

**SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR**

PESZTICID ANALITIKAI ELJÁRÁSOK FEJLESZTÉSE

VASS ANDREA

Doktori (Ph.D) értekezés

Készült:

Szent István Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2017

A doktori iskola

Megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Tudományága: Élelmiszertudományok

Vezetője: **Dr. Vatai Gyula**
Egyetemi tanár
Szent István Egyetem,
Élelmiszertudományi Kar,
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

Témavezető: **Dr. Dernovics Mihály**
Egyetemi docens
Szent István Egyetem,
Élelmiszertudományi Kar,
Alkalmazott Kémia Tanszék

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

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

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása



Tartalom

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. Növényvédő szerek csoportosítása	5
2.2. Mintaelőkészítési eljárások peszticid analitikai vizsgálatra: általános jellemzők	7
2.3. Multi-komponenses szabvány módszerek	12
2.3.1. QuEChERS	13
2.3.2. Poláris peszticidekre fejlesztett mintaelőkészítési multi-komponenses módszerek	17
2.4. A növényvédő szer analitikában használt kromatográfiai módszerek	21
2.4.1. RP, NP	21
2.4.2. Ioncserés eljárások (SAXC, SCXC, WAX, WCX)	22
2.4.3. HILIC	23
2.4.4. SFC	29
2.4.5. Kapcsolt rendszerek és azok fejlődése a peszticid analitikában	30
2.5. A kromatográfiai módszerek gyakorlati alkalmazása a peszticid analitikában	31
2.5.1. (RP) LC-MS	31
2.5.2. Ionok elválasztására alkalmas kromatográfia alkalmazása	32
2.5.3. HILIC-MS	33
2.5.4. SFC használata a peszticid analitikában	34
2.6. Metabolomikai megközelítés a peszticid analitikában	37
2.6.1. Növényvédő szerek: transzlokáció, metabolizáció, degradáció	37
2.6.2. Növényvédő szerek és azok metabolitjainak jogi szabályozása	39
2.7. Feldolgozott élelmiszerek peszticid analitikája	41
2.7.1. Az imazalil jellemzése és ipari alkalmazása	42
2.7.2. Zsíros élelmiszermatrixok mintaelőkészítése peszticid analitikai célokra	45
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	47
3.1. Felhasznált vegyszerek és minták	47
3.2. Kapcsolt analitikai rendszerek	48
3.2.1. HPLC-ESI-MS/MS	48
3.2.2. HPLC-ESI-TOF-MS	48
3.2.3. UHPLC-HESI-MS/MS	48



3.2.4. HPLC-ESI-QTOF-MS	49
3.2.5. HPLC-ESI-QTOF-MS_2	49
3.2.6. UPC ² -PDA	49
3.2.7. UPC ² -ESI-MS	50
4. TÉZISEK, THESES	51
4.1. TÉZISEK	51
4.2. THESES	52
5. EREDMÉNYEK	53
5.1. Új generációs szuperkritikus fluidkromatográfia alkalmazhatósága a növényvédő szermaradványok átfogó vizsgálatában	53
5.1.1. Célok megfogalmazása	53
5.1.2. Modell komponensek kiválasztása	53
5.1.3. Alkalmazott készülékbeállítások	54
5.1.4. Eredmények	57
5.1.5. Összegzés	62
5.2. Imazalil nyomon követése a szüretelés után kezelt citromhéjtól egészen az azzal készült süteményig	64
5.2.1. Célok megfogalmazása	64
5.2.2. Mintaelőkészítés, használt kromatográfias beállítások	64
5.2.3. Használt módszerek, készülékbeállítások	68
5.2.4. Eredmények	69
5.2.5. Összegzés	79
5.3. Különböző HILIC, kevert módú és egyéb vizes normál fázisú folyadékkromatográfias elválasztási módszerek alkalmazhatóságának tanulmányozása analitikai kihívást jelentő poláris növényvédő szerek meghatározására, tömegspektrométer alapú detektálással	80
5.3.1. Célok megfogalmazása	80
5.3.2. Adatértékelési protokoll	80
5.3.3. Eredmények	84
5.3.4. Összegzés	96
5.4. Poláris növényvédő szerek meghatározása olívaogyóból és olívaolajból tömegspektrométerrel csatolt hidrofíli kölcsönhatás folyadékkromatográfiával	98
5.4.1. Célok megfogalmazása	98
5.4.2. Mintaelőkészítés	98
5.4.3. Eredmények	99



5.4.4. Összegzés.....	106
6.1. ÖSSZEFOGLALÁS.....	107
6.1.1. Új generációs szuperkritikus fluidkromatográfia alkalmazhatósága a növényvédő szermaradványok átfogó vizsgálatában	107
6.1.2. Imazalil nyomon követése a szüretelés után kezelt citromhéjtól egészen az azzal készült süteményig.....	108
6.1.3. Különböző HILIC, kevert módú és egyéb vizes normál fázisú folyadékkromatográfias elválasztási módszerek alkalmazhatóságának tanulmányozása analitikai kihívást jelentő poláris növényvédő szerek meghatározására, tömegspektrométer alapú detektálással.....	109
6.1.4. Poláris növényvédő szerek meghatározása olívbogyóból és olívaolajból tömegspektrométerrel csatolt hidrofíl kölcsönhatás folyadékkromatográfiával.....	110
6.2. SUMMARY	111
6.2.1. Applicability of ultra performance convergence chromatography, a new generation of supercritical fluid chromatography, for the analysis of pesticide residues.....	111
6.2.2. Follow-up of the fate of imazalil from post-harvest lemon surface treatment to a baking experiment	112
6.2.3. Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides.....	113
6.2.4. Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry	114
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	115
MELLÉKLETEK.....	116



RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Angol	Magyar
ADI	Acceptable Daily Intake	Elfogadható napi beviteli mennyiség
ANOVA	Analysis of Variance	Varianciaanalízis
AOAC	American Organization of Analytical Chemists	Analitikai Kémikusok Amerikai Szervezete
API	Atmospheric Pressure Ionization	Atmoszférikus nyomású ionizáció
ARfD	Acute Reference Dose	Akut toxicitási mennyiség
ASE	Accelerated Solvent Extraction	Gyorsított oldószeres extrakció
BEH	Ethylene Bridged Hybrid	etilénhidas hibrid
CAD	Corona Charged Aerosol Detector	Korona kisülést felhasználó aeroszol detektor
CE	Collision Energy	Ütközési energia
CEP	Collision cell Entrance Potential	Ütközési cella belépő feszültség
CI	Chemical Ionisation	Kémiai ionizáció
CID	Collision Induced Dissociation	Ütközés általi disszociáció
CNTs	Carbon Nanotubes	Szén nanocsövek
CoElu	Co-Eluent	Koeluens
CPARA	Canadian Pest Management Regulatory Agency	Kanadai Növényvédő Szer Rezisztencia Akcióbizottság
c-SPE	Cartridge SPE	Töltött oszlopos SPE
CXP	Collision cell Exit Potential	Ütközési cella kilépő feszültség
CYP	Cytochrome P450	Citokróom P450
DAD	Diode Array Detector	Diódasoros detektor
DLLME	Dispersive Liquid Liquid Microextraction	Diszperzív folyadék-folyadék mikroextrakció
DNS	Deoxyribonucleic acid	Dezoxiribonukleinsav
DP	Declustering Potential	Klasztermentesítő feszültség
DPX	Disposable Pipette Extraction	Eldobható pipetta extrakció
d-SPE	dispersive-Solid Phase Extraction	diszperziós-Szilárd Fázisú Extrakció
ECD	Electron Capture Detector	Elektronbefogásos detektor
EFSA	European Food Safety Authority	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság
EI	Electron Impact	Elektron ütköztetéses
EIC	Extracted Ion Chromatogram	Kiemelt ion kromatogram
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector	Elpárologtatás utáni fényszóráson alapuló detektor
EP	Entrance Potential	Belépő feszültség
ESI	Electrospray Ionization	Elektroszpré ionizáció
EURL	European Union Reference Laboratory	Európai Unió Referencia Laboratóriuma
EÜM	-	Egészségügyi Minisztérium
FAO	Food and Agriculture Organization	Élelmészügyi és Mezőgazdasági Szervezet
FID	Flame Ionization Detector	Lángionizációs detektor
FPD	Flame Photometric Detector	Lángfotometriás detektor
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee	Gombaölő Szer Rezisztencia Akcióbizottság



FVM	-	Földművelésügyi- és Vidékfejlesztési Minisztérium
GC	Gas Chromatography	Gázkromatográfia
GCB	Graphitized Carbon Black	Aktív szén; tisztító szorbens
GPC	Gel Permeation Chromatography	Gélpermeációs kromatográfia
HESI	Heated Electrospray Ionisation	Fűtött elektrozspré ionizáció
HFLPME	Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction	Hollow-Fiber folyadék fázisú mikroextrakció
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography	Hidrofil kölcsönhatás kromatográfia
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee	Növényvédő Szer Rezisztencia Akcióbizottság
HSS	High Strength Silica	Nagy szilárdságú szilika
ICP	Inductively Coupled Plasma	Induktív Csatlósú Plazma
IMD	Ion Mobility Detector	Ion Mobilitás Detektor
IP	Ion Pairing	Ionpároképző
IPA	Isopropyl Alcohol	Izopropanol
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee	Rovarölő Szer Rezisztencia Akcióbizottság
LC	Liquid Chromatography	Folyadékkromatográfia
LCL	Limit of Calibration	Legkisebb kalibrációs pont
LLE	Liquid-Liquid Extraction	Folyadék-folyadék extrakció
LPME	Liquid-phase Microextraction	Folyadék fázisú mikroextrakció
LOD	Limit of Detection	Kimutatási határ
LOQ	Limit of Quantification	Mennyiségi meghatározási határ
MAE	Microwave Assisted Extraction	Mikrohullámmal segített extrakció
MFE	Molecular Feature Extraction	-
MIP	Microwave Induced Plasma	Mikrohullámú plazma
m-PFC	Multi-Plug Filtration Cleanup	Többszörös szorbens tölteten való átszűréssel megvalósuló tisztítás
MRL	Maximum Residue Level	Maximális szermaradvány koncentráció
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Többszörös reakció nyomon követés
MS	Mass Spectrometry	Tömegspektrometria
MS/MS	Triple quadrupole (MS)	Hármas quadrupól (MS)
MSPD	Matrix Solid-Phase Dispersion	Mátrix szilárd fázisú diszperzió
MWCNTs	Multi-Walled Carbon Nanotubes	Többszörös falú szén nanocsövek
NP	Normal Phase	Normál fázis
NPD	Nitrogen Phosphorus Detector	Nitrogén foszfor detektor
OC	Organochloride	Szerves klór (tartalmú)
P	Peak Shape	Csúcsalak
PCB	Polychlorinated Biphenyl	Poliklórozott bifenil
PDA	Photodiode Array	Fotodióda soros elrendezés
PID	Photoionisation Detector	Fotoionizációs detektor
PLE	Pressurized Liquid Extraction	Nyomással segített folyadék extrakció
PP	Polypropylene	Polipropilén
PSA	Primary Secondary Amine	Primer szekunder amin; tisztító szorbens



PTFE	Polytetrafluoroethylene	Poli-tetrafluoroetilén (teflon)
QTOF	Quadrupole Time-of-Flight	Kvadrupól repülési idő
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	Gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos
QuPpe	Quick Polar Pesticide	Gyors módszer poláris peszticidek mérésére
QuPpe-AO	Quick Polar Pesticide (Animal Origin)	Gyors módszer poláris peszticidek mérésére állati eredetű élelmiszer mintából
QuPpe-PO	Quick Polar Pesticide (Plant Origin)	Gyors módszer poláris peszticidek mérésére növényi eredetű élelmiszer mintából
R	Relative response factor	Relatív érzékenység
R ²	Coefficient of determination of a linear regression	Determinációs együttható
RP	Reversed Phase	Fordított fázisú
RSD	Relative Standard Deviation	Relatív szórás
RT	Retention Time	Retenciós idő
SANCO SANTE	SANCO/E Santé et Consommateurs (Directorate General for Health and Consumer Affairs, Belgium)	SANCO/E (Egészségügyi Főigazgatóság és Fogyasztóvédelmi Tanács, Belgium)
SAXC	Strong Anion Exchange Chromatography	Erős anioncserélő kromatográfia
SB	Stable Bond	Stabil kötésű
SCD	Sulfur Chemiluminescence Detector	Kemilumineszcens detektor
SCXC	Strong Cation Exchange Chromatography	Erős kationcserélő kromatográfia
SDME	Single Drop Microextraction	Csepp mikroextrakció
SFC	Supercritical Fluid Chromatography	Szuperkritikus fluid kromatográfia
SFE	Supercritical Fluid Extraction	Szuperkritikus fluid extrakció
SLE	Solid-Liquid Extraction	Folyadék-szilárd extrakció
SPE	Solid Phase Extraction	Szilárd Fázisú Extrakció
SRM	Selected Reaction Monitoring	Választott reakció nyomon követés
SV	Separation from the Void	Holtterfogatától való elválasztás mértéke
TIC	Total Ion Chromatogram	Teljes ion kromatográfia
TOF	Time of Flight	Repülési idő
UHPLC	Ultra High-Performance Liquid Chromatography	Magas nyomású nagyteljesítményű folyadék kromatográfia
UV	Ultra Violet	Ultraibolya
WAX	Weak AnionExchanger	Gyenge anioncserélő
WCX	Weak Cation Exchanger	Gyenge kationcserélő

A magyar rövidítéseket nagy betűvel kezdtem, ahol az adott magyar kifejezés tulajdonnév vagy létező magyar rövidítés áll a háttérben.



1. BEVEZETÉS

A „peszticid” név magában foglal minden olyan vegyszert vagy vegyszerkeveréket, amely a kártevők terményre gyakorolt negatív hatását csökkenti, illetve megszünteti. A definíció értelmezése azonban nem egészen egyértelmű, hiszen mást jelent az analitikus számára (hatóanyag) és a felhasználó számára (formált szer). A formált szer nem csupán a felszívódást segítő hordozóval van kisserelve és nem csupán egy hatóanyagot, hanem azok kombinációit, koktéjlját tartalmazza. A földművelés fejlődésével párhuzamosan növekedett a nagyobb hozam érdekében használt növényvédő szerek mennyisége és sokszínűsége. A kereskedelmi forgalomban lévő, aktív összetevők száma több százra tehető, míg a belőlük készült peszticid „koktélok” több ezerre. Bár számtalan biztonsági előírásnak és toxikológiai kísérletnek kell megerősítenie azt, hogy egy szer a piacra kerülhessen és ezek szükségessége nem is vitatott, ugyanakkor ennek ellenére használatuk kockázatokat rejt magában (Hansen & Lambert 1987). A szerek egyedi érzékenységtől függően krónikus toxicitást is okozhatnak, amelyek tünetegyüttese gyakran nem is fedik fel a betegség valódi okát. Az ilyen típusú megbetegedések megelőzésének kulcseleme a növényvédő szermaradékok vizsgálatára szolgáló eszköztár bővítése.

Növényi detoxifikációs folyamatok során előfordul, hogy magasabb rendű állatok és az ember számára felvehető és biológiailag hozzáférhető peszticid metabolitok alakulnak ki, melyek toxicitása ismeretlen, így fokozott veszély faktorként kell rá tekintenünk. A növényvédő szerekre illetve azok jól definiált metabolitjaira (pl. dimetoát, ometoát) MRL értéket állapítanak meg, viszont korántsem ismert az élelmiszerekben fellelhető, akár az élelmiszerfeldolgozás során lejátszódó degradációból származó összes szermaradvány módosulat. Ezért elengedhetetlen a növényvédő szermaradékok analitikájának folyamatos fejlesztése egészségünk védelme érdekében, ami remélhetően az MRL értékek átgondolását és releváns egyes esetekben szigorítását (akár további metabolit vegyületek bevonását) hozza a jövőben.



2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Növényvédő szerek csoportosítása

A növényvédő szereket több szempont alapján lehet csoportokba sorolni. A legáltalánosabb csoportosítási módszer a biológiai hatásmechanizmus, azaz cél szervezet szerinti. E szerint egy peszticid lehet gombaölő (fungicid), gyomirtó (herbicid), rovarölő (inszekticid), állat pusztító (zoocid) és vírusellenes hatású (virocid) stb. Természetesen ebben a csoportosításban minden csoport tovább bontható: pl. zoocidok a madárirtó szerek (avicidok) és a rágcsálóölő szerek (rodenticidok) is. A továbbiakban nem a szercsoportok magyar nevét fogom használni.

A legkorszerűbb, általánosan elfogadott csoportosításnak a HRAC, FRAC, IRAC növényvédő szer rendszerező táblázatok számítanak, melyek mind hatásmechanizmus, mind szerkezeti felépítés alapján rendszerezik a jelenleg forgalomban lévő, azaz engedélyezett összes növényvédő szert (Internet 1, 2, 3). Ezeket rendszeresen felülvizsgálják, és újra kiadják, így a legújabb engedélyezett hatóanyagokat is kategorizálják, mielőtt azok piacra kerülnek. Meg kell ugyanakkor jegyezni, hogy a hatásmechanizmus és a szerkezeti felépítés nem független egymástól. Az 1. táblázatban néhány példát részleteznék ezen osztályozás szerint a dolgozatomban megjelenő célkomponensek közül.

1. táblázat: Peszticidok osztályozása, hatásmechanizmusa, kémiai csoportba sorolása

pesticid	osztályozás	hatás	hatásmechanizmus	jellemző kémiai csoport
Imazalil	FRAC	szisztémikus	Szteroid bioszintézis gátló	imidazol
Metkonazol	FRAC	szisztémikus	Szteroid bioszintézis gátló	tiazol
Haloxifop	HRAC	szisztémikus	Zsír-sav szintézis gátló	aryl-fenoxi propinát
Tebukonazol	FRAC	szisztémikus	Szteroid bioszintézis gátló	tiazol
Dikvát	HRAC	szisztémikus	Fotokémiai rendszer gátló	bipiridium
Glifozát	HRAC	szisztémikus	Aminosav szintézis gátló	szerves foszforsav

Egyéb osztályozási lehetőség többek között a növényvédő szer kijuttatásának, idejének módja: ideje szerint lehet kelés előtti, utáni, illetve szüretelés utáni kezelés is, kijuttatás módja szerint pedig lehet szilárd, folyadék vagy levegőbe permetezés a szer formálásának függvényében.



Analitikus szemmel azonban ezek a felosztások, csoportba sorolások csak a szermaradvány találati gyakoriság jóslása végett fontosak. Alapvetően a célkomponens oldhatósága vagy illékony téhetősége már befolyásolja az analitikus döntését, hogy GC vagy LC módszerrel lehet végrehajtani elválasztását a mátrixtól. A detektálás minősége ugyancsak szerkezeti sajátosság függő tulajdonság: például adott mérendő komponens ionizálható vagy nem ionizálható, illetve milyen polaritású módban ionizálható, ami meghatározza annak tömegspektrométerrel való detektálhatóságát. Másik példát említve, ha egy célpeszticid heteroatomot (pl. S-, N-, P-t) tartalmaz, az alkalmassá teszi egyéb detektálási megoldásokkal (ECD, NPD) történő detektálásra, delokalizált elektron rendszer vagy jellegzetesen sok kettős kötéssel rendelkező szerek esetén akár szelektív UV/VIS detektálásra is. A kémiai szerkezet szolgáltatja az analitikus számára a legfontosabb információt, amelynek figyelembevételével jó kinyerési hatásfokkal működő (80-120%), kézben tartható mintaelőkészítés hajtható végre. A növényvédő szereket gyakorta polaritásuk alapján is osztályozzuk, ami relatív fogalom, hiszen egy szer mindig csak valamihez képest lehet poláris vagy apoláris. Egyértelmű, hogy apoláris növényvédő szer extrakciójához inkább szerves apoláris oldószereket használnak, mint pl. acetont, etil-acetát, CH_3CN (acetonitril), s utána egy általános, apoláris célkomponensekre alkalmazható, széles spektrumú tisztítást hajtanak végre (C_{18} , SPE, ld. 2.3.1 fejezet). Ugyanakkor a poláris peszticidek extrakciójára inkább vizes-metanolos extrakció a jellemző (ld. 2.3.2 fejezet).

Az analitikus számára másik fontos osztályozási szempont, hogy a mérendő komponens disszociált ion, ionná alakítható vagy ionná nem alakítható komponens. Ez befolyásolja az extrakcióhoz választott oldószer minőségét, és az eluenseként választott oldat pH értékét is. A legjobb példa erre talán a kvaterner ammónium sók és azok különböző pH-értéken tapasztalható, eltérő ion formában történő detektálhatósága (Núñez et al. 2002).

Megemlítendő még az a csoportosítás, amely alapján beszélhetünk planáris szerkezetű növényvédő szerekről. Erre a felosztásra különös figyelmet kell szentelnünk, ugyanis a mintaelőkészítésre használatos multi-komponenses módszerek általában tartalmaznak tisztítási lépést, amely magában hordozza a mérendő komponens mennyiségi veszteségének lehetőségét: planáris szerkezetű növényvédő szereknél például GCB d-SPE szorbenst alkalmazva a tiabendazol, cironidil, spinozad, foszalon szermaradványok mennyiségi meghatározása nem hajtható végre (Polgár et al. 2012, Lehotay et al. 2010).



2.2. Mintaelőkészítési eljárások peszticid analitikai vizsgálatra: általános jellemzők

A peszticid analitikai mintaelőkészítés és mérés terén az az irányvonal figyelhető meg, hogy amennyire csak lehetséges, „zöld” azaz környezetbarát legyen: tehát minél kevesebb, kevésbé toxikus szerves oldószert használjon, a laboratórium idő- és energiafelhasználás lehetőleg a legcsekélyebbre redukálható legyen. Mindez egyre inkább életre hívja a multi-komponenses módszerek használatát abból a célból, hogy a lehető legtöbb komponens meghatározhatóvá váljon egy analitikai futtatásból. Ezzel egyúttal megkezdődött az olyan „zöld” mérési technikák fejlődése is, mint az SFC (Tankiewicz et al. 2011).

A folyamatosan fejlődő élelmiszeripar és agrárgazdaság természetes velejárója, hogy a felhasznált növényvédő szerek köre a 20. század közepétől folyamatosan bővül. Élelmiszerbiztonsági szempontból elengedhetetlen e vegyületek ellenőrzése, megfelelő nyilvántartása és monitorozása. Ma több mint 500 olyan hatóanyag szerepel az EURL adatbázis honlapján (Internet 6), melyhez határérték tartozik és mintegy 300 regisztrált peszticid van kereskedelmi forgalomban, melyekre maximális maradvány tartalom (MRL) van megállapítva, különböző mátrixokra (Jogszabály 4). A mintaelőkészítési módszerek folyamatosan fejlődnek, részben a komponensek fejlesztése, részben pedig a készülék oldali (azaz detektálással kapcsolatos) megoldások újításai révén. Általános megközelítés szerint a peszticid analitikában mintaelőkészítésnek nevezzük azt a folyamatot, mely során a mérendő komponenst vagy komponenseket extraháljuk a mintából, esetlegesen megtisztítjuk a detektálást hátráltató komponensektől (azaz a zavaró mátrix jó részétől), és a mérési összeállítás sajátosságainak megfelelő oldószerbe visszük megfelelő koncentrációban. A folyamat során bizonyos esetekben származékot képezünk, hogy a célkomponens meghatározhatóvá váljon. Az extrakciós lépés a kiinduló minta állaga szerint lehet szilárd, félszilárd (püré) vagy folyadék (víz, szörp).

