

Doktori értekezés Ph.D. fokozat elnyerésére



ADALÉKOLÁSI ELJÁRÁSSAL VÉGREHAJTOTT LC-ESI-MS
VIZSGÁLATOK KIFEJLESZTÉSE ÉS KRITIKAI ÉRTÉKELÉSE

DEÁK EDIT

Doktori (Ph.D.) értekezése

Témavezető:

Stefanovitsné Dr. Bányai Éva

Dr. Dernovics Mihály

Készült:

Budapesti Corvinus Egyetem

Alkalmazott Kémia Tanszék

„A tudományos módszer lényege,
hogy a problémákat mint problémákat kezeli,
így keresi a legjobb megoldást, előítéletek és sovinizmus nélkül.
Nem azt kérdezzük, hogy kinek van igaza, hanem azt, hogy mi az igazság.”

Szent-Györgyi Albert

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Felföldi József**
egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Fizika-Automatika Tanszék

Témavezetők: **Stefanovitsné Dr. Bányai Éva**
DSc, tanszékvezető egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Dr. Dernovics Mihály
PhD, egyetemi docens
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2014. október 7-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Simonné Sarkadi Livia, DSc
Zsigrainé Vasanits Anikó, PhD
Nagyné Sárdi Éva, DSc
Lelik László, CSc

Opponensek

Németh Zsolt, PhD
Kovács Béla, PhD

Titkár

Jókainé Szatura Zsuzsanna, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
2. BEVEZETÉS	9
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
3.1. A KARBAMÁTOK	10
3.1.1. Az etil-karbamát.....	11
3.1.1.1. Az etil-karbamát általános jellemzői.....	11
3.1.1.2. Az etil-karbamát előfordulása és képződése élelmiszerekben	12
3.1.1.3. Az etil-karbamát mennyisége élelmiszerekben.....	13
3.1.1.4. Az etil-karbamát humán élettani hatása	16
3.1.1.5. Élelmiszerek etil-karbamát tartalmára vonatkozó jogi szabályozás	16
3.2. A PÁLINKA	18
3.2.1 A pálinkakészítés folyamata	19
3.3. MÓDSZEREK ALKOHOLTARTALMÚ ITALOK ETIL-KARBAMÁT TARTALMÁNAK CSÖKKENTÉSÉRE	20
3.3.1. Karbamid tartalom csökkentés	20
3.3.2. Hidrogén-cianid tartalom csökkentés pálinkában	21
3.4. ANALITIKAI MÓDSZEREK ETIL-KARBAMÁT TARTALOM MEGHATÁROZÁSÁRA	22
3.4.1. Etil-karbamát tartalom meghatározása hagyományos (nem tömegspektrometriai detektálású) gázkromatográfiával	22
3.4.2. GC-MS eljárás származékképzés nélkül	22
3.4.3. GC-MS módszerek származékképzéssel	23
3.4.4. Etil-karbamát meghatározása folyadékkromatográfiás eljárásokkal	25
3.4.5. Származékképzés	26
3.4.6. Kalibrációs eljárások etil-karbamát meghatározásánál.....	28
3.5. A Q ₁₀ ÁLTALÁNOS ISMERTETÉSE	30
3.6 A Q ₁₀ felfedezése és szerepe az elektrontranszport láncban	31
3.7 Élelmiszerek Q ₁₀ tartalma	32
3.8 Analitikai módszerek Q ₁₀ meghatározására	34
3.8.1. Mintaelőkészítés.....	34
3.8.2 Q ₁₀ analitikai meghatározása	37
3.8.3 Kalibrációs eljárások Q ₁₀ tartalom meghatározásánál	40
3.9 A mérési bizonytalanság fogalma és meghatározása	41
4. CÉLKITŰZÉSEK	43
5. ANYAG ÉS MÓDSZER	44
5.1. Felhasznált vegyszerek	44
5.2. Alkalmazott műszerek.....	44
5.2.1. HPLC-ESI-MS-MS	44
5.2.2. HPLC-ESI-QTOF-MS és –MS-MS kísérletek	46
5.4. Vegyület szintézisek	47
5.4.1. Xantil-etil-karbamát szintézise és HPLC-ESI-MS/MS mérési paramétereinek optimalítása MRM módszerrel történő meghatározásához	47
5.4.2. Xantil-butil-karbamát szintézise	48
5.5. Etil-karbamát mennyiségi meghatározása adalékolással (spiking) HPLC-ESI-MS-MS rendszer segítségével.....	48
5.6 Mintaelőkészítés és kalibráció összes Q ₁₀ tartalom meghatározásához HPLC-UV készülékkel	49
5.7 Q ₁₀ H ₂ standard oldat előkészítése kromatográfiás felhasználáshoz	50
5.8 Q ₁₀ H ₂ standard oldat előkészítése adalékolási mintaelőkészítéshez.....	50

5.9 Mintaelőkészítési eljárások összehasonlítása étrendkiegészítők redukált Q ₁₀ tartalmának meghatározásához	51
5.10 Kalibrációs eljárások étrendkiegészítők redukált Q ₁₀ tartalmának meghatározásához	52
5.11 Q ₁₀ koenzim mennyiségi meghatározása HPLC-ESI-MS-MS kapcsolt rendszerrel	52
5.12 Vizsgálati minták etil-karbamátra	53
5.13. Vizsgálati minták Q ₁₀ koenzimre	53
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	54
6.1 Etil-karbamát meghatározás.....	54
6.1.1 A xantil-etil-karbamát MS/MS fragmentációs viselkedése és ESI-MS/MS meghatározásának optimalizálása.....	54
6.1.2 Validáláshoz szükséges teljesítményjellemzők megállapítása	55
6.1.2.1 Szelektivitás	55
6.1.2.2 Mennyiségi teljesítményjellemzők	56
6.1.2.3 Stabilitás.....	58
6.1.3 Pálinkaminták mérési eredményeinek bemutatása	59
6.1.4 Kísérlet új belső standard bevezetésére etil-karbamát mennyiségi meghatározására.....	60
6.1.5 A kidolgozott etil-karbamát meghatározási módszer kiterjesztett mérési bizonytalanságának számítása.....	66
6.2 Redukált Q ₁₀ koenzim meghatározásának eredményei.....	75
6.2.1 Átvett módszerek verifikálása.....	75
6.2.2 Q ₁₀ H ₂ standard oldat készítésének kidolgozása	76
6.2.3 Az extrakciós módszer hatása a Q ₁₀ H ₂ stabilitására	77
6.2.4. Q ₁₀ H ₂ tartalom mennyiségi meghatározás: kalibrációs eljárások összehasonlítása HPLC-ESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel.....	79
6.2.5. Az ubikinon és az ubikinol HPLC-ESI-MS/MS meghatározásának robusztussága	82
6.2.6 A kidolgozott redukált Q ₁₀ tartalom meghatározási módszer kiterjesztett mérési bizonytalanságának számítása.....	83
7. KÖVETKEZTETÉSEK	92
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	94
9. ÖSSZEFOGLALÁS	95
10. SUMMARY	96
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	97
12. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	111
13. MELLÉKLET	113

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFID	Alkali flame ionization detector	Alkáli lángionizációs detektor
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Hivatalos Analitikai Vegyészek Szövetsége
APCI	Athmospheric-pressure chemical ionization	Légköri nyomású kémiai ionizáció
ATP	Adenosine triphosphate	Adenozin trifoszfát
CAS	Chemical Abstracts Service	-
CE	Collision energy	Ütközési energia
CECD	Coulson electrolytic conductivity detector	Coulson elektromos vezetőképességen alapuló detektor
CEP	Collision cell entrance potential	Ütközési cella belépő feszültség
CRM	Certified Reference Material	Hiteles anyags minta
CXP	Collision cell exit potential	Ütközési cella kilépő feszültség
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane	Dikloro-difenil-triklóretán
DEPC	Diethylpyrocarbonate	Dietil-pirokarbonát
DP	Declustering potential	Klasztermentesítő feszültség
EC	Ethyl-carbamate	Etil-karbamát
ECD	Electron capture detection	Elektron befogásos detektálás
EFSA	European Food Safety Authority	Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal
EP	Entrance potential	Belépő feszültség
ESI	Electrospray ionization	Elektroporlasztásos ionizáció
FD	Fluorescence detection	Fluoreszcens detektálás
FDA	Food and Drug Administration	Élelmiszer és Gyógyszer Igazgatóság
FID	Flame ionization detection	Lángionizációs detektálás
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia
FPD	Flame photometric detection	Lángfotometriás detektálás
GC	Gas chromatography	Gázkromatográfia
HPLC	High performance liquid chromatography	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
HPLC-EC	HPLC-Electrochemical detection	HPLC-elektrokémiai detektor
HRMS	High resolution mass spectrometry	Nagy felbontású tömegspektrometria
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Alap és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója
LDL	Low Density Lipoprotein	Alacsony sűrűségű lipoprotein
LOD	Limit of Detection	Kimutatási határ
LOQ	Limit of Quantitation	Mennyiségi meghatározási határ
LRM	Laboratory Reference Material	Laboratóriumi referencia minta
MRM	Multiple reaction monitoring	Többszörös átmenet pásztázás
MS	Mass spectrometry	Tömegspektrometria
MS/MS; MS ⁿ	Tandem mass spectrometry	Tandem tömegspektrometria
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nikotinamid-adenin-denukleotid
NAT	-	Nemzeti Akkreditáló Testület

NPD	Nitrogen phosphorus detection	Nitrogén-foszfor detektálás
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Poli-tetrafluoroetilén (teflon)
QTOF	Quadrupole-Time-of-flight	Kvadrupol-repülési idő hibrid tandem-MS
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals	Kémiai anyagok nyilvántartása, értékelése, engedélyezése és korlátozása
RP	Reversed-phase	Fordított fázisú
SIM	Selected Ion Monitoring	Kiválasztott ion figyelés
SPE	Solid phase extraction	Szilárd fázisú extrakció
SPME	Solid phase microextraction	Szilárd fázisú mikroextrakció
TEA	Thermal Energy Analyzer	Hőenergia analízátor
TSD	Thermionic Specific Detector	Termikus emisszió alapuló detektor
UV	Ultra Violet	Ultraibolya
VIS	Visible	Látható
XBC	Xanthyl-buthyl-carbamate	Xantil-butil-karbamát
XEC	Xanthyl-ethyl-carbamate	Xantil-etil-karbamát

2. BEVEZETÉS

A Scopus adatbázis szerint a „high-speed liquid”, „high-pressure liquid”, „high-performance liquid”, „HPLC” és a „chromatographic”/„chromatography” szavakat-kifejezéseket tartalmazó és nem gázkromatográfiai rendszerre utaló közlemények száma 1966-1973 között megközelítette a kétszázat: egész pontosan 190 találatról van szó, amelyekből egyébként egyetlen egy sem származik az akkori szocialista országokból. A keresést azért zártuk le az 1973-as dátummal, mert ebben az évben jelent meg a Scopus adatai szerint először olyan élelmiszer-analitikai közlemény, amely HPLC műszer használatára épített: a szerzők on-line UV detektálással (Molyneux és Wong, 1973) sörből humulon-származékokat mutattak ki ill. azonosítottak.

Bár az adatbázis közel egy évtizednyi különbséget mutat ki az általános célú HPLC vizsgálatok és az élelmiszer-mátrix, mint halmazok metszete szerint, az élelmiszer-analitika valójában sosem maradt le a modern műszeres eljárások alkalmazása terén. Arról van inkább szó, hogy a rutin élelmiszer-analitikát nagyobb mértékben kötötte gúzsba a rendelkezésre álló szabványok használatának „édes” kényszere, mint a K+F feladattal megbízott, legtöbbször a gyógyszeriparnak dolgozó kutatókat.

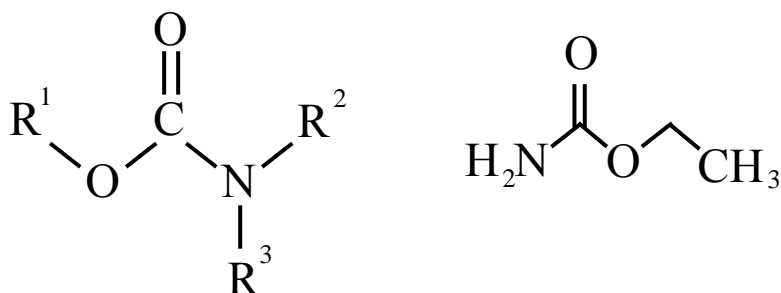
2014-re természetesen teljesen más nagyságrendek és trendek jellemzők. Évente több ezer, élelmiszerrel kapcsolatos HPLC eljárást publikálnak a Scopus kimutatásai szerint. A NAT adatbázisa több száz akkreditált HPLC módszert sorol fel a hazai laboratóriumok eszköztárában, míg a Magyar Szabványügyi Testület honlapján 33 hatályos HPLC alapú MSZ szabvány érhető el, melyek egy része már nem csupán tömegspektrometriai, hanem deuterált belső standard használatára épít. Mindez azt jelenti, hogy a HPLC – és kifejezetten a HPLC-(ESI)-MS is – megkerülhetlenné vált mind a rutin élelmiszeranalitikai mérések, mind pedig a módszerfejlesztések területén.

PhD értekezésemben HPLC-ESI-MS technikára épített, korábban az adott (élelmiszer)mátrixokra ilyen eljárással nem vizsgált célkomponensek mennyiségi meghatározását célzó módszereket dolgoztam ki. A célkomponensek, az etil-karbamát és a redukált/oxidált ubikinon szinte minden szempontból különböznek egymástól – ami összekötötte őket, az a standard addíciós kalibrációra épített, szelektív mérésre alkalmas, a későbbiekben NAT által akkreditált szintű HPLC-ESI-MS metodika.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A KARBAMÁTOK

Mindennapi élelmiszereink nyomokban számos karcinogén vegyületet tartalmazhatnak, és ezen élelmiszerek gyakori fogyasztása szerepet játszhat egészségünk károsodásában. Ezen toxikus vegyületek közé tartoznak egyes karbamátok is. A karbamátok szerves vegyületek, a karbaminsav (NH_2COOH) származékai. A karbamátcsoport, az észterek (mint az etil-karbamát) és a karbaminsavak szerkezetileg összefüggő funkciós csoportok, és kémiai is gyakran átalakulnak egymásba. A karbamát észtereket uretánoknak is nevezik.



1. ábra: A karbamátok általános kémiai szerkezete és az etil-karbamát

A karbamátban két oxigénatom található (1. ábra), melyek bármelyike vagy mindkettő kicserélhető kénatomra. Abban az esetben, ha egy oxigént helyettesít egy kénatom tiokarbamátokról beszélünk, ha mindkettőt, akkor az $\text{R}_1\text{-SC(=S)-NR}_2\text{R}_3$ általános képletű ditiokarbamátokról. Az előzőeknek két különböző típusú szerkezeti izomerje van. Az *O*-tiokarbamátok, $\text{R}_1\text{-OC(=S)-NR}_2\text{R}_3$, melyekben a karbonilcsoportot (C=O) tiokarbonilcsoport (C=S) helyettesíti, ill. az *S*-tiokarbamátok, $\text{R}_1\text{-SC(=O)-NR}_2\text{R}_3$, melyekben az R-O- csoport helyett R-S- csoport található. Az *O*-tiokarbamátok izomerizációs reakcióban, például a Newman-Kwart átrendeződés során átalakulhatnak *S*-tiokarbamáttá.

A karbamát vegyületeket eredet szempontjából két nagy csoportba, a mesterséges és természetes eredetű karbamátok közé sorolhatjuk. A nem polimer típusú, élelmiszeranalitikailag releváns mesterséges karbamátok felhasználás szerinti főbb alcsoportjai a következők:

- növényvédőszer (pesticid/inszekticid)

A karbamát típusú inszekticid mélyhatású szerek, amelyek a növénybe néhány mm, esetleg cm mélységig hatolnak be, de a növény más részeibe nem jutnak át. Általános képletük: $\text{R}_1\text{-OC(=O)-NR}_2\text{R}_3$; R_1 jellemzően fenil, míg R_2 és R_3 hidrogénnel vagy egyszerűbb szerves csoporttal szubsztituált. Közéjük tartozik több, az EU-ban engedélyezett (aldicarb, fenoxycarb, oxamyl) és betiltott (alanycarb, carbofuran, ethiofencarb, fenobucarb) hatóanyag is. Ezek az

inszekticidek a rovarokat az acetilkolin-észteráz reverzibilis inaktiválásával pusztítják el (Metcalf, 2002).

- gyomirtószer (herbicidek)

A karbamát herbicideket szerkezetük alapján egy fő (karbamátok; asulam, karbutilate) és egy alcsoportra (karbanilátok; barban, chlorpropham) oszthatjuk. Szelektív hatású gyomirtó szerek: egyes kultúrnövények detoxikáló mechanizmusuk révén képesek tolerálni a permetezéssel kijuttatott mennyiséget.

Karbamátok a természetben, biokémiai úton is keletkeznek. A dezoxihemoglobin α - és β -láncában levő valin aminosav maradékának N-terminális aminocsoportjai karbamátok formájában találhatók. Ezek segítik a fehérje stabilizálását a dezoxihemoglobinná alakulás során és növelik a fehérjéhez kötött maradék oxigénmolekulák felszabadulásának valószínűségét. Ezen karbamátcsoportoknak a hemoglobin O_2 iránti affinitására kifejtett hatását Bohr-effektusnak nevezik. Az ureázok és foszfortriészterázok lizin aminosav maradékának ϵ -aminocsoportjai is karbamát alakjában fordulnak elő. Az aminoimidazolból származó karbamát az inozin bioszintézisének közterméke. (Bartoschek et al., 2001).

3.1.1. Az etil-karbamát

3.1.1.1. Az etil-karbamát általános jellemzői

Az etil-karbamát (uretán) az R_1 alkil-csoport homológ sorában a második legrövidebb karbamát a metil-karbamát után. Az etil-karbamát szagtalan, színtelen kristály, nagy tisztaságban labdacsok vagy fehér, szemcsés por formájában található meg. Hevítésre vagy égetésre bomlik, mérgező gázokat (nitrogén-oxidokat) fejlesztve. Alapvető fizikai és kémiai tulajdonságait az 1. táblázat ismerteti – ezek közül élelmiszeranalitikai oldalról kiemelendő a vízben mutatott jó oldékonysága, a gázkromatográfiai szempontból előnyös forráspontja, ill. az, hogy heteroatomot nem tartalmaz, így tömegspektrometriás izotopológ-eloszlása nem jellegzetes.

Oldhatósága vízben 1 g/0,5 ml; etanolban 1 g/0,8 ml; kloroformban 1 g/0,9 ml; éterben 1 g/1,5 ml; glicerolban 1 g/2,5 ml; olívaolajban pedig 1 g/32 ml.

Az etil-karbamát kereskedelmi alkalmazására számos példát említhetünk, ide tartozik a különböző amino gyanták előkészítése, amelyeket koszolvensként használnak a növényvédő- és gyógyszeripari cégek, illetve a textiliparban mint kémiai köztesanyag, amely a mosási és viselési tulajdonságokat befolyásolja. Orvosi vonatkozásban korábban antineoplasztikus szerek hatóanyagaként (Paterson és Haddow, 1946) és többszörös myeloma kezeléseknél (Holland et al., 1966) alkalmazták, valamint embereknél hipnotikus szerként, laboratóriumi állatoknál pedig érzéstelenítőként (University of

California, 2003). Az 1940-es években nyilvánították toxikusnak, míg rákkeltőnek 1943-ban (Nettleship et al. 1943, Haddow és Sexton 1946).

1. táblázat: Az etil-karbamát főbb tulajdonságai

IUPAC név	Etil-karbamát
Elemi összetétel	C ₃ H ₇ NO ₂
Moláris tömeg	89,093
Monoizotópos tömeg	89,04767
CAS szám	51-79-6
Forráspont (légtörny nyomáson)	182-184 °C
Olvadáspont	48-50 °C
Relatív sűrűség	1,1
Oldékonyság vízben	0,48 g/cm ³
Gőznyomás	78 °C-on 1,3 kPa
Relatív gőzsűrűség	3,07
Lobbanáspont	92 °C

Az etil-karbamát mesterséges előállítása ammónia és etil-kloroformát reakciójával vagy hő hatására karbamid nitrátból és etanolból történik.

3.1.1.2. Az etil-karbamát előfordulása és képződése élelmiszerekben

Az etil-karbamátnak biotikus és abiotikus képződési útvonala is ismert, amelyek magában az érintett élelmiszerben vagy az annak alapanyagául szolgáló kiindulási termékekben eredményezik az etil-karbamát kialakulását. A biotikus útvonal legfontosabb prekürzora a karbamid, amely fermentált termékekben képződik, elsősorban az élesztők és egyes penészek (fermentált szójaszószok esetén az *Aspergillus oryzae*) arginin bontó tevékenységéből, ornitinnel együtt. Mustok erjesztése során jó nitrogén ellátottság esetén a felesleges karbamid egy része kiürül az élesztősejtéből, és a mustok ill. borok savas kémhatásán az etil-alkohollal etil-karbamát alakul ki. Relatív nitrogénhiány esetén az élesztők a karbamidot ismét felveszik, és ammóniává alakítva felhasználják, így jelentős etil-karbamát képződés csak akkor megy végbe, ha a must feleslegben tartalmaz könnyen asszimilálható nitrogént (Eperjesi et al., 1998, Granchi et al., 1998; Henschke és Ough, 1991; Ingledew et al., 1987; Kodama és Yotsuzuka, 1994; Liu et al., 1994; Orduna et al., 2001; Monteiro et al., 1989; Ough et al., 1988; Ough et al., 1990; Tegmo-Larsson et al., 1989). Továbbá azt is kimutatták, hogy fizikokémiai tényezők is befolyásolják képződését, mint például a tárolás és a kor. Mindazonáltal, a karbamid-ciklusban szerepet játszó citrullin mennyisége is hozzájárulhat a megnövekedett etil-karbamát szinthez.

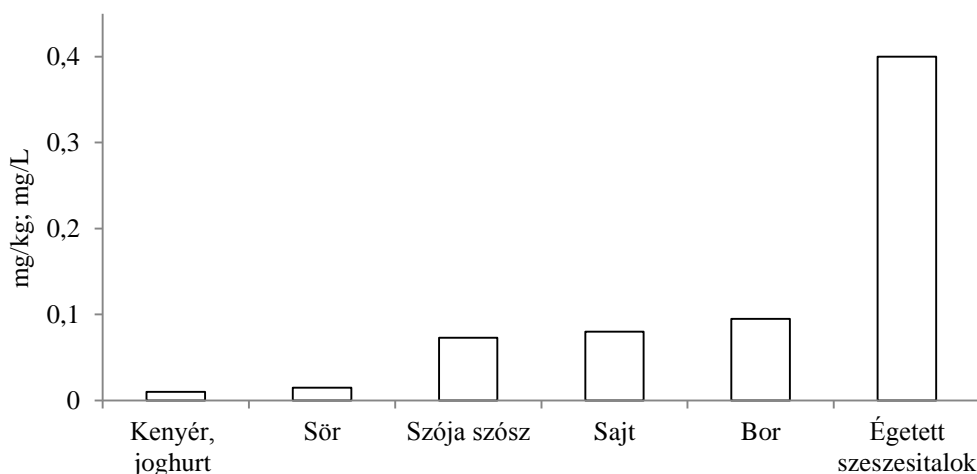
A hagyományosan (tehát nem savas hidrolízissel) előállított szójaszós 6-8 hónapig tartó fermentációja során 1-5 v/v% etanol is képződik, így ennél a folyékony halmazállapotú terméknel is minden prekursor adott az etil-karbamát kialakulásához.

Egyes tejsavbaktériumok képesek arra, hogy argininből citrullint és karbamoil-foszfátot hozzanak létre. Mivel savas közegben mindkettő reakcióba lép etanollal, az élesztő nélküli fermentációs folyamatok is felelősek lehetnek az etil-karbamát képződéséért. (Masque et al., 2011, Arena et al., 1999).

Az abiotikus útvonal nem igényli sejtek jelenlétét: a korábban kialakult prekursorokból, akár steril rendszerben is, feltehetően egyensúlyi folyamat révén etil-alkoholos közegben etil-karbamát keletkezik karbamidból vagy hidrogén-cianátból (Battaglia et al., 1990; Aresta et al. 2001). A reakció nagyobb hőmérsékleten gyorsabban zajlik le, így pl. égetett szeszekben az etil-karbamát mennyisége jóval nagyobb, mint borokban. Ez az abiotikus útvonal érhető tetten a csonthéjas gyümölcsből készült desztillátumokban, ahol az etil-karbamát a magvakban természetes módon előforduló cianogén-glikozidokból képződhet (Taki et al., 1992, Mackenzie et al. 1990). A gyümölcs összezúzása során a magvak összetörhetnek, és a belőlük felszabaduló cianogén-glikozidok reakcióba léphetnek a gyümölcspépben található enzimekkel, így hidrocianidsav szabadul fel. Fény hatására a cianid cianáttá oxidálódik, amely az etanollal reakcióba lépve etil-karbamátot képez. Amennyiben a reakció elkezdődött, a folyamatot már nem lehet leállítani akkor sem, ha a termék steril. Fontos kiemelni, hogy a cefre hosszabb tárolása során hidrocianidsav az ép magvakból is felszabadulhat, így az etil-karbamát képződése szempontjából a csonthéjas gyümölcsök magjának szerepe megkérdőjelezhetetlen.

3.1.1.3. Az etil-karbamát mennyisége élelmiszerekben

A 2. ábra az etil-karbamát tartalom szempontjából legfontosabb élelmiszereket mutatja (Hasnip et al., 2007; Lachenmeier et al., 2005b; EFSA 2007). Jellemző, hogy az etil-karbamátot legnagyobb mennyiségben tartalmazó két élelmiszercsoport, a borok és az égetett szeszesitalok alapvető tulajdonsága a hosszú abiotikus periódus (hónapokig-évekig tartó tárolás és érlelés), míg a fermentált szójaszós és a malátából készült italok (főként a sörök) esetében a biotikus képződési út játszik fontosabb szerepet. A tejtermékeknél és kenyérféléknél egyrészt az etanol 1 v/v % alatti mennyisége, másrészt szilárd halmazállapot esetén a folyadékközeg hiánya miatt nem jöhet létre nagy etil-karbamát koncentráció.



2. ábra: Különböző élelmiszerek átlagos etil-karbamát tartalma (Hasnip et al., 2007; Lachenmeier et al., 2005b; EFSA 2007 nyomán)

Toxikológiai oldalról a tejtermékek és a kenyér etil-karbamát szintje nem számottevő (Haddon et al., 1994; Lee 2013). A becsült napi bevétel egy átlagos, 60 kg tömegű, alkoholt rendszeresen nem fogyasztó emberre számítva 17 ng/ttkg/nap. Különböző alkoholos italokat fogyasztó felnőtteknél 65 ng/ttkg/nap, illetve azoknál, akik gyümölcspárlatokat nagy mennyiségben fogyasztanak, 558 ng/ttkg/nap (EFSA, 2007).

A fermentált szójaszósz egyes távol-keleti országok esetében számít jelentős etil-karbamát forrásnak: Japánban például az egy főre jutó szójaszósz fogyasztás (kb. 10 liter/fő/év) nagyjából kétszerese a jellegzetes szaké italnak, így érthető, hogy napjainkban mindkét termék esetén számottevő erőfeszítéseket tesznek a etil-karbamát szintjének csökkentése érdekében. Dél-Koreában is nagy hangsúlyt fektetnek az etil-karbamát meghatározására fermentált élelmiszerekből. A különböző szójaszószokban mért mennyisége tág határok közt mozog, a nem kimutathatótól a 240 µg/kg-ig (Lee 2013; Lim és Lee, 2011). A hagyományos kínai „sufu”, illetve ennek a vörös változata, a „red sufu”, amelyet szintén fermentációval állítanak elő szójából, ugyancsak jelentős etil-karbamát forrás. A „red sufu”, köszönhetően az előállítás során alkalmazott mikrobáknak, több, 182 µg/kg mennyiséget tartalmaz, míg a sufu 63 µg/kg-t (Wu et al., 2012; Wang és Yen, 1998).

Köszönhetően annak, hogy az etil-karbamát mennyisége a legtöbb élelmiszerben és szeszes italban alacsony, nem jelent humán egészségügyi kockázatot (EFSA 2007; Vavasour et al., 2006). Égetett szeszekben mennyisége viszont tág határok között változik. Az első dokumentált vizsgálatot alkoholos italból 1985-ben végezték, amelynek során egy importált szeszes italban Kanadában nagy mennyiségű etil-karbamátot találtak (Conacher és Page, 1986). Madrera és Valles 2008-ban végzett kutatásában a vizsgált égetett szesz minták etil-karbamát tartalma 3,56-67 µg/l között mozgott (Madrera et al., 2009).

Számos tanulmány született a nádcukor etil-karbamát tartalmának meghatározásáról. Barcelos et al. 2007-ben különböző termőterületről származó cukornádat vizsgáltak, LOD értéktől kezdve 700 µg/l értékig terjedő tartományban kaptak eredményeket, átlagosan 243 µg/l-t (Barcelos et al., 2007). Erjesztett nádcukorból készült párlatot tanulmányoztak Machado és kollégái 2013-ban. A cachaça vizsgálata során fluoreszcens detektálást alkalmazva 25-35 µg/l koncentrációt mutattak ki az egyes mintákból (Machado et al., 2013).

A kutatások során számos alkohol tartalmú italból 15 µg/l és 12 µg/ml közötti mennyiséget mutattak ki. Borokban az etil-karbamát általában 10 és 50 µg/l közötti koncentrációban található meg (Canas et al., 1994; Vahl, 1993). Magasabb értékeket főleg rizsből és bogyós gyümölcsből készült borokban mértek (Jagerdeo et al., 2002).

Az 1970-s években, az etil-karbamát keletkezésének korai vizsgálati szakaszában nagy figyelmet szenteltek a Boycovin fantázianevű, DEPC tartalmú mikrobiológiai terméknek, amelyet a romlás megelőzésére adagolnak az édes borokba. Ennek a terméknek az ammónium ionok hatására beinduló lassú reakciója borban etil-karbamátot képez, így használatát a továbbiakban nem javasolták (Ough, 19761).

Egy 2001-ben Baden-Württembergben végzett kísérletsorozat volt az első, amely szisztematikus gyártástechnológiai megközelítéssel nyomon követte a csonthéjas gyümölcsökből készülő párlatok etil-karbamát tartalmának alakulását (Weltring et al., 2006). A különböző gyümölcsfajták párlataira vonatkozó vizsgálatokat kisüzemi főzdekben végezték a következő paraméterek figyelembe vételével: gyümölcs fajtája és minősége, a magok állapota a cefrőzés során, tisztítási mellékfolyamatok lefutása, rézkatalizátor használata a desztilláció során, végpárlat készítés időpontja, utóbepároló alkalmazása és a késztermék raktározása. Az adatok kiértékelése után megállapították, hogy azokban a párlatokban, ahol a desztilláció során rézkatalizátort alkalmaztak, az etil-karbamát tartalom lényegesen kisebb volt, mint a katalizátor nélküli desztilláció során készült párlatokban. Megfigyelték azt is, hogy a párlatok különböző alkoholtartalma is befolyásolja az etil-karbamát mennyiségét. A 40 % alatti alkoholtartalmú párlatok etil-karbamát tartalma volt a legnagyobb, míg a 45 %, 50 % és 50 % feletti alkoholtartalom alacsonyabb mennyiséget eredményezett. A raktározás körülményeinek vizsgálata során arra a következtetésre jutottak, hogy a sötét helyen tárolt párlatok kisebb etil-karbamát tartalommal rendelkeztek.

Magyarországról – eltekintve a „szürke irodalomtól” – csak 2009-ben jelent meg az első, korántsem széleskörű felmérés, amelyben a vizsgált 14 szeszesitalból háromban mutattak ki 0,21-0,22 mg/l etil-karbamát koncentrációt (Lachenmeier et al., 2009). Az azt megelőző időszakban csupán konferenciák szintjén került elő az etil-karbamát problémája, és végül 2013-ban publikálták a korábbi eredményekre is építő kutatási eredményeket (Ajtony et al., 2013).

Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal különböző alkoholos italokban vizsgálta az etil-karbamát koncentrációját (EFSA, 2007). 3244 db csonthéjas gyümölcsből készült párlat minta vizsgálata során 2912 esetben találtak etil-karbamátot kimutatási határ felett az italokban. Az átlagos érték 0,85 mg/l-nek adódott, de találtak olyan mintát is, amely 22 mg/l-t tartalmazott ebből a vegyületből. A mért értékek mediánja az átlagnál jelentősen kisebb, 0,33 mg/l lett, ami nem egyenletes mintaeloszlásra és számos, az átlagot megemelő, kiugró koncentrációjú mintára utal.

3.1.1.4. Az etil-karbamát humán élettani hatása

Az etil-karbamát az emberi szervezetbe élelmiszereken keresztül, tipikusan vízben/alkoholban oldva, vagy ritkább esetben aeroszoljának belégzésével és lenyelésével juthat be. Káros hatással lehet a központi idegrendszerre és a májra rövid idejű behatás esetén, míg hosszantartó vagy ismételt expozíció következtében a csontvelőre, a vesére, a szemre és az immunrendszerre is. Teratogén és karcinogén, lehetséges mutagén, állatokra nézve karcinogén. Bőrrel érintkezve irritációt okozhat. *In vitro* és *in vivo* genotoxikus, a DNS-sel kovalens kötést létesít. Mivel természetes, nyomokban fellelhető összetevője a fermentált élelmiszereknek, alkoholos italoknak és az égetett szeszeknek, az emberi szervezetre gyakorolt napi terhelését becsülni kell. Zimmerli és munkatársai kutatásai alapján normál étkezés mellett, beleértve alkoholos italok fogyasztását is, az elkerülhetetlen napi bevitt 10-20 ng/ttkg értékre számította ki (Zimmerli és Schlatter, 1991). Bár a toxicitási adatok kiértékelése és a hagyományos kockázatkezelési módszer is azt mutatja, hogy a daganatos megbetegedésekben játszott szerepe elhanyagolható (< 0,0001%), egyéni fogyasztási szokások megemelhették a kockázatot. Ide tartoznak a rendszeres borfogyasztók, mivel napi 0,5 L bor elfogyasztása ötszörösére emeli a rizikófaktort, míg az égetett szesz kedvelőinek (>20-40 ml/nap fogyasztás) közel 0,01%-ra emelkedik a feltételezett daganat kockázata. A karcinogén vegyületeknek való humán kitettséget, amennyire csak lehetséges, természetesen csökkenteni kell, amit jogi szabályozás révén lehet részben megoldani.

3.1.1.5. Élelmiszerek etil-karbamát tartalmára vonatkozó jogi szabályozás

1970 és 1980 között egyes alkoholos italokban (főként desztillátumokban és brandy-kben) kimutatott magas etil-karbamát szint Kanadában aggodalomra adott okot, hiszen ekkorra már ismert volt a vegyület egészségre káros hatása. A válaszképpen hozott kanadai törvényhozás értelmében az etil-karbamát szintje a különböző szeszes italokban nem haladhatja meg típustól függően a 30-400 µg/l-t – a két szélső érték a nagy mennyiségben fogyasztott asztali borokra (30 µg/l) és a likőrökre (400 µg/l) lett megállapítva (Health Canada 2012).

1985-ben az FDA saját szabályozást készített, és egy ideig szigorúan ellenőrizték az importot és a borelőállítást is. Ennek részeként 1988-ban az FDA tervet fogadott el az etil-karbamát csökkentésére asztali és desszertborokban és ezt ismertette az Amerikai Borszövetséggel (US FDA, 1988). A megállapodás alapján az 1988 után készült asztali borokban ($\leq 14^\circ$ alkohol) az etil-karbamát átlagos szintje nem haladhatja meg a $15 \mu\text{g/l}$ -t, míg desszert borokban ($\geq 14^\circ$ alkohol) a $60 \mu\text{g/l}$ értéket.

Az Európai Unióban egy, az EFSA által 2007-ben kiadott tanulmányra alapozva kezdték el vizsgálni az etil-karbamát mennyiségét a különböző szeszes italokban és párlatokban, figyelembe véve, hogy az EU területén Csehországban, Franciaországban és Németországban már korábban hatályos korlátozások léteztek $30\text{-}1000 \mu\text{g/l}$ közötti értékekkel, italtól függően (EFSA, 2007). Ezt követően az Európai Unió 2010. március 2-án ajánlást fogadott el a csonthéjas gyümölcsből készült párlatokban és csonthéjas gyümölcsből készült törkölypárlatokban az etil-karbamát szennyeződés megelőzéséről és csökkentéséről, valamint az ilyen italokban előforduló etil-karbamát szintjének ellenőrzéséről (2010/133/EU). Ennek háttérében az állt, hogy az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA) szennyező anyagokkal foglalkozó tudományos testülete expozíciós határértéket állapított meg élelmiszerekben és italokban előforduló etil-karbamátról és hidrocianidról (hidrogén-cianid). Mivel az etil-karbamát erősen toxikus, és a csonthéjas gyümölcsökből készült párlatokban prekursora a hidrogén-cianid, az EFSA kockázatsökkentő intézkedések bevezetését javasolta a tagállamok részére:

„A szeszes italok meghatározásáról, megnevezéséről, kiszereléséről, címkézéséről és földrajzi árujelzőinek oltalmáról, valamint az 1576/89/EK tanácsi rendelet hatályon kívül helyezéséről szóló, 2008. január 15-i 110/2008/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet meghatározza a csonthéjas gyümölcsökből készült párlatokban és törkölypárlatokban előforduló hidrogén-cianid maximális mennyiségét. E rendelet értelmében a csonthéjas gyümölcsökből készült párlatokban és törkölypárlatokban a hidrogén-cianid-tartalom nem haladhatja meg a 7 g/hl -t abszolút alkoholra vonatkoztatva (70 mg/l). A csonthéjas gyümölcsből készült párlatokban és csonthéjas gyümölcsből készült törkölypárlatokban az etil-karbamát-szennyeződés megelőzésére és szintjének csökkentésére szolgáló eljárási szabályzat megfelelő eszköznek tekinthető az EFSA ajánlásainak megvalósításához. A szabályzat helyes gyártási eljárásokat javasol, amelyek alkalmazásával az etil-karbamát mennyisége bizonyítottan csökkenthető. A helyes gyártási eljárások alkalmazásával realisztikus és megvalósítható célérték, hogy a fogyasztásra kész párlatokban az etil-karbamát szintje 1 mg/l legyen. A csonthéjas gyümölcsből készült párlatokban és csonthéjas gyümölcsből készült törkölypárlatokban előforduló etil-karbamát szintjét három éven át ellenőrizni kell, majd az ellenőrzés eredményeit fel kell használni az eljárási szabályzat hároméves alkalmazása során

kifejtett hatásainak értékelésére. Ezenkívül meg kell vizsgálni maximális szint meghatározásának a lehetőségét” (2010/133/EU).

Miután 2010-ben kiadták a javaslatot a megengedhető legnagyobb mennyiségről, elkészítették a nyomon követési űrlapot, 2010-2011-2012 során adatokat gyűjtöttek, 2014-ben pedig kiértékeltek (EFSA, 2014). Ez utóbbi jelentés szerint az EU tagállamaiból csak 11 szolgáltatott eredményeket, és ezek közül Magyarország csupán 2011-ben tett eleget a felszólításnak, alig 22 mérési adattal, amely az összes adatnak (2399) még az 1%-át sem érte el. Bár a gyűjtött adatok messze nem reprezentálták az EU-t sem a fogyasztás szerkezete, sem pedig a lakosság eloszlása szempontjából /jellemző, hogy az eredmények 19%-a Ausztriából származik/, az EFSA végül azzal zárta a felmérést, hogy etil-karbamát szintje jellemzően 1 mg/l maradt a vizsgált időszakban, így külön beavatkozásra nincs szükség.

3.2. A PÁLINKA

A pálinka az erjesztett gyümölcsök lepárlásával készülő gyümölcspárlatok egy hagyományos, magyar fajtája. A magyar pálinka 2002 óta eredetvédett hungarikum, ez nagyban hozzájárult ahhoz, hogy a boltok polcain a kommersz termékeket felváltották a tisztán gyümölcsből készült minőségi termékek. A szabályozás szerint annak hatályba lépése óta pálinka elnevezéssel csak a kizárólag Magyarországon termelt és termelt gyümölcs felhasználásával készült, hazánkban cefrézett, párolt, érlelt és palackozott italt lehet illetni. Nem tartalmazhat semmilyen hozzáadott anyagot, így cukrot, ízesítőt és színezéket sem. Az Európai Unió jogszabályoknak (Council Regulation (EEC) No 1576/89) megfelelően a "pálinka" szót csak Magyarország és négy osztrák tartomány használhatja. A leggyakrabban alapanyagként használt gyümölcsök a szilva, körte, alma, kajszibarack, cseresznye és a szőlőtörköly, de bármilyen gyümölcsből készülhet. A 2008. évi LXXIII. törvény rendelkezik a pálinka elkészítéséről. Ez alapján csak azok a termékek nevezhetők pálinkának, melyek:

- Magyarországon termelt gyümölcsből, vagy szőlőtörkölyből készülnek;
- 100%-os gyümölcstartalmúak, azaz sem egyéb alkoholt, sem pedig színező-, ízesítő- vagy édesítőanyagot nem tartalmaznak;
- minimum 37,5%-os alkoholfokkal rendelkeznek.

2010. szeptember 27-én életbe lépett törvénymódosítás eredményeként magánszemélyek is birtokolhatnak szeszfőző berendezést, illetve saját részre főzhetnek azzal különböző (szőlőbor-, szőlőseprő-, szőlőtörköly- és gyümölcs-) párlatokat, ennek értelmében tehát pálinkát is. A Jövedéki Törvény főbb pontjai: a lefőzendő cefre készülhet saját vagy vásárolt gyümölcsből; a birtokolt

berendezés űrtartalma nem haladhatja meg a 100 liter térfogatot, amelyet bejelentési kötelezettség nem terhel; az adómentesen lefőzhető mennyiség 50 liter 86°-os párlat.

A törvénymódosítás eredményeképpen 2010 után jelentősen megnőtt a pálinkával foglalkozó vállalkozások száma. Mivel a termékek minősége erősen változó, ezért 2011-ben iparági és egyetemi együttműködés keretében bevezették a Pálinkavédjegyet. A Pálinkavédjeggyel ellátott palackokban laboratóriumi és érzékszervi vizsgálatokkal ellenőrzött minőségű pálinka került töltésre. A laboratóriumi vizsgálatok során elemzik többek között az alkohol-, a metanol-, a hidrogén-cianid tartalmat, és csonthéjas gyümölcsből származó pálinkák esetében az etil-karbamát tartalmat is. Érdekes elgondolkodni ugyanakkor azon, hogy figyelembe véve a csak az ezen védjeggyel ellátott, tehát etil-karbamátra biztosan bevizsgált honi pálinkák (>50) számát, mi állhatott a 2010-től számított hazai minőségi „pálinkaforradalom” lendületéhez képest elenyésző mértékű, az EFSA számára 2010-2012 között szolgáltatott mérési adat mögött.

