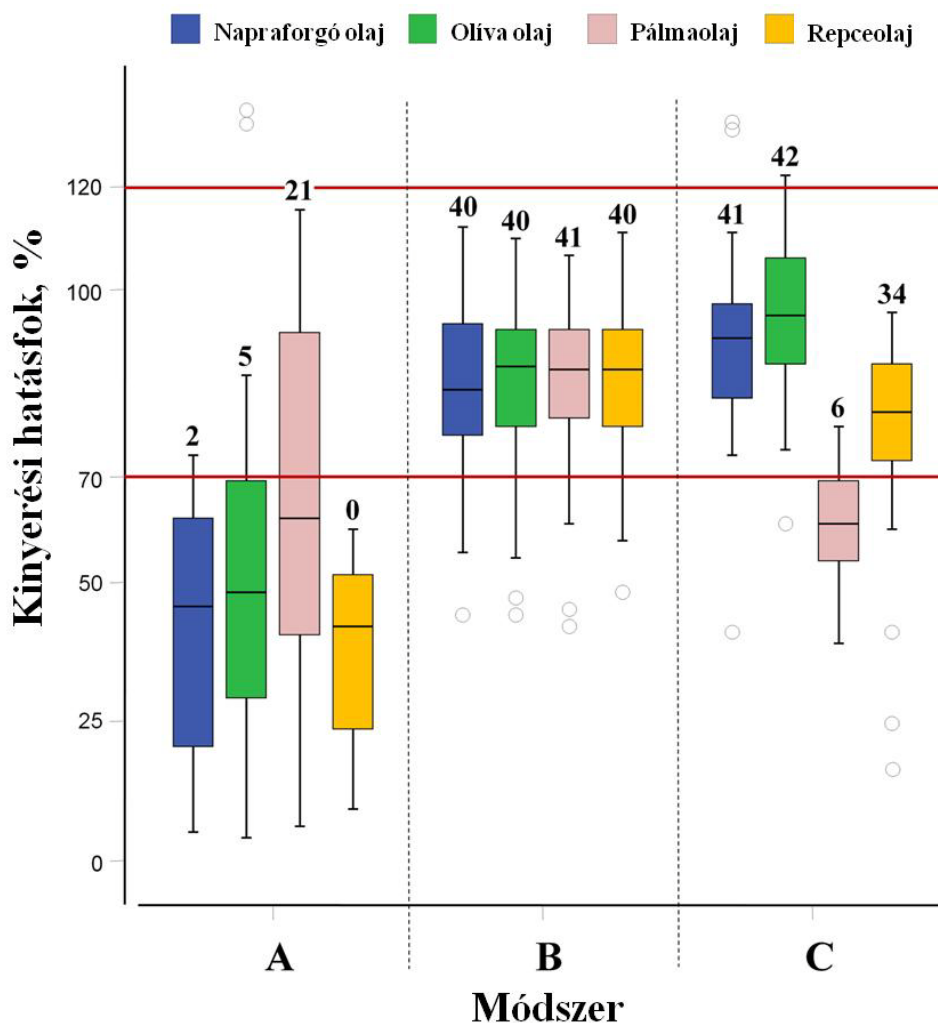
\* Analitikai meghatározás határánál alacsonyabb érték

### 5.1.3.5. Visszanyerési hatások

Az élelmiszerekből történő növényvédő szer mérésre szolgáló módszerek validálását és minőségbiztosítását szabályozó DG SANCO rendelet multikomponenses módszerek esetében 70-120%-os tartományt határoz meg a visszanyerési hatások elfogadási tartományaként. Egy komponens kinyerése akkor elfogadható, amennyiben a kinyerési hatások középértéke ebbe a tartományba esik és a párhuzamos eredmények relatív szórás értéke (RSD) nem haladja meg a 20%-ot. Ilyen multikomponenses módszer fejlesztésekor és alkalmazásakor azonban szem előtt kell tartani, hogy minél kifinomultabb minta-előkészítésnek, illetve nagyobb hatásfokú tisztításnak vetjük alá a vizsgált mintát, annál nagyobb lesz a veszélye, hogy a mátrixkomponenseken kívül a célkomponenseket is eltávolítjuk az extraktumból. Emiatt egy módszerfejlesztéskor a nagyfokú tisztítás és a magas kinyerési hatások közti kompromisszumot meg kell hozni, és meg kell találni azt a minta-előkészítési eljárást, mely már megfelelően tiszta mintát eredményez, viszont még a kinyerési hatások is elfogadhatóak.

Méréseim során a vizsgált három minta-előkészítés közül az „A” módszert (legnagyobb tisztítási hatások) választottam referencia módszerként, mivel korábbi tanulmányokban ezt a módszert alkalmazva jó kinyerési hatásokot értek el olíva olaj mátrixból [Gilbert-López et al. 2010, Hernando et al. 2007]. A kapott kinyerési hatások eredmények a Mellékletek II. táblázatban láthatóak, az adatokat pedig a 10. ábra szemlélteti.

A legszembetűnőbb különbség ismét az „A”, illetve a másik két módszer között vehető észre. Jelentősen alacsonyabb kinyerési hatások értékek mértem az „A” módszer esetében. Napraforgó és olíva olaj esetében mindössze 2, illetve 5 komponens esett az elfogadási tartományba az „A” módszert alkalmazva, repceolaj esetében pedig egy kinyerési hatások sem volt elfogadható. Kiemelendő, hogy az említett három mátrix-szal szemben pálmaolaj esetében jelentősen több komponens (21) esett az elfogadási tartományba és – szemben a másik három olajmátrix-szal – pálmaolajban minden komponens kinyerhető volt.



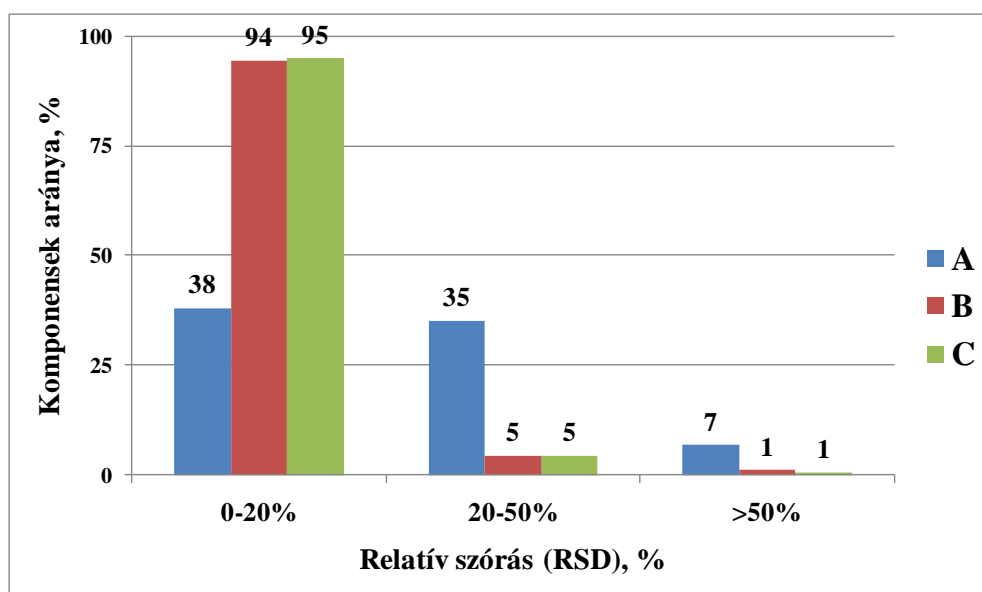
**9. ábra** Kinyerési hatások eloszlása a három vizsgált módszerrel; a számok az elfogadási tartományba eső komponensek számát mutatják az adott olajmintában (összes vizsgált komponens: 44; a körök kiugró értékeket jelölnek)

A GCB szorbenst kihagyva a minta-előkészítésből („B” módszer) jelentős javulás volt megfigyelhető a kinyerési hatások értékekben. Mind a négy vizsgált olajmátrixban magas kinyerési hatásokot értem el, mely javulás egyértelműen a GCB szorbens elhagyásának volt köszönhető. Ezt a tisztító szorbenst főként klorofill megkötésére alkalmazzák növényi eredetű mintáknál, illetve nagy fajlagos felületének köszönhetően számos mátrix-komponens megkötésére is alkalmas. Azonban e nagy adszorpciós képességének köszönhetően fennáll a veszélye, hogy nemcsak az eltávolítani kívánt szennyezőt, hanem a mérni kívánt komponenseket (vagy azok egy részét) is eltávolítjuk a mintából, jelentősen csökkentve ezzel a módszer visszanyerési hatását. Ezt a hatást különösen planáris gyűrűs szerkezetű komponensek esetében figyelhetjük meg (pl. boscalid, prochloraz, carbendazim, thiabendazole), ilyen komponenseket ugyanis jóval nagyobb adszorpciós erők kötnek a szintén planáris szén szerkezetű szorbenshez.



A GCB és C<sub>18</sub> szorbenseket elhagyva a tisztítási lépésből („C” módszer) nem volt megfigyelhető jelentős változás a napraforgó és olíva olaj esetében (41, illetve 42 komponens az elfogadási tartományban). Nagymértékben csökkentek azonban a kinyerési hatásfok értékek repce és különösen pálmaolaj mátrixban (34, illetve 6 komponens az elfogadási tartományban). Pálmaolaj esetében még az „A” módszernél tapasztaltaknál is alacsonyabb értékeket kaptam, ahol 21 komponens esett az elfogadási tartományba. Ez a jelentős különbség az olajmátrixok között feltehetően a különböző olajok eltérő zsírsav-összetételével magyarázható. A vizsgált négy olajmátrix közül ugyanis a pálmaolajban található legnagyobb mennyiségben telítetlen zsírsav.

A kinyerési hatásfok vizsgálatokat hat párhuzamos minta készítésével végeztem. A párhuzamos eredmények precizitását az alábbi ábrán szemléltetem az adatok relatív szórás értékeivel (RSD).



**10. ábra** Kinyerési hatásfok eredmények relatív szórás (RSD) értékei; megfelelő, ha  $RSD \leq 20\%$

Látható, hogy az „A” módszert alkalmazva csak a komponensek 38%-ánál volt elfogadható a módszer precizitása, a többi esetben 20%-nál nagyobb RSD értékek voltak megfigyelhetőek. Ennek oka valószínűen a kisebb kinyerési hatásfok értékekben keresendő, mivel általánosan elmondható, hogy kisebb értékek nagyobb bizonytalansággal mérhetőek (ugyanakkora szórás érték kisebb átlagértékhez viszonyítva nagyobb RSD-t eredményez). Az adatok RSD értékének tekintetében is kiemelő a pálmaolaj mátrix, mivel ebben az olajmintában minden komponens detektálható volt, és egy komponens (piperonyl butoxide) kivételével minden esetben 20% alatti RSD értékek voltak megfigyelhetőek. A „B” és „C” módszerre nagy precizitás volt jellemző, mely látható az alacsony RSD értékeken is (az esetek 94 ill. 95%-ában 20% alatti RSD volt megfigyelhető).

A fentebb bemutatott kinyerési hatások eredmények alapján elmondható, hogy a három alkalmazott szorbenskombináció közül a PSA+C<sub>18</sub> bizonyult a legalkalmasabbnak. Ezzel a módszerrel magas kinyerési hatásokokat értem el (a komponensek kb. 91%-a az elfogadási tartományba esett), és az eredményeket nem befolyásolta a vizsgált olajminta típusa sem, mutatva ezzel a módszer robusztus mivoltát.

#### **5.1.4. Konklúziók**

Ebben a kísérletsorozatban növényi olajokból történő növényvédő szer meghatározás lehetőségeit vizsgáltam négy különböző olajmintán. Három QuEChERS-alapú minta-előkészítési eljárást alkalmaztam és megvizsgáltam a különböző hatásfokú d-SPE tisztítások a módszer teljesítményjellemzőire gyakorolt hatását.

A módszerfejlesztés első lépéseként sikerült a mérni kívánt 50 komponensből 44-re optimális MS/MS paramétereket meghatározni, azonban hat komponenst érzékenységi problémák miatt nem tudtam detektálni, így a későbbiekben 44 komponenst vizsgáltam.

A kromatográfiás elválasztás optimalizálása során sikerült jó elválasztást elérnem a mérendő komponensekre nézve, és a kezdeti 45 perces futtatási időt 35 percre csökkentettem.

A minta-előkészítések vizsgálatáról általánosságban elmondható, hogy több tisztító szorbens alkalmazása csökkentette a mátrix-komponensek által okozott jelváltozást, míg elhagyva egyes szorbenseket a tisztítási lépésből magasabb mátrixhatások voltak megfigyelhetők. Az olíva és napraforgó olaj esetében jelentősebb mátrixhatásokat tapasztaltam, továbbá az ezen olajmátrixok által okozott jelváltozás mértéke jelentősen függött az alkalmazott tisztító szorbensektől. Pálma és repceolaj esetében kisebb mátrixhatásokat figyeltem meg, továbbá a tapasztalt értékek kisebb mértékben függtek a tisztítási lépéstől. A mátrixhatások szempontjából az „A” módszer (PSA+GCB+C<sub>18</sub>) bizonyult a legalkalmasabbnak és legrobusztusabbnak.

A módszer validálása során tapasztalt mátrixhatás értékekből leszűrhető volt, hogy mindenképpen olyan kalibrációt szükséges alkalmazni, amely kiküszöböli ezt a hatást. Méréseim során ezért a mátrixhoz illesztett (ún. *matrix-matched*) kalibrációt alkalmaztam.

A kimutatási határok tekintetében szintén az „A” módszer bizonyult a legmegfelelőbbnek, ezzel a módszerrel az esetek 84%-ában 1 µg l<sup>-1</sup> alatti koncentrációban már kimutathatóak voltak a vizsgált komponensek. Kisebb fokú tisztítást alkalmazva kis mértékben nőttek a kimutatási határok, azonban az esetek 77%-ában még így is 10 µg l<sup>-1</sup> alatt maradtak. A mért kimutatási határokat összevetettem az EU

által a vonatkozó olajnövényekre meghatározott MRL határértékekkel. Hat komponens esetében néhány kimutatási határ a határérték feletti értéknek adódott, felhívva a figyelmet ezekre a komponensekre, melyek detektálása ilyen alacsony koncentráció-tartományban problémás lehet. Érdeemes azonban megjegyezni, hogy bár a „B” és „C” módszerekkel viszonylag magasabb értékeket mértem, a módszerek még így is megfelelően érzékenynek tekinthetők. Továbbá újra kiemelő az is, hogy – lévén nincs olajmintákra meghatározott MRL határérték – a kimutatási határokat az olajnövényekre meghatározott határértékekkel vettem össze.

A kinyerési hatásfokok vizsgálatakor eredményeim eltértek a korábbi, irodalomban fellelhetőektől. Szemben a korábban publikált eredményekkel, nem sikerült jó kinyerési hatásfokokat elérnem a PSA+GCB+C<sub>18</sub> szorbenskombinációval, mivel a GCB szorbens nemcsak a mátrixkomponenseket, hanem a vizsgálandó növényvédő szer molekulákat is megkötötte, így rendkívül alacsony visszanyerési hatásfokokat értem el. Elhagyva a GCB szorbent jelentősen magasabb értékeket kaptam, míg a C<sub>18</sub> szorbens további elhagyása ismét rontott a módszer teljesítményén. Az eredményekből lesűrhető volt, hogy adott esetben szükséges lehet a minta-előkészítés tisztítási lépésének egyszerűsítése, vállalva ezzel a kevésbé tiszta minta-extraktumot, ezzel viszont elkerülve annak a veszélyét, hogy a mérni kívánt komponensek is elvesznek a minta-előkészítés során.

Összefoglalva elmondható, hogy a PSA+C<sub>18</sub> szorbenskombinációt alkalmazva sikerült egy olyan multikomponenses módszert fejlesztenem, mely megfelelő teljesítményjellemzők mellett képes 44 növényvédő szer vizsgálatára növényi olaj mintákból. Figyelemre adhat továbbá okot a GCB szorbens jelentős adszorpciós képessége is, mely egyes esetekben hátrányosan befolyásolhatja a kinyerési hatásfokokat, így mindenképpen érdemes a GCB szorbens alkalmazásának szükségességét, illetve – felhasználása esetén – az alkalmazott szorbens mennyiségét megfontolni.

## **5.2. NAGYFELBONTÁSÚ TÖMEGSPEKTROMÉTER (LC-TOFMS) ALKALMAZÁSA NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK MARADVÁNYAINAK KIMUTATÁSÁRA PONTOS TÖMEG ADATBÁZIS SEGÍTSÉGÉVEL**

### **5.2.1. Bevezetés**

Munkám ezen szakaszában céлом volt egy olyan tömegspektrometriás kereső módszer kifejlesztése, mely alkalmas növényvédő szerek kimutatására különböző zöldség- és gyümölcsmintákból. A már korábban említett előnyei miatt erre a célra egy nagyfelbontású MS készüléket (TOFMS) alkalmaztam, melyhez folyadékkromatográfiás elválasztástechnikát csatoltam. Ez a műszer, szemben az előző pontban alkalmazott tandem-MS készülékkel, alkalmas a teljes tömegspektrum nagy pontossággal történő rögzítésére információvesztés nélkül, melynek köszönhetően különösen alkalmas olyan mérésekre, ahol a célunk a minél nagyobb számú komponens vizsgálata.

Munkám során céлом volt egy minél több komponenst tartalmazó adatbázis megszerkesztése, mely lehetőség szerint az alpmolekulák minél több fragmensét is tartalmazza. Ez az adatbázis a vizsgált mintákban történő gyors, automatizált keresést teszi lehetővé.

Az adatbázis megszerkesztését és a keresési feltételek megválasztását követően céлом volt, hogy a kifejlesztett kereső módszer hatékonyságát összevesszem egy referencia LC-MS/MS célkomponenses módszerrel. A kapott eredmények alapján levonható lesz a következtetés a nagyfelbontású műszerek széleskörű kereső módszerekben történő alkalmazhatóságáról.

## 5.2.2. Kísérleti körülmények

### 5.2.2.1. Mérési paraméterek

#### LC-TOFMS

Méréseimet a 4.2.2 pontban bemutatott LC-TOFMS készüléken végeztem a következő üzemeltetési paraméterek mellett:

#### *a, Folyadékkromatográfiás paraméterek:*

- analitikai oszlop: Agilent XDB-C<sub>18</sub> (méret: 4,6 x 50 mm; töltetátmérő: 1,8 μm)
- injektálási térfogat: 10 μl
- eluensek: A: ionmentes víz + 0,1 V/V% hangyasav; B: acetonitril
- eluens térfogatáram: 500 μl perc<sup>-1</sup>
- gradiens program: 10% acetonitril (3 percig), majd lineáris emelés 100%-ig (25 percnél), majd tiszta acetonitrillel mosás (3 percig)

Minden ilyen futtatást egy 10 perces ekvilibráló szakasz követte, mely során visszaállítottam a kiindulási (10%-os) szerves oldószer arányt.

#### *b, Tömegspektrometriás paraméterek:*

- kapilláris feszültség: 4000 V
- porlasztó nyomás: 40 psi
- szárító gáz térfogatáram: 9 l perc<sup>-1</sup>
- gáz hőmérséklet: 325°C
- skimmer feszültség: 65 V
- oktapól feszültség: 250 V
- fragmentor feszültség (forrásban történő CID fragmentáció): 190 V
- vizsgált tömegtartomány: 50-1000 *m/z*

## LC-MS/MS

A két műszer összehasonlítása céljából végzett tandem-MS kísérleteket a 4.2.1. fejezetben bemutatott műszeren végeztem egy korábban kidolgozott mérési módszert alkalmazva [Kmellár et al. 2010]. A módszer egy kvalitatív és egy kvantitatív mérés kombinálásán alapul, melynek lényege, hogy a vizsgált mintákat először kvalitatív mérésnek vetjük alá, mely mérés eredménye egy bináris igen/nem válasz (kimutatható-e növényvédő szermaradványt a mintában vagy nem). A célkomponensek azonosítása egy MRM és egy EPI mód kombinációját alkalmazó kereső módszer segítségével történt, mely során minden célkomponensre egy MRM átmenetet monitoroztam. Egy adott intenzitás érték felett (500 beütésszám) a műszer átkapcsolt a megerősítő EPI üzemmódba, és felvette az ion teljes termékion spektrumát (20, 35 és 50 eV ütközési energiáknál). Az így felvett EPI spektrumokat egy a gyártó által összeállított spektrumkönyvtárban található spektrumokkal hasonlítottam össze, melyek egyezése a találat biztonságát erősítette meg. Végso megerősítésként a talált komponensek sztenderdjével kapott retenciós időt hasonlítottam össze a feltételezett komponens retenciós idejével. Ha a találatot megerősítettem – tehát a minta pozitív volt –, a mintát további (kvantitatív) vizsgálatnak vetettem alá. Erre a célra egy MRM módszert alkalmaztam, ahol komponensenként két átmenetet monitoroztam, és sztenderd addíciós kalibrációt alkalmazva határoztam meg a komponensek koncentrációját.

Az alkalmazott LC-MS/MS paraméterek a következők voltak:

### *a, Folyadékkromatográfiás paraméterek:*

- analitikai oszlop: Agilent XDB-C<sub>8</sub> (méret: 150 x 4,6 mm, töltetátmérő: 5 µm)  
+ előtétoszlop azonos töltettel (10 mm x 4,6 mm).
- oszlop hőmérséklet: 30°C
- injektálási térfogat: 10 µl
- eluensek: A: ionmentes víz + 0,1 V/V% hangyasav; „B”: acetonitril.
- eluens térfogatáram: 600 µl perc<sup>-1</sup>
- gradiens program: 20% szerves oldószer összetétel (3 percig), majd lineáris emelés 100%-ig (36 percnél), majd tiszta acetonitrillel mosás (3 percig), melyet 9 perces ekvilibráló szakasz követett a kiindulási (20%) szerves oldószer aránnyal.

### ***b, Tömegspektrometriás paraméterek:***

	<i>Kombinált EPI/MRM mérés (kvalitatív)</i>	<i>MRM mérés (kvantitatív)</i>
– függöny gáz áram:	20 psi	10 psi
– ütközési gáz:	12 egység	5 egység
– ionforrás feszültség:	5500 V	5500 V
– forrás hőmérséklet:	450 °C	450 °C
– 1. ionforrás gáz áram:	40 psi	50 psi
– 2. ionforrás gáz áram:	50 psi	50 psi
– MRM átmenet pásztázási idő:	5 msec	5 msec
– vizsgált MRM átmenetek száma:	300	200

A kvantitatív MRM módszerben monitorozott MRM átmenetek listáját, illetve a hozzájuk tartozó optimált MS/MS paramétereket a Mellékletek III. táblázatában mutatom be.

#### **5.2.2.2. Minta-előkészítés**

A minták előkészítésére a 2.4.2.2. fejezetben említett „acetát-pufferelt QuEChERS” technikát alkalmaztam, melynek menete a következő: 15,0 g előzetesen homogenizált mintát bemérünk egy 50 ml-es centrifugacsőbe, majd a mintához adunk 15,0 ml 1 V/V% ecetsavat tartalmazó acetonitrilt, illetve a belső sztenderdként alkalmazott TPP-t. Ezt követően hozzáadunk még 6,0 g vízmentes magnézium-szulfát és 1,5 g nátrium-acetát trihidrát sót, majd 4 percig erősen rázzuk a csövet, mely során a mérendő komponensek az acetonitril fázisába extrahálódnak. Ezután 4000 rpm fordulatszámon 4 percig centrifugáljuk a mintát, mely során elválnak az acetonitriles, vizes és a minta szilárd részeit tartalmazó fázisok. A felső, acetonitriles fázisból 5,0 ml-t átpipetázunk egy 15 ml-es centrifugacsőbe, amihez hozzáadagoljuk a d-SPE tisztító szorbenseket: 750 mg magnézium-szulfát sót az esetlegesen acetonitrilben maradt víz kivonására, és 250 mg PSA szorbenst univerzális tisztító szorbensként különböző mátrixkomponensek megkötése céljából. A mintát ezt követően 20 mp-ig kémcsórázón rázatjuk, majd újabb centrifugálást követően (4000 rpm, 4 perc) a felülúszóból 800 µl-t pipetázunk egy 1,5 ml-es mintatartó edénybe. Ezt a 800 µl mintát inert argon gáz alatt elpárologtatjuk, majd visszahígítjuk a kromatográfiás elválasztás során eluensként használt összetételű acetonitril/víz eleggyel. Injektálás előtt a mintákat egy 0,45 µm porozitású PTFE teflon szűrőn szűrtem át.

### 5.2.2.3. Komponensek azonosításának menete (screening módszer)

Ahogy azt a 2.4.3.4. fejezetben bemutattam, a nagyfelbontású műszerek egyik nagy előnye, hogy a felvett tömegspektrumban történő célkomponenses keresés jelentősen megkönnyíthető és gyorsítható pontos tömeg adatbázisok használatával. Az általam használt Agilent 6220 TOF műszerhez tartozó MassHunter szoftver is el van látva ilyen funkcióval, mely lehetővé tette az adatbázisban szereplő komponensek gyors és egyszerű kimutatását.

Az alkalmazott kereső módszer az alábbi lépésekből áll:

**(i) Minta-előkészítés:** A keresés első lépése – mint minden analízis során – a minta-előkészítés. Tekintve, hogy a műszerrel elméletileg korlátlan számú komponens mérhető egyszerre és az adatbázisban szereplő komponensek köre is tetszés szerint bővíthető, ez a lépés tekinthető a mérés szűk keresztmetszetének. E megfontolásból az előző pontban bemutatott QuEChERS technikát választottam erre a célra, mely univerzális mivoltának köszönhetően kifejezetten alkalmas az ilyen széleskörű kereső (*wide-scope screening*) módszerek fejlesztése során.