Az extrakció során alkalmazott oldószerek egyike az ACETON (Luke et al. 1975), amely környezetkímélőnek tekinthető, ugyanakkor nem univerzális, mivel határfokát nagyban befolyásolja a mérendő és mátrix polaritása, így gyakran használják együtt olyan apoláris koszolvenssel, mint a hexán (Cherta et al. 2013). Érdeemes megjegyezni, hogy az FDA ezt az extrakciós módszert illetve ezek variációit javasolta a QuEChERS módszer megszületése előtt. A CH₃OH használata nem terjedt el korábban e területen (Mol et al. 2008), ugyanakkor a poláris peszticidek extrakciójára újabban rendszeresen alkalmazzák vízzel elegyítve (ld. QuPPE módszer, 2.3.2 fejezet). Az etil-acetát csak oldószer csere



végrehajtása esetén ajánlatos LC elválasztásnál (Aguera et al. 2000). A legelterjedtebb extraháló oldószer a CH_3CN , amely vízzel jól elegyedik, ugyanakkor szervesen sók jelenlétében könnyedén elválasztható a vizes fázistól, valamint kompatibilis az LC-MS műszeregyüttessel. Nem meglepő, hogy a leggyakrabban alkalmazott multi-komponenses módszer, a QuEChERS is ezt az oldószert használja ecetsavval savanyított vagy nem savanyított formában. Csak említésképpen meg kell, hogy jegyezzem, hogy diklórometán, toluolt, ciklohexánt szintén alkalmaznak extrakciós illetve reszolvatációs oldószerként peszticid analitikai célokra, de kizárólag GC-MS technikával kombinálva.

A növényvédő szer analitikában használatos extrakciós megoldások igen széles palettán mozognak. Szilárd-folyadék extrakció (SLE) esetén a kiinduló minta homogén, aprított szilárd vagy félszilárd halmazállapotú. A minta extrakciójánál a szermaradvány tartalom kioldására alkalmas szerves oldószerral mechanikai úton előidézett keveredést hozunk létre (pl. rázótolcsérrel történő rázás). Folyadék minta esetén folyadék-folyadék extrakcióról beszélünk (LLE). Két egymással nem, vagy részben elegyedő, ugyanakkor sók hozzáadásával szétválasztható folyadékok közötti megoszlással jön létre „kisózás”. Az LLE extrakció során előfordulhat, hogy két szerves fázist is használnak víz ellenében, mint pl. hexánnal telített CH_3CN -t a zsíros mátrix zsírtartalmának eltávolítása végett: ebben az esetben is a kisózás lépése után a két szerves fázis jól elkülönül egymástól (Their & Krichoff 1987), mivel ennél az eljárásnál igen nagymértékű a mérendő komponensekkel interferáló mátrix komponensek kioldódása, minden esetben tisztítási lépést kell a folyamatba iktatni. A szerves sóknak a fázismegosztás elősegítésén kívül még víztelenítő szerepe is van, továbbá elérhető az extrakciós szolvens polaritásának kismértékű változtatása is, ezáltal különböző polaritású osztályba sorolható növényvédő szerek egyidejű kioldása. Az első generációs növényvédő szer analitikában használatos szervesen só a NaCl volt. Ezt „Luke-módszerként” jegyzi a szakirodalom (Luke et al. 1975), amely ugyanakkor még nem csökkentette számottevően az analitikai minta víztartalmát. A NaCl mellett Na_2SO_4 , MgSO_4 illetve a NaCl valamelyik szulfát sóval való keverése jelent meg a módszerfejlesztési folyamatok során. Több tanulmány is született arról, hogy melyik a hatékonyabb eljárás a lehető legkevesebb víztartalom elérésére (Anastassiades et al. 2003). Schenck és munkatársai (2002) egyértelműen bizonyították, hogy a MgSO_4 a leghatékonyabb vízmentesítő só, így nem is meglepő, hogy a már sokat említett és majd a későbbiek folyamán részletesen általam



is leírt QuEChERS módszer is ezt a sót használja a fázismegosztás, polaritás beállítás illetve a víztelenítés megvalósítására.

A korábban említett költséghatékony és „zöld kémia” felé tett első, szemmel láthatóan oldószer takarékos lépés a folyadék fázisú mikroextrakció (LPME) kidolgozása volt. Ennek a jellemzően GC alapú elválasztásra fejlesztett technikának három fajtája van: az SDME, a DLLME és a HFLPME (Lambropoulou & Albanis 2007 a,b). Ezeknél az eljárásoknál a folyadék minta tisztítási lépését úgy oldják meg, hogy abba szerves oldószer cseppeket juttatnak átmenetileg, amely a mintafolyadékban történő tartózkodásának ideje alatt extrakciós közegként szolgál a célkomponensek számára, majd ez a csepp kerül injektálásra az analízis során. Andraščíková és munkatársai (2015) összehasonlító tanulmányukban arra a megállapításra jutottak, hogy a felsorolt három módszer jósága élelmiszermátrix függő.

A következő extrakció típus az SPE, amely során a megkötni kívánt komponens (legyen az a célmolekula vagy az eltávolítani kívánt mátrix komponens) szilárd fázison adszorbeáljuk. Szigorúan véve az SPE két, bár az én meglátásom szerint valójában négy nagy csoportba osztható:

a, Az első a d-SPE, amelyet leggyakrabban mintatisztítási lépésként alkalmaznak úgy, hogy különböző szilárd szorbenseket juttatnak a minta extraktumba, ezáltal megkötve a zavaró minta komponenseket. A növényvédő szermaradvány analitika leggyakoribb tisztító szorbense a PSA, melyet a QuEChERS technika is alkalmaz. A szilika alapú szorbens N-propil-etiléndiamin csoportot hordoz, melynek $-NH_2$ csoportja gyenge ioncserélő kapacitása révén poláris mátrix komponensek (szénhidrátok, fenolok és fenolos savak) megkötésére alkalmas, mindemellett az apoláris peszticidek csak elenyésző százalékát köti meg, így alkalmas kvantitatív meghatározásra. A következő d-SPE szorbens a 18 szénatomszámú alkil-láncot hordozó szilika (C_{18}) (Szabvány 5), amelyet poláris mátrix komponensek, jellemzően zsírsavak megkötésére használunk. Érdekes módon újabban tea mátrixszal kapcsolatban is említi a szakirodalom, mint a vizsgálandó növényvédő szerek vizsgálatát zavaró, azzal interferáló mátrix komponensek eltávolítására szolgáló szorbenst (Martínez-Dominguez et al. 2016). A harmadik szorbens, melyet az EN 15662:2008 szabvány módszer javasol, az aktív szén (GCB). Ez a szorbens arra hivatott, hogy a magas klorofill tartalmú minták fenolos alkotók, klorofill és szterol tartalmát megkösse, így csökkentve a mátrixhatás mértékét. Hátránya azonban, hogy a planáris szerkezetű növényvédő szerek is eltávolításra kerülhetnek, ami rontja a visszanyerési hatásfokot, így



használatánál elővigyázatosnak kell lenni és figyelembe venni a mérendő komponensek sorát (Beyer & Biziuk 2010). Meg kell jegyezni, hogy a tisztító szorbensek széles palettája képviselteti még magát a rutin eljárások között, mint pl. az anion-, kationcserélő illetve kevert módú szorbensek (Sadowska-Rociek et al. 2014), viszont ezek használata még nem olyan gyakori a peszticid analitika területén.

b, A második SPE módszer a c-SPE. A szorbens töltetet leggyakrabban fecskendőbe töltik, és különböző oldószerekkel mossák. A mosás lehet gravitáció által segített, ill. mechanikai nyomással vagy vákuum pumpával kivitelezett. A töltet leggyakrabban C_8 , C_{18} , -CN, -NH₂ vagy egyéb, módosított szilika alapú alkotó, mint Florisil vagy porózus polimerek. A patron hasonló elven működik, mint az analitikai oszlopok: térfogat és szemcseméret függvényében különböző koncentrációjú anyagmennyiséget lehet rajtuk megkötni, majd megfelelő oldószer összetétellel eluálni. A tisztítás mellett a c-SPE természetesen a célkomponens dúsítására is alkalmas. A mosás általában öt fázisú: első a töltet nedvesítése, a második a kondicionálás, ezután következik a minta adszorbeálása a tölteten, majd a mosási fázis következik, amely eltávolítja a töltetről a nem kívánatos, adszorbeálódott mátrix elemeket, az utolsó lépés pedig az elúció. Schenck és munkatársai 2002-ben közöltek egy átfogó kísérletes tanulmányt, amely során acetonos vagy CH₃CN-s extrakcióval előkészített zöldség, ill. gyümölcs mintákat vetettek alá patronos tisztításnak GCB, C_{18} , anioncserés, -NH₂, és PSA töltetekkel. A szerzők szerint a PSA és az -NH₂ eredményezte a leghatékonyabb tisztítást. A GCB csupán a színt okozó vegyületek, mint klorofill és riboflavin kitisztításában volt eredményes. A C_{18} és anioncserés töltet csak kis mértékben távolította el a mátrix interferáló komponenseit. c-SPE alapú technika a proteomikában gyakran alkalmazott eldobható pipetta extrakció (DPX) is, ahol a c-SPE töltet anyagával megegyező töltő anyag van a pipetta hegyében. Az elúciós lépések azonosak a korábban leírtakkal, viszont lényegesen kevesebb oldószer és minta szükséges ennek használatához, ami ugyancsak egy lépés a „zöld” kémia felé (Fernandes et al. 2013).

c, A harmadik típusú szilárd fázisú extrakció az MSPD. Itt jellemzően 1 g mintát homogenizálnak hasonló mennyiségű szorbenssel, amely a minta szerkezetének mechanikai roncsolásával egy időben a felületén adszorbeálja a célkomponenseket. Leggyakrabban C_{18} és aminopropil szorbenst használnak erre a célra, és az így kapott homogenizátumot további tisztítási lépésnek vetik alá. Sok esetben c-SPE tisztítással kombinálják, amikor is a homogenizátumot félig töltött fecskendőbe töltik, majd valamilyen szerves oldószerral



eluálják. Jellemzően az MSPD-t nagy zsírtartalmú minta zsírtartalmának és a komponensek egyidejű megkötésére használják aminopropil szorbenssel, majd a tisztítási lépésnél Florisil töltetet alkalmaznak, így tartva vissza a hosszú szénláncú zsírsavakat. Gilbert-Lopez és munkatársai olívaolaj növényvédő szer tartalmát vizsgálták. A dörzsmozsárban kellően homogenizált 2 mL mintát 2 g Bondesil-NH₂ szorbenssel Florisil oszlopra töltötték, majd 2*5 mL CH₃CN-lel eluálták (2010). A szerzők sikerrel azonosították és határozták meg mennyiségileg 103 növényvédő szermaradványt az olaj mintából ppb koncentrációban, különösebben zavaró mátrixhatás nélkül.

d, A negyedik, legújabb keletű szilárd fázisú extrakció az m-PFC. 1991-ben Iijima írta le először a szén nanocsöveket (CNTs), amelyeket „multi-walled” kialakítással kezdtek alkalmazni mintaelőkészítési célra (MWCNTs). Az elmúlt években számos cikk született arról, hogy ez a fajta tisztítás ugyanolyan hatékony vagy olykor hatékonyabb, mint az eddig elterjedt d-SPE, ráadásul on-line köthető a kromatográfias oszlop elé. Qin és munkatársai összehasonlító tanulmányukban az m-PFC és a d-SPE tisztítási technikák hatásfokát hasonlították össze a hagyományosnak mondható PSA, C₁₈, és GCB szorbensekével liszt, spenót, sárgarépa, alma, citrusfélék és mogyoró reprezentatív mátrixokra. Ezeket a mátrixokat három koncentrációban adalékolták növényvédő szerekkel. Arra a következtetésre jutottak, hogy a m-PFC segítségével sokkal gyorsabb és érzékenyebb multi-komponenses analitikai módszer alakítható ki, mint a d-SPE módszerrel, mert nem szükséges hozzá egyéb oldószer, vortex, vagy centrifugálási procedúra. Noha jobb RSD% és LOD értékeket tudtak elérni az m-PFC segítségével, a szerzők is belátták, hogy rutin laboroknak kevésbé költséges és jobban kézben tarthatóbb a d-SPE módszer (Qin et al. 2015).

A peszticid analitika és a mikrohullámú extrakció (MAE) több mint 20 éve fonódott össze először (Lopez-Avila et al. 1994). Az extrakció a szilárd mátrixból mikrohullámú energia segítségével történik, zárt vagy nyitott roncsoló tégelyben, nagy mennyiségű szerves oldószerben, amely leggyakrabban CH₃OH, H₂O, etanol, nem poláris célkomponensek esetén pedig hexán, CH₃CN vagy ezek elegye (Ericsson & Colmsjö 2000). Az extrakció hatásfoka függ az extrakció hőmérsékletétől és a minta mátrix természetétől. A technika előnye, hogy igen gyors, egyszerre több minta is kezelhető, valamint az extrakciós edénynek csak a belseje melegedik át. Hátránya, hogy a nem hőstabil vegyületek jelentős bomlást szenvedhetnek, továbbá az SFE eljárással összehasonlítva sokkal nagyobb az együtt extrahálódó és



interferáló mátrix komponensek száma. Rendszerint ezt az eljárást is tisztítási lépés követi a nem specifikus jellege miatt, ezért nem is vált általánosan alkalmazott módszerré.

A mikrohullámú extrakcióhoz hasonlóan a PLE vagy ASE extrakciós technika is feltűnik a peszticid analitika extrakciós módszerei között. Az eljárás itt is szilárd mintából indul ki: az oldószer itt közel vagy túl van a kritikus ponton, de ellentétben az SFE eljárással tradicionális oldószereket használ (pl. ciklohexán, etanol). A nyomás az oldószert forrásponton tartja, így nem szükséges túl magas hőmérséklet, ami megvédené a hőérzékeny célmolekulát a bomlástól. Ugyanakkor minél magasabb a hőmérséklet, annál nagyobb a határfok, mert erősebb az oldószer penetrációja a mintába (Zhang et al. 2012).

A mintatisztítási lépések új generációs megoldása az on-line köthető, valamilyen, az analitikai elválasztást közvetlenül megelőző állófázison történő mátrix megkötés. Ennek a módszernek kétségtelenül a GPC volt az elődje, mely során az extraktumot egy porózus polimer töltettel ellátott oszlopra injektálják, melyen a növényvédő szerek elválnak a nagy molekulatömegű zsírsavaktól. A módszer előnye, hogy megfelelő műszeres háttérrel megoldható a technika automatizálása. Hátrányaként említendő meg ellenben, hogy nem minden esetben sikerül a növényvédő szerek mátrix komponensektől történő elválasztása, így további mintatisztítás szükséges, offline technikaként ráadásul nagyon idő- és oldószerigényes (Zhang et al. 2012).

2.3. Multi-komponenses szabvány módszerek

Számos kutatóintézet foglalkozik a növénytermesztésben használt különböző növényvédő szermaradványok ellenőrzésével. Az egyre szigorodó szabályozásnak és fejlesztéseknek köszönhetően a piacon fellelhető készítmények folyamatosan változnak, új szerek jelennek meg, míg régebbieket kivonnak a forgalomból. További vizsgálati módszerek fejlesztése szükséges annak érdekében, hogy minél hatékonyabban kimutathatók legyenek e készítmények, illetve bomlástermékeik jelenléte. Ennek eredménye a „multi-komponenses” mintaelőkészítési eljárások megjelenése, melyekből a legismertebbek a következők: a poláris peszticidek mintaelőkészítésére és mérésére irányuló QuPPE módszer, illetve a jellemzően inkább apoláris és kissé poláris növényvédő szerek mintaelőkészítésére alkalmas QuEChERS módszer, melynek számtalan módosulata ismert. Ezekon felül számos multi-komponenses módszer látott napvilágot. Magyarországon napjainkig 67 szabvány jelent meg víz, talaj, élelmiszer mátrixokra, melyekből mára már csak 11 MSZ EN hatályos (2. táblázat).



2. táblázat: Hatályos szabvány módszerek peszticidek vizsgálatára

Jelzet	Mátrix	Komponensek	Detektálás	Mintaelőkészítés	Tisztítás
MSZ 21470-102:2004	Környezetvédelmi talaj	foszforsav-észter	GC,-ECD,-NPD,-MS	aceton, 15% NH ₄ -acetát+diklórmétán	adszorbens benzol
MSZ EN 12393 - 1:2014 12393 - 2:2014 12393 - 3:2014	Növényi eredetű élelmiszerek	peszticid szermaradékok	GC,-NPD, -FPD,- ECD, -AED, ECD,-MS, LC-MS/MS	M: acetonos extrakció diklórmétánnal/ petróleummal N:extrakció aceton diklórmétán, ciklohexán / etil-acetát P: etil-acetát	M: Florisil N: GPC, és szilika gél P: GPC
MSZ EN 15637:2009	Növényi eredetű élelmiszerek	peszticid szermaradékok	LC-MS/MS	CH ₃ OH extrakció	kovaföldes tisztítás
MSZ EN 15662:2009	Növényi eredetű élelmiszerek	peszticid szermaradékok	GC-MS, LC-MS/MS	CH ₃ CN-es extrakció, szétválasztás	diszperziós SPE tisztítás
MSZ EN 15741:2009	Takarmányok	OC peszticidek PCB-k	GC-MS	etil-acetátos extrakció	GCP
MSZ EN 15742:2009	Takarmányok	OC peszticidek PCB-k	GC-ECD	etil-acetátos extrakció	GCP
MSZ EN 16693:2016	Víz	OC peszticidek	GC-MS	acetonos extrakció	SPE
MSZ EN ISO 14181:2001	Takarmányok	OC peszticidek	GC	acetonos extrakció	szilika, Na ₂ SO ₄ hexán
MSZ EN ISO 14182:2000	Takarmányok	OC peszticidek	GC	acetonos extrakció	szilika, Na ₂ SO ₄ hexán
MSZ EN 15054:2006	Zsírsgégy élelmiszerek	klórmekvát mepikvát	LC-MS	CH ₃ OH extrakció	nincs
MSZ EN 15055:2006	Zsírsgégy élelmiszerek	klórmekvát mepikvát	LC-MS	CH ₃ OH extrakció	nincs

M, N, P = MSZ EN 12393 szabvány család három módszert is javasol a mintaelőkészítésre, melyeket M, N, P betűvel jelöl

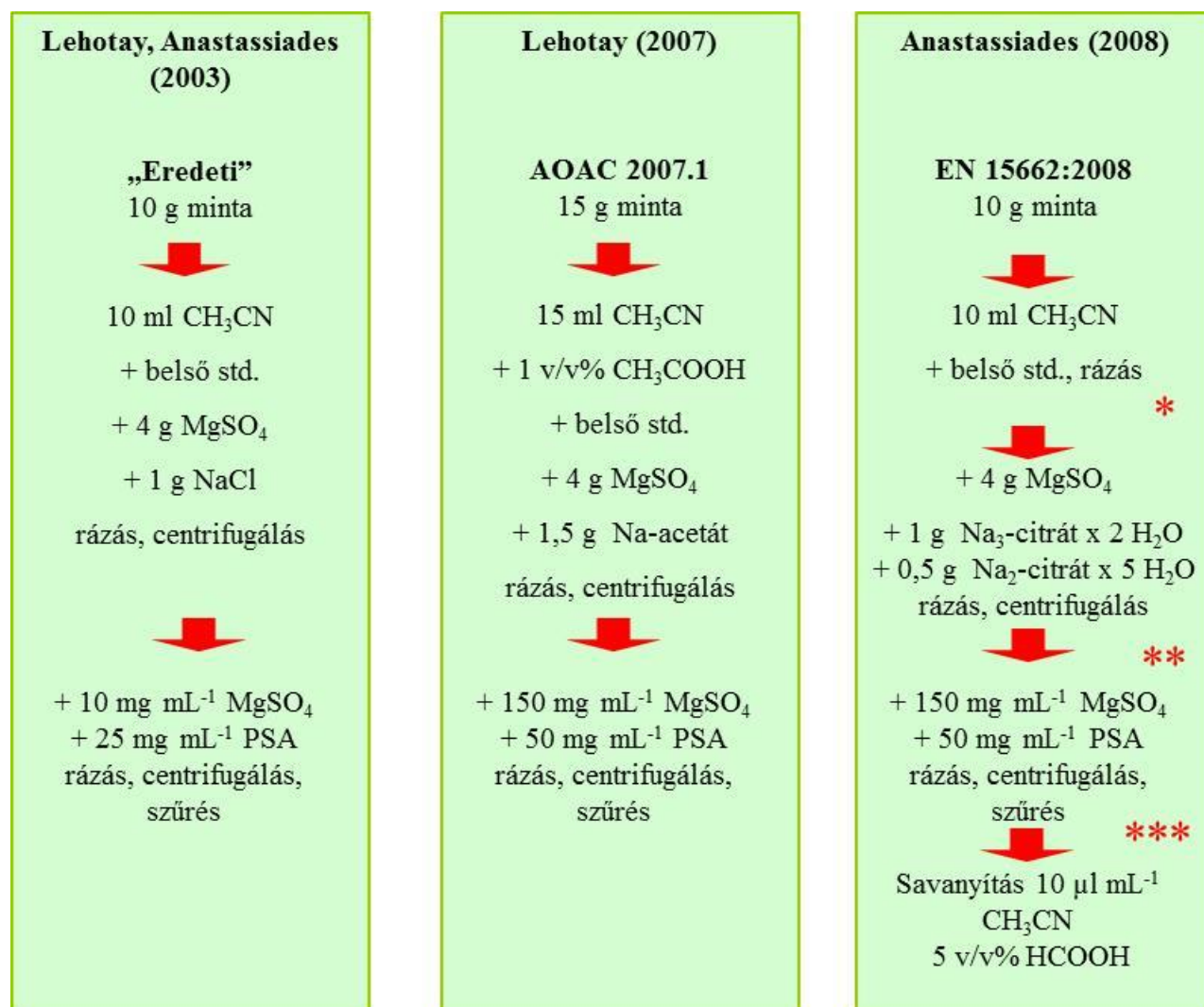
2.3.1. QuEChERS

A QuEChERS módszert Anastassiades és Lehotay kutatócsoportjai publikálták 2003-ban és 2005-ban, zöldségek és gyümölcsök növényvédő szer vizsgálatának mintaelőkészítésére. (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al. 2005). Alapvetően egy CH₃CN-es extrakcióból (LLE), majd MgSO₄-ot és NaCl-ot felhasználó kisózási lépésből áll, végül ezt követi egy d-SPE tisztítási lépés, mely igen sok módosítást rejthet magában. Ezt követően ugyancsak a fent említett két kutató illetve kutatócsoportjaik nevéhez fűződik a QuEChERS módszer továbbfejlesztése (mind a pufferek, mind a d-SPE szorbensek



használatának területén) illetve a két ma használatos „alapszám” az AOAC 2007:1 és az EN 15662:2008 szabvány megalkotása.

Összehasonlítva a két módszert, lévén, hogy mindkettő „uniform” (azaz ugyanazt a mintaelőkészítést alkalmazza több különböző szermaradványra), teljesíteniük kell azt a SANTE (Jogszabály 1) által támasztott követelményt, miszerint a mérendő célkomponensek mindegyikének 70-120%-ban visszanyerhetőnek kell lennie. A két módszer a fő lépéseket leszámítva (extrakció, kisózás, tisztítás) számos lépésben különböznek egymástól, amit az 1. ábra szemléltet. Az egyik nagy különbség a felhasznált puffer, s így az extrakció során alkalmazott pH érték. Az AOAC Na-acetátot használ, így a közeget savasabb pH értékre (4,5-4,8) pufferelem. Az EN 15662:2008 szabvány citrát puffert használ, amely a pH értéket 5-5,5-re állítja be. A szabvány további homogenizálási lépést iktat be az extrakció során a kisózás előtt, ezen felül tartalmaz néhány pH korrekciós lépést citrom, lime és bogyósok esetén, amely mátrixok esetén 200-600 μL térfogatú, 5 M koncentrációjú NaOH használatát írja elő, ugyancsak a kisózási lépést megelőzően. További eltérésként sorolható fel, hogy egy éjszakás kifagyasztást javasol a magas illóolaj tartalmú mintánál az illóolaj eltávolítása végett. Ellentétben az AOAC eljárással, ez a szabvány már minta típusra lebontottan ad ajánlást a mintatisztítási lépés során alkalmazandó GCB:MgSO₄ mennyiségéről klorofill illetve karotin tartalmú mintákra, és végül a legutolsó lépésben kapott extraktum savanyítását is előírja hangyasavas CH₃CN oldattal. Az előzőekben leírt QuEChERS változatokat az 1. ábra foglalja össze.