3.2.1 A pálinkakészítés folyamata

A pálinkafőzés erjesztésből, a lepárlásból és az érlelésből áll, mindezt pedig megelőzi a gyümölcsfeldolgozás többlépcsős folyamata. Ez utóbbinak része a gyümölcs válogatása, mosása, aprítása, magozása, enzimes kezelése (pektinbontás), majd a pH beállítása 2,8–3,2 közé kénsavval vagy foszforsavval. A pálinka kizárólag érett, egészséges és engedélyezett gyümölcsből készülhet – a pontos feltételeket az országgyűlés által elfogadott 2008. évi LXXIII. törvény („Pálinkatörvény”) szabályozza.

A gyümölcsfeldolgozást követő erjedés olyan biokémiai folyamat, amelyeket különböző élesztőtörzsek által termelt enzimek katalizálnak. A cefréhez általában fajlesztőt adnak, amely biztosítja az erjedés megindulását és egyenletes lefolyását. A kierjedt cefre vizet, alkoholt, valamint szilárd és oldott anyagokat tartalmaz. Illóanyag a víz, az etil-alkohol, valamint különböző kellemes és kellemetlen aromájú szerves vegyületek, a metil-alkohol, az aldehidek, a kozmaolajok, a szerves savak, az észterek és egyéb aromaanyagok.

A lepárlás pálinkakészítés egyik legfontosabb lépése, amely során az erjesztett cefréből elkülönítik az illóanyagokat a szilárd és nem illó anyagoktól. Az erjedt cefrét előmelegített tartályokba fejtik, majd a vörösrézről vagy rozsdamentes acélból készült üstökben lepárolják. A pálinka desztillálása során a középpárlatot, vagyis a legértékesebb, ún. „le coeur” részt használják fel. A középpárlat megfelelő elválasztása az elő- és utópárlattól megfelelő szaktudást igényel, mivel nagyrészt itt dől el a pálinka minősége. A kisüsti pálinka alkoholtartalmát szigorú előírás szerint ($\pm 0,3 \text{ ‰}$) jó minőségű, ioncserélt vízzel állítják be a forgalomba hozatal előtt.

3.3. MÓDSZEREK ALKOHOLTARTALMÚ ITALOK ETIL-KARBAMÁT TARTALMÁNAK CSÖKKENTÉSÉRE

3.3.1. Karbamid tartalom csökkentés

Mivel az etanol nem csupán a természetes fermentációs folyamatok során, hanem egyes esetekben (pl. szójaszószok) tartósítás céljából külön adagolással is a termékhez kerül, ettől az etil-karbamát termelődése szempontjából fontos prekursorról nem lehet technológiailag megszabadulni. Ebből következik, hogy a legtöbb kísérlet a fermentációban kialakuló karbamid mennyiségének csökkentése irányába mutat, alapvetően három lehetőség kiaknázásával: (a) szőlőfajta-szelekció és megfelelő trágyázás révén történő, közvetett megelőzés; (b) közvetlen karbamid-bontás savas ureáz enzim adagolásával; (c) szelektált élesztő- és penésztörzsek alkalmazása.

Megfelelő tőke vagy fajtaválasztással elkerülhetjük, hogy olyan fajta gyümölcsfák terméséből készítsük el cefrénket, amely gyümölcse N-tartalmú vegyületekben gazdag. Vannak olyan szőlőfajták, amelyek eleve nagy arginin képzők, ezeket célszerű elkerülni.

A másik fontos kérdés a trágyázás módjának kiválasztása. Ugyanakkor sajnos nincs elég adatunk arról, hogy milyen istálló alapú trágyázást vagy karbamid-mentes műtrágyázást érdemes választani abból a célból, hogy a karbamid szint a leszüretelt gyümölcsünkben kicsi legyen. Ugyancsak kevés információval rendelkezünk a bio ültetvényekről származó pálinkák etil-karbamát tartalmát illetően, így fontos lenne összevetni a bio és a konvencionális termesztésből származó eredményeket. Érdemes még megjegyezni, hogy egyéb karbamid forrásként jelentkezhet az ültetvény relatív közelében elhelyezett emésztőgödör, illetve a karbamid tartalmú jégmentesítő adalékok alkalmazása az ültetvények közelében (Ough et al., 1989).

Az ureáz első célzott felhasználását 1989-ben írták le (Kobashi, 1989) *Lactobacillus reuterii* törzsből tisztított enzimmel szaké és bor kezelésére. Ugyancsak egy *Lactobacillus* törzs, a *L. fermentii* szolgált egy másik kutatócsoport ureáz forrásaként sherry etil-karbamát tartalmának csökkentéséhez (Kodama és Yotsuzuka, 1996). Miyagawa és munkatársai 1999-ben szaké kezeléséhez az *Arthrobacter mobilis* talajlakó baktérium által szintetizált, nikkeltartalmú ureáz enzimet tisztítottak ki, amely két hét időtartam alatt a szaké kémhatásán (pH=4,4), 17 v/v% etanoltartalom mellett is képes volt a karbamid mennyiségét kimutatási határ alá csökkenteni, ráadásul a szaké pasztörözési lépése során inaktiválhatónak bizonyult.

A karbamid enzimes úton történő eltávolításának lehetőségét kinetikus modellel Esti és munkatársai írták le 2007-ben, melynek során rövid és hosszú ideig tárolt 2003-as évjáratú borokat vizsgáltak az olaszországi Apulia borvidékről.

Liu és munkatársai kínai rizsbor karbamid tartalmát egy *Enterobacter* törzsből származó savas

ureázal tudták számottevő mértékben lecsökkenteni. A kísérlet során a célenzim aktivitását 1100 és 2504 UL⁻¹ tartományban optimálták a kezdeti glükóz koncentrációra és a reaktor anaerob jellegének emelkedésére, amelyet a CO₂ terhelés növeléssel oldottak meg, illetve *in vitro* természetes aktivitást is optimálták 4 °C-os hideg tárolás során (Liu et al., 2012).

A legmodernebb eljárás az ureáz alkalmazásának területén a rögzített enzimes technológia, amelyet Andrich és munkatársai borok kezelésére ismertettek. A karbamid bomlásának kinetikáját egy modell bor oldatban szabad és rögzített ureáz alkalmazásával vizsgálták (Andrich et al., 2009). A törzsszelekció az ureázos kezeléshez képest még korai fejlesztési stádiumban van.

Kitamoto és munkatársai argináz-enzimaktivitás mentes mutánst állítottak elő egy génmódosított diploid szaké élesztőből. Eredményül azt kapták, hogy a karbamid mentes szaké, amely ezzel a mutánssal készült, sem a melegítés, sem pedig a tárolás után nem tartalmazott kimutatható mértékben etil-karbamátot (Kitamoto et al., 1993).

3.3.2. Hidrogén-cianid tartalom csökkentés pálinkában

Az erjedési folyamat során, a csonthéjas gyümölcsök sérült magjából indulhat meg az etil-karbamát képződése. Minél több hidrogén-cianid van a cefrében, annál több etil-karbamát keletkezhet, amely a lepárlás folyamán bármelyik frakcióban feldúsulhat, és végül átjut a középpárlatba. A lepárlás során az alkoholt lassan kell elpárologtatni, ez megoldható közvetlen láng helyett gőz alkalmazásával. Az első párlatrészt gondosan külön kell választani, míg a középső, úgynevezett középpárlatot össze kell gyűjteni, majd ezt követően sötét helyiségben tárolni. Ha a tartályban a párlat alkoholtartalma eléri az 50%-ot, el kell kezdeni az utópárlat összegyűjtését, hogy az esetlegesen képződő etil-karbamát az utópárlatba kerüljön.

Célszerű lenne a gyümölcsöt minden esetben magozni. Azonban ha nem kellően érett a gyümölcs, a csonthéj teljesen nem szilárdult meg, így a feldolgozás során az éretlen, törékeny mag zúzott formában belekerül a cefrébe és elindul a cianid képződés. Ugyanez történik akkor is, ha érett és sértetlen mag kerül a cefrébe, mivel ekkor az erjedés folyamán, a tárolás során az amigdalin diffúzióját követően történik meg az enzimes lebontás és a cianid keletkezése.

Amennyiben a magzat biztosítása végett szükséges mag a cefrébe, akkor sérülésmentes magot kell néhány százalékból (3-6%) visszajuttatni. A hidrogén-cianid határértéke 70 mg/l (EFSA 2007), ezzel a módszerrel a várható mennyisége 0-5 mg/l között lesz, amelyből kedvezőtlen tárolási körülmények mellett, hosszú idő alatt sem fogja elérni a keletkező etil-karbamát mennyisége az 1 mg/l határértéket.

3.4. ANALITIKAI MÓDSZEREK ETIL-KARBAMÁT TARTALOM MEGHATÁROZÁSÁRA

3.4.1. Etil-karbamát tartalom meghatározása hagyományos (nem tömegspektrometriai detektálású) gázkromatográfiával

Mint ahogy a 1. táblázatban is látható, az etil-karbamát forráspontja lehetővé teszi a származékképzés nélküli gázkromatográfiás meghatározást, ugyanakkor halogén elem hiányában a klasszikus GC elválasztások esetén nagyon jó kimutatási határral rendelkező ECD detektor nem használható. A többi, viszonylag kis költséggel üzemeltethető detektor, mint például a FID, nem mér kellő érzékenységgel, így erre a célkomponensre is kiterjesztett tömegspektrometriai detektálás elterjedése előtt más módszerekre volt szükség.

A legelső, szakirodalomban is leírt gázkromatográfiai eljárást Walker és társai 1974-ben még töltött oszlopos rendszerre dolgozták ki, az azóta feledésbe merült, nitrogéntartalmú vegyületekre használható CECD detektálással. A módszerrel elérhető LOQ érték 100 µg/l-nek adódott, ami – figyelembe véve az EU által javasolt 1 mg/l felső határt – a mai napig is vizsgálatra alkalmas lenne, ha nem társult volna hozzá túl nagy vegyszer- és fogyóeszköz-igény. A Walker-féle eljárásan érdemben csak 1986-ban tudtak javítani, amikor Dennis et al. kapilláris gáz-kromatográfiával, TEA detektálással 1 µg/l kimutatási határt tudtak elérni, azonban a mintaelőkészítés ugyancsak rendkívül munka- és vegyszerigényesnek bizonyult (Dennis et al. 1986). Bailey és munkatársai szintén 1986-ban közölt tanulmánya is egy gázkromatográfiás meghatározáson alapszik. Vizsgálataikban származékképzés után nitrogén-foszfor termoionizációs detektort alkalmaztak. Bár a módszer szelektív lett, de a µg/kg tartományban nem mutatott elég érzékenységet és LOQ értéket az etil-karbamát meghatározásához (Bailey et al., 1986).

3.4.2. GC-MS eljárás származékképzés nélkül

Alkoholos italok etil-karbamát meghatározására 1986 után a szerves oldószeres folyadék-folyadék extrakciót követő GC-MS módszerek terjedtek el leginkább. Szerves extrahálószerként diklórmétánt (Dennis et al. 1986, Clegg et al. 1988) diklórmétán-etilacetát 95:5 v/v % elegyét (Giachetti et al., 1991), ill. dietil-étert (Fauhl et al., 1992) használtak.

Sen és munkatársai (1992) a jobb extrakciós hatásfok elérése érdekében szilárdfázisú oszlopon történő folyadék-folyadék extrakciót alkalmaztak a bor, és egyéb nagy alkoholtartalmú minták előkészítésénél. Bár ezen módszerek kiváló érzékenységgel, kimutatási határral (1-5 µg/kg) ill. megfelelő pontossággal (visszanyerés >80%) rendelkeznek, hátrányként említhető a nagy oldószer- (kb. 200-300 ml/minta) és időigény, valamint az olykor körülményes mintaelőkészítés.

Whiton és Zoeckelin (2002) oldószermentes, és ezzel mintegy környezetbarát, és minimális mintaelőkészítést igénylő szilárdfázisú mikroextrakciós (SPME) GC-MS módszert dolgoztak ki az etil-karbamát gyors meghatározására. Minta hőmérsékletre, extrakciós időre és a headspace mintavételi egység tübevonatára optimalták a paramétereket. A Carbowax/divinilbenzén mintavételi szál 30 perces alkalmazása reprodukálható és lineáris eredményeket adott a 10-80 µg/l-es tartományban, míg az elérhető LOD 9,5 µg/l-nek bizonyult.

A Magyar Borkönyvi gázkromatográfiás módszer (2002) 10-200 µg/l koncentrációban etil-karbamátot tartalmazó borminták vizsgálatára validált. Lényege, hogy belső standardként ismert mennyiségben propil-karbamátot adunk a mintához, az oldatot vízzel hígítjuk, és 50 ml térfogatú szilárd fázisú extrakciós oszlopra visszük. Az etil-karbamátot és a propil-karbamátot diklórmétánnal eluáljuk. Az eluátumot a vákuumban rotadeszt készülékkel töményítjük be, a detektálást tömegspektrometriásan SIM üzemmódban végezzük. A módszer LOQ értéke 0,3 mg/l, ami abból a szempontból aggályos, hogy az általános elvárások alapján az analitikai módszerek LOQ értéke 1 nagyságrenddel kell, hogy kisebb legyen az adott komponensre megengedett értéknél – mindez az EU által szorgalmazott 1 mg/l határértéknél nem teljesül. További nehézséget okoz, hogy a propil-karbamát nem szerezhető be a nagy vegyszergyártó cégek palettájáról (Sigma-Aldrich, Acros, Alfa Aesar).

Érdemes megemlíteni, hogy ugyancsak propil-karbamátos belső standard technikával és SIM detektálással, ám automatizált HS-SPME eljárással a módszer LOQ értéke közel két nagyságrenddel javítható (LOQ=3,96 µg/l) (Liu et al., 2012).

3.4.3. GC-MS módszerek származékképzéssel

Az etil-karbamát polaritásának és illékonyságának csökkentésére Giachetti és mtsai. (1991) az etil-karbamátnak xanthidrollal képzett xantilamid származékát elemezték GC-MS módszerrel. Ezen származékképzéssel az etil-karbamát aktív aminocsoportja által okozott csúcsszélesedés nagymértékben csökkenthető volt, azonban a mintamátrixban lévő, szabad aminocsoportot tartalmazó xantilamid származékok a kromatogramban jelentős interferenciát okozhatnak. A kislebontású GC-MS akár SIM, akár teljes pásztázás („full scan”) üzemmódban való használata során az esetleges mátrix okozta interferenciák elkerülése miatt, különösen kis koncentráció tartományban szükségessé válik egy másik, eltérő polaritású oszlopon történő megerősítő vizsgálat elvégzése is. Nagyfelbontású (HRMS), vagy tandem (MS-MS) tömegspektrometriás detektálással az izobár interferencia lehetősége csökken, ezzel a megerősítő vizsgálatokra nincsen szükség.

Tekintettel arra, hogy az GC-HRMS, vagy GC-MS-MS technikák használata során a mátrix okozta interferenciák akár két nagyságrenddel is csökkenhetnek, a mintaelőkészítési műveletek is nagymértékben leegyszerűsíthetők. Lachenmeier (2005) az etil-karbamát tömegspektrumát

GC-MS-MS tandem tömegspektrometriás módszerrel elemezve, a mintaelőkészítési műveletek egyszerűsítésével csonthéjas gyümölcsök párlatára 10 µg/l-es kimutatási határt és 100 ± 10% visszanyerést ért el.

Lehetőség van etil-karbamát bormintából történő meghatározására egy olyan kombinált módszerrel is, amelyben a töltött oszlopos mikroextrakciós technikát kapcsolják az egydimenziós GC-MS-hez. Łeca és munkatársai különböző tölteteket teszteltek (SIL, C₂, C₈, C₁₈, M1), számos extrakciós oldószert és mátrix hatást is vizsgáltak. A kísérleti adatok azt mutatták, hogy a C₈-diklórmétán párosítás bizonyult a leghatékonyabbnak az etil-karbamát extrakciójára. Jó linearitást és nagy érzékenységet tudtak elérni, a kimutatási határ 1,5µg/l-nek adódott, a mérés precizitása pedig jobb volt, mint 7% (Łeca et al., 2014).

A 2. táblázat összefoglalja a szakirodalomban elérhető, gázkromatográfiás módszerre épített etil-karbamát vizsgálatok LOD értékeit. Látható, hogy a tömegspektrometriai detektálású kapcsolások néhány (pl. a borkönyvi) eljárás kivételével, míg az egyéb rendszerek számottevő része alkalmas a jelenleg elvárt, LOQ=100 µg/l biztosításához a 3 LOD ≈ LOQ elv figyelembe vétele mellett. A GC alapú vizsgálatok valódi szűk keresztmetszete tehát nem a mennyiségi mérések adott paraméterserege, hanem a HPLC-hez képest kevésbé robusztus üzemeltetés és a legtöbb esetben bonyolult és vegyszerigényes mintaelőkészítés.

2. a. táblázat: Gázkromatográfiái alapú etil-karbamát vizsgálati eredmények alkoholos italokból

Minta típusa	Módszer	LOD (µg/l)	Irodalom
Alkoholos italok	GC-ECD	µg/kg	Bailey et al. (1986)
	GC-NPD	20	Baumann és Zimmerli (1986)
	GC-TEA	1	Dennis et al. (1986, 1988)
	GC-ECD	2-5	
	GC-MS	1	
	GC-MS (EI)	100	Bebiolka és Dunkel (1987)
	GC-MS (PCI)	10	
	GC-ECD	5-10	Conacher és Page (1987)
	GC-MS	0,5	
	GC-MS	0,5	Lau et al. (1987)
	GC-MS	10	Mildau et al. (1987)
	GC-TEA	1,5	Canas et al. (1988)
	GC-Ion Trap-MS	5	Clegg et al. (1988)
	GC-MS	2-5	Funch & Lisbjerg (1988)
	GC-FID	10-25	Pierce et al. (1988)
	GC-MS	5	
	GC-TSD (2D)	1	Ma et al. (1995)
	GC-MS	3	Mirzoian és Mabud (2006)
	GC-MS	10	Nagato et al. (2000)
	GC-MS	1	Giachetti et al. (1991)
	GC-MS	(LOQ: 300)	Magyar Borkönyv (2002)

2. b. táblázat: Gázkromatográfiai alapú etil-karbamát vizsgálati eredmények égetett szeszekből és fermentált élelmiszerekből

Minta típusa	Módszer	LOD (µg/l)	Irodalom
Égetett szeszek	GC-NPD	10	Adam és Postel (1987)
	GC-FID	10-20	Andrey (1987)
	GC-FID	50	Drexler és Schmid (1989)
	GC-MS	5	MacNamara et al. (1989)
	GC-MS/MS	10	Lachenmeier et al. (2005/1)
	GC-MS/MS	30	Lachenmeier et al. (2005/2)
	GC-MS/MS	1	Brumley et al. (1988)
	GC-MS (2 dimenziós)	0,1	Jagerdeo et al. (2002)
	GC-MS	9-6	Whiton és Zoeckelin (2002)
	GC-MI/FTIR	10	Mossoba et al. (1988)
	GC-FID	6,7	Wang és Yen (1997)
Fermentált élelmiszerek	GC-MS/MS	0,6	Hamlet et al. (2005)
	GC-MS	0,5	Hasegawa et al. (1990)
	GC-MS	11	Le-Kim et al. (2000)
	GC-MS	1	Fauhl et al. (1993)
	GC-MS	0,5	Matsudo et al. (1993)

3.4.4. Etil-karbamát meghatározása folyadékkromatográfias eljárásokkal

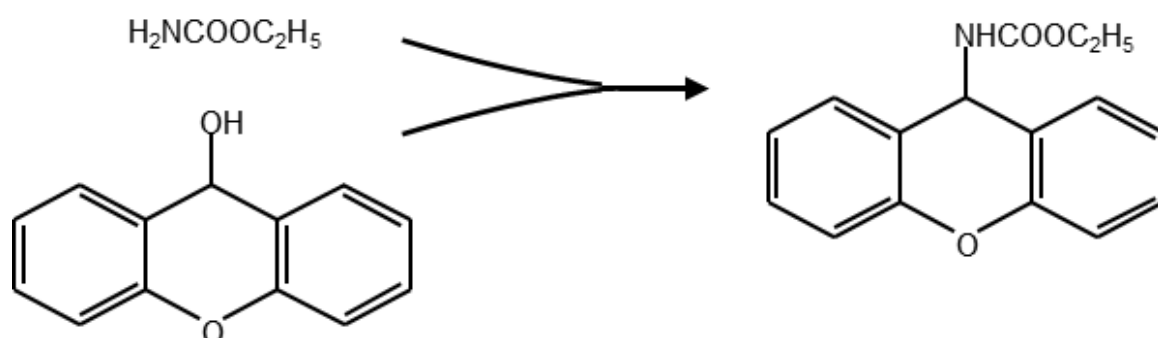
A gázkromatográfia előnye a folyadékkromatográfiához képest az, hogy bármilyen mintaelőkészítésről is van szó, az egész folyamat szelektívebb elválasztást eredményez a folyadékkromatográfiához képest, mivel a GC alapú eljárásoknál kizárólag az illékony, illetve illékonyra tehető komponenseket határozhatunk meg. Az elmúlt évtizedekben azonban – főleg a HPLC-ESI-MS rendszerek rutin vizsgálatokra való alkalmazásának tömeges elterjedésével – felmerült az igény arra, hogy korábban gázkromatográfias módszerrel vizsgált komponenseket folyadékkromatográfias eljárással határozzunk meg.

Az etil-karbamát folyadékkromatográfias vizsgálatát alapvetően az gátolta, hogy a vegyület nem rendelkezik szelektív mérést lehetővé tevő VIS-kromofór csoporttal, míg a keto-csoport bár mutat 220 nm környékén abszorbanciát, ez a hullámhossz tartomány sem szelektív, sem pedig érzékeny mérést nem lesz lehetővé. Ilyen esetekben két, egymást nem kizáró gyakorlati lehetőség marad: az egyik a származékképzés alkalmazása, a másik pedig a szelektívebb méréstechnika (fluorimetria vagy tömegspektrometria) választása. Származékképzés hiányában ugyanakkor az etil-karbamát hidrofíliája nem teszi lehetővé az elterjedt és a szerves tömegspektrometriás berendezésekhez eluens-összetétel szempontjából leginkább használható, fordított fázisú kromatográfias oszlopok alkalmazását. Bár a molekula szerkezete nem zárja ki az ioncserés eljárásokat, hiszen pK értékéből fakadóan vizes közegben kationként van jelen, a kationcserés kromatográfia csak korlátozottan alkalmas tömegspektrometriai kapcsolásokra.

További problémaként merül fel, hogy az etil-karbamát kis moláris tömegéből fakadóan kis kiindulási tömegű és kis fragmens tömegű MRM átmeneteket ad, ami nagyban korlátozza a jó jel/zaj viszony elérését. Park et al. (2007) tanulmányukban először írták le az etil-karbamát HPLC-ESI-MS rendszerre kidolgozott méréstechnikáját, amelyben a vegyület fragmensben szegény viselkedése miatt egyetlen MRM átmenettel voltak kénytelenek dolgozni (m/z 90 \rightarrow m/z 62) – ez azonban nem felel meg a legalapvetőbb ESI-MS alapú eljárások minőségbiztosítási követelményeinek sem.

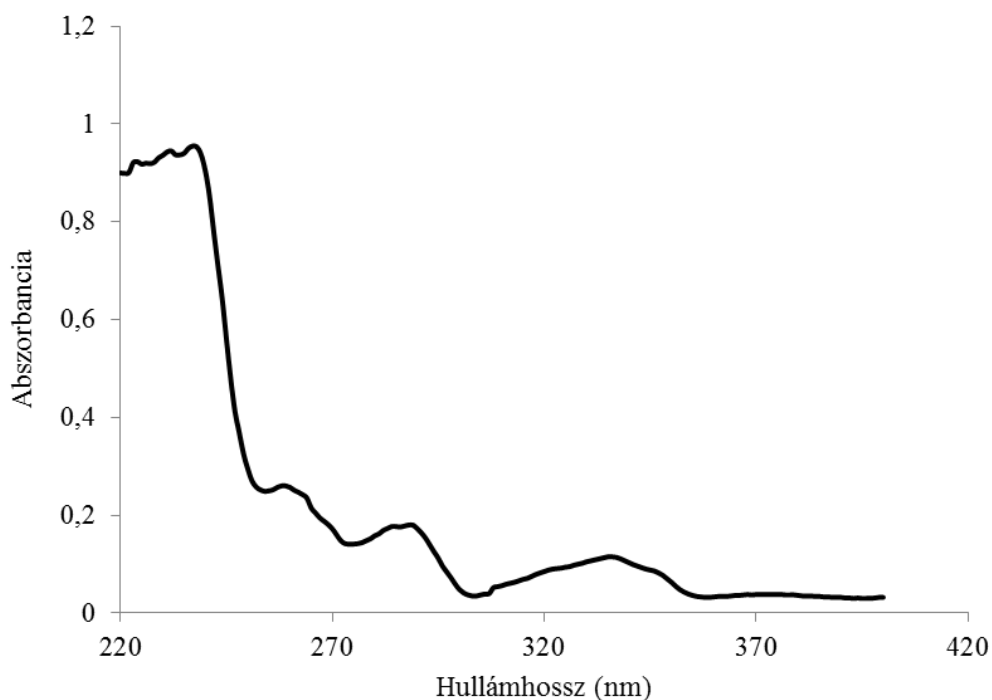
3.4.5. Származékképzés

Az etil-karbamát derivatizációját 9-xanthidrollal égetett szeszekben Giachetti et al. írták le 1991-ben, Herbert et al. pedig 2002-ben (3. ábra). Az etil-karbamát amino-csoportja az egyetlen olyan funkciós csoport, amelyiket a gyakorlatban rendelkezésre álló származékképző vegyületekkel meg lehet célozni. Ez az amino-csoport szolgált kiindulási pontként a GC alapú módszereknél a Giachetti et al. (1991) által bevezetett, xanthidrolra épített mintaelőkészítések esetében is.



3. ábra: Etil-karbamát származékolása 9-xanthidrollal

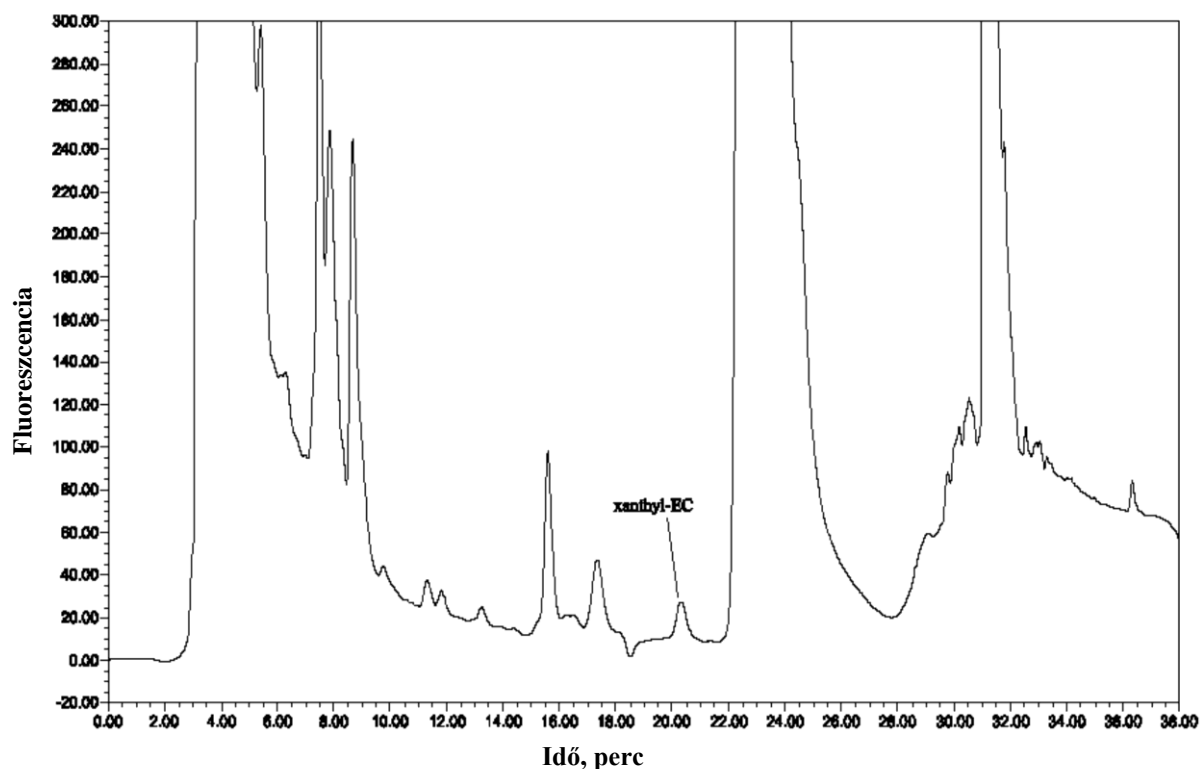
Bár a reakcióban képződő xantil-etil-karbamát kiterjedt kettős kötés rendszere már az UV-tartományban is kellően kromofór (4. ábra), azonban a vegyület fluorofór tulajdonságából egyenesen következik a HPLC-UV eljárásokhoz képest elvileg jóval szelektívebb HPLC-FD használata.



4. ábra: Etanolban oldott, 10 mg/l koncentrációjú 9-xanthidrol UV-spektruma

Herbert et al. voltak az elsők (2002), akik borok és égetett szeszes italok etil-karbamát koncentrációjának meghatározására xanthidrolos származékképzésen alapuló HPLC-FD módszert dolgoztak ki. A minták hígítása után savas közegben az etil-karbamátból 9-xanthidrollal fluoreszkáló xantilurán származékot képeztek. A kimutatási határ 4,7 µg/l-nek, az átlagos visszanyerés 96%-nak, az ismételhetőség pedig 6,7%-nak adódott. A módszer előnye, hogy a gázkromatográfiás mintaelőkészítésekkel összehasonlítva jóval kisebb munkaigényű ill. minimális szerves oldószer felhasználással járt együtt.

Madrera és Valles folyadékkromatográfiás elválasztást követő fluoreszcens detektálást alkalmazva (5. ábra) mutatta ki a xantil-etil-karbamát származékot égetett szeszekből (Madrera, Valles 2009). A kimutatási határ 1,64 µg/l-nek, míg a mennyiségi meghatározás alsó határa ennél a módszernél 3,56 µg/l-nek adódott.



5. ábra: Xantil-etil-karbamát kimutatása almaborból, 38 µg/l koncentrációban, HPLC-FLD rendszerrel (Madrera és Valles, 2009)

Az 5. ábra ugyanakkor rávilágít a fluorimetriás módszer legfőbb hátrányára is: a származékképzésre használt xanthidrol nagy feleslege és az egyéb, aminocsoportot tartalmazó, és így a származékképző szerrel reakcióba lépő alkotó miatt a mérés szelektivitása gyenge, nagyban függ az alkalmazott HPLC oszlop felbontóképességétől – és ahogy a közleményből indirekt módon kiderül – a retenció időn és a láthatóan nem szelektív fluorimetriás válaszjelről eltekintve nem biztosít több, azonosításra használható paramétert.

3.4.6. Kalibrációs eljárások etil-karbamát meghatározásánál

Általánosságban a külső kalibráció a mérendő anyagokat ismert koncentrációban tartalmazó standard oldat sorozatok mérésével történik. A módszer nagy mértékben terhelt a mintaelőkészítés és a vizsgálatok (pl. kromatográfiás elválasztás) során létrejövő veszteségek és „decomposition” /a célkomponens azon tulajdonságának reverzibilis vagy irreverzibilis megváltozása, amely alapján a célkomponens detektálása zajlik/ miatti, ill. az esetleges mátrixhatásból fakadóan fellépő érzékenység-különbség okozta rendszeres hibákkal. Előnye, hogy gyors és kis költséggel jár.

A külső kalibrációhoz képest a standard addíciós módszerrel a mátrixhatásból származó érzékenység-különbség miatt fellépő hibalehetőség zárható ki. Az eljárás jóval munkaigényesebb a

külső kalibrációnál, így használatát indokolni érdemes. A standard addíció ugyanakkor nem tudja önmagában orvosolni a mintaelőkészítés és a vizsgálatok során fellépő veszteségeket, így igény esetén a következő minőségi szintet jelentő „spiking” /adalékolás/ jelent megoldást. Ez utóbbi esetben a mérendő komponens a mintaelőkészítés során különböző ismert mennyiségekben adagoljuk egy adott minta sorozatához, így hozva létre a kalibrációs sort. Ez a módszer pontos, korrigálja a standard addíció során elkerülhetetlen hibákat, de kifejezetten munkaigényes.

A negyedik technika a belső standardra épített kalibrációs eljárás, amely ideális esetben egyesíti magában a külső kalibráció egyszerű végrehajtásának előnyeit, a standard addíció mátrixhatást kiküszöbölő jellegét és a spiking technika mintaelőkészítés/vizsgálat során kialakuló rendszeres hibákat korrigáló hatását. A belső standard alkalmazása tulajdonképpen egy jelkorrekciós eljárás. Lényege, hogy nem közvetlenül a mérendő komponensre kapott válaszjelet, hanem ennek a válaszjelnek és vagy (i) minden mintához a mintaelőkészítés során vagy (ii) az analitikai mintához hozzáadott, vizsgálandó vegyülethez hasonló szerkezetű komponensre (belső standard) kapott válaszjelnek a hányadosát használjuk a kalibrációhoz. Az eljárás kritikus pontja a megfelelő belső standard kiválasztása, mely fizikailag és kémiaiilag is megfelelően jellemzi a mérendő vegyület csoportot. Érdemes deuterált (vagy ^{13}C -mal jelölt) standardokat is alkalmazni, azonban ezek használata jelentősen megemeli az analízis anyagköltségeit. Kereskedelmi forgalomban ugyan kapható például etil-(d₅)-karbamát, azonban az ára jóval meghaladja még a piaci alapú mérések esetén tervezhető beruházási kereteket is (2014. augusztusi adatok szerint a Sigma-Aldrich-nál kapható, „492590” cikkszámú termék ára egyetemek részére 748665 Ft/g).

A szakirodalomban az összes felsorolt módszer szerepel az etil-karbamát mérési eljárásaiban. Külső kalibrációs módszerrel végzett kísérletet például de Andrade-Sobrinho munkatársaival 2002-ben, melynek során 188 szeszes ital etil-karbamát tartalmát vizsgálta meg. Lei és munkatársai (2012) savanyúság minta esetében, GC-FID kapcsolt rendszerrel, összehasonlították a standard addícióval és adalékolással meghatározott értékeket, és nem mutattak ki szignifikáns eltérést.

Propil-karbamát belső standard segítségével égetett szeszekből GC-MS technikával Nagato és munkatársai 2000-ben 10 µg/l kimutatási határt értek el. Ugyanilyen kalibrációs eljárással bormintákból Whiton és Zoecklein 2002-ben 9,6 µg/l LOD értéket tudtak elérni, míg szójaszószból GC-MS módszerrel, diklór-metánnal végzett extrakciót követően Fauhl és társai 1993-ban 1 µg/l kimutatási határt közöltek.

Funch és Lisbjerg 1988-ban deuterált etil-karbamátot használtak GC-MS módszerükben, amellyel 2-5 µg/l kimutatási határt értek el alkoholos italokból. Hamlet és munkatársai 2005-ben publikált kutatásaik során, szintén deuterált belső standard alkalmazásával, kenyérből 0,6 µg/kg etil-karbamát kimutatására voltak képesek.

3.5. A Q₁₀ ÁLTALÁNOS ISMERTETÉSE

A koenzimek olyan vegyületek, amelyek az enzimekkel együttműködve segítik a katalitikus folyamat lejátékozódását. Az enzimkatalizált reakció során a koenzimek kémiai változáson mennek keresztül, majd egy másik reakció során regenerálódnak, visszaalakulnak eredeti állapotukba. Vannak azonban olyan koenzimek, amelyek erősen kötődnek az enzim molekulához, átalakulásuk után nem képesek disszociálni, enzimhez kötött formában alakulnak át, ezeket prosztetikus csoportnak nevezzük (Bányai et al., 2001).

A Q_n-koenzim típus egyéni képviselői az egyszerű lipidek közé tartoznak, kémiai szerkezetük szerint 2,3-dimetoxi-5-metil-6-helyettesített 1,4-benzokinon származékok. Az öt szénatomot és általában kettős kötést tartalmazó ún. izoprén egységek száma adja meg a koenzim szám jelzését. Az emberi szervezetben jellemzően előforduló Q₁₀ esetében a molekula n=10 izoprén egységet tartalmaz. Bár az ubikinon szoros szerkezeti rokonságban áll a véralvadásban fontos szerepet játszó K2 vitaminnal, azzal sem funkciójában, sem bioszintézisében rokonságot nem mutat (Kosáry, 1997).

Az ubikinon redukált formája az ubikinol, amely antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik, ezért az utóbbi években a figyelem középpontjába került. A biológiai membránokban és az LDL-ben hidrofób vegyületként fontos szerepet játszik a celluláris védelemben az oxidatív károsodásokkal szemben, ezáltal az LDL atherogén potenciáljának csökkenésében (Palomaki et al. 1998). Szabadgyök fogó képessége mellett közvetetten, az alfa-tokoferoxil elektrondonorjaként jön létre. Elősegíti az endogén tokoferol (E-vitamin) regenerációját, így fokozza a membránok antioxidáns aktivitását (Kagan et al. 1990; Pobezhimova és Voinikov, 2000).

Amellett, hogy az emberi szervezet is előállítja, megfelelő étrenddel biztosítani lehet a szükséges bevitt, azonban problémát jelent a szív- és érrendszeri megbetegedésekkel rendelkező idősebb egyének táplálkozásának kiegészítése. Erre megoldást nyújthat az a számos már EU-ban elérhető, regisztrált készítmény, amellyel megelőzhetőek a krónikus szív problémák (Molyneux et al., 2008; Potgieter et al., 2013; Singh et al., 2007). Ez a kapcsolat idézte elő a Q₁₀ tartalmú étrend-kiegészítők széleskörű elterjedését az Európai Unióban (Pravst és Zmitek, 2011; Pravst et al. 2010).

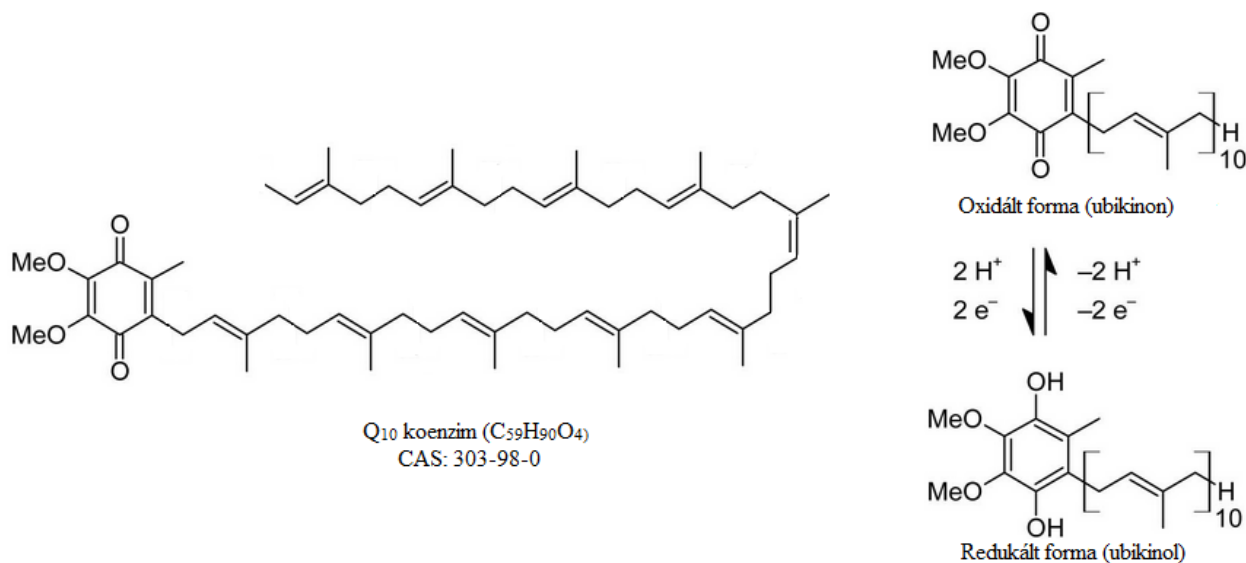
Az egészségre gyakorolt pozitív hatásáról több elmélet is napvilágot látott. Ezek közé tartozik, hogy a Q₁₀ közreműködik a szervezet energiaellátásának szabályozásában, fenntartja a normál vérnyomást, védi a DNS-t, a fehérjéket és a lipideket az oxidatív károsodástól, befolyásolja a koleszterol koncentrációt a vérben, növeli a teherbírási képességet és/vagy a teljesítőképességet, segíti a szívizom működésének helyreállítását infarktust követően stb. Azonban ezeket az állításokat az EFSA álláspontja szerint az étrendkiegészítő-gyártók nem tudták kellő mértékben alátámasztani

(EFSA 2010/2). A helyzet megértését nehezíti, hogy csak Magyarországon két Q₁₀ tartalmú, engedélyezési dokumentumaik szerint „a szívfunkciók javítására és a krónikus szívelégtelenség tüneteinek enyhítésére szolgáló” gyógyszer is van forgalomban. Az első ilyen készítmény a 2005-ben engedélyezett Myoqinon (vényköteles; Pharma Nord) 100 mg-os lágy kapszula volt, míg a másik a hazai gyártótól származó „Béres Q₁₀ 30 mg” kemény kapszula (orvosi rendelvény nélkül is kiadható).

3.6 A Q₁₀ felfedezése és szerepe az elektrontranszport láncban

Elsőként Frederick L. Crane professzor és munkatársai fedezték fel a Q₁₀ koenzimet 1957-ben a Wisconsin Egyetem-Madison Enzimológiai Intézetében (Crane et al., 1957). A kémiai szerkezetét 1958-ban írták le (Wolf et al., 1958). Az elektrontranszport lánc koncepcióját 1961-ben Peter Mitchel vetette fel, ezért a felfedezéséért 1978-ban Nobel díjat kapott. Az 1980-as évektől kezdve egyre több klinikai vizsgálatot végeztek, mivel már rendelkezésre álltak a módszerek Q₁₀ kimutatására vérből és plazmából. Antioxidáns, gyökfogó szerepére Lars Ernster világított rá. Azóta számos kutatás született a szív- és érrendszeri, daganatos betegségekkel való összefüggéseivel kapcsolatban.