**(ii) Analízis:** A minta-előkészítési lépést követi a nagyfelbontású MS analízis az ún. „*full-scan*” (teljes pásztázási) módban, mely során a műszer a teljes tömegtartomány pásztázza és rögzíti nagy tömegpontossággal (ált.  $\Delta m < 2$  ppm).

**(iii) Komponensek keresése:** Az így felvett „nyers” tömegspektrumban elvégezhető az adatbázis alapú keresés, amelyre a szoftver különböző lehetőségeket kínál. Ezek a következők:

- ***Find compounds by formula*** (képlet alapján történő keresés): Ezt a funkciót alkalmazva a szoftver az adatbázisban szereplő összegképleteket felhasználva kiszámítja azok teoretikus tömeg/töltés értékét, s ezen értékeket összeveti a nyers tömegspektrumban található csúcsokkal. Ezt az összehasonlítást egy meghatározott toleranciaszinttel végzi, melyet a felhasználó határozhat meg a keresés indításakor (meghatározott tömegpontosság, ppm-ben kifejezve). Ha a szoftver az így meghatározott toleranciaszinten belül talál olyan iont, amely megfelel(het) valamely adatbázisban szereplő komponensnek, kiextrahálja a tömeg/töltéshez tartozó kromatogramot (méréseim során egy adott  $m/z$  érték  $\pm 10$  ppm-es tömegtartományához tartozó kromatogramot extraháltam ki). További szűrő feltételként megadhatunk retenciós időket az adatbázisban szereplő komponenseknek (amennyiben rendelkezésünkre áll a komponens sztenderdje), s így a szoftver csak a komponenshez tartozó retenciós időben keresi az adott  $m/z$  értéket (szintén meghatározható toleranciával; általában  $\pm 1$  perc). Ezáltal a téves pozitív találatok száma jelentősen csökkenthető. A módszer hátránya, hogy további szűrő feltételek



nem adhatók meg, melynek következtében a keresés jelentős számú téves pozitív találatot eredményezhet, különösen a bonyolultabb mintamátrixok (pl. hagyma, citrom stb.) esetében.

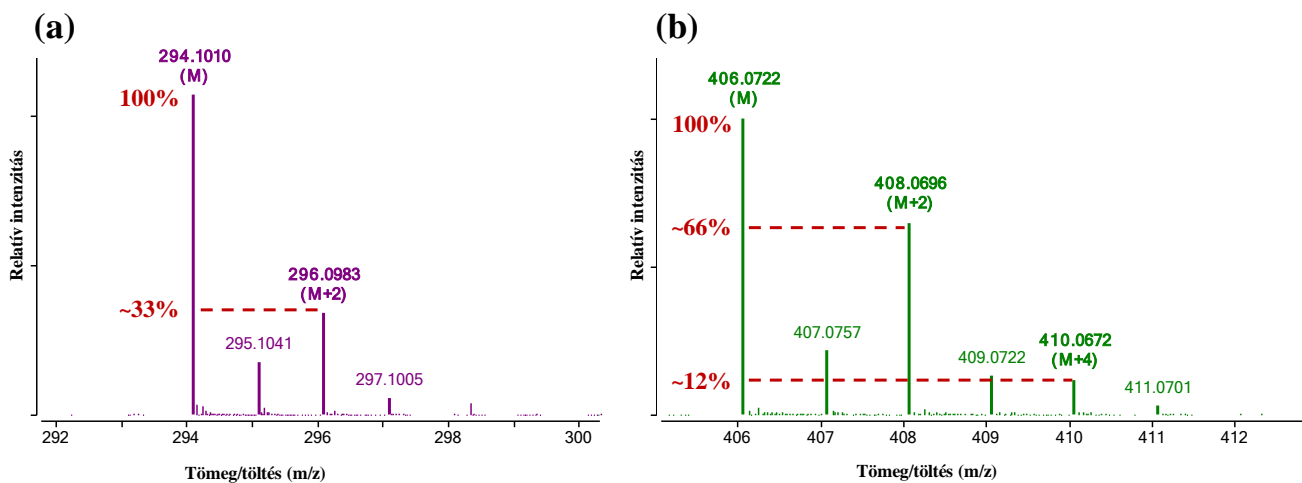
- **Find by molecular feature:** Ezen funkciójában a szoftver – hasonlóképp az előző módhoz – az adatbázisban szereplő komponensekhez tartozó tömeg/töltés érték alapján végzi a keresést. Előnye azonban az előzőekben bemutatott funkcióval szemben, hogy több szűrési feltételt tudunk meghatározni. Ilyen szűrési paraméter lehet – a korábban már említett pontos tömeg mellett – például minimális abszolút és relatív csúcsmagasságok és jel/zaj viszony megadása, vagy egy komponens tömegeltolódása (*mass defect*), mely feltételeknek köszönhetően jelentősen csökkenthető a téves pozitív találatok száma. Az ilyen szűrőfeltételek megállapítása során azonban óvatosan kell eljárni, hiszen a túl engedékeny értékek nem küszöbölik ki a téves pozitív eredményeket, ellenben a túl szigorú értékek megnövelhetik a téves negatív eredmények szolgáltatásának valószínűségét.

**(iv) Megerősítés:** Az adatbázis alapján történő keresést követően (végezzük bármelyik módszerrel is) a szoftver felállítja a talált komponensek listáját, és kiextrahálja a hozzájuk tartozó tömeg/töltés értékek kromatogramját és a tömegspektrumot az adott időpillanatban. Általában ez a lista azonban még szigorú szűrési feltételek mellett is tartalmaz téves pozitív találatokat, így a találatok megerősítése céljából manuális ellenőrzésre van szükség. Ezt a megerősítést különböző, együtt is alkalmazható módszerek teszik lehetővé, melyek az alábbiak lehetnek:

- **Szoftveres megerősítés:** Megerősítés céljából alkalmazhatjuk a szoftver „*Identify compounds*” opcióját, mely a találati lista elemeit újra összeveti az adatbázisban található komponensekkel és a hozzájuk tartozó retenciós idő értékekkel. Ezt követően a feltételezett komponenseket egy ún. „*overall score*” értékkel jellemzi, figyelembe véve a teoretikus és a mért tömeg/töltés értékek közti eltérést, illetve, amennyiben rendelkezésre áll retenciós idő információ, a retenciós idők közti eltérést.

Empirikus tapasztalatokra alapozva általánosságban elmondható, hogy a 60%-nál kisebb *score* értékkel jelölt komponensek nem valós találatot jelentenek.

- Izotópmintázat:** Abban az esetben, ha nem áll rendelkezésünkre egy komponens sztenderdje, a retenciós idő által szolgáltatott nagy bizonyosságú megerősítés nem lehetséges. Ekkor további megerősítés válhat szükségessé, elkerülendő a téves pozitív eredmény szolgáltatását. Ilyen további megerősítést tesz lehetővé, ha a mérendő komponens valamilyen jellegzetes izotópmintázattal bíró atomot/kat tartalmaz (pl. Cl, S, Br). Ezek közös jellemzője, hogy szemben a monoizotópos elemekkel, két vagy több izotóppal rendelkeznek, mely izotópok aránya jellemző az adott elemre, s melynek köszönhetően egy ilyen elemet tartalmazó molekula izotópmintázata jellemző lesz az őt alkotó atomokra. Így például egy Cl atomot tartalmazó molekula tömegspektrumán (pl. triadimefon; 10. ábra/a) a molekulaion (M) és a (főként) C atomoknak köszönhetően megjelenő M+1 tömeg/töltés érték mellett megfigyelhetjük az M+2 tömeg/töltésű iont is. Észrevehető, hogy ennek az M+2 ionnak az intenzitása kb. az M ion intenzitásának 33%-a, mely a Cl atom jellegzetes izotópmintázatának köszönhető (minden kb. negyedik Cl atom tömege 35 helyett 37 atomtömeg egység). Ha egy két Cl atomot tartalmazó molekulát figyelünk meg (pl. difenoconazole; 10. ábra/b), az M+2 ion intenzitása a molekulaion intenzitásának kb. 66%-a, köszönhetően a két Cl atomnak. Ezen kívül szintén megfigyelhető egy ion M+4 tömeg/töltés értéknél kb. 12%-os intenzitással, mely azt az esetet tükrözi, mikor a molekulában található mindkét Cl atom a 37-es tömegű izotóp formájában van jelen.



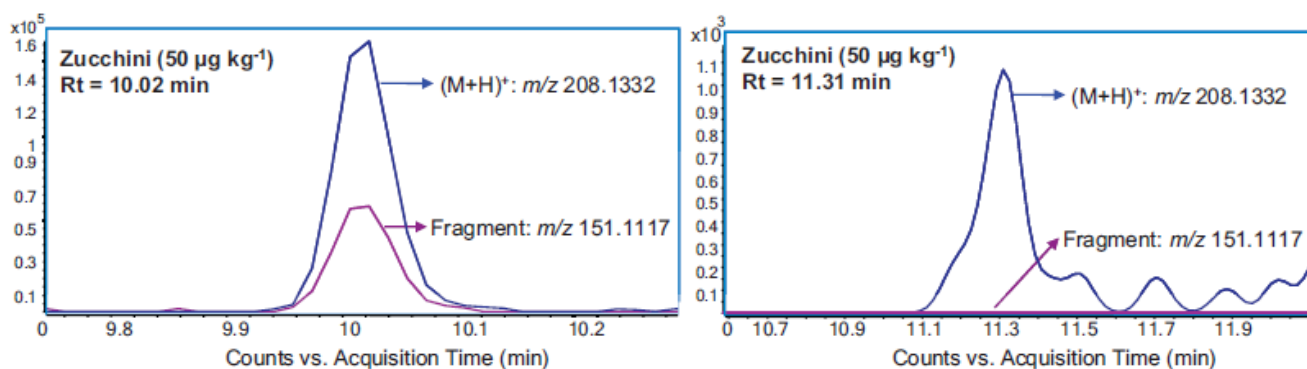
**11. ábra** Klórtartalmú növényvédő szerek jellegzetes izotópmintázata  
 a) triadimefon (1 klór atom); b) difenoconazole (2 klór atom)

Ennek a jellegzetes izotópmintázatnak köszönhetően az ilyen atomokat tartalmazó molekulák és fragmenseik könnyebben észrevehetőek a tömegspektrumban, illetve vizsgálatukkal megerősíthető egy valószínűsített találat. Ezzel a módszerrel ugyanis kiszűrhetőek az olyan téves pozitív találatok, melyek az egyező (vagy közel azonos) tömeg/töltésű mátrixkomponens jelenlétéből származnak, ám azok nem tartalmazzák a jellegzetes izotópmintázatú atomot.

- **Fragmensek:** Egy komponens egyértelmű azonosítását jelentősen megkönnyítheti, ha az adott molekulát fragmentálva megvizsgáljuk a keletkező fragmenseket, feltérképezve ezzel a jellegzetes molekula-részleteket, funkció csoportokat. Ezt a technikát különösen a tandem-MS készülékeknel alkalmazhatjuk nagy sikerrel, ahol a külön erre a célra kialakított ütközési cellában nagy hatékonysággal fragmentálhatók a molekulák, és az így vizsgált szelektív prekursor ion - termékion átmenetek nagybiztonságú megerősítést tesznek lehetővé. Az általam használt TOFMS tömegspektrométer azonban ún. *single-MS* készülék volt, mely azt jelenti, hogy csak egy tömeg-analizátort tartalmazott, és szemben a tandem-MS készülékekkel, nem volt ellátva a molekulák fragmentációját szolgáló ütközési cellával. Ez azonban nem jelenti azt, hogy e műszer alkalmazásakor le kellene mondanunk a fragmensek által szolgáltatott fontos információkról. Ez annak köszönhető, hogy bár a műszer nem tartalmazott ütközési cellát, a molekulák fragmentálása mégis lehetséges volt az ilyen műszereknél elterjedt módon, forrásban történő fragmentáció (*in-source fragmentation*) útján. Az így keletkezett fragmensek mennyisége és aránya egy ionforrás paraméter, a fragmentor feszültség nagyságától függ. Ezen paraméter változtatásával növelhetjük a megjelenő fragmensek mennyiségét, azonban ez az anyamolekula intenzitásának csökkenésével jár, ezért méréseim során a kompromisszumos, már korábbi mérések során jól bevált 190 V-os feszültséget alkalmaztam. Ilyen feszültség mellett (általában) már megjelennek az anyamolekulán kívül annak fragmensei is, azonban még nem kell az anyamolekulák jelentős intenzitás-csökkenésével számolnunk, mely téves negatív eredményekhez vezethetne. Ezeket az (*in-source*) fragmenseket felhasználhatjuk a feltételezett találat megerősítésére, mintegy kvázi MS/MS készüléknél. Ez történhet oly módon, hogy a fragmens már szerepel a pontos tömeg adatbázisban, illetve történhet manuális kereséssel. Az első esetben, amennyiben az anyamolekula fragmentálódott, az automatikus keresés segítségével detektálhatóak a fragmensionok. A második esetben az anyamolekula retenció idejében manuálisan keresünk fragmensionokat a nyers tömegspektrumban. Ezt a keresést segítheti, ha ismerjük a molekula fragmentációs útvonalát (előzetes MS/MS tapasztalatok vagy irodalmi adatok), illetve ha a mérendő komponens tartalmaz jellegzetes izotópmintázatú elemet, s azokat a fragmensei „öröklék”, miáltal könnyebben észrevehetővé válnak a spektrumban.

Mindkét esetben azonban szem előtt kell tartanunk, hogy a forrásban történő fragmentáció nem „szelektív”, azaz nem csak a mérendő komponens fragmentálódik, hanem minden, az ionforrásba kerülő molekula. Ez azt jelenti, hogy az anyamolekula és (feltételezett) fragmense között nincs egyértelműen bizonyítható kapcsolat, így ezen fragmensek vizsgálatakor figyelmesen kell eljárunk, minden esetben megvizsgálva, hogy az anyamolekula és a feltételezett fragmens retenciós ideje megegyezik-e. Azonban a retenciós idők tökéletes egyezése sem jelenti egyértelműen, hogy egy feltételezett fragmens az adott anyamolekulához tartozik, mivel egy ilyen anyaion-fragmension kapcsolat bizonyítása ezzel a műszerrel nem is lehetséges. Fontos tehát kiemelni, hogy bár mindenképpen hasznos és érdemes a fragmensionok monitorozása, azonban ezt az információt legjobb esetben is csak másodlagos megerősítő információként szabad elfogadnunk.

A fragmensionok monitorozása révén elérhető megerősítés fontossága különösen abban az esetben értékelődik fel, amikor szűrőfeltételként nem határoztunk meg retenciós időt. Jól szemlélteti ezt a Malato és munkatársaitól átvett promecarb hatóanyag ( $C_{12}H_{17}NO_2$ ) példája [Malato et al. 2011]. Ebben az esetben a csak a szerkezeti képleten alapuló keresés két időpontban is találatot eredményezett a kérdéses  $m/z$  értékre. A 11,3 percnél jelentkező (izobár) komponens okozta téves pozitív találat kiszűrését a karakterisztikus fragmension ( $m/z$  151) monitorozása tette lehetővé.



**12. ábra** Fragmensionok vizsgálatának fontossága; a retenciós idő ismerete nélkül is kiszűrhető az izobár komponensek (jobb oldalon) okozta téves pozitív találat (Forrás: Malato, 2011)

#### 5.2.2.4. Az automatizált keresés szűrési feltételeinek kiválasztása

Ahogy a bevezetésben említettem, a téves pozitív eredmények számának csökkentése érdekében szükséges lehet különböző szűrési feltételek megadása az automatikus keresések során. Ezen feltételek helyes megválasztása fontos feladat, ha el akarjuk kerülni a túl szigorú feltételek okozta téves negatív, illetve a túl engedékeny feltételek okozta téves pozitív eredmények számának emelkedését.

Egy tanulmányban Malato és mtsi. vizsgálták a különböző szűrési paraméterek a keresés sikerességére gyakorolt hatását [Malato et al. 2011]. Ezek alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- **Retenciós idő:** A retenciós idő szűrési paraméterként történő felhasználása nagyfokú megerősítést tesz lehetővé, jelentősen csökkentve a téves pozitív találatok eredményét. Az elfogadási tartomány szélessége általában  $\pm 0,3-1$  perc, melyet befolyásol az alkalmazott kromatográfiás technika és annak robusztussága (pl. egy robusztus UPLC módszer esetében felesleges a  $\pm 1$  perces időablak használata, mivel ezzel csak a téves pozitív eredmények száma nőne meg).
- **Tolerancia a tömegek eltérésére:** Az adatbázisban szereplő összegképlethez számolt teoretikus  $m/z$  értékhez képest a mérés során eltérő értékeket kaphatunk. Azt, hogy milyen fokú eltérést tekintünk még elfogadhatónak, az analitikus szabja meg a keresés indításakor. Lehetőség van abszolút és relatív eltérés megadására. Abszolút eltérés esetében általában (a műszer tömegpontosságától és felbontóképességétől függően) 0,5-5 mDa-os értéket szoktak alkalmazni. Abszolút eltérés megadása esetében azonban problémát jelent, hogy ez az eltérés érték más relatív eltérést jelent különböző tömegű molekulák esetében. Ez a nagyobb tömegű molekulák (>350 Da) esetében jelenthet problémát, ugyanis egy szigorú abszolút toleranciaszint felállítása esetén a relatív eltérés ( $\Delta\text{ppm}$ ) már túl szigorú lenne. Ebből kifolyólag szerencsésebb a relatív eltérés alkalmazása (általában  $\pm 5-10$  ppm).

A fent elmondottak alapján a következő szűrési paramétereket állítottam be:

- Minimális csúcs alatti terület: 300 beütésszám
- Tömegeltérés:  $\pm 5$  ppm
- Retenciós idő alapján történő szűrést nem alkalmaztam.

### 5.2.3. Eredmények és értékelésük

#### 5.2.3.1. A pontos tömeg adatbázis szerkesztése

Mivel az alkalmazott műszer szoftvere lehetővé tette az automatikus, adatbázis alapján történő keresést, első lépésként megalkottam a mérendő komponensek listáját. Kiaknázandó a műszer egyik legnagyobb előnyét, az elméletileg korlátlan számú mérhető komponenst, a lehető legszélesebb körű listát kívántam létrehozni. Erre a célra már meglévő növényvédő szer adatbázisokat [Ferrer et al. 2006, Mezcua et al. 2009ba, Thurman et al. 2006] használtam fel, illetve internetes keresést [Internet\_1] végeztem, mely során létrehoztam a célkomponensek listáját, mely jelen állapotában kb. 1400 komponenst tartalmaz. Ezt követően a listát kiegészítettem a komponensekhez tartozó összegképletekkel és teoretikus tömeg/töltés értékükkel, s így létrehoztam a pontos tömeg adatbázist a szoftver által kezelhető kiterjesztésben (pontosvesszőkkel tagolt értékek; .csv kiterjesztés). Az adatbázisban szereplő kb. 1400 komponensből 850 anya-, 447 fragmens-, 99 pedig bomlástermék molekula, mely szám a későbbiekben bármikor tovább bővíthető újabb komponensekkel.

Megjegyzendő azonban, hogy mivel az adatbázist nem csak folyadékkromatográfiás, hanem gázkromatográfiás (pl. GC-TOFMS) mérések során is felhasználhatóvá kívántam tenni, az adatbázisban szereplő komponensek körét nem szűkítettem le a csak LC-vel, illetve a csak GC-vel mérhető komponensek körére. Ennek következtében, például egy folyadékkromatográfiás mérés során nem az összes 850 szert vizsgálhatjuk, hanem (értelemszerűen) csak az LC-vel mérhető szereket. Tekintve azonban, hogy az LC-vel, illetve GC-vel mérhető komponensek jelentős átfedést mutatnak, az adatbázist nem választottam két részre.

*(Megjegyzés: Az adatbázis terjedelmes mivolta miatt nem tartottam megfelelőnek annak dolgozatomhoz való csatolását, még mellékletként sem. Internetes hozzáférés az adatbázishoz: [Internet\_2]).*

### 5.2.3.2. Kereső módszer alkalmazása valódi mintákon

A fentebb bemutatott automatizált keresés segítségével megvizsgáltam 29, kereskedelemből származó zöldség-, gyümölcsmintát. A mintákat előzetesen megvizsgáltam a 4.2.1. fejezetben ismertetett tandem-MS készülékkel is, és az automatikus keresést értékelendő összehasonlítottam a két műszerrel kapott eredményeket.

A tandem-MS készüléket alkalmazva a 29 vizsgált mintában összesen 130 esetben találtam növényvédő szermaradványt, mely komponensek listáját és azok koncentrációját az adott mintában a Mellékletek IV. táblázatában foglaltam össze. A táblázatban ezen kívül feltüntettem, hogy az adott komponens a TOFMS készülékkel vizsgálva kimutatta-e az automatikus keresés.

A tandem-MS készülékkel talált 130 komponens mintegy 81%-át (130-ból 105-t) a TOF készülékkel is sikerült detektálnom és azonosítanom. 25 esetben fordult elő, hogy egy komponens csak a tandem-MS készülékkel sikerült kimutatnom (komponensek félkövérrel jelezve a táblázatban). Erre a különbségre több magyarázat lehet:

- (i) a tandem-MS technika valamelyest nagyobb érzékenysége
- (ii) a két mérés között eltelt idő: elsőként a tandem-MS méréseket végeztem el, majd néhány hónap múlva a TOFMS méréseket, mely idő alatt (a hűtött tárolás ellenére) bomolhattak a komponensek
- (iii) különböző szűrők használata: a tandem-MS mérésekhez a minta törzsoldatokat PTFE szűrőn szűrtem le, míg a TOFMS mérésekhez a spanyolországi laboratóriumban használt nylon szűrőt használtam. Kis koncentrációsinteknél egy ilyen különbség már könnyen befolyásolhat egy igen/nem döntést.

Érdemes kiemelni, hogy a 25 esetből 20-nál a komponensek koncentrációja kisebb volt, mint  $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ . Öt esetben fordult csak elő, hogy ennél nagyobb koncentrációban jelen lévő szermaradványt nem sikerült kimutatni a TOFMS műszerrel. Ezek közül kettő a két szőlő mintában jelenlevő chlormequat chloride, mely eltérés szintén a fentebb említett okok valamelyikére vezethető vissza. Ezen kívül három esetben fordult elő, hogy nagy koncentrációban jelen lévő komponens nem sikerült detektálnom az automatikus kereséssel (0,65, 1,18 és 3,52 ppm; cyprodinil, propamocarb és azoxystrobin). Ennek oka (melyet már Malato és mtsi. is az adatbázis alapú kereső módszerek sikerességét korlátozó egyik tényezőként említenek [Malato et al. 2011]), hogy a TOFMS technika korlátozottabb lineáris tartománnyal rendelkezik, mint az MS/MS készülékek. A nagy koncentrációban jelen lévő komponensek telítik a detektort, melynek következtében romlik a tömegpontosság, így a komponensek kívül esnek a  $\pm 5$  ppm-es toleranciaszinten. A problémára (fél)megoldást jelenthet, ha a vizsgált minták mindegyikéből 10x-es hígítást készítünk, mintánként két mérést végezve. Az eljárás

természetesen megduplázza a mérési és adatfeldolgozási időt, így rutinban történő alkalmazása nem célszerű. Igazi megoldást a műszerek szoftveres hátterének fejlesztése jelentene, elkerülve a túltelítés okozta tömegpontosság romlását.

Az összehasonlítás során 15 komponensnél összesen 24 esetben fordult elő, hogy egy komponenst csak az automatizált kereső módszerrel fedeztem fel, a tandem-MS készülékkel nem (ld. 5. táblázat). Ebből három komponens növényvédő szer alapmolekula volt (cyproconazole, chlorantraniliprole és fluopicolide), melyek nem szerepeltek az MRM módszerben, így értelemszerűen nem is lettek detektálva. Kiemelendő, hogy a cyproconazole szert fejes salátában találtam, melynek nem szabadna ebből a szerből kimutatható mennyiséget tartalmaznia. További négy komponens már korábban azonosított bomlástermék volt, melyeket az MRM módszer szintén nem vizsgált. Érdekes módon nyolc komponens csak a TOFMS műszerrel lett detektálva, annak ellenére, hogy azok szerepeltek az MRM módszer által vizsgált szerek listáján. Utóbbira magyarázat lehet a TOFMS műszerrel full-scan módban elérhető nagy érzékenység, mellyel szemben a másik oldalon, az MRM-EPI módszerben (a pásztázott több mint 300 átmenet miatt) valamelyest csökkent érzékenységű detektálás áll. Leellenőrizve továbbá az MRM módszerben található átmeneteket, a nyolc komponensből kettőnél (iprodone és penconazole; mindkét komponens két klór atomot tartalmaz) találtam, hogy az MS/MS optimálás a kevésbé intenzív M+2 ionra lett elvégezve.