1. ábra: QuEChERS módszerek(*) citrom, lime, bogyósok esetén, ahol 200-600 µL térfogatú 5 M NaOH alkalmazandó, (**) citrusfélék esetén alkalmazandó kifagyasztási lépés, (***) klorofill, karotin tartalmú minták esetén alkalmazandó GCB:MgSO₄ keverék

Számos összehasonlító tanulmány született az említett módszerek eredményességét vizsgálva. Az első közlemény Anastassiades és kutatócsoportjának (2007) a nevéhez fűződik, mely később az EN 15662:2008 alapjául szolgált. A csoport a QuEChERS módszer megannyi módosított formáját hozta létre, így az eredeti, NaCl-t alkalmazó eljárást, Na-acetát, majd később Na-citrát puffer alkalmazásával tették robusztussá, melyet különböző mintatisztítási lépésekkel kombináltak. Egyidejűleg az elkészített extraktumok gravimetriás mérésével bizonyították, hogy a citrát pufferes eljárás az acetátos módszerhez képest akár 60%-kal kevesebb mátrixot visz tovább az analitikai mintába (Anastassiades et al. 2007). A csoport legtöbbet idézett közleménye az az összehasonlító tanulmány (Lehotay et al. 2010), amely során alma-áfonya szósz, körte és citrom minta mátrixot adalékoltak 32 növényvédő



szerrel 50-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentráció tartományban, és készítették elő mindhárom (NaCl-t, Na-acetátot, Na-citrátot pufferként alkalmazó) módszerrel. A kész extraktumokat mind LC-, mind pedig GC-MS-műszeregyüttessel megmérték. A mennyiségi kiértékelést mátrix illesztett kalibrációval hajtották végre. A visszanyerési kísérletek alapján elmondható, hogy a két „alap” módszer (AOAC 2007.01, EN 15662:2008) jól működött, az átlagos kinyerési hatások a szermaradványokra 96%-nak adódott. A nem pufferelt módszer esetén viszont a stabilitás szempontjából pH függő növényvédő szerek nem megfelelő visszanyerési hatásfokot mutattak: pymetrozine-ra csak az AOAC módszer eredményezett 80% közeli kinyerési hatásfokot, ahogy tiabendazol esetén is az acetát pufferelt módszer adott elfogadható értéket. Az együtt extrahálódott mátrix komponensek mennyiségét ugyancsak gravimetriás megközelítéssel határozták meg ebben a tanulmányban is. Azt tapasztalták, hogy noha egyik módszer sem használ C_{18} szorbenst, az nagymértékben lenne képes csökkenteni az együttesen extrahálódó mátrix komponensek mennyiségét, ráadásul citrom esetén helyettesíthetné a kifagyasztási lépést, így lehetővé tenné kevesebb extraháló szer használatát, s kevésbé időigényes. A tanulmány szerint a GCB felhasználása a planáris szerkezetű peszticidek kinyerési hatásfokát rontja. A mátrixhatás vizsgálata azzal a konklúzióval zárult, hogy annak mértéke mind a körte, mind az alma-áfonyalé mintára kielégítően kicsi volt, ugyanakkor a citrus minta esetén módszertől függetlenül számottevő s nem elhanyagolható.

Andraščíková és Hrouzková (2013) szintén a korábban leírt három mintaelőkészítési módszert vették górcső alá citrom mintánál GC-MS módszerrel. Az extrakciós módszerek összehasonlítását az LCL, LOD, LOQ, érzékenység, linearitás és visszanyerési hatások megállapításán keresztül hajtották végre. A szerzők a citrát pufferelt módszert találták a legérzékenyebbnek a célkomponensekre, ezt követte a nem pufferelt, majd az acetát pufferelt módszer. Mi több, a citrát pufferelt módszer eredményezte a legalacsonyabb LOD és LOQ értéket is, a vizsgált folpet és lindane szermaradványokat leszámítva. Ez utóbbiakra viszonylag jó eredményeket adott az eredeti módszer, míg az AOAC módszer pedig kifejezetten alkalmatlannak bizonyult, mert sok szermaradvány esetén a kimutatási határ magasabb lett a 2013-ban hatályos MRL értéknél. Ráadásul a mátrixhatás vizsgálat sem az acetát pufferelt módszernek kedvezett. A visszanyerési vizsgálaton mind a három módszer kielégítette a SANTE követelményeit, bár a nem pufferelt és acetátos kissé gyengébb eredményeket adott néhány célpeszticidre. Összességében a cikk szerzői csak az eredeti és a



citrát pufferelt módszert tartották elfogadhatónak a vizsgált 35 peszticid tekintetében citrom mintára.

2.3.2. Poláris peszticidekre fejlesztett mintaelőkészítési multi-komponenses módszerek

A poláris peszticidok analízise régóta jelent kihívást az analitikusok számára, mivel a gyakran alkalmazott acetonitriles extrakciót követő kisózási lépés nem, vagy csak részben képes felülúszóban tartani ezeket a vegyületeket. A 3. táblázatban szereplő vegyületek közül több disszociált anion illetve kation formájában van jelen, így RP oszlopról a holtterefogatban eluálódnak. A poláris peszticidok főként nem specifikus herbicidek, ahol a nagy hidrofobicitásra azért van szükség, hogy a növények számára felvehető és floém mobilisek legyenek.

Az első, poláris peszticidekre fejlesztett szabvány módszerek 2006-ban láttak napvilágot EN 15054:2006 és EN 15055:2006 jelzettel, amelyből az első MS, a második pedig MS/MS detektálást alkalmaz, így az utóbbi alacsonyabb kimutatási határral képes detektálni a célkomponenseket. Mindkettő klórmekvát és mepikvát meghatározására alkalmas, és mindkét célkomponensre deuterált sztenderd használatát írják elő, többek közt abból az okból, hogy a mintaelőkészítés során fellépő veszteség korrigálható legyen. A két szabvány módszer röviden a következőképp foglalható össze: 10-20 g mintához mindkét deuterált sztenderd törzsoldatból ($16,67 \mu\text{g mL}^{-1}$) 60-60 μL mennyiséget kell kimérni, majd előírt mennyiségű (20-40 mL) metanollal történik az extrakció 2 percig. Száraz minta esetén víz hozzáadását követően 10 perc várakozási idő szükséges. A kapott extraktum centrifugálása és szűrése után injektálásra alkalmas oldathoz jutunk. A meghatározás ioncserés kromatográfiával LC-MS/MS összeállítással történik, MRM alapú azonosítással. A mennyiségi meghatározás alapja, hogy olyan külső kalibrációs sor készül, amely tartalmazza a deuterált sztenderd oldatokat is, így a szabvány egyesíti a külső kalibráció egyszerűségét a belső sztenderd használatának előnyeivel.

A QuPPE egy olyan multi-komponenses validált módszergyűjtemény, amely a komponensek kíméletes extrakcióját követően alkalmas erősen poláris peszticidok és származékaik LC-ESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel történő meghatározására. A módszer a sztenderd vegyületek oldószerének megnevezésétől, a munkaadatok tárolási módján át, a mintaelőkészítésen és a kromatográfiás paramétereken túl a kiértékelés menetéig bezáróan komplett ajánlást nyújt. A dolgozat készítésének időpontjában a 8.1 verzió volt a hatályos, azonban a kísérletek végrehajtásának idején 7.1 verzió volt csak elérhető, így a továbbiakban



az újabb verziót tárgyalom, jelezve a különbségeket a két, egymást követő verzió között (Internet 4, 5).

A módszer a mennyiségi meghatározáshoz deuterált sztenderdeket használ, de lehetővé teszi a sztenderd addíció illetve a mátrix illesztett kalibráció használat is abban az esetben, ha a mintamátrix nem nyomja el az ionizációt és az extraktum mennyisége megengedi (amely eredetileg 20 mL). Fontos megjegyezni, hogy a QuPPE két változatban, QuPPE-PO-ban és a QuPPE-AO-ban létezik: az első növényi, az utóbbi állati eredetű mátrixra validált - dolgozatomban csak az elsőre térnék ki.

A mintaelőkészítés a QuPPE esetén kíméletes extrakció, amely az EN 15055:2006-ban leírtaktól abban tér el, hogy jóval aprólékosabban határozza meg az extrakciós eljárást az egész folyamat reprodukálhatóságának növelése érdekében (pl. kisebb, kezelhető térfogatok, számszerűsített víz addíció). A folyamat során 5,0 - 13,5 g minta kerül bemérésre 50 mL térfogatú centrifugacsőbe. Száritott minta esetén nedvesítést kell végrehajtani az adott gyümölcs/zöldség nedvességtartalmának függvényében, a módszerhez tartozó leírásban közölt összes nedvesség tartalom táblázat alapján. A nedvesítésre kizárólag abban az esetben van szükség, ha deuterált sztenderdet használunk a mennyiségi kiértékelés során. Az extrakció során 10,0 mL 0,1 v/v% hangyasavval savanyított CH_3OH -t és 50 μL belső sztenderdet adunk a mintához. Sztenderd addíció és mátrix illesztett kalibráció esetén 20 mL végtérfogatra kell jelre tölteni az oldatokat vízzel. Rázógép használata esetén friss mintánál 5-15, nedvesített mintánál pedig 15-30 percig tart az extrakció. Kézzel a friss mintát 1 percig kell rázni, míg nedvesített mintánál az 1 percet követően 15-30 percnyi pihentetés után újabb 1 perces rázás következik. Parakvát és dikvát esetén az 1 perces kézi extrakciót 15 perces 80 °C-os hőkezelés követi, majd újabb egy perces erőteljes rázás következik, amely után a mintát hagyni kell kihűlni a centrifugálás előtt. Az összes eddigiekben leírt módon előkészített extraktumot 5 percig tartó 4000 g terhelésű centrifugálás után 0,45 μm -es pórusméretű szűrőn kell tisztítani az injektálást megelőzően.

A QuPPE 8.1 verziója tíz validált multi-komponenses módszert tartalmaz, és nyolc HPLC oszlopot használ azok megvalósítására, míg a 7.1 verzióban a módszerek száma hét volt és hét HPLC oszlop kerül említésre. A 3. táblázatban tüntetem fel a módszerekkel vizsgálható komponenseket, pKa értékeket és a leggyakrabban használt MRM átmeneteket, amelyek között félkövér dőlt betűvel jelöltem meg a HILIC módszerfejlesztés során általam is használtakat (ld. 5.3 és 5.4 fejezetek).



3. táblázat: A QuPPE és az EN 15055:2006 módszerekkel vizsgálható növényvédő szerek és azoknak a dolgozatomban használatos rövidítése, pKa értékük, jellemző MRM átmenetek és a használatos ESI ionizációs mód

Megnevezés	Rövidítés	pKa	Jellemző MRM átmenetek	ESI
<i>Etiléntiokarbamid</i>	ETU	14,34	103/44, 103/60, 103/86	+
<i>3-(Metil foszfinil)-propionsav</i>	MPPA	4,88	151/63, 151/107, 151/133	-
<i>Amino-metil-foszonsav</i>	AMPA	8,4	110/63, 110/79, 110/8	-
<i>Amitrol</i>	AML	4,14; 10,7	85/43, 85/57, 85/58	+
Bialafosz	BIP	2,6; 5,6; 10,3	322/88, 322/94, 322/134	-
Klorát	CHL	disszociált anion	83/67, 85/69	-
<i>Klórmeqvát</i>	CQ	disszociált kation	122/58, 122/63, 124/58	+
<i>Ciromazin</i>	CYNE	5,22	167/68, 167/125, 167/85, 167/108,	+
Cianursav	CYA	6,88; 11,4; 13,5	128/42, 128/85	-
<i>Daminozid</i>	DZE	4,68	161/143, 161/61, 161/101 , 161/115, 161/44	+
<i>Dietanolamin</i>	DMIN	8,88	106/88, 106/70, 106/45	+
<i>Difenzokvát</i>	DFQ	7,0	249/77, 249/130, 249/193	+
<i>Dikvát</i>	DQ	disszociált kation	184/128, 183/157, 184/156	+
<i>Etefon</i>	ETN	2,8; 7,2	143/107, 143/79, 145/107	-
<i>Foszetil-alumínium</i>	FOSAL	4,7	109/81, 109/63	-
<i>Glufozinát</i>	GLU	2,0; 2,9; 9,8	180/63, 180/136, 180/85, 180/95	-
<i>Glifozát</i>	GYPH	0,78; 2,29; 5,96	168/63, 168/124, 168/150, 168/81	-
2- hidroxi-etil-foszonsav	HEPA	n.i.	125/79, 125/95, 125/63	-
Kasugamicin	KMY	3,23; 7,73	380/112, 380/200	+
<i>Maleinsav-hidrazid</i>	MH	5,65	111/82, 111/42, 111/55, 111/83	-
Melemin	MELIN	5,0	127/85, 127/68, 127/60	+
<i>Mepikvát</i>	MQ	disszociált kation	114/98, 114/58	+
<i>Morfolin</i>	MLIN	8,38	88/70, 88/45, 88/44	+
N,N-Dimetil-hidrazin	NND	7,21	61/44, 61/45	+
N-Acetil-AMPA	NAA	3,142	152/63, 152/79, 152/110	-
<i>N-Acetil-glufozinát</i>	NAG	9,15; 9,85	222/63, 222/59, 222/136	-
<i>Nereistoxin</i>	NTOX	n.i.	150/105, 150/61, 150/71	+
<i>Parakvát</i>	PQ	disszociált kation	186/171, 171/77, 171/155	+
Perklorát	PCL	7,0	99/83, 101/85	-
<i>Foszonsav</i>	PHSA	1,3; 6,7	81/79, 81/63	-
Propamokarb	PCARB	9,6	189/144, 189/102, 189/74	+
<i>Propilén tioureao</i>	PTU	9,62	117/100, 117/58, 117/60, 117/72	+
<i>Sztreptomycin</i>	SMY	10,88; 11,9	582/263, 582/246, 582/ 221	+
<i>Trietanolamin</i>	TMIN	7,8	150/132, 150/70, 150/88	+
<i>Trimetil-szulfónium</i>	TRM	disszociált kation	77/62, 77/47	+
1,2,4-Triazol	TRZ	2,2	70/43	+
Triazol-alanin	TRZAM	n.i.	157/70	+
Triazol-ecetsav	TRZA	n.i.	128/70	+
Triazol-tejsav	TRZLA	n.i.	158/70	+

n.i.: nem ismert

Az 4. táblázatban foglaltam össze a poláris peszticidekre jelenleg használatos multi-komponenses módszereket. A táblázatból kitűnik az a tendencia, amelyik napjaink analitikai módszereknél is megfigyelhető, hogy a fejlesztők igyekeznek egyre kisebb méretű oszlopot használni, ezáltal költséghatékonyá, kevesebb oldószerigényűvé, illetve nagyobb mintaátviteli kapacitásúvá tenni az adott eljárást. Jól láthatóan törekedtek arra is, hogy egy



kromatogramon belül minél több komponens egyidejű meghatározását lehessen végrehajtani, valamint a HILIC térhódítása is szembetűnő: a később született módszerek mindegyike HILIC oszlopot használ a célkomponensek elválasztására. A felsorolt módszerek legalább két, maximum tizenöt célkomponens egyidejű meghatározására alkalmasak.

4. táblázat: Kromatográfiai megoldások a QuPpe módszerekben és az EN 15054:2006, EN 15055:2006 szabványcsaládban

Módszer, ESI ionizáció	Célkomponensek	HPLC oszlop	Eluens	Elúció
QuPpe 1.1 negatív	ETN, HEPA, GYPH, AMPA, GLU, MPPA, NAG, PHSA	Dionex IonPac AS 11-HC 2 mm x 250 mm	A: H ₂ O B: 1 mM citromsav dimetilaminnal, pH=11 állítva	Lineáris gradiens V= 0,3 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPpe 1.2 negatív	ETN, HEPA, GYPH, AMPA, GLU, MPPA, NAG, PHSA, NAA, FOSAL	Dionex IonPac AS 11-HC 2 mm x 250 mm	A: H ₂ O B: 1 mM NH ₄ -citrát vízben	Lineáris gradiens V= 0,3 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPpe 1.3 negatív	ETN, HEPA, GYPH, AMPA, GLU, MPPA, NAG, PHSA, NAA, FOSAL, MH, PCL, CHL, CYA*, BIP*	Hypercarb 2,1 mm x 100 mm x 5 µm	A: 1 v/v% ecetsavval savanyított: 5:95 v/v% CH ₃ OH: H ₂ O B: 1 v/v% ecetsavval savanyított CH ₃ OH	Lineáris gradiens V= 0,2-0,4 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPpe 1.4* negatív	PHSA, PCL, CHL	Hypercarb 2,1 mm x 100 mm x 5 µm	A: 1 v/v% ecetsavval savanyított: 5:95 v/v% CH ₃ OH: H ₂ O B: 1 v/v% ecetsavval savanyított CH ₃ OH	Lineáris gradiens V= 0,4 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPpe 2 negatív	FOSAL, MH, PCL	Obelisc R 2,1 mm x 150 mm x 5 µm 100Å	A: 50 mM NH ₄ -formiát vízben 0,1 v/v % hangyasav B: CH ₃ CN	Inverz lineáris gradiens V= 0,3-0,5 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPpe 3 pozitív	AML, CQ, MQ, DFQ, DZE, TRZ, ETU, PTU, CYNE	Obelisc R 2,1 mm x 150 mm x 5 µm 100Å	A: 5 mM NH ₄ -formiát vízben B: 5 mM NH ₄ -formiát 95:5 v/v % CH ₃ CN:H ₂ O-ben	Inverz lineáris gradiens V=0,4 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPpe 4.1 pozitív	DQ, PQ, CQ, MQ, DZE, NND, CYNE, TRM, NTX, DFQ, MELIN*, PCARB*	Obelisc R 2,1 mm x 150 mm x 5 µm 100Å	A: 20 mM NH ₄ -formiát vízben, pH=3,0 B: CH ₃ CN	Inverz lineáris gradiens V= 0,4 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPpe 4.2 pozitív *	AML, ETU, CQ, MQ, DZE, PTU, CYNE, TRM, NTOX, DFQ, MELIN* PCARB*, DMIN, TMIN, MLIN	BEH Amide 2,1 mm x 100 mm x 1,7 µm	A: 50 mM NH ₄ -formiát vízben, pH=3, B: CH ₃ CN	Inverz lineáris gradiens V=0,5 mL perc ⁻¹ 40°C



Módszer, ESI ionizáció	Célkomponensek	HPLC oszlop	Eluens	Elúció
QuPPE 5 pozitív	CQ, MQ, DFQ, ETU, PTU	MonoChrom MS 100 mm x 2 mm x 5 µm	A: 5 mM NH ₄ -acetát vízben 0,1 v/v% ecetsav B: CH ₃ CN	Inverz lineáris gradiens V= 0,4 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPPE 6 pozitív	SMY, KMY	Obelisc R 2,1 mm x 150 mm x 5µm 100Å	A: 0,1 v/v % hangyasav H ₂ O B: 0,1 v/v % hangyasav, CH ₃ CN-ban	Inverz lineáris gradiens V= 0,3-0,5 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPPE 7 pozitív	DMIN, TMIN, MLIN	Dionex Acclaim Trinity P1 2,1 mm x 100 mm x 3 µm	A: 50 mM NH ₄ -formiát vízben, pH=3 B: CH ₃ CN	Inverz lineáris gradiens V= 0,4 mL perc ⁻¹ 40°C
QuPPE 8 pozitív *	TRZ, TRZAM, TRZA, TRZLA	Hypercarb 2,1 mm x 100 mm x 5µm	A: 1 v/v% ecetsav vízben +5 v/v % CH ₃ OH, B: 1% v/v% ecetsav CH ₃ OH-ben	Inverz lineáris gradiens V= 0,6 mL perc ⁻¹ 40°C
EN 15054:2006 EN 15055:2006 pozitív	CQ, MQ	Shodex RSpak 613: 6 mm x 150 mm 6 µm, 100Å	CH ₃ OH:H ₂ O 1:1 v/v% 50 mM NH ₄ -acetáttal	Izokratikus V= 0,3 mL perc ⁻¹ Nem temperált
EN 15054:2006 EN 15055:2006 pozitív	CQ, MQ	Shodex RSpak 413: 4 mm x 150 mm x 4,6 µm, 25Å	CH ₃ CN: CH ₃ OH: ecetsav:H ₂ O, 17,5:7,5:3,75:75,25 v/v% 50 mM NH ₄ -acetáttal	Izokratikus V= 0,3 mL perc ⁻¹ 30°C
EN 15054:2006 EN 15055:2006 pozitív	CQ, MQ	Partisil SCXC 2,1 mm x 150 mm x 10 µm	1:1 v/v% CH ₃ OH:H ₂ O és 150 mM NH ₄ -formiát	Izokratikus V= 0,2 mL perc ⁻¹ Nem temperált

(*) azokat a módszereket és új mérendő komponenseket jelöltem így, amelyek a QuPPE 7.1 verzióban még nem, de a QuPPE 8.1 verzióban már szerepeltek

2.4. A növényvédő szer analitikában használt kromatográfias módszerek

Ebben a fejezetben kerül sorra az LC alapú kromatográfias megoldások általános bemutatása. Ki kell hangsúlyoznom, hogy bár a GC használata igen elterjedt e területen, ennek tárgyalását dolgozatomban nem tartalmazza. A teljesség igénye nélkül csak az általam használt folyadékkromatográfias módszerekre szorítkozom, különös tekintettel a HILIC és az új generációs SFC kromatográfias módszerekre.

2.4.1. RP, NP

Az gyakorlatban leggyakrabban használt kromatográfias oszlop RP, és nincs ez máshogyan a peszticid analitikában sem (Michel & Buszewski 2002; Zhang et al. 2012). Az állófázis apoláris, legtöbbször alkil-szilika (C₄-C₁₈), ezen felül fenil módosító csoportot is



tartalmazhat, továbbá lehet polimerrel bevont szilikagél, szerves polimer alapú töltet (sztirol-divinil-benzol alapú), nyomásálló szén alapú állófázis, alumínium-oxid alapú állófázis, ill. cirkónium-oxid alapú állófázis. A mozgófázis jellemzően poláris keveréke egy vagy több szerves oldószernek és víznek vagy puffernek. A retenciós viszonyokat itt az állófázis és mozgófázis közötti hidrofobicitási különbség illetve az injektált minta anyagi minősége szabja meg. A szerves oldószer mennyiségének növelésével a mozgófázis polaritása gyengébb lesz, így az oszlop kevésbé fogja visszatartani a kevésbé poláris komponenseket, amelyek így hamarabb fognak eluálódni az oszlopról.