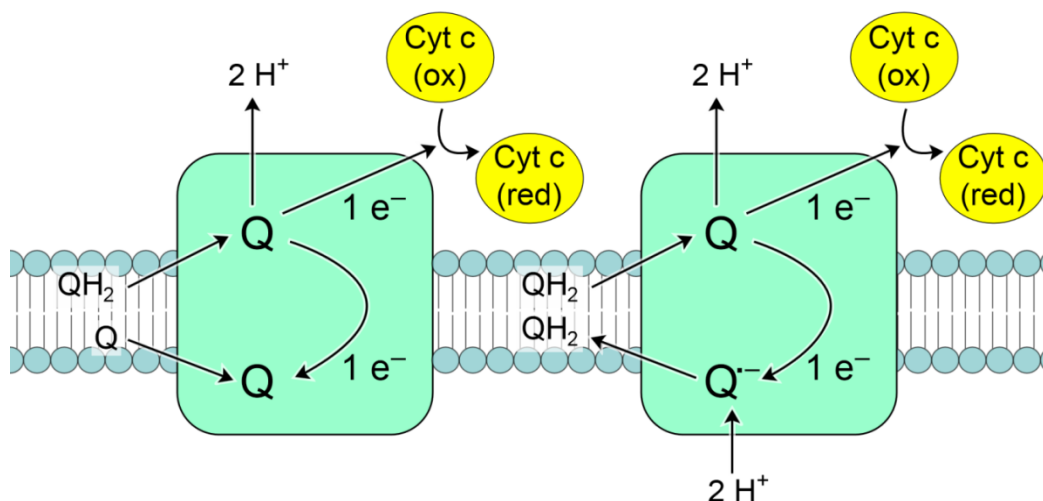
Az ubikinon a sejtműködéshez és a sejtlégzéshez szükséges mitokondriális elektrontranszport lánc nélkülözhetetlen komponense, megtalálható a szövetekben és a szérumban is. Az emberi plazma-ubikinon koncentrációja átlagosan 0,75-1,00 µg/ml között helyezkedik el (Overvad et al., 1999). Koncentrációjában jelentős eltérés mutatkozik az egyes szervek között. A szív, az izmok, a máj és a vese ubikinon szintje magas (Bays, 2005).



6. ábra: Az ubikinon és az ubikinol szerkezeti képlete (Orozco et al., 2007)

A Q_{10} koenzimnek három redox állapota van (6. ábra): teljesen oxidált forma (ubikinon), a szemikinin (ubiszemikinin) és a teljesen redukált forma (ubikinol). Mivel a molekula teljesen oxidált és teljesen redukált formában is létezik, lehetővé teszi, hogy részt vegyen az elektrontranszport láncban és antioxidáns szerepet töltsön be, valamint a mitokondriumban kapcsolatban álljon az ATP szintézissel (Menke et al., 2000).

A belső mitokondriális membránban a NADH-ból és szukcinátból származó elektronok az elektrontranszport láncban keresztül az oxigénhez eljutva vízzé redukálják azt (7. ábra). Az elektronok szállítása az elektrontranszport láncban keresztül H^+ ionokat pumpál keresztül a membránra, ami miatt protongrádiens alakul ki a membrán két oldalán; ezeket a protonokat a (membránra található) ATP-szintetáz használja fel az ATP termeléséhez. Ebben a folyamatban a Q_{10} elektronhordozóként funkcionál, amely az enzim komplex I-ről és II-ről viszi az elektronokat a komplex III-ra. Ez létfontosságú része a folyamatnak, mert semmilyen más molekula nem képes ellátni ezt a funkciót. Így a Q_{10} a szervezet minden egyes sejtjében részt vesz az energiatermelésben (Kosáry, 1997).



7. ábra: A mitokondrium és a Q_{10} koenzim működésének vázlata (Kosáry, 1997).

A Q_{10} antioxidáns természete az energiahordozó funkcióból származik, folyamatosan egy oxidációs-redukciós cikluson megy át. Redukált formájában a Q_{10} molekula könnyen leadja az egyik vagy mindkét elektronját és ez által antioxidánsként funkcionál.

3.7 Élelmiszerek Q_{10} tartalma

A koenzim Q_{10} endogén módon termelődik, valamint a táplálékból is felszívódik (Overvad et al., 1999; Appelkvist et al., 1993). Bár a Q_{10} nem tekinthető vitaminnak, kiindulási anyaga azonban egy esszenciális aminosav, a fenilalanin, amelyet az emberi szervezet előállítani nem képes (Kosáry, 1997). Az endogén szintézis mellett a Q_{10} -hez a szervezet különböző ételekkel is hozzájut.

Az élelmiszerek közül a belsőségek és halak Q_{10} tartalma a legmagasabb, kiemelendő ezek közül a marha-, sertés-, és csirkeszív, csirkemáj. A tejtermékekben a Q_{10} mennyisége jóval kevesebb, mint az állati szövetekben. A gyümölcsök és a bogyós növények többsége nem megfelelő Q_{10} forrás (Pravst et al., 2010), míg az olajos magvak, az olíva kivételével, ebből a szempontból átmeneti értékeket képviselnek (3. táblázat).

3. táblázat: Élelmiszerek Q_{10} tartalma (Pravst et al., 2010)

	Q_{10} (mg/kg)		Q_{10} (mg/kg)
Marha szív	113	Földimogyoró	27
Sertés szív	11,8-128,2	Dió	19
Szardínia	5-64	Pisztácia	20
Makréla	43-67	Szezámmag	17
Szója	54-280	Petrezselyem	8-26
Szőlőmag	64-73	Brokkoli	6-9
Napraforgó	4-15	Szőlő	6-7
Olíva	4-160	Avokádó	10

Több iparág is próbálkozott Q_{10} koenzimmel dúsított élelmiszerek bevezetésével, de a zsírdékony formátum miatt sokáig a tejtermékek kerültek előtérbe a fejlesztések során, mint olyan készítmények, amelyekhez a tejszírban történő feloldás után viszonylag könnyen lehet egyenletesen adagolni ezt a komponenst. Ilyen termék például a Szlovéniában évek óta piacon lévő „EGO Slim & Vital” joghurtital-termékcsalád, amelyet a Ljubljana-i Tejipari Vállalat állít elő L-karnitin, biotin és Q_{10} koenzim dúsítással. A többféle ízben kapható italban a Q_{10} mennyisége 3,0 mg/100g (8. ábra). Hazai viszonylatok közt inkább a többek közt liposzóma technikával vízben oldódóvá tett kiszerezésű ásványvizek piacán jelentek meg többé-kevésbé sikeres, Q_{10} -zel dúsított termékek (8. ábra).



8. ábra: „KellaQ10” ásványvíz és Slim & Vital joghurt ital

Fontos kérdés a Q_{10} tartalmú étrend-kiegészítőkkel kapcsolatban, hogy vajon az oxidált, vagy a redukált forma rendelkezik a megfelelő biológiai hozzáférhetőséggel és hasznosulással. A Q_{10} koenzim viszonylag kis biológiai hasznosulással rendelkezik köszönhetően annak, hogy

gyakorlatilag nem oldódik vízben, és nagy a molekulatömege (863,34 g/mol) a 10 izoprén egység miatt (Ondarroa et al., 1986). Hagyományos étkezéssel bevitt mennyisége erősen limitált (Zhang et al., 1995), felszívódása az E-vitaminhoz hasonló (Bhagavan et al. 2002). Barakat és munkatársai 2013-ban publikált eredményei alapján, összehasonlítva a Q_{10} és a $Q_{10}H_2$ felszívódási értékeit emberekben végzett kísérletekben, azt tapasztalták, hogy a $Q_{10}H_2$ sokkal jobb abszorpciós hányadossal rendelkezik. Hasonló eredményt hozott a kutyákon végzett összehasonlító kísérlet is, a $Q_{10}H_2$ felszívódása több mint kétszerese a folyékony formában (jellemzően szójaolajban oldva) bevitt Q_{10} -nek (Miles et al. 2002).

Egy 2012-ben végzett kísérletben 228 olyan férfit vizsgáltak 26 héten keresztül, akiknél ismeretlen eredetű meddőséget diagnosztizáltak. Azt az eredményt kapták, hogy az ubikinollal kezelt csoport értékei több paraméterben is jelentősen javultak a kontroll csoporthoz képest. Ez is azt a tényt támasztja alá, hogy szükség van a Q_{10} redukált formájának a meghatározására (Safarinejad et al., 2012).

Általánosan elmondható, hogy a legtöbb étrendkiegészítő az oxidációs szempontból stabil Q_{10} formát tartalmazza, azonban számos esetben az eredeti Q_{10} forma mellett, vagy önállóan kínálják a gyártók $Q_{10}H_2$ tartalmú készítményeiket. Ugyanakkor, ha E-vitaminnal gél kapszulát állítanak elő, vagy kemény kapszulát C-vitaminnal, a gyártás és tárolás alatt az emulgeálószernek köszönhetően megjelenik a tablettákban a redukált forma is (Kettawan et al., 2007).

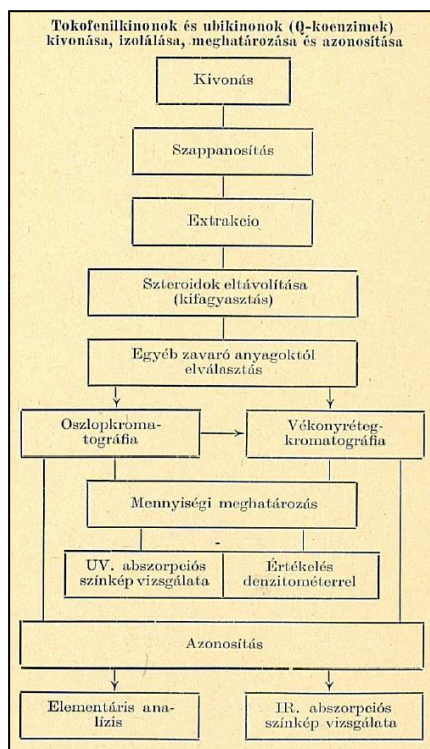
3.8 Analitikai módszerek Q_{10} meghatározására

3.8.1. Mintaelőkészítés

Első körben érdemes leszögezni, hogy a Q_{10} mennyiségi meghatározása alapvetően két fő irányba futhat: összes Q_{10} tartalom ill. redukált/oxidált Q_{10} mennyiség mérése felé. Élelmiszerek esetében szinte kizárólag az első, míg étrendkiegészítők és humán szöveti minták esetében a második irány a hangsúlyozott. Az utóbbi csoportnál egyrészt magasabb piaci pozíció (=drágább termék) társítható a redukált Q_{10} tartalomhoz, másrészt a szöveti stressz és oxidatív környezet jellemzésének egyik módja a szöveti oxidált Q_{10} arányának megadása. Mindkét fő irányvonalra jellemző, hogy mivel a Q_{10} és a $Q_{10}H_2$ is rendkívül hidrofób komponens, extrakciójuk szerves oldószereket igényel, a várható koncentráció függvényében. Ugyanakkor összes Q_{10} meghatározási célzatú vizsgálatoknál a kinyert Q_{10} koenzimeket oxidációval uniformizálni szükséges, míg redukált/oxidált formák szelektív meghatározása esetén az egyedi formák megtartása, a „decomposition” elkerülése a cél.

Élelmiszerek esetében tehát az összes Q_{10} meghatározás adja a vonatkozó vizsgálatok többségét – bár érdemes megjegyezni, hogy a 2000-es évek előtti időszakból alig találni vonatkozó szakirodalmat, ahogy ezt Mattila és Kumpulainen (2001) összefoglaló közleménye részletezi is. Az

első jelentős és pontos adatokat szolgáltatónak tekinthető közlemény magyar szerzőktől származik 1971-ből, Berndorfer-Kraszner és Telegdy-Kovács műegyetemi oktatóktól, akik a hazai élelmiszerekből, zöldségekből és húsfélékből határozták meg a Q₁₀-tartalmat (Berndorfer-Kraszner és Telegdy-Kovács, 1971). Bár a mintaelőkészítés leírásának kidolgozottsága a nem analitikai célzatú újságból fakadóan nem elég részletes, érdemes a 9. ábrán áttekinteni, mivel jellemzi egyrészt a szerzők gondosan felépített kísérleti tervét, másrészt az akkor rendelkezésre álló módszerek (legfőképpen az azonosítás) korlátait.



**9. ábra: Mintaelőkészítési vázlat Q₁₀ élelmiszerekből történő meghatározására
(Berndorfer-Kraszner és Telegdy-Kovács, 1971)**

Az ezt követő időszakban alakult ki a következő eljárás, amelyet biológiai szövetekre először Ikenoya et al. (1981), míg élelmiszerekre elsőként Weber et al. (1997) és Mattila et al. (2000) alkalmazott: a vizsgálandó mintát (rizsliszt, heringfilé, bifsztek) homogenizálást követően 0,15 M NaCl oldattal és etanollal darálnak / homogenizálnak össze, majd több lépésben n-hexán és etanol 5:1 arányú oldatával extrahálnak. A kinyert és egyesített hexános felülúszókat Na-szulfát ágyon vízmentesítették, majd bepárlást követően izopropanolban oldották el a HPLC vizsgálatokhoz. Ezzel a módszerrel kb. 5 mg/kg LOQ értéket sikerült biztosítani, ami kis zsírtartalmú állati minták vizsgálatához elegendőnek bizonyult.

Mattila és Kumpulainen (2001) sajtminták, növényi olajok és májminták extrakciójánál a hexános extrakció előtt elszappanosítást alkalmazott KOH-dal, hogy a mintamatrixot csökkentse és megelőzze a nagy zsírtartalom miatt fellépő emulzió- és zagyképződést.

Shimada és munkatársai (2007) szarvasmarhamáj mintát először K-foszfátban homogenizáltak, majd ezt követően metanolt és hexánt adtak a zagyhoz, kevertették és a hexán fázist leválasztás után szárazra párolták. Ezután FeCl_3 tartalmú etanolban visszaoldották az üledéket és az így kapott oldatot injektálták a HPLC rendszerbe.

Az élelmiszerekhez és a szöveti mintákhoz képest jelentős (mg/g, mg/ml értéket meghaladó) Q_{10} koncentrációjú mintáknál, tehát – leggyakoribb esetben az étrendkiegészítőknél – nem használható sem önmagában, sem pedig extraháló oldat (vagy HPLC eluens) keverékben metanol vagy propanol, mivel ezen oldószerekben jóval kisebb a Q_{10} oldékonysága. Zhao et al. közleményükben (2013) a következő sorrendet állapították meg szobahőmérsékleten történő oldási kísérletek esetén: etil-acetát > n-hexán (több mint 100 mg/ml) > 1-butanol > 1-propanol > 2-propanol > etanol (0,2-0,3 mg/ml; Cayman 2012). A vonatkozó közleményekben a n-hexán szerepel leginkább, mint az extrakciót / oldást legkevésbé gátló oldószer, amelyet olykor a HPLC kompatibilitás biztosítása miatt a Q_{10} -et ugyancsak jól oldó, de annál költségesebb terahidrofuránnal váltanak / egészítenek ki.

Étrendkiegészítő minták esetén a legfontosabb szakirodalmi referenciák a későbbi AOAC 2008.07 módszer alapjául szolgáló Orozco et al. (2007) ill. Lunetta és Roman (2008) közlemények, amelyek az összes szóba kerülő paraméterseregbe (beleértve az extrahálásra használt mérőlombikok színét, az étrendkiegészítőkben található gyakori vegyületek / β -karotin, E-vitamin/ szelektivitásra mutatott zavarását, stb.) validálták a következőkben röviden bemutatásra kerülő eljárást. A módszerben a kellő mértékben homogenizált, reprezentatív mértékben feldolgozott kapszulákat/ tablettákat acetonitril:terahidrofurán:víz 55:40:5 %/v/v keverékkel extrahálják, majd az ülepített oldatot 0,1 m/m % FeCl_3 tartalmú etanollal hígítják, hogy a mintákban esetleg jelen lévő redukált Q_{10} -t oxidált formába uniformizálják. Ezt követően a mintaoldat szűrés és további, az adott HPLC vizsgálattal kompatibilis eluens eleggyel történő hígítás után közvetlenül injektálható.

Érdemes megemlíteni, hogy a szakirodalomban élelmiszer vagy étrendkiegészítő mintára Q_{10} meghatározás esetén alig találni SPE vagy Chemelute alapú eljárásokat. Az egyik ritka kivétel Rodriguez-Acúna et al. közleménye, amelyben a szerzők növényi olajokból SPE patron segítségével, heptános elúcióval tisztították ki a Q_9 és Q_{10} komponenseket (2008).

Az eddig felsorolt közleményektől eltérően a redukált/oxidált Q_{10} mennyiség meghatározását célzó vizsgálatoknál uniformizálás helyett az eredeti redox állapot megőrzése a cél, amelyet elvileg legegyszerűbb módon oxidáció-gátló adalékkal lehet elérni. Ilyen kísérletek során néhány kivételtől eltekintve (Kettawan 2007, Kubo 2008) nem élelmiszer (étrendkiegészítő), hanem kísérleti

állatokból származó vagy humán eredetű vér, vérplazma vagy szérum szerepel mintaként. Menke és munkatársai esetében humán vérplazma került vizsgálatra, amelyhez a mintaelőkészítés során először etanolban oldott Q₉ belső standard oldatot adtak, majd ezután 2,6-di-terc-butil-*p*-krezolt, amely képes meggátolni a lipid auto-oxidációt és egyéb oxidációs folyamatot anélkül, hogy közben redukálná az ubikinont (Menke et al., 2000). A mintához ezt követően hexánt adagoltak, majd elegyítés/vortex homogenizálás után az elváló hexánt fázis evaporálták, argon gáz alatt szárazra párolták, majd a megmaradt üledéket feloldották etanolban és a HPLC rendszerbe injektálták.

Az oxidációt gátló adalék használata elkerülhető akkor, ha a mintaelőkészítés során a felhasznált oldószerek gáztalanítottak (oldott oxigén tartalmuk elhanyagolható) és a mintaelőkészítés rövid, egyszerűen kivitelezhető. Ezt az elvet Yamasita és Yamamoto úgy követték, hogy metanollal és hexánnal keverték össze a vérplazmamintát, majd centrifugálást követően a hexános felülúszót közvetlenül injektálták az oldatot a HPLC-EC rendszerbe.

A korábban említett két élelmiszeripari példa esetén egyszer sem használtak a szerzők oxidációt gátló adalékot az extrakció során. Kettawan et al. (2007) 14 különböző élelmiszer (a lazactól a petrezselyemig) és 43 étrendkiegészítő mintából határozta meg a redukált/oxidált Q₁₀ arányt viszonylag egyszerű, a homogenizálás után etanol-hexán eleggyel végrehajtott extrakciós lépések után. Kubo et al. (2008) 70 élelmiszer-minta (húsok-halak-kagylók-zöldségek-gyümölcsök stb.) extrakcióját hajtotta végre izopropanol használatára optimált extrakció után, ugyancsak oxidációt gátló adalék nélkül.

3.8.2 Q₁₀ analitikai meghatározása

Mivel a Q₁₀ koenzim erősen hidrofób karakterű komponens, ezért meghatározása / mátrixtól történő elválasztása fordított fázisú kromatográfiával (C₈ és C₁₈ RP oszlopokkal) viszonylag egyszerűen megoldható. GC alapú módszerek alkalmazására a molekula szerkezete nem nyújt lehetőséget, míg elválasztástechnika nélkül még a viszonylag egyszerű mátrixszal jellemezhető étrendkiegészítők sem vizsgálhatók a nem kielégítő szelektivitásból fakadóan.

A HPLC elválasztást követő detektálásra természetesnek adódik az UV, mivel a molekula 275 nm-en viszonylag szelektív és érzékeny elnyeléssel rendelkezik, és az analitikai mintára számítva 1-10 mg/kg koncentráció felett megfelelő teljesítményjellemzők mellett mérhető. A HPLC-UV módszernél azonban külön figyelmet kell fordítani az uniformizálásra. A redukált Q₁₀ hidrofílebb karakteréből fakadóan a minták számos alkotójával együttes elúciót mutathat, másrészt uniformizálás nélkül a mintában nem biztosítható a két forma egymáshoz viszonyított arányainak állandósága. Bár a korai szakirodalom eltekintett az élelmiszerek Q₁₀ tartalmának akár 62%-t (!) kitevő redukált formáról (Kettawan et al. 2007), a későbbi közleményekben ezt a problémát már

jellemzően az ubikinonná történő oxidációval kezelték. Nem véletlen tehát, hogy a 2007-ben és 2008-ban közölt AOAC tanulmányok sok szempontból mérőföldkőnek számítanak az élelmiszereink Q₁₀ tartalmáról szóló jelentésekben. Mindkét, részben egymásra épülő közleményben (Orozco et al. 2007, Lunetta és Roman, 2008) az uniformizálást követően 275 nm-en történik a szelektív HPLC-UV meghatározás. A feltárt lineáris összefüggés az 50-1000 mg/g mérési tartományban húzódott, az ismételhetőség pontossága 2,15 és 5,00% között mozgott, az LOQ pedig 9 µg/ml-nek adódott.

Az uniformizálással kizárt, korábban feltehetően számottevő mértékű rendszeres hiba megszűnését követően jelentek meg az Európai Unióban egyre nagyobb teret meghódító Q₁₀ tartalmú étrendkiegészítőkről szóló tanulmányok, amelyek olykor érdekes tendenciákra hívták fel a figyelmet. Pravst és Zmitek 2011-ben megjelent tanulmányában 58, az unió területén beszerezhető Q₁₀ tartalmú étrendkiegészítőt vizsgált meg HPLC-UV módszerrel: eredményeik alapján a megvizsgált termékek egyharmada a feltüntetett Q₁₀ mennyiség kevesebb, mint 70%-át tartalmazta. Folyadékkromatográfiás elválasztást követő fluoreszcens detektálást a vegyület szerkezete nem zárja ki, mivel a redukált forma számottevő fluoreszcenciát mutat, tehát egy másik irányú, redukciót előírányzó uniformizálással is mérhetővé válik a minta összes Q₁₀ tartalma. Ez az eljárás azonban nem tudott elterjedni, mivel egyrészt a korábban említett, hidrofílebb kromatográfiás viselkedés nehezíti a szelektív elválasztást, másrészt az ubikinol fluoreszcenciás mérési érzékenysége rosszabb, mint az ubikinon UV spektroszkópiai meghatározásánál elérhető érzékenység (Molyneux és Lever 2005, Kruk és Strzalka 1993).

Az ubikinon ubikinollá történő uniformizálása NaBH₄-del az elérhető közlemények szerint az elektrokémiai detektálással felszerelt HPLC rendszerek esetén került csak szóba, ugyanis ez a detektálási eljárás az ubikinolra nézve érzékenyebb, mint a fluorimetriás. Ugyanakkor az elektrokémiai detektálás kivitelezése jóval költségesebb és bonyolultabb, mint az UV detektálásé, mivel egy dupla cellás detektorra van szükség, amely a redukált és oxidált forma folyamatos átalakulását monitorozza. Emellett az elektrokémiai detektor nem kellően robusztus a nagy koncentrációjú lipofil komponensekre, amelyek passziválják az elektródokat, ezzel csökkentve az élettartamát. Az elektrokémiai detektálás egyetlen előnye az UV módszerekhez képest a jóval (több mint egy nagyságrenddel) kisebb LOQ. Yamashita és Yamamoto 1997-ben megjelent cikkében HPLC-EC technikával szimultán határozott meg ubikinont és ubikinolt emberi vérplazmából. Módszerük kimutatási határa kitűnő reprodukálhatóság mellett 4 nM-nak adódott. Szintén elektrokémiai detektálással határozták meg Menke és munkatársai 2000-ben vérplazmából, szimultán módszerrel ubikinont, ubikinolt α- és γ-tokoferolt, Q₉ belső standard segítségével. Majd ezt a vonalat követve 2004-ben Galinier és munkatársai publikálták patkányokon végzett kísérleti eredményeiket, melyekben az ubikinon és az ubikinol közötti összefüggést vizsgálták. Az

élelmiszerek területén Kettawa et al. (2007) és Kubo et al. (2008) aknázták ki az elektrokémiai detektor által nyújtott jobb kimutatási/meghatározási határokat.

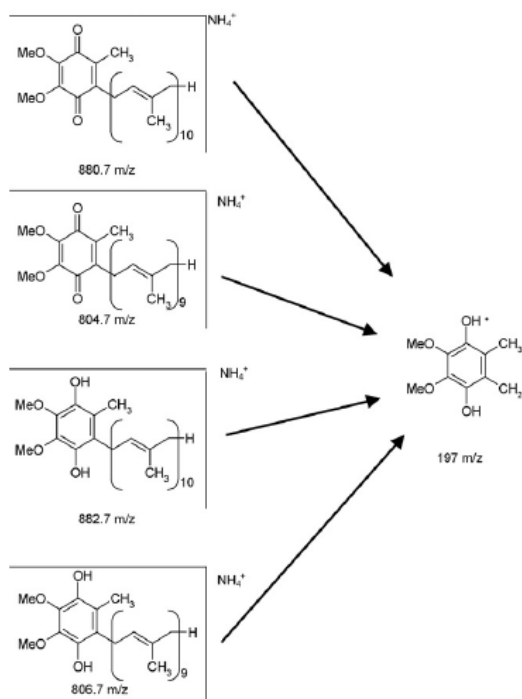
Érzékenység szempontjából az elektrokémiai detektálásnál is jobb teljesítményt nyújt elvileg napjaink rutin eljárása, a HPLC-MS, amely ugyanakkor nem tud automatikusan megoldást nyújtani a Q₁₀ meghatározásához. Ennek az a két legfőbb oka, hogy a molekula túl nagy a lipofil molekulák ionizációjára kimondottan alkalmas APCI ionforráshoz, ami pozitív ionizációs módban nagyfokú ionforrás-fragmentációban ölt testet, másrészt a hidrofíl Q₁₀ molekula egyik formája sem képes proton-adduktként ionizálódni az ESI ionforrásokban.

Az egyik fajta megoldást Ruiz-Jiménez és munkatársai által elsőként alkalmazott ammónia-adduktos ionizációs eljárás jelentette, amely a gyakorlatban 100% szerves oldószert tartalmazó HPLC eluens 5 mM ammónium-formiáttal történő kiegészítésével jó hatásfokú ionizációt biztosít (Ruiz-Jiménez et al., 2007). Az ESI-MS alapú detektálás az ubikinon és az ubikinol eltérő tömege miatt lehetővé teszi az egy futamban történő szelektív detektálásukat is. Kiemelendő azonban, hogy alapvonal szinten biztosítani kell a kromatográfiás elválasztást a két komponensre, mivel a redukált ubikinon A+2-es izotopológja kis felbontású ESI-MS esetén nem különböztethető meg az ubikinon monoizotópos tömegétől.

Ruiz-Jiménez és munkatársai által végzett kísérletben Q₁₀ és Q₁₀H₂ tartalmat vizsgáltak emberi vérplazmából HPLC-ESI-MS/MS módszerrel, pozitív ionizációs módban, Q₉ belső standard segítségével. A figyelt NH₄-adduktok 880.7 *m/z* (Q₁₀), 882.7 *m/z* (Q₁₀H₂), 804.7 *m/z* (Q₉) és a 806.7 *m/z* (Q₉H₂) relatív tömegűek voltak, ahogy ezt a 10. ábra mutatja, ugyanakkor a legfőbb (mennyiségi) MRM átmenet Q₃ tömege minden esetben egyezik fog a kinol-gyűrűből képződő stabil fragmens miatt. Ez alapján a Q₁₀ és a Q₁₀H₂ tömegspektruma jelentősen eltér Hansen et al. által 2004-ben publikált eredményektől, mely szerint nincs különbség az oxidált és a redukált forma tömegspektruma között. Ki kell azonban emelni, hogy Hansen csoportja vizsgálatai során APCI ionforrást alkalmazott, amely az ionforrásban történő fragmentáció miatt úgyszólván uniformizálta a két komponenst azáltal, hogy a [Q₁₀H₂+H⁺] \rightarrow [Q₁₀+H⁺] molekulaionná bomlott.

A hidrofíl molekulákra elvileg jól használható APCI ionforrást Rodriguez-Acuna és mtsai 2008-ban közölt tanulmányukban végül negatív ionizációs mód választásával tudták optimalni Q₉ és Q₁₀ mennyiségi meghatározására olajmintákból. A Ruiz-Jiménez ill. Rodriguez-Acuna kutatói csoportok közleményeit követően végül megnyílt a lehetőség a leggyakrabban hozzáférhető két LC-MS ionforrás alkalmazására élelmiszeripari mintákra is, amelyet dél-koreai (Pyo et al. 2010, Pyo et al. 2011, Lee et al. 2014) publikációk sora jelez. Ezek közül összetettsége miatt emelendő ki a 2011. évi közlemény, amelyben a koreai szerzők szójaszószt és szójajkrémet vizsgáltak fordított fázisú C₁₈-as oszlopon, ESI ionizációt alkalmazva pozitív módban. A mintaelőkészítéskor az extrakciót elszappanosítás előzte meg, melynek során a homogenizált mintához NaOH-t, metanolt, és az

oxidáció elkerülésére pirogallolt adtak. A keverést és vízfürdőt követte az extrakció n-hexánnal. A bepárlást követően a maradékot 2-propanolban oldották fel és szűrést követően injektálták a HPLC rendszerbe. Méréseik során arra az eredményre jutottak, hogy a napi összes Q_{10} bevitel ezekből a koreai étkezés szempontjából alapvetőnek számító élelmiszerekből 11,6 mg/nap/főnek adódott, szemben a korábban becsült 3-6 mg/nap/fővel szemben.



10. ábra: A Q_{10} , $Q_{10}H_2$, Q_9 és Q_9H_2 mennyiségi átmenetei ammónia-addukt képződést követően (Ruiz-Jiménez et al., 2007)

3.8.3 Kalibrációs eljárások Q_{10} tartalom meghatározásánál

A választott HPLC eljárások egyértelműen meghatározzák a kalibrációs lehetőséget. HPLC-UV módszerek esetén (Orozco et al., 2007; Lunetta and Roman 2008; Pravst et al., 2011) a külső kalibráció elfogadott, annak ellenére, hogy bonyolult minta mátrixoknál (pl. vérplazma), a mátrix hatás nem elhanyagolható. Ugyancsak elfogadott a külső kalibráció elektrokémiai detektálás esetén, ahol azonban in situ gondoskodni kell a redukált standard oldatokról (Q_9H_2 , $Q_{10}H_2$), tehát elő kell őket állítani a kereskedelmi forgalomban beszerezhető oxidált formákból $NaBH_4$ -del végzett redukcióval és úgy tárolni őket, hogy az oxidáció a lehető legkevesebbé indulhasson meg (Yamashita et al., 1997, Galinier et al., 2004, Kubo et al., 2008, Kettawan et al., 2007).

Menke és munkatársai 2000-ben közölt tanulmányukban HPLC-ECD eljárásuk során Q_9 és Q_9H_2 oldatokat belső standardként alkalmazott a Q_{10} és $Q_{10}H_2$ mennyiségi meghatározásához, humán vérplazma minták esetében. Mivel a Q_9 az emberi szervezetben nincs jelen kimutatható mértékben,

ez az eljárás rutinná vált a tömegspektrometriai detektálásra épített vérplazma vizsgálatok során is (Ruiz-Jiménez et al., 2007). Napjainkban ugyanakkor a legpontosabb mérési eljárásnak a kereskedelmi forgalomban nem beszerezhető, ám kis mennyiségben *in situ* előállítható deuterált (d_6 -CoQ₁₀) Q₁₀ belső standardra épített módszer számít (Itkonen et al., 2013, Duberley et al., 2013). Ez a technika kizárólag kis koncentrációjú Q₁₀ minták (pl. vérplazma) esetén alkalmazható.

3.9 A mérési bizonytalanság fogalma és meghatározása

A mérési bizonytalanság a Nemzetközi Metrológiai Értelmező Szótár szerint mérés minőségjellemzője, olyan a mérési eredményhez társított paraméter, amely a mérendő mennyiségnek megalapozottan tulajdonítható értékek szóródását jellemzi). Fogalmilag és tartalmilag is más, mint a hagyományosan használt mérési hiba, mert a hiba számszerű megadása esetén is nyitva marad a kérdés, hogy az mennyire pontos.

A mérési bizonytalanság kifejezésére már 20 éve létezik ajánlás, az ISO kiadásában jelent meg 1993-ban az Útmutató a mérési bizonytalanság kifejezéséhez (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement; BIPM, 1993). Ezt követte 1995-ben és 2008-ban egy-egy javított és bővített kiadás (JCGM, 2008). Ez az útmutató kétféle módon jellemzi a mérendő értékek szóródását: egyrészt a mérési eredményhez, mint valószínűségi változóhoz tartozó szórás értékével, ilyenkor standard bizonytalanságról, vagy több más megfigyelt érték függvényeként megjelenő mérési eredmény (közvetett mérés) esetén eredő standard bizonytalanságról beszélünk. Másrészt a mérési bizonytalanság jellemezhető egy intervallummal, amelynek sugara az eredő standard bizonytalanság és egy k kiterjesztési (vagy átfedési) tényező szorzataként adódik. Ez utóbbi esetben tulajdonképpen egy konfidencia intervallumot kapunk: a legtöbbször használt $k=2$ esetén 95%-ost, amely összesen 4 szórásnyi tartományban fedi a mérés várható értékét.

A mérési bizonytalanság mértékét kétféle módon csökkenthetjük. Az általában költségesebb, de hatásosabb módszer a bizonytalanság csökkentése új mérési módszerek vagy mérőeszközök alkalmazásával (Kosztján és Schanda, 2009; Kosztján és Hegedűs, 2010). Ha nincs lehetőség az adott technológiai színvonalon a bizonytalanság csökkentésére, a bizonytalanság figyelembe vétele (elfogadása) szintén megoldás lehet (Hegedűs, 2011). Ez utóbbi eljárás a gyakorlatban azt jelenti, hogy a megrendelő/vevő által felkínált „value-for-money” tárgyalási pozíciót módosítjuk úgy, hogy deklaráltan gyengébb minőségű, de még mindig „fit-for-purpose” módszer használatában egyezünk ki.

A mérési bizonytalanság a mérések természetes velejárója. A mérés során végrehajtott lépéseknek elemi bizonytalansága van. Ezek együtt adják a mérés teljes (kiterjesztett) bizonytalanságát, amely mindig a mért érték körüli tartomány. A mérendő paraméter valódi értéke azon belül nagy valószínűséggel megtalálható. Forrásai a mintavétel, a tárolási körülmény, a minta előkészítés, a

készülék állapota, a reagensek tisztasága, a mérés környezeti körülményei, a minta effektusok, a számítástechnikai effektusok, az operátortól függő hatások, a véletlenszerű effektusok, stb (Szegény, 2012).

Méréseink megbízhatóságát a mérési bizonytalansággal igazoljuk. Értékének becslésére három módszert különböztetünk meg. A szigorú matematikai módszer alapján számba vesszük a részbizonytalanságokat és becsüljük az eredő bizonytalanságot. A meglévő minőségbiztosítási adatok (gyűjtött ill. kombinált bizonytalanságok) alapján is meghatározhatjuk. A kombinált módszer pedig ennek a kettőnek az együttes alkalmazása.

A bizonytalanság számszerűsítésére a matematikai módszer alapján a becsült szórást használjuk, amely a becsült variancia négyzetgyöke, ezt nevezzük standard bizonytalanságnak. Az „A” típusú meghatározásánál kiszámítjuk az elvégzett mérési sorozat varianciabecslőjét ill. szórásbecslőjét és ezt tekintjük a standard bizonytalanság számszerű értékének. A „B” típusú meghatározásnál a mérési eredmény, mint valószínűségi változó eloszlására állítunk fel hipotézist, és a feltételezett eloszlás szórása adja a standard bizonytalanság számszerű értékét (Pataki, 1993). A mérési bizonytalanság összetevőinek átfogó értékelése rámutat a vizsgálati módszer esetleges kritikus pontjaira, amelyekre nagyobb figyelmet kell fordítani.

Tekintettel arra, hogy a bizonytalanság értékét többféle módon lehet becsülni, az EURACHEM/CITAC útmutató egy általánosan elfogadott referencia útmutatót tartalmaz. Ez alapján a bizonytalanság becslése négy lépést foglal magába. Az első a mérendő komponens meghatározása. Itt pontosan le kell írni, hogy mit kell mérni, beleértve a mérendő komponens és a bevitt mennyiség közötti kapcsolatot (pl. bemért mennyiség, állandók, kalibrációs-standard értékek). A második a bizonytalansági források azonosítása. Ehhez tudni kell a módszer összes kritikus lépését, ezért kell pontosan meghatározni a mérendő komponenst. A harmadik lépés a bizonytalansági összetevők meghatározása, míg a negyedik lépés a kombinált bizonytalanság számítása (Olivares és Lopes, 2012).

Fontos megjegyezni, hogy az általánosságban számolt mérési szórás és a teljes mérési bizonytalanság, bár mértékegységük azonos, gyökeresen eltérő célokat szolgál, így helyes meghatározásuk és értelmezésük kulcsfontosságú az élelmiszeranalitikában.

4. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az etil-karbamát mennyiségi meghatározására alkalmas, szelektív HPLC-ESI-MS módszer kidolgozása, amely a vonatkozó szakirodalom szerint kutatásaim megkezdése előtt még nem állt rendelkezésre. Ehhez kapcsolódóan a mintaelőkészítés és a vizsgálati módszer optimalizálása, validálása, valódi mintákon történő alkalmazása, valamint a kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, majd a kész mérési módszer akkreditálásának megvalósítása.
2. Étrendkiegészítő mintákból redukált Q₁₀ koenzim mennyiségi meghatározására alkalmas, szelektív HPLC-ESI-MS módszer kidolgozása, annak akkreditálása. Ehhez kapcsolódóan az extrakción alapuló mintaelőkészítés miatt külön figyelmet kell fordítani a mérés minőségbiztosítására, így a már elérhető validált AOAC módszer beépítésére a kinyerési hatások megállapításához, a redukált Q₁₀ koenzim *in situ* előállításának optimalizálására, és a kalibrációs eljárás megfelelő kiválasztására. Ennél a feladatnál is cél a kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, mivel ez a paraméter nagyon ritkán kerül közlésre annak ellenére, hogy ez tükrözi valójában a kifejlesztett módszerek műveleti paramétereknek való kitéttőségét.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Felhasznált vegyszerek

Kísérleteim során lehetőség szerint analitikai tisztaságú vegyületeket alkalmaztam: az etil-karbamátot ($\geq 99\%$), a butil-karbamátot (98%), a 9-xanthidrolt ($\geq 99\%$), az 1,4-dioxánt (puriss), az imazalilt (Pestanal[®] tisztaság), a hangyasavat (puriss, tömegspektrométerhez), a Na-borohidridet (NaBH_4 , a.r. $>98\%$), az ammónium-formiátot (a.r., $>99\%$), a 2,6-di-terc-butil-1,4-metilfenolt (BHT; $>99\%$) és a Q_{10} koenzim standardot (a.r., $>99\%$) a Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Németország) cégtől rendeltem. A szükséges vegyszerek közül a metanolt, az n-hexánt (98%, HPLC gradiens tisztaság), az 1-propanolt ($\geq 99\%$), az acetont (puriss), és az acetonitrilt (ACN; HPLC grádiens tisztaság) a Scharlau-tól (Barcelona, Spanyolország), míg az ammóniát (a.r.), a sósavat (a.r., 37 m/m%), a jégecetet (puriss), és a tetrahidro-furánt (THF; izokratikus HPLC tisztaság) a Merck-től (Merck; Darmstadt, Németország) szereztük be. Az EDTA (dinátrium só $\times 2\text{H}_2\text{O}$, a.r. $>99\%$), az etanol (Ph. Eur.) és a FeCl_3 (99%) a Reanal cégtől (Budapest, Magyarország) származott. Az oldatkészítés után a standard vegyületeket hűtőben tároltam $+4 - +6\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A kalibrációs sorhoz szükséges oldatot maximum 5 munkanapig használtam és a mérésig hűtőben tároltam. A vízzel történő hígításokhoz a Milli-Q ELIX-3 + Synergy UV rendszer (Millipore; Bedford, MA, USA) által előállított ioncserélt vizet alkalmaztam (18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$). A mintaelőkészítés során a homogenizált minta leszűréséhez 0,45 μm pórusméretű hidrofíl PTFE fecskendőszűrőt használtam (VWR International; Radnor, PA, USA). Mivel etil-karbamátra hitelesített CRM nem áll rendelkezésre, referenciaként két FAPAS (Sand Hutton, EK) LRM brandy minta valamelyikét használtam (T1362QC, elfogadási tartomány: 40,4-103,9 $\mu\text{g/l}$ illetve T1358QC, elfogadási tartomány: 143-331 $\mu\text{g/l}$). A minták HPLC-re történő injektálásához 2 mL-es mintatartó üvegedényeket (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) használtam.

5.2. Alkalmazott műszerek

Az alkalmazott műszerek beállításai és az optimálás paraméterek egyes esetekben a módszerfejlesztés részét képezték, ezért azok az „Eredmények” fejezetben kerülnek részletezésre.

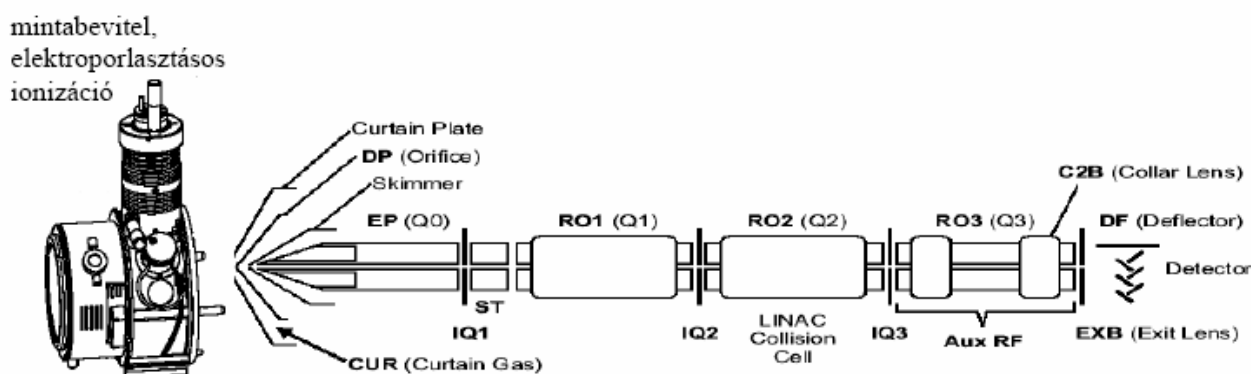
5.2.1. HPLC-ESI-MS-MS

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztás során Agilent 1100 típusú HPLC rendszert alkalmaztam, amely légmentesítő egységből, kétcsatornás pumpából, automata mintaadagolóból és kolonna termosztátból épült fel. Az etil-karbamát meghatározására irányuló kísérletek során a Zorbax XDB C_{18} (2,1mm \times 50 mm; 3,5 μm szemcseátmérő; Agilent) oszlopot használtam, míg a

Q₁₀ koenzim vizsgálata során az X_{Terra}[®] MS C₁₈ (2,1mm x 20 mm; 5 µm szemcseátmérő; Waters) oszlopot alkalmaztam.