5. táblázat A kizárólag TOFMS készülékkel detektált komponensek

Hatóanyag	Minta	Összegképlet [M+H] <sup>+</sup>	Elméleti m/z	Tapasztalt m/z	Hiba, ppm	R <sub>t</sub> , perc
Cyproconazole *	Fejes saláta	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>3</sub> O	292,1212	292,1211	0,34	16,8
Chlorantraniliprole *	Körte	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> BrCl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	481,9781	481,9766	3,11	16,1
Fluopicolide *	Paradicsom	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	382,9727	382,9723	1,04	18,3
Iprodione **	Eper	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	330,0407	330,0405	0,60	18,7
	Körte			330,0406	0,60	18,7
	Zöld paprika			330,0401	1,81	18,7
Pyrimethanil **	Paradicsom	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub>	200,1182	200,1183	0,50	13,4
Indoxacarb **	Zöld paprika	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	528,0780	528,0778	0,38	21,6
	Paradicsom			528,0770	1,89	21,4
Difenoconazole **	Zöld paprika	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	406,0720	406,0716	0,98	19,9
Penconazole **	Zöld paprika	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	284,0716	284,0713	1,06	18,6
Pyraclostrobin **	Szőlő	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	388,1059	388,1055	0,77	20,8
Dimethomorph **	Szőlő	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> ClNO <sub>4</sub>	388,1310	388,1306	1,03	16,1, 16,4
Kresoxim-methyl **	Szőlő	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub>	314,1387	314,1387	0,0	19,9

Hatóanyag	Minta	Összegképlet [M+H] <sup>+</sup>	Elméleti m/z	Tapasztalt m/z	Hiba, ppm	R <sub>t</sub> , perc
Imazalil bomlástermék [Thurman et al. 2005]	Narancs	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	257,0243	257,0236	2,72	9,4
	Citrom			257,0241	0,78	9,5
	Narancs			257,0241	0,78	9,6
	Grapefruit			257,0239	1,56	9,6
Prochloraz bomlástermék [Thurman et al. 2005]	Narancs	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>3</sub> NO	282,0214	282,0219	1,77	11,6
	Citrom			282,0211	1,06	11,6
	Kígyóborka			282,0219	1,78	11,8
Imidacloprid, OH-	Paradicsom	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	272,0545	272,0543	0,73	8,7
	Zöld paprika			272,0548	1,10	8,7
Imidacloprid, olefin-	Paradicsom	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	254,0439	254,0440	0,39	8,1

\* A komponenst nem vizsgálta az MRM módszer

\*\* A komponenst vizsgálta az MRM módszer, viszont nem lettek detektálva

## 5.2.4. Konklúziók

Ebben a fejezetben egy széleskörű kereső módszer fejlesztését mutattam be, mely a nagyfelbontású, nagy tömegpontosságú műszerek által nyújtott előnyöket aknázza ki.

A lehető legtöbb komponens vizsgálata céljából a minták előkészítésére az univerzális, multikomponenses QuEChERS módszert választottam. Az extraktumokat egy LC-TOFMS készülékkel vizsgáltam teljes pásztázási módban.

Az így felvett spektrumban a szoftver által nyújtott funkciót kihasználva kerestem komponenseket. Ehhez egy kb. 1400 komponens adatait tartalmazó adatbázist szerkesztettem meg, mely jelentősen megkönnyíti az információban gazdag tömegspektrumban történő keresést. Az adatbázis alapú keresések során alkalmazott szűrési paraméterek megválasztását irodalmazási munka előzte meg, mellyel célt volt a téves pozitív és téves negatív találatok számának minimalizálása. A bonyolult minták okozta szinte elkerülhetetlen téves pozitív találatok kiszűrése manuálisan oldható meg.

A megszerkesztett adatbázist felhasználva megvizsgáltam 29, kereskedelemről származó zöldség- és gyümölcsmintát. A keresés hatékonyságát vizsgálandó a kapott eredményeket összevettem egy célkomponenses LC-MS/MS módszerrel, mellyel szintén megvizsgáltam ezeket a mintákat. A két módszerrel kapott eredmények szoros egyezést mutattak: az MS/MS módszerrel detektált komponensek kb. 80%-át a TOFMS készülékkel is sikerült kimutatnom. Ezen kívül utóbbival sikerült az MS/MS módszerrel nem detektált komponenseket is kimutatnom.

Az összehasonlítás során kapott eredmények alapján levonható a következtetés, miszerint az automatizált, adatbázis alapú keresés sikeresen alkalmazható a széleskörű kereső módszerek esetében, jó egyezést mutatva a célkomponenses módszerekkel kapott eredményekkel. Látható továbbá, hogy a nagyfelbontású TOFMS készülékek MS/MS készülékekhez viszonyított kisebb érzékenységét ellensúlyozza a nem célkomponenses (*post-target*) mérési lehetőség, mellyel nem várt szennyezőket is ki tudunk mutatni (ld. cyproconazole példája).

Eredményeim közül kiemelendő fontosságúnak tartom (a komponensek számát tekintve) egyedülálló adatbázis létrehozását, továbbá az LC-TOFMS készülékek széleskörű (akár nem célkomponenses) kereső módszerekben történő alkalmazhatóságának bizonyítását.

### **5.3. NAGYFELBONTÁSÚ TÖMEGSPEKTROMÉTER (LC-TOFMS) ALKALMAZÁSA NEM CÉLKOMPONENSES SZERMARADVÁNY MÉRÉSEKRE; ISMERETLEN NÖVÉNYVÉDŐ SZER BOMLÁSTERMÉKEK AZONOSÍTÁSA**

#### **5.3.1. Bevezetés**

Doktori értekezésemben ez idáig olyan módszerekkel foglalkoztam, melyek (i) vagy célkomponensek egy előre meghatározott körét vizsgálta, (ii) vagy pedig egy teoretikus pontos tömeg adatbázist felhasználva mutatta ki (valamelyest szintén célkomponenses módon) növényvédő szer molekulák jelenlétét. Ezek a molekulák a legtöbb esetben ezen szerek alapformái voltak, eltekintve néhány olyan esettől, ahol a talált molekula egy már korábban felfedezett növényvédő szer bomlásterméke volt, és már szerepelt a keresendő molekulák listáján. Ahogy azonban már a bevezetésben említettem, fontos lehet tudnunk, hogy a szerek alapformáján kívül a vizsgált minta tartalmaz-e egyéb, a keresési listában nem szereplő szennyezőket, ismeretlen bomlástermékeket.

Disszertációm most következő fejezetében egy olyan kereső módszer fejlesztését és gyakorlati alkalmazását mutatom be, mely alkalmas ismeretlen növényvédő szer bomlástermékek viszonylag gyors és egyszerű kimutatására.

A módszer alapja egy olyan megfigyelés, miszerint hasonlóság áll fenn egy molekula természetben történő degradációja és a tömegspektrométerben történő fragmentációja között. Ennek magyarázata, hogy mindkét esetben a molekula leggyengébb kötése szakadnak fel a legnagyobb valószínűséggel. Ezt a módszert García-Reyes és mtsi. fejlesztették ki [García-Reyes et al. 2007c], és „fragmentáció-degradáció” technikának nevezték el. Csatlakozván az említett kutatócsoporthoz a módszert sikerült oly módon továbbfejlesztem, hogy az ismeretlen bomlástermékek keresése szisztematikusan és viszonylag egyszerűen elvégezhető legyen. Ezt az előző fejezetben bemutatott adatbázis alapú keresés és az imént említett „fragmentáció-degradáció” technika előnyeinek ötvözésével sikerült elérnem.

A módszer gyakorlati alkalmazhatóságát bizonyítja, hogy a segítségével megvizsgált 29, az előző fejezetben is vizsgált élelmiszermintában sikerült számos (köztük ismeretlen) bomlásterméket felfedeznem és azonosítanom.

## 5.3.2. Kísérleti körülmények

### 5.3.2.1. Mérési paraméterek

Méréseimet a 4.2.2 pontban bemutatott LC-TOFMS nagy tömegpontosságú tömegspektrométeren végeztem az 5.2.2.1 pontban leírt mérési paramétereket alkalmazva.

### 5.3.2.2. Minta-előkészítés

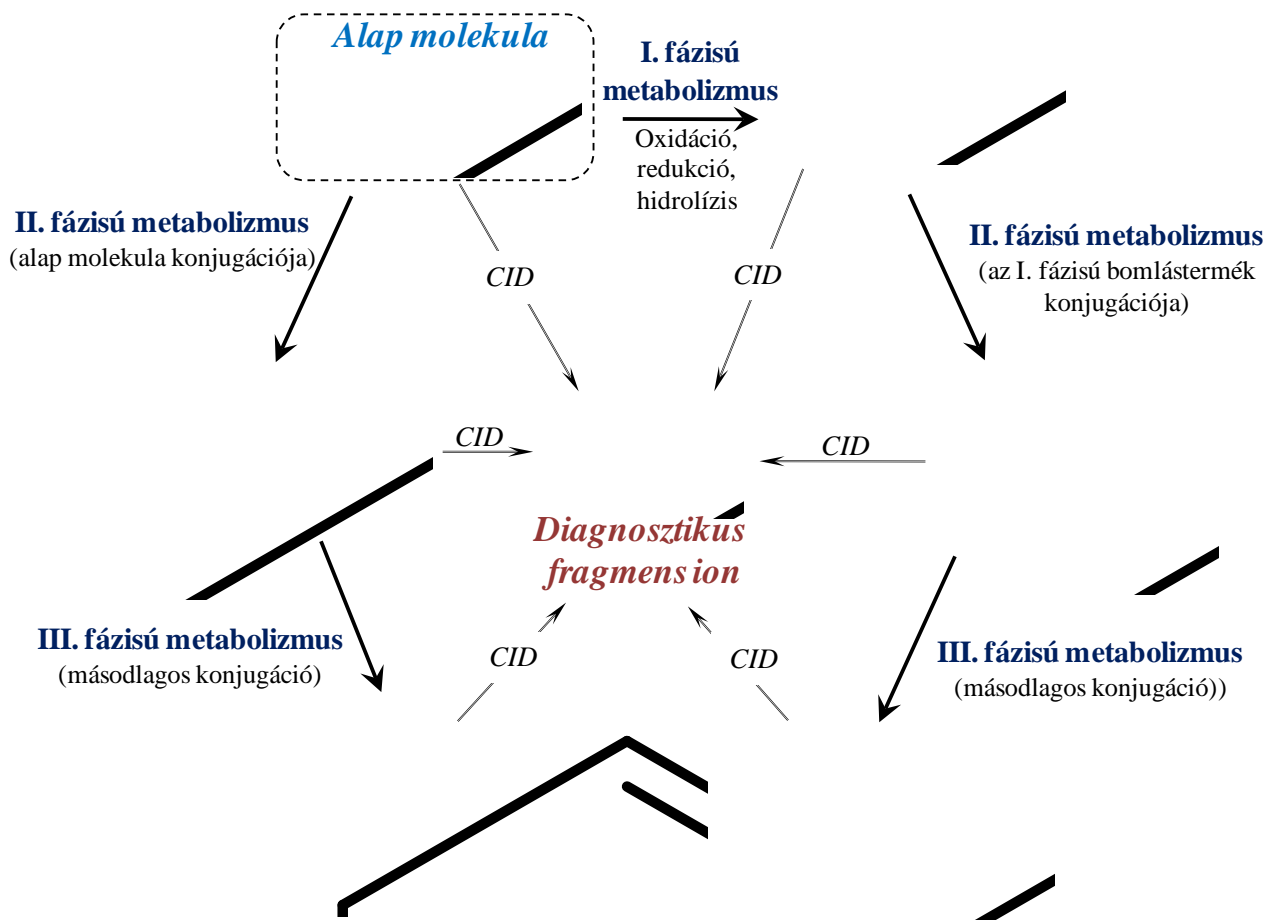
Méréseim során az 5.2 fejezetben vizsgált mintákkal dolgoztam („acetát-pufferelt QuEChERS” minta-előkészítés), a róluk felvett nyers pontos tömegspektrumot újrazivsgálva kerestem növényvédő szer bomlástermékeket.

### 5.3.2.3. Bomlástermékek keresése („fragmentáció-degradáció” technika)

Ahogy azt már korábban bemutattam, a xenobiotikumok, mint pl. a növényvédő szerek bomlása/metabolizációja során az alapmolekula gyakran csak kis változásokon esik át, melynek köszönhetően a kiindulási molekula és a belőle keletkezett bomlástermék számos hasonló funkciós csoporttal, illetve molekularészlettel rendelkezhet. Tömegspektrometriás szempontból ez azt jelenti, hogy a két molekula műszerben történő fragmentációja – azok hasonló mivoltának köszönhetően – azonos fragmensionokat eredményezhet. Ez a tény, illetve a gyakorlati eredményekkel alátámasztott megfigyelés, miszerint hasonlóság áll fenn a molekulák természetben történő degradációja, illetve műszerben történő fragmentációja között adják a „fragmentáció-degradáció” technika elvi alapját (ld. 13. ábra).

A módszer gyakorlati alkalmazása során az alábbi lépéseket kell elvégezni:

- **Fragmentation kromatogramjának vizsgálata:** A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy egy növényvédő szer fragmensei szerepelnek a pontos tömeg adatbázisban, azokat folyamatosan monitorozzuk. Amennyiben egy fragmension (vagy akár maga a molekulaion; ld. később) extrahált ion kromatogramját (EIC) manuálisan vizsgálva több csúcsot figyelünk meg (a főcsúcs retenciósidőjétől eltérő időben is csúcsot látunk), az egy hasonló szerkezetű molekula, azaz egy lehetséges bomlástermék jelenlétére utalhat.



13. ábra A „fragmentáció-degradáció” technika elvi alapja; a bomlástermékek szisztematikus keresése az ún. diagnosztikus fragmension monitorozásával lehetséges (sematikus molekulák)

- **Tömegspektrum vizsgálata:** Amennyiben több csúcsot veszünk észre az ion kromatogramján, a főcsúcs retenciós idejétől eltérő időpillanatban megvizsgáljuk a teljes tömegspektrumot, és megkeressük a lehetséges anyaiont, amelyből képződhetett az adott fragmension. Ebben a keresésben jelentős segítséget jelenthet a már korábban is említett jellegzetes izotópmintázat (pl. klór vagy kén atom a molekulában), illetve ha az anyaiion nem csak a hidrogén-addukt ( $[M+H]^+$ ), hanem nátrium- és kálium-addukt ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ) formában is megjelenik. Utóbbi esetben ugyanis biztosak lehetünk benne, hogy az „M” ionnál nagyobb  $m/z$  értékű anyaiont nem kell keresnünk, mivel nátrium- és kálium-addukt formában fragmension nem, csak a kvázi-molekulaion jelenik meg.

- **Anyamolekula keresése:** Következő lépésként ki kell extrahálnunk a lehetséges anyai ion kromatogramját és retenciós idejét össze kell vetni a fragmensionéval. Csak teljes egyezés esetén tetelezhető fel kapcsolat a lehetséges anyai ion és a fragmension között. A kapcsolat megerősítését segítheti, ha a mintát egy az eredeti gradiens programtól eltérő módszerrel is lemérjük, és ismét megvizsgáljuk a két ion retenciós idejét (*fontos megjegyezni, hogy ezzel csak cáfolni lehet a feltételezett anyai ion-fragmension kapcsolatot, megerősíteni egyértelműen nem*). Segítség lehet továbbá, ha az anyamolekula szerkezetét megrajzoljuk egy képletrajzoló programmal, majd megpróbáljuk a megfigyelt fragmensek  $m/z$  értékéhez tartozó molekularészleteket megtalálni, felfedve ezzel a feltételezett bomlástermék és az alap növényvédő szer közti azonos funkció csoportokat, molekularészleteket.
- **Bomlástermék azonosítása:** Egy ismeretlen molekula azonosítása nagy kihívást jelentő analitikai feladat, mely sikeres elvégzéséhez többféle eljárást kell alkalmaznunk. Méréseim során az alábbi azonosítási technikákat alkalmaztam:
  - **Összegképlet generálása:** Amennyiben megtaláltuk a feltételezett bomlástermék molekulaionját, a szoftver segítségével lehetséges összegképleteket generálunk a molekulára, felhasználva a pontos tömegmérés nyújtotta információkat. Azért, hogy csökkentsük a generált lehetséges képletek számát, mindenképpen érdemes szűrőfeltételeket megadnunk. Ilyen szűrőfeltétel lehet pl. egy bizonyos tömegpontosság (azaz egy adott  $\Delta$ tömeghiba felett a szoftver már nem generál képleteket). Segíthet továbbá, ha figyelembe vesszük a növényvédő szer alapformájának összetételét (pl. egy növényvédő szer, mely nem tartalmaz foszfor atomot, valószínűleg annak bomlásterméke sem fog stb.), illetve a molekula izotópmintázatát is.
  - **További fragmensek keresése:** A feltételezett bomlástermék retenciós idejénél további fragmensionokat kerestem, mely  $m/z$  értékekre lehetséges összegképletet generálva (ld. előző pont) a feltételezett bomlástermék további molekularészleteiről szerezhetünk információt.
  - **Retenciós idő:** Általánosan elmondható, hogy fordított fázisú kromatográfiát alkalmazva kisebb retenciós idő a molekula nagyobb polaritására utal. Ez az információ (bár nem egzakt módon) a feltételezett bomlástermék alap növényvédő szer molekulához viszonyított relatív polaritás viszonyáról adhat tájékoztatást.
  - **DBE (double bond equivalent) érték:** „Kettős kötés ekvivalens” érték. Miután megtaláltuk a legvalószínűbb összegképletet a feltételezett bomlástermékre, érdemes megvizsgálni ezt a szoftver által automatikusan számolt értéket. Ez a szám megmutatja, hogy az adott összegképlethez tartozó molekulában hány kettős kötés és/vagy gyűrű található, segítve ezzel az ismeretlen molekulák szerkezetének feltérképezését.

- **Irodalmi adatok:** További jelentős segítséget nyújthatnak a növényvédő szer bomlástermékekről szóló irodalmak, melyek segítségével könnyebben azonosíthatjuk a megtalált (feltételezett) bomlástermékeket.
- **MS/MS mérés:** A feltételezett bomlástermék azonosítását jelentősen megkönnyítheti egy megerősítő tandem-MS mérés elvégzése, mely során a célzott, szelektív fragmentáció révén értékes információkhoz juthatunk a kérdéses molekula szerkezetéről.

### 5.3.3. Eredmények és értékelésük

Bomlástermékek keresését az 5.2. pontban bemutatott mintákon végeztem el. Elsőként az ott leírt adatbázis alapú keresést alkalmazva megkerestem a növényvédő szerek alapformáját, majd a pozitív mintákban a 5.3.2.3. pontban bemutatott kereső módszerrel kerestem a növényvédő szerek bomlástermékeit. Számos bomlásterméket fedeztem fel a mintákban (ld. 6. táblázat), melyek közül három esetet mutatok be az alábbiakban, szemléltetendő a módszer gyakorlati alkalmazhatóságát.

#### 5.3.3.1. Propamocarb bomlástermékek fejes saláta (*Lactuca sativa*) mintában

Az automata, adatbázis alapú keresést elvégezve a gombaölő propamocarb hatóanyag (PRO;  $C_9H_{20}N_2O_2$ ;  $m/z$  189,1598) maradványait találtam egy fejes saláta mintában. A találat megerősítését a pontos tömeganalízis, az izotópmintázat egyezése, két diagnosztikus fragmension jelenléte ( $m/z$  102,05 és 144,10) és a retenciós idők sztenderddel történő összehasonlítása ( $t_R$ : 2,4 perc) szolgáltatta. A keresést követően a két fragmension kromatogramját vizsgáltam meg, mely vizsgálat során mindkét fragmension esetében két plusz csúcsot fedeztem fel (2,85 és 2,21 perc; ld. 15. ábra). A keresési módszer lépéseit követve megvizsgáltam a pontos tömegspektrumokat az adott időpontokban és lehetséges anyamolekulákat kerestem.

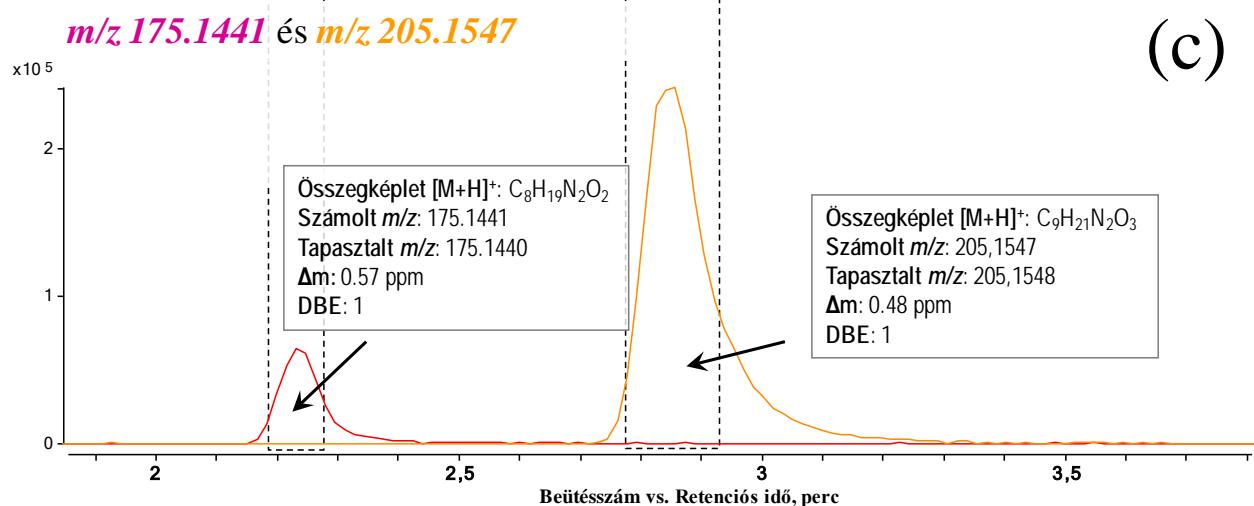
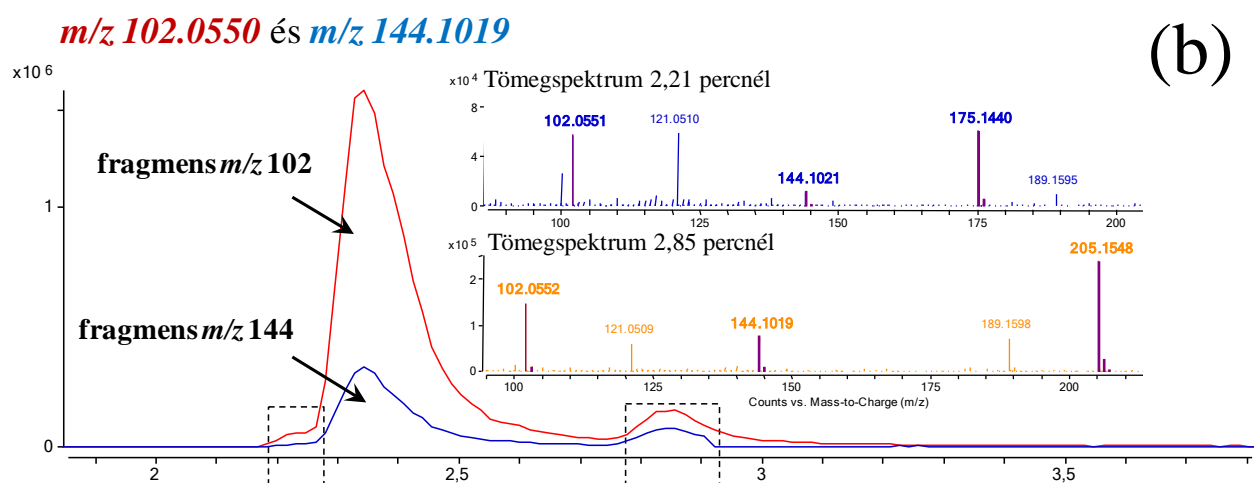
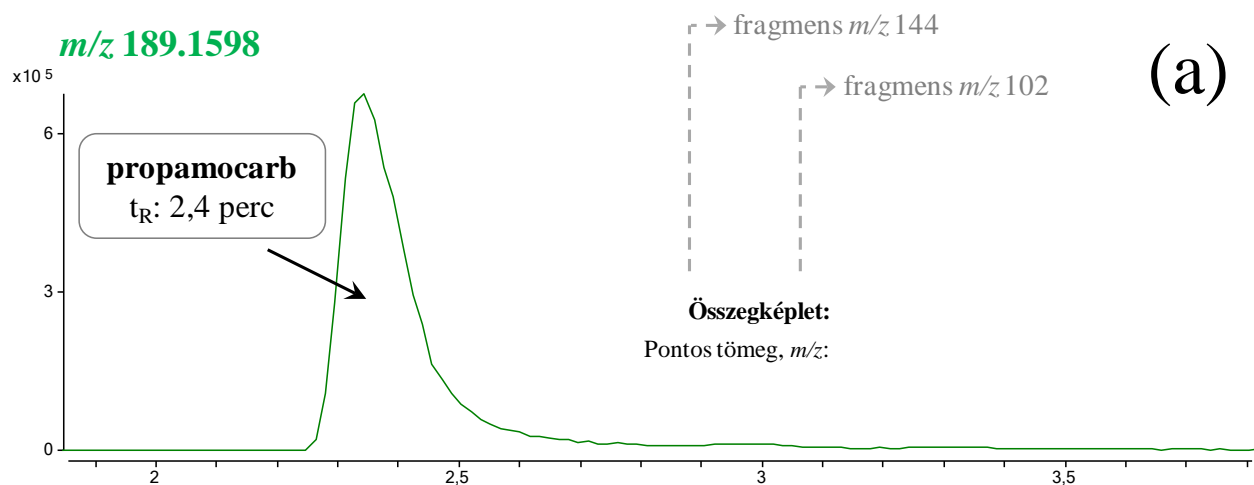
2,85 percnél megvizsgálva a tömegspektrumot (ld. 13. ábra/b) négy intenzív iont találtam:  $m/z$  189,1598,  $m/z$  144,1019,  $m/z$  102,0552 és  $m/z$  205,1548. A 189-es tömeg/töltés értékű ion a PRO alapformája ( $\Delta m$ : 0,0 ppm), mely a 2,4 percnél látható PRO-csúcs leszálló ágából származik, míg az  $m/z$  144 és 102 ionok az alapmolekula fragmensionjai ( $\Delta m$ : 0,0 és 1,96 ppm). A negyedik, legintenzívebb iont ( $m/z$  205,1548) megvizsgálva látható, hogy izotópmintázata egyezik a PRO-éval, továbbá a 16 Da-os tömegkülönbség egy oxidációs származékra utalhat. Az ion kromatogramját kiextrahálva látható volt, hogy retenciós ideje teljesen egyezik a PRO fragmensek kromatogramján látható plusz csúccsal ( $t_R$ : 2,85 perc). Mivel feltételeztem, hogy a felfedezett molekula egy PRO



bomlástermék, a lehetséges összegképleteket generálása során szűrőfeltételként csak szén, hidrogén, nitrogén és oxigén atomokat állítottam be. A legvalószínűbb találat a  $C_9H_{20}N_2O_3$  volt ( $m/z$  205,1547;  $\Delta m$ : 0,48 ppm), mely egy oxigén atomban különbözik a PRO molekulától.