A másik, manapság már ritkábban alkalmazott kromatográfia az NP. Az RP retenciós mechanizmusával ellentétben az NP esetén az oszlop kapacitása nő, ha növeljük a minta és az állófázis (alumínium-oxid, NH_2 , $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$ csoporttal módosított szilikagél) polaritását és a mozgófázisét pedig csökkentjük. A normál fázisú kromatográfiában alkalmazott mozgófázisok (eluensek) többsége szénhidrogénekből tevődik össze, amelyhez kis térfogatrészben (0,1-25 v/v%) poláris oldószert adunk a megfelelő elválasztás érdekében. Mivel ez a poláris oldószer semmilyen esetben sem víz, a szakirodalom „non aquarius” kromatográfiának is nevezi (Snyder et al. 2010). Peszticid analitikai célokra jellemzően nem használják, mivel a legtöbb detektorral nem kompatibilis (Arend & Ballschmiter 2000), ugyanakkor azért tartottam fontosnak megemlíteni, mert HILIC oszlopként gyakorta alkalmaznak korábban NP kromatográfiánál használt állófázist.

2.4.2. Ioncserés eljárások (SAXC, SCXC, WAX, WCX)

Az ioncserés kromatográfia olyan analitikai módszer, melynél az ionok elválasztása az álló- és a mozgófázis közötti ioncsere-egyensúlyon alapul. Az ioncserés kromatográfia állófázisként ioncserélő tulajdonságú anyagokat használ a tipikusan állandó töltéssel rendelkező vegyületek (pl. erős savak és bázisok, szervetlen ionok) meghatározására. Az elválasztás az egyes ionok és az állófázison elhelyezkedő ellentétes töltésű funkciós csoportok között kialakuló kölcsönhatáson alapul (Fekete 2006).

Az állófázisként alkalmazott ioncserélőket csoportosíthatjuk töltésük szerint. Az anioncserélők pozitív töltésű funkciós csoportokkal rendelkeznek (pl. protonált aminocsoport, kvaterner amin), a kationcserélők negatív töltésű funkciós csoportokat hordoznak (pl. deprotonált szulfonsav, karboxilcsoport). Töltésük pH-függése szerint az ioncserés LC oszlopok lehetnek erős ioncserélők, ahol az ioncsere kapacitása független a pH-



tól (pl. kvaterner amin, szulfonsav), illetve gyenge ioncserélők, ahol az ioncsere kapacitása pH-függő (egyéb aminocsoportok, karboxilcsoportok). Az utóbbi típust rutin analitikában kevésbé alkalmazzák a robusztusságában mutatkozó hiányosságai miatt. Állófázis hordozóként leggyakrabban megfelelő ioncserélő funkciós csoportokkal ellátott térhálósított műgyantát (pl. sztirol és divinil-benzol kopolimer) vagy szilikagélt alkalmaznak. A felhasznált eluensek ezen kromatográfias elválasztásnál általában szerves és szervetlen pufferek, amelyek összetételét egyértelműen a detektálási eljárás szabja meg. Például LC-MS rendszerrel szervetlen pufferek használata szinte kizárt. Gradiens elúciónál legtöbbször ugyanazon puffer egy kisebb és egy (jellemzően legalább egy nagyságrenddel) nagyobb koncentrációjú, azonos pH-értékre beállított oldata szerepel eluensként. Az ionok megkötődése függ a mérettől, töltéstől, hőmérséklettől, ionerősségtől és végül, de nem utolsó sorban a pH-tól. A poláris peszticidek igen nagy csoportja konstans vagy disszociált anionként vagy kationként viselkedik, így kézenfekvő, hogy ioncsere elválasztás kerül előtérbe a célkomponensek meghatározásához (ld 3. Táblázat).

2.4.3. HILIC

Alpert mutatta be először azt a víztartalmú mozgófázist használó, normál fázisú kromatográfias összeállítást, amely azóta számtalan néven vonult be a köztudatba. Ezek közül a legismertebb az „aquarius chromatography” vagy HILIC, amely az LC-ESI-MS kapcsolások területén legfontosabb kromatográfias elválasztási típusná nőtte ki magát a fordított fázis után (Alpert 1990). Retenciós mechanizmusa nagyban eltér az eddig megszokottaktól, leginkább a normál fázisú kromatográfiahoz hasonlít. A HILIC esetén arról van szó, hogy a hidrofíl vegyületek megoszlanak a poláris állófázis (mint például a „bare szilika”) és a víztartalmú poláris mozgófázis között. A megoszlást illetve annak dinamikáját, kinetikáját az állófázison létrejött vízből álló „filmréteg” és a mozgófázis szerves oldószertartalma szabja meg. A fizikailag megkötődött víznek a HILIC elválasztásnál nagy jelentősége van: ez adja azt a határfelületi réteget, amelybe a vizsgálandó komponensek beoldódnak. A leegyszerűsített kromatográfias kép alapján, minél nagyobb a vegyületek vízben mutatott oldékonysága, annál több időt töltenek ebben a határfelületi rétegben, ahol a tartózkodási idő megegyezik a vegyületek nettó retenciós idejével (Fekete 2009). Ezen felül számos másodlagos (pl. ioncsere, hidrogén vagy dipol-dipol) kölcsönhatás is szerepet játszik a megoszlás kinetikájában (Nováková et al. 2014). A HILIC olyan kromatográfias módszer,



amely kompatibilis a tömegspektrométerrel (MS), elpárologtatás utáni fényszóráson alapuló detektorral (ELSD), vagy korona kisülést felhasználó aeroszol detektorral (CAD). A nagymértékű kompatibilitás lehetővé teszi az elemezhető vegyületek számának és a detektálási módok használhatóságának kiterjesztését is. Végül, de nem utolsó sorban, mivel a nagy polaritású és ionos vegyületeknél, ahol RP oszlop használata esetén ionpárképzőt kellett a mozgófázisba tenni, a fent említett detektálási módok gyakorlatilag nem voltak használhatók, így ezeknél a vegyületeknél a HILIC mindenképp hasznos alternatíva lett (Fekete 2009).

A HILIC tehát új megoldási lehetőség a kis molekulaméretű, poláris, gyengén savas vagy bázikus, vagy disszociált ionként jelentkező vegyületek elválasztására és tömegspektrométerrel való analízisére, melyek a hagyományosan és leggyakrabban alkalmazott RP kromatográfiával nem, vagy csak nagyon gyengén visszatartathatók. Feltétel, hogy a célkomponensek mutassanak ionizációt az alkalmazott ionforrásban, és legyenek oldhatóak a jellemzően kis víztartalmú induló eluensben. Gyakran a HILIC sokkal jobb MS kompatibilitási mutatókkal rendelkezik, mint a korábban alkalmazott normál fázisú kromatográfia (Grumbach et al. 2004), ioncserélő kromatográfia vagy az ionpárképző kromatográfia, hiszen a HILIC-nél használt magas szerves oldószer arány gyakran elősegíti az ionizációt. Más megközelítésből nézve az RP elválasztásnál számos komponens elúciója a HILIC-hez képest nagyobb víztartalmú közegben történik, ahol az ionizáció határfoka eredendően kisebb.

A HILIC-et már régóta használják szénhidrátok, aminosavak, peptidok elválasztására (Zhu et al. 1991, Feste & Khan 1993, Churms 1996). A figyelem akkor vetődött igazán erre a típusú elválasztásra, mikor alkalmazhatósága szélesebb körűvé vált: használhatónak bizonyult proteomikai célokra, poláris gyógyszerhatóanyagok és azok metabolitjainak elválasztására (Strege 1998), mint ahogyan alkalmas toxinok, növényi extraktumok, valamint növényvédő szerek analízisére is (Tolstikov & Fiehn 2002, Garbis et al. 2001, Wang et al. 2007).

Sokféle HILIC töltet típust ismerünk: alapvetően mindegyik szilikagél alapú vagy monolit polimer, lehet szilikagél vagy szilika bázisú amino-, amido-, ciano-, karbamát-, diol-, polioli-, zwitter ionos szulfobetain vagy poli(2-szulfoetil-aszpartamid) csoportokkal.

Az első és egyben leggyakrabban használt HILIC állófázis típus a szilikagél, melyből három félélt különböztetünk meg (A, B, C). Az „A” előállítási mechanizmusából fakadóan



fémes szennyeződést tartalmaz, ezért nem alkalmas HILIC elválasztásra. A „B” típus már lényegesen kevesebb szennyeződést tartalmaz, akár már pH=9-ig stabil marad, és nem mutat oszlopvézést sem. A „C” típusú szilika, vagy más néven „hydride szilika”, amely Si-H csoportokat tartalmaz Si-OH helyett az ún. „hydrosilation” mechanizmus (egyfajta vizes+szerves oldószeres kondicionálás) eredményeként (Spagou et al. 2010, Hao et al. 2008). Alapvetően a kereskedelmi forgalomban elérhető „B” típusú oszlop használható HILIC elválasztásra megfelelő kondicionálás után (Jandera 2011).

A gyártók különböző technológiával gyártott szilika oszlopai eltérő megoszlási hatásokkal, kapacitással, így különböző csúcsalakkal képesek elválasztani a meghatározni kívánt komponenseket. Minden szilika felület illetve poláris porózus szerkezet a mozgófázis összetételének függvényében vízzel töltődik fel. McCalley és Neue kimérték, hogy a szilikagél pórusainak 4-13 %-a telítődik vízzel 70-95 v/v% CH₃CN-H₂O mozgófázis használatakor. Hasonló eredményt kaptak a teljesen porózus Atlantis szilikagélre és a héjszerű töltetre is (McCalley & Neue 2008).

A szilikán a retenciós mechanizmust igen sok tényező befolyásolja: elsősorban a vizes és a szerves fázis közötti megoszlás, továbbá adszorpciós és ioncserélő folyamatok is lejátszódhatnak, amelyek viszont nagyban függenek a meghatározni kívánt komponensek természetétől (Chauve et al. 2010). A HILIC mozgófázisok mindig tartalmaznak kis mennyiségű vizet (legalább 1-5 v/v%), ami lehetővé teszi a szilanol-csoportok disszociációját, másrészt injektálási oldalról nézve biztosítja a minta feloldását is, hiszen vízmentes szerves oldószerben az ionos (hidrofil) vegyületek oldódása erősen gátolt lehet. A szilanol-csoportok molekuláris formáját a mozgófázis pH-ja szabja meg: savas pH értékeken visszaszorított formában vannak. Lúgos pH értéken a szilanol csoport disszociációja megnő, ily módon a kationcserélő mechanizmus nagy szerepet játszhat a retenciós mechanizmusban.

A HILIC oszlopok következő nagy csoportját a polárisan módosított szilikagélek alkotják: a leggyakoribb módosítók a ciano-, amino-, ciklodextrin-, polietilén-glikol-, pentafluorofenilpropil-, alkil-, beágyazott amin-, karbamát- vagy egyéb más funkciós csoportok. Az ilyenfajta módosított csoportok gyakorta használatosak RP kromatográfiában is, ugyanakkor a mozgófázis szerves tartalmának növelésével kiválóan alkalmazhatók HILIC esetén is. A kémiaiilag kötött aminopropil-szilika oszlopok esetén primer aminok vannak kötve a szilanol csoportra; ez az oszlop a gyakorlatban régóta használatos pl. cukrok elválasztására, bár peptidek és karbonsavak esetén is megfelelő. A különböző gyártók által



foralmazott, elvileg azonos amino szilika oszlopok eltérő retenciós tulajdonságokat, így eltérő szelektivitást mutatnak, ugyanakkor néhány általános érvényű szabály elmondható erről az oszloptípusról. Így például savas komponensek esetén és savas közegben a korábban említett folyadék-folyadék megoszláson kívül ioncserés mechanizmus is segíti a komponensek visszatartását (Olsen 2001). Hátrányként említhető azonban, hogy mindenképp ionos mozgófázist igényel, valamint gyakori az irreverzibilis minta adszorpció és/vagy az „oszlopvézés” (Ahuj & Scypinski 2001).

Az amid oszlopok karbamoil- vagy amidcsoportokat tartalmaznak a szilika felületén. Ellentétben a szilika, vagy amin oszlopokkal az amid oszlopok nem alkalmasak a bázikus viselkedésű komponensek elválasztására és ioncserés kölcsönhatás ritkán lép fel. Előnyük, hogy nem számottevő a minta visszafordíthatatlan adszorpciója, így stabilabbak és robusztusabbak (Hemström et al. 2006), valamint nem igényelnek ion tartalmú mozgófázist sem.

Alpert használta először a poli-szukcinimiddel módosított szilikagélt, amely már kifejezetten a HILIC elválasztás céljára módosított állófázis volt. A poli-szukcinimiddel (1990) és ennek változataival módosított állófázisokat, amelyből három típust különböztetünk meg, gyakran alkalmazzák poláris vegyületek elválasztására. Az első változat a poliszulfoetil csoporttal módosított, amely erős kationcserélő tulajdonsággal rendelkezik és összetett retenciós tulajdonságot mutat, hiszen egyszerre ötvözi a HILIC és a kationcserélő retenciós mechanizmust, így kiválóan alkalmazható hidrofil peptidek elválasztására (Hartmann et al. 2003). A második a poli-hidroxi etillel módosított szilika oszlop, amely leginkább foszforilált és nem foszforilált aminosavak, peptidek, oligonukleotidok és kis molekulatömegű poláris anyagok, növényi metabolitok elválasztására alkalmas. A harmadik képviselője ennek a csoportnak a poli-glikol-komplex oszlop, amely főleg szénhidrátok és cukrok elválasztására használatos.

A diol-csoportot tartalmazó oszlopok döntő többsége mind RP, mind HILIC (Jandera & Hájek 2009) módban is használható; az elúció jellegét a mozgófázis víz és szerves oldószer aránya szabja meg (Liu & Pohl 2008). Ez az állófázis nagyon erősen poláris és akárcsak a „csupas” szilika, hidrogénkötés kialakítására képes, valamint nem tartalmaz ionizálható csoportot. Erősen savas közegben a kötött diol szubsztituensek hidrolizálnak, így ez az oszlop a pH-limitált típusokhoz tartozik.



Poli-etilén illetve cianopropil ligandumokat is gyakran alkalmaznak a HILIC elválasztáshoz: az előbbi mind RP, mind HILIC módban alkalmazható; az utóbbi az erős hidrogénkötő képessége miatt rossz visszatartást mutat erősen poláris komponensekre, így alkalmazhatósága speciális feladatokhoz kötött (Daunoravičius et al. 2006). Ciklodextrin ligandum is lehet kötve szilikagélre: a hat, hét vagy nyolc egységből álló dextrinekkal főként enantiomer-szelektív, királis elválasztás hajtható végre HILIC rendszerrel (Jandera 2011).

Számos egyéb szilika alapú oszlop van forgalomban, melyek mindegyike speciális HILIC célra alkalmas; a teljesség igénye nélkül kiemelnék párat: (a) az 1,2,4-triazol szubsztituenst tartalmazó oszlopokat HILIC módban vitaminok, peptidek, aminosavak, és más poláris szerek elválasztására használják (Ikegami et al. 2008). (b) a fluorozott szilika oszlopok aromás aminok és halogén tartalmú komponensek elválasztására alkalmasak, mint pl. egyes növényvédő szerek (főként a herbicidek) nagy százaléka (Wu et al. 2008). (c) a szénhidrát csoportot tartalmazó oszlopok is igen elterjedtek az olyan természetes vegyületek elválasztására, mint például a flavonoidok (Moni et al. 2010).

A szemcsés organikus polimerek képezik a HILIC oszlopok következő nagy csoportját: ezek mindegyike tartalmaz ionos és zwitter-ionos felületi csoportokat. Retenciós mechanizmusuk régóta ismert és a cukorkémiai preparatív rendszereknél használatos (Ikegami et al. 2008). A legjelentősebb csoportot ezen HILIC típusokon belül a poláris és ionos komponensek vizsgálata szempontjából kétségtelenül a zwitter-ionos állófázisok alkotják. Először Jiang és kutatócsoportja mutatta be a szulfon-alkilbetain állófázist, amellyel HILIC elvű elválasztást hajtottak végre szervesen sókra, kis molekulatömegű szerves és szervesen molekulákra és egyes fehérjékre (2006). Mivel az aktív réteget alkotó erősen savas szulfonsav részletet és az erősen bázikus kvaterner ammónium vegyületeket 1:1 mól arányban, széles pórusú szilikára rögzítik, ez az oszloptípus egy injektáláson belül képes elválasztani mind a kationos, mind az anionos vegyületeket (Guo 2005). A szulfon-alkilbetain „zic-HILIC” oszlop erősen köti a vizet hidrogén- és dipol-dipol kötésekkel. Az ilyen típusú oszlopokon a retenciós tulajdonságok erősen pH-függőek: pH=3 esetében erősen kationos jellegű vegyületekre, míg pH=7-8 között többszörösen töltött molekulák vizsgálatára használható jól (Boersema et al. 2008).

Egyre gyakrabban jelennek meg az oszlopgyártók kevert mechanizmusú oszlopokkal is, mint pl. a SIELC által gyártott „Obelisc” típus. Ezek az új innovációs fejlesztésű állófázisok voltak az első kereskedelmi forgalomban elérhető „Liquid Separation Cell” elven



működő oszlopok. A kevert mód megvalósítása „Obelisc R” oszlop esetén úgy történik, hogy a szilika felületéhez közel egy anioncserélő csoport van kötve, amelyet egy hosszú hidrofób lánc köt össze és választ el egy kationcserélő csoporttól (Lamouroux et al. 2011).

A monolit oszlopok különálló csoportját képezik a HILIC típusú oszlopoknak. Jellemző általános tulajdonságuk, hogy segítségével gyors kromatográfia valósítható meg. Két jelentős csoportra oszthatók: a makropórusos szilika típusúra illetve a porózus monolitikus organikus polimer típusúra. A monolit oszloptípus hátránya, hogy meglehetősen kis retenciót mutat kis molekulatömegű komponensek elválasztásánál (Nischang et al. 2010).

Az állófázisok tárgyalása után rátérnek a HILIC rendszerben általában használatos mozgófázisokra. Mivel folyadék-folyadék megoszlásról van szó, amely hidrogénkötésekkel, dipol-dipol és anionos-kationos kölcsönhatással egészül ki, a mozgófázis legerősebb eluense a víz, illetve az ammónium-formiátot vagy ammónium-acetátot tartalmazó puffer (10-100 mM). A „gyengébb” eluens jellemzően IPA, CH₃OH, CH₃CN, 5-95 v/v%-ban. Itt érdemes megjegyezni, hogy MS kapcsolásnál inkább CH₃CN a preferált eluens, ez biztosítja a felsorolt három közül a legstabilabb nyomást gradiens elúció esetén is. A szerves oldószer kiválasztása erős hatást gyakorol a visszatartásra HILIC módban. Az elúciós erősség a következőképpen növekszik: CH₃OH > etanol > IPA > tetrahidrofurán > CH₃CN. Mindez a polaritással fordított arányban áll, ami a proton-donor / proton-akceptor kölcsönhatás kialakítási képességgel magyarázható (Quiming et al. 2007). A CH₃CN a leginkább használatos eluens, mert szinte semmilyen kölcsönhatásba nem lép a felületen kötött poláris vízzel, ellentétben a CH₃OH-val, amely erős hidrogén kötés kialakítására képes. Az álló és a mozgófázis minősége mellett a kromatográfias szelektivitást, csúcshélességet, valamint a csúcshimetriát (tailing-gel illetve fronting-gal való eluálódást) a pH, a hőmérséklet, és a minta hígítására használt oldószer is befolyásolja. A hőmérséklet módosításának hatása alapvetően eltöprel a jól megválasztott oldószer befolyása mellett. Ugyanakkor szignifikáns szelektivitásbeli változást eredményezhet a hőmérséklet változtatása olyan vegyületek esetén, amelyek részlegesen ionizálhatók, különböző hidrodinamikai méretet vagy formát (azaz konfigurációt) vehetnek fel ill. bázikus hidrogén kötés kialakítására alkalmasak (Jandera 2011).

Mint általánosságban a kromatográfias módszereknél, itt is elmondható, hogy az injektálási térfogat legfeljebb akkora lehet, amekkora még nem rontja az eluálódó komponens csúcsalakját (1,5-3%-a az oszloptérfogatnak). A minta hígítására használt oldószer összetétel



a nagy molekulánál (pl. fehérjék) kevésbé, a kis molekulatömegű vegyületeknél (pl. peszticidek) viszont jobban befolyásolja az elúciós viszonyokat. Nem jól definiálható csúcsalakot vagy akár gyengébb retenciót is eredményezhet, ha a minta teljes mértékben a vizes fázisban van oldva (Nováková et al. 2014). Ugyanígy a pH-nak is igen fontos szerepe van a HILIC elválasztásra szánt minta hígításánál különösen azon komponenseknél, amelyek különböző ionos formákat vehetnek fel: így viselkednek például a kvaterner ammónium sók, melyek gyakorta használatos herbicidek (Acedo-Valenzuela et al. 2004).

2.4.4. SFC

Klesper és munkatársai 1962-ben írták le először az akkor még „magasnyomású kromatográfiának” nevezett SFC rendszert, amelyben magas hőmérsékletű és nyomású, sűrűsége alapján folyadéknak tekinthető gázt használtak mozgófázisként. A szuperkritikus folyadék kromatográfia hajnalán szénhidrogéneket, H₂-t, NH₃-t, N₂-t használtak elválasztásra, azonban napjainkban szinte kizárólag a CO₂ vált használatos eluenssé, annak köszönhetően, hogy nem gyúlékony, nem toxikus, olcsó, továbbá könnyen szuperkritikus állapotba juttatható. Alacsony a kritikus hőmérséklete (31,1 °C) és viszonylag alacsony a kritikus nyomása (73,8 bar (25 °C)) (Karayannis et al. 1968). Az első SFC berendezések csupán CO₂-ot tudtak használni eluensként, míg az új generációs SFC rendszerek már módosító szerves oldószerek bekeverését is lehetővé teszik a CO₂-ba, ami megváltoztatja a polaritási viszonyokat. Ilyen szerves módosítóként szolgálhat a hexán CH₃CN<IPA <etanol<CH₃OH (erősségi sorrendben), melyek növelik/változtatják a CO₂ polaritását, és így a használt állófázis minőségének függvényében az injektált komponensek retencióját. Jentoft és Gouw (1970) újításainak köszönhetően az SFC-ben nyomás gradienst is lehet alkalmazni az elválasztás időtartalma alatt, amely a GC-hőmérséklet ill. HPLC-oldószer gradiensének felel meg, ugyanis magasabb nyomáson a CO₂ szolvatációs képessége nő. Újabb fontos felfedezés volt a nyomás szabályozó egység (Sugiyama et al. 1985), aminek köszönhetően a mai új generációs készülékekkel már precízen lehet szabályozni a nyomást, így reprodukálható analitikai eredményt kaphatunk.

A kezdeti SFC technika eleinte nyitott csöves és töltött oszlopokat használt (Saito 2012). Manapság szinte az összes RP, NP és királis LC kromatográfiában használatos analitikai oszlop kompatibilis a modern SFC rendszerekkel, akár az 1,7 µm szemcseméretű oszlopok is. AZ új generációs berendezéseknél a leggyakrabban használt oszlopok a következők: BEH (Lin et al. 2015), HSS C₁₈ SB (Li et al. 2015), BEH 2-EP (Zhao et al.



2015), és speciális királis oszlopok (Chen et al. 2014). Általános alapszabály az SFC célra használt oszlopok esetén, hogy tilos vizes eluent juttatni a rendszerbe vagy víztartalmú mintát injektálni, mert az megváltoztatja a CO₂ fluidizációs paramétereit. A szerves oldószerek adagolásánál is figyelni kell arra, hogy a CO₂-hoz viszonyított arányuk ne legyen több mint 30%, illetve a hőmérséklet és a nyomás viszonyok úgy legyenek megválasztva, hogy a CO₂ ne kerüljön ki a fluid állapotából, illetve ha mégis, kézből tudjuk tartani a rendszerben lévő komponensek gáz fázisban mutatott viselkedését. A hőmérséklet szabályozása az általános HILIC rendszerekkel ellentétben itt kulcsfontosságú, hiszen a hőmérséklet határozza meg a CO₂ szuperkritikus voltát illetve annak sűrűségét. Alapvetően elmondható, hogy minél nagyobb a hőmérséklet, annál kisebb lesz a CO₂ sűrűsége, és annál később fognak eluálódni a komponensek az oszlopról, függetlenül az állófázis minőségétől. Ezzel ellentétben alacsonyabb hőmérsékleten és nyomáson, de még szuperkritikus körülmények között a hőmérséklet csökkentésével a CO₂ sűrűsége nő, így ugyanazon komponensek hamarabb fognak eluálódni az állófázisról (Tailor 2009).