A detektáláshoz a HPLC rendszerhez az Applied Biosystem által gyártott 3200-QTRAP (Applied Biosystems/MSD Sciex, Foster City, CA, USA) hármas kvadrupól rendszerű és lineáris ioncsapdával felszerelt tandem tömegspektrométert kapcsoltam. Ionforrásként TurboIonSpray[®] típusú pneumatikus ESI ionforrást alkalmaztam. A porlasztást nitrogéngáz (99,7% tisztaságú) segítségével végeztem. Az adatok kiértékelése az Analyst szoftver 1.4.2-es verziójával történt.

A 3200 QTRAP típusú ESI-MS-MS készülék vázlatos felépítését a 11. ábra mutatja be. A hármas kvadrupól tömegspektrométer három egymás után kapcsolt kvadrupól (Q) analizátort tartalmaz. Az első analizátor (Q₁) kiválasztja az adott molekulaiont (anyaion). Ezt követi az ütközési cella (Q₂), ahol gázbevezetés (N₂; 99,9995%) hatására bekövetkezik a fragmentáció. A keletkezett új fragmensionok (product ion, daughter ion) tömeg/töltés szerint a harmadik kvadrupólban válnak szét (Q₃).



11. ábra: Az ionforrás és a tandem tömegspektrométer kapcsolása

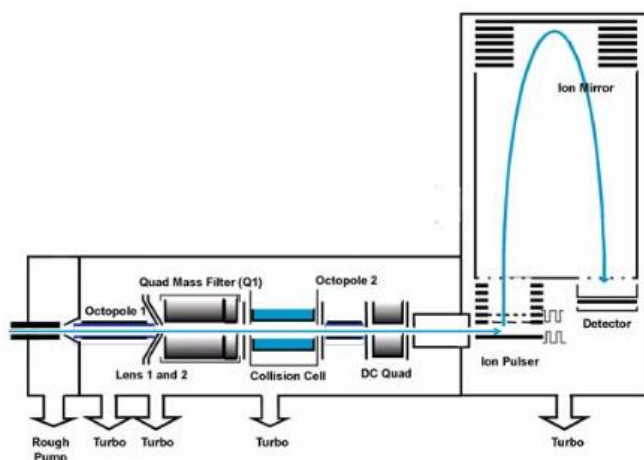
Munkám során kétféle módon használtam az analizátort. A **product ion scan** (leányion kiválasztás) módban a Q₁ kvadrupól a meghatározott molekulaiont átengedi, Q₂-ben választható vagy automatikusan léptetett ütközési energia mellett megtörténik a fragmentáció, a harmadik kvadrupól pedig minden keletkezett fragmenst detektál (Q₃ SCAN). A módszerfejlesztéshez a legintenzívebb fragmensionokat itt választhatjuk ki. Az MRM módszerfejlesztéshez a legintenzívebb fragmensionokat itt választhatjuk ki.

MRM módban szintén mind a három kvadrupólt használjuk. A Q₁ és Q₃ kvadrupól SIM módban működik, csak a meghatározott anyaiont (Q₁) és fragmens ionokat (Q₃) engedik át. Lehetőség van egyszerre több adott molekulát figyelni, melyekből csak a rájuk jellemző fragmens kerül detektálásra.

5.2.2. HPLC-ESI-QTOF-MS és –MS-MS kísérletek

A standard minták elemzését kiegészítettem HPLC-ESI-QTOF-MS készülékkel történő meghatározással (12. ábra), melynek során az Agilent 6530 QTOF készülékét használtam Agilent 6220 típusról származó dual ESI ionforrást alkalmazva, pozitív ionizációs módban. A tömegspektrométert a 4 GHz-es nagy felbontású üzemódban használtam, ahol a felbontás m/z 922 relatív tömegnél jellemzően meghaladta a 19000-es értéket. A további beállítási paramétereket alkalmaztam még: kapilláris feszültség 4000 V; porlasztónyomás, 40 psig; szárító gáz térfogatáram, 9.0 L min⁻¹; szárító gáz hőmérséklet, 325 °C; skimmer feszültség, 65 V; octopole 1 feszültség, 250 V; fragmentor feszültség, 160 V. A készülék tömegkalibrálását a berendezés az adott ionizációs módtól függően automata módon, teljes letapogatásonként (full scan), tehát jellemzően 1 másodpercenként végzi el purin (m/z 121.0509) és hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi)-foszfazin (HP-921; C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄, m/z 922.0098) segítségével. A teljes letapogatású spektrumokat m/z 50-1000 között rögzítettem. Az adatok rögzítésére és kiértékelésére az Agilent Mass Hunter Data Acquisition (B.04.00) és Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis (B.04.00) szoftvereket alkalmaztam.

A standard minták mérésére irányuló kísérletek során a Zorbax XDB C₁₈ (2,1 mm x 50 mm; 3,5 µm) fordított fázisú oszlopot használtam, az elválasztás pedig gradiens módban történt. Az „A” eluens 0,1 %/v% hangyasav tartalmú Milli Q víz, a „B” eluens pedig metanol volt. Az áramlási sebesség értékét 300 µL/percre állítottam be. A következő gradiens lépcsőt használtam: 0-2 perc 10% “B”, 2-12 perc felvitel 100% “B”-re, 12-15 perc 100% “B”, 15-15,1 perc “B” csökkentése 10%-ra. Az injektálási térfogat 10 µL, az oszlop termosztát hőmérséklete pedig 30 °C volt. A célkomponensek m/z értékeinél végzett fragmentációs kísérletek során az ütközési energia értékét a készülék automatikusan állította be a molekulatömeg alapján.



12. ábra: Az Agilent 6530 Accurate Mass QTOF LC-MS rendszer sematikus ábrája

5.4. Vegyület szintézisek

5.4.1. Xantil-etil-karbamát szintézise és HPLC-ESI-MS/MS mérési paramétereinek optimalálása MRM módszerrel történő meghatározásához

A tömegspektrometriás detektálás első lépése minden esetben a készülék optimalálása az adott detektálási paraméterekre. Az ABI 3200 Q-TRAP készüléke lehetővé teszi „syringe” (úgynevezett „mass spec only”) módban a kellően tiszta standard folyamatos injektálását HPLC használata nélkül.

Annak érdekében, hogy meg tudjuk állapítani a származék tömegfragmentációs térképét, elő kellett állítani a xantil-etil-karbamátot. A xantil-etil-karbamát standard oldatot Moskalyk és Chatten publikációja alapján készítettem el (Moskalyk és Chatten, 1967). A kísérlet során 2,0 g (0,010 mol) 9-xanthidrolt és 1,0 g (0,011 mol) etil-karbamátot 15,0 ml jégcetben oldottam fel, majd 40 °C-on 30 percig termosztáltam. A termékként kapott xantil-etil-karbamát kristályokat szűrtem, majd mostam 250 ml hűtött desztillált vízzel. A származékot 1,4-dioxán-víz-aceton (4:4:2 v/v) elegyben újrakristályosítottam, majd az eredményként kapott fehér kristályokat 25 ml hűtött metanollal mostam és levegőn megszáritottam. A kihozatal 835 mg (31%) lett.

A HPLC elválasztáshoz az elúció gradiens módban történt. Az „A” eluens 0,1 %/v hangyasav tartalmú Milli Q víz, a „B” eluens pedig metanol volt. Az áramlási sebesség értékét 300 µL/percre állítottam be. A következő gradiens lépcsőt használtam: 0-3 perc 50% „B”, 3-15 perc felvitel 90% „B”-re, 15-20 perc 90% „B”, 20-20,1 perc „B” csökkentése 50%-ra. Az injektálási térfogat 10 µl, az oszlop termosztát hőmérséklete pedig 30 °C volt. A HPLC-ESI-MS/MS csatolt rendszer ezen HPLC paramétersereghez tartozó („default”) paramétereit a következőknek adódtak: ionforrás feszültség: 5500 V; függőnygáz nyomása (N₂): 25 psig; porlasztógáz nyomása: 50 psig; „turbó” porlasztógáz nyomása: 10 psi; ionforrás hőmérséklete: 300°C; ütközési gáz: 5.0 egység /dimenzió nélkül/.

A fragmentációs paraméterek optimalálása során a készülék következő beállításait vettem figyelembe a maximális érzékenység elérése érdekében:

A **DP** az ionforrásra vonatkozó paraméter. 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. Az **EP** a belépő feszültség – a keletkezett ionokat fókuszálja és „tereli” a magasabb nyomású Q0 régióban. A **CEP** az ütközési cella belépési feszültsége – az ionok mozgatásáért felelős feszültség. A **CE** az ütközési energia – a prekursor ionnal közölt energia az ütközési cellában. Minél magasabb ez az érték, annál nagyobb fokú fragmentációra számíthatunk. A **CXP** az ütközési cella kilépési feszültsége – az ütközési cellából

kilépő ionokat mozgatásáért felelő feszültség. A fragmentációs paraméterek automatikus optimálása során a készülék alábbi tartományokban dolgozik: DP: 0-400 V, EP: 0-12 V, CEP: 0-188 V, CXP: 0-58 V.

5.4.2. Xantil-butil-karbamát szintézise

A xantil-butil-karbamát standard oldatot a xantil-etil-karbamát szintézisének leírt módszerrel, azonos molarányok betartásával (1,0 g helyett 1,31 g butil-karbamát bemérésével) hajtottam végre. A kihozatal 670 mg (21%) lett. A xantil-butil-karbamát standardból három lépésben 1 mg/l koncentrációjú munkoldatot készítettem 40:60 v/v metanol-víz elegyben. A kész oldat hűtőben 1 hónapig tartható el.

5.5. Etil-karbamát mennyiségi meghatározása adalékolással (spiking) HPLC-ESI-MS-MS rendszer segítségével

A pálinkáknál ill. egyéb alkoholtartalmú italoknál a származékképzést Madrera és Walles módszerének módosításával a következő módon hajtottam végre (Madrera és Valles, 2009). Először 1-propanolt használva oldószerként 0,1 M koncentrációjú 9-xanthidrol oldatot készítettem. A vizsgálandó mintát homogenizáltam, majd 0,45 µm pórusméretű PTFE szűrőn leszűrtem. Szén-dioxiddal dúsított termék esetén a szűrletet ultrahangos fürdőben 5 percig kezeltem. Ezt követően a vizsgálandó mintából ill. a minta deklarált alkoholtartalmának megfelelő koncentrációban etanolt tartalmazó vak mintából analitikai mérleg pontossággal bemértem 7,0 ml-t egy 10,0 ml-es mérőlombikba, majd 600 µl 9-xanthidrol oldatot és 400 µl 6 M HCl oldatot adtam a mintához. Az oldatot rázással homogenizáltam, majd 10 percig állni hagytam. Ezt követően a mérőlombikot jelre töltöttem metanollal, majd 600 µl 6 M NH₃ oldatot adtam a mérőlombikhoz és azt rázással homogenizáltam. Ezt az oldatot 0,45 µm pórusméretű PTFE szűrőn leszűrtem és közvetlenül ezt használtam a kromatográfiai mérésekhez. A mérést az oldat instabilitása miatt 6 órán belül meg kell kezdeni. Munkám során nagy hangsúlyt fektettem arra, hogy a mindennapi rutin mérésekre alkalmas módszert dolgozzak ki, ezért kiemelkedően fontos volt a stabilitás kérdése, az erre vonatkozó eredményeket a 6.1.2.3. alfejezetben ismertetem.

Minden mintát három párhuzamossal (beleértve a mintaelőkészítést is) mértem meg. A mennyiségi azonosítást négy pontos adalékolással hajtottam végre a 4. táblázatban ismertetett összeállítás szerint, amelyhez a korábban felsorolt oldatokon túl még 10 mg/l koncentrációjú etil-karbamát oldatra (4:6 v/v etanol:víz elegyben) volt szükség, amelyet 500 mg/l koncentrációjú törzsoldatból készítettem 50-szeres hígítással.

A standard addíciós lépések során rögzített kromatogramokat az ESI-MS-MS szoftvere segítségével, csúcs alatti terület meghatározásával értékeljük ki. Ezen addíciós lépések tartományában az HPLC-ESI-MS-MS készülék jel/koncentráció összefüggése lineáris, így a kiértékeléshez és az analitikai mérőgörbe kialakításához egyenest illesztünk a csúcs alatti területek által meghatározott számértékekhez.

4. táblázat: Adalékolási lépések összeállítása

Várhatóan kis etil-karbamát koncentrációjú minták esetén (pl. brandy, < 100 ppb)						
Minta (μl)	Etil-karbamát standard oldat (μl)	9-xanthidrol oldat (μl)	HCl oldat (μl)	NH ₃ oldat (μl)	Végtérfogató jelre töltve metanollal (μl)	Kalibrációs lépés jele, ng/injektálás
7000	0	600	400	600	10000	0
7000	100	600	400	600	10000	0,5
7000	200	600	400	600	10000	1
7000	500	600	400	600	10000	2,5
Várhatóan nagy etil-karbamát koncentrációjú minták esetén (pl. pálinka, > 100 ppb)						
Minta (μl)	Etil-karbamát standard oldat (μl)	9-xanthidrol oldat (μl)	HCl oldat (μl)	NH ₃ oldat (μl)	Végtérfogató jelre töltve metanollal (μl)	Kalibrációs lépés jele, ng/injektálás
7000	0	600	400	600	10000	0
7000	200	600	400	600	10000	1
7000	400	600	400	600	10000	2
7000	800	600	400	600	10000	4

5.6 Mintaelőkészítés és kalibráció összes Q₁₀ tartalom meghatározásához HPLC-UV készülékkel

Az általam kidolgozott módszer alapját a 2008.7 számú AOAC eljárás (Orozco et al., 2007, Lunetta és Roman, 2008) adta. Röviden összefoglalva, 200 mg homogenizált mintát (vagy az extrakció után visszamaradó felülúszót, kinyerési hatások megállapítása céljából) 25,0 ml térfogatú mérőlombikban 3 párhuzamos alkalmazásával, 20 ml ACN:THF:víz (40:55:5 v/v %) összetételű oldattal extraháltam két lépésben, először rázógépből 30 percen keresztül, majd ezután szintén 30 percig ultrahangos fürdőben. Ezt követően a minta térfogatát az extrakciós oldattal 25,0 ml-re egészítettem ki. Az uniformizáláshoz 1,0 ml-t mértem ki ebből az oldatból 10,0 ml térfogatú mérőlombikba és 1,0 mg/ml FeCl₃ tartalmú etanol oldatot adtam hozzá. Ezt az oldatot vortex berendezéssel kevertem, szobahőmérsékleten állni hagytam 30 percig, majd HPLC eluenssel (60:35:5 v/v/v ACN:THF:víz) 10,0 ml-re egészítettem ki. A kapott oldatot 0,45 μm pórusátmérőjű PTFE szűrőn szűrtem és 10 μl-t injektáltam a HPLC-UV rendszerbe. A HPLC elemzést az AOAC

eljárás szerint, izokratikus elválasztással, 40 °C hőmérsékletre temperált oszloppal, 0,35 ml/perc térfogatáram mellett végeztem. Az összes Q_{10} koncentrációt külső kalibráció segítségével csúcs alatti területből határoztam meg. A kalibrációs pontok koncentrációi a következők voltak: 25-50-75-100 és 125 $\mu\text{g } Q_{10}/\text{ml}$.

5.7 $Q_{10}H_2$ standard oldat előkészítése kromatográfiás felhasználáshoz

A standard ubikinol oldat kromatográfiás célra történő készítését Yamashita és Yamamoto (1997) módszere alapján végeztem. A kiindulási Q_{10} standard oldatot 25,0 ml térfogatú barna mérőlombikba készítettem el oly módon, hogy 12,5 mg-ot mértem be a por kiszerelésű Q_{10} standardból, majd n-hexánnal jelre töltöttem és homogenizáltam. A kapott oldat 500 mg/l koncentrációjú lett, amelyet mélyhűtőben 1 hónapig lehet tárolni. Ebből az oldatból 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú Q_{10} standard oldatot készítettem úgy, hogy 0,5 ml tömény oldatot 10,0 ml-re töltöttem jelre n-hexánnal barna mérőlombikban. A reakcióhoz szükséges EDTA oldathoz 0,372 g EDTA nátriumsót oldottam fel ioncserélt vízben, majd 100,0 ml-es mérőlombikban ioncserélt vízzel jelre töltöttem. A homogenizált oldatból 0,1 ml-t mértem ki egy 10,0 ml-es mérőlombikba, majd ioncserélt vízzel jelre töltöttem. A végleges EDTA koncentráció így 0,1 mM lett.

A Q_{10} standard oldatot NaBH_4 segítségével redukáltam a következő módon: a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú Q_{10} standard oldatból 2,0 ml-t mértem ki egy zárható, 15 ml térfogatú centrifugacsőbe, 20 mg NaBH_4 -t és 50 μl metanolt adtam hozzá, 3 percig kevertem, majd szobahőmérsékleten, sötétbe helyeztem 5 percre. A sárga szín eltűnése jelezte a reakció végét. Ezután 1,0 mL 0,1 M EDTA oldatot adtam hozzá, majd felráztam és 2000 g terheléssel centrifugáltam szobahőmérsékleten az oldatot 2 percig. Mivel a vizes metanol nem elegyedik hexánnal és a $Q_{10}H_2$ nem a vizes-metanolos fázisba választódik ki, a hexán fázisban lévő $Q_{10}H_2$ koncentrációnak meg kell egyeznie a kiindulási Q_{10} koncentrációval (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A reakció hatásfokát HPLC-ESI-MS/MS vizsgálatokkal ellenőriztem.

5.8 $Q_{10}H_2$ standard oldat előkészítése adalékolási mintaelőkészítéshez

Alufóliába csomagolt 50,0 ml térfogatú centrifugacsőbe 20,0 ml térfogatú, 500 mg/l koncentrációjú Q_{10} standardot, 1,0 ml metanolt és 400 mg Na-borohidridet teszünk. Három percen keresztül keverjük vortex berendezéssel, majd ezt követően a fejlődő hidrogén elvezetése céljából egyszer meglazítjuk (majd visszazárjuk) a cső zárókupakját. Az időközben elszíntelenedett oldatot 5 percig kezeljük ultrahangos vízfürdőn, majd 10,0 ml EDTA oldatot adunk hozzá. Vortex berendezéssel megkeverjük, majd 3 percig centrifugáljuk. Szintén alufóliába csomagolt 50,0 ml Falcon centrifugacsőbe pipetázzuk át az ubikinolt tartalmazó n-hexán fázist (koncentráció:

500 mg/l) és ezzel végezzük el a későbbiekben az adalékolási folyamatot. Ezt az oldatot hűtőben 5 napig lehet tárolni. A két, ubikinol standard létrehozására irányuló eljárás alapparamétereit az 5. táblázat segítségével hasonlíthatjuk össze.

5. táblázat: Redukált Q₁₀ standard előkészítési paramétereinek összehasonlítása

Irodalmi módszer /Yamashita és Yamamoto (1997)/	Módosított módszer
2 ml 25 µg/ml oxidált Q ₁₀	20 ml 500 µg/ml oxidált Q ₁₀
50 µl metanol	1000 µl metanol
20 mg NaBH ₄	400 mg NaBH ₄
3 perc inkubálás	5 perc inkubálás, távozó H ₂ gáz eltávolítása
100 µl EDTA-oldat	10 ml EDTA-oldat

5.9 Mintaelőkészítési eljárások összehasonlítása étrendkiegészítők redukált Q₁₀ tartalmának meghatározásához

Öt különböző módon végeztem el 25 µg/ml koncentrációjú Q₁₀H₂ mintaoldattal az étrendkiegészítő minták extrakciójának előzetes próbáját, minden esetben három párhuzamos mérést végezve, hogy megtaláljam az ubikinol oxidációját legkevésbé kiváltó, ugyanakkor jó kinyerési hatásfokot biztosító módszert. Az ubikinol oldatokat az 500 mg/l koncentrációjú törzsoldatból 20-szoros, n-hexánal végrehajtott hígítással nyertem, és eljárásonként 4,0 ml oldattal dolgoztam, 15 mL térfogatú centrifugacsöveket használva:

- (1) 4,0 ml ubikinol oldathoz 4,0 ml gáztalanított n-hexánt adtam, és az oldatot ultrahangos szondával 2 percig kezeltem;
- (2) 4,0 ml ubikinol oldathoz 4,0 ml gáztalanított n-hexánt adtam, és az oldatot ultrahangos fürdőben 5 percig kezeltem;
- (3) 4,0 ml ubikinol oldathoz 4,0 ml gáztalanított és 1 mg/mL koncentrációban BHT-t tartalmazó n-hexánt adtam, majd az oldatot 30 percig rázóasztalon kevertettem;
- (4) 4,0 ml ubikinol oldathoz 4,0 ml gáztalanított és 1 mg/mL koncentrációban BHT-t tartalmazó n-hexánt adtam, majd az oldatot ultrahangos szondával 2 percig kezeltem;
- (5) 4,0 ml ubikinol oldathoz 4,0 ml gáztalanított és 1 mg/mL koncentrációban BHT-t tartalmazó n-hexánt adtam, majd az oldatot ultrahangos fürdőben 5 percig kezeltem.

A kezelések után az oldatokat 20 percig 4100 g terheléssel 8 °C hőmérsékleten centrifugáltam, majd 5 mM koncentrációban ammónium-formiátot tartalmazó metanollal hígítottam úgy, hogy az ubikinol elméleti koncentrációja 0,1 µg/ml legyen. A hígítást követően az oldatokat 0,45 µm pórusméretű PTFE fecskendőszűrőkön tisztítottam és a szűrt oldatokból injektáltam a HPLC-ESI-MS rendszerre.

5.10 Kalibrációs eljárások étrendkiegészítők redukált Q₁₀ tartalmának meghatározásához

Az első eljárás az adalékolás (spiking) elvét követi. Hexánban oldott 2,0, 4,0 és 8,0 ml térfogatú, 500 mg/l koncentrációjú Q₁₀H₂ standard oldatot adtam 15 ml térfogatú, alufóliával bevont centrifugacsőbe kimért, 50,0 mg tömegű homogenizált mintához, majd ezt 8 ml-re egészítettem ki gáztalanított n-hexánnal. A „nullás” kalibrációs ponthoz a kimért mintához közvetlenül 8,0 ml n-hexánt mértem. Az extrakciót ultrahangos szondával (UP 100; 100W, Hielscher, Teltow, Németország) végeztem 2 percig szobahőmérsékleten, majd 10 ml-re jelre töltöttem n-hexánnal, 20 percig centrifugáltam 4100 g terheléssel, 8 °C-on. Ezután a felülúszókból 25-25 µl-t oldottam fel 25,0 ml barna mérőlombikokba töltött, 5 mM koncentrációban ammónium-formiátot tartalmazó metanolban, és a lombikokat jelre töltöttem. Az oldatokat 0,45 µm pórusméretű PTFE filteren szűrtem az injektálás előtt. 10 µl injektálása esetén a kalibrációs pontoknak így 0-1-2 és a 4 ng Q₁₀H₂/injektálás adódik.

A második módszer egy általános addíciós módszerből áll. 50,0 mg homogenizált mintát extraháltam 8 ml gáztalanított hexánban 15 ml térfogatú, alufóliával bevont centrifugacsőben, ultrahangos szondával történő 2 perces kezeléssel. Ezt követően a mintákat n-hexánnal 10 ml-re egészítettem ki, majd 20 percig centrifugáltam 4100 g terheléssel, 8 °C-on. Ezután szűrtem az oldatot, a felülúszókból 25-25 µl-t oldottam fel 25,0 ml barna mérőlombikokba töltött, 5 mM koncentrációban ammónium-formiátot tartalmazó metanolban. A lombikokhoz jelre töltés előtt 25 µg/ml koncentrációjú Q₁₀ és Q₁₀H₂ standard oldatokból 0-100-200-500 µl-t adagoltam, így jelre töltés és szűrés után, 10 µl injektálása esetén a kalibrációs pontoknak 0-1-2 és 5 ng Q₁₀ vagy Q₁₀H₂ / injektálás adódik.

5.11 Q₁₀ koenzim mennyiségi meghatározása HPLC-ESI-MS-MS kapcsolt rendszerrel

Az eljárás adaptáció Ruiz-Jiménez és munkatársai 2007-ben megjelent cikke alapján. A Q₁₀ és Q₁₀H₂ azonosítását az ammónia-ionnal adduktot képező molekulák anyaion-leányion átmeneteinek monitorozása biztosítja, amely a Q₁₀H₂-nél az m/z 882,6 → m/z 197,2 és az m/z 882,6 → m/z 154,0 relatív tömegszámú átmeneteken, a Q₁₀-nél pedig az m/z 880,6 → m/z 197,2 és az m/z 880,6 → m/z 109,1 relatív tömegszámú átmeneteken történt. A Q₁₀H₂ mennyiségi meghatározásához az m/z 882,6 → m/z 197,1 MRM átmenet jelének intenzitását mértem, míg a Q₁₀-nél a az m/z 880,6 → m/z 197,2 átmenetet.

5.12 Vizsgálati minták etil-karbamátra

Az etil-karbamát koncentrációját az első mérések alkalmával 20 pálinka mintában vizsgáltam. A minták házi főzésből, különböző termőterületről, eltérő termesztési és főzési technológiával, ugyanakkor az Európai Unió szabályainak megfelelő (EEC No. 1576/89) pálinkafőző üzemekből származnak. A házi főzésből származó pálinkák alapanyaga a következő 14 gyümölcsfajta volt: som (*Cornus mas* L.), birs (*Cydonia oblonga* Mill.), eper (*Fragaria X. Ananassa* L.), alma (*Malus domestica* L.), faeper (*Morus nigra* L.), kajszibarack (*Prunus armeniaca* L.), cseresznye (*Prunus avium* L.), meggy (*Prunus cerasus* L.), szilva (*Prunus domestica* L.), őszibarack (*Prunus persica* L.), körte (*Pyrus communis* L.), ribizli (*Ribes rubrum* L.), csipkebogyó (*Rosa rubiginosa* L.) és berkenye (*Sorbus domestica* L.). A minták deklarált alkohol tartalma 45-62^v/_v% között mozgott, amelyet Milli-Q vízzel 40%-ra állítottam be. Ezt követően a saját készítésű pálinka minta is vizsgálatra került, amely vegyes gyümölcsökből készült, és később referencia anyagként vett részt a módszer akkreditálásában.

5.13. Vizsgálati minták Q₁₀ koenzimre

Kereskedelmi forgalomban kapható Q₁₀ étrendkiegészítő tablettákat és gélkapszulákat vizsgáltam összesen 12 készítményt, amelyeken egyik esetben sem tüntette fel a hazai vagy kínai gyártó/forgalmazó, hogy tartalmazna redukált Q₁₀ koenzimet. Minden egyes mintát közvetlenül a mintaelőkészítés előtt bontottam fel, 10 kapszula/tabletta tartalmát homogenizáltam és mértem meg. A megfelelő homogenitás eléréséhez a tablettákat dörzsmozsárban egyneműsítettem.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1 Etil-karbamát meghatározás

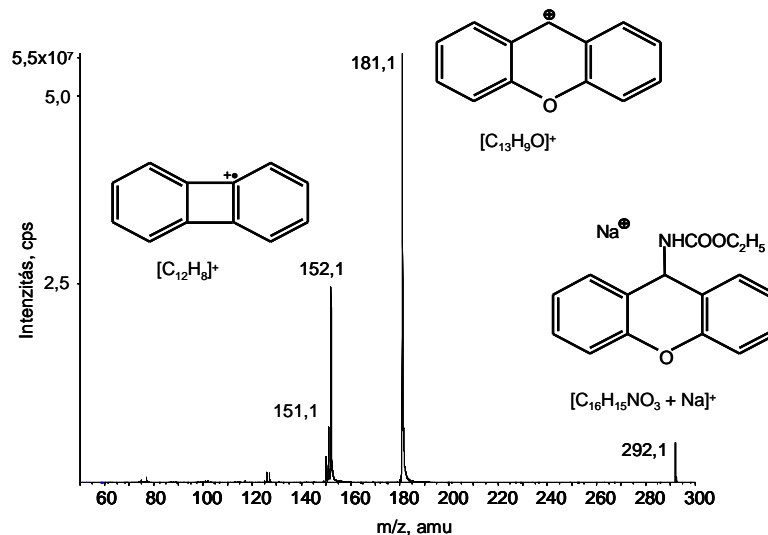
6.1.1 A xantil-etil-karbamát MS/MS fragmentációs viselkedése és ESI-MS/MS meghatározásának optimalizálása

Bár ez a vegyület közvetve rendelkezésre állt attól a pillanattól kezdve, hogy legelőször végrehajtották oldatban az etil-karbamát 9-xanthidrolos származékképzését (Giachetti et al., 1991), magának a vegyületnek a kitisztítása legalább optimalizációs szintű fokra korábban még nem történt meg. Ebből fakadóan a származék ESI-MS/MS viselkedése nem volt szakirodalomban hozzáférhető.

A fragmentációs paraméterek optimális beállításához 50 mg/l koncentrációjú, 60:40 v/v% víz:(metanol+0,1 v/v% hangyasav) oldatban elkészített xantil-etil-karbamát standardot juttattam be fecskendőpumpán keresztül a tömeganalizátorba 20 µL / perc térfogatárammal. Az automatikus Q₁-optimalizálás a következő paramétersereget eredményezte: DP: 61 V, EP: 8 V, CEP: 16 V, CXP: 4 V. Ezek az adatok, amelyek közül a DP tekinthető a legfontosabbnak, nem tükröznék szélsőséges instabilitási vagy addukt (ill. dimer)-képző tulajdonságot; ugyanakkor nyilvánvalóvá vált, hogy a várt, $[C_{16}H_{15}NO_3+H]^+$ molekulaion helyett kizárólag $[C_{16}H_{15}NO_3+Na]^+$ adduktot tudunk kimutatni. A Na⁺ addukt képződése a legtöbb esetben lehetetlenné teszi az MRM eljárás végrehajtását, ugyanis a Na⁺ ion leszakadása után keletkező semleges molekula tömegspektrometrián nem kezelhető. Ugyanakkor, ahogy azt N-metil-karbamát peszticidek vizsgálata során már leírták (Garcia et al., 2007; Goto et al., 2003), egyes karbamát származékok nem csupán jól ionizálódnak, hanem értékelhető fragmentációs viselkedést is mutatnak Na-adduktként.

Kísérleteink szerint (13. ábra) ez történik a xantil-etil-karbamáttal is: nem a nátrium ion szakad le önmagában, hanem a teljes származékolt aminocsoport, így egy xanthidrol-fragmens (m/z 181,1, $[C_{13}H_9O]^+$) és annak egy ESI-MS esetén ritkának mondható, páratlan elektronszámú gyökös fragmense (m/z 152,1, $[C_{12}H_8]^+$) keletkezik, mindkettő kimagasló intenzitással. Érdekes, hogy ez a fragmentáció – részben az OE ion képződése miatt – hasonlít a Giachetti és mtsai által leírt GC-EI fragmentációra.

Az ábráról is leolvasható intenzitások alapján az m/z 292,1 → m/z 181,1 átmenet a mennyiségi, míg az m/z 292,1 → m/z 152,1 átmenet a minőségi szereppel bír. Az optimalizált MRM átmenetek Q₂ ütközési energiája 23 V (m/z 292,1 → m/z 181,1) és 83 V (m/z 292,1 → m/z 152,1) értékeknek adódott.

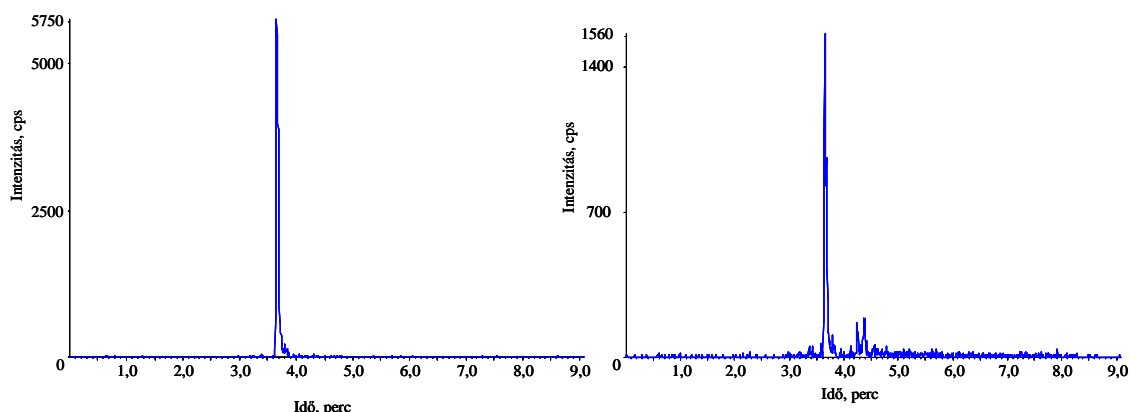


13. ábra: A xantil-etil-karbamát fragmentációs spektruma

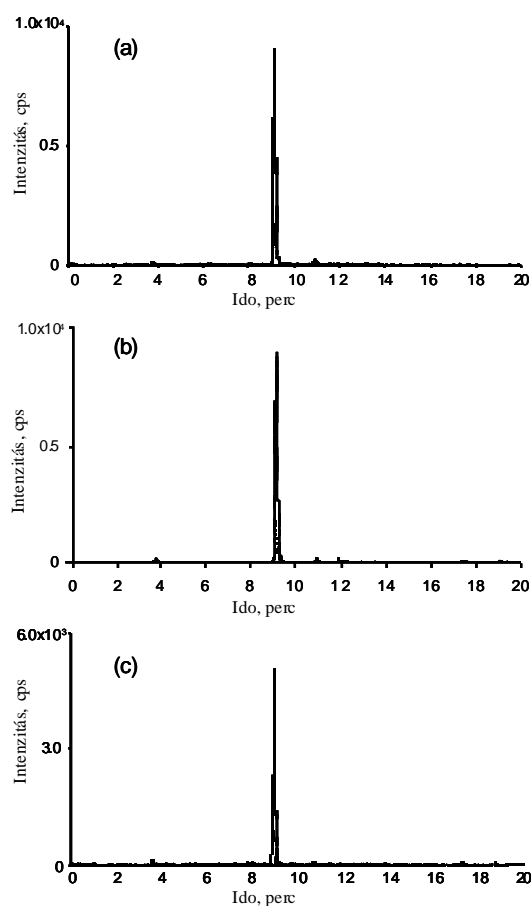
6.1.2 Validáláshoz szükséges teljesítményjellemzők megállapítása

6.1.2.1 Szelektivitás

Az 5.5 és 6.1.1 alfejezetekben ismertetett eljárással a FAPAS T1358 brandy típusú minta vizsgálata során kapott MRM – extrahált ion kromatogramokat a 14. ábra mutatja. Bár a brandy jól összetettebb mátrix, mint a célmátrixnak szánt pálinka, nem tapasztalható számottevő zavarás a figyelt retenciós idő környékén. Ezt követően mind a 14, különböző gyümölcsből készített pálinkaminta mérése is sorra került, de egyetlen esetben sem találtunk zavarást (15. ábra). Mindez azt jelzi, hogy a Park et al. (2007) tanulmányban származékképzés nélkül vizsgált etil-karbamát MRM átmenetek mátrixhoz köthető zavarása a származékképzéssel (feltehetően a relatív tömegnövelésnek m/z 90 helyett m/z 292/ köszönhetően) jelentős mértékben csökkenthető.



14. ábra: FAPAS T1358 brandy minta MRM kromatogramjai; t_R (xantil-etil-karbamát)=3,65 perc. Bal ábra: mennyiségi átmenet; jobb ábra: minőségi MRM átmenet



15. ábra: Xantil-etil-karbamát MRM spektruma birs (a), kajszibarack (b) és berkenye (c) pálinkáknál

6.1.2.2 Mennyiségi teljesítményjellemzők

Az LOD és az LOQ értékeit két módon állapítottam meg. Egyrészt xantil-etil-karbamát standardot oldottunk fel 40 % etanolban, és a kromatográfiás csúcs előtti tartományból ($t_R=2,5-3,0$ perc) számítással határoztuk meg a LOD (alapzaj + alapzaj szórásának háromszorosa) és LOQ (alapzaj + alapzaj szórásának tízszerese) paramétereket (ld. 6. táblázat). Ezen eljárás mód azonban nem tükrözi a mintaelőkészítéssel és a mintamátrixszal bejutó esetleges zavaró komponensek és a természetesen megnövekvő zaj miatti jel/zaj viszony romlását, így a számítást elvégeztük egy elméletileg etil-karbamátot nem hordozó valódi minta, csipkebogyó pálinka mérésével is. Az így kapott LOD és LOQ értékek valamivel magasabbak lettek ugyan, azonban a 2. táblázattal való összevetésben azonos nagyságrendbe esik a legtöbb GC-MS módszer hasonló paraméterével és a jóval kevésbé szelektív HPLC-FD módszerekkel (de Melo Abreu et al., 2005; Madrera és Valles, 2009; Park et al., 2007).

A standard oldattal meghatározott mérési tartomány (5,1-1000 $\mu\text{g/l}$) alapján a kidolgozott módszer lehetővé teszi az EU által javasolt határérték (1 mg/l) ellenőrzését külön célkomponens-dúsítás

nélkül, közvetlen mintabeméréssel és minimális mintaelőkészítés után. Ezt igazolja az is, hogy az adalékolással kapott kalibrációval történő minta-visszamérések 97%-ot meghaladó visszanyerési hatásfokot mutattak a vizsgált pálinkaminták esetében.

Ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy a kalibrációs egyenesek meredekségének különbözősége a kis szórásértékkel együtt erős mátrixfüggést mutat. Az a tény, hogy például a sárgabarack és körte pálinka mátrixok etil-karbamát mérésre kifejtett hatása 50%-kal eltérő érzékenységekben ölt testet, legalább mátrix illesztett adalékolást irányoz elő, ami viszont a GC-MS módszerekhez képest számottevő hátrányt jelenthet egyidejűleg mérendő, különböző alapanyagból készített italok esetén.

6. táblázat: Módszervalidálási paraméterek

	Xantil-etil-karbamát standard etanol oldatban	Adalékolás csipkebogyó pálinkában	Adalékolás körte pálinkában	Adalékolás sárgabarack pálinkában
LOD, µg/l	2,0	2,8	-	-
LOQ, µg/l	5,1	8,0	-	-
Mérési tartomány, µg/l	5,1-1000	-	-	-
Adalékolás visszanyerési hatásfoka	>99%	>97%	>97%	>98%
Egyenes meredeksége ± SD, n=3	3692±31, n=3	4561±79, n=6	4910±53, n=6	3263±20, n=6
Korrelációs együttható	0,9999	0,9950	0,9960	0,9990

Bár az a jelenség, hogy egyes mátrixok a célkomponensre kapott jel növekedését, mások pedig a szupresszióját okozzák, kellő alapossgal dokumentált a HPLC-ESI-MS/MS rendszereknél (Kmellár et al., 2008; Niessen et al., 2006), elvileg nem zárhatjuk ki, hogy kézzelfoghatóbb indok áll a háttérben. Mivel Na-adduktról van szó, a minta és a mintaelőkészítésnél felhasznált oldatok Na-tartalma befolyásolhatja a $[M+Na]^+$ képződését és intenzitását. Lachenmeier et al. (2009) közleménye szerint az égetett szeszes italok nátrium-koncentrációja gyártmánytól függően Magyarországon 4,8 – 147 mg/l között helyezkedik el, tehát több mint egy nagyságrendben változhat – mindenesetre még a legkisebb érték is azt jelenti, hogy az etil-karbamát moláris koncentrációját közel 20 x meghaladó mértékű nátrium ion jut be a mintaelőkészítésnél magából a mintából is a reakcióelegybe még akkor is, ha 1 mg/l etil-karbamát koncentrációt feltételezünk. Ebből az következik, hogy mivel a nátrium mindig sokszoros „feleslegben” van jelen a mintában, nem ez a mátrixalkotó a felelős a különböző pálinkák mérésénél tapasztalt érzékenység-eltérésért. A kidolgozott mérési eljárás pontosságának meghatározásához sajnos nem áll rendelkezésre etil-karbamátra hitelesített CRM, ezért két, kereskedelemben is hozzáférhető FAPAS brandy

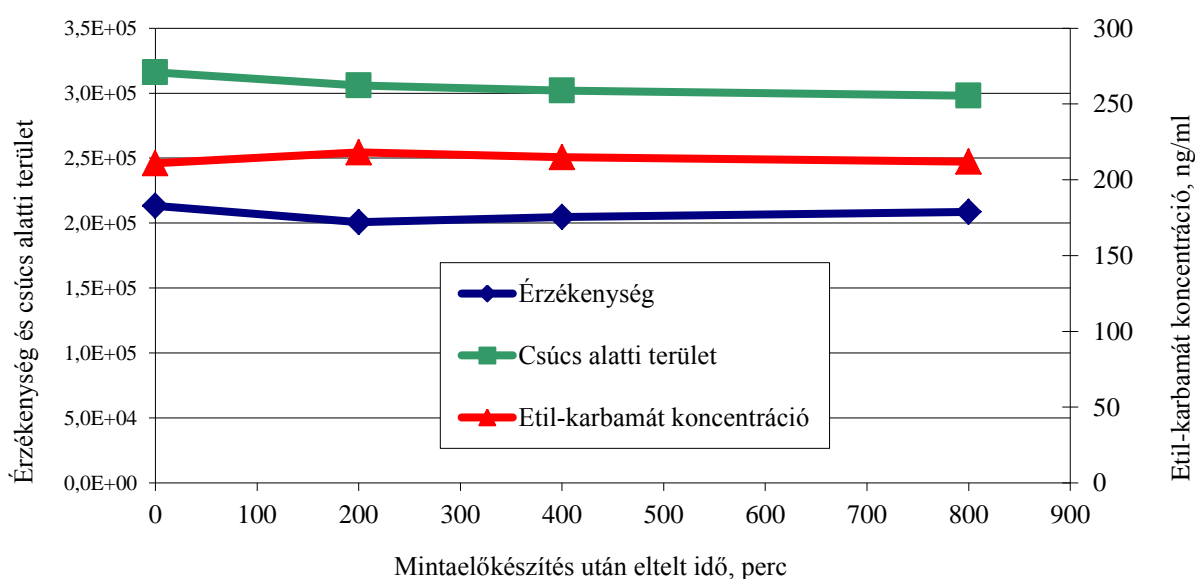
referenciaanyagot vizsgáltunk meg. A kapott eredmények (7. táblázat) azt igazolják, hogy az eljárásunk pontosnak tekinthető.