A PRO bomlástermékekről elérhető irodalmat áttanulmányozva három lehetséges oxid-származékot találtam (két hidroxid és egy N-oxid), melyek mindegyike ezzel az összegképlettel rendelkezik [Beyersbach et al. 2000]. A két hidroxid bomlástermék esetében azonban a hidroxid csoport az alapmolekula azon részén található, melyből a fragmentáció során az  $m/z$  102 és 144 fragmensek keletkeznek. Mivel azonban ezen két fragmension kromatogramján észleltem a plusz csúcsokat, levonható a következtetés, miszerint a talált bomlástermék a harmadik lehetséges molekula volt. Bár a végső, egyértelmű megerősítést csak további MS/MS kísérletek vagy sztenderd szintetizálása tenné lehetővé, a rendelkezésre álló információk alapján nagy biztonsággal kijelenthető, hogy a talált bomlástermék az alapmolekula N-oxidációja során keletkezett PRO N-oxid volt. *(Megj.: Az N-oxidok vagy más néven amin-oxidok általános kémiai tulajdonsága a nagyfokú vízdékonyság és erős hidrofil jelleg [Maisonneuve 2000]. Ezzel szemben a felfedezett bomlástermék retenciós ideje nagyobb, mint az alap PRO molekuláé, mely fordított fázisú kromatográfia esetében általában apolárosabb jellegre utal. Lehetséges tehát, hogy a 2,85 percnél talált molekula az N-oxid PRO egy az amin-oxidokra jellemző 1,2-Meisenheimer átrendeződésének terméke volt [Wang 2010]; feltételezett szerkezetet ld. Mellékletek 20. ábrán).*

**2,21 percnél** is hasonló módon kerestem bomlásterméket. Elsőként megvizsgáltam a tömegspektrumot lehetséges anyamolekulát keresve. Az alap PRO molekula és a két fragmensionon kívül egy negyedik ionot találtam 175,1440 tömeg/töltés értékkel. Kiextrahálva az ion kromatogramját látható, hogy retenciós ideje egyezik a fragmensionok kromatogramján látható plusz csúccsal. A lehetséges összegképletek generálása során szintén csak a PRO molekulában megtalálható szén, hidrogén, nitrogén és oxigén atomokat állítottam be. A legvalószínűbb találat a  $C_8H_{18}N_2O_2$  volt ( $m/z$  175,1441;  $\Delta m$ : 0,57 ppm), mely az alapmolekulától egy szén és két hidrogén atomban különbözött (metil-csoport hidrogén atommal történő szubsztitúciója). Figyelembe véve, hogy a feltételezett bomlástermék az alapmolekulával azonos fragmensekkel rendelkezik, kijelenthető, hogy a talált bomlástermék nagy valószínűséggel az alapmolekula N-dealkilációja során keletkezett N-dezmetil-PRO volt, mely oxidációs bomlástermék szintén megtalálható volt korábbi irodalmakban [Beyersbach et al. 2000].



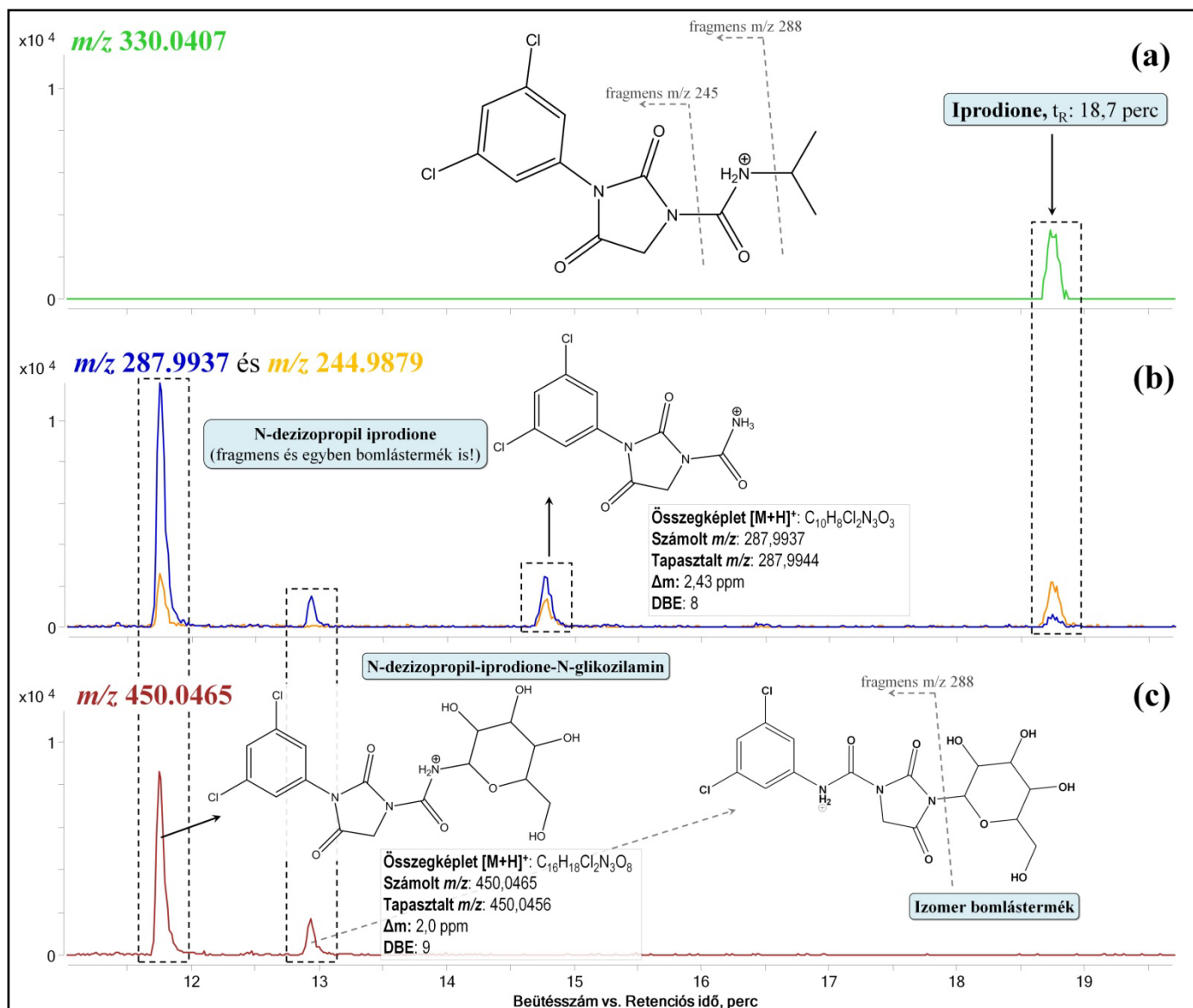
14. ábra Propamocarb és bomlástermékeinek azonosítása fejes saláta mintában; (a) alapmolekula kromatogramja ( $m/z$  189); (b)  $m/z$  144 és 102 fragmensionok kromatogramjai; a fragmensionoknál megfigyelhető két plusz csúcs bomlástermékek jelenlétére utal (tömegspektrumok a két időpillanatban: ld. beillesztve); (c) a két detektált bomlástermék kromatogramja és feltételezett szerkezete ( $m/z$  175 és 205)

### 5.3.3.2. Iprodione bomlástermékek köre (*Pyrus communis*) mintában

Az automatikus kereső módszert alkalmazva egy két klór atomot tartalmazó gombaölő szer, iprodione (IPR;  $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$ ;  $m/z$  330,0407) maradványait találtam egy körte mintában. A molekula azonosítását a pontos tömeg, a jellegzetes izotópmintázat, két diagnosztikus fragmension jelenléte ( $m/z$  287,99 és 244,98) és a molekula retenciós idejének sztenderddel történő összehasonlítása ( $t_R$ : 18,3 perc) tette lehetővé. Követve a bomlástermék-kereső módszer lépéseit, megvizsgáltam a két fragmension automatikusan kiextrahált kromatogramját (16. ábra). Mindkét fragmension esetében észrevehető volt több, a főcsúcs retenciós idejétől eltérő időben megjelenő csúcs ( $t_R$ : 11,7, 12,9 és 14,7 perc), továbbá megfigyelhető, hogy a két fragmens két esetben egyszerre jelent meg (11,7 és 14,7 perc). A fragmensek több időpillanatban történő, és különösen a két fragmens egy időben való megjelenése lehetséges bomlástermékek jelenlétére utalhat, ezért mindhárom időpillanatban megvizsgáltam a pontos tömegspektrumokat lehetséges anyamolekulák után kutatva. A keresést jelentősen megkönnyítette, hogy a fragmensionok mindegyike „öröklí” az anyamolekula két klór atomját, ami azt jelenti, hogy a lehetséges bomlástermék is (legalább) két klór atomot kell, hogy tartalmazzon. Ezt szem előtt tartva kutattam a spektrumokban a klór jellegzetes izotópmintázatát mutató ionok után.

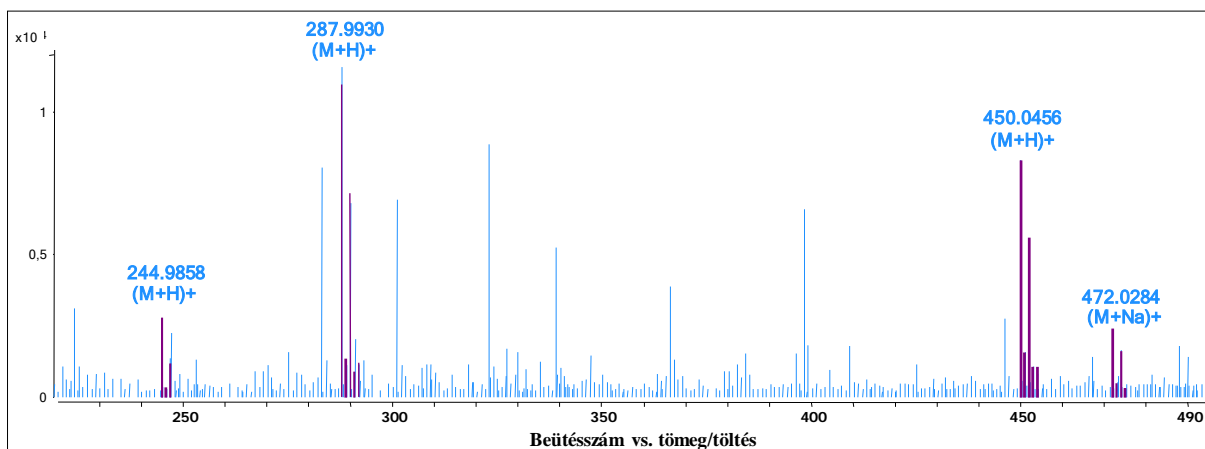
14,7 percnél megvizsgálva a spektrumot kettő két klór atomot tartalmazó molekulát találtam ( $m/z$  244,9865 és 287,9944). Ez a két ion azonos az IPR két fragmensionjával ( $\Delta m$ : 5,71 és 2,43 ppm), mely felvetette annak a lehetőségét, hogy az IPR  $m/z$  288 fragmense egyben egy bomlástermék is, mely retenciós ideje 14,7 perc volt. Ezt a feltevést a bomlástermék és az alapmolekula retenciós idejének viszonya is alátámasztotta. Degradáció során ugyanis általában polárosabb természetű termék keletkezik, melyre így fordított fázisú kromatográfia esetében kisebb visszatartást fogunk tapasztalni. A feltevést továbbá irodalmi adatok is alátámasztották [FAO/WHO 1994]. A talált bomlástermék tehát nagy valószínűséggel az alap IPR molekula N-dealkilációja során keletkezett N-dezizopropil IPR ( $C_{10}H_7Cl_2N_3O_3$ ) volt (IPR-TP1).

Ez az eset jól példázza a „fragmentáció-degradáció” technika elvi alapját, miszerint a növényvédő szerek fragmentációja és degradációja között szoros hasonlóság mutatkozhat. Ez fontos témává és hasznos bomlástermék-kereső eszközzé teszi a növényvédő szerek fragmentációs mechanizmusának feltérképezését.



15. ábra Iprodione és bomlástermékeinek azonosítása körte mintában; (a) iprodione alpmolekula kromatogramja ( $m/z$  330); (b)  $m/z$  288 és 245 fragmensionok kromatogramja; a több időpillanatban megjelenő csúcsok bomlástermékek jelenlétére utalnak; (c) a felfedezett bomlástermék ( $m/z$  450) kromatogramja és a glikozid-származék bomlástermékek feltételezett szerkezete

**11,7 percnél** is megvizsgáltam a tömegspektrumot klórt tartalmazó molekulákat keresve. Öt ilyen iont találtam:  $m/z$  244,9858, 287,9930, 450,0456, 472,0284 és 488,0016 (17. ábra).



**16. ábra** Pontos tömegspektrum 11,7 percnél

Az első két ion feltételezhetően azonos az IPR két fragmensével ( $\Delta m$ : 8,57 és 2,43 ppm). Bár az első ion esetében viszonylag nagy relatív hibát figyelhetünk meg, a jellegzetes izotópmintázat megerősítette a feltevést. Észrevehető továbbá, hogy az  $m/z$  450, illetve az  $m/z$  472 és 488 ionok közötti tömegkülönbség 22 és 38 Da, mely különbségek az  $[M+H]^+$ , illetve az  $[M+Na]^+$  és az  $[M+K]^+$  molekulaionok (hidrogén-, nátrium- és kálium-addukt) közötti különbségeknek felelnek meg. Ez azt jelenti, hogy a lehetséges bomlástermék alapmolekulája az  $m/z$  450 (molekula)ion. A három ionra lehetséges összegképleteket generáltam és – figyelembe véve az ion izotópmintázatát – szűrőfeltételként minimum két klór atomot állítottam be. Figyelembe véve az IPR molekula elemi összetételét, a legvalószínűbb találatnak mindhárom esetben a  $C_{16}H_{17}Cl_2N_3O_8$  összegképlet bizonyult ( $m/z$  450,0465;  $\Delta m$ : 2,00 ppm). Kivonatva az ion kromatogramját látható volt, hogy a csúcs egybeesik a két fragmension csúcsával (továbbá egy másik csúcs is látható volt 12,9 percnél; 16. ábra/b). Megfigyelhető, hogy a kérdéses molekula nagyobb tömegű, mint az IPR, retenciós ideje viszont kisebb, mely egy polárosabb természetű molekulát jelent. Ennek magyarázata lehet, hogy az IPR vagy valamely bomlásterméke egy poláros molekulával kapcsolódott össze. Azért, hogy felderítsem, milyen molekulával kapcsolódhatott az IPR, megvizsgáltam a kérdéses ion illetve az IPR és annak fragmensionjai közötti tömegkülönbségeket. Az alap IPR molekulaion és a kérdéses ion közötti különbség 120,0049 Da volt. Lehetséges összegképleteket generáltam erre a tömegre, azonban nem találtam olyan molekulát, mellyel együtt az IPR a kérdéses  $m/z$  értéket adta volna. Ezután megvizsgáltam a fragmensionok és a kérdéses ion közötti tömegkülönbséget is. Az  $m/z$  288 fragmens és a lehetséges bomlástermék közötti különbség 162,0526 Da volt, mely semleges-vesztés (neutral loss)

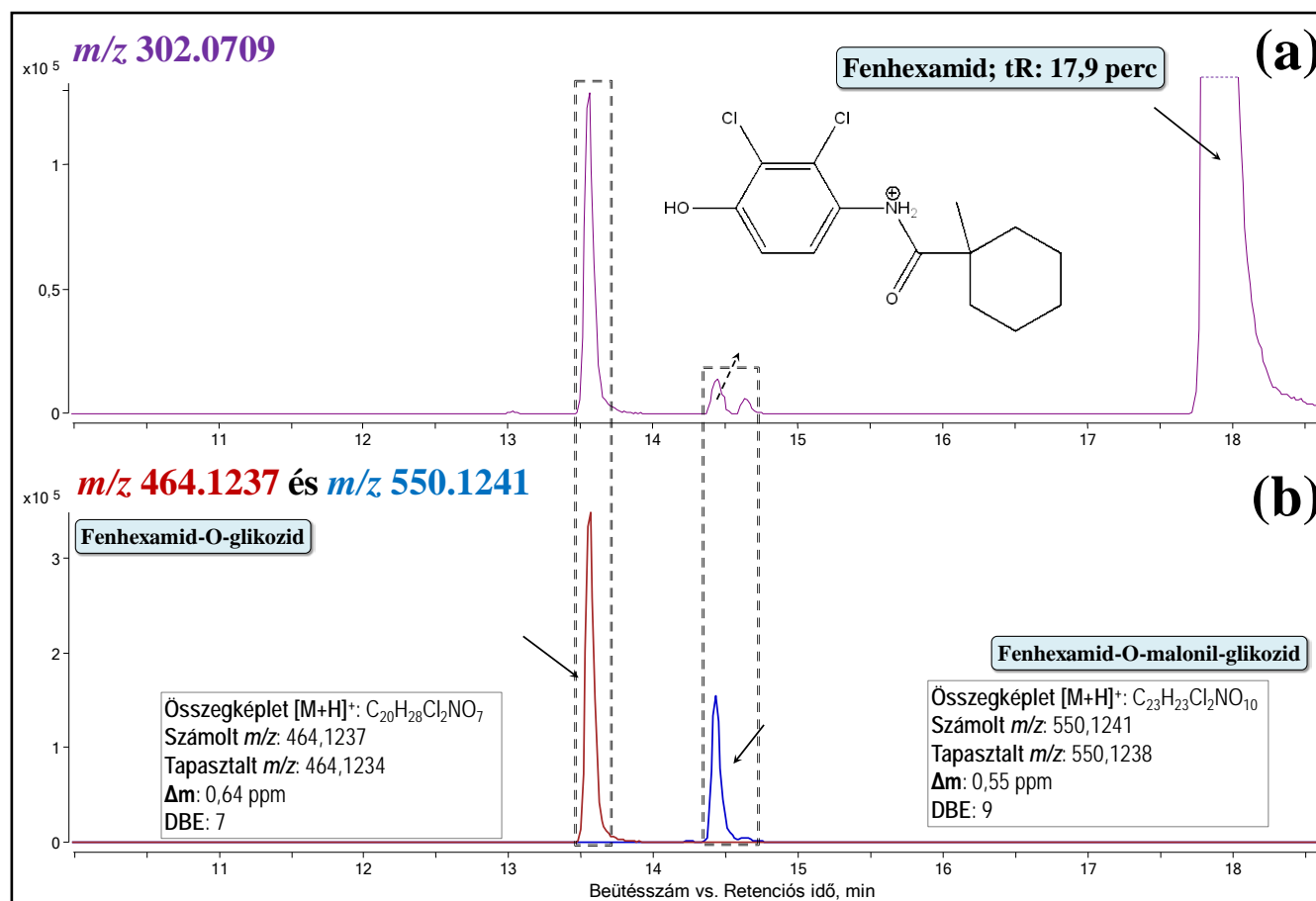
különösen gyakori pl. polifenolos vegyületek esetében [Abrankó et al. 2011]. Ehhez a tömeghez a  $C_6H_{10}O_5$  összegképlet tartozik, mely egy hexóz molekulával (leggyakoribb esetben glükózzal) történő konjugációt jelent. A 11,7 percnél megfigyelt bomlástermék tehát nagy valószínűséggel egy II. fázisú bomlástermék, mely az IPR alapmolekula I. fázisú bomlása során keletkezett (és a 14,7 percnél felfedezett) IPR-TP1 molekula II. fázisú (konjugációs) reakcióban keletkezett terméke, az N-dezizopropil-IPR-glikozilamin (N-glikozid). A molekula feltételezett szerkezete a 16. ábra „c” részletén látható.

12,9 percnél szintén látható volt az  $m/z$  288 fragmension és az  $m/z$  450 ion (továbbá annak Na- és K-adduktjai) is. A két ion kromatogramját egymásra vetítve látható volt, hogy a két ion egyszerre érkezett a detektorba, köztük anyaion-fragmension kapcsolat volt feltételezhető. Érdekes megfigyelni, hogy bár az  $m/z$  288 fragmension megjelent, az  $m/z$  245 fragmension nem volt látható 12,9 percnél. Erre lehetséges magyarázat, hogy az alkalmazott fragmentor feszültség (190 V) túl alacsony volt ahhoz, hogy ez a kisebb tömegű fragmens is megjelenjen. A mintát ezért újra megvizsgáltam magasabb fragmentor feszültséget alkalmazva (230 V), azonban ilyen ionforrás paraméterek mellett sem jelent meg a kérdéses fragmension. Ebből az eredményből arra a feltevésre jutottam, hogy összegképletükben megegyező, azonban szerkezetben valamelyest különböző izomer bomlástermékeket találtam. Ez a feltevés megerősítést nyert az iprodione bomlástermékekről szóló irodalom áttanulmányozása során [FAO/WHO 1994]. A 12,9 percnél látható csúcs az IPR-TP1 bomlástermék izomerizációját (vagy az alap IPR molekula izomerének N-dealkilációját) követően, annak hexóz molekulával történő konjugációs reakció terméke. A bomlástermék feltételezett szerkezetét az 16. ábra „c” részletén szemléltetem. Érdekes módon sem az IPR alapmolekulának, sem az IPR-TP1 bomlástermék molekulának az izomerei nem (vagy kimutatási határ alatt) jelentek meg, csak a bomlástermék glikozid-származéka volt jelen a mintában.

### 5.3.3.3. Fenhexamid bomlástermékek fejes saláta mintában

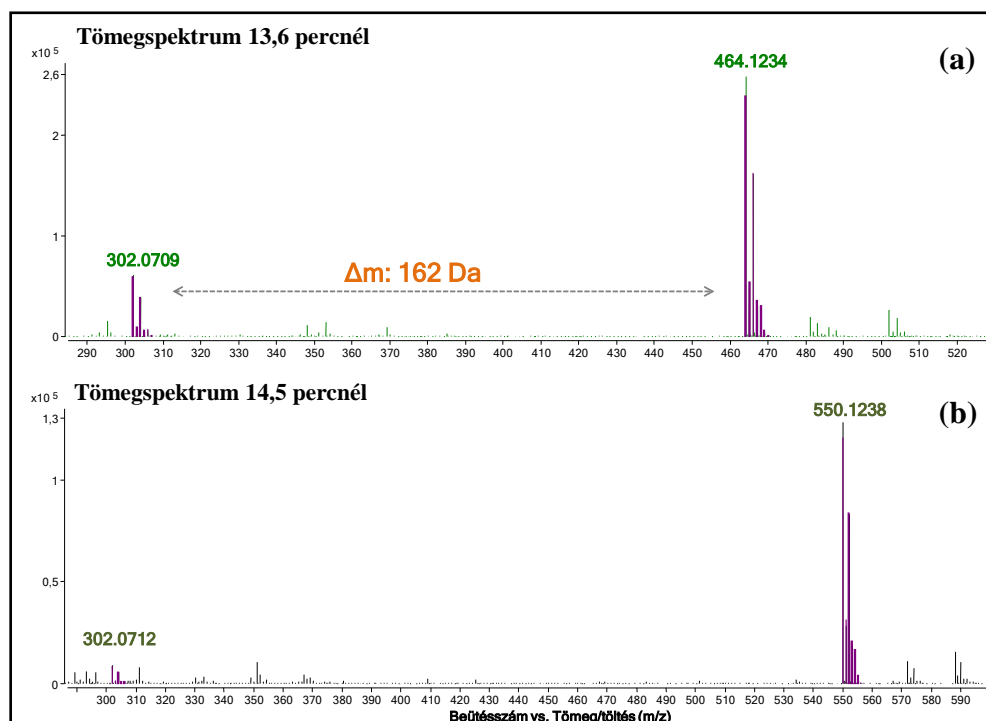
Egy fejes saláta mintában elvégezve az automatikus keresést egy két klór atomot tartalmazó gombaölő hatóanyag, fenhexamid (FHX;  $C_{14}H_{18}Cl_2NO_2$ ;  $m/z$  302,0709) maradványait találtam. A találat megerősítését a pontos tömeganalízis, jellegzetes izotópmintázat, forrásban történő fragmentáció ( $m/z$  97 fragmens) és a retenciós idő sztenderddel történő összehasonlítása ( $t_R$ : 17,9 perc) tették lehetővé.

Ahogy korábban említettem, a bomlástermék-kereső módszer nem csak fragmensionok monitorozásával, hanem az alapmolekula-ion kromatogramjának vizsgálatával is felfedheti bomlástermékek jelenlétét. A FHX esetében is ez történt, megvizsgálva ugyanis annak kromatogramját (18. ábra), két a főcsúcs retenciós idejétől eltérő időben látható csúcsot vettem észre (13,6 és 14,5 perc).



17. ábra Fenhexamid és bomlástermékeinek azonosítása fejes saláta mintában; (a) alapmolekula kromatogramja ( $m/z$  302); a kromatogramon megfigyelhető plusz csúcsok bomlástermékek jelenlétére utalnak; (b) a két detektált bomlástermék kromatogramja és feltételezett szerkezete ( $m/z$  464 és 550)

**13,6 perc:** Mivel a FHX molekula két klór atomot tartalmaz, szintén a két klór jellegzetes izotópmintázatát mutató iont kerestem a tömegspektrumban. Több ilyen iont is találtam, melyek közül kiemelendők az  $m/z$  302,0709 és 464,1234 ionok (19. ábra/a). Kiextrahálva és egymásra vetítve a két ion kromatogramját látható volt, hogy a két ion egyszerre jelent meg, köztük anyaion-fragmension kapcsolat volt feltételezhető. Az  $m/z$  302 ion nagy valószínűséggel azonos a FHX molekulával ( $\Delta m$ : 0,0 ppm), az  $m/z$  464 molekulaion pedig nagy valószínűséggel az anyamolekula ionja, mivel a hidrogén-addukton kívül megjelent annak nátrium- és kálium-adduktja is. Lehetséges összegképleteket generáltam az  $m/z$  464 ionhoz, figyelembe véve annak izotópmintázatát, illetve az alap FHX molekula elemi összetételét. A legvalószínűbb találat a  $C_{20}H_{27}Cl_2NO_7$  volt ( $m/z$  464,1237;  $\Delta m$ : 0,64 ppm), mely képlet  $C_6H_{10}O_5$ -ben különbözik az alapmolekulától. A tapasztalt tömegkülönbség a kérdéses ion és a FHX molekula között 162 Da volt, mely a már az előző pontban is bemutatott hexóz molekularészletre utal. A 13,6 percnél látható bomlástermék tehát nagy valószínűséggel a FHX molekula glikozid származéka, az alapmolekula egy hexóz molekulával történő konjugációs reakciójának terméke, a FHX-*O*-glikozid (FHX-GLY). A találat megerősítése céljából FHX-4-*O*-glikozid sztenderdet szintetizáltam, mely retenciós ideje megegyezett a kérdéses bomlástermékével.