2.4.5. Kapcsolt rendszerek és azok fejlődése a peszticid analitikában

Mint ahogyan minden szercsoport analitikájában, ahol olyan nagyfokú szerkezeti és polaritásbeli diverzitás van, mint a növényvédő szerek esetén, megfigyelhető az analitikai mérési módszerek széles palettája és azok egymás melletti, kompetitív vagy egyedi fejlődése. Ide sorolhatók a manapság leggyakrabban használt kromatográfiai eljárások, az LC és a GC után csatolt különböző detektálási megoldások, melyek közül napjainkra az egyik legfontosabbá az MS detektálás vált (Alder et al. 2006). A korábban elterjedt műszeregyüttesek és technikák (vékonyréteg kromatográfia, ELISA alapú technikák, elektroanalitikai módszerek) peszticid analitikai területen megfigyelhető visszavonulásának okát a növényvédő szer rutin analitikai trendek között és az új elvárásoknak való megfelelésben kell keresni, viszont ennek megértéséhez érdemes átnézni ezen terület fejlődési vonalát. A növényvédő szer analitika hajnalán az 1960-70-es években a piacon lévő hatóanyagok száma tízes nagyságrendű volt, az egyetlen és megfelelő hatékonyságú analitikai módszer pedig gázkromatográfia az olyan detektorokkal, mint pl. NPD, ECD, FPD, és a FID. Mint ahogy a detektálási lehetőségekből látszik, korlátozott volt a detektálható komponensek köre: csak meghatározott funkciós csoporttal rendelkező vegyületek szerepelhettek célkomponensként, amelyek számottevő bomlás nélkül általában



származékképzéssel illékonyá tehetőek voltak. Ezek a feltételek meglehetősen korlátozták az egy időben mérhető komponensek számát.

Kezdetekben a gázkromatográfiai rendszerek szinte egyeduralkodónak számítottak peszticid analitikában, részben a GC kompatibilis detektorok folyadékkromatográfiai kapcsolásaiban rejlő kihívások miatt (pl. részecske nyaláb összekötő elem). A folyadékkromatográfiára, mint elválasztástechnikai platformra való igényt többek közt a rohamosan fejlődő növényvédő szer szintézis ipar hívta életre. Megjelentek a piacon a polárisabb, a növények és állatok anyagcsere útvonalaiiban fellelhető és/vagy azokhoz hasonló vegyületek, melyek már nem voltak illékonyá tehetőek, így a folyadékkromatográfia és az SFC az 1980-as évek második felétől szerepet kapott a növényvédő szer analitikában. A kezdetekben az LC rendszerek UV-VIS illetve fluoreszcens detektorral voltak felszerelve (Hunter 1985), míg a valódi multi-komponenses meghatározások csak a tömegspektrométerek (MS, MS/MS, TOF-MS) megjelenésével indultak igazi fejlődésnek. A növényvédő szerek számának növekedésével megjelent az igény arra, hogy minden peszticidet minden mintából egy módszerrel lehessen mérni, ám a növényvédő szerek kémiai sokszínűségéből adódóan ez gyakorlatban nem lehetséges. A sokszínűség mértéke még a mai napig is kihívás, és feladatot jelent a kapcsolt rendszerekre módszereket fejlesztők számára, hasonlóan a mintaelőkészítési oldalon megfigyelhető diverzitás okozta problémákhoz.

2.5. A kromatográfiai módszerek gyakorlati alkalmazása a peszticid analitikában

2.5.1. (RP) LC-MS

A legszélesebb körben alkalmazott kromatográfiai elválasztás és nagyműszeres analitikai kapcsolások egyike. Ennek peszticid analitikai oldalról nézve az a fő oka, hogy a korábban a 2.2. fejezetben ismertetett szabványos vagy validált módszerekkel történő mintaelőkészítéssel kinyerhető növényvédő szerek megfelelő eluens (leggyakrabban H₂O és CH₃CN) alkalmazása esetén jól elválaszthatók. A leggyakrabban alkalmazott állófázisok a C₁₈ ill. a C₈, amelyeken lineáris felfutású gradiens elúciót alkalmaznak az elválasztás megvalósítására. A detektálás a rutin laborok szintjén történhet MS/MS hármas quadrupól készüléken (MRM vagy SRM alapú azonosítás), és Q-TOF rendszerben (ez utóbbira már



validált módszer is elérhető az EURL peszticid honlapján (Internet 6)) illetve kutató laboratóriumban Hybrid Orbitrap műszerezettséggel (Stachniuk & Fornal 2015).

2.5.2. Ionok elválasztására alkalmas kromatográfia alkalmazása

Az első feljegyzés, amelyben ionpároképző kromatográfiát használtak peszticid analitikai célokra, 1985-re datálható, amikor Hunter összehasonlító tanulmányában RP és NP kromatográfiával csatolt UV ill. fluoreszcens detektálással mutatott ki néhány növényvédő szermaradványt állati szövetekből. Dugay és Hennion hasonló ionpároképző IP-RP UV összeállítással határozott meg mennyiségileg aminotriazol ivóvízből (1995). Oh és munkatársai 2014-ben direkt, közvetlen injektálásos on-line tisztítással megvalósított IP-RP-HPLC-MS/MS módszerrel mutattak ki dikvátot és parakvátot víz mintából. Található olyan módszert is az irodalomban, mely kationcserés mintatisztítási és elődúsítási lépést követően IP-ESI-MS/MS detektálással valósítja meg a parakvát és dikvát mennyiségi meghatározását (Nagatomi et al. 2013).

A poláris peszticidek között nem kis számban képviseltetik magukat azok, amelyek só formái oldódást követően anion és kation formában vannak jelen, vagy a megfelelő pH érték megválasztásával könnyen ionos formára alakíthatók (ld. 3. táblázat). A glifozát és annak AMPA származéka anioncserés kromatográfiával elválaszthatók a mátrixtól, viszont ez olyan puffert igényel, amely nem feltétlenül kompatibilis az MS rendszerekkel (pl. foszfát puffer). García De Llasera és munkatársai (2005) glifozát és AMPA mennyiségi meghatározására alkalmas SAXC-HPLC módszert fejlesztettek fluoreszcens detektálással NaH_2PO_4 tartalmú eluenssel. Léteznek ugyanakkor speciális erős anioncserés HPLC oszlopok, melyek MS kompatibilis illékony puffer (pl. ammónium-formiát) eluenst használnak, és megfelelő elválasztást biztosítanak (ld. QuPpe 8.1: 1.1 és 1.2 módszer; 4. táblázat). Abdulah és munkatársai (1995) szintén képesek voltak anioncserés kromatográfiát követően az AMPA-t és glifozátot meghatározni MS detektorral.

Popp és munkatársai 2008-ban AMPA és glifozát szermaradványok mennyiségi meghatározását anioncserés kromatográfiával csatolt induktív plazma tömegspektrométerrel (HPLC-ICP-MS) hajtották végre, felhasználva az ICP-MS foszfor szelektív mérésre is alkalmas tulajdonságát, $\mu\text{g L}^{-1}$ koncentráció tartományban.

A már korábban (2.3.2. fejezet) ismertetett EN 15055:2006 szabvány Startin, Hau és Evans kutatócsoportjainak munkásságán alapszik, akik SCXC-HPLC-ESI-MS/MS módszert fejlesztettek klórmekvát kationra. A módszert sikeresen alkalmazták körte mintára deuterált



belső sztenderd nélkül, és körte, körte lé, gyümölcs püré és gabona termékekre pedig deuterált belső sztenderdekkel a mennyiségi analízishez. A módszert a szerzők később kibővítették mepiqat meghatározással is (Startin et al. 1999, Hau et al. 2000 és Evans et al. 2000). Érdekes, hogy a szakirodalom erre a két alkotóra csak két SCXC-HPLC-ESI-MS alapú tanulmányt említ, feltehetően az EN módszer széles körű elterjedése és szabványos volta miatt (Yu et al. 2010, vízminta; és Tian 2011, gyümölcsök). Kiemelendő, hogy ebben a két cikkben a szerzők tagadhatatlanul egyre jobb analitikai teljesítmény-jellemzőket (alacsonyabb LOD, LOQ stb.) tudtak elérni, köszönhetően az időközben fejlődő analitikai megoldásoknak.

Mivel a dikvát és parakvát is ionos formában van jelen vizes közegben, így azok ioncserés kromatográfiával történő meghatározására is találunk példát az irodalomban. Kambhampati és kutatócsoportja 1994-ben olyan SAXC kromatográfiával működő kapcsolt módszert valósított meg, ahol a hagyományos EI-MS detektort részecske nyaláb kapcsolóelemmel kötötte össze. Itagaki és munkatársai kationcserélő szilika oszlopon (pH=3) valósította meg a dikvát és parakvát elválasztását UV detektálással kombinálva (1997). Érdeemes megemlíteni, hogy nemcsak elúciós állófázisként, hanem DPX mintatisztítási és elődúsítási lépésként is használnak SCXC tölteteket (Suzuki & Kaneko 2009).

2.5.3. HILIC-MS

A HILIC technika sok évtizedes múltja ellenére a peszticid analitikában viszonylag későn került sorra az első HILIC-re épített analízis. A szakirodalom szerint Guo és Gaiki 2005-ben publikált közleményei tekinthetők ezen a téren úttörőnek: a szerzők klórmekvát és parakvát elválasztásánál alkalmazták a technikát és ugyanezen komponensek RP alapú vizsgálatához viszonyítva 75-szörös érzékenységnövekedést tudtak elérni. Az időben következő közlemény Wang és csoportja nevéhez fűződik, akik klórmekvát és mepikvát analízisét hajtották végre paradicsomból és paradicsom alapú feldolgozott termékekből. A szerzők tanulmányukban UPLC-HILIC-ESI-MS/MS rendszerrel dolgoztak (Wang et al. 2007). Hayama és munkatársai 2008-ban publikálták HILIC-ESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel végzett kísérletüket, mely során vízmintákból szerves foszfonsav tartalmú növényvédő szereket (acefát, metamidofos, monokrotofos, ometoát, *oxidemeton*-metil, és vamidotion) tudtak kimutatni. Egy magyar kutatócsoport 2010-ben paradicsom mintából határozta meg a propilén tioureát és annak bomlástermékeit HILIC-ESI-MS segítségével



(Tölgyesi et al. 2010). Jiang és munkatársai ugyancsak HILIC-ESI-MS/MS rendszert használtak glifozát és AMPA szimultán meghatározásához rizs mintából (2012).

Egy évvel később (2013) jelent meg az első olyan publikáció, amely a HILIC (diol) kromatográfiát ötvözte a klasszikus RP (C_{18}) elválasztással. Kittlaus és munkatársai kétdimenziós kromatográfiát valósítottak meg szabályozott elúciós profillal; ők voltak képesek elsőként uborka, citrom, fehérliszt és fekete tea minták esetén rutin módszerükbe a mérendő 300 növényvédő szermaradvány mellé poláris komponenseket beilleszteni. Zhou és munkatársai (2013) etiléntiokarbamid gyors és egyszerű meghatározását fejlesztették ki zic-HILIC-MS/MS összeállításra. Hengel és munkatársai morfolin mennyiségi meghatározására alkalmas HILIC-ESI-MS/MS módszert dolgoztak ki alma és citrus mátrixra (2014). A következő évben Gao és munkatársai multi-komponenses HILIC-ESI-MS/MS módszert fejlesztettek klórmekvát és mepikvát analízisére barack és burgonya mintákból, szokatlan módon nem QuPPE, hanem egy továbbfejlesztett és módosított QuEChERS mintaelőkészítésre alapozva (2015).

Mint ahogy az itt felsorolt példákön látszik, számtalan poláris növényvédő szer meghatározására alkalmas HILIC módszer látott napvilágot az elmúlt évtizedben. Napjainkra a HILIC kromatográfiával működő élelmiszer-analitikai módszerek száma jelentősen megnőtt, köszönhetően az egyre inkább minden élelmiszer-analitikai laboratórium alapberendezésévé váló tömegspektrométereknek illetve azok ionforrásaival való kompatibilitásnak (Bernal et al. 2011). Ugyanakkor az is szembeötlő, hogy ezek a fent említett módszerek különböző eluensek és állófázisok használatát követelik meg a rutin analitikai laboratóriumoktól (4. táblázat). Indokolt lenne egy olyan hiánypótló kutatás, ahol a felsorolt analitikai módszerekben használt állófázisok górcső alá kerülnek és akár egy analitikai összeállítással mérhetővé válhatna a korábban említett komponensek mindegyike (3. táblázat).

2.5.4. SFC használata a peszticid analitikában

Elsőként Wheeler és McNally tettek kísérletet 1987-ben az SFC előnyeinek és hátrányainak bemutatására az akkoriban herbicidekre használatos GC-MS és HPLC-UV módszerek kiváltásának reményében. A hőlabilis poláris komponensek ugyanis jellemzően rosszul voltak elválaszthatók RP-HPLC technikával és ugyancsak nehezen mérhetők GC berendezéssel: egyrészt a használt és az elválasztás kivitelezéséhez szükséges poláris



módosító alkalmazása kedvezőtlen mátrixhatást okozott, másrészt a GC használatával magával értetődően együtt járó magas hőmérséklet kedvezőtlenül magas kimutatási határt tett lehetővé. Wheeler és McNally voltak az elsők, akik valós mátrixot felhasználva a HPLC elválasztást hasonlították össze az SFC rendszerrel az akkoriban kereskedelmileg hozzáférhető töltött oszlopot illetve kapilláris oszlopot használva. Az eredményeik azt mutatták, hogy mindkét módszer esetén gyorsabb analízis idő, alacsonyabb kimutatási határ és jobb injektálási ismételhetőség volt elérhető a töltött oszloppal a kapilláris oszlophoz képest. Ugyanakkor az összehasonlított rendszerek linearitása nem volt szignifikánsan különböző.

Hawthorne és Miller (1988) először valósítottak meg kapilláris SFC-CI-MS csatolást fűtött kapcsolóelem nélkül úgy, hogy a kémiai ionizációs ionforrással ellátott tömegspektrométeren semmilyen átalakítást nem kellett alkalmazniuk. Megfelelő kromatográfiás csúcsalakkal és érzékenységgel sikerült elválasztaniuk és detektálniuk egy triazine peszticid metabolitot, az abietinsavat, és nagy molekulatömegű policiklikus aromás szénhidrogéneket. Módszerüket felhasználva sorra jelentek meg az újabb SFC-MS kapcsolásra épített eljárások, mint pl. a Murugaverl és munkatársainak közleményében bemutatott SFC-EI-MS rendszer, ugyancsak kapcsolóelem nélkül (1993). Kalinoski és Smith (1988) olyan SFC-MS elválasztást valósított meg foszfortartalmú inszekticidekre nagy térfogatáram kezelésére alkalmas kapcsolóelemmel, ahol „microbore” HPLC oszlopot nyomás gradienssel használtak az elválasztásra. A szerzőknek elsőként sikerült SFC technikával ng mL^{-1} koncentrációtartományban detektálni a szermaradékokat.

Számos egyéb detektorral történő kapcsolást sikerült már a szakirodalom szerint megvalósítani SFC-vel. Hőlabilis, szerves foszforsav tartalmú növényvédő szer meghatározás zajlott le már SFC-ECD és SFC-SCD összeállítással (Chang & Taylor 1990). Berger 1995-ben öt peszticid analitikájához szimultán detektálást valósított meg SFC-UV, NPD és ECD kapcsolással. A szerző három detektor együttes használatával volt képes mennyiségileg meghatározni a célkomponenseket ppb koncentrációban. Tarver és Hill 1992-ben megoldást akart találni az SFC-ECD egyik nagy gyengeségére, a nyomás gradiens használata esetén fellépő alapvonal emelkedésre. Tanulmányukban sikerrel valósították meg az SFC ion mobilitás detektorral történő csatolását klórozott policiklikus vegyületekre és poliklórozott bifenilekre. Bár klórtartalmú fungicid esetén nem tapasztaltak alapvonal emelkedést, a rendszer nem bizonyult elég robusztusnak, ezért nem is vált általánosan elterjedt módszerré.



Ugyancsak ebben az évben Olson és Caruso (1992) érdekes csatolással álltak elő heteroatomot tartalmazó peszticidekre: a méréshez elem szelektív tömegspektrométert használtak (SFC-MIP-MS) detektorként, ami instabil rendszernek bizonyult, a speciális, nem kézben tartható kapcsolóelem miatt.

Az első lágy ionizációs kapcsolást SFC rendszerhez peszticid analitikai célokra Zegers és munkatársai írták le 1995-ben. Fotoionizációs detektort használtak úgy, hogy CO₂-hoz CH₃OH módosítót keverték, így téve alkalmassá a pg mennyiségű növényvédő szerek analitikájára. A tanulmányban összehasonlították a GC-PID és SFC-PID rendszereket a növényvédő szerek mellett más alkotókat is vizsgálva, és az SFC csatolást alkalmasabbnak találták a növényvédő szerek tekintetében. A szakirodalom ettől a közleménytől kezdve említi poláris módosítóként a CH₃OH-t a CO₂-hoz 5-10%-ban adagolva. Strode és Taylor (1996) növényvédő szerek on-line csatolt, szilárd fázisú extrakciót követő szimultán meghatározását publikálta SFC-ECD rendszerben CH₃OH módosító használatával. Bernal és kutatócsoportja 1996-ban SFC-DAD-ECD segítségével CH₃OH módosító oldószerrel dolgozott a szermaradványok elválasztása során. Szintén CH₃OH-t használt koszolvensként Shi és kutatócsoportja 1997-ben: közleményük szerint hét napon keresztül tesztelték sikeresen SFC-SCD rendszerük stabilitását peszticid analitikai célokra s végezetül kellően robusztusnak találták azt. Pyo és munkatársai (1997) SFC-FID-UV kapcsolással gazdagította az SFC peszticid analitikai felhasználásának eszköztárát. Időközben megjelentek az egyéb polaritás módosító szerek is, mint pl. a CH₃CN: Bicchi munkacsoportja 1996-ban C₁₈ oszlopon választott el kitin bioszintézist gátló inszekticideket SFC-UV rendszerben CH₃CN módosítót használva.

Ez idő tájt ugyan peszticid analitika területén még nem, de a szakirodalomban már megjelent az SFC tömegspektrométerrel történő csatolása egyéb, nem peszticid célkomponensek vizsgálatára (SFC-API-MS; Li & Hsieh, 2008). Voorhees és munkatársai 1998-ban szuperkritikus fluid extrakciót kombináltak SFC-MS rendszerrel állati szövetek peszticid analitikai mérésére. Akkoriban ez az összeállítás nem volt stabilnak tekinthető, mivel mindössze a mérési idő 53%-ban tudott folyamatosan és reprodukálhatóan működni. El-Saeid 2003-ban SFE mintaelőkészítést követő SFC-UV on-line kapcsolt rendszerrel elemezte konzervek, fagyasztott ill. friss zöldségek és gyümölcsök peszticid tartalmát, CH₃OH módosító használatával. Ishibashi csoportja(2012) volt az első, aki felvetették az LC-MS és GC-MS kompatibilis növényvédő szerek egy kromatogramon belüli vizsgálatának



kérdését: SFC-ESI-MS/MS módszerrel kísérelték meg 17, széles $pK_{o/w}$ (4,6-7,05) tartományba tartozó szermaradvány analízisét $ng\ mL^{-1}$ koncentrációban. Ugyancsak Ishibashi csoportja (2015) fejlesztett multi-komponens peszticid analitikai eljárást 444 célkomponens mennyiségi és minőségi meghatározására SFC és nagy teljesítményű quadropol-Orbitrap MS rendszer kapcsolásával, amely 24 óra alatt 72 minta analízisére bizonyult alkalmasnak. Az analízis idő mindössze 45 percrek adódott, mintánként $10\ \mu g\ kg^{-1}$ kimutatási határral, mindezt valódi minta mérésével igazolva: spenót mintából 373 adalékolt szermaradványt voltak képesek detektálni.

2.6. Metabolomikai megközelítés a peszticid analitikában

A metabolomika, az elsődleges és/vagy másodlagos anyagcseretermékek vizsgálatával foglalkozó, napjainkban egyre rohamosan fejlődő tudományág tipikus analitikai mérettartománya 1,5-2 kDa alatti. A metabolomika célja egy biológia rendszer egy adott pillanatában a rendszerben jelen lévő „összes” vegyület (metabolit) egyidejű meghatározása, amennyiben lehetséges akár azonosítása is, ezáltal anyagcsere-útvonalak felfedezése, biomarkerek keresése, biokémiai folyamatok megismerése és anyagcseretermékek fluxusának megfigyelése. A metabolit analitika lehet célzott vagy nem célzott. Célzott metabolit kutatásnál egy vagy több célkomponens pontos tömegére keresünk rá szakirodalmi adatok, vagy prediktív keresés alapján, ez utóbbi lehet például egy ismert lebontó vagy felépítő folyamat reakciósorozatába illesztett, feltételezett anyagcseretermék (León et al. 2016). Napjainkban ugyanakkor előtérbe kerültek a nem célzott peszticid metabolit keresési eljárások is (Da Rosa et al. 2012, Lénárt et al. 2013).

2.6.1. Növényvédő szerek: transzlokáció, metabolizáció, degradáció

A növényvédő szereket transzlokációs szempontból három nagy csoportra oszthatjuk: a kontakt, a felszívódó és az episzisztémikus szerekre. Az episzisztémikus szerek metszetet képeznek a két csoport között és az is előfordulhat, hogy egy kontakt szisztémikus szer pl. gombákra nézve nem szisztémikus. A felszívódó szer egy adott növény esetén azt jelenti, hogy a szer felszívódik, de a növényi nedvkeringésbe nem kerül bele. A kontakt szer nem vesz részt a felépítő vagy lebontó folyamatokban, és degradációját ill. annak mértékét csupán a külső környezeti tényezők határozzák meg. Ilyen lehet a hőbomlás vagy akár a fény hatására végbemenő fotodegradáció; ez utóbbinak a mértéke az adott növényvédő szer



szerkezetétől, illetve a fénynek való kitettség időtartamától is függ. Szinte minden növényvédő szer, amely tartalmaz nem gyűrűs formában delokalizált elektronrendszert, fotokémiaiailag instabilnak tekinthető. A bomlást elősegítő külső tényező lehet a pH is: egy adott szer formálási segédanyaga megfelelő pH értékre van pufferelve, viszont a behatási idő elteltével a puffereltség megszűnik, a hatóanyag bomlásnak indul (Lüttge & Higinbotham 1979). A korábban említett második nagy csoport, a felszívódó szerek esetén a célszervezetek (növények, gombák, mikroorganizmusok) lebontó folyamatai során a növényvédő szerek rendkívül sok reakció úton mennek végig, melynek következtében sokszor nem is ismertek a különböző metabolitok, így azokra sem sztenderd, sem toxicitási mutatók, ebből fakadóan pedig határértékek sincsenek. Kivételt képez pár, napjainkra már jól definiált anyamolekulából keletkező metabolit, melyek többsége már sztenderd formában is elérhető, mint például az ometoát + dimetoát esete, ahol a két szermaradvány koncentrációjának összegére van felállítva MRL határérték zöldségek és gyümölcsök esetén (Internet 7.).