7. táblázat: FAPAS LRM minták etil-karbamát tartalmának meghatározási eredményei

Minta megnevezés	Mért mennyiség (ng/ml)	Dokumentált elfogadási tartomány (ng/ml)
	Etil-karbamát	
T1358	211	143-331
T1362	82	40,4-103,9

6.1.2.3 Stabilitás

A származékképzés során kialakuló xantil-etil-karbamát stabilitásáról a vonatkozó közlemények azt emelik ki, hogy pH=2-2,5 kémhatáson a származék órákon át stabil (Herbert et al., 2002, Ajtony et al., 2013), míg ennél savasabb pH értéken gyors bomlást mutat, amely például 0,75 M sósavoldat használatánál meghaladja óránként a 17%-ot, míg 0,15 M sósav használata esetén a 3%-ot. Az általunk használt eljárásrendben a 0,3 M koncentrációjú, a származékképzést 10 perc alatt teljessé tévő sósav szignifikáns mértékben hozzájárulhatott volna hosszabb távon a származék bomlásához, így a reakcióidő lefutását és a jelre töltést követően ammóniaoldat hozzáadásával puffereltük kevésbé savas tartományba a reakcióközeget. Ugyanakkor lúgos kémhatáson az észterek hidrolízise következhet be, így meg kellett határozni, hogy a mintaelőkészítést követően milyen hosszú ideig lehet a kész analitikai mintaoldatot mérésre felhasználni. Mint ahogy a 16. ábrán látható, az ammóniával stabilizált, pH papírral pH=10 körüli kémhatásúnak mért oldatból még 800 perc (>12h) után is kellő pontossággal és érzékenységgel lehetett a T1358 számú FAPAS mintában meghatározni a célkomponens mennyiségét.



16. ábra: Mintából származó xantil-etil-karbamát stabilitásvizsgálata

A stabilitásvizsgálat során alkalmazott FAPAS LRM minták mérésekor az egymást követő négy kalibrálási sorozat lehetővé tette a kalibrációs összefüggés meredekségének (érzékenység) és a tengelymetszet szórásának meghatározását. A FAPAS T1358 minta meredekségének szórása 2,6%-nak, míg a tengelymetszet szórása 1,6%-nak adódott. A FAPAS T1362 minta meredekségének szórása 4,0% lett, a tengelymetszet szórása pedig 2,0%.

6.1.3 Pálinkaminták mérési eredményeinek bemutatása

A 8. táblázat tartalmazza a 14féle gyümöcsből készített pálinka minták mérési eredményeit. Két minta tartalmaz 1 mg/l –nél nagyobb mennyiségben etil-karbamátot, a meggy és a szilva (ld. piros jelölés). Ennek oka adódhat egyrészt a technológiai feldolgozásból: akár a cefrekészítés, akár a főzés során előfordulhat, hogy sérül a magház, amigdalín szabadul fel, amely a lepárlás végén etil-karbamátot eredményez (EUR-Lex, 2010). Érdeemes megjegyezni, hogy bár a szóban forgó két minta házi készítésű, a nagy nevű hazai gyártók esetében sem ritka az 1 mg/l érték túllépése (Nagygyörgy és Kőpataki, 2010, Horváth, 2013, Magyarósi, 2011). Nagygyörgy (2013) rámutatott arra, hogy az általuk vizsgált 1884 db. magyar pálinka mintából 132 db minta etil-karbamát tartalma meghaladta az 1 mg/l értéket, tehát a probléma messze nem tekinthető megoldottnak.

8. táblázat: Etil-karbamát koncentráció a különböző hazai párlatokban. Ü – üzemi lepárlás, H – házi készítés. Az eredmények három párhuzamos mérés átlagát mutatják.

Minta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gyümölcs alapanyag	som	birs		eper	alma		faeper	sárgabarack		meggy
Előállítás módja	H	Ü	H	H	Ü	H	H	Ü	H	H
Etil-karbamát koncentráció µg/l	<LOD	860	721	<LOD	137	210	<LOD	113	525	1390
Minta	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Gyümölcs alapanyag	cseresznye		szilva		barack	körte		fekete-ribiszke	csipkebogyó	berkenye
Előállítás módja	Ü	H	Ü	H	H	Ü	H (bio)	H	H	H
Etil-karbamát koncentráció µg/l	310	475	422	2609	<LOD	105	30	<LOD	<LOD	106

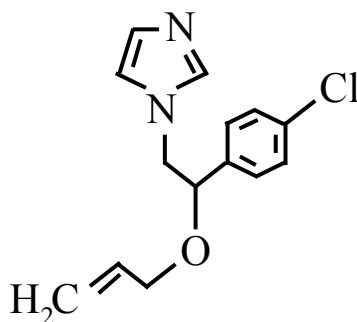
A mért eredmények közül a házi készítésű eper pálinka minta esetén az átlagos etil-karbamát koncentráció 2609 µg/l-nek adódott, míg a mérések szórása 5,4% lett. Az összes többi minta során mért eredmények szórása ennél kisebb, ezért külön nem tüntettem fel. Az eredmények közül mindenképpen külön kell szót ejteni a birsalma pálinkákról, ugyanis a mag nélküli alapanyag

ellenére viszonylag nagy mennyiségben mutattuk ki az etil-karbamátot. Csak közvetett információkkal rendelkezünk a birsalma magjainak amigdalín koncentrációját illetően (Hernandez et al., 2004), és a szabad N-karbamil-aminosavak (amelyek szintén az etil-karbamát prekursorai) mennyisége a magban és a gyümölcshúsban nem jelentős (Silva et al., 2005; Silva et al., 2004). Ez azt jelenti, hogy további adatgyűjtésre, szerves- és műtrágya alkalmazásbeli különbségeinek vizsgálatára van szükség, hogy meg tudjuk mondani, mi okozza a birsalma pálinka magas etil-karbamát tartalmát.

6.1.4 Kísérlet új belső standard bevezetésére etil-karbamát mennyiségi meghatározására

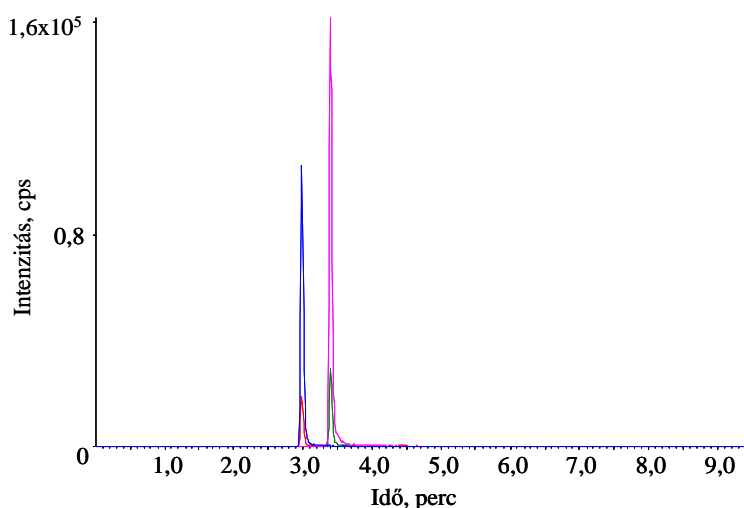
A Magyar Borkönyvben (2002) alkalmazott gázkromatográfiás-tömegspektrometriás módszer borokban található etil-karbamát meghatározására szolgál 10-200 µg/l koncentrációban. A mérés során belső standard vegyületként propil-karbamátot használnak, amely azonban kereskedelmi forgalomban nem beszerezhető, előállítása időigényes és a vegyület nem stabil. Ahogyan a 3.4.6. Fejezetben bemutattam, bár az ideális belső standard az etil-karbamát deuterált formája lenne, aktuális egységárából fakadóan ésszerű lépésnek tűnt kiváltani könnyebben hozzáférhető vegyülettel.

Munkám során kísérletet tettem új belső standard vegyületek kiválasztására. A csupán a méréshez kapcsolódó jelkorrekcióra a kizárólag déligyümölcsök posztharvest kezelésére engedélyezett fungicid, az imazalil (17. ábra) megfelelőnek tűnt, mivel fordított fázisú HPLC oszlopon a célkomponenshez (xantil-etil-karbamáthoz) hasonló hidrofób tulajdonságokkal bír, oldékonysága, molekulatömege, pozitív ionizációs módban történő fragmentálhatósága, a xantil-etil-karbamáthoz hasonló fragmenstömegei (m/z 297.2 \rightarrow m/z 159.0 és m/z 297.2 \rightarrow m/z 201.0; Kmellár et al., 2008) pedig alkalmassá teszi az ESI-MS-MS vizsgálatokhoz. Fontos kiemelni, hogy bár az imazalil és az XEC retenciós ideje nem egyezik (18. ábra), és így a mátrixhatás által kiváltott érzékenység csökkenés nem követhető nyomon, számos szabványos eljárás elfogadja az ilyen elveket követően kiválasztott belső standard alkalmazását – példaként a több száz peszticid egy futamban történő mérésénél használható trifenil-foszfát említhető (Sanco/10684/2009).



17. ábra: az imazalil fungicid szerkezeti képlete

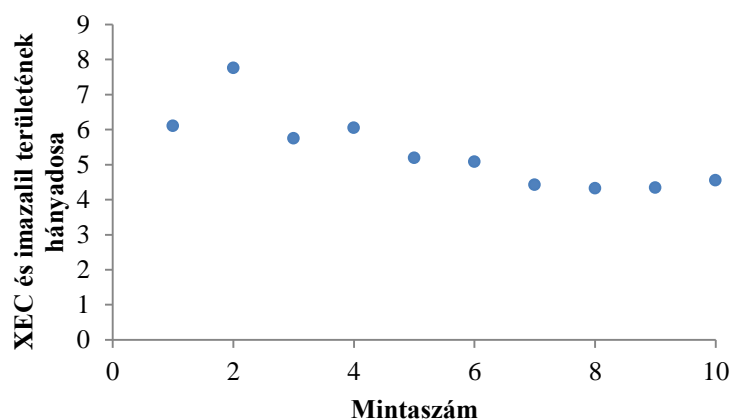
Az imazalil használhatóságának igazolásához ismételhetőségre vonatkozó kísérleteket végeztem. Ugyanabból a 0,01 mg/l mennyiségben etil-karbamátot tartalmazó 20,0 ml térfogatú pálinkamintához a mintaelőkészítés során 200 µl mennyiségben adagoltam 5 ppm koncentrációjú imazalilt, majd 15 egymást követő alkalommal injektáltam a 6.1.1. fejezetben ismertetett MRM paraméterek beállításával a mintaoldatból, amelyben így az imazalil koncentrációja 0,05 mg/l-nek adódott.



18. ábra: az imazalil ($t_R=2,98$ perc) és a xantil-etil-karbamát ($t_R=3,46$ perc)

HPLC-ESI-MS-MS vizsgálattal kapott, extrahált MRM kromatogramjai. A két komponens kromatográfiai felbontása 5,0.

A 19. ábrán jól látható, hogy bár a célkomponens jele egy nagyságrendbe esik az imazalil válaszjelével és a két jel aránya elvileg megfelelő lenne az eljáráshoz, különösen az első öt injektálás során az arány nem várt ingadozást mutatott. Elméletileg ugyanis legfeljebb kismértékű csökkenést kellett volna tapasztalni, ami az imazalil stabil és a XEC bomló jellegéből következett volna, azonban a ± 30 -40%-os kilengés nem indokolható sem műszer instabilitással, sem pedig injektálási problémákkal.



19. ábra: Imazalil belső standarddal végzett xantil-etil-karbamát meghatározás ismételhetősége

Különböző statisztikai próbák léteznek annak megállapítására, hogy valamely érték kiugró vagy sem. Kísérleteim során az ún. Dixon féle Q-tesztet végeztem el, hogy megállapítsam, a 19. ábrán és a 9. táblázatban ismertetett adatok között tekinthető-e bármelyik kiugrónak.

9. táblázat: Imazalil belső standarddal végzett ismételhetőségi vizsgálat mérési eredményei

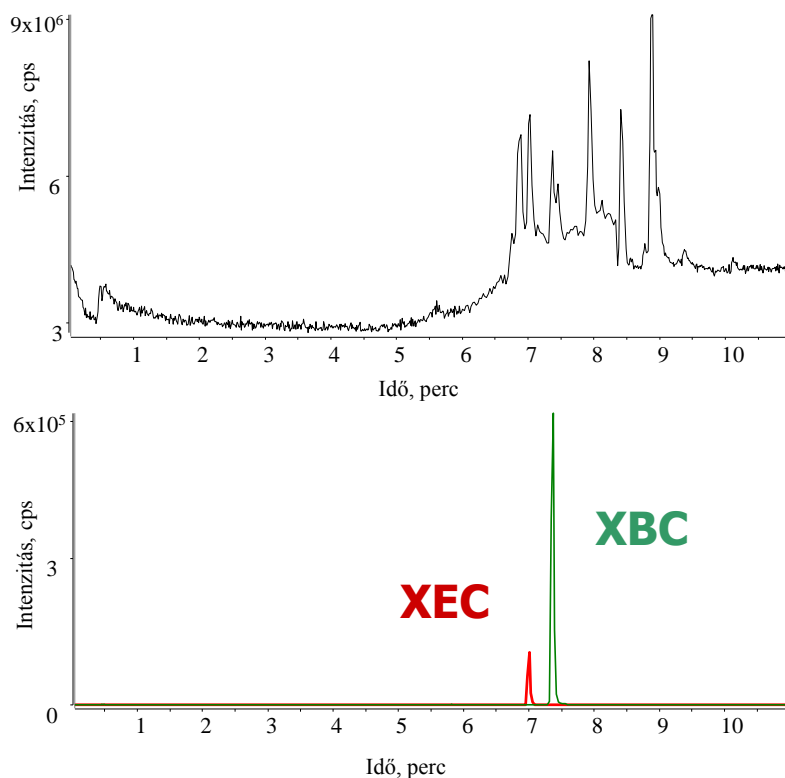
Xantil-etil-karbamát csúcs alatti területe,cps	Imazalil csúcs alatti területe, cps	Hányadosuk
824000	135000	6,1037
892000	115000	7,7565
868000	151000	5,7483
853000	141000	6,0496
794000	153000	5,1895
758000	149000	5,0872
717000	162000	4,4259
684000	158000	4,3291
664000	153000	4,3399
687000	151000	4,5497

A teszt során a $Q = \frac{\text{köz}}{\text{terjedelem}}$ mennyiséget kell kiszámolni és egy táblázatból vett Q_{KRIT} értékkel összehasonlítani. Ha a $Q > Q_{\text{KRIT}}$, akkor a gyanús érték valóban kiugró. A terjedelem a legkisebb és a legnagyobb mért érték közötti távolság, a köz pedig a „gyanús” érték és a legközelebbi szomszédja közti távolság.

$$Q = \frac{7,7565 - 6,1037}{7,7565 - 4,3291} = 0,4822$$

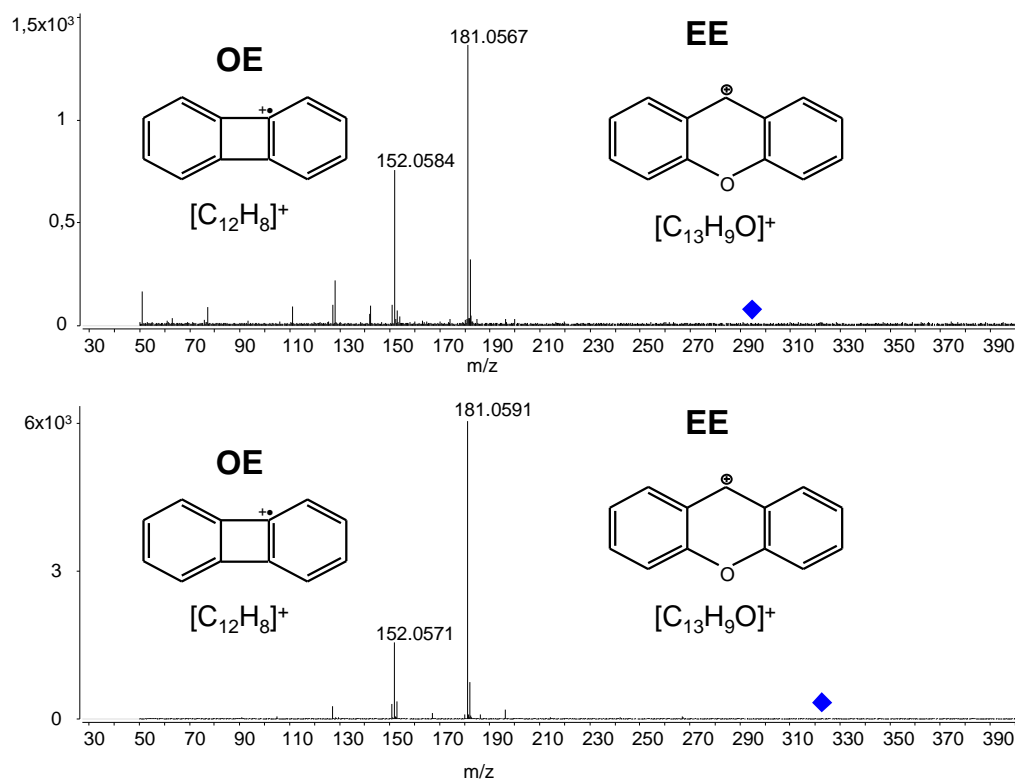
Mivel 90%-os megbízhatósági szinten 10 adatra a $Q_{\text{KRIT}}=0,412$, aminél a Q értéke nagyobb, ezért az adat kiugrónak számít, tehát szignifikánsan különbözik a többi értéktől. Ebből az a következtetés vonható le, hogy az imazalil nem alkalmazható belső standard célokra ebben a mérési összeállításban.

A következő, általam belső standard célokra szánt vegyület a butil-karbamát volt, amely a Magyar Borkönyvben nevesített propil-karbamáttal ellentétben kereskedelmi forgalomban elérhető, az etil-karbamáttal analóg vegyület, kromatográfiás szempontból közel áll a célkomponenshez, valamint – mivel a mintaelőkészítés során részt vesz a célkomponenssel azonos származékképzési folyamatban – használata ideális lehet belső standard vegyületként. A xantil-butil-karbamát kromatográfiás és fragmentációs vizsgálatát nagyfelbontású tömegspektrométerrel (HPLC-ESI-QTOF-MS) hajtottam végre. Ahogy a 20. ábráról látható, a xantil-butil-karbamát – a xantil-etil-karbamáthoz hasonlóan Na-adduktént – a hosszabb alifás oldallánc miatt később eluálódik az RP-HPLC oszlopról, mint a xantil-etil-karbamát. Ugyanakkor a két vegyület fragmentációs viselkedése teljes mértékben egyezik (21. ábra): az aminosocportnál történő fragmentációt követően a xanthidrol ugyanazon fragmensei jelennek meg intenzív ionként a folyamatban.



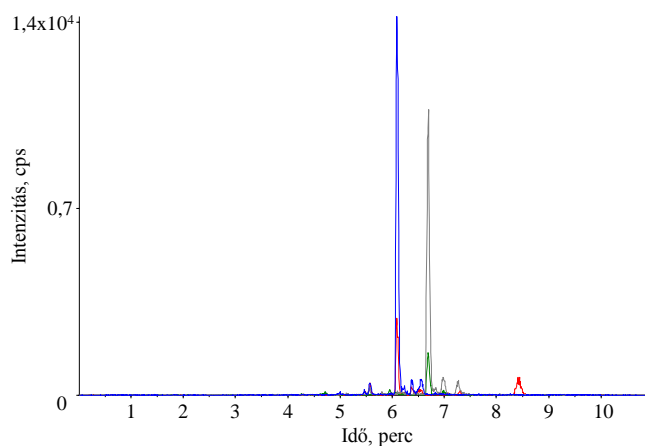
20. ábra: Xantil-etil-karbamát (XEC, $[\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_3 + \text{Na}]^+$, m/z 292,09441) és xantil-butil karbamát (XBC, $[\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_3 + \text{Na}]^+$, m/z 320,12571) standardok HPLC-ESI-QTOF-MS vizsgálata. A felső kép a teljes letapogatást (full scan), míg az alsó kép a két komponens extrahált ion kromatogramját mutatja, a monoizotópos tömeg ± 10 mDa keresőparaméterekkel. Kromatográfiás felbontás értéke: 1,6.

A fragmensek ismeretében kiegészítettem a 6.1.1. alfejezetben leírt, hármas kvadrupol készülékkel történő mennyiségi elemzés módszerét a xantil-butil-karbamát adataival, amelyek a Q₁ tömegektől eltekintve minden paraméterben, még az ütközési energiában is egyeztek.



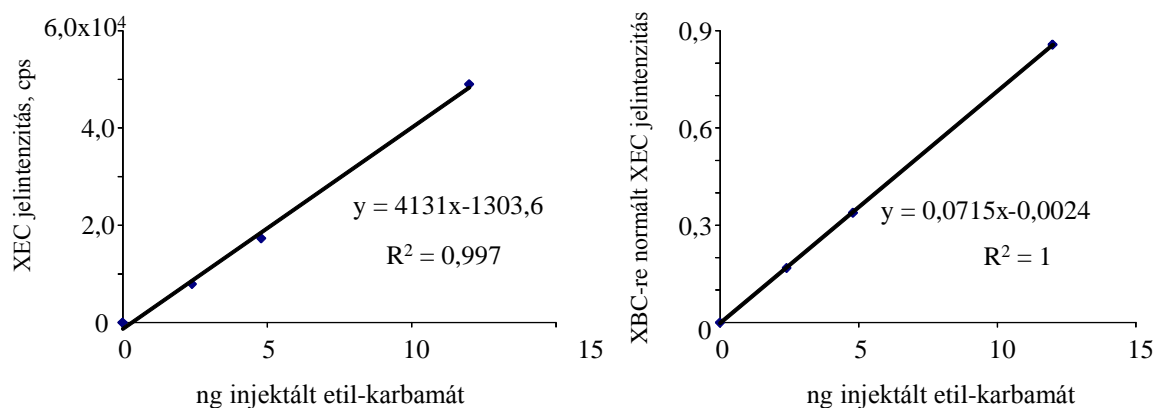
21. ábra: Xantil-etil-karbamát (felső kép) és xantil-butil karbamát (alsó kép) standard vegyületeinek HPLC-ESI-QTOF-MS-MS fragmentációs vizsgálata. A kék rombusz az anyaion helyét jelzi a tömegspektrumban.

Abból a célból, hogy kivizsgáljam, éri-e az új MRM átmeneteket zavarás a mintamátrixból, a T1362 számú FAPAS brandy LRM mintaelőkészítését kibővítettem 100 µg/l koncentrációban 40:60 % metanol-víz elegyben oldott butil-karbamát hozzáadásával a származékképző 9-xantheidrol bemérése előtt. Ahogy a 22. ábrán látható, a xantil-butil-karbamát átmeneteit sem éri számottevő zavarás, így feltételezhető volt, hogy a pálinkaminták esetén is alkalmazható lesz.



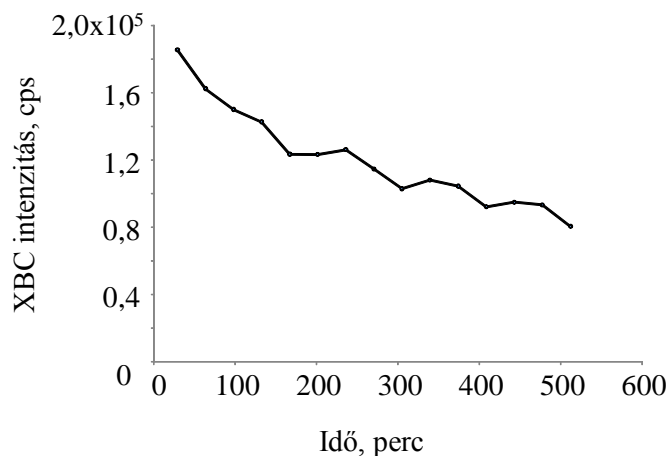
22. ábra: Xantil-etil-karbamát ($t_R=6,01$ perc) kimutatása FAPAS brandy-ből HPLC-ESI-MS-MS rendszerrel, xantil-butil-karbamát ($t_R=6,81$ perc) belső standard adagolásával. Kromatográfiás felbontás értéke: 2,9.

Ezt követően a rendelkezésre álló pálinkamintákat megvizsgáltam az előbb leírtakhoz hasonló módon, 100 $\mu\text{g/l}$ végkoncentrációjú butil-karbamát belső standard adagolásával, ugyanakkor a lépések során nem hagytam ki a korábbi kalibrációs eljárásához szükséges etil-karbamát adalékolási lépéseket sem, hogy összevethető tegyem a két módszert. Ahogyan a 23. ábrán látható, mind az adalékolással, mind pedig a belső standarddal korrigált kalibrációs egyenes megfelelő illeszkedést mutatott, és a belső standardra normált kalibráció értéke szignifikánsan jobbnak is bizonyult – amiből elméletileg az következik, hogy a minden mintával végrehajtandó adalékolási lépések helyett át lehetne térni a butil-karbamát, mint belső standard alapú kalibrációra.



23. ábra: Adalékolással (balra) ill. xantil-butil-karbamátra való normálással (jobbra) végrehajtott etil-karbamát mennyiségi meghatározás barackpálinka mintából

A kísérletek során azonban nyilvánvalóvá vált, hogy az eljárás mégsem működőképes: ahogy a 24. ábrán látható, a xantil-etil-karbamáthoz képest a xantil-butil-karbamát nem stabil hosszabb távon az oldatban, és már egyetlen óra időtartamot követően is jelentős mértékben bomlik.



24. ábra: A xantil-butil-karbamát intenzitásának csökkenése az idő függvényében

A 24. ábra alapján kijelenthető, hogy bár elméletileg a butil-karbamát megfelelő belső standard vegyület, a mérési adatok ezt nem igazolták, így kísérleteim nem vezettek pozitív eredményhez. Ebből fakadóan feltételezhető, hogy a borkönyvi módszerben ismertetett, propil-karbamátra épülő eljáráson túl, egyedi módszer fejlesztése során a deuterált etil-karbamát választása marad a célravezető technika. Hosszabb távon, nagy mintamennyiség (pl. Nagygyörgy /2013/ által említett ~ 2000 mintás mérési sarzsra számítva) esetében 10 ml mintánként, 100 µg/l végkoncentrációjú deuterált etil-karbamát oldat összesen 1 µg deuterált standardot igényel, amely így mintánként (kizárólag az alapanyag-beszerzést számolva) ~ 400 forinttal emeli meg a mérés költségét úgy, hogy az 1 g deuterált standardból elméletileg még több tízezer mintára elegendő mennyiség marad.

6.1.5 A kidolgozott etil-karbamát meghatározási módszer kiterjesztett mérési bizonytalanságának számítása

Az ebben a fejezetben tárgyalt kísérleti munkám célja az volt, hogy rámutassak az általam kidolgozott módszer kritikus pontjaira, meghatározzam a mérések során végrehajtott lépések bizonytalanságát, valamint azt, hogy a részfolyamatok bizonytalansága hogyan hat a végeredmény bizonytalanságára.

A kiterjesztett mérési bizonytalanság számítással történő meghatározását egy olyan pálinka minta példáján keresztül dolgoztam ki, amelynek etil-karbamát koncentrációja 321,6 ng/ml volt. Ezt az értéket a gyakorlatban úgy kaphatom meg (5.5 alfejezet), hogy ugyanazon pálinkamintából

négyszer 7,0 ml-t mérek szét négy mérőlombikba, amelyből egy kontroll, három pedig az adalékolás célját szolgálja. Így egy minta meghatározása valójában négy mérést jelent, hiszen így kaphatom meg a számításhoz feltétlenül szükséges érzékenységet (=analitikai mérőgörbe meredeksége). A képletekben és a számítások során a mértékegységeket a gyakorlathoz igazítottam: példának okáért 10 ml szerepelhet 10000 µl-ként is, hogy jobban nyomon lehessen követni a bizonytalansággal terhelt értékek változását.

A számítások bemutatása előtt ki kell emelnem, hogy mivel a rendelkezésre álló etil-karbamát standard (Sigma) nem hiteles anyagminta, hanem csupán nagy tisztaságú standard vegyület, a gyártó nem mellékelte hozzá bizonytalansági adatot. Ebből fakadóan a bizonytalansági mérlegekben a standard tisztaságából származó bizonytalansággal nem számoltam, ami – mint látni fogjuk a későbbiekben mérleg megoszlását – ennél a konkrét mérési eljárásnál feltételezhetően nem befolyásolta volna a végeredményt.

Első lépésként azt a függvényt kellett definiálnom, amellyel a végeredmény közvetlenül kiszámolható. A függvényt úgy kellett tényezőkre bontanom, hogy az összes, mérési bizonytalanságot okozó lépés külön azonosítható legyen. Az első képlet az adalékolási sor első, „nullás” pontjának meghatározásához tartozik:

$$c = \frac{A}{a} \cdot \left(\frac{V_1 + V_2}{V_3} \right) \cdot \frac{1}{2 \cdot V_4}$$

1. képlet

ahol „c” a minta etil-karbamát koncentrációja (ng/ml), „A” a kapott csúcs alatti terület (cps), „a” a mérés érzékenysége (cps/ng etil-karbamát injektálás), „V1” a mérőlombik névleges térfogata (10 ml–10000 µl), „V2” a mérőlombikhoz utólag adagolt ammónia térfogata (0,6 ml–600 µl), „V3” a HPLC injektálási térfogata (10 µl), „V4” pedig a pipettázott minta térfogata, amelyet 2x3,5 ml-ként mérünk be (3,5 ml). A V4 jellege miatt ez a hat tényező valójában hét hozzájárulást jelent a mérési bizonytalanság számítási rendjében.

Fontos megjegyezni, hogy ugyan a HPLC-ESI-MS készülékbe az injektáláskor nem etil-karbamát, hanem xantil-etil-karbamát jut (tehát a meredekség valódi mértékegysége cps / ng xantil-etil-karbamát injektálás lenne), azonban magát az adalékolást etil-karbamáttal végezzük, és ahogy nem számítjuk át az adalékolt etil-karbamátot xantil-etil-karbamáttá, úgy az injektált xantil-etil-karbamátot sem számoljuk vissza etil-karbamáttá.

A felsorolt tényezőkhez az adott minta mérésénél a következő adatok tartoztak (10. táblázat):

10. táblázat: Az etil-karbamát mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített első kalibrációs ponthoz („nullás” ponthoz) tartozó standard bizonytalansági tényezők ismertetése, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Érték	Becslés típusa	Standard bizonytalanság
A, cps	42300	"A" típusú becslés, 4,15% szórás	1755 cps
a, cps/ng	19914	(első körben állandónak tekintett)	
V1, µl	10000	"B" típus, $\pm 0,04$ ml, 95%	20 µl
V2, µl	600	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	0,7 µl
V3, µl	10	$\pm 1\%$ szórás, „B” típus, gyári kézikönyvben	0,05 µl
V4, ml	3,5	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	0,0025 ml

Ezekből az adatokból a második, a mérés érzékenysége származtatott, ugyanis ezt a négy (3+1) adalékolási lépésből kapott csúcsterületekre illesztett egyenes képletéből számolhatom. Az első körben tehát $7-1=6$ tényezőt tudom számolni a „nullás” pont bizonytalanságát. Ebből az is következik, hogy az adalékolási kalibrációs folyamat egymásba ágyazott bizonytalansággal írható le: külön meg kell határoznom mind a négy injektálás bizonytalanságát állandónak tekintett érzékenység mellett, ezt követően a négy pont bizonytalanságával egyenként meg kell terhelnem a kalibrációs egyenes számítását, hogy megkaphassam magának a kalibrációs egyenesnek a bizonytalanságát. Ezek után ki tudom számolni a „nullás” pont teljes kiterjesztett bizonytalanságát, immár hét tényezővel.

A 9. táblázatban felsorolt tényezők bizonytalanságának becslése a következő módon alakult:

„A” : mivel a készülék szórása nem ismert az adott tömegszámokon és átmeneteken, „A” típusú becslés elvégzéséhez 10 egymást követő injektálást hajtottunk végre 0,2 mg/l koncentrációjú xantil-etil-karbamát standard oldatból, kiszámoltuk a mérések relatív szórását, amely 4,15%-nak adódott (Melléklet 1. táblázata) – ezt az értéket tekinthettük a továbbiakban a csúcs alatti terület tényezőjénél a standard bizonytalanságnak. Ennél a tényezőként egyébként számértékileg az $A/a=2,12$ ng injektált etil-karbamát mennyiséget ad.

„V1”: a felhasznált 10,0 ml névleges térfogatú „A” pontosságú mérőlombik bizonylatolt feltöltési bizonytalansága $\pm 0,04$ ml volt. Ezt „B” típusú becslésként, 95%-os konfidencia intervallumként értelmezve a standard bizonytalanság 0,02 ml-nek adódik.

„V2” a mérőlombikhoz utólag adagolt ammónia oldatot 100-1000 μ l térfogat kimérésére alkalmas digitális pipettával mértük ki, amelyhez, mint az akkreditált laboratóriumhoz tartozó eszközhez, kalibrációs jegyzőkönyv tartozik. E dokumentumban ennél a pipettánál 0,7 μ l szórását állapítottak meg, ezt az értéket pedig (mint „A” típusú becslést) azonosnak tekintjük a standard bizonytalansággal.

„V3” a HPLC injektálási térfogata (10 μ l) a gyártó (Agilent) kézikönyve szerint $\pm 1\%$ szórással terhelt. Ezt „B” típusú becslésként, 95%-os konfidencia intervallumként értelmezve a standard bizonytalanság 0,05 μ l-nek adódik.

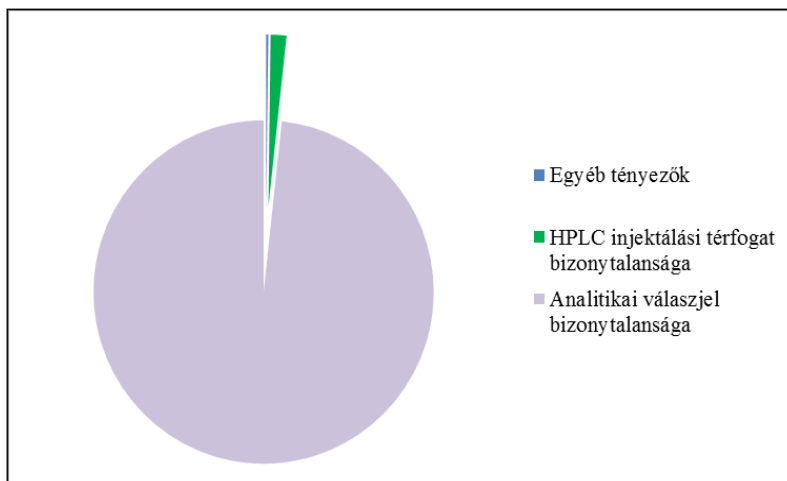
„V4” a mérőlombikba adagolt pálinka mintát 0,5-5 ml térfogat kimérésére alkalmas digitális pipettával mértük ki, amelyhez, mint az akkreditált laboratóriumhoz tartozó eszközhez, kalibrációs jegyzőkönyv tartozik. E dokumentumban ennél a pipettánál 2,5 μ l szórását állapítottak meg, ezt az értéket pedig (mint „A” típusú becslést) azonosnak tekintjük a standard bizonytalansággal.

A következő, 11. táblázatban a bizonytalansági értékek számítását részletezem, amelynek alapja az egyes tényezők parciális deriválása. Ez a gyakorlatban úgy zajlik, hogy az egyes tényezők szélsőértékeit véve kiszámoljuk az analitikai függvény változását, majd négyzetre emeljük az előjelekből fakadó eltérések megszüntetése érdekében. Az így rendezett értékek összesítését gyökvonás követi a mérés standard bizonytalanságának (=1 szórás) megállapításáért, majd a $k=2$ kiterjesztési tényezővel határozzuk meg a kiterjesztett bizonytalanságot.

11. táblázat: Az etil-karbamát mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített első kalibrációs ponthoz („nullás” ponthoz) tartozó kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, ng/ml	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, ng/ml	Eltérés a koncentrációban / Δ /, ng/ml	Δ^2 , (ng/ml) ²	Hozzájárulás, %
V1	10000-20=9980 μ l	321,65	321,05	0,606895	3,68E-01	0,2
V2	600-0,7=599,3 μ l	321,65	321,63	0,021241	4,51E-04	0,0
V3	10-0,05=9,95 μ l	321,65	323,27	-1,61635	2,61E+00	1,5
V4	3,5-0,0025=3,4975 ml	321,65	321,88	-0,22992	5,29E-02	0,0
V4	3,5-0,0025=3,4975 ml	321,65	321,88	-0,22992	5,29E-02	0,0
A	42300-1755=40544,55 cps	321,65	308,53	13,12829	1,72E+02	98,2
Szórásnégyzet /szumma, (ng/ml) ² /					175,439	100
Szórás /gyökvonás, ng/ml/					13,245	
$k=2$ kiterjesztés, ng/ml					26,49	

A kapott érték (26,49 ng/ml) azt jelenti, hogy a meredekség bizonytalansága nélkül a végeredmény 95%-os konfidencia-intervallummal megadva $321,65 \pm 26,49$ ng/ml. A 25. ábráról leolvasható, hogy a bizonytalanságért ennél a számítási szintnél legnagyobb mértékben az analitikai válaszjel felelős.



25. ábra: Az etil-karbamát mérési bizonytalanságának alakulása állandónak tekintett érzékenység mellett

A további három, adalékolt pont mérési bizonytalanságának kiszámításához az 1. képlet nem használható, mivel nem hordozza magában tényezőként az adalékoláshoz szükséges lépéseket.

A 2. képlet úgy lett kialakítva, hogy az egyenlet bal oldalán az adalékolt koncentráció *nélküli* (tehát elvileg az eredeti) eredmény alakulhasson ki. Ehhez azt kellett tenni, hogy az egyenlet jobb oldalán az (A/a) szakasszal megkapott ng etil-karbamát értéket csökkentettük az adalékolás injektálásra jutó értékével – ez az első adalékolási pontnál 1,89 ng, amelyet úgy kapunk, hogy az elméletileg bemért etil-karbamát standard tömegét a tényleges bemérés faktorával korrigáltunk, így lett 2 ng helyett 1,89 ng.

$$c = \frac{A}{a} - \frac{m}{V_5} \cdot \frac{V_6}{V_7} \cdot \frac{V_8}{V_1 + V_2} \cdot V_3 \cdot 10^3 \cdot \frac{V_1 + V_2}{V_3} \cdot \frac{1}{2 \cdot V_4}$$

2. képlet

A 2. képletben új tényezők is szerepet játszanak: „m” az etil-karbamát törzsoldat készítésénél bemért tömeg (mg), „V5” az etil-karbamát törzsoldat térfogata (ml), „V6” és „V7” a törzsoldat hígításánál alkalmazott térfogatok (ml), míg „V8” az adott adalékolási lépésnél a mérőlombikba a hígított etil-karbamátból bemért térfogat (μl). A „10³” érték korrekciót jelent a ml és a μl között. A felsorolt tényezőkhez az első adalékolási minta mérésénél a következő adatok tartoztak (12. táblázat):

12. táblázat: Az etil-karbamát mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített második kalibrációs ponthoz (első adalékolási ponthoz) tartozó standard bizonytalansági tényezők ismertetése, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Érték	Becslés típusa	Standard bizonytalanság
A, cps	79900	"A" típusú becslés, 4,15% szórás	3316 cps
a, cps/ng	19914	(első körben állandónak tekintett)	
V1, µl	10000	"B" típus, $\pm 0,04$ ml, 95%	20 µl
V2, µl	600	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	0,7 µl
V3, µl	10	$\pm 1\%$ szórás, B típus, gyári kézikönyvben	0,05 µl
V4, ml	3,5	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	0,0025 ml
m, mg	12,5	"B" típus, négyzetes eloszlás	0,028868 mg
V5, ml	25	"B" típus, $\pm 0,04$ ml, 95%	0,02 ml
V6, ml	0,2	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	0,0007 ml
V7, ml	10	"B" típus, $\pm 0,04$ ml, 95%	0,02 ml
V8, µl	200	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	0,7 µl

A 12. táblázatban felsorolt, korábban nem ismertetett tényezők bizonytalanságának becslése a következő módon alakult:

„m”: a digitális analitikai mérleggel végzett tömegmérés „B” típusú, négyzetes eloszlású becslések körébe tartozik, amely esetben az adott digitális mérleg legkisebb, még leolvasható értékének felét (jelen esetben 0,05 mg-nak) $\sqrt{3}$ -mal kell osztani a standard bizonytalanság meghatározásához. 12,5 mg etil-karbamát standardot mértünk be, amelyhez így 0,028868 mg standard bizonytalanság társult.

„V5”: a felhasznált 25,0 ml névleges térfogatú „A” pontosságú mérőlombik bizonylatolt feltöltési bizonytalansága $\pm 0,04$ ml volt. Ezt „B” típusú becslésként, 95%-os konfidencia intervallumként értelmezve a standard bizonytalanság 0,02 ml-nek adódik.

„V6” és „V7”: a „V5” térfogatú törzsoldatból 0,2 ml-t („V6”) mérünk át egy 100-1000 µl térfogat kimérésére alkalmas digitális pipettával a „V7” térfogatú (10,0 ml) mérőlombikba. A pipetta és szórása megegyezik a „V2” tényező értékeivel, míg a „V7” mérőlombik paraméterei a „V1” mérőlombikéval azonosak.

„V8”: a „V7” mérőlombikban elkészített hígított etil-karbamát törzsoldatból az adalékoláshoz ebből a pontnál bemért 200 µl térfogat, amelyet a „V2” tényezőnél ismertetett

pipettával végeztünk el, és itt annak paramétereivel számolhatunk.

A következő, 13. táblázatban az első adalékolási ponthoz tartozó bizonytalansági értékek számítását részletezem. A 11. táblázathoz képest eltér az eredeti koncentráció értéke (321,65 ng/ml helyett 321,86 ng/ml), amely az aktuális mérési adatokból lett számolva, tehát terhelt a rendszer bizonytalanságával.

