

Doktori értekezés Ph.D. fokozat elnyerésére



Élelmiszertudományi Kar

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 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**

egyetemi tanár
Egyetem
Kar
Tanszék

PhD, egyetemi docens
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar

Alkalmazott Kémia Tanszék

Dr. Dernovics Mihály

DSc, tanszékvezető
Budapesti Corvinus

Élelmiszertudományi

Alkalmazott Kémia

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

BEVEZETÉS

A Scopus adatbázis szerint a „high-speed liquid”, „high-pressure liquid”, „high-performance liquid”, „HPLC” és a „chromatgraphic”/„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 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.

CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatban bemutatott vizsgálatok alapvetően három fő témakörre oszthatók. Az egyes témakörökben az alábbi célokat tűztem ki:

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 hatásfok 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.

ANYAG ÉS MÓDSZER

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 C₁₈ (2,1mm x 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) hármass kvadrupol 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 standard minták elemzését kiegészítettem HPLC-ESI-QTOF-MS készülékkel történő meghatározással, 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.

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.

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.

EREDMÉNYEK

Etil-karbamát meghatározás

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 eljáráshoz képest nem csökkenti, hogy nem épül belső standard használatára, mivel az adalékolási eljárás pontosság szempontjából a deuterált belső standardot használó módszerek után következik.

Bár ez a vegyület közvetve rendelkezésre állt attól a pillanattól kezdve, hogy legelőször végrehajtották oldatban az etil-karbamát 9-xanthidrolos származékképzését, magának a vegyületnek a kitisztítása legalább optimálási szintű fokra korábban még nem történt meg. Ebből fakadóan a származék ESI-MS/MS viselkedése nem volt szakirodalomban hozzáférhető. Kísérleteink szerint a xantil-etil-karbamátnál 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. Az LOD és az LOQ értékeit két módon állapítottam meg. Egyrészt xantil-etil-karbamát standardot oldottunk fel 40 $v/v\%$ etanolban, és a kromatográfias 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) paramétereit. 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 azonos nagyságrendbe esik a legtöbb GC-MS módszer hasonló paraméterével és a jóval kevésbé szelektív HPLC-FD módszerekkel.

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 „jószágát” 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.

Q₁₀ koenzim meghatározásának eredményei

Az étrendkiegészítők redukált Q₁₀ 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 étrendkiegészítő minták redukált Q₁₀ tartalmának mérése történt meg, amelyhez az étrendkiegészítők nagy Q₁₀ koncentrációja miatt a szakirodalomtól eltérő, optimált módon kellett redukált standardot előállítani. A vizsgált 12 étrendkiegészítő minta fele tartalmazott redukált Q₁₀ koenzimet annak ellenére, hogy a gyártó erről nem számolt be a csomagoláson – feltételezhetően a gyártás/kiszerezés közben létrejövő, a kiindulási oxidált Q₁₀-ból redukcióval kialakuló mennyiségről van szó. 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 vizsgálathoz 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 módozatok 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.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként dolgoztam ki származékképzésen alapuló HPLC-ESI-MS-MS módszert szeszesisitalok (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 ismételhősége (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 ismételhősége (szórása) határozza meg.

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