A peszticidek metabolizmusa három fázisra osztható, amelyeket az 5. táblázat foglal össze a fázisokban végbemenő folyamatokkal, illetve az azokhoz tartozó oldhatóságban, toxikológiai mobilitásban, illetve biológia hozzáférhetőségben bekövetkezett változásokkal együtt. Az I. fázisú reakciókban az alapmolekula egy vagy több, főként oxidációs, redukciós, illetve hidrolízis folyamaton esik át, mely reakció(k) terméke egy polárisabb, vízben jobban oldódó és általában kevésbé toxikus bomlástermék. Az I. fázisú reakciók leggyakrabban lejátszódó fajtája az oxidáció, melyek általában valamilyen enzim (leggyakrabban CYP monooxygenáz, peroxidázok és polifenol oxidázok) hatására mennek végbe. II. fázisú reakcióban az alapmolekula vagy egy I. fázisú reakcióban keletkezett bomlástermék vesz részt, és annak egy poláris molekulával (általában valamilyen cukor, aminosav vagy glutation) történő konjugációja zajlik le. Az így keletkezett bomlástermék polaritása tovább nő, ezzel párhuzamosan fitotoxicitása lényegében megszűnik, továbbá biológiai hozzáférhetősége csökken. Az ilyen típusú reakciók fontos enzimei például a glükóz-transzferázok, leggyakoribb cukordonorként pedig az uridin-difoszfoglükóz szerepel. A III. fázisú reakciónak a másodlagos konjugációs reakciókat nevezik, mely során egy II. fázisú bomlástermék további konjugációs reakcióban vesz részt, és egy újabb cukor, aminosav, vagy pedig almasav kapcsolódik a molekulára (Van Eerd et al. 2003). Ez igen gyakori folyamat nagy cukortartalmú élelmi növények esetében, mint pl. a paradicsom, ahogy azt Frear és munkatársai (1989) leírták korábban a metribuzin esetén. Az ilyenkor fellépő



probléma az, hogy ezáltal az eredetileg szisztemikus szer akár felvehetővé is válhat a magasabb rendű élőlények számára is, így újra kell értékelni annak toxicitását is.

5. táblázat: Peszticid metabolizmus három fő fázisa (Shimabukuro 1985)

Karakterisztika	Kezdeti tulajdonságok	I. Fázis	II. Fázis	III. Fázis
reakciók	anya molekula	oxidáció, hidrolízis, redukció	konjugáció	másodlagos konjugáció vagy beépülés biopolimerekbe
oldódás	lipofil	amfofil	hidrofil	hidrofil vagy oldhatatlan
fitotoxicitás (herbicid)	toxikus	módosított vagy kisebb toxicitás	jelentősen csökkentett vagy nem toxikus	nem toxikus
mobilitás	szelektív hatás	módosított /csökkentett	limitált vagy helyhez kötött	helyhez kötött
biológiai hozzáférhetőség a célorganizmus számára	teljes abszorpció magasabb rendű élőlényekben	teljes abszorpció	kisebb mértékű abszorpció	limitált abszorpció vagy nem hozzáférhető

Ez a kép napjainkban kissé árnyaltabbá vált, tekintve hogy a növényvédő szer ipar egyre inkább törekszik a prezeisztensebb szerek (rövidebb hatóidővel rendelkező) előállítására, amelyek, ezzel egyensúlyban, jobb felszívódási tulajdonsággal rendelkeznek az élő célorganizmus elleni védelmet tekintve. A hidrofil tulajdonságot részben ellensúlyozva viszont heteroatomokat (főként Cl és újabban F) tartalmaznak a molekulák, így magasabb rendű élőlények számára kevésbé legyenek hozzáférhetőek (ne tudjanak a bontó enzimek aktív centrumához kapcsolódni), és egyéb fizikai behatások is elegendőek legyenek a bontásukhoz (pl.: fotodegradáció). (Krämer & Schirmer 2008). A heteroatomok jelenléte a szermaradványban az analitikus feladatát is megkönnyíti metabolomikai kutatás során, hiszen a nagyobb molekulatömeg vizsgálata mindig pontosabb, Cl-tartalom esetén pedig a jellegzetes Cl izotóp mintázat mind az anya, mind a metabolit molekulák vizsgálatánál jó azonosítási, megerősítési támpont lehet.

2.6.2. Növényvédő szerek és azok metabolitjainak jogi szabályozása

A növényvédő szerek felhasználása egyre nagyobb volumenű. Hatásuk az intenzív mezőgazdasági termelés biztosítása mellett a környezetre nézve is igen jelentős, melyek a következők lehetnek: élelmiszer-szennyezés, rezisztens fajok számának növekedése, házi- és vadállatok mérgezése, a természetes élővilág egyensúlyi zavara, a mérgező anyagok felhalmozódása (bio-akkumuláció és bio-amplifikáció a táplálékláncban). Az emberre nézve



veszélyt a növényvédő szerek közvetlen szennyeződés (bőrkontaktus, belélegzés, lenyelés) vagy szennyezett élelmiszereken keresztül, közvetett úton jelenthetnek. A növényvédő szerek piacra kerülésének engedélyezését szigorú ellenőrző vizsgálatok előzik meg, mely alapján előírják és meghatározzák az alkalmazható mennyiséget, a munkavédelmi és egészségügyi várakozási időt, valamint a maradékanyagok maximális határértékeit. Magyarországon 2004. május 1-től, az Európai Unióhoz való csatlakozástól kezdve, az addig érvényben lévő EÜM rendeletet, amely a növényvédő szerek megengedhető maximális értékéről szolt (Jogszabály 2), felváltotta az EU-ban 1991 óta hatályban lévő rendelet (EUR-Lex - 31991L0414 - EN - EUR-Lex, 1991) (Jogszabály 3). Ez utóbbi rendelet meghatározza a peszticid és a maradvány definícióját is. A peszticidek olyan „hatóanyagok és készítmények, amelyek egy vagy több hatóanyagot tartalmaznak olyan formában, ahogy a felhasználóhoz eljutnak”. Az Európai Unió szabályozás alatt tartja a peszticidek felhasználását, ezáltal minden tagállam ugyanazokat a bírálati és engedélyezési eljárásokat használja a növényvédő szerek piacra kerülése során. A peszticidekre vonatkozó kockázatbecslések elkészítése és az Európai Tanács döntéshozatali folyamataihoz szükséges tudományos háttér biztosítása az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA) feladata. A növényvédő szerek veszélyességét fogyasztói szempontból az Európai Tanács által meghatározott MRL értékkel szokás jellemezni, mellyel maximalizálják az élelmiszerekben és takarmányokban, illetve az ezek felületén megengedett növényvédő szermaradványok mennyiségét.

Az MRL szintet felügyeleti vizsgálatok alapján határozzák meg. A toxikológiai adatokból származtatják az ADI (érzékelhető káros egészségügyi hatás nélkül a szervezetbe juttatható átlagos napi felvétel) és az ARfD értéket. Az ADI a krónikus toxicitást jellemző érték: egy hatóanyagok az a becsült mennyisége az élelmiszerben testtömegre vonatkoztatva, amely napi érték egy életen keresztül elfogyasztható bármilyen észlelhető tünet kialakulása nélkül. Az ARfD az akut toxicitást jellemzi: egy hatóanyag becsült mennyisége az élelmiszerben testtömegre vonatkoztatva, egy étkezés alatt vagy rövid időn belül elfogyasztott, élelmiszerrel szervezetbe vihető maximális értékben kifejezve. Az MRL (mg kg^{-1}) valamint az ADI illetve ARfD értékek sok esetben nem hasonlíthatók össze közvetlenül, mivel a mg -ban kifejezett ADI és ARfD értékbe minden, a fogyasztásra kerülő élelmiszerben jelen lévő, toxikológiailag szignifikáns szermaradék (hatóanyag és metabolit vagy bomlástermék) beletartozik. Ugyanakkor az MRL általában csak a nyerstermékben jelen lévő hatóanyag maradékra vagy egy jól definiált metabolitjára vonatkozik a nagyszámú



hatósági ellenőrző vizsgálat megkönnyítésére. 2008-ig a tagállamok szermaradvány meghatározásának menete és kivitelezése nem volt egységes az EU-ban, mivel minden tagállam egyedi határértéket szabhatott. 2008.09.01-én viszont hatályba lépett a 396/2005/EK rendelet, amely a határértékeket harmonizálta és egységesítette. Mellékletei a következők: Annex I: azon peszticidek listája, melyekre MRL érték van termékcsoporthoz meghatározva (főleg zöldségekre s gyümölcsökre lebontva). Annex II: a korábbi MRL értékek listája, azok egységesítése. Annex III: a hatályos átmeneti határértékek listája. Annex IV: olyan növényvédő szerek listája, melyekre nincs határérték megállapítva, mert azok vagy az étrendi kitettség, vagy szerkezeti felépítés hatásmechanizmus miatt nem jelentenek egészségügyi veszélyt (pl piperonil-butoxid, mint egyes rovarirtó szerek hatását fokozó formálási segédanyag; szinergista, amely a CYP monooxygenáz rendszer gátlására szolgál). Annex V: a lista azon növényvédő szereket tartalmazza, melyekre az alapértelmezett $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ határértéktől eltérő MRL érték vonatkozik. Annex VI: a lista a feldolgozott élelmiszerek vizsgálata során alkalmazandó átszámítási faktorokat tartalmazza (még nem publikálták). Annex VII: a lista azon füstölőszerként alkalmazott szerek listáját tartalmazza, melyek esetében a tagállamok a korábbi mellékletekben szereplő határértékeknél magasabb MRL értéket állapíthatnak meg (Jogsabály 4, 5, 6, 7, 8).

Tekintve, hogy a megítéléshez felhasználható információ folyamatosan változik, ha szükséges, az ADI és ARfD értékek újraértékelésre kerülnek. Éppen ezért minden kimutatott peszticid új metabolitjainak detektálása, illetve a már ismert metabolitok új környezetben való megtalálása hasznos információval szolgál azok toxicitásának újraértékelésében, illetve a detoxikációs folyamatokról gyűjtött ismereteink bővítése szempontjából. Mindez felveti annak a lehetőségét is, hogy a metabolitok és a detoxifikációs termékek azonosítását ill. előrejelzését a növényi anyagcsereutaknál sokkal gyorsabb mikrobiológiai eszköztárral oldják meg (Lénárt et al. 2013).

2.7. Feldolgozott élelmiszerek peszticid analitikája

Alapvetően minden mezőgazdasági úton előállított nyers élelmiszere van MRL érték, amely az EURL honlapján termékre és hatóanyagra lebontott adatbázisban elérhető. Ugyanakkor a feldolgozott élelmiszerekre nagyon ritkán állapítottak meg külön határértékeket, kivéve, ha azokat az egészségügyi kockázat miatt kiemelt figyelem övez. Ebbe a csoportba tartoznak például a bébiételek, mivel magasabb kockázati faktorba sorolt



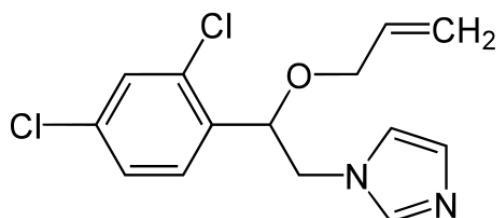
gyermek és csecsemők fogyasztják, rendszerint anyatejes táplálás utáni fő táplálékként. Ezért 2003-ban az EU erre a termékkörre kiadta a hatályos korlátozásokat (96/5/EC és 91/321). Ezek a jogszabályok az Európai Unióba való belépésünket követően 35/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet formájában lettek harmonizálva, amely kimondja, hogy a rendelet 7. számú mellékletében felsorolt öt szermaradványt leszámítva, ezen fogyasztói csoport számára élelmi célra készített késztermékekben egyetlen peszticid maradvány szintje sem haladhatja meg a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ értéket (Jogszabály 9).

Észre kell venni, hogy míg a háztartásokban felhasznált alapanyagokra jól definiált peszticid határértékek vannak megállapítva, a késztermékek szermaradvány tartalmáról gyakorlatilag semmilyen információ (pl.: határérték) sem áll a rendelkezésünkre. A képet tovább árnyalja, hogy a feldolgozás során (darálás, fagyasztás, hőkezelés) a növényvédő szerek nem biztos, hogy elbomlanak, ill. szenvedhetnek akár olyan degradációs bomlást is, ahol a bomlástermék nem feltétlenül toxikusabb a kiindulási célpeszticidnél. A feldolgozott termékekből és készletekből történő növényvédő szer meghatározás valóban a peszticid analitika Achilles-sarka: a multi-komponenses mintaelőkészítési módszerek ritkán alkalmasak összetett élelmiszermintából történő szermaradvány kinyerésre, ráadásul a technológiai lépések miatt degradálódó peszticidek a célzott SRM/MRM módszerek számára kimutathatatatlanná válnak. Az érem másik oldala, hogy az agrárgazdaság egyre nagyobb mennyiségű növényvédő szert használ, azok végtermékben kimutatható mennyiségének csökkentésére pedig akár feldolgozási lépések hatásával elérhető bomlást is meg lehetne célozni s hasznosítani a fogyasztó elé kerülő készlet szer mennyiség tartalmának redukálása érdekében. Ilyen célzott feldolgozási lépések lehetnek az egyes mosási eljárások, mechanikai behatások (hámozás, őrlés), hőkezelés (sütés, forralás, hűtés, fagyasztás), vagy a kész-félkész élelmiszerek gyártása során ezek kombinációja.

2.7.1. Az imazalil jellemzése és ipari alkalmazása

A citrusféléket támadó patogén mikroorganizmusok közül nagyon sok a termésen lévő sérüléseken keresztül fertőzi meg a gyümölcsöt még a gyümölcsöskertben, illetve a feldolgozó üzemben, az elosztás során vagy az értékesítés alatt. Citrusféléknél a gazdasági szempontból legjelentősebb betakarítás utáni fertőzések kórokozóiaként a *Penicillium digitatum*-ot (zöld penész) és a *Penicillium italicum*-ot (kék penész) tartják számon. A citrus gyümölcsök savanyú rothadását a *Galactomyces citri-aurantii* növénypatogén penészgomba

okozza, mely betegség kialakulásával szintén nagy terményveszteségek jöhetnek létre. Ezen és egyéb penészgombák hatásából adódó tényleges veszteségek nagyon változóak, függenek a termelési területtől, a citrus fajtájától, a termőfa korától és állapotától, a terménynövekedés és betakarítás során tapasztalt időjárási viszonyoktól, stb. A kórokozók gyorsan szaporodnak, spóráik jelen vannak a gyümölcs felületén, a légkörben és a légáramlatok által könnyen terjednek. Ezért a citrus ligetekben és a feldolgozó üzemekben a gombás fertőzés veszélye egész szezomban fennáll, így valószínűleg a gyárba érkezett citrus gyümölcsök legnagyobb része már érintkezésbe került valamilyen patogén kórokozóval (Palou et al. 2008). Az ismertett problémák miatt szinte minden esetben szükség van valamilyen felületi kezelésre, amely megakadályozza, vagy legalább lassítja a romlási folyamatokat. A szüretelés utáni (post harvest) kezelések elég gyakoriak a citrusfélék esetén: merítéses vagy permetezéssel juttatják viaszréteggel együtt a növény felületére a különböző szereket, többek közt tiaben Ortofenil-fenol (Ito et al. 2003), propikonazol (McKay et al. 2012), imazalilt és tiabendazol (Altieri et al. 2013).



2. ábra: Imazalil szerkezeti képlete (C₁₄H₁₄Cl₂N₂O)

Az imazalil (2. ábra) széles körben alkalmazott, betakarítás utáni növényvédő szer, hatásmechanizmusa szerint ergoszterol-bioszintézis gátló (De Waard et al. 1982). A gombákra gyakorolt hatása mellett meg kell jegyezni azt is, hogy bizonyítottan gátolja a CYP rendszer működését. A citrus gyümölcsök belsejére és héjára nincs külön MRL érték annak ellenére, hogy ezek a betakarítás utáni szerek főleg a citrusok felületén találhatóak és a citromhéj egyértelműen és nem elhanyagolható mértékben felhasznált fűszernek számít (Yolci Omeroglu et al. 2014). Érdekes, hogy a citrusok héján található viasz illetve peszticid maradékok eltávolítására sem EFSA, sem iparági javaslat nem ismert. Ettől független, hogy a citrusfélék növényvédő szermaradvány tartalmát hatóságilag monitorozzák az EU-ban, és a csomagoláson jelölni kell, milyen betakarítás utáni szerrel van kezelve a citrus gyümölcs. A csomagoláson feltüntetett, a fogyasztók számára ismeretlen vegyszerek miatt



megfigyelhető a kemofóbia jelenségének erőteljes térnyerése (Sanguinetti 2005; Weatherston & Minks 1995). Ez utóbbi nem teljesen alaptalan, hiszen például az imazalilt eddig számtalan élelmiszer mátrixból kimutatták, melyből talán a legnagyobb port felferő eset a világpiacot uraló üdítő gyártó brand citrushéjből készített termékének imazalil szennyezettsége volt - mi több, az adott üdítőt kifejezetten fiatalokat célzó termékcsoporthoz pozícionálják (Gilbert-López et al. 2012). Az imazalilt kimutatták olyan (elvileg nem célmátrix) termékekből, mint pl. az olíva, tej (Anagnostopoulos et al. 2013), tojás (Lehotay et al. 2005, Choi et al. 2015), hal (Nácher-Mestre et al. 2014; Orlando & Simionato 2013, Lankova et al. 2013), rák (Omar et al. 2013, Park et al. 2013; Anagnostopoulos et al. 2014), zsír (Sartarelli et al. 2012) és funkcionális élelmiszerek (Gao et al. 2014). Az imazalil nagy mennyiségben máj szöveti elhalásához is hozzájárulhat (Egbuta et al. 2014).

A citrufélék héjáról történő peszticid eltávolítás analitikai nyomon követésére alig található szakirodalmi példa. Krueve és kutatócsoportja narancs héján kimutatott tiabendazol és imazalil szermaradványokra kíséreltek meg hatékony mosási technikát kidolgozni. A meleg vizes és a mosogatószeres mosás eltávolította a tiabendazolt, de az alkalmazott módszerek közül egyikkel sem sikerült lemosni teljes mértékben az imazalilt. Ennek részben az az oka, hogy az imazalil diffundál a héjba és a héjon keresztül a narancsba is, így jelen lehet a gyümölcsben hámozás után is (Krueve et al. 2007).

Az imazalil bomlását számos mátrixon követték nyomon. A vegyület például stabil marad sterilizálási célú hőkezelés alatt (pH=5,0, 100 °C, 60 perc, ill. pH=6,0, 120 °C, 20 perc) (EFSA Technical Report 2014). Besil és kutatócsoportja (2016) 4 °C-on történő tárolást követően vizsgálta az imazalil bomlási kinetikáját mandarin mintában két különböző kezelési koncentrációban. A szerzők arra a megállapításra jutottak, hogy mindkét koncentráció tekintetében az imazalil fele bomlott el a 15-18 tárolási nap során attól függően, hogy a gyümölcsöt permetezéssel vagy merítéssel kezelték. Az imazalil bomlását a talajban is megvizsgálták: a vizsgált tényezők közül a legerőteljesebb hatásúnak az UV sugárzás bizonyult, az UV > napfény > búzával ültetett talaj > sterilizált talaj > sötétben tárolt talaj sorrendjében (Chu et al. 2007). Az UV-val kombinált, különböző szerves sókkal történő kezelés (UV/TiO₂, UV/K₂S₂O₈ és UV/TiO₂/ K₂S₂O₈) is alkalmas az imazalil mennyiségének csökkenésére (Hazime et al. 2014). Az imazalil bomlását a citrus feldolgozóüzemek szennyvizében, ipari léptékben Fe(II) és H₂O₂ adagolásával segítik elő (Santiago et al. 2015).



Bár napjainkig sokan próbálták azonosítani az imazalil degradációs/bomlás termékeit, eddig csupán egy jól definiálható bomlásterméket találtak, amely az imazaliltól összegképlete szerint C_3H_3 eltérést mutat (alfa-(2,4-diklór-fenil)-1H-imidazol-1-etanol; a továbbiakban imazalil metabolit IMA-M; $C_{11}H_{10}N_2OCl_2+H^+$; m/z 257,0248). Ez a bomlástermék RP kromatográfiás elválasztás esetén hidrofilebb volta miatt korábbi retenciós idővel jelentkezik az imazalilhoz képest, valamint ugyancsak klór izotóp mintázatot mutat (Chu et al. 2007, Picó et al. 2010, Gilbert López et al. 2007, Thurman et al. 2005).

2.7.2. Zsíros élelmiszermatrixok mintaelőkészítése peszticid analitikai célokra

Mint ahogyan a 2.2 fejezetben ismertetésre került, az analitikai mérőberendezések számára megfelelő tisztaságú minta előállítására számtalan extrakciós és tisztítási lépés létezik (SPE, MAE, stb). Zsíros mátrix feldolgozására használják még az extrakciós szerves oldószerhez kevert apoláris szerves oldószeres (pl. hexán) eljárást, a GPC-t, a d-SPE szorbens alapú technikákat (MSPD), stb., de ide sorolható még az alacsony hőmérsékleten végrehajtott zsír eltávolítás is, ami lényegében az ún. kifagyasztásos technika (Gilbert-López et al. 2009). A szakirodalomban a zsíros mátrix kérdésével foglalkozó számos összehasonlító cikk ismert. Lehotay és munkatársai 2005-ben tej, tojás és avokádó mintákra fejlesztettek megoldást: az első a már ismertetett AOAC 2007.1 módosított változata, amelyben a tisztítási lépésnél 50 mg mL^{-1} C_{18} szorbenssel egészítik ki a folyamatot, a második pedig az MSPD módszer, ahol $0,5 \text{ g}$ mintát 2 g C_{18} szorbenssel és 2 g $MgSO_4$ sóval homogenizálnak, majd ezt Florisil oszlopba töltik és eluálják. Leszámítva az anyag- és munkaidő költséget, mindkét módszer kellően jónak bizonyult a vizsgált szermaradványok, köztük az imazalil kinyerésére. Chung és Chan 2010-ben „teljes étrend” kísérletük során az AOAC 2007.1 módszerben leírtakat vette alapul az élelmiszerek széles palettájára. Az alkalmazott mintaelőkészítések között fellelhető volt az 5%-nál nagyobb zsírtartalmú élelmiszerekre alkalmazott tisztítási módszerük, amely során ugyanannyi tömegű C_{18} szorbenst adtak a mintához, mint amennyi PSA-t. 98 peszticidre alkalmas módszerükkel nagy zsírtartalmú pékárukat (pl. croissant) is meg tudtak vizsgálni. Egy másik „teljes étrend” kutatás során Nougadère és társai a vizsgált közétkeztetésben szereplő összes élelmiszerből, többek között házi készítésű magas zsírtartalmú süteményekből is peszticid maradványokat határoztak meg. Az étrend elemeit egy hónapon keresztül gyűjtötték és homogenizálták öt minta egységre szétosztva (1: állati eredetű termékek, 2: növényi eredetű termékek, 3: alacsony zsírtartalmú mix, 4: magas zsírtartalmú élelmiszerek és 5: víz). Mindegyik csoportra különböző mintaelőkészítési



módszert alkalmaztak. A negyedik mixet CH_3CN -nel és ciklohexánal is extrahálták, majd mindkét típusú extraktum GPC-val való tisztítás után a megfelelő oldószerben visszaoldva került mérésre LC-MS és GC-MS mérőrendszerekkel (Nougadère et al. 2012). Uygun és munkatársai (2005, 2007, 2008, 2009) tanulmányorozatában malation, fention és klórpírifosz metil koncentrációjának változását követték nyomon a lisztfeldolgozás folyamatában a tárolt gabonától kezdve az őrlésen át a tésztakészítésen keresztül egészen a sütésig. A mérések kivitelezése során a munkacsoportban etil-acetátos extrakcióval és MgSO_4 adagolással dolgoztak, az extrahált mintát pedig GPC segítségével tisztították. Arra a következtetésre jutottak, hogy a górcső alá vett növényvédő szerek koncentrációja nem változott a tárolás és az őrlés során, ugyanakkor a sütés hatására mennyiségük szignifikánsan csökkent.