18. ábra Tömegspektrumok 13,6 és 14,5 percnél



**14,5 perc:** Hasonló módon kerestem bomlásterméket 14,5 percnél is. Az  $m/z$  302 ionon kívül (nagy valószínűséggel FHX;  $\Delta m$ : 0,99 ppm) egy  $m/z$  550,1238 iont is felfedeztem, mely két klór jellegzetes izotópmintázatát mutatta (19. ábra/b). Az  $m/z$  550 ionon kívül megjelent az  $m/z$  572 és 558 is (nátrium- és kálium-adduktok). A kérdéses ion kromatogramját kiextrahálva anyai-ion-fragmension kapcsolatot feltételeztem a két ion között. Lehetséges összegképleteket generálva (szűrőfeltételként min. két klór atom) a  $C_{23}H_{29}Cl_2NO_{10}$  adódott a legvalószínűbb lehetőségnek ( $m/z$  550,1241;  $\Delta m$ : 0,55 ppm). Megvizsgálva a FHX és a feltételezett bomlástermék molekula közötti különbséget nem találtam lehetséges magyarázatot az ismeretlen molekulára, azonban a FHX-GLY és az  $m/z$  550 ion közötti különbséget megvizsgálva az  $C_3H_2O_3$ -nak adódott. Ez az összegképlet, számításba véve egy lehetséges észter-kötés létrejöttkor kilépő vízmolekulát, az almasavhoz ( $C_3H_4O_4$ ) kapcsolható. Ez a molekula gyakori résztvevője III. fázisú (másodlagos) konjugációs reakcióknak, így nagy valószínűséggel állítható, hogy a 14,5 percnél felfedezett molekula a FHX többszöri konjugációja során létrejött III. fázisú bomlástermék, a FHX-*O*-malonil-glikozid (ld. 18. ábra/b).

A FHX fragmension ( $m/z$  97) kromatogramját megvizsgálva további bomlástermékeket fedeztem fel a vizsgált fejes saláta mintában. 8,5 percnél megvizsgálva a tömegspektrumot két iont találtam, melyek izotópmintázata két klórra volt jellemző ( $m/z$  318,0656 és 480,1187). A két ion retenciós ideje teljes egyezést mutatott (mindkét kromatogramon azonban több csúcsot figyeltem meg), mely alapján feltételeztem, hogy a  $m/z$  318 ion ennél a retenciós időnél az  $m/z$  480 ion fragmensionjaként jelent meg. Lehetséges összegképleteket generálva (szűrőfeltételként min. két klór atom) legvalószínűbb találatnak a  $C_{14}H_{17}Cl_2NO_3$  ( $m/z$  318,0651;  $\Delta m$ : 1,57 ppm), illetve a  $C_{20}H_{27}Cl_2NO_8$  ( $m/z$  480,1186;  $\Delta m$ : 0,21 ppm) összegképletek adódtak. Megfigyelhető, hogy a két ion közötti tömegkülönbség 162 Da, mely a már korábban látott glikozid-csoporttal magyarázható ( $M+C_6H_{10}O_5$ ). Az  $m/z$  318 ion és a FHX molekula közötti tömegkülönbség 16 Da, mely alapján feltételeztem, hogy a kérdéses ion a FHX molekula oxidációs reakcióban keletkezett bomlásterméke. Irodalmi adatok alátámasztották a feltevést, azonban egyúttal felhívták a figyelmet, hogy oxidáció a FHX molekula több pontján mehet végbe. Oxidációs reakciók esetében az erős elektrofil jellegű hidroxid-gyök a nagy elektronsűrűségű szénatomokat támadja meg nagyobb valószínűséggel. Ennek következtében a FHX molekula metil-ciklohexán gyűrűje nagyobb reaktivitással rendelkezik, mint a klórozott aromás gyűrű, mivel utóbbinál érvényesül a klór atomok elektronelvonó tulajdonsága. A klórozott fenil-gyűrű kevésbé reaktív mivoltát korábbi kísérleti eredmények is igazolták [Malato et al. 2001, 2003].

Legnagyobb valószínűséggel tehát a metil-ciklohexán gyűrű oxidációja történik meg (több támadási hely lehetséges), melyen kívül az aromás gyűrű, a metil-szubsztituens és a karboximid molekularészlet amino-csoportjának oxidációja játszódhat le [Anderson et al. 1999, Lambropoulou et al. 2010]. Ez a

magyarázat arra, hogy az  $m/z$  318 ion kromatogramján több csúcs látható, mely feltételezett bomlástermékek tehát a FHX molekula oxidációja során keletkezett különböző szerkezeti izomerek. Ezen izomerek pontos szerkezetének feltérképezéséhez azonban további MS/MS vizsgálatok szükségesek.

Elmondható tehát, hogy a 8,5 percnél felfedezett  $m/z$  480 ion nagy valószínűséggel egy hidroxil-FHX molekula glikozid származéka. Ez az ion is több időpillanatban volt megfigyelhető, mely a hidroxil-FHX különböző szerkezeti izomereinek tudható be. A glikozilációs reakció viszont nagy valószínűséggel a fenolos hidroxid, nem pedig az oxidációs reakcióból származó hidroxid-csoporttal játszódik le [Anderson et al. 1999].

Végül, még egy FHX bomlásterméket sikerült találnom a mintában. A találatot azonban nem a szisztematikus bomlástermék-kereső módszer alkalmazása tette lehetővé, hanem egy feltevés, mely szerint a hidroxil-FHX bomlástermék is alkothat másodlagos konjugációs terméket. Ezért kiszámoltam a hidroxil-FHX-malonil-glikozid molekula tömegét ( $m/z$  566,1190) és kiextraháltam az ion kromatogramját. Két csúcsot figyeltem meg, mely szintén a különböző szerkezeti izomerek jelenlétével magyarázható. A tömegspektrumokat megvizsgálva a két retenciós időnél látható volt az  $m/z$  566 ion jellegzetes, két klórra jellemző izotópmintázata, mely megerősítette a találatot.

#### **5.3.3.4. A glikozid-származékok jelentősége**

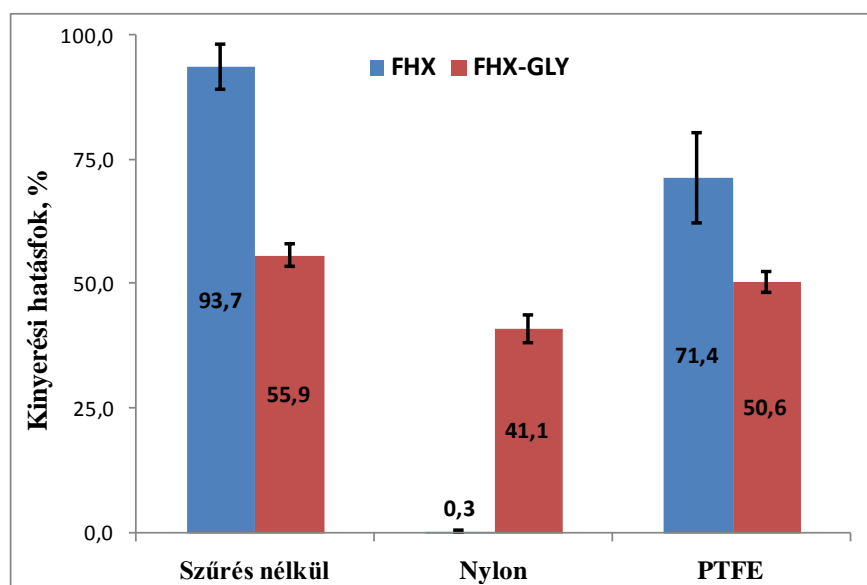
Érdemes néhány szót szólni a felfedezett glikozid-származékok jelentőségéről és a velük kapcsolatban analitikai szempontból felmerülő kérdésekről.

Ahogy már a 2.5.2. fejezetben bemutattam, a növényvédő szerek *in vivo* detoxikációjának egyik lehetséges mechanizmusa a valamilyen poláros (pl. szénhidrát vagy glutation) molekulával történő konjugáció. Ezen reakció termékeként egy polárosabb természetű bomlástermék keletkezik, mely vegyületeket nagyobb polaritásuk – így könnyebb exkréciójuk – miatt kevésbé toxikus vegyületekként tartanak számon. Azonban pontosan ezen tulajdonságukkal kapcsolatban merülhet fel kérdés analitikai szempontból, ugyanis egy poláros molekula extrakciója szokványos szerves oldószerekkel (acetonitril, etil-acetát stb.) kisebb hatásfokú lehet. Ennek köszönhetően hagyományos multikomponenses minta-előkészítést alkalmazva (pl. QuEChERS, etil-acetát módszer stb.) e bomlástermékek alacsonyabb hatásfokkal nyerhetőek ki a mintából, mely kisebb hatásfok ezen molekulák koncentrációjának és ezáltal fontosságának alábecsléséhez vezethet. E célból egy glikozid-származék, a FHX-GLY sztenderdjét szintetizáltuk, mellyel egy kinyerési hatásfok vizsgálatot végeztem el egy fejes saláta mintán. A mintát előzetes vizsgálatnak vettem alá, mely során megbizonyosodtam róla, hogy

nem tartalmaz sem FHX, sem FHX-GLY szermaradványt. Ezt követően elvégeztem a minta FHX és FHX-GLY sztenderddel történő adalékolását (*spiking*) oly módon, hogy a végső koncentráció  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  legyen mindkét komponensre nézve. A kinyerési hatásfokok középértékei 94 (FHX) és 56%-nak (FHX-GLY) adódtak (RSD: 4,8 és 4,0%). Figyelembe véve a DG SANCO által multikomponenses módszerek esetére meghatározott elfogadási tartományt (70-120%) elmondható, hogy a bomlástermék nem volt megfelelően kinyerhető a mintából, feltehetően annak polárosabb természete miatt. Ez a viszonylag alacsonyabb kinyerési hatásfok azonban még elfogadhatónak tekinthető, amennyiben a célunk „csak” a vegyület minőségi meghatározása.

A kinyerési hatásfok vizsgálatán kívül a FHX-GLY bomlástermék mennyiségi meghatározását végeztem el a szintetizált sztenderd segítségével sztenderd addíciós kalibrációt alkalmazva. A bomlástermék koncentrációja a három pozitív mintában  $0,07$  (eper),  $0,46$  és  $0,81 \text{ mg kg}^{-1}$ -nak (két fejes saláta) adódott. Összehasonlítva ezeket az értékeket a mintákban mért FHX szermaradvány koncentrációjával ( $0,03$ ,  $0,21$  és  $3,36 \text{ mg kg}^{-1}$ ) látható, hogy egyes bomlástermékek nagy arányban lehetnek jelen a mintában (egyes esetekben még az alapmolekulánál is nagyobb koncentrációban).

*(Megj.: A fent bemutatott kvalitatív meghatározás során egy érdekes minta-előkészítési problémával szembesültem. A már korábban az LC-MS/MS műszerrel megvizsgált mintákat az LC-TOFMS készülékkel újravizsgálva a FHX koncentrációja kb. egy nagyságrenddel alacsonyabbnak adódott. Ezen eltérés okát egy minta-előkészítési lépésben, a szűrés folyamatában találtam meg. A tandem-MS készülékkel végzett mérések során PTFE szűrőt alkalmaztam a minta törzsoldat szűrésére, míg spanyolországi tartózkodásom során az ottani laborban gyakran alkalmazott nylon membránszűrőt használtam. Lévén a két mérés ebben a kritikus lépésben különbözött egymástól, egy kísérletet végeztem, melyben a FHX és a FHX-GLY kinyerési hatásfokát vizsgáltam PTFE és nylon szűrővel végezve a minták szűrését, illetve referenciaként szűrés nélkül, csak centrifugálást alkalmazva is elvégeztem a minta-előkészítést. A kapott eredményeket a 20. ábra szemlélteti, melyen látható, hogy nylon szűrőt alkalmazva lényegében a teljes FHX mennyiség megkötődött a szűrő membránfelületén, lehetetlenné téve a vegyület vizsgálatát. Hasonló problémakört jártak körbe mélyrehatóbban Jansson és mtsi. is [Jansson et al. 2010].)*



**19. ábra** Kinyerési hatások vizsgálata különböző membránszűrőket alkalmazva; a nylon szűrő a polárosabb fenhexamid-glikozid molekulát (FHX-GLY) csak kis mértékben, míg a közepesen apoláros fenhexamid molekulát (FHX) teljesen adszorbeálta

#### 5.3.3.5. A kereső módszer előnyei és korlátai

Az alábbiakban felsorolásszerűen összefoglalom a bomlástermék-kereső módszer előnyeit, illetve igyekszem kritikus szemmel tekinteni sikeres alkalmazásának gyakorlati korlátaira is:

- ✓ Ahogy a fentebb bemutatott példák is szemléltetik, a kifejlesztett kereső módszert alkalmazva viszonylag gyorsan és egyszerűen detektálhatóak a növényvédő szerek bomlástermékei.
- ✓ A módszer kiemelendő előnye, hogy az adatbázis alapú keresésnek köszönhetően a növényvédő szerek alapmolekuláit, illetve azok fragmenseit automatizált, azaz gyors és egyszerű módon lehet kimutatni a mintákban. Ezt követően a pozitív mintákat megvizsgálva célirányosabban van mód a talált alapmolekulák bomlástermékeit kimutatni, melyet a „fragmentáció-degradáció” technika egyszerű mivolta tesz lehetővé.
- ✓ Pozitívumként említendő meg, hogy a létrehozott adatbázis, mely az automatizált keresés alapját adja, bármikor tovább bővíthető új molekulákkal, illetve fragmensekkel, továbbá az alkalmazott TOFMS készülék velejáró előnyeként lehetőségünk nyílik az ún. retrospektív adatelemzésre is.
- ✓ Végül, a módszer előnyeként elmondható, hogy alkalmazásával a bomlástermékek detektálásához és azonosításához nem volt szükség sztenderdekre, ami – figyelembe véve a forgalmazott bomlástermék sztenderdek hiányát, illetve a kevés elérhető sztenderd árát – analitikai és gazdaságossági szempontból is nagy előnyként könyvelhető el.

Érdemes azonban néhány szót szólni a módszer alkalmazásának korlátairól is.

- X A TOFMS technika előnye (és néha hátrütője is egyben), hogy a mintáról felvett teljes tömegspektrumban minden a mintában megtalálható és az ionforrásban ionizálódott anyagot felfedezhetünk. Bonyolult mintamátrixok esetén (pl. citrusfélék, fűszerek, hagymafélék stb.) ez viszont azt is jelenti, hogy jelentősen megnőhet a zavaró, ún. izobár komponensek jelenlétének valószínűsége, növelve ezzel az adatfeldolgozási időt.
- X Mivel a bomlástermékek keresése főként a fragmensionok monitorozásán alapul, a módszer további hátrányaként említendő meg, hogy amennyiben egy növényvédő szer fragmense nem szerepel a pontos tömeg adatbázisban, annak bomlástermékét nem lehet a bemutatott módszerrel felfedezni. Ez alól kivételt képeznek az alapmolekulák származékai, mivel ebben az esetben már az alapmolekula kromatogramján is több csúcsot figyelhetünk meg (pl. FHX-GLY esetében). Ezt a problémát kiküszöbölendő igyekeztem a lehető legtöbb fragmensionot felvenni a pontos tömeg adatbázisba.
- X Végül, ám legfontosabbként, a módszer „Achilles-sarkaként” említendő meg, hogy alkalmazásával csak olyan bomlástermékek fedezhetőek fel, melyek rendelkeznek legalább egy, az alapmolekuláéval azonos fragmensen. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy amennyiben a metabolizáció során a növényvédő szer azon molekularészlete változik meg, melyből fragmentációja során a monitorozott fragmens keletkezne, ez a bomlástermék nem lesz kimutatható ezzel a módszerrel (mivel nem fog megjelenni a bomlástermék retenciós idejénél az alapmolekulához tartozó fragmens).

6. táblázat Az LC-TOFMS kereső módszer segítségével felfedezett növényvédő szer bomlástermékek (vizsgált minták száma: 29)

Bomlástermék	Minta <sup>a</sup>	Összegképlet [M+H] <sup>+</sup>	Számolt m/z	Tapasztalt m/z	Δm, ppm	Izotóp- mintázat egyezés	DBE <sup>b</sup>	t <sub>R</sub> , perc
Acetamidrid, N-dezmetil-	Zöldpaprika (3)	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub>	209,0589	209,0584	2,39	92,5	7	9,8
	Zöldpaprika (6)			209,0590	0,48	47,1	7	9,8
	Zöldpaprika (6)			209,0586	1,43	98,7	7	9,8
Fenhexamid, -O-glikozid	Fejes saláta (9)	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>7</sub>	464,1237	464,1234	0,64	98,6	7	13,6
	Fejes saláta (11)			464,1238	0,21	99,7	7	13,5
	Eper (59)			464,1231	1,29	98,4	7	13,5
	Szőlő (1)			464,1248		48,65	7	13,5
Fenhexamid, -O-malonil-glikozid	Fejes saláta (4)	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>10</sub>	550,1241	550,1238	0,55	97,6	9	14,5
	Fejes saláta (17)			550,1232	1,64	99,2	9	14,4
Fenhexamid, OH-	Fejes saláta	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	318,0651	318,0656	1,57		6	
	Szőlő (1)			318,0662	3,46	99,1	6	14,5
Fenhexamid, OH--O-glikozid	Fejes saláta	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>8</sub>	480,1186	480,1187	0,21		7	
	Szőlő (13)			480,1186	0,0	96,4	7	11,3
Fenhexamid, OH--O-malonil-glikozid	Fejes saláta	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>11</sub>	566,1190	566,1178	2,11		9	
Iprodione, N-dezizopropil-	Körte (266)	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	287,9938	287,9944	2,1	56,8	8	14,8
	Eper (3)			287,9944	2,1	65,3	8	14,7
	Zöldpaprika (166)			287,9931	2,43	74,3	8	14,8

Bomlástermék	Minta <sup>a</sup>	Összegképlet [M+H] <sup>+</sup>	Számolt m/z	Tapasztalt m/z	Δm, ppm	Izotóp- mintázat egyezés	DBE <sup>b</sup>	t <sub>R</sub> , perc
Iprodione, N-dezizopropil-~-N-glikozilamin	Körte (935)	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	450,0465	450,0456	2,0	97,7	9	11,8
Malathion, dezmetil-	Mandarin (5)	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	317,0277	317,0264	4,1	98,7	2	24,6
Propamocarb, N-dezmetil-	Fejes saláta (1)	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	175,1441	175,1440	0,57	49,8	1	2,2
	Fejes saláta (1)			175,1436	2,85	97,0	1	2,1
	Fejes saláta (1)			175,1436	2,85	49,8	1	2,2
	Kígyóuborka (1)			175,1445	2,28	43,6	1	2,2
Propamocarb, N-oxid	Fejes saláta (2)	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	205,1547	205,1548	0,49	98,9	1	2,9
	Fejes saláta (2)			205,1550	1,46	76,8	1	2,9
	Fejes saláta (3)			205,1548	0,49	99,8	1	3,0
	Kígyóuborka (10)			205,1546	0,49	98,9	1	3,0
	Fejes saláta (14)			205,1548	0,49	60,3	1	3,0

<sup>a</sup> A bomlástermék és az alap növényvédő szer molekula csúcsterület-aránya a mintában (%); a 10%-nál nagyobb értékek félkövér formátummal jelölve

<sup>b</sup> Double bond equivalent – Kettős kötés ekvivalens

### 5.3.4. Konklúziók

Az utóbbi években a növényvédő szer bomlástermékekre terelődött figyelem következtében a mai peszticidanalitika már nem csak a szerek alapformáit, de azok releváns bomlástermékeit is kell, hogy vizsgálja. Az ehhez szükséges analitikai eszközök és metodikák tárháza egyelőre meglehetősen szűkös, köszönhetően a szükséges mérések nem célkomponenses mivoltának. Általánosságban elmondható, hogy ismeretlen molekulák detektálásához és azonosításához nem elegendők a hármaskvadrupól készülék nyújtotta információk, erre a feladatra mindenképpen nagyfelbontású és nagy tömegpontosságú tömegspektrometriás technikát kell alkalmaznunk (pl. TOF-MS, QTOF-MS, Orbitrap stb.). A kifejlesztett és az ebben a fejezetben bemutatott bomlástermék-kereső módszer egy újabb alternatívát nyújt a nagy kihívást jelentő analitikai feladat, az ismeretlen bomlástermékek azonosításának megoldására.

A módszer kihangsúlyozandó előnye, hogy segítségével egyszerűen és gyorsan tudjuk kimutatni akár ismeretlen bomlástermékek jelenlétét is, melyhez elegendő a növényvédő szerek fragmensionjait monitorozni. Ez azonban egyben a módszer gyengéje is, mivel (néhány kivételtől eltekintve) nagyban rá vagyunk utalva a fragmensionok vizsgálatára. Az ebből következő hátrányokat részben kiküszöbölhetjük, ha a pontos tömeg adatbázisban minél több fragmension szerepel, elősegítve ezzel a fragmens alapú keresést.

A módszert alkalmazva 29, előzőleg tandem-MS készülékkel is megvizsgált zöldség- és gyümölcsmintában kerestem a bennük felfedezett növényvédő szerek bomlástermékeit. Értelemszerűen, a tandem-MS készülékkel vizsgálva (a mérés célkomponenses mivolta miatt) nem találtam bomlástermékeket a mintákban. Azonban TOF-MS készülékkel újravizsgálva bennük összesen 29 esetben fedeztem fel degradációs terméket. Ez a magas szám egyrészt az általam bemutatott módszer gyakorlati alkalmazhatóságát mutatja, másrészt rávilágít az élelmiszermintákban fellelhető bomlástermékek gyakoriságára, igazolva ezzel a bomlástermék-keresés fontosságát, illetve az ilyen és ehhez hasonló kereső módszerek fejlesztésének szükségességét.

Az általam felfedezett bomlástermékek nagyrészt már korábban is ismert molekulák voltak, érdemes viszont hangsúlyozni, hogy a bemutatott keresési metodika értelmében az irodalmi adatokra való támaszkodás minden esetben a detektálást követte, a felfedezett bomlástermék azonosítása céljából (nem pedig fordítva, szintén működőképes, ám ezzel ellentétes megközelítésű keresési technikaként célkomponenses módon keresve az irodalomban fellelhető bomlástermékeket).

A mintában talált degradációs termékek egyik jellegzetes csoportja a glikozid-származékok voltak, melyek egyes esetekben jelentős koncentrációban jelentek meg (még az alapmolekulánál is nagyobb



arányban). Általánosságban a glikozid-származékokat kevésbé toxikus vegyületeknek tekintik azok nagyobb polaritása miatt. Azonban e tulajdonságuk miatt hagyományos minta-előkészítési technikákat alkalmazva kisebb kinyerési hatásfokokat érhetünk el, melynek köszönhetően fennáll a veszélye koncentrációjuk, így a fogyasztók ezen szereknek való kitettségének az alábecslésére. Ez a lehetőség, továbbá a glikozid-származékok toxikológiai vizsgálatainak hiánya felhívja a figyelmet az ilyen típusú bomlástermékek monitorozásának fontosságára.

Eredményeim közül kiemelendő újdonságként tartom számon az iprodione szer II. fázisú bomlástermékeinek azonosítását, melyekről nem találtam irodalmi feljegyzést, továbbá a fenhexamid-glikozid sztenderd szintetizálását, melyet tudomásom szerint ez idáig szintén nem publikáltak.

A vizsgálataim során felfedezett bomlástermékek nagy száma egyértelműen mutatja, hogy mindenképpen szükséges a növényvédő szer analitika határait tovább bővíteni. Szükség van olyan széleskörű kereső módszerekre, melyekkel a szokványos, célkomponenses módszereket kiegészítve jóval átfogóbb és valóságosabb képet adhatunk egy élelmiszer minta növényvédő szer tartalmáról és így a fogyasztókra jelentett veszélyekről. Úgy gondolom, munkám során sikerült egy ilyen módszert kifejlesztenem, mely véleményem szerint jól megállja a helyét a már korábban bemutatott kereső módszerek között.



## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### 1. Multikomponenses LC-MS/MS módszert dolgoztam ki növényi olajok növényvédő szer tartalmának meghatározására. A módszerfejlesztés során megállapítottam, hogy:

- több tisztító szorbens alkalmazása csökkenti a mátrixkomponensek által okozott jelváltozást, valamint a szorbensek tisztító hatása mintafüggő.
- a 44 hatóanyag kvantitatív meghatározása ilyen mintákból csak mátrix-illesztett kalibrációval lehetséges.
- a kidolgozott módszer kimutatási határa függ az alkalmazott tisztítási módszertől, és legtöbb esetben megfelel az EU által a releváns olajnövényekre meghatározott követelményeknek.
- az irodalomban fellelhető eredményekkel szemben kimutattam, hogy a PSA+C<sub>18</sub>+GCB szorbens kombináció rossz kinyerési hatásfokokat eredményez, melynek oka a GCB szorbens egyes (különösen a planáris szerkezetű) hatóanyagokkal szembeni túlzott adszorpciós képessége.
- az egyszerűsített minta-előkészítés ugyan kevésbé tiszta mintát, azonban jelentősen jobb kinyerési hatásfokokat eredményez.