13. táblázat: Az etil-karbamát mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített második kalibrációs ponthoz (első adalékolási ponthoz) tartozó kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, ng/ml	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, ng/ml	Eltérés a koncentrációban / Δ /, ng/ml	Δ^2 , (ng/ml) ²	Hozzájárulás, %
V1	10000-20= 9980 μ l	321,86	320,71	1,146358	1,31E+00	0,2
V2	600-0,7= 599,3 μ l	321,86	321,82	0,040123	1,61E-03	0,0
V3	10-0,05= 9,95 μ l	321,86	324,91	-3,05311	9,32E+00	1,4
V4	3,5-0,0025= 3,4975 ml	321,86	322,09	-0,23006	5,29E-02	0,0
V4	3,5-0,0025= 3,4975 ml	321,86	322,09	-0,23006	5,29E-02	0,0
A	79900-3316= 76584,15 cps	321,86	296,64	25,21414	6,36E+02	97,9
m	12,5-0,028868= 12,47 μ l	321,86	322,52	-0,65983	4,35E-01	0,1
V5	25-0,02= 24,98 ml	321,86	321,63	0,228754	5,23E-02	0,0
V6	0,2-0,0007= 0,1993 ml	321,86	322,86	-1	1,00E+00	0,2
V7	10-0,02= 9,98 ml	321,86	321,28	0,572574	3,28E-01	0,1
V8	200-0,7= 199,3 μ l	321,86	322,86	-1	1,00E+00	0,2
Szórásnégyzet /szumma, (ng/ml) ² /					649,312	100
Szórás /gyökvonás, ng/ml/					25,482	
k=2 kiterjesztés, ng/ml					50,96	

Érdemes megfigyelni, hogy bár az első adalékolási pont bizonytalansági mérlege majdnem kétszer annyi (6 helyett 11) tényezőtől áll (eltekintve az állandónak vett érzékenységtől), a közel kétszer rosszabb kiterjesztett bizonytalanság mögött a készülék több mint 4%-os szórása áll, ami ennél a számításnál a számértékileg nagyobb jel miatt jóval nagyobb mértékű bizonytalanságot okoz. Mivel a módszer LOQ értéke jóval a készülék szórásának megállapítására szolgáló 0,2 mg/l etil-karbamát koncentráció alatt van, és a „nullás” pont ill. az első adalékolási pont injektált etil-karbamát mennyisége között /2,12 ng vs. (2,12 ng + 1,89 ng)/ nagyságrendnyi különbség nem áll fenn, nem érdemes feltételezni, hogy a készülék szórása számottevően javulna a nagyobb koncentráció injektálásánál – más szóval félrevezető lenne 4,15%-nál kisebb szórás „feltételezésével” javítani a bizonytalansági mérleget.

A második és harmadik adalékolási pont az első adalékolási ponttal hasonló módon számolandó, a 12. táblázathoz képest csak abban térnek el, hogy az „A” és a „V8” értékei természetesen nagyobbak, ahogy növeljük az adalékolás során bevitt etil-karbamát mennyiségét. A vonatkozó számítások az értekezés Mellékletének 2. és 3. táblázatában találhatók.

A négy („nullás” + 3 adalékolási) pont kiterjesztett mérési bizonytalanságának megállapítása után lehetőség nyílik arra, hogy az egyes pontok bizonytalanságával terhelt „A” értékekkel egyenként újra számoljuk a kialakuló kalibrációs egyenes bizonytalanságát. Konkrét példával ez azt jelentette, hogy a „nullás” pontnál kapott csúcs alatti terület értékét (42300 cps) a kiszámolt relatív szórással terhelve $(42300 \text{ cps} \cdot (100 \cdot (13,464 \text{ ng/ml} / 321,65 \text{ ng/ml})) = 44072,37 \text{ cps})$ helyettesítettem be a kalibrációs egyenes számításához (14. táblázat).

14. táblázat: Az egyes kalibrációs pontokhoz tartozó eredeti és szélsőértékkel korrigált csúcs alatti területekkel kiszámolt új meredekség értékek

Adalékolási pontok, ng etil-karbamát / inj.	„c”, ng/ml	SD, ng/ml	RSD, %	„A”, cps	Szórással terhelt „A”, cps	Eredeti meredekség, cps/ng	Korrigált meredekség, cps/ng
0	321,65	13,245	4,12	42300	44042,76	19914	19729
1,89	321,86	25,482	7,92	79900	86228,08	19914	19626
3,77	363,88	39,246	10,79	123000	136271,7	19914	20115
7,55	317,14	61,345	19,34	192000	229132,8	19914	24974
Átlag, cps/ng							21111
Szórás, cps/ng							2584
RSD, %							12,2

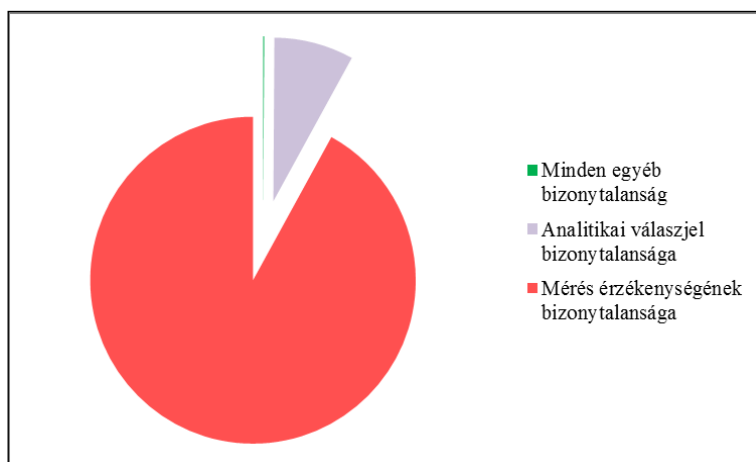
A négy pontból a legkisebb négyzetek elvével számolt kalibrációs egyenes bizonytalansága az egyes pontok bizonytalanságával terhelt. Mivel a nagyobb adalékolási pontoknál a számértékieleg nagyobb csúcs alatti terület a készülék szórása miatt nagyobb bizonytalansággal terhelt, a kalibrációs egyenes pontjainak bizonytalansága a koncentráció emelkedésével növekedik. Ez okozza, hogy a meredekség relatív szórása eléri a 12%-ot. Bár ez az érték nagynak tűnik, érdemes megjegyezni, hogy a gyakorlatban, ha egy adott mérési eljárásnál a külső kalibrációs és a standard addíciós kalibrációs egyenesek meredekségének eltérése 10%-nál kisebb, úgy nem kell standard addíciót alkalmazni – ez azt jelenti, hogy a 12% összemérhető azzal a határral, amelyen belül a kalibrációs egyenesek természetes szórást mutatnak általános esetben.

A 12,2%-os relatív szórás figyelembe vételével most már lehetőség nyílik a legelső, „nullás” (tehát az adalékolás nélküli minta) kiterjesztett mérési bizonytalanságának megállapítására (15. táblázat). A táblázat „a”-ra vonatkozó sorában a meredekséget „A” típusú becslésként a 12,2 %-os szórással terheltem.

15. táblázat: Az etil-karbamát mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített első kalibrációs ponthoz („nullás” ponthoz) tartozó teljes kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, ng/ml	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, ng/ml	Eltérés az koncentrációban / Δ /, ng/ml	Δ^2 , (ng/ml) ²	Hozzájárulás, %
V1	10000-20=9980 μ l	321,65	321,05	0,606895	3,68E-01	0,0
V2	600-0,7=599,3 μ l	321,65	321,63	0,021241	4,51E-04	0,0
V3	10-0,05=9,95 μ l	321,65	323,27	-1,61635	2,61E+00	0,1
V4	3,5-0,0025=3,4975 ml	321,65	321,88	-0,22992	5,29E-02	0,0
V4	3,5-0,0025=3,4975 ml	321,65	321,88	-0,22992	5,29E-02	0,0
A	42300-1755=40544,55 cps	321,65	308,53	13,12829	1,72E+02	7,9
a	19914-2430=17484 cps/ng	321,65	366,35	-44,6946	2,00E+03	91,9
Szórásnégyzet /szumma, (ng/ml) ² /					2173,046	100
Szórás /gyökvonás, ng/ml/					46,616	
<i>k</i> =2 kiterjesztés, ng/ml					93,23	

A táblázatból (és a 26. ábrán) látható, hogy a bizonytalansági mérleg legfőbb összetevője a meredekség lett, önmagában a bizonytalanság több mint 90%-ért felelős – ami pedig a korábban leírtak szerint a műszer szórásából fakad. A $321,65 \pm 93,23$ ng/ml végeredmény (amelyet a bizonytalanság miatt érdemes inkább $0,32 \pm 0,09$ mg/ml dimenzióban közölni) közel 30%-os kiterjesztett mérési bizonytalansága tehát érdemben úgy csökkenthető, ha a műszer reprodukálhatóságát javítani tudjuk. Mivel „az ESI-MS bizonytalansága” jellemzően az ionizáció instabilitására utal, nem zárható ki, hogy mechanikai beavatkozással (porlasztó kapilláris ellenőrzése – cseréje, az ionforrás teljes körű karbantartása) szignifikáns javulás érhető el.



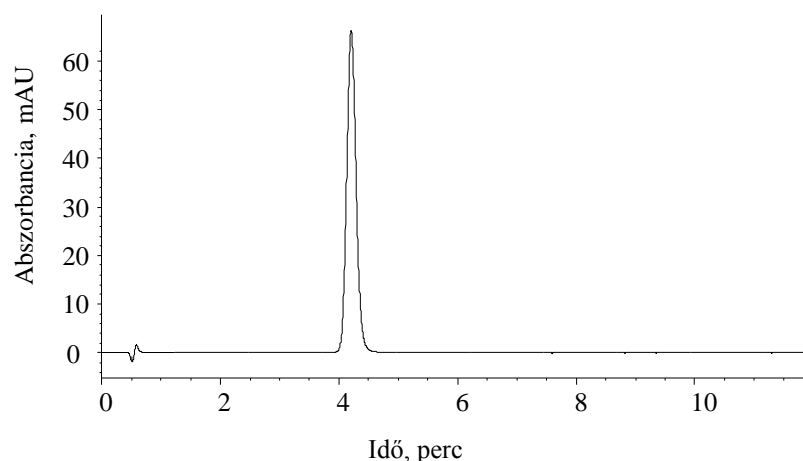
26. ábra: Az etil-karbamát mérési bizonytalanságának alakulása a mérés érzékenységeinek bizonytalanságát is figyelembe véve

6.2 Redukált Q₁₀ koenzim meghatározásának eredményei

6.2.1 Átvett módszerek verifikálása

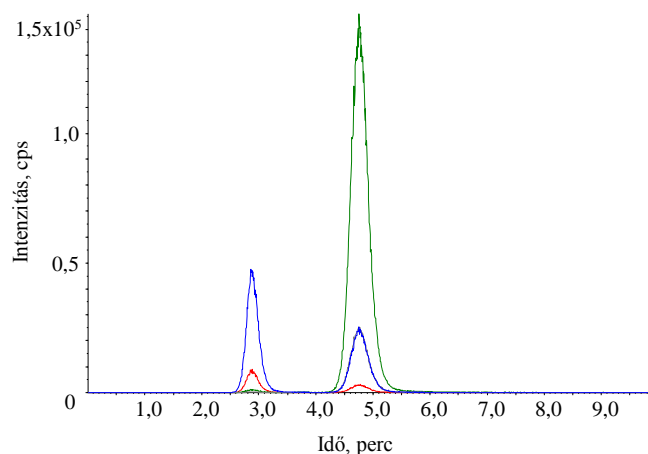
A redukált Q₁₀ koenzim mennyiségi meghatározását célzó vizsgálataim során átvett módszerként kezeltem az AOAC 2008.07 eljárást, amely az étrendkiegésztők összes Q₁₀ tartalmának uniformizálást követő, HPLC-UV alapú mérésén alapul, ill. a Ruiz-Jiménez et al. (2007) közleményben először leírt, Q₁₀ és Q₁₀H₂ ammónia-adduktok révén történő szelektív HPLC-ESI-MS-MS meghatározást. Az átvett módszereket ugyanakkor verifikálni szükséges, hogy igazolni lehessen az eljárásokra való hivatkozás jogosultságát.

A 27. ábra ismerteti az AOAC módszer átvételével kapott, 25 mg/l koncentrációjú Q₁₀ oldat HPLC-UV kromatogramját. Az átvétel megfelelőségét mutatja, hogy az Orozco et al. (2007) közleményhez képest ($t_R=3,98$ perc) a Q₁₀ retenciós ideje ($t_R=4,20$ perc) nem tér el számottevő mértékben, ugyanakkor a „k” retenciós tényező az általunk használt HPLC rendszerben jobb ($k=6,5$ vs. $k_{Orozco}=3,0$).



27. ábra: Q₁₀ standard oldat HPLC-UV kromatogramja

A Ruiz-Jiménez et al. (2007) közleményben ismertetett módszer verifikálása során külön figyelmet kellett fordítani arra, hogy bár a monoizotópos tömegek a két célkomponens esetén eltérnek egymástól, így elvileg nem lenne szükség alapvonali elválasztásra, az ubikinol A+2 izotopológja (amely a molekula nagy szénatom száma miatt számottevő intenzitású) azonban a kis felbontású tömegspektrométeren nem különböztethető meg az ubikinon monoizotópos tömegétől, tehát az alapvonali elválasztás kulcsfontosságú. A 28. ábrán látható, hogy a két célkomponens szóban forgó MRM átmenetei nem zavarták egymást, a kromatográfiás felbontás megfelelő mértékű ($t_{R\text{ red}}= 2,86$ perc; $t_{R\text{ ox}}= 4,75$ perc; $R=2,22$).

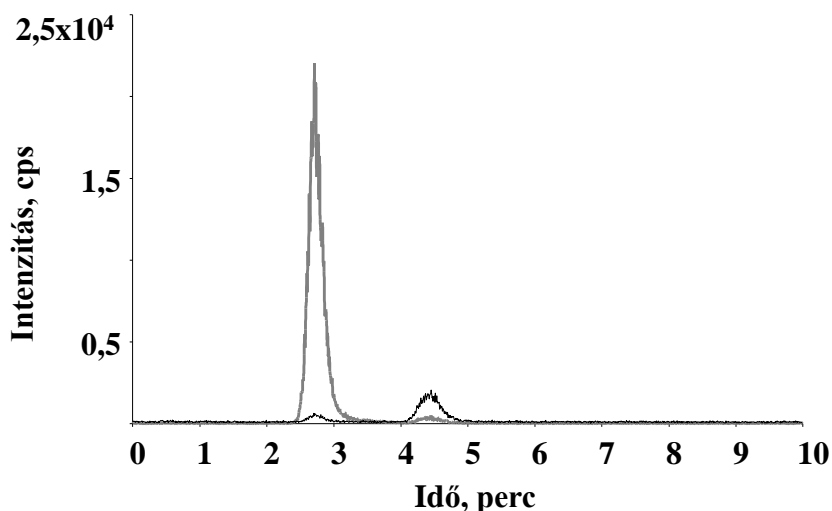


28. ábra: $Q_{10}H_2$ és Q_{10} standardokat tartalmazó mintaoldat HPLC-ESI-MS-MS kromatogramja. Felbontás: 2,36

6.2.2 $Q_{10}H_2$ standard oldat készítésének kidolgozása

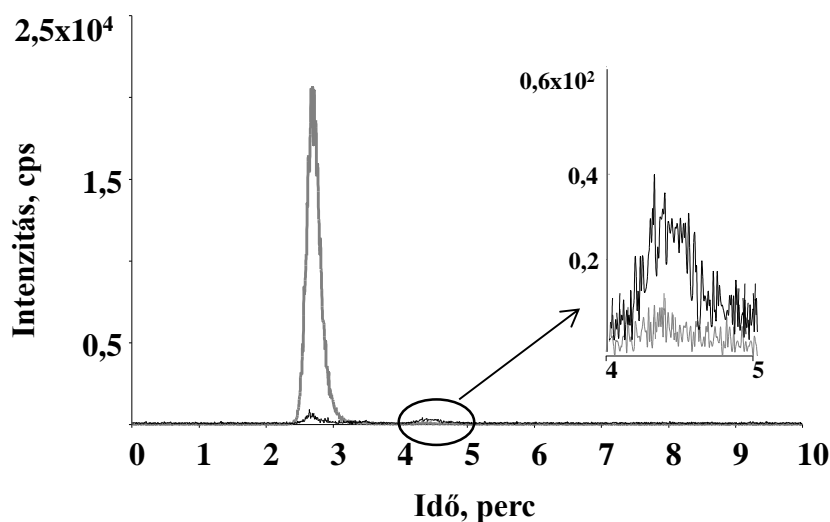
Az ubikinol standard formában instabilitása miatt nem érhető el kereskedelmi forgalomban, így minden esetben az analízist végrehajtó személyzetnek kell elkészítenie a szilárd kiszerelésű ubikinonból, $NaBH_4$ segítségével. Mivel a mérvadónak számító Yamashita és Yamamoto (1997) közleményben leírt módszert hivatkozza a témával foglalkozó legtöbb tanulmány, első körben az ott leírt módszert reprodukáltuk.

Vizsgálati eredményeink szerint azonban az ilyen módon elkészített ubikinol oldat jelentős mértékben (6%) tartalmaz oxidált formát (29. ábra), ami arra utal, hogy bár valószínűleg a 8800-szoros mólfeleslegben alkalmazott $NaBH_4$ teljes redukciót idéz elő, a kialakuló kis törzsoldat-koncentráció (25 mg/l) nem kedvez az ubikinol stabilitásának és gáztalanítás ellenére a légköri oxigén bejutása összemérhető oxidációs veszteséget eredményez.



29. ábra: A kis (25 mg/l) koncentrációban elkészített ubikinol oldat HPLC-ESI-MS-MS kromatogramján jól látható az oxidált Q_{10} megjelenése.

Általános tapasztalat, hogy a töményebb törzsoldatok a bomlást elősegítő szennyezések ill. bármilyen egyéb ágens jelenlétének kevésbé vannak kitéve, mivel az esetleg mégis kialakuló bomlási folyamat arányaiban kevesebb veszteséget okoz. Ezért volt szükség a módszer módosítására, egy nagyobb koncentrációjú $Q_{10}H_2$ oldattal ugyanis feltételezhetően csökkenthető az oxidáció mértéke. Az 5.8 szakaszban leírtak szerint elkészített, hússzor töményebbre tervezett ubikinol oldat HPLC-ESI-MS-MS vizsgálata feltárta, hogy a lényegesen nagyobb (500 mg/l) koncentrációban elkészített $Q_{10}H_2$ oldatban az ubikinon koncentrációja 1% alatti (30. ábra), így addíciós célra is felhasználható.



30. ábra: A nagy (500 mg/l) koncentrációban elkészített ubikinol oldat HPLC-ESI-MS-MS kromatogramján az oxidált Q_{10} mértéke nem éri el az 1%-ot.

6.2.3 Az extrakciós módszer hatása a $Q_{10}H_2$ stabilitására

Az így már rendelkezésre álló és stabil $Q_{10}H_2$ adalékolásra használható oldattal meg kellett vizsgálnom, hogy az étrendkiegészítőkre alkalmazott – például a az AOAC módszerben 30 perces – extrakció milyen mértékben váltja ki a mintában lévő ubikinol oxidációját. Figyelembe kell ugyanis venni, hogy az AOAC módszer oxidált Q_{10} mérésére validált eljárás, így fejlesztésekor a redukált forma megtartása kifejezetten káros lett volna, és a vas (III)-klorid oldattal végrehajtott uniformizálás is az ubikinol oxidációját szolgálta.

Első lépésként még minta nélkül, csupán az elkészített ubikinol törzsoldatot használva modell oldatként (5.9. fejezet) azt kellett meghatároznom, milyen extrakció csökkenti legkevésbé az

ubikinol koncentrációt. Mint ahogy a 16. táblázat ismerteti, az idő növelésével az ubikinol visszanyerése jelentős mértékben romlik. Az ultrahangos szonda használata sokkal eredményesebb, mint az ultrahangos fürdőé, ami az átvitt hasznos teljesítmény szempontjából teljes mértékben indokolt (Abid et al., 2014). Ki kell emelni, hogy az ultrahangos feltárás általában fokozza az oxidációt, különösen magas hőmérsékleten és hosszú időn keresztül (Luque de Castro és Priego-Capote, 2007). Ebből fakadóan azt vártuk, hogy a BHT, mint lipofil antioxidáns adagolása csökkenti az ubikinol oxidációját – erre utalnak azon közlemények is, amelyekben vérplazma redukált Q₁₀ tartalmának meghatározásával foglalkoznak (pl. Lang et al., 1986, Menke et al., 2000, Franke et al., 2013).

16. táblázat: Extrakciós kezelések hatása redukált Q₁₀ visszanyerésére

	Oldat	Kezelés	Idő	Visszanyerési hatások, ± 1 SD
1	n-hexán	ultrahangos szonda	2 perc	91 \pm 2 %
2	n-hexán	ultrahangos fürdő	5 perc	67 \pm 1 %
3	n-hexán + 1 mg ml ⁻¹ BHT	rázóasztal	30 perc	42 \pm 2 %
4	n-hexán + 1 mg ml ⁻¹ BHT	ultrahangos fürdő	5 perc	59 \pm 2 %
5	n-hexán + 1 mg ml ⁻¹ BHT	ultrahangos szonda	2 perc	81 \pm 4 %

A várakozással és a közleményekben leírtakkal ellentétben a BHT adagolása szignifikáns mértékben rontotta az ubikinol visszanyerését. Erre a folyamatra adhat magyarázatot az a megfigyelés, hogy bizonyos esetekben és koncentrációk mellett a BHT pro-oxidánsként is viselkedhet (Smirnova et al., 2002).

A tapasztalatok alapján végül a két perces, ultrahangos szondával végzett extrakciót alkalmaztuk az étrendkiegészítő minták vizsgálatára. A 17. számú táblázat szemlélteti a 12 vizsgált étrendkiegészítő összes Q₁₀ tartalmát és a visszamaradt Q₁₀ mennyiséget, amely adatokat az AOAC módszer alapján HPLC-UV módszerrel határoztam meg. Az extrakció minden esetben elérte a legalább 99,6%-os hatásfokot, amely azt jelzi, hogy a választott extrakciós módszer (bár nem egyezik az AOAC 30 perces kezelésével) valódi minták mennyiségi meghatározására is tökéletesen alkalmas. Érdeemes megjegyezni, hogy bár a minták között szerepelt gélkapszula (az első három) és hagyományos tableta is, az extrakciós módszer mindkét fajtára alkalmasnak bizonyult.

17. táblázat: étrendkiegészítő minták összes Q10 tartalma és az elért kinyerési hatások értékek

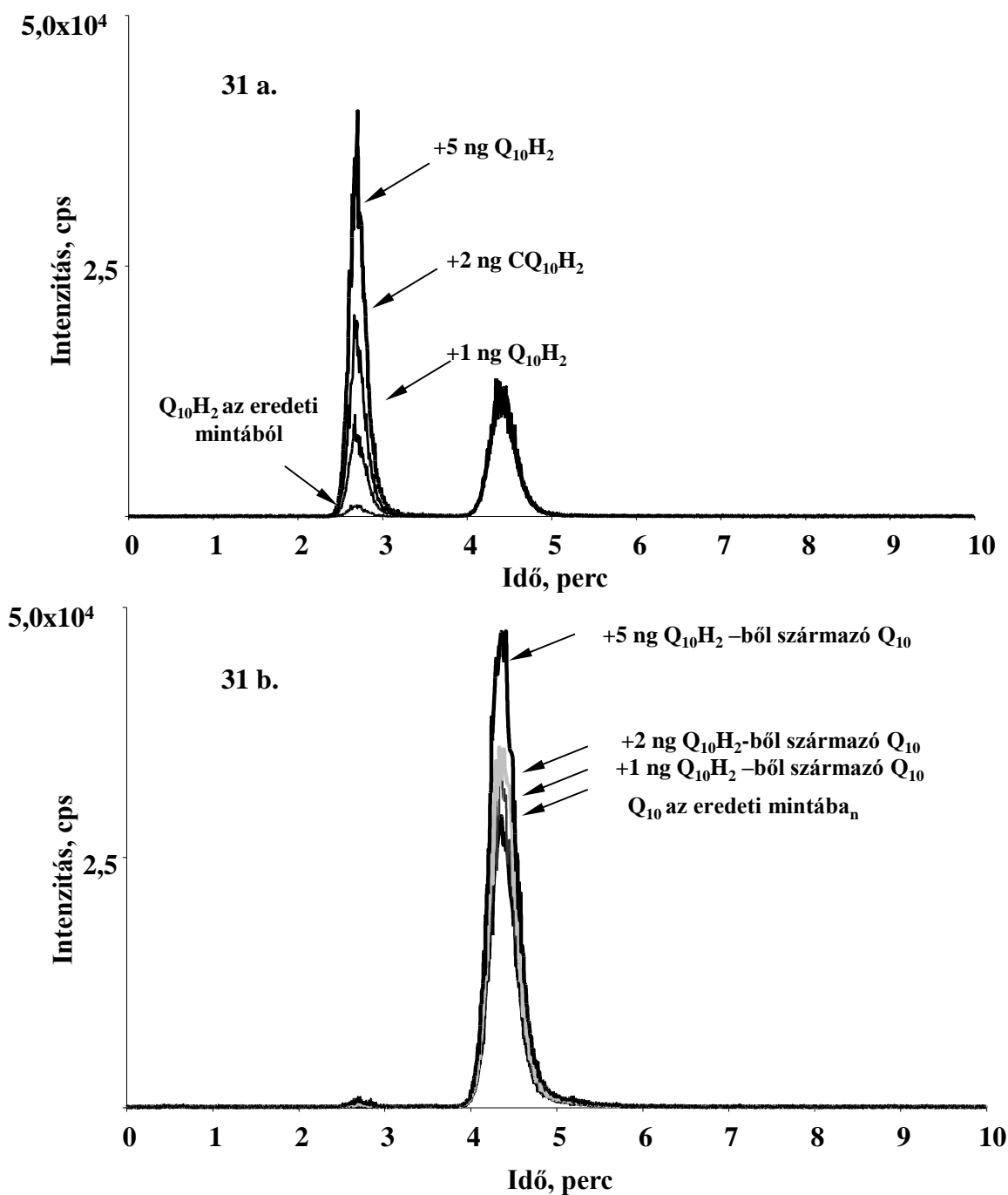
Minta-szám	Összes Q ₁₀ tartalom mg/g, ± 1 SD	Névleges Q ₁₀ tartalom, mg/g	Q ₁₀ tartalom az üledékben mg/g	Extrakciós hatékonyság, %
1	88,1 \pm 2,2	100,0	0,1	99,9
2	31,5 \pm 0,9	30,0	0,1	99,7
3	104,5 \pm 2,4	103,4	0,1	99,9
4	90,7 \pm 4,0	103,4	0,1	99,9
5	85,1 \pm 2,5	85,2	0,1	99,9
6	76,5 \pm 2,6	85,2	0,1	99,9
7	81,3 \pm 2,2	88,7	0,2	99,8
8	78,8 \pm 2,2	88,7	0,1	99,9
9	44,8 \pm 1,5	56,1	0,1	99,8
10	48,8 \pm 1,7	56,1	0,1	99,8
11	44,4 \pm 1,3	56,1	0,1	99,8
12	48,9 \pm 1,3	56,1	0,1	99,8

Az a jelenség, hogy a készítmények túlnyomó része a névlegeshez képest legalább 10%-kal kevesebb Q₁₀-et tartalmazott, sajnos jól ismert jelenség az étrendkiegészítők területén, és egyértelműen az étrendkiegészítők laza szabályozására és gyenge fogyasztóvédelemre utal (Pravst és Zmitek, 2011).

6.2.4. Q₁₀H₂ tartalom mennyiségi meghatározás: kalibrációs eljárások összehasonlítása HPLC-ESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel

Eltekintve az étrendkiegészítők mérésére sok szempontból (költség, „fontosság”, rutin analitikai laboratóriumok standard vegyületek szintézisére való felkészültsége, stb.) nem alkalmazható deuterált Q₁₀ standardtól, tömegspektrometriai detektálás esetén standard addíció, ennek költséghatékonyabb formája (mátrix illesztett kalibráció) és az adalékolás jöhet számításba. Az első és az utolsó között számottevő eltérés mutatkozik mind a felhasználandó standard vegyület mennyiségében, mind pedig a folyamat munkaigényében az utóbbi hátrányára, így meg kell vizsgálni, analitikailag indokolt-e a bonyolultabb adalékolást választani.

A 31. ábrán egy oxidált és redukált formát is tartalmazó étrendkiegészítő minta standard addícióval végrehajtott kalibrációs eredményei láthatóak. A standard addíciós sor elkészítéséhez a Q₁₀H₂ m/z 882,6 \rightarrow m/z 197,2 mennyiségi átmenetét használtam fel (31 a. ábra). Ahogy a 31 b. ábrán látható, a Q₁₀ m/z 880,6 \rightarrow m/z 197,2 MRM átmenete szintén növekedő csúcs alatti területet eredményez a standard addíció során.



31 a. és b. ábra: Standard addíciós kísérlet kalibrációs eredményei. A 31 a. ábrán a redukált Q₁₀ kvantitatív átmenetének (m/z 882,6 \rightarrow m/z 197,2), míg a b. ábrán az oxidált Q₁₀ kvantitatív átmenetének (m/z 880,6 \rightarrow m/z 197,2) extrahált ion kromatogramja látható. Az utóbbi növekedés a csúcs alatti területek integrálását követően nem mutat lineáris összefüggést.

A mintában jelen van a Q_{10} mindkét formája, azonban az oxidált forma intenzitásának növekedése nem volt lineáris összefüggésben a standard addíció során hozzáadott $Q_{10}H_2$ standard mennyiségével. Ebből az következik, hogy nem tudjuk nyomon követni, mekkora rész alakul át a standard addíciós eljárás során a $Q_{10}H_2$ standardból oxidált Q_{10} -zé. Így az egyszerre $Q_{10}H_2$ -t és Q_{10} -et is tartalmazó mintákban standard addíciós eljárással a $Q_{10}H_2$ koncentrációja nem határozható meg kellő pontossággal.

Ezzel szemben az adalékolt minták vizsgálata során a hozzáadott $Q_{10}H_2$ ugyanúgy viselkedik és oxidálódik, mint a mintában eredetileg jelen lévő $Q_{10}H_2$, így az eredmény a pontos $Q_{10}H_2$ tartalmat tükrözi. Ebből a Q_{10} mennyisége a totál Q_{10} és a $Q_{10}H_2$ különbsége. A kísérleteim során végül a saját fejlesztésű adalékolási kalibrációra és extrakciós eljárásra épített, AOAC (HPLC-UV) módszerrel minőségbiztosított, szelektivitás oldaláról pedig a Riz-Jimenez et al. (2007) közleményben ismertetett HPLC-ESI-MS-MS technikára alapozott mérési összeállítással határoztam meg 12 étrendkiegészítő összes és redukált Q_{10} tartalmát (18. táblázat). A minták fele tartalmazott kimutatható szinten redukált Q_{10} koenzimet is, amelynek mennyisége az összes Q_{10} 5-16%-át tette ki. A készítmények csomagolásán lévő gyártói közlemények szerint mind a hat, redukált Q_{10} tartalmú étrendkiegészítő antioxidáns hatású komponenseket is hordozott (pl. C-és E-vitamint ill. szelenitet), amelyekről korábban igazolták, hogy a gyártástechnológiától függően szerepet játszhatnak az ubikinon járulékos redukációjában (Kettawan et al., 2007).

18. táblázat: Étrendkiegészítő minták redukált Q_{10} tartalma és aránya az összes Q_{10} tartalomhoz képest.

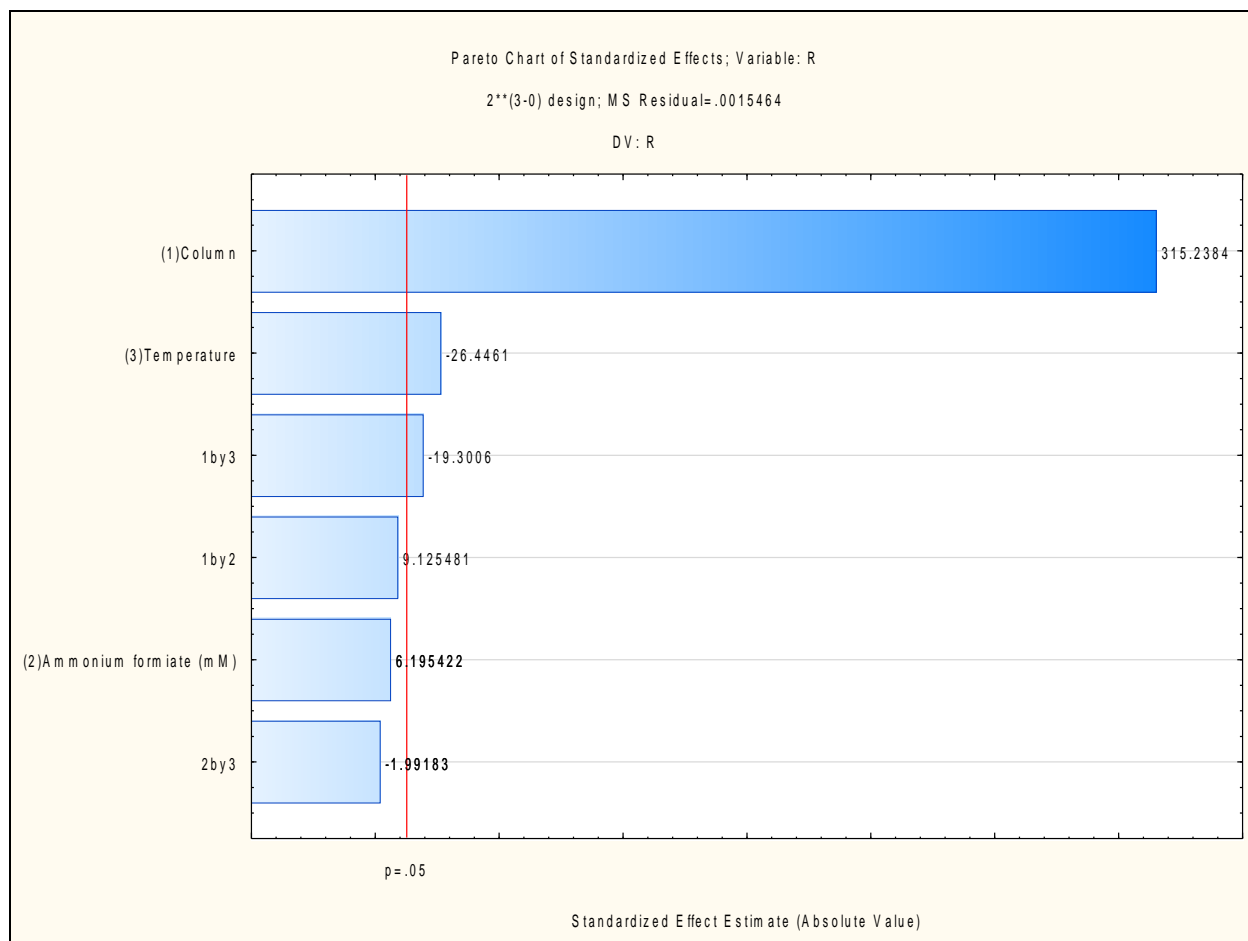
Minta-szám	Összes Q_{10} tartalom, mg/g	$Q_{10}H_2$ tartalom, mg/g, ± 1 SD	$Q_{10}H_2$ tartalom, az összes Q_{10} tartalom százalékában kifejezve
1	88,1	< 0,05	-
2	31,5	< 0,05	-
3	104,5	$5,7 \pm 0,15$	5
4	90,7	$10,2 \pm 0,18$	11
5	85,1	< 0,05	-
6	76,5	< 0,05	-
7	81,3	< 0,05	-
8	78,8	< 0,05	-
9	44,8	$7,0 \pm 0,15$	16
10	48,8	$6,1 \pm 0,09$	12
11	44,4	$5,7 \pm 0,11$	13
12	48,9	$4,6 \pm 0,09$	9

6.2.5. Az ubikinon és az ubikinol HPLC-ESI-MS/MS meghatározásának robusztussága

A kísérletek során a 6.2.1. alfejezetben ismertetett okokból fakadóan a két célkomponens alapvonal-szintű elválasztását kell biztosítani. Mivel az alkalmazott kromatográfiás eljárás izokratikus, mindenképpen érdemes megvizsgálni, hogy a kidolgozott módszer robusztusnak tekinthető-e, másképpen kifejezve, a két komponensre számított felbontóképesség (R) szignifikáns mértékben romolhat-e annak következményeképpen, ha valamelyik kromatográfiás paraméter megváltozik. Ebből a szempontból tehát a robusztusság-vizsgálat függő paramétere az R , míg független paraméterként az elválasztás hőmérséklete, a kromatográfiás eluens pufferkoncentrációja (mint két kvantitatív paraméter) ill. kvalitatív paraméterként az RP-HPLC oszlop típusa jöhet számításba. A három felsorolt független változó R értékére gyakorolt hatását 2^3 típusú, teljes faktoriális elrendezésű kísérletterv révén érdemes megvizsgálni, ez ugyanis viszonylag költséghatékonyan, csupán nyolc mérési összeállítással képes statisztikailag igazolni vagy elvetni az adott független változó R -re gyakorolt szignifikáns hatásának meglétét.

A Melléklet 4. táblázata ismerteti a három független változó értékeit, kísérleti kiosztását és a kísérletileg kapott R értékeket. A verifikált eljáráshoz képest (6.2.1. alfejezet: 40 °C oszlopfűtési hőmérséklet, 5 mM ammónium-formiát puffer a metanol eluensben, 20 mm hosszú XTerra HPLC oszlop) a hőmérsékletet ± 5 °C, a pufferkoncentrációt ± 3 mM értékkel változtattuk, míg a másik (a táblázatban A-val jelölt) oszlopként az etil-karbamát vizsgálatánál alkalmazott, 50 mm hosszú, azonos belső átmérőjű XDB- C_{18} oszlopot használtuk fel. A Melléklet 5-7. táblázatai a Statistica 11.0 szoftverrel (Statsoft; Tulsa, OK, USA) készült feldolgozási eredményeket mutatják, míg a becsült R értékeket a Melléklet 1. ábrája ismerteti.

A módszer robusztusságát, tehát a kiválasztott független változóknak való kitettségét a 32. ábra mutatja be. Egyértelmű, hogy a 20 mm hosszú XTerra oszlophoz képest az 50 mm hosszúságú XDB oszlopon szignifikánsan eltérő R volt mérhető, tehát a módszer a választott HPLC oszlop oldaláról nézve nem robusztus – ugyanakkor az, hogy az R jóval nagyobb értékű az XDB oszlopon, természetesen nem tekinthető hátrányos változásnak. Ettől eltérően, a hőmérséklet hatásának megítélése már nem pozitív, mivel a kimutatott szignifikáns hatás azt jelenti, hogy a módszer nem robusztus a hőmérséklet változásával szemben: + 5 °C eltérés esetén az R értéke szignifikánsan romlik. A modell azt is jelzi, hogy nem elhanyagolható az oszlop és a hőmérséklet együttes hatása sem az R értékére, azonban ezt a hatást nagy mértékben a jelentősen különböző HPLC oszlop okozza. A 3. független változó, a pufferkoncentráció változására az R nem mutatott szignifikáns eltérést, tehát erre a változóra nézve a módszer robusztusnak tekinthető.



32. ábra: A három választott független változó (1: HPLC oszlop; 2: pufferkoncentráció; 3: oszlop termosztálási hőmérséklet) egyenkénti és együttes hatása az ubikinon és az ubikinol kromatográfiás felbontására.

6.2.6 A kidolgozott redukált Q_{10} tartalom meghatározási módszer kiterjesztett mérési bizonytalanságának számítása

Az 6.1.5 fejezethez hasonlóan a redukált Q_{10} tartalom meghatározási eljárás kiterjesztett mérési bizonytalanságát is érdemes meghatározni, mivel ez nagy mértékben segíti a módszer elméleti megítélését. Bár a számítási eljárás hasonlít az etil-karbamátnál, mint adalékolási módszerrel meghatározott komponensnél alkalmazott megközelítésre, a folyamat során több tényezőt kell figyelembe venni. Ugyan az etil-karbamáthoz hasonlóan a Q_{10} standard sem hiteles anyagmintaként állt rendelkezésre, tehát a standard vegyület bizonytalanságát nem vehettük figyelembe a számításnál, azonban az adalékoláshoz felhasznált redukált forma bizonytalanságát szükséges volt beépíteni a tényezők közé. Ebből fakadóan a számítási lépések összetettebb függvényeket igényeltek.

A kiterjesztett mérési bizonytalanság számítással történő meghatározását egy olyan étrendkiegészítő minta példáján keresztül dolgoztam ki, amelynek redukált Q_{10} koncentrációja

6,81 mg / g volt. Ennél a számításnál is azt az elvet követjük, hogy az egymásba ágyazott bizonytalanság miatt először állandónak tekintjük a mérés érzékenységét, majd utólag egészítjük ki a „nullás” minta mérési bizonytalanságának mérlegét az érzékenység bizonytalanságával.

Az első függvény a következő módon hordozta a mintaelőkészítés és a mérés során felmerülő, bizonytalanságot okozó tényezőket:

$$c = \frac{A}{a} \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{V_3}{V_4} \cdot \frac{1}{10^6} \cdot \frac{1}{m_1}$$

3. képlet

ahol „c” a minta redukált Q₁₀ koncentrációja (mg / g), „A” a kapott csúcs alatti terület (cps), „a” a mérés érzékenysége (cps/ng redukált Q₁₀ injektálás), „V1” az extrakciós térfogat (10 ml-es beosztásig használt centrifugacső), „V2” az extrakciós oldatból digitális pipettával kimért, hígításhoz használt térfogat (25 µl), „V3” a hígítási lépés végtérfogata (25,0 ml mérőlombik), „V4” a HPLC-ESI-MS-MS rendszerbe injektált térfogat (10 µl), „m₁” az extrakcióhoz bemért mintamennyiség (mg). A 10⁻⁶ szorzó a ng – mg átváltáshoz szükséges.

A felsorolt tényezőkhez az adott minta mérésénél a következő adatok tartoztak (19. táblázat):

19. táblázat: A redukált Q₁₀ tartalom mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített első kalibrációs ponthoz („nullás” ponthoz) tartozó standard bizonytalansági tényezők ismertetése, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Érték	Becslés típusa	Standard bizonytalanság
A, cps	12352	„A” típusú becslés, 1,06% szórás	136 cps
a, cps/ng	36247	(első körben állandónak tekintett)	
V1, µl	10000	„B” pontosságú centrifugacső, „A” típusú becslés, 0,55% szórás	55 µl
V2, µl	25	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	0,06 µl
V3, µl	25000	"B" típus, ± 0,04 ml, 95%	20 µl
V4, µl	10	±1% szórás, „B” típus, gyári kézikönyvben	0,05 µl
m ₁ , g	0,05	"B" típus, négyzetes eloszlás	0,000028868 g

A 19. táblázatban felsorolt tényezők bizonytalanságának becslése a következő módon alakult:

„A”: mivel a készülék szórása nem ismert az adott tömegszámokon és átmeneteken, „A” típusú becslés elvégzéséhez 10 egymást követő injektálást hajtottunk végre 1,0 mg/l koncentrációjú

redukált Q_{10} standard oldatból, kiszámoltuk a mérések relatív szórását, amely 1,06%-nak adódott (Melléklet 4. táblázata) – ezt az értéket tekinthettük a továbbiakban a csúcs alatti terület tényezőjénél a standard bizonytalanságnak.