Koesukwiwat és munkatársai 2010-ben fejlesztettek ki és hasonlítottak össze zsíros mátrixra használatos analitikai tisztítási eljárásokat. Átfogó vizsgálatuk egészen az alapanyagoktól (úgy, mint a gabona (<10 m/m% zsír), lenmag (42,2 m/m% zsír) és földimogyoró (49,2 m/m% zsír)) egészen az azokból készült cukrászati pékáru tésztájáig terjedt, beleértve a kekszet (13,8 m/m% zsír), fahéjas tekercszet (11,4 m/m% zsír), és pite tésztát (25,5 m/m% zsír) is. Az extrakcióhoz kizsózáson (NaCl) alapuló CH_3CN extrakciót alkalmaztak, a tisztítási lépésnél pedig három különböző eljárást (a gélpermeációs kromatográfiát, az 50 mg mL^{-1} extraktum C_{18} szorbens adagolását /d-SPE/, valamint a kifagyasztásos technikát) vetettek be a zavaró zsíros mátrix csökkentésére. A mátrixhatás mértékét tömegméréssel ellenőrizték. A szerzők azt tapasztalták, hogy erre a mátrixra a kifagyasztás és a d-SPE eljárás kombinációja ill. önmagában történő alkalmazása nem tudott szignifikánsan kevesebb együttesen extrahálódó mátrixkomponenst eredményezni. A kifagyasztással kombinált mintaelőkészítési módszert összehasonlították a csak d-SPE-vel tisztított mintákra kapott eredménnyel: a koextrahálódó komponenseket ill. a célkomponenseket mennyiségileg meghatározva az eredmények nem mutattak szignifikáns eltérést. A GPC alkalmazása annak hosszadalmas végrehajtása és a felhasználandó számos üvegeszköz miatti bizonytalanságból fakadóan rendre alacsonyabb szermaradvány mennyiség visszamérésre vezetett. A cikk szerzői tanulmányukat azzal a konklúzióval zárták, hogy a C_{18} szorbens használata a leghatékonyabb erre a mintatípusra nézve.



3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált vegyszerek és minták

A dolgozatomban használt összes növényvédő szer sztenderdet nagy tisztaságú oldószerrel (CH_3CN , CH_3OH , H_2O) oldottam fel és hígítottam. A törzsoldatokat, melyek töménysége $1000\text{-}3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ közé esett, az előállítás dátumával ellátva, $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ -on mélyhűtőben tároltam maximum 1 évig. A nagy tisztaságú CH_3CN -t és CH_3OH -t (gradient grade tisztaság), C_{18} szorbenst, a primary secondary amin-t (PSA), a hangyasavat és az NH_4 -formiátot (MS tisztaság) a Sigma-Aldrich csoporttól szereztük be (Schnelldorf, Németország). A NaCl (99,8%), n-propanol, etanol (mindegyik HPLC tisztaság), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99%), vízmentes NH_4 -acetát (98,5%), hexán (95,0%), és trinátrium-citrát-dihidrát ($\text{Na}_3\text{Cit} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 99%) vegyszereket a VWR szállította (Radnor, PA, USA). A $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -ot kemencében hevítettem $400 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 2 órán keresztül, majd további 2 órát $200 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, vízmentesítés céljából. A dinátrium-hidrogén-citrátot ($\text{Na}_2\text{HCit} \times 1,5 \text{ H}_2\text{O}$; 99 %) az Alfa Aesar-tól szereztem be (Karlsruhe, Németország). A trifenil-foszfát belső sztenderdet (TPP; 99 %) az Acros Organics (New Jersey, USA) szállította. Az ecetsavat (65%), az ammónia oldatot (25%), a NaOH -ot (>98%) és a CO_2 -ot (99,95%) a Merck-től rendeltük (Darmstadt, Németország). Az Oasis MCX (150 mg, 6 mL) SPE patront a Waters-től (Millford, MA), míg a C_{18} SPE Bond Elut patront (500 mg, 6 mL) az Agilent-től szereztük be (Santa Clara, USA). Az imazalilos mosási kísérlethez 5 v/v % koncentrációjú, kereskedelmi forgalomban kapható almaecetet használtam (BUSZESZ, Budapest), detergensként pedig mosogatószert ("Cif Extra Strong Lemon"; Unilever, Budapest). Minden kísérletsorozatnál PP centrifugacsöveket használtam (50 mL és 15 mL; VWR). A 0,22 és 0,45 μm pórusméretű eldobható PTFE fecskendőszűrőket, a fiolákat, valamint az összes üveg edényt a VWR-től rendeltük. A mérések kivitelezésére felhasznált nagy tisztaságú vizet Millipore MilliQ víztisztító rendszerrel (Merck-Millipore, Darmstadt, Németország) állítottuk elő. A sütési alapanyagokat és a citrom mintákat kiskereskedelmi hálózatokból szereztük be Budapesten, jellemzően görög és spanyol beszállítóktól. Az olívaolaj mintákat (helyben gyártott és termesztett) a helyi szupermarketekben vásároltuk Jaén-ben (Spanyolország) Az olívabogyó mintavételezését a spanyol „növényvédő szerrel vélhetően szennyezett olíva mintavételi protokoll” szerint hajtottuk végre. (Jogszába 10). A begyűjtött mintának 500 g-nyi



mennyiségét a Talleres Lopera gyárban dolgozták fel (Priego de Córdoba, Córdoba, Spanyolország).

3.2. Kapcsolt analitikai rendszerek

3.2.1. HPLC-ESI-MS/MS

A tandem-MS vizsgálatok során egy hibrid, lineáris ioncsapdával felszerelt hármaskvadrupól elrendezésű készüléket alkalmaztam (Applied Biosystems 3200 QTRAP HPLC/MS/MS Foster City, CA, USA), amely egy TurboV IonSpray ESI ionforrást tartalmazott, pozitív ionizációs módban üzemeltetve. A tömegspektrométer Agilent 1100 típusú HPLC rendszerhez volt kapcsolva (Agilent Technologies), mely tartalmazott az eluensek gáztalanítására szolgáló ún. vákuum gáztalanítót, kétsatornás HPLC pumpát, automata mintaadagolót és az analitikai oszlop fűtésére szolgáló termosztátot.

A mérési adatok rögzítését és feldolgozását az Analyst szoftver 1.4.2. verziójával végeztem.

3.2.2. HPLC-ESI-TOF-MS

Az 5.3 és 5.4 fejezetben bemutatott eredményekhez a kromatográfias elválasztást Agilent 1290 típusú HPLC rendszeren végeztem, mely egy vákuum gáztalanítót, automata mintaadagolót és egy kétsatornás HPLC pumpát tartalmazott. A detektálást Agilent 6220 típusú TOF tömegspektrométeren végeztem, mely ESI ionforrással volt felszerelve. A műszer a tömegkorrekciót automatikusan, a folyamatosan bejuttatott kalibráló oldat segítségével végezte el. A kalibráló oldatot a dupla porlasztófejes ESI forrással juttattam a műszerbe, melynek egyik kapillárisán a minta, másikon pedig a kalibráló oldat áramlott kis térfogatárammal (kb. 10 μL perc⁻¹). Referenciatömegként purin ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4$; m/z 121,050873) és HP-0921 ([hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoro-pentoxi)-foszfazén], $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{24}$; m/z 922,009798) oldatok keverékét alkalmaztam. A tömegspektrumok felvételét és az adatok feldolgozását az Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis szoftverrel (B.06.00) végeztem.

3.2.3. UHPLC-HESI-MS/MS

Ezt a készüléket az 5.3 és 5.4 fejezetben ismertetett kísérletekhez használtam a poláris peszticidek narancs, olívaolaj és olívabogyó mintákból történő mennyiségi meghatározására. Egy Thermo TSQ Endura típusú hármaskvadrupól analízátort (Thermo Scientific, San José, USA) kapcsoltam egy Dionex Ultimate 3000 UHPLC-vel (Thermo Scientific). Interfészként HESI ionforrást használtam az alábbi beállításokkal: köpeny gáz 45, aux gáz 13; ion átvezető



kapilláris hőmérséklete 320-350 °C; párologtató hőmérséklete 250°C; porlasztó feszültség: 3500 V (-2500 V negatív módban). Mindegyik quadrupol 0,7 FMWH felbontásra volt állítva. A készüléket MRM üzemmódban az Xcalibur 3.0.63 verziójú szoftver segítségével vezéreltem, míg az adatok kiértékelését Tracefinder 3.2.5.12.0 szoftverrel végeztem.

3.2.4. HPLC-ESI-QTOF-MS

A metabolitkutatást 6530 Accurate Mass HPLC-ESI-QTOF-MS (Agilent Technologies) típusú műszer segítségével hajtottam végre, amely elé Agilent 1100 típusú HPLC berendezést kapcsoltam. Az analitikai összeállítás UV-VIS detektort is tartalmazott, amelyet 200-400 nm tartományban 80 Hz mintavételi frekvencián üzemeltettem. A tömegkorrekció azonos módon zajlott a 3.2.2. fejezetben leírtakkal.

3.2.5. HPLC-ESI-QTOF-MS_2

A kromatográfiás elválasztást az 5.3 fejezetben ismertetett kísérletekben Agilent 1290 típusú HPLC rendszeren végeztem, mely vákuum gáztalanítót, automata mintaadagolót és kétsatornás HPLC pumpát tartalmazott, egy Agilent 6530 típusú hibrid quadrupól repülési idő tömegspektrométerrel csatolva (Q-TOF) (Agilent Technologies), ESI ionforrással. A fragmentor feszültség minden esetben 90 V-ra volt állítva mindegyik ionizációs üzemmódban. A tömegspektrumok felvételét és az adatok feldolgozását az Agilent Mass Hunter Data Acquisition szoftverrel (B.06.00) végeztem.

3.2.6. UPC²-PDA

A GC és LC kompatibilis komponensek egyidejű elválasztásához új generációs szuperkritikus kromatográfiás műszert, az ACQUITY UPC² (Waters) használtam (5.1 fejezet). A Waters nevezéktan szerint ez a berendezés aktív oldószer oszlop „manager”-ből, „convergence manager”-ből, „sample manager”-ből (10 µL), és „binary solvent manager”-ből áll. A berendezés a kétlépcsős (aktív ill. statikus) nyomásszabályozóval sokkal precízebben tartja a beállított nyomás értéket, ezáltal javított felbontást tapasztalhatunk. A rendszer különálló szivattyúkat használ a folyékony CO₂ és a koeluensek egyidejű kezelésére. Az új technológiának köszönhetően rendkívül pontosan szabályozható a nagynyomású folyékony CO₂ és a különböző koeluensek mennyisége. A műszer fotodióda soros (PDA) detektorral van felszerelve, ami abban különbözik a hagyományos DAD-tól,



hogy a benne elhelyezett szilika lencse csökkenti a CO₂ és a koeluensek közötti törésmutató mértékét, ezzel jelentősen csökkentve a zajt. Az ezzel a készülékkel kapott eredményeket Empower V-02 programmal értékeltem ki.

3.2.7. UPC²-ESI-MS

Az előző fejezetben leírt rendszer (3.2.6.) csatolását oldottam meg a 3.2.1. fejezetben leírt rendszerrel. A mérési adatok rögzítését és feldolgozását az Analyst szoftver 1.4.2 verziójával végeztem.



4. TÉZISEK, THESES

4.1. TÉZISEK

1. UPC² kromatográfias elválasztást követően ESI-MS detektálást alkalmazó mérőrendszert állítottam össze, mellyel növényvédő szerek kromatográfias viselkedését tanulmányoztam. Ennek során megállapítottam, hogy a hőmérséklet emelése a szuperkritikus CO₂ mozgófázis elúciós erejét gyengíti, mely jelenség CH₃CN koeluens adagolásával a legtöbb vizsgált komponens esetén fokozódik. Ugyanakkor egyes komponenseknél (dimetoát, tebufenpirád, prokloráz) a CH₃CN koeluens használata ellentétes hatást eredményez, azaz a mobilfázis elúciós ereje fokozódik. Mindez azt sugalja, hogy dimetoát, piperonil-butoxid, tebufenpirád, prokloráz esetén az CH₃CN elúciós sajátossága dominál a szuperkritikus CO₂ elúciós sajátosságaival szemben.

2. Hőkezeléssel járó konyhatechnikai műveletnek kitett, feldolgozott élelmiszer-mátrixra (12 m/m % zsírtartalmú sütemény) dolgoztam ki olyan mintaelőkészítési és HPLC-ESI-MS/MS mérési eljárást, amelynek segítségével nyomon tudtam követni egy szüretelés utáni fungicid, az imazalil mennyiségének változását és anyagmérlegét a citrushéj alapanyagtól a kész süteményig.

3. Elsőként igazoltam HPLC-ESI-QTOF-MS műszeregyüttessel az imazalil hőkezelés által kiváltott degradációját, hőkezeléssel járó konyhai műveleteknek kitett, feldolgozott élelmiszer-mátrixban.

4. A rendelkezésre álló (7.1 verziószámú) QuPpe módszer gyűjteményhez képest több poláros peszticid célkomponens (17 pozitív ion módban, 9 negatív ion módban) együttes vizsgálatára alkalmas módszert dolgoztam ki és validáltam gyümölcsmátrixból történő mennyiségi meghatározásra HILIC-ESI-TOF-MS és HILIC-ESI-MS/MS mérési összeállítások használatával.

5. Igazoltam, hogy az általam kidolgozott poláris peszticidek mennyiségi meghatározására alkalmas, HILIC elválasztáson alapuló módszer megfelelő olajos (olívbogyó, olívaolaj) élelmiszer-mátrixból történő vizsgálatára is.



4.2. THESESES

1. I was able to set up UPC² based analytical system with ESI-MS detection to study the chromatographic behavior of target pesticides. I noticed that increasing temperature decreases the elution strength of CO₂ mobile phase - this phenomenon was enhanced for most of the target analytes with the addition of CH₃CN as coeluent. However, its use resulted in opposite effects for certain analytes, i.e, dimethoate, piperonyl-butoxide, tebufenpyrad, prochloraz, as the eluotropic strength of the mobile phase was enhanced. The observation indicates that the elution characteristics of CH₃CN dominate over those of supercritical CO₂ in the case of dimethoate, piperonyl-butoxide, tebufenpyrad and prochloraz.

2. I developed a novel sample preparation method and a related HPLC-MS/MS procedure for a special processed food matrix, i.e, a cake sample containing 12 m/m % fat that was exposed to a previous heat treatment. The overall method could be used for the quantitative monitoring and mass balance determination of a postharvest fungicide, imazalil, from the raw material (citrus peel) until the end cake product.

3. I was the first to describe the heat treatment based degradation of imazalil in a processed food matrix with the help of an HPLC-ESI-QTOF-MS instrumental setup.

4. I developed and validated a new analytical method for fruit matrices with HILIC-ESI-TOF-MS and HILIC-ESI-MS/MS instrumental setups. This method could be used to detect and quantify higher number of polar pesticides (17 in positive ion mode and 9 in negative ion mode) than the QuPPe version 7.1 offered that was available at the time of thesis preparation.

5. I proved that the HILIC method I had validated for the quantification of polar pesticides are suitable for high oil containing food matrices, e.g, olive and olive oil.



5. EREDMÉNYEK

5.1. Új generációs szuperkritikus fluidkromatográfia alkalmazhatósága a növényvédő szermaradványok átfogó vizsgálatában

5.1.1. Célok megfogalmazása

Korábban számos szakmai vitát váltott ki, hogy melyik elválasztási módszer (LC, GC) használata a célravezetőbb a növényvédő szerek monitorozásában (Alder et al. 2006). Ha egy laboratórium a növényvédő szerek széles spektrumát szeretné vizsgálni, úgy számolnia kell azzal, hogy legalább két kapcsolt technikát kell fenntartania és üzemeltetnie, amely roppant költséges beruházást igényel. Erre a problémára nyújthat alternatív megoldást az elmúlt években napvilágot látott, úgynevezett konvergens kromatográfia névre keresztelt elválasztástechnikai eszköz, amelyet egyelőre a Waters cég által gyártott ACQUITY UPC² készülék képvisel. Ellentétben a korábbi, szuperkritikus fluid kromatográfias elven működő hasonló készülékekkel, reprodukálható és gyors kromatográfiát képes megvalósítani (Eaton & McDonald 2012). Mivel a mozgófázis túlnyomó részt CO₂, ezért üzemeltetése gazdaságos és sok labor számára elérhető lehet. Köszönhetően annak, hogy a mozgófázis úgynevezett koeluenssel (ami lehet hexán, CH₃CN, CH₃OH, etil-acetát, stb.) módosítható, lehetővé válhat mind a GC, mind az LC elválasztási körülmények megvalósítása. Érdemes tehát megpróbálni egy olyan SFC módszer kifejlesztését, mely egyesítené, és egyúttal felváltaná a laboratóriumokban használt két elválasztási módszer (GC és LC) szimultán használatát. A munkám célja az volt, hogy megvizsgáljam, a fent említett konvergens kromatográfias műszer képes-e egy futtatáson belül elválasztani olyan célkomponenseket, amelyeket ezen kísérletet megelőzően csak két különböző típusú kromatográfia (GC és LC) segítségével lehetett. Továbbá vizsgáltam azt is, hogy azon vegyületek, melyek mindkét módszerrel elválaszthatónak bizonyultak, milyen kromatográfias viselkedést mutatnak, tehát inkább a GC vagy LC elválasztás esetén tapasztalt elúciós sajátságokhoz hasonlítható a viselkedésük.

5.1.2. Modell komponensek kiválasztása

A munkám során az első, és egyben egyik legfontosabb feladat a megfelelő modell komponensek kiválasztása volt. A kiválasztás alapjául a korábbi szakirodalmi tanulmányok ill. módszerleírások szolgáltak (Nollet & Rathore 2010). A GC komponensek megválasztásában a Waters cég által validált módszerleírás volt segítségemre (Internet 8),



míg az LC módszerrel elválasztható komponensek várható elúciós viselkedésének felméréséhez egy, a tanszékünkön született tanulmányt használtam fel (Kmellár et al. 2010). Különös figyelmet fordítottam arra, hogy a kiválasztott célpeszticidek között egy csoport demonstrálja a kizárólag LC kompatibilis, ugyanígy egy másik csoport modellezze a csak GC kompatibilis komponenseket, illetve legyen egy olyan csoport, amely mind LC, mind GC módszerrel elválasztható. Továbbá a csoportokon belüli komponenseknek ki kellett elégíteni a következő feltétel rendszert: (i): az EN 15662:2008 szabvány módszerrel kinyerhetőnek kellett lenniük a vonatkozó SANCO rendeletben rögzített kritériumoknak megfelelően (70-120%-os kinyerési hatások) (Jogszabály 1); (ii): különböző $pK_{o/w}$ értékekkel kellett rendelkezniük; (iii): a forrásként megjelölt tanulmányok alapján a kiválasztott komponenseknek le kellett fedni az elúciós idő egészét, abból a célból, hogy a kromatogram elején, közepén és végén eluálódó komponensekből egyaránt tartalmazzon hatóanyagokat az összeállított komponens sor. A fent leírt szempontok alapján a választás a 6. táblázatban felsorolt peszticidekre esett.

6. táblázat: Az UPC² kísérlethez kiválasztott hatóanyagok listája, félkövérrel megjelölve azokat, amelyekhez mind LC, mind GC oldalról rendelkezésre állt a retenciós idő információ

LC-GC	GC	LC
Azinfosz-metil	Aldrin	Boszkalid
Azoxistrobin	Brómpropilát	Karbendazim
Klórprofám	Diklorán	Flutriafol
Diazinon	α -Endosulfán	Spiroxamin
Diklórvosz	Tau-fluvalinát	Tiabendazol
Dimetoát	Folpet	
Eszfenvalerát	Heptaklór	
Fenhexamid	Permetrin (sum)	
Pendarimetalin	Kvintozen	
Piperonil-butoxid		
Pirimikarb		
Pirimipfosz-metil		
Prokloráz		
Tebufenpirád		
Triadimenol		
Trifloxistrobin		

5.1.3. Alkalmazott készülékbeállítások

Az UPC²-PDA rendszerben a mozgófázis CO₂ gáz és CH₃CN vagy CH₃OH módosító koeluens volt (CoElu). A kísérlethez az XBridge TM C₁₈ oszlopot választottam (Waters, 1,8 μ m, 3,0 mm x 100 mm), amelyen a mozgófázist 1,5 mL perc⁻¹ térfogatárammal a



következő gradiens szerint áramoltattam: az első percben 3% CoElu, 1-9 percig 20% CoElu, 0,5 perc alatt tért vissza a gradiens 3% CoElu értékre, majd 9,5-13 percig 3% CoElu összeállításban maradt. A CO₂ nyomásszabályozó beállítása 1500 psi volt. A detektálást PDA detektorral végeztem (210-400 nm). A 10 µg mL⁻¹ koncentrációjú sztenderd oldatokat egyesével injektáltam az aktuálisan használt koeluensben oldva (n=3); a mérést több hőmérsékleten (40, 50, 60, 70 °C) is megismételtem.

A HPLC-ESI-MS/MS rendszerben alkalmazott készülék és kromatográfias beállításaim a következők voltak: „A” eluens H₂O 0,1 v/v% hangyasavval, a „B” 100% CH₃CN, illetve CH₃OH. A használt gradiens a következő volt: 0-1 percig 5% „B”, 1-30 percig 100% „B”, majd 0,5 perc alatt visszatért a gradiens 5% „B”-re, végül 10-re ekvilibrálási szakasz következett. Az elválasztáshoz XBridge TM C₁₈ (Waters; 3,5 µm x 3 mm x 100 mm) oszlopot használtam. A vizsgálatokat 30, 40, 50 és 60 °C-on hajtottam végre, minden esetben 5 µL injektálási térfogatot választva. A célkomponenseket két részre osztottam: 600 ng mL⁻¹ koncentrációban két sztenderd oldat keveréket képeztem, mivel a fenhexamid (M+H⁺: 302,0) és a flutriafol (M+H⁺: 302,1) azonos *m/z* értékkel jelenik meg pozitív ion módban kis felbontású tömegspektrométert használva. A két „mix” mindegyike tartalmazott azonos komponenseket is, boszkalidot és piperonil-butoxidot, 20:80 v/v% CH₃CN:H₂O vagy CH₃OH:H₂O-ben oldva, attól függően, hogy az adott gradiens melyik szerves oldószert használta koeluensként. Az MS paraméterek a következők voltak: ionforrás feszültség 5500 V; ionforrás hőmérséklet 450 °C; ionforrás porlasztó nyomása (Gáz: 1-2) 50-50 psi, az ütközési gáz nyomása 5 psi és a függöny gáz nyomása 10 psi.

A UPC²-ESI-MS kapcsolt rendszerben az UPC² rendszerről 1,5 mL perc⁻¹ térfogatárammal érkező eluenst egy T idomú kapcsolóelem segítségével elegyítettem össze az Agilent 1100 típusú HPLC pumpa által szállított, 0,2 mL perc⁻¹ térfogatáramú, 50:50 v/v% CH₃CN:H₂O, 0,1 v/v% hangyasav összetételű ionizációt elősegítő folyadékkal, amelyet így együtt juttattam az ESI ionforrásba. Az elúciós paraméterek teljesen megegyeztek az UPC²-PDA rendszerben leírtakkal.