### 2. Kidolgoztam egy széleskörű, adatbázis alapú LC-TOFMS kereső módszert.

- a módszerfejlesztés során létrehoztam egy jelen állapotában kb. 1400 komponenset tartalmazó pontos tömeg adatbázist, mely az alpmolekulák mellett azok fragmensionjait is tartalmazza.
- az automatizált keresés alkalmazhatóságát 29 zöldség és gyümölcs minta vizsgálatával igazoltam. A vizsgált mintákban összesen 105 esetben találtam növényvédő szermaradványt.
- az automatizált keresés eredményeit összevettem egy célkomponenses LC-MS/MS módszer eredményeivel. Megállapítottam, hogy a két módszerrel közel azonos eredményeket lehet elérni, továbbá a nem célkomponenses mérés hozadékaként nem várt vagy ismeretlen komponensek is kimutathatók, igazolva ezzel az LC-TOFMS technika széleskörű kereső módszerekben történő alkalmazhatóságát.

**3. Új LC-TOFMS módszert dolgoztam ki ismeretlen növényvédő szer bomlástermékek azonosítására a fragmensionok adatbázis alapú monitorozása alapján.**

- a módszer alkalmazhatóságát 29 zöldség és gyümölcs minta elemzése alapján igazoltam.
- a módszer, ellentétben a célkomponenses keresési technikákkal, eredményre vezet akár ismeretlen bomlástermékek nem célkomponenses vizsgálata során is.
- a módszerfejlesztés során elsőként azonosítottam az iprodione hatóanyag II. fázisú konjugációs bomlástermékét
- azonosítási és kvantitatív meghatározás céljából kidolgoztam a fenhexamid-*O*-glikozid bomlástermék sztenderd szintetizálási lehetőségét.

## 7. ÖSSZEFOGLALÓ

Munkám során olyan multikomponenses HPLC-MS módszerek fejlesztését és gyakorlati alkalmazását végeztem el, melyek alkalmasak növényvédő szermaradványok és bomlástermékek élelmiszerekből történő kimutatására.

Dolgozatom alapvetően három fő egységből áll.

Elsőként egy 44 komponens mérésére alkalmas célkomponenses HPLC-MS/MS módszert dolgoztam ki, mellyel növényi olajok növényvédő szer tartalma mérhető. A módszer fejlesztése során optimalám a kromatográfiás elválasztást és az MS/MS detektálást. Összehasonlítottam három QuEChERS-alapú minta-előkészítési eljárást, mindhárom esetben elvégezve a módszerek validálását, meghatározva a módszerek teljesítmény-jellemzőit (linearitás, mátrixhatások, kimutatási határok és kinyerési határfokok). Kiértékelve a kapott eredményeket a három módszer közül kiválasztottam a növényi olaj minták vizsgálatára legmegfelelőbb minta-előkészítési technikát.

A második egységben egy olyan széleskörű, nem célkomponenses kereső módszert fejlesztettem ki, mely kiaknázza a nagyfelbontású MS készülékek és az adatbázis alapú, automatizált keresés előnyeit. Létrehoztam egy kb. 1400 komponens tartalmú adatbázist, melybe az alapmolekulák mellett igyekeztem a lehető legtöbb fragmensiont is belefoglalni. Irodalmi eredmények alapján kiválasztottam a keresési paramétereket, mellyel az automatizált keresést elvégeztem. A kereső módszert kereskedelemből származó mintákon alkalmaztam, melyekben számos növényvédő szermaradványt találtam. A keresés hatékonyságát és a lefedett komponensek körét vizsgáló a mintákat egy célkomponenses LC-MS/MS módszerrel is megvizsgáltam, és összehasonlítottam a két módszerrel kapott eredményeket.

A harmadik egységben növényvédő szer bomlástermékek kimutatására és azonosítására alkalmas LC-TOFMS módszert fejlesztettem ki, mely az adatbázis alapú keresés és a „fragmentáció-degradáció” technika előnyeit ötvözi. A módszer alkalmazhatóságát a vizsgált mintákban felfedezett és azonosított számos (köztük ismeretlen) bomlástermék igazolja. Megerősítés és kvantitatív meghatározás céljából sikerült egy bomlástermék sztenderd szintetizálását megoldanom.



## 8. SUMMARY

During my work HPLC-MS analytical methods capable of detecting pesticide residues and transformation products in different food samples were developed and applied.

The dissertation covers three main topics.

First, a targeted multi-residue HPLC-MS/MS method was developed for the determination of 44 selected pesticides in vegetable oil matrices. During method development chromatographic separation and MS/MS detection were optimized. Three QuEChERS-based sample preparations were compared by performing the validation process for each method. During validation method performance parameters (linearity, matrix effects, limits of detection and recovery) were determined. Based on the results the sample preparation most suitable for the analysis of oil matrices was chosen.

In the second part a wide-scope, non-targeted multi-residue method was developed that exploits the benefits of high-resolution MS instruments and automated screening process. An accurate-mass database consisting of approx. 1400 compounds was created that (apart from the pesticide molecules) contains fragment ions as well. Search criteria for the automated screening process were chosen based on literature search. The method was applied for the analysis of different vegetable and fruit samples in which several pesticide residues were found. For the demonstration of the effectiveness of the screening process the samples were analyzed with a targeted LC-MS/MS method and the results from the two instruments were compared.

In the third part an LC-TOFMS method were developed for the detection and identification of pesticide metabolites. The method exploits the benefits of the automated screening process based on accurate-mass database and the 'fragmentation-degradation' technique. The method was successfully applied in real samples in which several pesticide metabolites (including unknowns) were detected and identified. For confirmation and quantitation purposes a protocol for the synthesization of a metabolite standard was developed.





## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Abrankó L., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. (2011): In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46 (5) 478-488. p. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1914>
- Aguilera-Luiz M. M., Plaza-Bolanos P., Romero-González R., Vidal J. L. M., Frenich A. G. (2011): Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 399 (8) 2863-2875. p. doi: 10.1007/s00216-011-4670-7
- Agüera A., Piedra L., Hernando M. D., Fernández-Alba A. R., Contreras M. (2000): Splitless large-volume GC-MS injection for the analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in vegetables using a miniaturised ethyl acetate extraction. *Analyst*, 125 (8) 1397-1402. p. DOI: 10.1039/B002611P
- Alder L., Greulich K., Kempe G., Vieth B. (2006): Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (6) 838-865. p. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.20091>
- Alder L., Lüderitz S., Lindtner K., Stan H.-J. (2004): The ECHO technique - the more effective way of data evaluation in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1058 (1-2) 67-79. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.120
- Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J. (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and 'dispersive solid-phase extraction' for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86 (2) 412-431. p. 1060-3271
- Anastassiades M., Scherbaum E., Taşdelen B., štajnbaher D. [2007]: "Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis" In *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*, edited by Ohkawa H., Miyagawa H. and Lee P. W., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 439-458. p. Weinheim, Germany. DOI: 10.1002/9783527611249.ch46
- Anderson C., Brumhard B., Ditzgens K., Reiner H. (1999): Metabolism of fenhexamid (KBR 2738) in plants, animals, and the environment. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 55 (2) 227-251. p.
- Aramendía M. A., Borau V., Lafont F., Marinas A., Marinas J. M., Moreno J. M., Urbano F. J. (2007): Determination of herbicide residues in olive oil by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105 (2) 855-861. p. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.01.063
- Argauer R. J., Lehotay S. J., Brown R. T. (1997): Determining Lipophilic Pyrethroids and Chlorinated Hydrocarbons in Fortified Ground Beef Using Ion-Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (10) 3936-3939. p. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9701953>
- Aysal P., Ambrus Á., Lehotay S. J., Cannavan A. (2007): Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42 (5) 481-490. p. doi: 10.1080/19312450701392490
- Bacandritsos N., Granato A., Budge G., Papanastasiou I., Roinioti E., Caldon M., Falcaro C., Gallina A., Mutinelli F. (2010): Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105 (3) 335-340. p. DOI: 10.1016/j.jip.2010.08.004

- Barker S. A. (2000): Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885 (1-2) 115-127. p. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00249-1
- Belfroid A. C., van Drunen M., Beek M. A., Schrap S. M., van Gestel C. A. M., van Hattum B. (1998): Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *Science Of The Total Environment*, 222 (3) 167-183. p. DOI: 10.1016/S0048-9697(98)00298-8
- Beyer A., Biziuk M. (2010): Comparison of efficiency of different sorbents used during clean-up of extracts for determination of polychlorinated biphenyls and pesticide residues in low-fat food. *Food Research International*, 43 (3) 831-837. p. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.11.018
- Beyerbach A., Morrison B. (2000): (<sup>14</sup>C)-Propamocarb: absorption, distribution and excretion following oral administration to the rat. Unpublished report No. 1669/002-D1141 from Covance Labs, Harrogate, England. Submitted to WHO by Chimac Agriphar, Ougrée, Belgium.
- Borra C., Di Corcia A., Marchetti M., Samperi R. (1986): Evaluation of graphitized carbon black cartridges for rapid organic trace enrichment from water: application to priority pollutant phenols. *Analytical Chemistry*, 58 (9) 2048-2052. p. doi: 10.1021/ac00122a026
- Cervera M. I., Medina C., Portolés T., Pitarch E., Beltrán J., Serrahima E., Pineda L., Muñoz G., Centrich F., Hernández F. (2010): Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 397 (7) 2873-2891. p. doi: 10.1007/s00216-010-3597-8
- Cook J., Beckett M. P., Reliford B., Hammock W., Engel M. (1999): Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables using procedures developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services. *Journal of AOAC International*, 82 (6) 1419-1435. p.
- Cunha S. C., Lehotay S. J., Mastovska K., Fernandes J. O., Beatriz M., Oliveira P. P. (2007): Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science*, 30 (4) 620-632. p. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200600410>
- Dhadialla T. S., Retnakaran A., Smagghe G. [2010]: "Insect Growth- and Development-Disrupting Insecticides" In *Insect Control - Biological and Synthetic Agents*, Academic Press 121-181. p. London, UK.
- Díaz R., Ibáñez M., Sancho J. V., Hernández F. (2012): Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS. *Analytical Methods*, 1 (4) 196-209. p. <http://dx.doi.org/10.1039/C1AY05385J>
- Díez C., Traag W. A., Zommer P., Marinero P., Atienza J. (2006): Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *Journal of Chromatography A*, 1131 (1-2) 11-23. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.07.046
- FAO/WHO [1994]: "Iprodione" In *Pesticide Residues in Food - Evaluations - Part I - Residues*, s.n. 701-814. p.
- Fenoll J., Hellin P., Martínez C. M., Miguel M., Flores P. (2007): Multiresidue method for analysis of pesticides in pepper and tomato by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Food Chemistry*, 105 (2) 711-719. p. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.12.060
- Fernández Moreno J. L., Arrebola Liébanas F. J., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J. L. (2006): Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1111 (1) 97-105. p.
- Ferrer C., Gómez M. J., García-Reyes J. F., Ferrer I., Thurman E. M., Fernández-Alba A. R. (2005): Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass

- spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1069 (2) 183-194. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.02.015
- Ferrer C., Lozano A., Agüera A., Girón A. J., Fernández-Alba A. R. (2011a): Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1218 (42) 7634-7639. p. doi: 10.1016/j.chroma.2011.07.033
- Ferrer C., Martínez-Bueno M. J., Lozano A., Fernández-Alba A. R. (2011b): Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection. One year pilot survey. *Talanta*, 83 (5) 1552-1561. p. doi: 10.1016/j.talanta.2010.11.061
- Ferrer I., Fernández-Alba A., Zweigenbaum J. A., Thurman E. M. (2006): Exact-mass library for pesticides using a molecular-feature database. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (24) 3659-3668. p. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.2781>
- Fillion J., Sauvé F., Selwyn J. (2000): Multiresidue Method for the Determination of Residues of 251 Pesticides in Fruits and Vegetables by Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of AOAC International*, 83 (3) 698-713. p.
- Frenich A. G., Vidal J. L. M., Lopez T. L., Aguado S. C., Salvador I. M. (2004): Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1048 (2) 199-206. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.07.027
- Fuentes E., Báez M. E., Quinones A. (2008): Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1207 (1-2) 38-45. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.08.051
- García-Reyes J. F., Ferrer C., Gómez-Ramos M. J., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R. (2007a): Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26 (3) 239-251. p. DOI: 10.1016/j.trac.2007.01.004
- García-Reyes J. F., Ferrer I., Thurman E. M., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R. (2005): Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19 (19) 2780-2788. p. DOI: 10.1002/rcm.2127
- García-Reyes J. F., Hernando M. D., Ferrer C., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R. (2007b): Large scale pesticide multiresidue methods in food combining liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry and tandem mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79 (19) 7308-7323. p. DOI: 10.1021/ac070855v
- García-Reyes J. F., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R. (2007c): Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation-degradation" relationships. *Analytical Chemistry*, 79 (1) 307-321. p. DOI: 10.1021/ac061402d
- Garrido Frenich A., Fernández Moreno J. L., Martínez Vidal J. L., Arrebola Liábanas F. J. (2007): Application of Gas Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry for the Multiresidue Analysis of Pesticides in Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (21) 8346-8352. p. doi: 10.1021/jf071615j
- Garrido Frenich A., Martínez Vidal J. L., Pastor-Montoro E., Romero-González R. (2008): High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 390 (3) 947-959. p. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1746-5>
- Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Fernández-Alba A. R., Molina-Díaz A. (2010): Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217 (24) 3736-3747. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.04.025

- Gómez-Ramos M. D. M., Pérez-Parada A., García-Reyes J. F., Fernández-Alba A. R., Agüera A. (2011): Use of an accurate-mass database for the systematic identification of transformation products of organic contaminants in wastewater effluents. *Journal of Chromatography A*, 1218 (44) 8002-8012. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.003
- Granby K., Andersen J. H., Christensen H. B. (2004): Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 520 (1-2) 165-176. p. DOI: 10.1016/j.aca.2004.05.088
- Grimalt S., Pozo O. J., Sancho J. V., Hernández F. (2007): Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Analytical Chemistry*, 79 (7) 2833-2843. p. DOI: 10.1021/ac061233x
- Grimalt S., V.Sancho J., Pozo O. J., Hernández F. E. (2010): Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 45 (4) 421-436. p. doi: 10.1002/jms.1728.
- Grube A., Donaldson D., Kiely T., Wu L. [2011]: "U.S. Environmental Protection Agency, *Pesticides Industry Sales and Usage - 2006 and 2007 Market Estimates* " 4. p.
- Guan H., Brewer W. E., Garris S. T., Morgan S. L. (2010): Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217 (12) 1867-1874. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.01.047
- Gunther F., Gunther J., Knüsli E. [1970]: "History of the development of triazine herbicides" In *Single Pesticide Volume: The Triazine Herbicides*, Springer New York 1-9. p. New York.
- Hernández F., Grimalt S., Pozo Ó. J., Sancho J. V. (2009): Use of ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight MS to discover the presence of pesticide metabolites in food samples. *Journal of Separation Science*, 32 (13) 2245-2261. p. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200900093>
- Hernández F., Ibáñez M., Pozo Ó. J., Sancho J. V. (2008a): Investigating the presence of pesticide transformation products in water by using liquid chromatography-mass spectrometry with different mass analyzers. *Journal of Mass Spectrometry*, 43 (2) 173-184. p. doi: 10.1002/jms.1279
- Hernández F., Portolés T., Pitarch E., López F. J. (2011): Gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry to analyze trace-level organic compounds in the environment, food safety and toxicology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30 (2) 388-400. p. DOI: 10.1016/j.trac.2010.11.007
- Hernández F., Pozo O. J., Sancho J. V., Lopez F. J., Marin J. M., Ibanez M. (2005): Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS2 using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24 (7) 596-612. p. DOI: 10.1016/j.trac.2005.04.007
- Hernández F., Sancho J. V., Ibáñez M., Grimalt S. (2008b): Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27 (10) 862-872. p. DOI: 10.1016/j.trac.2008.08.011
- Hernando M. D., Ferrer C., Ulaszewska M., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R. (2007): Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 389 (6) 1815-1831. p. DOI: 10.1007/s00216-007-1464-z
- Hiemstra M., de Kok A. (2007): Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154 (1-2) 3-25. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.03.123

- Hoffmann E. d., Stroobant V. [2007]: "Mass Analysers" In *Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition*, John Wiley and sons Ltd. 85-174. p. West Sussex, England.
- Ibáñez M., Sancho J. V., Hernández F., McMillan D., Rao R. (2008): Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27 (5) 481-489. p. DOI: 10.1016/j.trac.2008.03.007
- Ibáñez M., Sancho J. V., Pozo Ó. J., Hernández F. (2006): Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 384 (2) 448-457. p. DOI: 10.1007/s00216-005-0167-6
- Internet\_1 - *EURL Datapool* [cited Nov 2012]. Available from <http://www.eurl-pesticides-datapool.eu/>.
- Internet\_2 - *Supplementary Data* [cited Dec 2013]. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312008461>.
- Jansson C., Kreuger J. (2010): Multiresidue Analysis of 95 Pesticides at Low Nanogram/Liter Levels in Surface Waters Using Online Preconcentration and High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 93 (6) 1732-1747. p.
- Jeannot M. A., Cantwell F. F. (1996): Solvent Microextraction into a Single Drop. *Analytical Chemistry*, 68 (13) 2236-2240. p. doi: 10.1021/ac960042z
- Jeschke P., Nauen R. [2010]: "Neonicotinoid Insecticides" In *Insect Control - Biological and Synthetic Agents*, Academic Press 61-113. p. London, UK.
- Jogszabály\_1 - "17/1999. (VI. 16.) EüM rendelet az élelmiszerek vegyi szennyezettségének megengedhető mértékéről", 1999. június 16.
- Jogszabály\_2 - "A Tanács 91/414/EGK irányelve a növényvédő szerek forgalomba hozataláról", 1991. július 15.
- Jogszabály\_3 - "Az Európai Parlament és a Tanács 396/2005/EK rendelete a növényi és állati eredetű élelmiszerekben és takarmányokban, illetve azok felületén található megengedett növényvédő szer-maradékok határértékéről, valamint a 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról", 2005. február 23.
- Jogszabály\_4 - "A Bizottság 212/2013/EU rendelete a 396/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet I. mellékletének az említett mellékletben felsorolt termékekre vonatkozó kiegészítések és módosítások tekintetében való felváltásából", 2013. március 11.
- Jogszabály\_5 - "A Bizottság 149/2008/EK rendelete az I. mellékletben felsorolt termékek megengedett szermaradék-határértékeit megállapító II., III. és IV. melléklet létrehozása által a 96/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet módosításáról", 2008. január 29.
- Jogszabály\_6 - "A Bizottság 839/2008/EK rendelete a bizonyos termékekben, illetve azok felületén található növényvédőszer-maradékok megengedett határértékéről szóló 396/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet II., III. és IV. mellékletének módosításáról", 2008. július 31.
- Jogszabály\_7 - "A Bizottság 260/2008/EK rendelete a 396/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletnek a betakarítást követően füstölőszerral végrehajtott kezelésre tekintettel eltérés hatálya alá eső hatóanyag-termék kombinációk jegyzékéről rendelkező VII. melléklet megállapításával történő módosításáról", 2008. március 18.
- Jogszabály\_8 - "Az Európai Parlament és a Tanács 1107/2009/EK rendelete a növényvédő szerek forgalomba hozataláról valamint a 79/117/EGK és a 91/414/EGK tanácsi irányelvek hatályon kívül helyezéséről", 2009. október 21.
- Jogszabály\_9 - "SANCO/I2495/2011 - Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed",
- Johnson G. F. (1935): The Early History of Copper Fungicides. *Agricultural History*, 9 (2) 67-79. p.

- Klein J., Alder L. (2003): Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops. *Journal of AOAC International*, 86 (5) 1015-1037. p.
- Klotzel M., Gutsche B., Lauber U., Humpf H.-U. (2005): Determination of 12 Type A and B Trichothecenes in Cereals by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (23) 8904-8910. p. doi: 10.1021/jf051501c
- Kmellár B., Abrankó L., Fodor P., Lehotay S. J. (2010): Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants*, 27 (10) 1415 - 1430. p. DOI : 10.1080/19440049.2010.490791
- Kmellár B., Fodor P., Pareja L., Ferrer C., Martínez-Uroz M. A., Valverde A., Fernandez-Alba A. R. (2008): Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1215 (1-2) 37-50. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.10.121
- Kruve A., Leito I., Herodes K. (2009): Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. *Analytica Chimica Acta*, 651 (1) 75-80. p. DOI: 10.1016/j.aca.2009.07.060
- Lacassie E., Dreyfuss M. F., Daguét J. L., Vignaud M., Marquet P., Lachâtre G. (1998): Multiresidue determination of pesticides in apples and pears by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 805 (1-2) 319-326. p. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)01305-8
- Lacina O., Urbanova J., Poustka J., Hajslova J. (2010): Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217 (5) 648-659. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.098
- Lambropoulou D. A., Albanis T. A. (2007): Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2) 195-228. p. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.10.004
- Lambropoulou D. A., Konstantinou I. K., Albanis T. A., Fernández-Alba A. R. (2010): Photocatalytic degradation of the fungicide Fenhexamid in aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions: Identification of intermediates products and reaction pathways. *Chemosphere*, 83 (3) 367-378. p. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.006
- Lehotay S. J., Kok A. d., Hiemstra M., Bodegraven P. v. (2005a): Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection *Journal of AOAC International*, 88 (2) 595-614. p.
- Lehotay S. J., Lightfield A. R., Harman-Fetcho J. A., Donoghue D. J. (2001): Analysis of Pesticide Residues in Eggs by Direct Sample Introduction/Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10) 4589-4596. p. doi: 10.1021/jf0104836
- Lehotay S. J., Mastovska K., Lightfield A. R. (2005b): Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 88 (2) 615-629. p.
- Lehotay S. J., Son K. A., Kwon H., Koesukwiwat U., Fu W., Mastovska K., Hoh E., Leepipatpiboon N. (2010): Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217 (16) 2548-2560. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.01.044
- Lénárt J., Bujna E., Kovács B., Békefi E., Száraz L., Dernovics M. (2013): Metabolomic Approach Assisted High Resolution LC-ESI-MS Based Identification of a Xenobiotic Derivative of

- Fenhexamid Produced by *Lactobacillus casei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (37) 8969-8975. p. doi: 10.1021/jf4022493
- Lentza-Rizos C., Avramides E. J., Cherasco F. (2001): Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *Journal of Chromatography A*, 912 (1) 135-142. p. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00527-1
- Li P., Yang X., Miao H., Zhao Y., Liu W., Wu Y. (2013): Simultaneous determination of 19 triazine pesticides and degradation products in processed cereal samples from Chinese total diet study by isotope dilution-high performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 781 63-71. p. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.027
- Lozano A., Martínez-Uroz M. A., Gómez-Ramos M. J., Gómez-Ramos M. M., Mezcua M., Fernández-Alba A. R. (2012): Determination of nicotine in mushrooms by various GC/MS- and LC/MS-based methods. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 402 (2) 935-943. p. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5490-5>
- Luke M. A., Froberg J. E., Doose G. M., Masumoto H. T. (1981): Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. *Journal of AOAC International*, 64 (5) 1187-1195. p.
- Luke M. A., Froberg J. E., Masumoto H. T. (1975): Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 58 (5) 1020-1026. p.
- Maisonneuve B. [2000]: "Amine Oxides" In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Volume 2, John Wiley & Sons, Inc. 463. p.
- Malato O., Lozano A., Mezcua M., Agüera A., Fernández-Alba A. R. (2011): Benefits and pitfalls of the application of screening methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1218 (42) 7615-7626. p. doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.110
- Malato S., Cáceres J., Agüera A., Mezcua M., Hernando D., Vial J., Fernández-Alba A. R. (2001): Degradation of Imidacloprid in Water by Photo-Fenton and TiO<sub>2</sub> Photocatalysis at a Solar Pilot Plant: A Comparative Study. *Environmental Science and Technology*, 35 (21) 4359-4366. p. doi: 10.1021/es000289k
- Malato S., Cáceres J., Fernández-Alba A. R., Piedra L., Hernando M. D., Agüera A., Vial J. (2003): Photocatalytic Treatment of Diuron by Solar Photocatalysis: Evaluation of Main Intermediates and Toxicity. *Environmental Science and Technology*, 37 (11) 2516-2524. p. doi: 10.1021/es0261170
- Marín J. M., Gracia-Lor E., Sancho J. V., López F. J., Hernández F. (2009): Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples: Study of matrix effects. *Journal of Chromatography A*, 1216 (9) 1410-1420. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.094
- Martínez K., Ferrer I., Barceló D. (2000): Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 879 (1) 27-37. p. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00307-1
- Mezcua M., Ferrer C., García-Reyes J. F., Martínez-Bueno M. J., Sigríst M., Fernández-Alba A. R. (2009a): Analyses of selected non-authorized insecticides in peppers by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 112 (1) 221-225. p. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.05.076
- Mezcua M., Malato O., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A. R. (2009b): Accurate-Mass Databases for Comprehensive Screening of Pesticide Residues in Food by Fast Liquid

- Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81 (3) 913-929. p. DOI: 10.1021/ac801411t
- Mills P. A., Onley J. H., Gaither R. A. (1963): Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. *Journal of AOAC*, 46 186-191. p.
- Mol H. G. J., Plaza-Bolanos P., Zomer P., De Rijk T. C., Stolker A. A. M., Mulder P. P. J. (2008): Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry*, 80 (24) 9450-9459. p. doi: 10.1021/ac801557f
- Moldoveanu S. C., David V. [2002]: "Chapter 11: Sorbent extraction" In *Journal of Chromatography Library Vol. 65*, Elsevier 341-401. p.
- Niessen W. M. A., Manini P., Andreoli R. (2006): Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (6) 881-899. p. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.20097>
- Ono Y., Yamagami Y., Nishina T., Tobino T. (2006): Pesticide multiresidue analysis of 303 compounds using supercritical fluid extraction. *Analytical Sciences*, 22 (11) 1473-1480. p. DOI: 10.2116/analsci.22.1473
- Otero R. R., Grande B. C., Gandara J. S. (2003): Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 992 (1-2) 121-131. p. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00317-0
- Peryea F. J. (1998): Historical use of lead arsenate insecticides, resulting soil contamination and implications for soil remediation. *Proceedings, 16th World Congress of Soil Science*. Montpellier, France. 20-26 Aug. 1998.
- Picó Y., Blasco C., Font G. (2004): Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. *Mass Spectrometry Reviews*, 23 (1) 45-85. p. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.10071>
- Picó Y., la Farré M., Soler C., Barceló D. (2007): Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS. *Analytical Chemistry*, 79 (24) 9350-9363. p. DOI:10.1021/ac0715591
- Pizzutti I. R., de Kok A., Zanella R., Adaime M. B., Hiemstra M., Wickert C., Prestes O. D. (2007): Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 1142 (2) 123-136. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.12.030
- Polgár L., Kmellár B., García-Reyes J. F., Fodor P. (2012): Comprehensive evaluation of the clean-up step in QuEChERS procedure for the multi-residue determination of pesticides in different vegetable oils using LC-MS/MS. *Analytical Methods*, 4 (4) 1142-1148. p. <http://dx.doi.org/10.1039/C2AY05543K>
- Quastel J H. [1950]: "2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) as a Selective Herbicide" In *Agricultural Control Chemicals*, American Chemical Society 244-249. p. s.l.
- Ranga Rao G. V., Rupela O. P., Rao V. R., Reddy Y. V. R. (2007): Role of biopesticides in crop protection: present status and future prospects. *Indian Journal of Plant Protection*, 35 (1) 1-9. p.
- Romero-González R., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J. L., Prestes O. D., Grió S. L. (2011): Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218 (11) 1477-1485. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.034
- Rosner D., Markowitz G. (2013): Persistent pollutants: A brief history of the discovery of the widespread toxicity of chlorinated hydrocarbons. *Environmental Research*, 120 126-133. p. DOI: 10.1016/j.envres.2012.08.011



- Sánchez A. G., Martos N. R., Ballesteros E. (2006): Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography-tandem mass-spectrometric determination. *Analytica Chimica Acta*, 558 (1-2) 53-61. p.
- Sannino A., Bandini M. (2005): Determination of seven benzoylphenylurea insecticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19 (19) 2729-2733. p. DOI: 10.1002/rcm.2108
- Schenck F. J., Callery P., Gannett P. M., Daft J. R., Lehotay S. J. (2002a): Comparison of Magnesium Sulfate and Sodium Sulfate for Removal of Water from Pesticide Extracts of Foods. *Journal of AOAC International*, 85 (5) 1177-1180. p.
- Schenck F. J., Howard-King V. (1999): Rapid Solid Phase Extraction Cleanup for Pesticide Residues in Fresh Fruits and Vegetables. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63 (3) 277-281. p. DOI: 10.1007/s001289900977
- Schenck F. J., Lehotay S. J., Vega V. (2002b): Comparison of solid-phase extraction sorbents for cleanup in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables. *Journal of Separation Science*, 25 (14) 883-890. p. DOI: 10.1002/1615-9314(20021001)25:14<883::AID-JSSC883>3.0.CO;2-7
- Secoy D. M., Smith A. E. (1983): Use of plants in control of agricultural and domestic pests. *Economic Botany*, 37 (1) 28-57. p. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02859304>
- Sheridan R. S., Meola J. R. (1999): Analysis of pesticide residues in fruits, vegetables, and milk by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 82 (4) 982-990. p.
- Soderlund D. M., Clark J. M., Sheets L. P., Mullin L. S., Piccirillo V. J., Sargent D., Stevens J. T., Weiner M. L. (2002): Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171 (1) 3-59. p. DOI: 10.1016/S0300-483X(01)00569-8
- Soler C., Hamilton B., Furey A., James K. J., Mañes J., Picó Y. (2007): Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis of carbosulfan, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, and other metabolites in food. *Analytical Chemistry*, 79 (4) 1492-1501. p. doi: 10.1021/ac060709+
- Soriano J. M., Jiménez B., Redondo M. J., Moltó J. C. (1998): Comparison of different sorbents for on-line liquid-solid extraction followed by high-performance liquid chromatographic determination of nitrogen-containing pesticides. *Journal of Chromatography A*, 822 (1) 67-73. p. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00573-1
- Steen R. J. C. A., Bobeldijk I., Brinkman U. A. T. (2001): Screening for transformation products of pesticides using tandem mass spectrometric scan modes. *Journal of Chromatography A*, 915 (1-2) 129-137. p. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00600-8
- Szabvány\_1 - "Magyar Szabvány MSZ EN ISO/IEC 17025 - Vizsgáló- és kalibráló laboratóriumok felkészültségének általános követelményei (ISO/IEC 17025:2005)", 2005
- Thurman E. M., Ferrer I., Malato O., Fernández-Alba A. R. (2006): Feasibility of LC/TOFMS and elemental database searching as a spectral library for pesticides in food. *Food Additives and Contaminants*, 23 (11) 1169 - 1178. p. DOI: 10.1080/02652030600838241
- Thurman E. M., Ferrer I., Zweigenbaum J. A., García-Reyes J. F., Woodman M., Fernández-Alba A. R. (2005): Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082 (1) 71-80. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.03.042
- Tsoutsis C. S., Albanis T. A. (2004): Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 84 (1-3) 3-13. p. doi: 10.1080/03067310310001597635
- van der Lee M. K., van der Weg G., Traag W. A., Mol H. G. J. (2008): Qualitative screening and quantitative determination of pesticides and contaminants in animal feed using comprehensive

- two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1186 (1-2) 325-339. p. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.11.043
- Van Eerd L. L., Hoagland R. E., Zablotowicz R. M., Hall J. C. (2003): Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, 51 (4) 472-495. p. doi: 10.1614/0043-1745(2003)051[0472:PMIPAM]2.0.CO;2
- Walters S. M. (1990): Clean-up techniques for pesticides in fatty foods. *Analytica Chimica Acta*, 236 77-82. p. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)83301-2
- Wang P.-C., Lee R.-J., Chen C.-Y., Chou C.-C., Lee M.-R. (2012): Determination of cyromazine and melamine in chicken eggs using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 752 78-86. p. DOI: 10.1016/j.aca.2012.09.029
- Wang Z. [2010]: "Meisenheimer Rearrangement" In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc. p. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470638859.conrr424>
- Yamamoto I., Casida J., Ujváry I. [1999]: "Nicotine and Other Insecticidal Alkaloids" In *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, Springer Japan 29-69. p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-67933-2\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-67933-2_2)
- Yasuor H., Zou W., Tolstikov V. V., Tjeerdema R. S., Fischer A. J. (2010): Differential Oxidative Metabolism and 5-Ketoclozazole Accumulation Are Involved in *Echinochloa phyllopogon* Resistance to Clomazone. *Plant Physiology*, 153 (1) 319-326. p. DOI: 10.1104/pp.110.153296
- Zachariasova M., Lacina O., Malachova A., Kostelanska M., Poustka J., Godula M., Hajslova J. (2010): Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 662 (1) 51-61. p. DOI: 10.1016/j.aca.2009.12.034
- Zheng C., Hao H., Wang X., Wu X., Wang G., Sang G., Liang Y., Xie L., Xia C., Yao X. (2009): Diagnostic fragment-ion-based extension strategy for rapid screening and identification of serial components of homologous families contained in traditional Chinese medicine prescription using high-resolution LC-ESI-IT-TOF/MS: Shengmai injection as an example. *Journal of Mass Spectrometry*, 44 (2) 230-244. p. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1502>



## 10. MELLÉKLETEK

*Mellékletek I. táblázat: Mátrixhatás értékek a négy vizsgált olajmintában*

Peszticid	Mátrixhatás, %											
	Napraforgó olaj			Olíva olaj			Pálmaolaj			Repceolaj		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Acephate	-47	99	-46	-27	6	-21	-30	-39	5	-40	-43	-4
Azinphos-methyl	-6	111	-20	34	129	-38	38	24	-49	-18	26	-23
Boscalid	-22	41	-36	-6	35	6	-13	-24	-5	-14	-5	17
Carbaryl	-11	37	-8	-55	-27	-74	-8	-28	15	-7	-43	-74
Carbendazim	-38	41	17	-13	5	4	-17	-6	39	-22	-14	33
Carbofuran	-38	-9	-5	-43	-43	-50	-40	-50	11	-34	-45	-8
Chlorfenvinphos	-22	21	-49	-4	4	-51	-9	-14	-34	-32	-18	-16
Cyprodinil	-35	42	-54	-73	12	-59	-56	-16	-31	-69	-21	2
Diazinon	-13	39	-54	-38	8	-50	-33	-14	-26	-49	-8	-5
Dimethoate	-38	-6	-22	-13	-46	-49	-31	-51	-7	-28	-47	-21
Fenarimol	5	14	8	0	-13	10	6	-8	78	5	-15	14
Fenhexamid	-13	21	-20	2	-9	-35	-1	-31	-1	-17	-22	7
Fenitrothion	26	-1	-70	-41	-15	-58	-23	-15	-37	-18	-20	-8
Flusilazole	-9	51	-31	-3	5	-36	-5	-6	-1	-13	-28	10
Imidacloprid	-18	4	-11	9	11	41	-3	-35	48	-16	-22	40
Indoxacarb	15	84	-67	-15	91	-63	-11	6	-41	-20	134	11
Kresoxim-methyl	-4	-3	-30	-1	-2	55	18	-8	-50	-43	-12	-54
Malathion	-21	51	20	-29	25	-41	-11	-11	13	-20	-9	-9
Metalaxyl	-11	66	-16	8	12	-13	-12	-20	-2	-4	1	5
Methamidophos	-47	122	-7	-33	25	-50	-24	-27	23	-38	-16	14
Methidation	-4	70	-31	4	51	-36	33	3	-38	-15	-10	-27
Methiocarb	1	54	-5	-77	-31	-92	-21	6	-25	1	-33	-77
Methomyl	-44	51	-32	-46	-30	-61	-14	-38	-24	-25	-40	-35
Mevinphos	-24	62	0	-2	24	1	-11	-19	30	-10	-16	18
Monocrotophos	-34	-8	18	-1	-49	-11	-25	-62	14	-27	-51	22
Omethoate	-36	79	-20	-21	26	-23	-31	6	29	-27	-34	62
Parathion	10	17	-69	-55	-23	-44	-56	-19	-23	-55	-21	-17
Phosalone	-14	19	-69	-44	6	-62	-29	-22	-30	-54	-17	-23
Piperonyl-butoxide	-34	-4	-62	-62	-11	-54	-51	-43	-35	-75	-51	-20
Pirimcarb	-27	-9	11	-7	-38	13	-28	-52	-11	-11	-40	35
Pirimphos-methyl	-21	38	-65	-62	30	-51	-56	-12	-31	-73	-29	3
Prochloraz	-10	6	-47	-4	-14	-44	-6	-23	-17	-10	-23	-1
Propiconazole	-9	47	-31	-9	-1	-37	-1	-17	6	-7	-19	17
Propoxur	-37	25	-12	-27	3	-45	-30	-36	-2	-33	-46	-3
Pyraclostrobin	-21	29	-64	-11	3	-52	-21	-34	-19	-38	-22	13
Spinosyn A	-33	-33	-74	-17	-39	-69	-28	-45	-55	-25	-48	-36
Spinosyn D	-35	-10	-72	-18	-24	-62	-29	-32	-49	-33	-31	-7
Tebuconazole	2	48	-12	3	13	-7	1	-10	24	0	-8	36
Thiacloprid	-38	40	-25	-19	-12	-31	-27	-15	12	-28	-2	-22
TPP	-19	107	-56	-32	68	-76	-32	21	8	-54	-3	27
Triadimefon	0	30	-19	0	4	-28	3	-23	13	2	-24	13
Triadimenol	0	70	-1	1	33	-11	2	6	23	25	4	17
Triazophos	-10	62	-22	-5	28	-26	-8	-7	-6	-19	8	16
Trifloxystrobin	-20	1	-65	-30	25	-38	-29	-22	-18	-47	-27	8

**Mellékletek II. táblázat** Kinyerési hatások értékei és azok precizitása (RSD%) a vizsgált négy olajmátrixban; 70%-nál kisebb vagy 120%-nál nagyobb kinyerési hatások értékei és 20%-nál nagyobb RSD értékek félkövérrel jelölve

Peszticid	Kinyerési hatások, % (RSD, %)											
	Napraforgó olaj			Olíva olaj			Repceolaj			Pálmaolaj		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Acephate	<b>58 (24)</b>	<b>59 (11)</b>	77 (9)	<b>49 (41)</b>	<b>53 (17)</b>	76 (7)	<b>55 (48)</b>	<b>61 (7)</b>	<b>65 (10)</b>	97 (6)	70 (8)	<b>54 (6)</b>
Azinphos-methyl	<b>ND</b>	82 (7)	101 (15)	<b>ND</b>	108 (19)	94 (18)	<b>ND</b>	75 ( <b>26</b> )	94 ( <b>27</b> )	<b>32 (10)</b>	105 (10)	<b>58 (27)</b>
Boscalid	<b>ND</b>	94 (10)	93 (9)	<b>ND</b>	96 (5)	98 (8)	<b>ND</b>	96 (8)	85 (6)	<b>32 (3)</b>	95 (14)	<b>65 (15)</b>
Carbaryl	<b>ND</b>	78 (8)	95 (6)	<b>131 (14)</b>	89 (6)	109 (10)	<b>ND</b>	97 (7)	82 (15)	<b>52 (5)</b>	87 (17)	<b>59 (12)</b>
Carbendazim	<b>ND</b>	80 (17)	<b>40 (11)</b>	<b>ND</b>	86 (7)	92 (9)	<b>ND</b>	<b>64 (13)</b>	<b>24 (14)</b>	<b>33 (2)</b>	75 (18)	<b>53 (18)</b>
Carbofuran	<b>58 (31)</b>	94 (7)	79 (5)	85 (11)	87 (3)	84 (7)	<b>49 (50)</b>	84 (6)	<b>68 (6)</b>	91 (5)	92 (12)	<b>53 (9)</b>
Chlorfenvinphos	<b>45 (27)</b>	89 (10)	97 (6)	<b>47 (14)</b>	87 (4)	97 (7)	<b>30 (49)</b>	93 (4)	74 (14)	77 (9)	84 (2)	<b>65 (7)</b>
Cyprodinil	<b>ND</b>	<b>61 (11)</b>	73 (4)	<b>ND</b>	73 (3)	72 (5)	<b>ND</b>	70 (6)	<b>60 (11)</b>	<b>8 (8)</b>	<b>59 (7)</b>	<b>38 (11)</b>
Diazinon	<b>34 (53)</b>	74 (13)	77 (4)	<b>36 (25)</b>	71 (11)	85 (5)	<b>24 (56)</b>	79 (3)	70 (3)	<b>44 (5)</b>	77 (4)	<b>57 (10)</b>
Dimethoate	71 ( <b>27</b> )	82 (17)	110 (4)	<b>68 (40)</b>	95 (6)	105 (2)	<b>50 (31)</b>	92 (9)	94 (3)	114 (9)	92 (10)	76 (13)
Fenarimol	<b>46 (30)</b>	82 (18)	94 (4)	<b>55 (11)</b>	87 (9)	83 (15)	<b>26 (50)</b>	89 (15)	71 (9)	87 (8)	93 (10)	<b>52 (17)</b>
Fenhexamid	<b>18 (32)</b>	75 (8)	85 (6)	<b>27 (11)</b>	76 (5)	87 (5)	<b>13 (32)</b>	74 (3)	73 (9)	<b>57 (5)</b>	75 (10)	<b>44 (20)</b>
Fenitrothion	<b>20 (52)</b>	86 (13)	93 (9)	<b>29 (44)</b>	85 (7)	102 (10)	<b>ND</b>	74 ( <b>21</b> )	73 (16)	<b>51 (7)</b>	84 (9)	<b>62 (21)</b>
Flusilazole	<b>37 (30)</b>	100 (4)	100 (6)	<b>42 (7)</b>	94 (4)	93 (11)	<b>22 (44)</b>	95 (3)	86 (3)	81 (7)	91 (8)	71 (12)
Imidacloprid	<b>62 (34)</b>	86 (12)	105 (13)	<b>56 (14)</b>	93 (10)	110 (5)	<b>46 (41)</b>	97 (5)	96 (5)	104 (5)	92 (18)	76 (15)
Indoxacarb	<b>20 (27)</b>	83 (2)	94 (10)	<b>28 (30)</b>	89 (8)	109 (10)	<b>9 (70)</b>	106 (8)	73 (17)	<b>57 (12)</b>	84 (3)	<b>69 (17)</b>
Kresoxim-methyl	<b>32 (40)</b>	91 (7)	89 (18)	<b>46 (23)</b>	78 (18)	93 (3)	<b>33 (9)</b>	83 (13)	<b>16 (82)</b>	78 (18)	105 (9)	<b>41 (30)</b>
Malathion	<b>64 (26)</b>	97 (3)	98 (7)	82 ( <b>41</b> )	90 (4)	107 (10)	<b>50 (47)</b>	79 (20)	91 (9)	91 (4)	85 (9)	<b>60 (12)</b>
Metalaxyl	<b>67 (30)</b>	98 (10)	109 (5)	70 (14)	103 (4)	109 (6)	<b>50 (45)</b>	99 (6)	93 (3)	109 (6)	89 (14)	<b>68 (12)</b>
Methamidophos	<b>50 (34)</b>	73 ( <b>25</b> )	76 (14)	<b>53 (34)</b>	72 (11)	80 (9)	<b>49 (41)</b>	81 (7)	70 (6)	94 (7)	74 (13)	<b>48 (17)</b>
Methidation	<b>28 (31)</b>	73 (7)	96 (5)	<b>37 (41)</b>	89 (3)	104 (4)	<b>24 (53)</b>	79 (17)	92 (16)	79 (7)	100 (14)	<b>65 (6)</b>
Methiocarb	<b>47 (37)</b>	83 (12)	90 (6)	<b>ND</b>	85 (6)	108 (10)	<b>39 (50)</b>	87 (5)	84 (6)	74 (5)	75 (9)	<b>60 (12)</b>
Methomyl	71 ( <b>28</b> )	111 (8)	107 (5)	<b>129 (26)</b>	104 (5)	109 (7)	<b>58 (49)</b>	110 (5)	89 (8)	113 (6)	103 (13)	<b>50 (12)</b>
Mevinphos	<b>44 (58)</b>	<b>43 (44)</b>	81 (18)	<b>52 (32)</b>	<b>54 (39)</b>	79 (13)	<b>45 (52)</b>	<b>56 (71)</b>	<b>58 (5)</b>	87 (7)	84 (8)	<b>58 (16)</b>
Monocrotophos	<b>69 (28)</b>	104 (7)	<b>130 (11)</b>	<b>62 (8)</b>	73 (19)	105 (20)	<b>57 (44)</b>	71 (15)	80 (11)	113 (8)	89 (19)	<b>66 (14)</b>
Omethoate	<b>50 (28)</b>	<b>54 (20)</b>	91 (5)	77 (19)	76 (14)	95 (4)	<b>57 (45)</b>	<b>47 (71)</b>	77 (4)	99 (8)	87 (15)	<b>49 (16)</b>
Parathion	<b>13 (53)</b>	80 (18)	85 (7)	<b>29 (21)</b>	84 (16)	89 (12)	<b>ND</b>	85 (7)	80 (19)	<b>32 (16)</b>	80 (9)	72 (16)
Phosalone	5 (11)	74 (6)	82 (8)	<b>ND</b>	76 (5)	98 (8)	<b>ND</b>	90 (10)	<b>40 (39)</b>	<b>18 (6)</b>	83 (7)	<b>47 (28)</b>
Piperonyl-butoxide	<b>12 (26)</b>	72 (5)	72 (6)	<b>16 (8)</b>	73 (5)	87 (13)	<b>9 (42)</b>	81 (4)	<b>61 (7)</b>	<b>6 (39)</b>	72 (3)	<b>49 (18)</b>
Pirimcarb	<b>18 (33)</b>	104 (19)	100 (6)	<b>20 (16)</b>	109 (9)	110 (17)	<b>ND</b>	88 (15)	94 (4)	<b>56 (5)</b>	94 (9)	<b>67 (15)</b>

Mellékletek II. táblázat folytatás

Peszticid	Kinyerési hatások, % (RSD, %)											
	napraforgó olaj			olíva olaj			repceolaj			pálmaolaj		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Pirimphos-methyl	<b>20 (38)</b>	77 (6)	72 (7)	<b>25 (20)</b>	70 (7)	85 (6)	<b>12 (53)</b>	74 (8)	72 (4)	<b>13 (18)</b>	71 (6)	<b>61 (11)</b>
Prochloraz	<b>ND</b>	79 (5)	88 (5)	<b>4 (8)</b>	86 (4)	87 (9)	<b>ND</b>	91 (4)	79 (4)	<b>35 (8)</b>	93 (5)	70 (8)
Propiconazole	<b>24 (29)</b>	91 (8)	87 (5)	<b>30 (13)</b>	86 (4)	93 (4)	<b>11 (67)</b>	87 (3)	76 (9)	<b>63 (6)</b>	82 (6)	<b>57 (16)</b>
Propoxur	<b>65 (28)</b>	93 (13)	101 (5)	85 (15)	87 (12)	106 (5)	<b>56 (49)</b>	102 (5)	88 (8)	91 (6)	98 (9)	70 (18)
Pyraclostrobin	<b>ND</b>	78 (5)	85 (6)	<b>ND</b>	86 (7)	89 (10)	<b>ND</b>	91 (6)	78 (5)	<b>27 (4)</b>	78 (6)	<b>69 (11)</b>
Spinosyn A	<b>ND</b>	71 ( <b>28</b> )	78 (7)	<b>4 (11)</b>	<b>43 (7)</b>	74 (17)	<b>ND</b>	77 (9)	<b>68 (11)</b>	<b>47 (8)</b>	<b>41 (12)</b>	<b>49 (15)</b>
Spinosyn D	<b>ND</b>	82 (16)	71 (19)	<b>ND</b>	<b>46 (9)</b>	<b>59 (10)</b>	<b>ND</b>	79 (6)	<b>58 (17)</b>	<b>48 (9)</b>	<b>44 (34)</b>	<b>45 (28)</b>
Tebuconazole	<b>16 (29)</b>	73 (11)	92 (6)	<b>19 (11)</b>	87 (5)	96 (10)	<b>ND</b>	88 (5)	78 (7)	<b>53 (6)</b>	90 (15)	<b>53 (13)</b>
Thiacloprid	<b>51 (30)</b>	95 (11)	<b>128 (15)</b>	<b>54 (14)</b>	91 (3)	120 (4)	<b>33 (53)</b>	85 (4)	94 (4)	99 (7)	106 (14)	<b>64 (18)</b>
TPP (ISTD)	<b>ND</b>	86 (13)	81 (8)	<b>ND</b>	81 (3)	95 (2)	<b>ND</b>	73 (9)	83 (14)	<b>27 (8)</b>	86 (15)	<b>57 (9)</b>
Triadimefon	<b>60 (28)</b>	99 (4)	94 (5)	<b>65 (12)</b>	95 (6)	99 (7)	<b>43 (44)</b>	93 (7)	80 (11)	99 (7)	95 (10)	<b>59 (13)</b>
Triadimenol	<b>68 (32)</b>	96 (7)	92 (7)	70 (8)	100 (7)	105 (8)	<b>58 (43)</b>	98 (5)	89 (6)	109 (7)	98 (4)	<b>55 (15)</b>
Triazophos	<b>9 (27)</b>	95 (8)	92 (4)	<b>8 (19)</b>	93 (3)	104 (6)	<b>ND</b>	90 (5)	85 (4)	<b>45 (5)</b>	86 (8)	<b>62 (16)</b>
Trifloxystrobin	<b>28 (25)</b>	85 (4)	90 (4)	<b>36 (11)</b>	96 (5)	108 (8)	<b>18 (37)</b>	104 (4)	79 (6)	<b>54 (8)</b>	82 (5)	<b>69 (16)</b>
<b>Átlag</b>	41 (32)	83 (11)	90 (8)	49 (20)	84 (8)	95 (9)	37 (46)	84 (11)	76 (11)	65 (8)	85 (10)	59 (15)
	n= 34	n=44	n=44	n=35	n=44	n=44	n=28	n=44	n=44	n=44	n=44	n=44

ND: Nem volt kimutatható

**Mellékletek III. táblázat** MS/MS paraméterek a kvantitatív (megerősítő) tandem-MS MRM mérésben; az intenzívebb fragmension félkövér stílussal jelölve