„V1”: a felhasznált centrifugacső beosztása a gyártó (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Svájc) adatai szerint „B” pontosságú mérőlombikkal egyeznek meg, tehát feltételezhetően az adott gyártási sarzson belül a centrifugacsövek azonos bizonytalansággal jellemzhetők. A centrifugacsövek feltöltési bizonytalanságát úgy határoztuk meg „A” típusú becsléssel, hogy öt csövet ioncserélt vízzel 10 ml-re töltöttük, majd digitális analitikai mérlegen meghatároztuk a feltöltés szórását (Melléklet 5. táblázata). A kapott szórásértéket a továbbiakban a tényező standard bizonytalanságként kezeltük.

„V2”: a hígításhoz történő oldatkimérést 10-100 μ l térfogat kimérésére alkalmas digitális pipettával mértük ki, amelyhez, mint az akkreditált laboratóriumhoz tartozó eszközhöz, kalibrációs jegyzőkönyv tartozik. E dokumentumban ennél a pipettánál 0,06 μ l szórást állapítottak meg, ezt az értéket pedig (mint „A” típusú becslést) azonosnak tekintjük a standard bizonytalansággal.

„V3” a felhasznált 25,0 ml névleges térfogatú „A” pontosságú mérőlombik bizonylatolt feltöltési bizonytalansága $\pm 0,04$ ml volt. Ezt „B” típusú becslésként, 95%-os konfidencia intervallumként értelmezve a standard bizonytalanság 0,02 ml-nek adódik.

„V4” a HPLC injektálási térfogata (10 μ l) a gyártó (Agilent) kézikönyve szerint $\pm 1\%$ szórással terhelt. Ezt „B” típusú becslésként, 95%-os konfidencia intervallumként értelmezve a standard bizonytalanság 0,05 μ l-nek adódik.

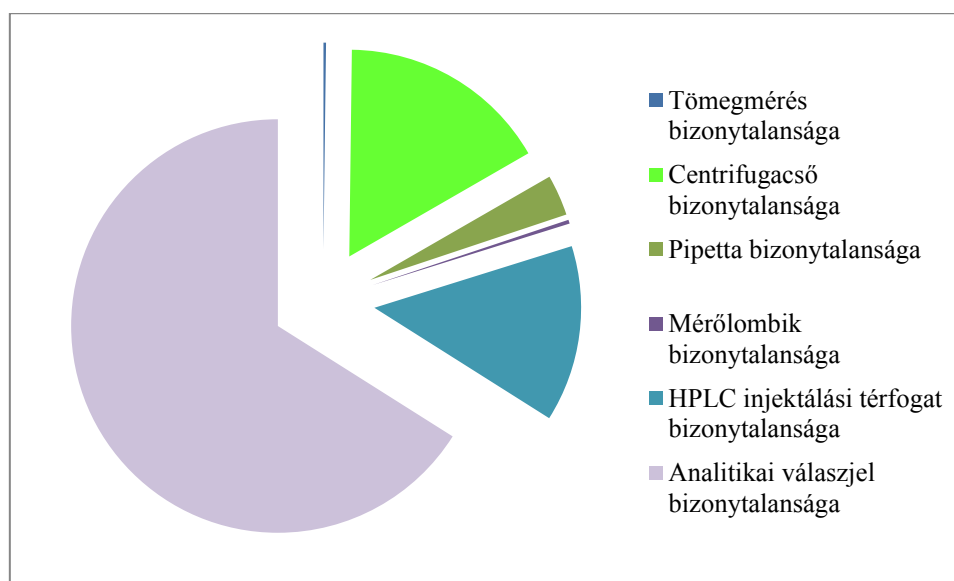
„ m_1 ”: a digitális analitikai mérleggel végzett tömegmérés „B” típusú, négyzetes eloszlású becslések körébe tartozik, amely esetben az adott digitális mérleg legkisebb, még leolvasható értékének felét (jelen esetben 0,05 mg-nak) $\sqrt{3}$ -mal kell osztani a standard bizonytalanság meghatározásához. 50,0 mg por kiszerelésű Q_{10} standardot mértünk be, amelyhez így 0,028868 mg standard bizonytalanság társult.

A következő 20. táblázatban a bizonytalansági értékek számítását mutatom be.

20. táblázat: A redukált Q_{10} mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített első kalibrációs ponthoz („nullás” ponthoz) tartozó kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, mg/g	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, mg/g	Eltérés a koncentrációban / Δ /, mg/g	Δ^2 , (mg/g) ²	Hozzájárulás, %
m_1	0,05-0,000028868=0,04997 g	6,815	6,819	-0,00394	1,55E-05	0,2
V1	10000-55=9945 μ l	6,815	6,778	0,037485	1,41E-03	16,5
V2	25-0,06=24,94 μ l	6,815	6,832	-0,0164	2,69E-04	3,2
V3	25000-20=24980 μ l	6,815	6,810	0,005452	2,97E-05	0,3
V4	10-0,05=9,95 μ l	6,815	6,850	-0,03425	1,17E-03	13,8
A	12352-136=12216 cps	6,815	6,740	0,075041	5,63E-03	66,1
Szórásnégyzet /szumma, (mg / g) ² /					0,009	100
Szórás /gyökvonás, mg / g /					0,092	
$k=2$ kiterjesztés, mg / g					0,18	

A kapott érték azt jelenti, hogy a meredekség bizonytalansága nélkül a végeredmény 95%-os konfidencia-intervallummal megadva $6,815 \pm 0,18$ mg/g, tehát RSD értékben összehasonlítva egyértelműen jobb a mérés bizonytalansága eddig a számítási lépcsőig az etil-karbamát meghatározáshoz képest, a sokkal kisebb ESI-MS-hez társítható szórás miatt. A bizonytalansági források eloszlása részben eltér az etil-karbamát méréshez képest, ugyanis a kisebb analitikai válaszjel-bizonytalanság miatt a térfogatmérések által jelentett bizonytalanság (pl. injektálás, jelretöltések) még számottevőnek vehető (33. ábra).



33. ábra: Az ubikinol meghatározás mérési bizonytalanságának alakulása állandónak tekintett érzékenység mellett

A 4. képlet, amellyel az első adalékolási pont bizonytalanságát számoltam, az etil-karbamátnál bevezetett átrendezéssel készül, tehát az egyenlet bal oldalán megmarad az elvileg a „nullás” ponthoz tartozó koncentráció, mivel az egyenlet jobb oldaláról kivonom az adalékolással bejuttatott redukált Q₁₀ standard mennyiségét.

$$c = \frac{A}{a} - \frac{m_2}{V_6} \cdot 10^9 \cdot R \cdot 0,99 \cdot \frac{V_5}{V_1} \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot V_4 \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{V_3}{V_4} \cdot \frac{1}{10^6} \cdot \frac{1}{m_1}$$

4. képlet

A 4. képletben négy új tényező is megjelenik: „m₂” a redukált Q₁₀ előállításához bemért szilárd Q₁₀ standard mennyisége (g), „V₅” a redukált Q₁₀ ennél a pontnál alkalmazott adalékolási térfogata (μl), „V₆” a szilárd Q₁₀ standard végtérfogata (μl), míg „R” a redukált Q₁₀ standard előállítási hatásfoka, amely dimenzió nélküli érték. A „10⁹” érték korrekciót jelent a ng és a g, míg „10⁶” érték korrekciót jelent a ng és a mg között.

A felsorolt tényezőkhez az első adalékolási minta mérésénél a következő adatok tartoztak (21. táblázat):

21. táblázat: A redukált Q₁₀ mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített második kalibrációs ponthoz (első adalékolási ponthoz) tartozó standard bizonytalansági tényezők ismertetése, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Érték	Becslés típusa	Standard bizonytalanság
A, cps	45105	„A” típusú becslés, 1,06% szórás	496,2 cps
a, cps/ng	36247	(első körben állandónak tekintett)	
V1, μl	10000	„B” pontosságú centrifugacső, „A” típusú becslés, 0,55% szórás	55 μl
V2, μl	25	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	0,06 μl
V3, μl	25000	"B" típus, ± 0,04 ml, 95%	20 μl
V4, μl	10	± 1% szórás, „B” típus, gyári kézikönyvben	0,05 μl
m ₁ , g	0,05	"B" típus, négyzetes eloszlás	0,000028868 g
m ₂ , g	0,0125	"B" típus, négyzetes eloszlás	0,000028868 g
V5, μl	2000	"A" típus, akkreditált kalibrációs jegyzőkönyv alapján	2,5 μl
V6, μl	25000	"B" típus, ± 0,04 ml, 95%	20 μl
R	0,99	"B" típus, ± 0,01 szórás, 95%	0,005

A 21. táblázatban felsorolt, korábban nem ismertetett tényezők bizonytalanságának becslése a következő módon alakult:

„m₂”: az „m₁”-gyel megegyező módon számolandó érték, mivel ugyanazon mérlegen történt a 0,0125 g Q₁₀ standard bemérése.

„V5”: a korábban már ismertetett, 0,5-5 ml térfogat kimérésére alkalmas digitális pipetta került itt alkalmazásra („A” típusú becslés, 2,5 µl szórás).

„V6”: a „V3”-mal egyező mérőlombik.

„R”: HPLC-ESI-MS méréssel megállapított, $\geq 99\%$ tisztaságra vonatkozó becslés, 95%-os konfidencia intervallumra meghatározva.

A 22. táblázatban az első adalékolási ponthoz tartozó bizonytalansági értékek számítását részletezem. A 20. táblázathoz képest jelentősen eltér a számolt „eredeti koncentráció” értéke (6,815 mg/g helyett 5,286 mg/g), amely előre jelzi, hogy a mérés bizonytalansága a célkomponens koncentrációjával feltehetőleg együtt nő.

22. táblázat: A redukált Q₁₀ mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített második kalibrációs ponthoz (első adalékolási ponthoz) tartozó kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, mg/g	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, mg/g	Eltérés a koncentrációban /Δ/, mg/g	Δ ² , (mg/g) ²	Hozzájárulás, %
m1	0,05-0,000028868=0,04997 g	5,286	5,342	-0,05614	3,15E-03	2,4
m2	0,0125-0,000028868=0,01247 g	5,286	5,331	-0,04527	2,05E-03	1,6
V1	10000-55=9945 µl	5,286	5,149	0,136882	1,87E-02	14,5
V2	25-0,06=24,94 µl	5,286	5,345	-0,05987	3,58E-03	2,8
V3	25000-20=24980 µl	5,286	5,266	0,01991	3,96E-04	0,3
V4	10-0,05=9,95 µl	5,286	5,411	-0,12506	1,56E-02	12,1
V5	12352-136=12216 cps	5,286	5,310	-0,0245	6,00E-04	0,5
V6	2000-2,5=1997,5 µl	5,286	5,270	0,015694	2,46E-04	0,2
R	0,99-0,005=0,985	5,286	5,385	-0,099	9,80E-03	7,6
A	45105-496,2=44608,8 cps	5,286	5,012	0,273763	7,49E-02	58,0
Szórásnégyzet /szumma, (mg/g) ² /					0,129	100
Szórás /gyökvonás, mg/g /					0,359	
k=2 kiterjesztés, mg/g					0,72	

Ahogy a 22. táblázatból kiolvasható, az első adalékolási lépésnél kb. a négyszeresére nőtt a szórás a „nullás” mintához képest, amihez bár legnagyobb mértékben még mindig a készülék

szórásajárul hozzá, de nem hanyagolható el a „B” típusú centrifugacső használata, ill. a HPLC injektorának hozzájárulása sem.

A második és harmadik adalékolási pont az első adalékolási ponttal hasonló módon számolandó, a 22. táblázathoz képest csak abban térnek el, hogy az „A” és a „V6” értékei természetesen nagyobbak, ahogy növeljük az adalékolás során bevitt redukált Q_{10} mennyiségét, másrészt az utolsó adalékolási pontnál a „V6” kétszer szerepel, mivel a 8,0 ml kimérése kétszer 4,0 ml-ként történt meg. A vonatkozó táblázatok az értekezés Mellékletében (10. és 11. táblázat) található.

A négy („nullás” + 3 adalékolási) pont kiterjesztett mérési bizonytalanságának megállapítása után az etil-karbamátnál ismertetett eljárással kiszámoltuk a kalibrációs egyenes bizonytalanságát. (23. táblázat).

23. táblázat: Az egyes kalibrációs pontokhoz tartozó eredeti és szélsőértékkel korrigált csúcs alatti területekkel kiszámolt új meredekség értékek

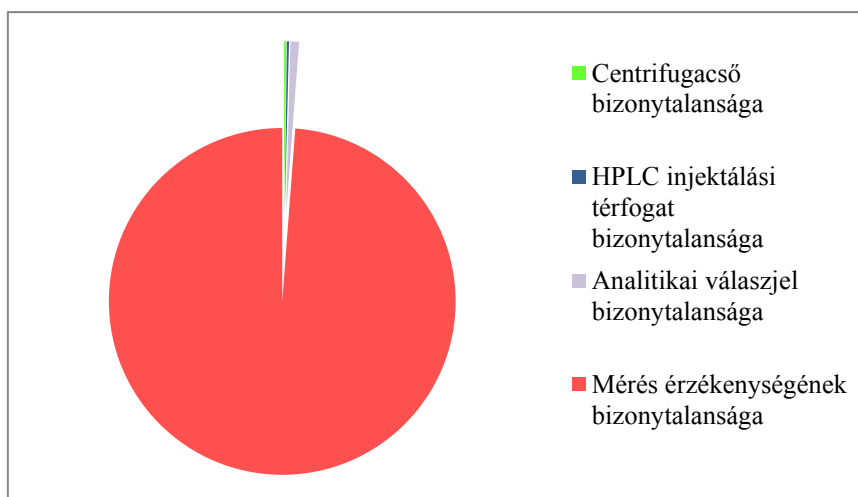
Adalékolási pontok, ng redukált Q_{10} / inj.	„c”, mg/g	SD, mg/g	RSD, %	„A”, cps	Szórással terhelt „A”, cps	Eredeti meredekség, cps/ng	Korrigált meredekség, cps/ng
0	6,815	0,092	1,35	12352	12518,75	36247	36213
0,9801	5,286	0,359	6,8	45105	48172,14	36247	35979
1,9602	8,606	0,683	7,94	86649	93528,93	36247	36448
3,9204	6,107	1,225	20,07	153170	183911,2	36247	44312
Átlag, cps/ng							38238
Szórás, cps/ng							4054
RSD, %							11,2

Hasonlóan az etil-karbamátnál megfigyelt jelenséghez, az érzékenység (az analitikai mérőgörbe meredeksége) bizonytalansága meghaladta a 10%-ot, amelyben még mindig az ESI-MS bizonytalansága játsza a legfőbb szerepet annak ellenére, hogy ezen komponens vizsgálata esetén jóval (kb. 80%-kal) kisebb szórás jellemzi a mérés ezen tényezőjét. A következő (24.) táblázatban már ennek az értéknek a figyelembevételével állítottuk össze a redukált Q_{10} bizonytalansági mérlegét.

24. táblázat: A redukált Q_{10} mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített első kalibrációs ponthoz („nullás” ponthoz) tartozó teljes kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, mg/g	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, mg/g	Eltérés a koncentrációban / Δ /, mg/g	Δ^2 , (mg/g) ²	Hozzájárulás, %
m_1	0,05-0,000028868=0,04997 g	6,815	6,819	-0,00394	1,55E-05	0,0
V1	10000-55=9945 μ l	6,815	6,778	0,037485	1,41E-03	0,2
V2	25-0,06=24,94 μ l	6,815	6,832	-0,0164	2,69E-04	0,0
V3	25000-20=24980 μ l	6,815	6,810	0,005452	2,97E-05	0,0
V4	10-0,05=9,95 μ l	6,815	6,850	-0,03425	1,17E-03	0,2
A	12352-136=12216 cps	6,815	6,740	0,075041	5,63E-03	0,8
a	36247-4060=32187 ng / cps	6,815	7,675	-0,85961	7,39E-01	98,9
Szórásnégyzet /szumma, (mg/g) ² /					0,747	100
Szórás /gyökvonás, mg/g /					0,865	
$k=2$ kiterjesztés, mg/g					1,73	

A kapott érték azt jelenti, hogy a vizsgált étrendkiegészítő redukált Q_{10} tartalma 95%-os konfidencia intervallum mellett $6,815 \pm 1,73$ mg/g (célszerűen $6,8 \pm 1,7$ mg/g közlésmóddal).



34. ábra: Az ubiquinol mérési bizonytalanságának alakulása a mérés érzékenységeinek bizonytalanságát is figyelembe véve

Bár az egyes lépések során még számottevő mértékben járult hozzá a bizonytalansághoz a HPLC injektora és a centrifugacsőben történő jelretöltés, a kiterjesztett bizonytalanság meghatározása során ezek elhanyagolható mértékűvé csökkentek, és minden esetben a készülék szórásából fakadó bizonytalanság uralja a mérleget (34. ábra). Ebből fakad, hogy a készülék megfelelő állapotának

biztosítása és a műszerrel végrehajtható, lehető legjobb ismételhetőségű mérés a kulcs a kis bizonytalanságú eredmény eléréséhez. Mindez ugyanakkor azt is megkérdőjelezi, hogy van-e értelme minden határon túl hangsúlyozni a mintaelőkészítés robusztusságát, beleértve az „A” jelű mérőlombikok használatát, a lehető legkevesebb térfogati kimérés iránti törekvést, stb., hiszen a mindösszesen 1% körüli szórással rendelkező mérőműszer befolyásolja legnagyobb mértékben a bizonytalanságot.

Mindenképpen érdemes megjegyezni, hogy az általunk megfigyelt mérleg tükröződik az EU-IRMM hitelesítési folyamataiban részt vevő laboratóriumok kiválasztásánál abban, hogy a sikeres jelentkezés legfőbb paramétere a felhasznált műszeregyüttes mérési ismételhetősége (szórása), nem pedig a teljes folyamat kiterjesztett mérési bizonytalansága – annak ellenére, hogy az „emberi tényező” a hanyagságtól (felhasználói szintű műszerkarbantartás) eltekintve az előbbi teljesítményjellemzőben nem is szerepel.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A xanthidrollal történő származékképzéssel kombinált HPLC-ESI-MS/MS detektálás olyan módszer kidolgozását tette lehetővé, amely révén nagy érzékenységgel, alacsony etil-karbamát koncentrációt lehet kimutatni, bonyolult mintaelőkészítési – előtisztítási igény nélkül. A módszer teljesítményjellemzőinek validálását – beleértve a pontosság meghatározását is – követően a módszer alkalmassá vált akkreditált laboratóriumi alkalmazásra, amelyet 2010 óta az országban elsőként NAT akkreditáció is igazolt. A módszer értékét a hatályos borkönyvi eljárashoz képest nem csökkenti, hogy nem épül belső standard használatára, mivel az adalékolási eljárás pontosság szempontjából a deuterált belső standardot használó módszerek után következik.

A mérés kiterjesztett bizonytalanságának összetétele megmutatta, hogy a bizonytalanság kiemelkedő és egyetlen számottevő oka a HPLC-ESI-MS berendezés által szolgáltatott jel szórása, amely mellett az összes járulékos lépés bizonytalansága elhanyagolható. Mivel a szakirodalomban tudomásunk szerint eddig nem közölték egyetlen hasonló (etil-karbamátra vonatkozó) mérési eljárás kiterjesztett mérési bizonytalanságát, így az általunk kapott érték „jóságát” megítélni csak annak fényében tudjuk, hogy a Magyar Borkönyv borok etil-karbamát tartalmának meghatározásánál a pálinkákra jellemző etil-karbamát koncentráció (~ 0,16 mg/l) és 14% feletti alkoholtartalmú minták esetén 6,84%-os reprodukálhatóságot jelez, és külön kiemeli a nagyobb alkoholkoncentráció esetén romló reprodukálhatóságot. Ebből fakadóan az általunk kifejlesztett eljárás – költséghatékonyság szempontjából évente max. százas nagyságrendben érkező minta esetén – minden szempontból versenyképesnek tekinthető.

Az étrendkiegésztők redukált Q_{10} tartalmának meghatározására kidolgozott, ugyancsak adalékolásra épített kalibrációs folyamatot igénylő, HPLC-ESI-MS/MS módszer hiánypótlónak számít ebben a mátrixcsoportban, mivel napjaink rutin élelmiszeranalitikai módszerét vonta be ebbe a piaci szempontból fontos szegmensbe. A mintaelőkészítés és a csatolt kromatográfiai-tömegspektrometriai vizsgálat minőségbiztosítása szempontjából hasznosnak bizonyult, hogy egy független AOAC módszerrel sikerült igazolni az optimált eljárás megfelelőségét a mennyiségi meghatározás szempontjából fontos kinyerési határfok oldaláról. A módszerrel valódi étrendkiegésztő minták redukált Q_{10} tartalmának mérése történt meg, amelyhez az étrendkiegésztők nagy Q_{10} koncentrációja miatt a szakirodalomtól eltérő, optimált módon kellett redukált standardot előállítani. A teljes eljárás – az etil-karbamátra kidolgozott módszerhez hasonlóan – NAT-akkreditációt kapott 2012-ben, elsőként és mai napig egyedülként Magyarországon.

A mérés kiterjesztett bizonytalanságának összetétele megmutatta, hogy a bizonytalanság kiemelkedő és egyetlen számottevő oka az etil-karbamát vizsgálatához hasonlóan – a HPLC-ESI-MS

berendezés által szolgáltatott jel szórása, annak ellenére, hogy mértéke közelítőleg az ötöde az etil-karbamát vizsgálatnál tapasztaltnak. Ez azt jelenti, hogy az adalékolás, bár bonyolult és munkaigényes eljárás, tehát sok, elvileg bizonytalanságot jelentősen növelő lépésből áll, a mérés bizonytalanságához gyakorlatilag nem járul hozzá, így alkalmazásával az általunk elérhető módoszatok szempontjából a legpontosabb mérést teszi lehetővé elhanyagolható bizonytalansági tétel mellett.

Ellentétben az etil-karbamátra kidolgozott, adott piaci keretek között is versenyképes eljárással, a redukált Q_{10} tartalom meghatározás a jelenlegi vegyszerárak (Q_{10} , THF) és fogyasztóvédelmi gyakorlat tükrében Magyarországon nem rentábilis, és alkalmazása ipari K + F tevékenységre korlátozódik.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként dolgoztam ki származékképzésen alapuló HPLC-ESI-MS-MS módszert szeszesitalok (pálinka, brandy) etil-karbamát tartalmának meghatározására. A módszerfejlesztés során:

- tömegspektrometriai oldalról elsőként jellemeztem a xantil-etil-karbamát és xantil-butil-karbamát vegyületek viselkedését, megállapítva, hogy Na-adduktként ionizálódnak és fragmentációjuk stabil, MRM átmenetek kialakítására alkalmas xanthidrol-fragmenseket eredményez.
- megállapítottam, hogy a módszer a főbb mennyiségi teljesítményjellemzőket (LOD, LOQ, lineritás, pontosság) tekintve legalább egyenértékű, de számos ponton jobb, mint a hatályos Magyar Borkönyvben szereplő, vonatkozó GC-MS módszer.
- megállapítottam, hogy a módszer kiterjesztett mérési bizonytalanságát legnagyobb mértékben nem a mintaelőkészítés, hanem az ESI-MS berendezés ismételhetősége (szórása) határozza meg.
- megállapítottam, hogy belső standard vegyület céljaira sem a butil-karbamát, sem pedig az imazalil nem alkalmas, így az adalékolás megfelelő és költséghatékony kalibrációs eljárást jelent.

2. Új mintaelőkészítési elveken nyugvó, HPLC-ESI-MS-MS alapú módszert dolgoztam ki étrendkiegészítő minták redukált Q₁₀ tartalmának meghatározására. A módszerfejlesztés során:

- új adalékolási eljárást dolgoztam ki, amelyben validáltam az ubikinon-redukció megfelelőségét.
- a vonatkozó (AOAC 2008.07) extrakciós eljáráshoz képest gyorsabb mintaelőkészítési módszert dolgoztam ki, amely egyúttal nagymértékben csökkenti a mintában található ubikinol oxidációját.
- megállapítottam, hogy a módszer kiterjesztett mérési bizonytalanságát legnagyobb mértékben nem a mintaelőkészítés, hanem az ESI-MS berendezés ismételhetősége (szórása) határozza meg.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A hazai pálinkafőzés felfutásához és az EU által propagált, etil-karbamát bevitelt csökkenteni szándékozó rendeletekhez igazodva a hatályos borkönyvi módszernél számos paraméterében jobb teljesítményjellemzőkkel leírható, napjaink rutin élelmiszeranalitikai laboratóriumaiban fontos szerepet játszó HPLC-ESI-MS-MS összeállításra dolgoztam ki az etil-karbamát mérési eljárását. A folyamatban kulcsfontosságú volt az etil-karbamát szelektív és érzékeny mérést lehetővé tevő, 9-xanthidrollal történő származékolás során létrejövő xantil-etil-karbamát ESI-MS ionizációs és fragmentációs viselkedésének leírása. A kidolgozott, NAT akkreditációs szintet elérő eljárás adalékoláson alapuló kalibrációs módszere LRM mintákkal igazoltan pontos eredményeket biztosított annak ellenére, hogy belső standard bevezetésére irányuló kísérleteim (imazalil, butil-karbamát) nem jártak sikerrel.

A minták redukált Q_{10} tartalma az étrendkiegésztők és az élelmiszerek oldaláról sokáig csupán mint zavaró tényező szerepelt, amely miatt uniformizálásra van szükség a mintaelőkészítés során. Ugyanakkor – részben piaci pozicionálás, részben kutatási eredményekhez történő igazodás következtében – egyre nagyobb igény jelentkezik e koenzim redukált/oxidált arányának meghatározására, amelyhez a korábbi élettani vizsgálatokhoz kapcsolódó klinikai analitikai eljárások közvetlenül nem ültethetők át. Dolgozatomban az élettani mintákhoz képest a Q_{10} koenzimet 3-5 nagyságrenddel nagyobb koncentrációban tartalmazó étrendkiegésztők redukált Q_{10} tartalmának mintaelőkészítéséhez szükséges ubikinol standard előállításának optimalizálását és validálását, az alkalmazandó extrakció oxidatív hatásának megállapítását, az ubikinol jó hatásfokú kinyerésére használható extrakciós módszer független (AOAC módszerre alapozott) eljárással történő validálását és a pontos mennyiségi mérést lehetővé tevő adalékolás kidolgozását hajtottam végre. A vizsgált 12 étrendkiegésztő minta fele tartalmazott redukált Q_{10} koenzimet annak ellenére, hogy a gyártó erről nem számolt be a csomagoláson – feltételezhetően a gyártás/kiszerelés közben létrejövő, a kiindulási oxidált Q_{10} -ból redukcióval kialakuló mennyiségről van szó.

A mérési eljárás kiterjesztett bizonytalanságához tartozó mérleg felállításával megállapítottam, hogy a folyamat bizonytalanság szempontjából „gyenge láncszeme” az ESI-MS készülék szórása, amely annak ellenére vezetett $\pm 25\%$ -ot meghaladó bizonytalansághoz, hogy önmagában csupán 1% -ot tett ki.

10. SUMMARY

The recent promotion of Hungarian „pálinka” brewing and the regulative issues of the EU on the decreasing of ethyl carbamate intake were the leading forces in my study to establish a novel analytical method for the quantification of ethyl carbamate. The approach was based on LC-ESI-MS, the platform routinely used in food analytical laboratories, that could provide a method with a set of analytical parameters exceeding those of the operative official method described in the „Hungarian Book of Wines” for almost all of the attributes. One of the important new features of my method was the ESI-MS characterization of xantil-ethyl-carbamate, the derivative that could make the whole procedure selective and sensitive enough. The final method achieved the accreditation level and it could provide accurate results for LRM samples. The quality of the method was not diminished by the unsuccessful introduction of internal standardization with imazalil and buthyl carbamate as the applied spiking procedure could compensate for analytical losses and drifts.

The ubiquinol content of foods and food supplements has usually been considered as an analytical interference that calls for uniformization during sample preparation. On the other hand, market positioning and involving some recent reports on the physiological attributes of ubiquinol, there has been a growing interest in the quantification of this reduced form of coenzyme Q₁₀ – however, analytical methods developed in the human clinical area cannot be directly applied. In my study, the analysis of food supplements containing Q₁₀ in a concentration range exceeding human physiological samples with 3-5 orders of magnitude was targeted for ubiquinol quantification. The method development process included (i) the preparation and validation of ubiquinol standard solution, (ii) the assessment of oxidative properties of extraction methodologies, (iii) the AOAC-method based validation of the extraction efficiency and the decomposition free character of the sample preparation, and (iv) the establishment of a novel spiking method to provide accurate results. Finally, half of the analysed food supplement samples contained ubiquinol. As no indication about this compound was given on any labels of the products tested, the formation of ubiquinol may have originated from unintentional reduction of the oxidised form of Q₁₀ during either the production or the packaging processes.

The extended uncertainty budget of the procedure concluded that the step responsible for the highest contribution was the standard deviation of the ESI-MS instrument. Indeed, 1% of standard deviation of the ESI-MS resulted in +/- 25% uncertainty of the final analytical result.

11. IRODALOMJEGYZÉK

- ABID M., SAQIB J., BING H., MALIK M. H., TAO W., SHICHENG L., KAHN M. A., ZENG X. (2014) Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice *Ultrasonics Sonochemistry* 21, 3, 984–990
- ADAM L., POSTEL W. (1987) Gaschromatographische Bestimmung von Ethylcarbamat (Urethan) in Spirituosen *Branntweinwirtschaft* 127, 66–68
- AJTONY Z., SZOBOSZLAI N., BENCS L., VISZKET E., MIHUCZ V.G. (2013) Determination of ethyl carbamate in wine by high performance liquid chromatography *Food Chemistry* 141, 2, 1301–1305
- ANDRADE S., de GULBERTO L., BOSCOLO M., LIMA-NETO B. S., FRANCO D. W. (2002) Ethyl carbamate in alcoholic beverages (cachaça, tiquira, whisky and grape) *Química Nova* 25, 6B, 1074–1077
- ANDREY D. (1987) A simple gas chromatography method for the determination of ethylcarbamate in spirits *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung* 185, 21–23
- ANDRICH L., ESTI M., MORESI M. (2009) Urea Degradation in Model Wine Solutions by Free or Immobilized Acid Urease in a Stirred Bioreactor *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 9, 3533–3542
- APPELKVIST E. L., EDLUND C., LOW P., SCHEDIN S., KALEN A. , DALLNER G. (1993) Effects of Inhibitors of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme-a Reductase on Coenzyme-Q and Dolichol Biosynthesis *Clinical Investigator* 71, 8, 97–102
- ARENA M. E., SAGUIR F. M., DE NADRA M. C. M. (1999) Arginine, Citrulline and Ornithine Metabolism by Lactic Acid Bacteria from Wine *International Journal of Food Microbiology* 52, 3, 155–161
- ARESTA M., BOSCOLO M., FRANCO D. W. (2001) Copper(II) Catalysis in Cyanide Conversion into Ethyl Carbamate in Spirits and Relevant Reactions *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 6, 2819–2824
- BAILEY R., NORTH D., MYATT D., LAWRENCE JF. (1986) Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages by Methylation and Gas-Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Thermionic Detection *Journal of Chromatography* 369, 1, 199–202
- BÁNYAI-STEFANOVITS É., DUDUCZ GY., FEHÉR I., (2001) Biokémia (jegyzet)
- BARAKAT A., SHEGOKAR R., DITTGEN M., MÜLLER R.H. (2013) Coenzyme Q10 oral bioavailability: Effect of formulation type *Journal of Pharmaceutical Investigation* 43, 6, 431–451
- BARCELOS F., VIANA L., DAS GRACAS CARDOSO M., VILELA F. J., PEREIRA DOS ANJOS J. (2007) Content of ethyl carbamate and other secondary compounds in different spirits produced in

- three regions of minas gerais: South minas, Zona da mata and Jequitinhonha valley *Quimica Nova* 30, 4, 1009–1011
- BARTOSCHEK S., VORHOLT J. A., THAUER R. K., GEIERSTANGER B. H., GRIESINGER, C. (2001) N-Carboxymethanofuran (carbamate) formation from methanofuran and CO₂ in methanogenic archaea: Thermodynamics and kinetics of the spontaneous reaction *European Journal of Biochemistry* 267, 3130–3138
- BATTAGLIA R., CONACHER HBS, PAGE B. D. (1990) Ethyl Carbamate (urethane) in Alcoholic Beverages and Foods - a Review *Food Additives and Contaminants* 7, 4, 477–96
- BAUMANN U., ZIMMERLI B. (1988) Accelerated ethyl carbamate formation in spirits *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 79, 2, 175–185
- BAYS H. (2006) Statin Safety: An Overview and Assessment of the Data-2005 *American Journal of Cardiology* 97, 8A, 6C–26C
- BEBIOLKA H., DUNKEL K. (1987) Bestimmung von Ethylcarbamat in alkoholischen Getränken mittels Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 83, 75–76
- BERNDORFER-KRASZNER É., TELEGDY-KOVÁCS, L. (1971) Egyes biokinonok jelentősége és előfordulása élelmiszerekben. Élelmészeti Ipar 25, 11, 339–345
- BHAGAVAN, HEMMI N., CHOPRA RAJ K. (2007) Plasma Coenzyme Q₁₀ Response to Oral Ingestion of Coenzyme Q₁₀ Formulations *Mitochondrion* 7, 78–88
- BIPM (1993) Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. Geneva: International Organisation for Standardisation.
- BRUMLEY W. C., CANAS B. J., PERFETTI G. A., MOSSOBA M. M., SPHON J. A., CORNELIUSSEN P. E. (1988) Quantitation of ethyl carbamate in whiskey, sherry, port, and wine by gaschromatography/tandem mass spectrometry using a triple quadrupole mass spectrometer *Analytical Chemistry* 60, 975–978
- CANAS B. J., JOE F. L., DIACHENKO G. W., BURNS G. (1994) Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Soy-Sauce by Gas-Chromatography with Mass-Selective Detection - Collaborative Study *Journal of Aoac International* 77, 6, 1530–1536
- CAYMAN CHEMICAL COMPANY (2012) Product information - Coenzym Q₁₀, Item No. 11506. <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/11506>. Hozzáférés dátuma: 2014.08.05.
- CLEGG B. S., FRANK R., RIPLEY B. D., CHAPMAN N. D., BRAUN H., SOBOLOV M., WRIGHT S. A. (1988) Contamination of Alcoholic Products by Trace Quantities of Ethyl Carbamate (Urethane) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 4–6: 832–837

- CONACHER HBS, PAGE B. D.(1986) Ethyl carbamate in alcoholic beverages: a canadian case history *Proceedings of Euro Food Tox II. European Society of Toxicology; Schwerzenbach, Switzerland: 237–242*
- CRANE F. L., HATEFI Y., LESTER R. L., WIDMER C. (1957) Isolation of a Quinone from Beef Heart Mitochondria *Biochimica Et Biophysica Acta* 25, 1, 220–221
- DE MELO ABREU S., ALVES A., OLIVEIRA B., HERBERT P. (2005). Determination of ethyl-carbamate in alcoholic beverages: An interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382, 2, 498-503
- DENNIS M. J., HOWARTH N., MASSEY R. C., PARKER I., SCOTTER M., STARTIN JR. (1986) Method for the Analysis of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages by Capillary Gas-Chromatography *Journal of Chromatography* 369, 1, 193–198
- DENNIS M. J., HOWARTH N., MASSEY R. C., McWEENEY D.J., PARKER I., SCOTTER M., STARTIN JR. (1988) Ethyl-carbamate analysis in fermented products: a comparison of measurements off mass spectrometry, thermal energy analyzer, and Hall electrolytic conductivity detector *Journal of Research of National Bureau of Standards* 93, 249-251
- DREXLER W., SCHMID E.R. (1989) A gas chromatographic method for the determination of ethyl carbamate in spirits *Ernährung/Nutrition* 13, 591–594
- DUBERLEY K. E. C., HARGREAVES I. P., CHAIWATANASIRIKUL K. A., HEALES S. JR., LAND J. M., RAHMAN S., MILLS K., EATON S. (2013) Coenzyme Q10 Quantification in Muscle, Fibroblasts and Cerebrospinal Fluid by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry Using a Novel Deuterated Internal Standard *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27, 9, 924–930
- EFSA (2007) Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages *EFSA J.* 551:1–44.
- EFSA (2010) Data collection templates for Ethyl Carbamate and 3-MCPD Esters *EFSA J.* 8(6):1569(6)
- EFSA (2010) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to coenzyme Q₁₀ and contribution to normal energy-yielding metabolism (ID 1508, 1512, 1720, 1912, 4668), maintenance of normal blood pressure (ID 1509, 1721, 1911), protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1510), contribution to normal cognitive function (ID 1511), maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 1721) and increase in endurance capacity and/or endurance performance (ID 1913) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 ; 1 ; 8(10):1793 (27)
- EFSA (2014) Evaluation of monitoring data on levels of ethyl carbamate in the years 2010-2012, EFSA supporting publication EN-578
- EPERJESI I., KÁLLAY M., MAGYAR I., (1998) *Borászat* ISBN: 9632862627

- ESTI M., FIDALEO M., TAMBORRA P., MORESI M. (2007) Modeling of Urea Degradation in White and Rose' Wines by Acid Urease *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2590–2596
- FAUHL C., WITTKOWSKI R. (1992) Determination of Ethyl Carbamate in Wine by GC-SIM-MS after Continuous Extraction with Diethyl Ether *Journal of High Resolution Chromatography* 15, 3, 203–205
- FAUHL C., CATSBURG R., WITTKOWSKI R. (1993) Determination of ethyl carbamate in soy sauces *Food Chemistry* 48, 3, 313–316
- FRANKE A. A., MORRISON C. M., CUSTER L. J., LI X., LA J. F. I. (2013) Simultaneous Analysis of Circulating 25-Hydroxy-Vitamin D3, 25-Hydroxy-Vitamin D2, Retinol, Tocopherols, Carotenoids, and Oxidized and Reduced Coenzyme Q10 by High Performance Liquid Chromatography with Photo Diode-Array Detection Using C18 and C30 Columns Alone or in Combination *Journal of Chromatography* 1301, 1–9
- FUNCH F., LISBJERG S. (1988) Analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung* 186, 29–32
- GALINIER A., CARRIERE A., FERNANDEZ Y., BESSAC A. M., CASPAR-BAUGUIL S., PERIQUET B., COMTAT M., THOUVENOT J. P., CASTEILLA L (2004) Biological Validation of Coenzyme Q Redox State by HPLC-EC Measurement: Relationship between Coenzyme Q Redox State and Coenzyme Q Content in Rat Tissues *Febs Letters* 578, 1–2, 53–57
- GARCIA-REYES J. F., HERNANDO M. D., FERRER C., MOLINA-DIA A., FERNANDEZ-ALBA A. R. (2007) 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
- GIACHETTI C., ASSANDRI A., ZANOLO G. (1991) Gas-Chromatographic Mass-Spectrometric Determination of Ethyl Carbamate *Journal of Chromatography* 585, 1, 111–115
- GOTO T., ITO Y., OKA H., SAITO I., MATSUMOTO H., NAKAZAWA H. (2003) Simple and rapid determination of N-methylcarbamate pesticides in citrus fruits by electrospray ionization tandem mass spectrometry *Analytica Chimica Acta* 487(2), 201–209
- GRANCHI L., PAPERI R., ROSELLINI D., VINCENZINI M. (1998) Strain Variation of Arginine Catabolism among Malolactic Oenococcus Oeni Strains of Wine Origin *Italian Journal of Food Science* 10, 4, 351–357
- HADDON W. F., MANCINI M. L., MCLAREN M., EFFIO A., HARDEN L. A., DEGRE R. L., BRADFORD J. L. (1994) Occurrence of Ethyl Carbamate (urethane) in United-States and Canadian Breads - Measurements by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry *Cereal Chemistry* 71, 2, 207–215

- HADDOW A., SEXTON W. (1946) Influence of carbamic esters (urethanes) on experimental animal tumors *Nature* 157, 500–503
- HAMLET C. G., JAYARATNE S. M., MORRISON C. (2005) Application of Positive Ion Chemical Ionisation and Tandem Mass Spectrometry Combined with Gas Chromatography to the Trace Level Analysis of Ethyl Carbamate in Bread *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 16, 2235–2243
- HANSEN G., CHRISTENSEN P., TUCHSEN E., LUND T. (2004) Sensitive and Selective Analysis of Coenzyme Q(10) in Human Serum by Negative APCI LC-MS *Analyst* 129, 1, 45–50
- HASNIP S., CREWS C., POTTER N., CHRISTY J., CHAN D., BONDU T., MATTHEWS W., WALTERS B., PATEL K. (2007) Survey of Ethyl Carbamate in Fermented Foods Sold in the United Kingdom in 2004 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7, 2755–2759
- HASEGAWA Y., NAKAMURA Y., TONOGAI Y (1990) Determination of ethyl carbamate in various fermented foods by selected ion monitoring *Journal of Food Protection* 53, 1058–1061
- HEALTH CANADA (2012) Canadian Standards (Maximum Levels) for Various Chemical Contaminants in Foods. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/contaminants-guidelines-directives-eng.php>. Hozzáférés dátuma: 2014.08.10.
- HEGEDŰS C. (2011) Kockázatalapú döntések támogatása a mérési bizonytalanság figyelembevételével
- HENSCHKE P. A., OUGH C. S. (1991) Urea Accumulation in Fermenting Grape Juice *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 4, 317–321
- HERBERT P., SANTOS L., BASTOS M., BARROS P., ALVES A. (2002) New HPLC Method to Determine Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages Using Fluorescence Detection *Journal of Food Science* 67, 5, 1616–1620
- HERNANDEZ L., LUNA H., RUIZ-TERAN F., VAZQUEZ A. (2004) Screening for hydroxynitrile lyase activity in crude preparations of some edible plants *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* 30 (3-4), 105-108
- HOLLAND J. F., HOSLEY H., SCHARLAU C., CARBONE P. P., FREI III E., BRINDLEY C. O., HALL T. C. (1966) A Controlled Trial of Urethane Treatment in Multiple Myeloma *Blood* 27, 3, 328–342
- HORVÁTH, G. (2013) A pálinkateszt eredménye 5:1. Magyar Nemzet Online, http://mno.hu/magyar_nemzet_belfoldi_hirei/a-palinkateszt-eredmenye-51-1191708. Hozzáférés időpontja: 2014.08.05.
- INGLEDEW W. M., MAGNUS C. A., PATTERSON C. A. (1987) Yeast Foods and Ethyl Carbamate Formation in Wine *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 4, 332–335
- IKENOYA S., TAKADA M., YUZURIHA T., ABE K., KATAYAMA K. (1981) Studies on reduced and oxidized ubiquinones. I. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones in

- tissues and mitochondria by high performance liquid chromatography *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 29, 158-164
- ITKONEN O., SUOMALAINEN A., TURPEINEN U. (2013) Mitochondrial Coenzyme Q10 Determination by Isotope-Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry *Clinical Chemistry* 59, 8, 1260–1267
- JAGERDEO E., DUGAR S., FOSTER G. D., SCHENCK H. (2002) Analysis of Ethyl Carbamate in Wines Using Solid-Phase Extraction and Multidimensional Gas Chromatography/mass Spectrometry *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 21, 5797–5802
- JCGM (2008) Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement, Paris: Joint Committee for Guides in Metrology.
- KAGAN V., SERBINOVA E., PACKER L. (1990) Antioxidant Effects of Ubiquinones in Microsomes and Mitochondria Are Mediated by Tocopherol Recycling *Biochemical and Biophysical Research Communications* 169, 3, 851–857
- KETTAWAN A., KUNTHIDA C., TAKAHASHI T., KISHI T., CHIKAZAWA J., SAKATA Y., YANO E., WATABE K., YAMAMOTO Y., OKAMOTO T. (2007) The Quality Control Assessment of Commercially Available Coenzyme q(10)-Containing Dietary and Health Supplements in Japan *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 41, 2, 124–131
- KITAMOTO K., ODAMIYAZAKI K., GOMI K., KUMAGAI C. (1993) Mutant Isolation of Non-Urea Producing Sake Yeast by Positive Selection *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75, 5, 359–363
- KMELLÁR B., FODOR P., PAREJA L., FERRER C., MARTINEZ-UROZ M. A., VALVERDE A., et al. (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
- KOBASHI K. (1989) Ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Eisei Kagaku*, 35, 2, 110–124
- KODAMA S., SUZUKI T., FUJINAWA S., DE LA TEJA P., YOTSUZUKA F (1994) Urea Contribution to Ethyl Carbamate Formation in Commercial Wines During Storage *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 1, 17–24
- KODAMA S., YOTSUZUKA F (1996) Acid Urease: Reduction of Ethyl Carbamate Formation in Sherry under Simulated Baking Conditions *Journal of Food Science* 61, 2, 304–307
- KOSÁRY J. (1997) A Q₁₀ hatásának biokémiai háttere és alkalmazhatósága a gyógyításban
- KOSZTYÁN Z. T., SCHANDA J. (2009) Adaptive Statistical Methods for Optimal Color Selection and Spectral Characterization of Color Scanners and Cameras *Journal of Imaging Science and Technology*, 53(1), 010501-1–010501-10.