Hatóanyag	MW	Anyaiion, m/z	Termékion, m/z	DP	EP	CEP	CE	CXP	Retenciósi idő, perc
Acephate	183,2	<b>184,1</b>	<b>143,2</b> 95,0	16	7,5	12	13 29	4 4	<b>3,3</b>
Acetamidrid	222,1	<b>223,2</b>	<b>126,1</b> 56,1	26	4,5	14	25 33	4 4	<b>11,7</b>
Azinphos-methyl	317,3	<b>317,9</b>	<b>132,1</b> 160,2	31	4	14	19 13	4 4	<b>21,6</b>
Azoxystrobin	403,4	<b>404,0</b>	<b>372,0</b> 329,0	31	5,5	18	19 39	12 4	<b>22,3</b>
Benalaxyl	325,1	<b>326,1</b>	<b>294,0</b> 148,1	40	5,5	18	15 23	4 4	<b>25,6</b>
Benomyl	290,4	<b>291,1</b>	<b>192,2</b> 160,0	21	4,5	18	17 37	4 4	<b>3,5</b>
Boscalid	343,2	<b>343,0</b>	<b>307,0</b> 140,0	56	8,5	16	25 25	10 4	<b>22,6</b>
Bupirimate	316,1	<b>317,2</b>	<b>166,2</b> 108,0	26	8,5	34	31 37	2 4	<b>20,3</b>
Buprofezin	305,4	<b>306,0</b>	<b>201,0</b> 116,0	31	4	16	17 21	4 4	<b>26,6</b>
Carbaryl	201,2	<b>202,1</b>	<b>145,0</b> 127,0	26	6	14	13 35	4 4	<b>18,1</b>
Carbendazim	191,2	<b>192,2</b>	<b>160,0</b> 132,0	36	8,5	12	23 39	4 4	<b>3,5</b>
Carbofuran	221,3	<b>222,2</b>	<b>165,1</b> 123,0	26	6	16	15 29	4 4	<b>17,3</b>
Chlorfenvinphos	359,6	<b>360,9</b>	<b>155,2</b> 98,9	51	7	18	19 39	4 4	<b>25,2</b>
Chlormequat chloride	122,6	<b>124,0</b>	<b>58,1</b> 59,2	36	9	10	41 27	4 4	<b>2,4</b>
Chlorpropham	213,3	<b>214,1</b>	<b>171,9</b> 154,1	26	2,5	12	13 23	4 4	<b>23,7</b>
Clofentezin	303,2	<b>304,1</b>	<b>231,0</b> 158,2	31	3	12	13 27	4 4	<b>3,1</b>
Cyprodinil	225,1	<b>226,2</b>	<b>93,1</b> 76,9	41	4	16	43 55	8 4	<b>19,6</b>
Desmethyl-pirimicarb		<b>225,2</b>	<b>168,0</b> 72,0	36	4,5	14	31 45	4 4	<b>4,0</b>
Diazinon	304,3	<b>305,0</b>	<b>169,0</b> 153,0	36	5	16	31 25	4 4	<b>27,0</b>
Dichlorvos	221,0	<b>223,0</b>	<b>109,0</b> 127,0	31	6,5	18	23 27	4 4	<b>16,1</b>
Diethofencarb	267,3	268,1	<b>226,2</b> 124,0	31	4,5	16	13 43	6 4	<b>21,7</b>
Difenoconazole	406,3	<b>406,1</b>	<b>251,0</b> 111,0	41	6,5	30	31 73	4 4	<b>25,1</b>
Diflubenzuron	310,7	<b>311,0</b>	<b>158,1</b>	71	10,5	14	19	4	<b>23,5</b>

Hatóanyag	MW	Anyaiion, m/z	Termékion, m/z	DP	EP	CEP	CE	CXP	Retenciósi idő, perc
			141,1				39	4	
Dimethoate	229,3	<b>230,0</b>	<b>199,0</b>	16	4,5	14	13	4	<b>11,6</b>
			125,0				25	4	
Dimethomorph	387,0	<b>388,2</b>	<b>301,2</b>	51	4,5	20	27	4	<b>19,7 és 20,1 *</b>
			165,2				43	4	
Diphenylamine	169,2	<b>170,0</b>	<b>93,0</b>	51	8	12	31	4	<b>24,6</b>
			66,0				59	4	
Fenamiphos	303,4	<b>304,0</b>	<b>217,0</b>	41	4	14	29	4	<b>22,0</b>
			234,0				21	4	
Fenarimol	331,2	<b>333,0</b>	<b>81,1</b>	61	8,5	14	47	4	<b>21,6</b>
			268,0				31	4	
Fenazaquin	306,4	<b>307,0</b>	<b>161,0</b>	41	4	14	21	4	<b>29,9</b>
			57,0				39	4	
Fenbuconazole	335,9	<b>336,8</b>	<b>125,0</b>	46	3,5	19,5	39	4	<b>23,3</b>
			128,0				73	4	
Fenhexamid	302,0	<b>302,1</b>	<b>97,1</b>	51	4	16	33	4	<b>22,5</b>
			55,0				59	6	
Fenoxycarb	301,3	<b>302,1</b>	<b>88,0</b>	41	5	46	37	4	<b>23,7</b>
			115,9				17	4	
Fenpropimorph	303,4	<b>304,2</b>	<b>147,1</b>	61	5	22	39	4	<b>23,4</b>
			116,9				65	4	
Fenpyroximate	421,2	<b>422,3</b>	<b>366,4</b>	31	4	24	21	6	<b>30,3</b>
			138,2				41	4	
Flusilazole	315,4	<b>316,1</b>	<b>247,2</b>	46	3,5	16	23	4	<b>23,2</b>
			165,1				37	4	
Haloxifop	361,0	<b>362,1</b>	<b>316,1</b>	61	7,5	16	23	8	<b>23,8</b>
Hexythiazox	352,0	<b>353,2</b>	<b>228,0</b>	41	4,5	16	21	4	<b>30,4</b>
			168,1				33	4	
Imazalil	297,2	<b>297,0</b>	<b>159,0</b>	46	4	14	31	4	<b>13,9</b>
			201,0				23	4	
Imidacloprid	255,7	<b>256,0</b>	<b>209,0</b>	31	4,5	16	19	6	<b>10,7</b>
			175,0				23	4	
Indoxacarb	527,8	<b>528,0</b>	<b>249,0</b>	66	4	22	23	4	<b>28,0</b>
			150,0				31	4	
Iprodione	330,2	<b>332,0</b>	<b>247,1</b>	51	6	16	19	4	<b>23,6</b>
			56,0				55	6	
Iprovalicarb	320,4	<b>321,2</b>	<b>119,0</b>	31	5	14	27	4	<b>22,4</b>
			203,1				13	4	
Isofenphos	345,4	<b>346,0</b>	<b>245,0</b>	16	2,5	14	17	8	<b>28,6</b>
			217,0				29	6	
Isofenphos-methyl	331,4	<b>332,2</b>	<b>231,0</b>	21	2,5	14	17	8	<b>27,1</b>
			273,0				11	6	
Kresoxim-methyl	313,4	<b>314,0</b>	<b>116,0</b>	21	9	14	19	4	<b>25,8</b>
			206,0				11	4	
Linuron	248,0	<b>249,0</b>	<b>160,0</b>	41	10	16	25	4	<b>21,8</b>
			182,0				21	4	
Malaoxon	314,0	<b>315,1</b>	<b>126,9</b>	26	6,0	14	43	4	<b>16,7</b>



Hatóanyag	MW	Anyaiion, m/z	Termékion, m/z	DP	EP	CEP	CE	CXP	Retenciósi idő, perc
Malathion	330,4	<b>331,1</b>	99,0 <b>127,0</b>	26	8	16	49 17	4 4	<b>24,5</b>
Mepanipyrim	223,1	<b>224,1</b>	99,1 <b>77,0</b>	51	4,0	14	29 43	4 4	<b>23,0</b>
Metalaxyl	279,3	<b>280,0</b>	106,0 <b>220,0</b>	31	4,5	14	39 17	4 4	<b>18,3</b>
Metconazole	319,1	<b>320,2</b>	192,0 <b>70,0</b>	46	6,5	12	23 43	4 4	<b>23,6</b>
Methamidophos	141,1	<b>142,0</b>	125,1 <b>94,0</b>	31	4,5	10	59 17	4 4	<b>3,3</b>
Methidathion	302,3	<b>302,9</b>	125,0 <b>145,0</b>	21	5	16	17 15	4 4	<b>21,9</b>
Methiocarb	225,3	<b>226,0</b>	85,0 <b>169,0</b>	26	9,5	14	27 13	4 4	<b>21,4</b>
Methiocarb-sulfon	257,3	<b>258,1</b>	121,0 <b>122,1</b>	36	5	16	23 21	4 4	<b>12,9</b>
Methiocarb-sulfoxid	241,3	<b>242,2</b>	201,1 <b>185,0</b>	31	4,5	14	13 17	4 4	<b>8,6</b>
Methomyl	162,2	<b>163,1</b>	122,0 <b>88,0</b>	21	4	10	37 13	4 4	<b>6,7</b>
Methoxyfenozide		<b>369,2</b>	106,0 <b>149,2</b>	26	8,0	18	13 21	4 4	<b>23,7</b>
Mevinphos	224,1	<b>225,1</b>	313,3 <b>127,0</b>	26	7	14	13 19	4 4	<b>12,3</b>
Monocrotophos	223,2	<b>224,1</b>	193,1 <b>127,0</b>	26	10	14	11 19	4 4	<b>5,2</b>
Myclobutanil	288,8	289,0	193,0 <b>70,0</b>	41	4,5	16	11 35	4 4	<b>22,4</b>
Neburon	275,2	<b>275,1</b>	125,0 <b>88,0</b>	56	7	14	39 33	4 4	<b>24,5</b>
Novaluron	492,7	<b>492,9</b>	114,2 <b>158,2</b>	71	4,5	26	19 27	4 4	<b>27,6</b>
Omethoate	213,2	<b>214,1</b>	140,9 <b>124,8</b>	21	5,5	14	63 29	4 4	<b>3,5</b>
Parathion	291,3	<b>292,0</b>	183,1 <b>236,0</b>	26	5	12	15 19	4 4	<b>26,3</b>
Penconazole	284,2	<b>286,0</b>	264,0 <b>70,0</b>	31	4,5	20	15 31	4 4	<b>23,5</b>
Pendimethalin	281,3	<b>282,0</b>	160,9 <b>212,0</b>	21	4	16	35 15	4 6	<b>30,3</b>
Phosalone	367,8	<b>368</b>	194,0 <b>182</b>	41	9,5	20	23 19	4 4	<b>27,5</b>
Phosmet	317,3	<b>318,0</b>	111 <b>160,0</b>	26	8,5	14	53 17	4 4	<b>22,2</b>
Piperonyl butoxide	355,0	<b>356,2</b>	133,0 <b>177,2</b>	31	4,5	16	49 17	4 4	<b>29,0</b>
Pirimicarb	238,0	<b>239,2</b>	119,1 <b>72,0</b>	36	4,5	16	47 31	4 4	<b>7,0</b>
Pirimiphos-methyl	305,0	<b>306,2</b>	182,2 <b>108,1</b>	51	4,5	22	21 41	4 4	<b>27,1</b>
			164,3				29	4	

Hatóanyag	MW	Anyaiion, m/z	Termékion, m/z	DP	EP	CEP	CE	CXP	Retenciósi idő, perc
Prochloraz	376,7	<b>378,1</b>	<b>310,1</b> 268,0	21	4,5	24	17 21	6 8	<b>20,2</b>
Propamocarb	188,3	<b>189,0</b>	<b>102,0</b> 144,0	31	6	12	23 17	4 4	<b>3,1</b>
Propargite	350,5	<b>368,2</b>	<b>231,2</b> 175,3	36	5,5	16	15 19	4 4	<b>31,1</b>
Propiconazole	342,2	<b>344,0</b>	<b>161,1</b> 69,0	56	5	18	33 33	4 4	<b>24,1 és 24,4 *</b>
Propoxur	209,2	<b>210,1</b>	<b>168,2</b> 111,1	16	6,5	14	11 19	4 4	<b>17,0</b>
Propyzamide	256,1	<b>255,9</b>	<b>189,7</b> 172,8	46	6	44	19 23	6 6	<b>22,9</b>
Pymetrozine	217,2	<b>218,1</b>	<b>105,0</b> 78,1	51	9	14	25 55	4 4	<b>2,5</b>
Pyraclostrobin	387,8	<b>388,0</b>	<b>194,0</b> 163,0	26	5	16	17 29	6 4	<b>26,4</b>
Pyrimethanil	199,3	<b>200,2</b>	<b>107,1</b> 82,1	46	7,5	12	31 35	4 4	<b>16,0</b>
Pyriproxyfen	321,4	<b>322,0</b>	<b>96,0</b> 185,0	31	2,5	20	21 29	4 4	<b>29,4</b>
Quinoxifen	308,1	<b>308,0</b>	<b>197,0</b> 162,0	61	4	14	43 61	4 4	<b>27,7</b>
Spinosyn A	731,0	<b>732,4</b>	<b>142,2</b> 98,1	61	10,5	72	41 87	4 4	<b>17,7</b>
Spinosyn D	745,5	<b>746,4</b>	<b>142,2</b> 98,1	76	5,5	34	39 89	4 4	<b>18,6</b>
Spiroxamine	297,5	298,2	<b>144,0</b> 100,0	46	4,5	16	27 41	4 4	<b>16,1</b>
Sulfotep	322,0	<b>323,0</b>	<b>115,0</b> 171,0	31	9	14	39 19	4 4	<b>27,8</b>
Tebuconazole	307,8	<b>308,1</b>	<b>70,0</b> 125,0	41	4,5	14	41 45	4 4	<b>22,9</b>
Teflubenzuron	381,1	<b>381,0</b>	<b>158,1</b> 141,3	71	10	18	21 43	4 4	<b>26,8</b>
Tetraconazole	371,2	<b>372,1</b>	<b>159,0</b> 123,1	31	3,5	21	25 40	4 4	<b>23,1</b>
Thiabendazole	201,3	<b>202,0</b>	<b>175,0</b> 131,0	56	6,5	14	35 43	4 4	<b>3,7</b>
Thiacloprid	252,7	<b>253,0</b>	<b>126,0</b> 99,0	51	4	16	27 57	4 4	<b>13,7</b>
Thiamethoxam	291,0	<b>292,1</b>	<b>211,2</b> 181,1	26	9,5	16	17 29	4 4	<b>8,1</b>
Thiophanate-methyl	342,4	<b>343,1</b>	<b>151,1</b> 311,1	26	6,5	18	25 17	4 10	<b>16,1</b>
TPP (internal standard)	326,0	<b>327,0</b>	<b>152,0</b> 215,0	61	12		43 33	4 4	<b>26,2</b>
Triadimefon	293,8	<b>294,0</b>	<b>197,2</b> 225,0	41	4	14	19 17	4 4	<b>22,8</b>
Triadimenol	295,8	296,0	<b>70,0</b> 227,0	21	4	14	21 13	4 4	<b>20,5 és 21,0 *</b>
Triazophos	313,3	<b>314,0</b>	<b>162,2</b>	46	4,5	14	23	4	<b>24,2</b>

Hatóanyag	MW	Anyaiion, <i>m/z</i>	Termékion, <i>m/z</i>	DP	EP	CEP	CE	CXP	Retenciósi idő, perc
Trifloxystrobin	408,4	<b>409,2</b>	119,1	26	7	18	47	4	<b>28,3</b>
			<b>186,1</b>				23	4	
			206,2				19	4	
Triflumuron	358,7	<b>359,1</b>	<b>156,0</b>	46	11	26	21	4	<b>25,3</b>
			139,0				35	4	

**Mellékletek IV. táblázat** A tandem-MS mérések eredményei és az LC-TOFMS keresés értékelése; az LC-TOFMS készülékkel nem detektált komponensek félkövér formátummal jelölve

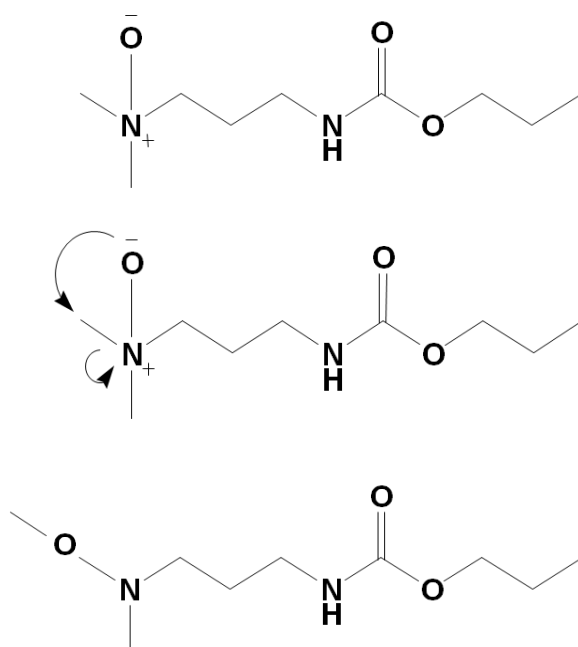
Minta	A tandem-MS készülékkel azonosított komponensek és koncentrációjuk (mg kg <sup>-1</sup> )	Azonosítva LC-TOFMS készülékkel
Alma	Bupirimate (<0,02)	I
	Difenoconazole (<0,02)	I
	<b>Fenpyroximate (&lt;0,02)</b>	-
	Pirimicarb (<0,02)	I
	Pyraclostrobin (<0,02)	I
Narancs	<b>Fenpyroximate (&lt;0,02)</b>	-
	Imazalil (<0,02)	I
	<b>Pyriproxyfen (&lt;0,02)</b>	-
	<b>Spiroxamine (&lt;0,02)</b>	-
	<b>Trifloxystrobin (&lt;0,02)</b>	-
Fejes saláta	Azoxystrobin (0,04)	I
	Boscalid (0,06)	I
	<b>Propamocarb (1,18) *</b>	-
Narancs	<b>Azoxystrobin (&lt;0,02)</b>	-
	<b>Fenhexamid (&lt;0,02)</b>	-
	Imazalil (0,29)	I
Citrom	Buprofezine (<0,02)	I
	Imazalil (0,23)	I
	Pyrimethanil (0,03)	I
	Thiabendazole (0,10)	I
Fejes saláta	Azoxystrobin (0,64)	I
	Fenhexamid (0,21)	I
	Propamocarb (0,27)	I
Körte	Methoxyfenozide (0,10)	I
	Tebuconazole (0,07)	I
	Trifloxystrobin (<0,02)	I
Paradicsom	Benalaxyl (<0,02)	I
	Difenoconazole (<0,02)	I
	Dimethomorph (0,03)	I
	Metalaxyl (<0,02)	I
	Pyrimethanil (0,24)	I
	Tebuconazole (0,05)	I
	Thiacloprid (0,05)	I
Körte	Boscalid (0,07)	I
	Pyraclostrobin (<0,02)	I
	Tebuconazole (0,03)	I
	Trifloxystrobin (<0,02)	I
Paradicsom	Dimethomorph (<0,02)	I
	Metalaxyl (<0,02)	I
	Propamocarb (0,06)	I
	Pyrimethanil (<0,02)	I

Minta	A tandem-MS készülékkel azonosított komponensek és koncentrációjuk (mg kg <sup>-1</sup> )	Azonosítva LC-TOFMS készülékkel
Alma	Fenpyroximate (<0,02)	I
	Boscalid (0,10)	I
	Pirimicarb (0,03)	I
	Pyraclostrobin (0,03)	I
Zöld paprika	Acetamiprid (<0,02)	I
	Carbendazim (<0,02)	I
	Difenoconazole (0,12)	I
	Spinosyn (0,04)	I
Paradicsom	Acetamiprid (<0,02)	I
	Cyprodinil (<0,02)	I
	Metalaxyl (0,03)	I
Zöld paprika	Acetamiprid (0,30)	I
	Azoxystrobin (0,07)	I
Eper	Azoxystrobin (0,65)	I
	Bupirimate (0,17)	I
	<b>Cyprodinil (0,65) *</b>	-
	Boscalid (0,25)	I
	Penconazole (0,10)	I
	Pyraclostrobin (0,10)	I
Fejes saláta	<b>Azoxystrobin (3,52) *</b>	-
	<b>Fenazaquin (&lt;0,02)</b>	-
	Fenhexamid (3,36)	I
	Propamocarb (0,07)	I
Kígyóuborka	Azoxystrobin (<0,02)	I
	Bupirimate (<0,02)	I
	Cyprodinil (<0,02)	I
	Dimethomorph (<0,02)	I
	Metalaxyl (<0,02)	I
	Propamocarb (0,15)	I
Narancs	Carbaryl (0,29)	I
	<b>Fenpyroximate (&lt;0,02)</b>	-
	Imazalil (0,40)	I
	Thiabendazole (0,23)	I
Őszibarack	<b>Acetamiprid (&lt;0,02)</b>	-
	Carbendazim (0,03)	I
	Malathion (<0,02)	I
	Thiophanate-methyl (0,03)	I
Zöld paprika	Acetamiprid (0,05)	I
	Difenoconazole (0,16)	I
	Spinosyn (0,07)	I
Paradicsom	Carbendazim (0,09)	I
	Imidacloprid (0,07)	I
	Thiophanate-methyl (0,03)	I

Minta	A tandem-MS készülékkel azonosított komponensek és koncentrációjuk (mg kg <sup>-1</sup> )	Azonosítva LC-TOFMS készülékkel
Alma	Acetamiprid (<0,02)	I
	Boscalid (0,02)	I
	Pyraclostrobin (<0,02)	I
	<b>Trifloxystrobin (&lt;0,02)</b>	-
Eper	Azoxystrobin (0,11)	I
	Bupirimate (0,06)	I
	<b>Fenazaquin (&lt;0,02)</b>	-
	Fenhexamid (0,03)	I
	Mepanipyrim (0,06)	I
	Boscalid (0,07)	I
	Pyraclostrobin (0,02)	I
	<b>Pyriproxyfen (&lt;0,02)</b>	-
<b>Spinosyn (&lt;0,02)</b>	-	
Szőlő	Azoxystrobin (0,06)	I
	Carbendazim (<0,02)	I
	<b>Chlormequat-chloride (0,04)</b>	-
	<b>Diphenyl-amine (&lt;0,02)</b>	-
	Iprovalicarb (<0,02)	I
	Kresoxim-methyl (0,05)	I
	<b>Methoxyfenozide (&lt;0,02)</b>	-
	<b>Myclobutanil (&lt;0,02)</b>	-
	Pyraclostrobin (<0,02)	I
Szőlő	Azoxystrobin (0,02)	I
	Buprofezine (<0,02)	I
	Carbendazim (<0,02)	I
	<b>Chlormequat-chloride (0,07)</b>	-
	<b>Fenpyroximate (&lt;0,02)</b>	-
	<b>Metconazole (&lt;0,02)</b>	-
	Myclobutanil (<0,02)	I
	<b>Pyriproxyfen (&lt;0,02)</b>	-
	Spiroxamine (<0,02)	I
Triadimenol (0,05)	I	
Paradicsom	Cyprodinil (0,03)	I
	Dimethomorph (0,02)	I
	Propamocarb (0,03)	I
Szőlő	Cyprodinil (0,02)	I
	Fenhexamid (0,18)	I
	Spiroxamine (<0,02)	I
	Trifloxystrobin (0,05)	I
Zöld paprika	Acetamiprid (0,03)	I
	Azoxystrobin (0,03)	I
	Imidacloprid (0,20)	I
	Penconazole (<0,02)	I

Minta	A tandem-MS készülékkel azonosított komponensek és koncentrációjuk (mg kg <sup>-1</sup> )	Azonosítva LC-TOFMS készülékkel
	Pirimiphos-methyl (0,03)	I
Grapefruit	Imazalil (0,39)	I
	Thiabendazole (0,23)	I

\* A komponens nagy koncentrációjából adódóan telítette a TOFMS műszer detektorát, ezért nem sikerült automatikusan detektálni



20. ábra Propamocarb N-oxid (felül) feltételezett 1,2 Meisenheimer átalakulása

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálámat kifejezni mindazoknak, akik közvetlenül vagy közvetve, akarva vagy akaratlanul, kisebb vagy nagyobb mértékben hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat napvilágot lásson.

Elsőként témavezetőmnek, Fodor Péternek, akinek a folytonos unszolása és támogatása nélkül ez a dolgozat aligha készülhetett volna el.

Köszönöm Dernovics Mihálynak, hogy önzetlen segítségére egész PhD tanulmányom alatt és az után is számíthattam. Neki köszönhetően nyílt lehetőségem a külföldi tanulmányútra, melynek eredményein ezen dolgozat nagy része alapszik. Köszönöm neki továbbá a bomlástermék sztenderd szintetizálásában, Vass Andreával és Gyepes Attilával közösen elvégzett munkáját, melynek köszönhetően emelhettem a témában íródott publikációm, illetve a disszertációm szakmai színvonalát.

Hálával tartozom az Alkalmazott Kémia Tanszék minden dolgozójának, akik kellemes, emberi légkört teremtettek a mindennapi munkához, továbbá segítő munkájukkal hozzájárultak a néha végeláthatatlannak tűnő minta-előkészítések elvégzéséhez. Firiszke, Ildi, Jules, köszönöm Nektek is!

Nem hagyhatom ki a felsorolásból a kedves PhD hallgató társakat sem: Tomi, Blanka, Virág, Dani, Dusi, Anikó, Joci, akik fiatalos, vidám és baráti hangulatot kölcsönöztek az együtt eltöltött néhány évnek.

Köszönettel tartozom Kmellár Bélának, aki a diplomamunkám készítése során témavezetőként elsőként vezetett be a műszeres analitika rejtelmeibe és ismertetett meg a növényvédő szer analitika fortélyaiival.

Köszönöm a Jaén-i Egyetem Juan-Francisco García-Reyes által vezetett csoportjának azt a kedvességet és segítőkészséget, melyet külföldi tartózkodásom során irányomba tanúsítottak. Olyan fél év volt az, melyre szívesen gondolok vissza, köszönhetően részben az ott kötött barátságoknak, részben pedig a „Juan-Fra” jóvoltából elért szakmai fejlődésnek.

Végül, de legfontosabbként: a **CSALÁDOM**. Nővérem, **Judit**, akihez bármikor fordulhattam, ha szövetségesre volt szükségem, és akivel az elmúlt 20 év egészen verekedésmentesre sikerült. Párom, **Nóra**, aki lelki- és sorstársként kísért végig a „nagy mű” születését, és akinek a nógatása nélkül lehet, hogy még mindig nem lenne kész. **Manóka**, aki a *fogas* kérdések és a sűrű légkör megteremtésének szakértője. **Drága szüleim**, akik nélkül nem az lennék, aki vagyok, nem tartanék ott, ahol tartok, és természetesen ez a dolgozat sem született volna meg. Ők az életem stabil bástyái, akik mindig ott voltak nekem, sokszor saját érdekeiket is háttérbe szorítva miattam. Nem tudom nekik eléggé megköszönni, hogy ilyen szerető és biztonságot adó környezetben nőhettem fel. Szeretlek titeket!