- KOSZTYÁN Z. T., HEGEDŰS, C. (2011) A mérési bizonytalanság kockázat alapú kezelés megfelelőségi döntésekben ipari körülmények között *Sigma XLII*(1-2), 43–55
- KRUK J., STRZALKA K. (1993) Fluorescence properties of plastoquinol, ubiquinol and atocopherol quinol in solution and liposome membranes *Journal of Photochemicals and Photobiology B: Biology* 19, 33-38
- KUBO H., FUJII K., KAWABE T., MATSUMOTO S., KISHIDA H., HOSOE K. (2008) Food Content of Ubiquinol-10 and Ubiquinone-10 in the Japanese Diet *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 3, 199–210
- LACHENMEIER D. W. (2005) Rapid Screening for Ethyl Carbamate in Stone-Fruit Spirits Using FTIR Spectroscopy and Chemometrics *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382, 6, 1407–1412
- LACHENMEIER D. W., FRANK W., KUBALLA T. (2005) Application of Tandem Mass Spectrometry Combined with Gas Chromatography to the Routine Analysis of Ethyl Carbamate in Stone-Fruit Spirits *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 2, 108–112
- LACHENMEIER, D. W., SARSH, B., & REHM, J. (2009). The composition of alcohol products from markets in Lithuania and Hungary, and potential health consequences: A pilot study *Alcohol and Alcoholism* 44, 1, 93–102
- LANG J. K., GOHIL K., PACHER L. (1986) Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions *Analytical Biochemistry* 157, 106–116
- LAU B.P.-Y., WEBER D., PAGE B.D. (1987) Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethyl-carbamate in alcoholic beverages *Journal of Chromatography* 402, 233-241
- LE KIM Y-K, KOH E., CHUNG H-J, KWON H. (2000) Determination of ethyl carbamate in some fermented Korean foods and beverages *Food Additives & Contaminants* 17, 6, 469–475
- LECA J. M., PEREIRA V., PEREIRA A. C., MARQUES J. C. (2014) Rapid and Sensitive Methodology for Determination of Ethyl Carbamate in Fortified Wines Using Microextraction by Packed Sorbent and Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection *Analytica Chimica Acta* 811, 29–35
- LEE KWANG-GEUN (2013) Analysis and Risk Assessment of Ethyl Carbamate in Various Fermented Foods *European Food Research and Technology* 236, 5, 891–898
- LEE J.H., HOANG N.H., HUONG N.L., SHRESTHA A., PARK J.W. (2014) Ultra-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Coenzyme Q10 as an Anti-Aging Ingredient in Edible Cosmetics *Analytical Letters* 47, 3, 367-376
- LEI F. F., ZHANG X. N., GAO Y.L., HAN Y. H., LI X. J., PAN S. Y. (2012) Multiple Headspace Solid-Phase Microextraction Using a New Fiber for Avoiding Matrix Interferences in the

- Quantitative Determination of Ethyl Carbamate in Pickles *Journal of Separation Science* 35, 9, 1152–1159
- LIM H. S., LEE K. G. (2011) Development and Validation of Analytical Methods for Ethyl Carbamate in Various Fermented Foods *Food Chemistry* 126, 3, 1373–1379
- LIU J., XU Y., NIE Y., ZHAO G. A. (2012) Optimization production of acid urease by *Enterobacter* sp. in an approach to reduce urea in Chinese rice wine *SOURCE Bioprocess & Biosystems Engineering* 4, 35, 651
- LIU S.-Q., PRITCHARD G. G., HARDMAN M. J., PILONE G. J. (1994) Citrulline Production and Ethyl Carbamate (Urethane) Precursor Formation From Arginine Degradation by Wine Lactic Acid Bacteria *Leuconostoc Oenos* and *Lactobacillus Buchneri* *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 2, 235–242
- LUNETTA S., ROMAN M. (2008) Determination of Coenzyme Q10 Content in Raw Materials and Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography-UV: Collaborative Study *Journal of AOAC International* 91, 4, 702–708
- LUQUE DE CASTRO M. D., PRIEGO-CAPOTE F. (2007) Ultrasound-assisted preparation of liquid samples *Talanta* 72, 2, 321–334
- MA Y. P., DENG F. Q., CHEN D. Z., SUN S. W. (1995) Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages by Capillary Multidimensional Gas-Chromatography with Thermionic Specific Detection *Journal of Chromatography A* 695, 2, 259–265
- MACHADO DE R., MARIA A., CARDOSO M. D. G., SACZK A. A., PEREIRA DOS ANJOS J. C., ZACARONI L. M., SILVEIRA DOREA H., LEE NELSON D. (2013) Determination of Ethyl Carbamate in Cachaca Produced from Copper Stills by HPLC *Food Chemistry* 138, 2–3, 1233–1238
- MACKENZIE W. M., CLYNE A. H., MACDONALD L. S. (1990) Ethyl Carbamate Formation in Grain Based Spirits .2. the Identification and Determination of Cyanide Related Species Involved in Ethyl Carbamate Formation in Scotch Grain Whiskey *Journal of the Institute of Brewing* 96, 4, 223–232
- MACNAMARA K., BURKE N., MULLINS E., RAPP, A. (1989) Direct quantification of ethyl carbamate in distilled alcoholic beverages using a cold capillary injection system and optimised selected ion monitoring *Chromatographia* 27, 5-6, 209-215
- MADRERA R. R., VALLES B. S. (2009) Determination of Ethyl Carbamate in Cider Spirits by HPLC-FLD *Food Control* 20, 2, 139–143
- MAGYAR BORKÖNYV (2002) Borok vizsgálata fejezet: 44. Az etil-karbamát meghatározása borban: gázkromatográfiás/tömegspektrometriás módszert alkalmazó szelektív meghatározás 292-296.

- MAGYARÓSI CS. (2011) Tényleg képes lehet ölni a házi pálinka? http://index.hu/tudomany/2011/04/28/tenyleg_kepes_olni_a_hazi_palinka/ Hozzáférés időpontja: 2014.08.05.
- MASQUE M. C., SOLER M., ZAPLANA B., FRANQUET R., RICO S., ELORDUY X., PUIG A. (2011) Ethyl Carbamate Content in Wines with Malolactic Fermentation Induced at Different Points in the Vinification Process *Annals of Microbiology* 61, 1, 199–206
- MATTILA P., LEHTONEN M., KUMPULAINEN J. (2000) Comparison of in-line connected diode array and electrochemical detectors in the high-performance liquid chromatographic analysis of coenzymes Q9 and Q10 in food materials *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4, 1229–1233
- MATTILA P., KUMPULAINEN J. (2001) Coenzymes Q9 and Q10: Contents in Foods and Dietary Intake *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 409–417
- MATSUDO T., AOKI T., ABE K., FUKUTA N., HIGUCHI T., SASAKI M., UCHIDA K. (1993) Determination of Ethyl Carbamate in Soy-Sauce and Its Possible Precursor *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 3, 352–56
- MENKE T., NIKLOWITZ P., ADAM S., WEBER M., SCHLUTER B., W. (2000) Simultaneous Detection of Ubiquinol-10, Ubiquinone-10, and Tocopherols in Human Plasma Microsamples and Macrosamples as a Marker of Oxidative Damage in Neonates and Infants *Analytical Biochemistry* 282, 2, 209–217
- METCALF R.L. (2002) “Insect Control” in Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry Wiley-VCH, Weinheim
- MILDAU G., PREUSS A., FRANK W., HEERING W. (1987) Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages: improved analysis and light-dependent formation. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 83, 69–74
- MILES M.V., HORN P., MILES L., TANG P., STEELE P., DeGRAUW T. (2002) Bioequivalence of coenzyme Q₁₀ from over-the-counter supplements *Nutrition Research* 22, 8, 919–929
- MIRZOIAN A., MABUD A. (2006) Comparison of Methods for Extraction of Ethyl Carbamate from Alcoholic Beverages in Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis *Journal of AOAC International* 89, 4, 1048–1051
- MIYAGAWA K., SUMIDA M., NAKAO M., HARADA M., YAMAMOTO H., KUSUMI T., YOSHIZAWA K., AMACHI T., NAKAYAMA T. (1999) Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis* *Journal of Biotechnology* 68, 2-3, 227–236
- MOLYNEUX R. J., WONG Y. (1973) High-pressure liquid chromatography in the separation and detection of bitter compound *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21, 531

- MOLYNEUX S. L., FLORKOWSKI C. M., GEORGE P. M., PILBROW A. P., FRAMPTON C. M., LEVER M., RICHARDS M. **(2008)** Coenzyme Q(10) An Independent Predictor of Mortality in Chronic Heart Failure *Journal of the American College of Cardiology* 52, 18, 1435–1441
- MOLYNEUX S.L., LEVER M. **(2005)** Fluorescence is less sensitive than ultraviolet or electrochemical detection for measurement of coenzyme Q10 in plasma *Clinica Chimica Acta* 358, 198–200
- MONTEIRO F. F., TROUSDALE E. K, BISSON L. F. **(1989)** Ethyl Carbamate Formation in Wine: Use of Radioactively Labeled Precursors to Demonstrate the Involvement of Urea *American Journal of Enology and Viticulture* 40, 1, 1–8
- MOSKALYK R. E., CHATTEN, L. G. **(1967)** Alkylation by secondary alcohols. I. The reaction of xanthidrol with some N1-monosubstituted sulfanilamides and related compounds *Canadian Journal of Chemistry* 45, 13, 1411–1424
- MOSSOBA M. M., CHEN J. T., BRUMLEY W. C., PAGE S. W. **(1988)** Application of gas chromatography/matrix isolation/Fourier transform infrared spectrometry to the determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and foods *Analytical Chemistry* 60, 945–948
- NAGATO L. A. F., SILVA O. A., YONAMINE M., PENTEADO M. DE V. C. **(2000)** Quantitation of ethyl carbamate (EC) by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits *Alimentaria* 37, 311, 31–36
- NAGYGYÖRGY L. **(2013)** A pálinka sikerének támogatása speciális laboratóriumi vizsgálatokkal. Előadáskivonat - A „Pálinkamester képzés” hallgatóinak laborlátogatása a WESSLING-ben Budapest 2013.11.22.
- NAGYGYÖRGY L., KŐPATAKI T. **(2010)** Etil-karbamát mérési eredmények pálinka mintákból. „Az etil-karbamát élelmiszerbiztonsági kockázatai” - szakmai nap a MÉBiH és WESSLING Hungary Kft. Szervezésében. Budapest, 2010.06.01.
- NETTLESHIP A., HENSHAW P. S., MAYER H. L. **(1943)** Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl-carbamate *Journal of National Cancer Institute* 4, 309–331
- 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
- OLIVARES I.R.B., LOPES A. F. **(2012)** Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 35, 109–121
- ONDARROA M., SHARMA S. K., QUINN P. J. **(1986)** Solvation Properties of Ubiquinone-10 in Solvents of Different Polarity *Bioscience Reports* 6, 783–796
- ORDUÑA R. M., PATCHETT M. L., LIU S-Q, PILONE G. J. **(2001)** Growth and Arginine Metabolism of the Wine Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus Buchneri* and *Oenococcus Oeni* at Different pH Values and Arginine Concentrations *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4, 1657–1662

- OROZCO D., SKAMARACK J., REINS K., TITLOW B., LUNETTA S., LI F., ROMAN M. (2007) Determination of Ubidecarenone (Coenzyme Q10, Ubiquinol-10) in Raw Materials and Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: Single-Laboratory Validation *Journal of AOAC International* 90, 5, 1227–1236
- OUGH C. S. (1976/1) Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 2, 323–328
- OUGH C. S. (1976/2) Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to wine *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 2, 328–331
- OUGH C. S., CROWELL E. A., MOONEY L. A. (1988) Formation of Ethyl Carbamate Precursors During Grape Juice (Chardonnay) Fermentation. I. Addition of Amino Acids, Urea, and Ammonia: Effects of Fortification on Intracellular and Extracellular Precursors *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 3, 243–249
- OUGH CS., STEVENS D., ALMY J. (1989) Preliminary Comments on Effects of Grape Vineyard Nitrogen-Fertilization *American Journal of Enology and Viticulture* 40, 3, 219–220
- OUGH C. S., STEVENS D., SENDOVSKI T., HUANG Z., AN D. (1990) Factors Contributing to Urea Formation in Commercially Fermented Wines *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 1, 68–73
- OVERVAD K., DIAMANT B., HOLM L., HOLMER G., MORTENSEN SA., STENDER S. (1999) Coenzyme Q(10) in Health and Disease *European Journal of Clinical Nutrition* 53, 10, 764–770
- PALOMÄKI A., MALMINIEMI K., SOLAKIVI T., MALMINIEMI O. (1998) Ubiquinone Supplementation during Lovastatin Treatment: Effect on LDL Oxidation Ex Vivo *Journal of Lipid Research* 39, 7, 1430–1437
- PARK S-K, KIM C. T., LEE J-W, JHEE O. H., OM A. S., KANG J. S., MOON T. W. (2007) Analysis of Ethyl Carbamate in Korean Soy Sauce Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection or Tandem Mass Spectrometry and Gas Chromatography with Mass Spectrometry *Food Control* 18, 8, 975–982
- PATAKI P. (1993) Összeállítás a mérési bizonytalanság új megközelítéséről
- PATERSON E., HADDOW A. (1946) Leukaemia Treated with Urethane, Compared with Deep X-Ray Therapy *Lancet* 1, 6402, 677–683
- PIERCE JR. W. M., CLARK A. O., HURST H. E. (1988) Determination of ethyl carbamate in distilled alcoholic beverages by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 71, 781–784
- POBEZHIMOVA T. P., VOINIKOV V. K. (2000) Protein Import to Mitochondria *Russian Journal of Plant Physiology* 47, 1, 129–136

- POTGIETER M., PRETORIUS E., PEPPER M. S. (2013) Primary and Secondary Coenzyme Q10 Deficiency: The Role of Therapeutic Supplementation *Nutrition Reviews* 71, 3, 180–188
- PRAVST I., ZMITEK K. (2011) The Coenzyme Q10 Content of Food Supplements *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety* 6, 4: 457–463
- PRAVST I., ŽMITEK K., ŽMITEK J. (2010) Coenzyme Q10 Contents in Foods and Fortification Strategies *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50, 4, 269–280
- PYO Y-H, (2010) Coenzyme Q10 and Q9 contents in 6 commercial vegetable oils and their average daily intakes in Korea *Food Science and Biotechnology* 19, 3, 837-841
- PYO Y-H, OH H-J. (2011) Ubiquinone Contents in Korean Fermented Foods and Average Daily Intakes *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 8, 1123–1129
- RODRÍGUEZ-ACUÑA R., BRENNE E., LACOSTE F. (2008) Determination of coenzyme Q10 and Q9 in vegetable oils *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 15, 6241-6245
- RUIZ-JIMENEZ J., PRIEGO-CAPOTE F., MATA-GRANADOS J. M., QUESADA J. M., LUQUE DE CASTRO MD. (2007) Determination of the Ubiquinol-10 and Ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in Human Serum by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry to Evaluate the Oxidative Stress *Journal of Chromatography A* 1175, 2, 242–248
- SAFARINEJAD M. R, SAFARINEJAD S., SHAFIEI N., SAFARINEJAD S. (2012) Effects of the Reduced Form of Coenzyme Q10 (ubiquinol) on Semen Parameters in Men with Idiopathic Infertility: A Double-Blind, Placebo Controlled, Randomized Study *The Journal of Urology* 188, 2, 526–531
- SANCO/10684/2009: Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- SEN N. P., SEAMAN S. W., WEBER D. (1992) A method for the determination of methyl carbamate and ethyl carbamate in wines *Food Additives & Contaminants* 9, 2, 149–160
- SHIMADA H., KODJABACHIAN D., ISHIDA M. (2007) Specific and rapid analysis of ubiquinones using Craven's reaction and HPLC with postcolumn derivatization *Journal of Lipid Research* 48, 9, 2079-2085
- SILVA B.M., ANDRADE P.B., FERRERES F., SEABRA R. M., OLIVEIRA M. B. P. P., FERREIRA M. A. (2005) Composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: Phenolics, organic acids and free amino acids *Natural Product Research* 19, 3, 275-281
- SILVA B. M., CASAL S., ANDRADE P. B., SEABRA R. M., OLIVEIRA M. B. P. P., FERREIRA M. A. (2004) Free amino acid composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp and peel) and jam *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5, 1201-1206

- SINGH U., DEVARAJ S., JIALAL I. (2007) Coenzyme Q10 Supplementation and Heart Failure *Nutrition Reviews* 65, 6, 286–293
- SMIRNOVA E. G., LYUBIMOV Y. I., MALININA T. G., LYUBIMOVA E. YU, ALEXANDRUSHKINA N. I., VANYUSHIN B. F., KOLESOVA G. M., YAGUZHINSKY L. S. (2002) Ionol (BHT) Produces Superoxide Anion *Biochemistry. Biokhimiia* 67, 11, 1271–1275
- SZEGÉNY ZS. (2012) A mérési bizonytalanság becslése a vizsgálólaboratóriumok gyakorlatában
- TAKI N., IMAMURA L., TAKEBE S., KOBASHI K. (1992) Cyanate as a Precursor of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 38, 6, 498–505
- TEGMO-LARSSON I. M., SPITTLER T. D., ROGRIGUEZ S. B. (1989) Effect of Malolactic Fermentation on Ethyl Carbamate Formation in Chardonnay Wine *American Journal of Enology and Viticulture* 40, 2, 106–108
- US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (1988) Too many drinks spiked with urethane, FDA Consumer. Hozzáférés: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/fc0488ur.html>
- VAHL M. (1993) A Survey of Ethyl Carbamate in Beverages, Bread and Acidified Milks Sold *Food Additives and Contaminants* 10, 5, 585–592
- VAVASOUR E., RENWICK A. G. , ENGELI B, BARLOW S, CASTLE L, DINOVI M, SLOB W, SCHLATTER J, BOLGER M. (2006) Prepared by the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) WHO and FAO; Geneva, Switzerland: 2006. Ethyl carbamate. WHO Food Additives Series 55. Safety evaluation of certain contaminants in food; 205–316.
- WALKER G., WINTERLIN W., FOUDA H., SEIBER J. (1974) Gas chromatographic analysis of urethan (ethyl carbamate) in wine *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22, 6, 944–947
- WANG S. H. W., YEN G. C. (1998) Determination of Ethyl Carbamate in Non-Alcoholic Fermented Foods Marketed in Taiwan *Journal of Food and Drug Analysis* 6, 2, 517–527
- WEBER C., BYSTED A., HØLMER G. (1997) The coenzyme Q10 content of the average Danish diet *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 67, 2, 123–129
- WEBER J. V., SHARYPOV V. I. (2009) Ethyl Carbamate in Foods and Beverages: A Review *Environmental Chemistry Letters* 7, 3, 233–247
- WELTRING A., RUPP M., ARZBERGER U., ROTHENBUCHER L., KOCH H., SPROLL C., LACHENMEIER D. W. (2006) Ethyl carbamate: Analysis of questionnaires about production methods of stone-fruit spirits at German small distilleries *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 102, 3, 97–101

- WHITON R. S., ZOECKLEIN B. W. (2002) Determination of Ethyl Carbamate in Wine by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/mass Spectrometry *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 1, 60–63
- WOLF D. E., HOFFMAN C. H., TRENNER N. R., ARISON B. H., SHUNK C. H., LINN B. O., MCPHERSON J. F., FOLKERS K. (1958) Coenzyme Q. I. structure studies on the coenzyme Q group *Journal of the American Chemical Society* 80, 17, 4752–4752
- WU O., PAN X., WANG L., SHEN X., YANG D. (2012) A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China *Food Control* 23, 1, 286–288
- YAMASHITA S., YAMAMOTO Y. (1997) Simultaneous Detection of Ubiquinol and Ubiquinone in Human Plasma as a Marker of Oxidative Stress *Analytical Biochemistry* 250, 1, 66–73
- ZHANG Y., ABERG F., APPELKVIST E. L., DALLNER G., ERNSTER L. (1995) Uptake of Dietary Coenzyme Q Supplement Is Limited in Rats *The Journal of Nutrition* 125, 3, 446–453
- ZHAO Y., SUN Y.-H., LI Z.Y., XIE C., BAO Y., CHEN Z.-J., GONG J.-B., YIN Q.-X., CHEN W., ZHANG, C. (2013) Solubility measurements and prediction of coenzyme Q10 solubility in different solvent systems *Journal of Solution Chemistry* 42, 4, 764–771
- ZIMMERLI B., SCHLATTER J. (1991) Ethyl Carbamate - Analytical Methodology, Occurrence, Formation, Biological-Activity and Risk Assessment *Mutation Research* 259, 3–4, 325–350
- 2010/133/EU (2010) *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* 052 , 03/03/2010, 0053 – 0057
- 1576/89/EGK (1989) *Az Európai Közösség Hivatalos Lapja* 1. 14.
- 110/2008/EK (2008) *Az Európai Unió Hivatalos Lapja* 39/16
2008. évi LXXIII. törvény (2008) A pálinkáról, a törkölypálinkáról és a Pálinka Nemzeti Tanácsról *Magyar Közlöny- és Lapkiadó Kft.*

12. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Impakt faktoros folyóirat cikk:

1. Edit Deák, Attila Gyepes, Éva Stefanovits-Bányai, Mihály Dernovics
Determination of ethyl carbamate in pálinka spirits by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry after derivatization
Food Research International, 43 (2010) 2452–2455
IF (2010): 2,416
Független hivatkozások száma 2014.08.10-ig, Scopus adatbázis alapján: 17
2. Andrea Vass, Edit Deák, Mihály Dernovics
Quantification of the reduced form of coenzyme Q₁₀, ubiquinol, in dietary supplements with HPLC-ESI-MS/MS
Food Analytical Methods, 2014, DOI 10.1007/s12161-014-9911-x
IF (2013): 1,802

Magyar nyelvű előadás:

Deák Edit:
Etil-karbamát tartalom meghatározása pálinkából HPLC-ESI-MS módszerrel
Erjedéssipari Nap, 2010. április 15., Központi Élelmiszerkutató Intézet, Budapest

Poszter nemzetközi konferencián:

1. E. Deák, A. Gyepes, M. Dernovics, É. Stefanovits-Bányai
Determination of ethyl-carbamate for authentication of Hungarian cider spirits by HPLC-ESI-MS
Recent Advances In Food Analysis (RAFA), 2009. nov 4-6., Prága, Csehország
2. E. Deák, A. Gyepes, M. Dernovics, É. Stefanovits-Bányai
Derivatization based enhanced selectivity of ethyl-carbamate determination in spirits by HPLC-ESI-MS/MS hyphenation
7th Aegean Analytical Chemistry Days, 2010. szept. 29.-okt. 4., Leszbosz, Görögország

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Minden teljesítmény sokak hozzájárulásával születik. Ez most is így történt.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Stefanovitsné Dr. Bányai Évának, aki másodéves egyetemista korom óta fogta a kezem, szakmai tanácsaival ösztönözte munkám, kedvességével átsegített a hullámvölgyeken.

Hálával és köszönettel tartozom Dr. Dernovics Mihálynak és Vass Andreának, hogy értékes idejüket rám szánták – nélkülük ez a dolgozat ebben a formában biztos, hogy nem születhetett volna meg.

Köszönettel tartozom Dr. Fodor Péternek, az Alkalmazott Kémia Tanszék vezetőjének, aki biztosította munkám sikerességéhez szükséges szakismereti és műszeres háttérrel, akinek személyes és szakmai támogatására mindvégig számíthattam.

Hálával tartozom az Alkalmazott Kémia Tanszék minden dolgozójának, akik kellemes, emberi légkört teremtettek a mindennapi munkához. Külön köszönöm Firisz Zsuzsannának, akinek barátságára és támogatására mindig számíthattam, életteli és kedélyes hozzáállásával gondoskodott a mindennapi derűs hangulatról.

Köszönöm Dr. Nguyen Duc Quang tanár úr segítségét a robusztusság-vizsgálat megtervezésében és kiértékelésében, ill. a BioCo Magyarország Kft. nagylelkű támogatását a Q10 tartalmú étrendkiegészítő minták biztosítása terén.

Szeretnék köszönetet mondani barátaimnak, akik szakadatlan biztatásukkal, ösztönzésükkel bátorítottak.

Köszönettel tartozom családomnak. Édesanyámnak, az irányomba tanúsított végtelen türelméért, biztató szavaiért. Köszönet illeti Édesapámat, aki nélkül sosem alakult volna ki a műszaki szemléletem, és aki mindig hitt abban, hogy ez a dolgozat elkészül. Köszönöm testvéremnek, Dórinak és családjának, Tibinek, Levinek, Beninek és Lilikének, hogy mellettem álltak a legnehezebb pillanatokban is.

És végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom gyermekeimnek, Kiliánnak és Kirillnek, akik értelmet adtak az életemnek. Köszönöm.

13. MELLÉKLET

1. táblázat: A HPLC-ESI-MS készülék xantil-etil-karbamát mérések bizonytalanságának meghatározásához felhasznált, ismételt injektálásokból származó adatsora.

Injektálás sorszáma	Csúcs alatti terület a xantil-etil-karbamát kvantitatív MRM átmenetén, cps
1	3,12E+05
2	3,24E+05
3	3,35E+05
4	3,23E+05
5	3,49E+05
6	3,38E+05
7	3,59E+05
8	3,48E+05
9	3,38E+05
10	3,33E+05
Átlag, cps	3,36E+05
Szórás, cps	13939,95
RSD, %	4,15%

2. táblázat: Az etil-karbamát mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített harmadik kalibrációs ponthoz (második adalékolási ponthoz) tartozó kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, ng/ml	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, ng/ml	Eltérés a koncentrációban / Δ , ng/ml	Δ^2 , (ng/ml) ²	Hozzájárulás, %
V1	10000-20=9980 μ l	363,88	362,11	1,764731	3,11E+00	0,2
V2	600-0,7=599,3 μ l	363,88	363,82	0,061766	3,81E-03	0,0
V3	10-0,05=9,95 μ l	363,88	368,58	-4,70004	2,21E+01	1,4
V4	3,5-0,0025=3,4975 ml	363,88	364,14	-0,2601	6,77E-02	0,0
V4	3,5-0,0025=3,4975 ml	363,88	364,14	-0,2601	6,77E-02	0,0
A	123000-5105=117895,5 cps	363,88	325,06	38,81526	1,51E+03	97,8
m	12,5-0,028868=12,47 μ l	363,88	365,20	-1,31966	1,74E+00	0,1
V5	25-0,02=24,98 ml	363,88	363,42	0,457509	2,09E-01	0,0
V6	0,2-0,0007=0,1993 ml	363,88	365,88	-2	4,00E+00	0,3
V7	10-0,02=9,98 ml	363,88	362,73	1,145147	1,31E+00	0,1
V8	400-0,7=399,3 μ l	363,88	364,88	-1	1,00E+00	0,1
Szórásnégyzet /szumma, (ng/ml) ² /					1540,231	100
Szórás /gyökvonás, ng/ml/					39,246	
k=2 kiterjesztés, ng/ml					78,49	

3. táblázat: Az etil-karbamát mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített negyedik kalibrációs ponthoz (harmadik adalékolási ponthoz) tartozó kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, ng/ml	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, ng/ml	Eltérés a koncentrációban / Δ /, ng/ml	Δ^2 , (ng/ml) ²	Hozzájárulás, %
V1	10000-20=9980 μ l	317,14	314,38	2,754702	7,59E+00	0,2
V2	600-0,7=599,3 μ l	317,14	317,04	0,096415	9,30E-03	0,0
V3	10-0,05=9,95 μ l	317,14	324,47	-7,33664	5,38E+01	1,4
V4	3,5-0,0025=3,4975 ml	317,14	317,36	-0,22669	5,14E-02	0,0
V4	3,5-0,0025=3,4975 ml	317,14	317,36	-0,22669	5,14E-02	0,0
A	192000-7968=184032 cps	317,14	256,55	60,58968	3,67E+03	97,6
m	12,5-0,028868=12,47 μ l	317,14	319,88	-2,74286	7,52E+00	0,2
V5	25-0,02=24,98 ml	317,14	316,22	0,915018	8,37E-01	0,0
V6	0,2-0,0007=0,1993 ml	317,14	321,14	-4	1,60E+01	0,4
V7	10-0,02=9,98 ml	317,14	314,84	2,290295	5,25E+00	0,1
V8	800-0,7=799,3 μ l	317,14	318,14	-1	1,00E+00	0,0
Szórásnégyzet /szumma, (ng/ml) ² /					3763,242	100
Szórás /gyökvonás, ng/ml/					61,345	
$k=2$ kiterjesztés, ng/ml					122,69	

4. táblázat: Az ubikinon és ubikinol kromatográfiás elválasztásának robusztusság-vizsgálatához alkalmazott 2³ teljes faktoriális kísérlettervezés adatai.

Mérés	HPLC oszlop	Ammónium-formiát puffer koncentráció, mM	HPLC oszlop fűtési hőmérséklete, °C	Oszlop változó (X1)	Puffer változó (X2)	Hőmérséklet-változó (X3)	Felbontás, R
1	A	2	35	1	-1	-1	12,2
2	A	2	45	1	-1	1	11,0
3	A	8	35	1	1	-1	12,7
4	A	8	45	1	1	1	11,4
5	B	2	35	-1	-1	-1	3,2
6	B	2	45	-1	-1	1	3,0
7	B	8	35	-1	1	-1	3,1
8	B	8	45	-1	1	1	2,9

5. táblázat: Az ubikinon és ubikinol kromatográfiás elválasztásának robusztusság-vizsgálatához alkalmazott 2^3 teljes faktoriális kísérlettervezés hatásai

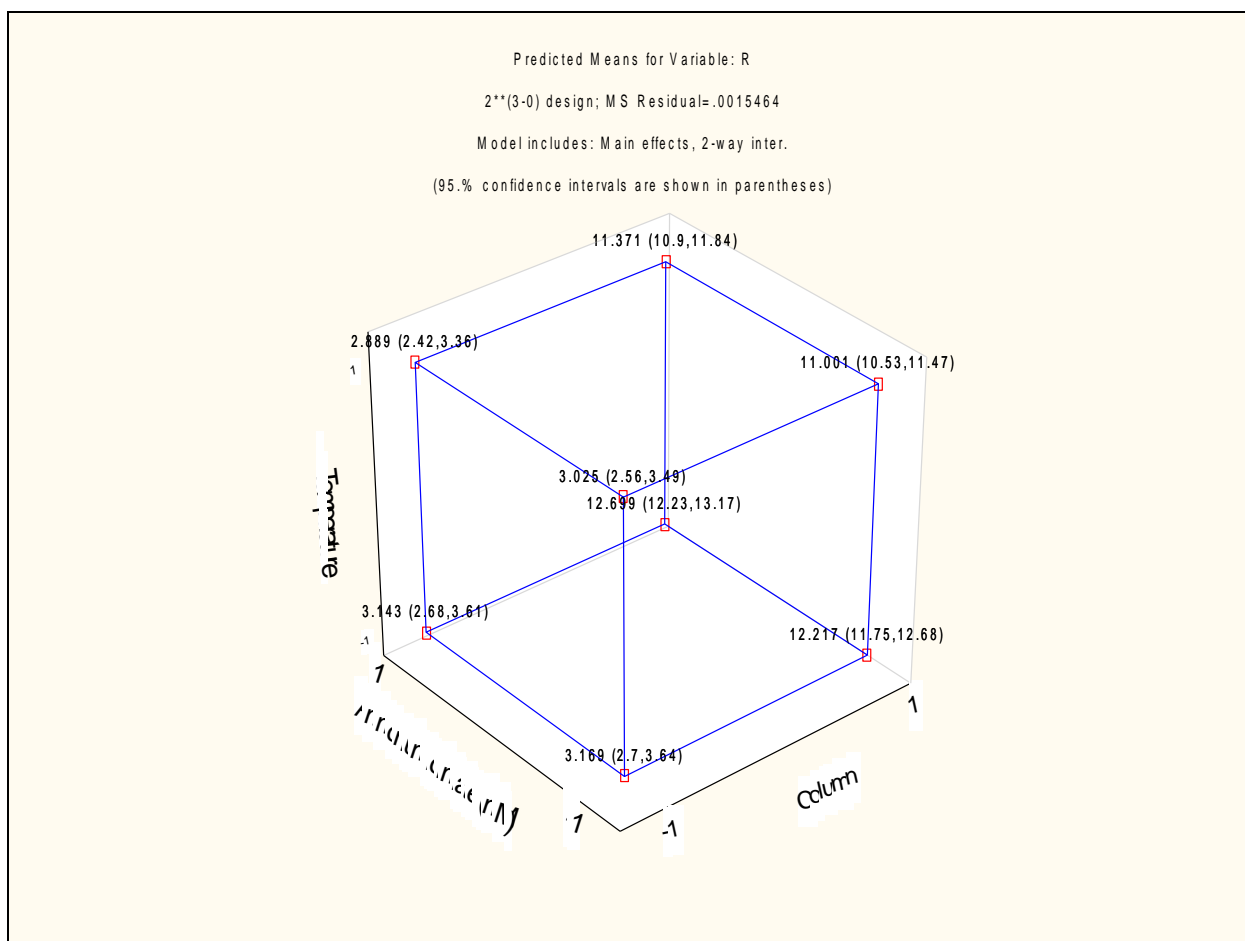
Effect Estimates; Var.:R; R-sqr=.99999; Adj.:.99993 (FullFactorial) 2**(3-0) design; MS Residual=.0015464 DV: R								
Factor	Effect	Std.Err.	t(1)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.E Coef
Mean/Interc.	7.43919	0.01390	535.063	0.00119	7.2625	7.61585	7.43919	0.013
(1)Column	8.76577	0.02780	315.238	0.00201	8.4124	9.11908	4.38288	0.013
(2)Ammonium formiate (mM)	0.17227	0.02780	6.1954	0.10187	-0.1810	0.52559	0.08613	0.013
(3)Temperature	-0.73538	0.02780	-26.446	0.02406	-1.0887	-0.38206	-0.36769	0.013
1 by 2	0.25375	0.02780	9.1255	0.06948	-0.0995	0.60706	0.12687	0.013
1 by 3	-0.53668	0.02780	-19.3006	0.03295	-0.8900	-0.18336	-0.26834	0.013
2 by 3	-0.05538	0.02780	-1.9918	0.29621	-0.4087	0.29793	-0.02769	0.013

6. táblázat: Az ubikinon és ubikinol kromatográfiás elválasztásának robusztusság-vizsgálatához alkalmazott 2^3 teljes faktoriális kísérlettervezés ANOVA táblázata

ANOVA; Var.:R; R-sqr=.99999; Adj.:.99993 (FullFactorial) 2**(3-0) design; MS Residual=.0015464 DV: R					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Column	153.6775	1	153.6775	99375.27	0.002015
(2)Ammonium formiate (mM)	0.0594	1	0.0594	38.38	0.101878
(3)Temperature	1.0816	1	1.0816	699.40	0.024061
1 by 2	0.1288	1	0.1288	83.27	0.069486
1 by 3	0.5761	1	0.5761	372.51	0.032955
2 by 3	0.0061	1	0.0061	3.97	0.296210
Error	0.0015	1	0.0015		
Total SS	155.5305	7			

7. táblázat: Az ubikinon és ubikinol kromatográfiás elválasztásának robusztusság-vizsgálatához alkalmazott 2^3 teljes faktoriális kísérlettervezés regressziós koeficiensei

Regr. Coefficients; Var.:R; R-sqr=.99999; Adj.:.99993 (FullFactorial) 2**(3-0) design; MS Residual=.0015464 DV: R						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(1)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	7.43919	0.01390	535.063	0.00119	7.26253	7.61585
(1)Column	4.38288	0.01390	315.238	0.00201	4.20622	4.55954
(2)Ammonium formiate (mM)	0.08613	0.01390	6.1954	0.10187	-0.09052	0.26279
(3)Temperature	#####	0.01390	-26.446	0.02406	-0.54435	-0.19103
1 by 2	0.12687	0.01390	9.1255	0.06948	-0.04978	0.30353
1 by 3	#####	0.01390	-19.3006	0.03295	-0.44500	-0.09168
2 by 3	#####	0.01390	-1.9918	0.29621	-0.20435	0.14896



1. ábra: Az ubikinon és ubikinol kromatográfiás elválasztásának robusztusság-vizsgálatához alkalmazott 2^3 teljes faktoriális kísérlet során kapott, becsült R értékek átlaga a mért pontokon

8. táblázat: A HPLC-ESI-MS készülék redukált Q₁₀ mérések bizonytalanságának meghatározásához felhasznált, ismételt injektálásokból származó adatsora.

Injektálás sorszáma	Csúcs alatti terület a redukált Q ₁₀ kvantitatív MRM átmenetén, cps
1	8,89E+05
2	8,70E+05
3	8,91E+05
4	8,92E+05
5	8,79E+05
6	8,67E+05
7	8,73E+05
8	8,78E+05
9	8,74E+05
10	8,70E+05
Átlag, cps	8,78E+05
Szórás, cps	9286,19
RSD, %	1,06%

9. táblázat: A redukált Q₁₀ tartalom meghatározásnál felhasznált centrifugacsövek 10 mL-re történő feltöltésének bizonytalanságának meghatározásához felhasznált mérési adatsor

Centrifugacső üres tömege, g	Centrifugacső 10 mL-re feltöltött tömege, g	Különbség, g
5,4097	15,4217	10,0120
5,4104	15,4380	10,0276
5,5012	15,4682	9,9670
5,4297	15,5262	10,0965
5,4143	15,5054	10,0911
Átlag, cps		10,03884
Szórás, cps		0,055
RSD, %		0,55

10. táblázat: A redukált Q_{10} mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített harmadik kalibrációs ponthoz (második adalékolási ponthoz) tartozó kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, mg/g	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, mg/g	Eltérés a koncentrációban / Δ /, mg/g	Δ^2 , (mg/g) ²	Hozzájárulás, %
m1	0,05- 0,000028868= 0,04997 g	8,606	8,611	-0,00497	2,47E-05	0,0
m2	0,0125- 0,000028868= 0,01247 g	8,606	8,697	-0,09054	8,20E-03	1,8
V1	10000-55= 9945 μ l	8,606	8,343	0,262957	6,91E-02	14,8
V2	25-0,06= 24,94 μ l	8,606	8,721	-0,11502	1,32E-02	2,8
V3	25000-20= 24980 μ l	8,606	8,568	0,038248	1,46E-03	0,3
V4	10-0,05=9,95 μ l	8,606	8,847	-0,24025	5,77E-02	12,4
V5	12352- 136=12216 cps	8,606	8,631	-0,0245	6,00E-04	0,1
V6	4000-2,5= 3997,5 μ l	8,606	8,575	0,031388	9,85E-04	0,2
R	0,99-0,005= 0,985	8,606	8,804	-0,198	3,92E-02	8,4
A	86649-953,1= 85695,9 cps	8,606	8,080	0,525913	2,77E-01	59,2
Szórásnégyzet /szumma, (mg/g) ² /					0,467	100
Szórás /gyökvonás, mg/g /					0,683	
k=2 kiterjesztés, mg/g					1,37	

11. táblázat: A redukált Q₁₀ mennyiségi meghatározása során adalékolási eljárásra épített negyedik kalibrációs ponthoz (harmadik adalékolási ponthoz) tartozó kiterjesztett mérési bizonytalanság meghatározása, állandónak tekintett érzékenységi paraméter mellett

Tényező	Szélsőérték	Eredeti koncentráció, mg/g	Szélsőértékkel terhelt koncentráció, mg/g	Eltérés a koncentrációban /Δ/, mg/g	Δ ² , (mg/g) ²	Hozzájárulás, %
m1	0,05- 0,000028868= 0,04997 g	6,107	6,110	-0,00353	1,24E-05	0,0
m2	0,0125- 0,000028868= 0,01247 g	6,107	6,288	-0,18108	3,28E-02	2,2
V1	10000-55= 9945 μl	6,107	5,642	0,46483	2,16E-01	14,4
V2	25-0,06= 24,94 μl	6,107	6,310	-0,20332	4,13E-02	2,8
V3	25000-20= 24980 μl	6,107	6,039	0,067612	4,57E-03	0,3
V4	10-0,05=9,95 μl	6,107	6,531	-0,4247	1,80E-01	12,0
V5	12352- 136=12216 cps	6,107	6,131	-0,0245	6,00E-04	0,0
V6/1	4000-2,5= 3997,5 μl	6,107	6,131	-0,0245	6,00E-04	0,0
V6/2	4000-2,5= 3997,5 μl	6,107	6,044	0,062777	3,94E-03	0,3
R	0,99-0,005= 0,985	6,107	6,503	-0,396	1,57E-01	10,4
A	153170-1684,9= 151485,1 cps	6,107	5,177	0,92966	8,64E-01	57,6
Szórásnégyzet /szumma, (mg/g) ² /					1,501	100
Szórás /gyökvonás, mg/g /					1,225	
k=2 kiterjesztés, mg/g					2,45	