Az analízishez kiválasztott peszticidekből két sztenderd keveréket készítettem 600 ng mL⁻¹ koncentrációval, CH₃CN-ben vagy CH₃OH-ban oldva. Mind a két rendszert manuálisan vezéreltem, emiatt vált szükségessé a mért retenciós idők kapacitás faktorra történő átszámítása (*k*) a következő formula alapján, ahol *R_t* a retenciós idő, *D_t* pedig a holtidő a kromatogramból megállapítva:



$$k=(R_t - D_t)/ D_t$$

Mindegyik hatóanyagot 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációra hígítottam. Az ESI ionforrásba fecskendő segítségével juttattam az oldatokat, és pozitív ion módban automata módon optimaltam az anyaionokra legmegfelelőbb potenciál értékeket. Az eljárás végeztével a 7. táblázatban felsorolt értékeket kaptam. Természetesen a GC rendszerrel elválasztható komponensekre a komponensek jellegéből fakadóan csak igen alacsony érzékenység volt elérhető, továbbá ezen komponensek miatt nem volt kivitelezhető az MRM alapú azonosítás.

7. táblázat: Kiválasztott hatóanyagok m/z értékei és optimált lencse potenciáljai Q1 pozitív ion módban

	m/z	eredeti tömeg	ionizáció formája	DP	EP	CEP
Aldrin	363,0	364,9	[M+H] ⁺	76	10	14
Azinfosz-metil	317,9	317,3	[M+H] ⁺	31	4,0	14
Azoxistrobin	404,0	403,4	[M+H] ⁺	31	5,5	18
Boszkalid	343,0	343,2	[M+H] ⁺	56	8,5	16
Brómpropilát	427,4	428,1	[M+H] ⁺	51	4,5	20
Karbendazim	192,2	191,2	[M+H] ⁺	51	10	12
Klórprofám	214,1	213,7	[M+H] ⁺	26	2,5	12
Diazinon	305,0	304,3	[M+H] ⁺	36	5,0	16
Diklorán	207,0	207,0	[M+H] ⁺	21	3,5	16
Diklórvosz	223,0	220,9	[M+H] ⁺	31	6,5	18
Dimetoát	230,0	229,3	[M+H] ⁺	16	4,5	14
Eszfenvalerát	420,4	419,9	[M+H] ⁺	46	5,0	18
Fenhexamid	302,1	302,2	[M+H] ⁺	51	4,0	16
Flutriafol	302,0	301,3	[M+H] ⁺	46	5,0	14
Folpet	296,3	296,5	[M] ⁺	31	3,5	12
Heptaklór	371,3	373,3	[M+H] ⁺	41	9,0	18
Pendarimetalin	282,0	381,3	[M+H] ⁺	21	4,0	16
Permetrin	391,3	391,3	[M+H] ⁺	46	6,0	21
Piperonil-butoxid	356,2	355,0	[M+H] ⁺	31	4,5	16
Pirimikarb	239,2	238,3	[M+H] ⁺	21	5,0	12
Pirimifosz-metil	306,2	305,3	[M+H] ⁺	31	3,5	16
Prokloráz	378,0	376,7	[M+H] ⁺	21	4,5	24
Kvintozen	294,4	395,3	[M+H] ⁺	41	4,5	12
Spiroxamin	298,2	297,5	[M+H] ⁺	46	4,5	16
Tau-fluvalinát	503,2	502,9	[M+H] ⁺	61	5,0	20
Tebufenpirád	334,1	333,8	[M+H] ⁺	81	10	16
Tiabendazol	202,0	201,3	[M+H] ⁺	56	6,5	14
Triadimenol	296,0	295,8	[M+H] ⁺	21	4,0	14
Trifloxistrobin	409,2	408,3	[M+H] ⁺	26	7,0	18
α -Endoszulfán	405,2	406,9	[M+H] ⁺	56	4,5	18



5.1.4. Eredmények

5.1.4.1. UPC²- PDA kapcsolt rendszerrel elért eredmények

Ezzel a műszeregyüttessel csak akkor tudtam detektálni a célkomponenseket, ha azokat nagy ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) koncentrációban egyenként injektáltuk. Ez a koncentráció korántsem életszerű, hiszen a valódi mintában csupán töredéke van jelen.

Az UPC²-PDA rendszerrel a 30 komponensből 29 volt detektálható mindkét koeluens használata esetén. A spiroxamin UV-kromofór csoportot nem tartalmaz, ezért PDA detektorral nem vizsgálható. A továbbiakban azokat a célpeszticideket, amelyeket retenciós idővel tudtam jellemezni a felhasznált GC segédletből (Internet 8), illetve az általam használt HPLC-ESI-MS/MS és UPC²-PDA rendszerekkel mért eredményekből, kiválogattam és elúciós sorrend alapján sorszámmal láttam el ($40 \text{ }^\circ\text{C}$). Ezáltal mindhárom rendszerre kaptam egy elúciós sorrendet, amelyet komponensenként összehasonlítottam abból a célból, hogy megállapítsam, az adott komponens viselkedése UPC²-ben inkább LC-ben vagy inkább GC-ben létrejövő elválasztási sajátosságokat mutat. Az LC rendszerben a megoszlást főképp a polaritási viszonyok szabják meg, ezzel szemben a GC rendszerben az adott oszlopon (DB-5MS) a megoszlás hajtóereje az illékonyság, azaz a mozgófázisban való oldódás mértéke. Az UPC² rendszerben a megoszlás kevert mechanizmus szerint történik, amelyet még emellett nagyban befolyásol az állófázis minősége és a „back pressure” értéke is. Ezért a rangsorszámok értelmezése céljából minősítő rendszert állítottam fel: a mennyiben az UPC² rendszerről érkező komponensek egyenkénti rangsorszáma megegyezett illetve +/- 1 eltérést mutatott az LC vagy GC elválasztással, úgy az adott molekula elúciós viselkedését az UPC²-ben hasonlóknak tekintetem az LC vagy GC rendszerhez. Ha a fent említett összefüggés mindkét rendszer esetén fennáll, úgy LC/GC hasonlóságról beszélünk; ilyen eset akkor lehetséges, ha az adott komponens LC és GC elválasztás esetén is ugyanúgy viselkedik. Értelemszerűen amennyiben az UPC²-től eltérő rendszerekkel kapott egyik retenciós rangsor sem felel meg az általam támasztott követelményeknek, akkor az sem LC-, sem pedig GC-retenciós szabályokat sem követ. Az eredményeket a 8. táblázat foglalja össze.

**8. táblázat: Rangsorolt elúciós szekvencia összehasonlítása GC segédlet, LC ill. UPC² (40 oC hőmérsékleten rögzített) adatok alapján**

Felhasznált koeluens	CH ₃ CN				CH ₃ OH			
	LC	UPC ²	GC	Elúciós jelleg	LC	UPC ²	GC	Elúciós jelleg
azinfosz-metil	4	6	9	x	3	9	9	GC
klórprofám	6	2	3	GC	5	5	3	LC
diazinon	7	5	5	GC	8	4	5	GC
diklórvosz	2	7	2	x	2	1	2	LC/GC
dimetoát	1	10	4	x	1	10	4	x
permetrin	11	3	11	x	11	6	11	x
piperonil-butoxid	9	7	8	LC/GC	9	7	8	LC/GC
pirimifosz-metil	8	4	6	x	7	2	6	x
prokloráz	5	9	10	GC	6	11	10	GC
tau-fluvalinát	10	1	1	GC	10	3	1	x
triadimenol	3	8	7	GC	4	8	7	GC

A fentiek alapján CH₃OH koeluens (UPC²) és CH₃OH „B” eluens (LC) használata esetén az azinfosz-metil, diazinon, prokloráz és triadimenol komponensek elúciós jellege a GC kromatográfiában tapasztaltakhoz hasonlítható elúciós viselkedést mutatott. A klórprofám LC kromatográfiához hasonló viselkedést mutatott. A diklórvosz és a piperonil-butoxid mind LC, mind GC elválasztás esetén másodikként eluálódott az oszlopról, így az UPC² rendszerről elsőként történő elúciója alapján mindkét elválasztási rendszerrel hasonlóságot mutatott. A dimetoát, permetrin és tau-fluvalinát a minősítő rendszer szerint nem követik egyik elválasztási rendszer elúciós sorrendjét sem. CH₃CN koeluens (UPC²) és CH₃CN „B” eluens (LC) használata esetén jellemzően több komponens követi a GC rendszerben tapasztalt elúciós sorrendet (klórprofám, diazinon, prokloráz, tau-fluvalinát és triadimenol). A piperonil-butoxid ugyancsak GC/LC minősítést kapott, azonban öt komponens esetén azt tapasztaltam, hogy a felállított minősítési kritériumok szerint nem lehet elúciós hasonlósági következtetést levonni.

5.1.4.2 UPC²-ESI-MS és LC-ESI-MS kapcsolt rendszerekkel elért eredmények

Az UPC²-ESI-MS rendszerben a detektálható komponensek számát egyértelműen befolyásolja a választott koeluens minősége. A 30 célkomponensből CH₃OH koeluens esetén 25, míg CH₃CN használatakor csak 19 komponens volt detektálható. A kísérletsorozat kezdetén ionizációs oldószer bejuttatását elősegítő pumpa nélkül kíséreltem meg a két rendszer kapcsolását, és csupán a koeluenseket savanyítottam hangyasavval. Azt tapasztaltam, hogy 50 v/v % víztartalmú (savanyított), ionizációt elősegítő oldat



közbeiktatása szükséges, ugyanis annak hiányában a használt gradiens olyan mértékű alapvonal emelkedést okozott, amely lehetetlenné tette a kromatogram kiértékelését. Érdemes megjegyezni, hogy a kísérleti beállításoknál a „back pressure” szabályozó nem volt képes tartani az eredetileg általam tervezett 3000 és 2000 psi értéket az összekapcsolt rendszer esetén, ezért választottam végül az 1500 értéket, amelyet az UPC²-PDA rendszerrel is alkalmaztam, hogy konzekvens adatokhoz jussak.

A HPLC-ESI-MS módszerrel, ahogyan az várható volt, minden LC kompatibilis célpeszticid jól definiálható retenciós idővel, csúcsalakkal és intenzitással volt detektálható. Érdekes módon két, jellemzően GC -vel vizsgálható vegyület, a folpet és az α -endoszulfán jól definiálható csúcsalakat eredményezett.

Mindkét rendszerrel CH₃OH és CH₃CN eluenseket használtam az elúcióhoz. A 3. ábrán láthatók a HPLC-ESI-MS és UPC²-ESI-MS kapcsolt rendszerek 40 °C hőmérsékleten, különböző eluensek használatával rögzített, egymásra helyezett EIC kromatogramjai. Az M1/1-4.Táblázat tartalmazzák a célkomponensek különböző hőmérsékleten detektált retenciós idejét.

Az „a” és „b” kromatogramokat összevetve jól látható, hogy CH₃CN „B” eluents használva jutottam az analitikai szempontokat jobban kielégítő kromatográfiás csúcsokhoz. Csupán egy növényvédő szer (dimetoát) esetén tapasztaltam széles frontinggal eluálódó csúcsot és kettő (pendimetalin és permetrin) esetén figyeltem meg erős tailinggel eluálódó csúcsalakat, amely minden bizonnyal a nagy koncentrációban történő injektálásból fakad. CH₃OH szerves eluents használva a szabálytalan csúcsalakkal eluálódó komponensek száma sokkal nagyobb volt. A pirimikarb a HPLC-ESI-MS rendszer alkalmazásánál, acetonitrilt használva, 7,25-7,62 perc (30-60°C) között eluálódik. A kromatogram elején látható csúcsot az injektált holtterfoggal érkező kromatográfiás „junk” eredményezi. Nem zárható ki hogy a pirimikarb egy része átesett az oszloponis, viszont abban az esetben, amikor nagyobb koncentrációban injektáltam ezt a peszticidet a holtterfogóban eluálódott csúcs csúcs alatti területe nem nőtt. Egyes célpeszticidek dupla, sőt tripla csúcsot adtak az UPC²-ESI-MS illetve a HPLC-ESI-MS esetén, míg a PDA rendszerben a peszticidek egyedi törzsoldat injektálásai nem okoztak csúcscsám-növekedést. A jelenség nem tekinthető megszokottnak, mivel csak az acetonitril eluens ill ko-eluens használata során figyelhető meg.

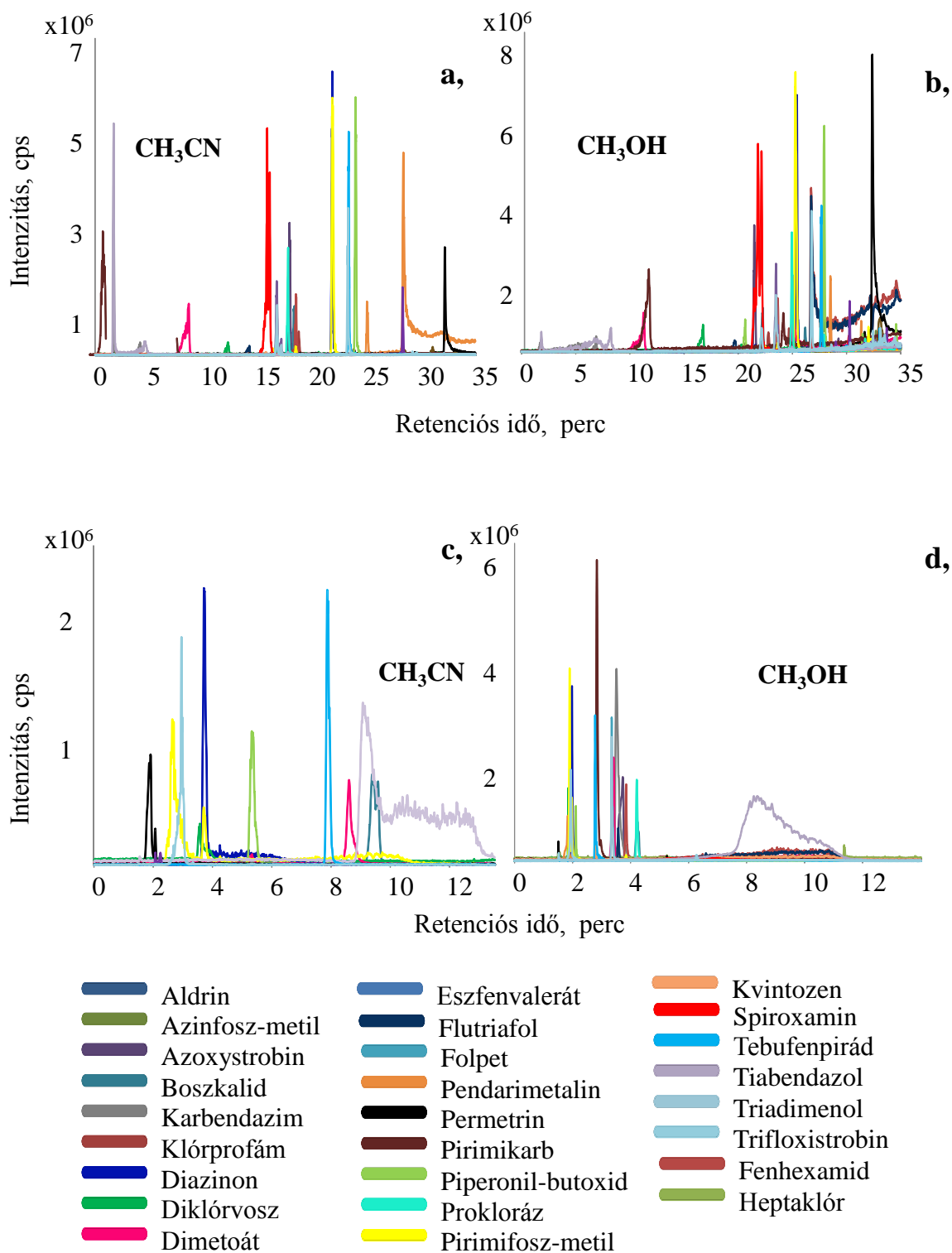
A kiértékelésnél minden alkalommal azt a csúcsot vettem alapul, amelynek területe az egyedi addíció hatására megnőtt. A dupla illetve tripla csúcsok okának hátterében a single



MS alapú detektálást és a kevert sztenderd oldatok (mixek) használatának együttesét látom annak ellenére, hogy igyekeztem szétválasztani az azonos m/z értéken detektálható vegyületeket. Erre talán a legjobb példa a pirimifosz-metil: esete, noha a diazinon (305,0 m/z) és a pirimifosz-metil (306,2 m/z) detektáláshoz felhasznált m/z értéke eltér, a diazinon mindkét tömegszámon látható az A+1 izotopológja miatt, ami szintén a single MS detektálás hátrányaként jelentkezik.

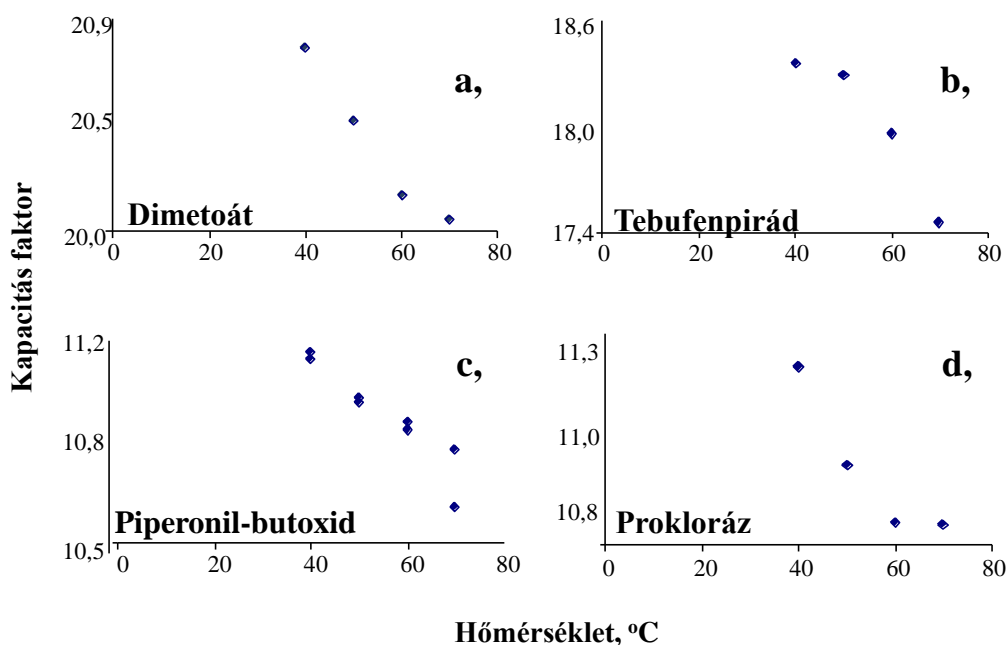
Sajnos nem volt alkalmam optimalizálni a gradienst, mivel legelső alkalommal az UPC²-PDA rendszeren a növényvédő szereket egyesével, egyedi törzsoldatban, gyakran különböző helyszíneken (ELTE, BME, BCE) injektáltam (2012). Ekkor csak arra nyílt lehetőségem, hogy kialakítsak egy olyan gradienst, amellyel a csúcsok elfogadhatóan definiálható csúcsalakot adtak. Ezt követően egy hétig használhattam a készüléket: ebben az időszakban az ESI-MS kapcsolást kellett végrehajtanom. Az adatok összehasonlíthatóságának érdekében nem változtathattam a korábban megállapított gradiensen.

Az UPC²-ESI-MS rendszerről kapott kromatogramokat vizsgálva kijelenthető, hogy CH₃OH koeluent alkalmazva egyértelműen több komponens volt detektálható jobb intenzitással, és szabályosabb, majdnem túszerű csúcsalakkal (kivéve a tiabendazolt) a CH₃CN használatához képest. A CH₃CN koeluens használatát ismertető kromatogramon (3. c ábra) kevesebb komponens látható, a csúcsalakok szélesebbek, a tiabendazol csúcsalakja pedig analitikai szempontból értékelhetetlen. A két összevetéséből jól látszik, hogy a CH₃OH az „erősebb” (jobb elválasztást biztosító) eluens az UPC² rendszer használata esetén.



3. ábra: HPLC-ESI-MS és UPC²-ESI-MS kapcsolt rendszerek segítségével 40 °C hőmérsékleten különböző eluensek használatával rögzített, egymásra helyezett EIC kromatogramok (egyenkénti célkomponens koncentráció: 0,6 µg mL⁻¹). A felső kettő kromatogram HPLC-ESI-MS elválasztást ismerteti „a”: CH₃OH és „b”: CH₃CN eluens használata esetén. Az alsó kettő kromatogram UPC²-ESI-MS elválasztást mutat be „c”: CH₃OH és „d”: CH₃CN koeluens használatánál.

Általánosan elmondható, hogy az SFC/UPC² rendszerben a hőmérséklet növelésével a CO₂ sűrűsége csökken, ezáltal az oldási képessége csökken (Kassim et al. 1988 és Kerlé et al. 2009), tehát a hőmérséklet növelése esetén a célkomponensek elúcióját az oszlopról gyakorlatilag nagyobb retenciós idővel kell várni. Érdekes módon az általam vizsgált komponensek közül a dimetoát, tebufenpirád, prokloráz és a piperonil-butoxid a CH₃CN koeluens használata esetén ettől eltérő retenciós kinetikát mutattak, amelyet a 4. ábra szemléltet.



4. ábra: a: dimetoát, b: tebufenpirád, c: prokloráz és d: piperonil-butoxid elúciós viselkedése CH₃CN koeluens használata esetén, a kapacitás faktor hőmérséklet függésén keresztül ábrázolva.

Érdeemes megjegyezni, hogy a dimetoát, prokloráz és piperonil-butoxid rangsorszámból jóslott kromatográfiás viselkedése alapján nem tudtam párhuzamot vonni a LC vagy GC kromatográfiás rendszerekkel. Feltehetően ennek az az oka, hogy a CO₂ sűrűségének csökkenésével ezek a komponensek a mozgófázisban már nem tudtak oldódni, így a CH₃CN-ben oldódnak, ezáltal a hőmérséklet növelésével hamarabb érkeznek meg a oszlopról. Ez a megfigyelés valamelyest igazolja a minősítési rendszer jóságát is.

5.1.5. Összegzés

A kísérlet során sikerült egy kromatogramon belül GC és LC kompatibilis növényvédő szereket elválasztani és detektálni az UPC²-PDA rendszerben. Megoldottam az UPC²-PDA és ESI-MS/MS rendszerek kapcsolását egy T idomú kapcsolóelem és egy



közbeiktatott, ionizációt elősegítő folyadék áramoltására alkalmas „segéd” pumpa segítségével. Ily módon a 30 modell komponensből CH_3OH koeluens használata esetén 25 detektálhatóvá vált. Azt tapasztaltam, hogy az UPC^2 rendszerben az alkalmazott összeállítás tekintetében a CH_3OH a jobb elválasztást biztosító koeluens a CH_3CN koeluenssel szemben, ugyanakkor a CH_3CN a hőmérséklet növelésével és a CO_2 sűrűségének csökkenésével nagyobb mértékben befolyásolja az elúciós viszonyok alakulását, mint a CH_3OH .



5.2. Imazalil nyomon követése a szüretelés után kezelt citromhéjtól egészen az azzal készült süteményig

5.2.1. Célok megfogalmazása

Ebben a fejezetben azt tűztem ki célul, hogy képet kapjak az imazalil teljes életútjáról a nyers alapanyagtól, azaz a felhasználásra kerülő citromhéjtól kezdve egészen a komplex mátrixú, analitikai szempontból zsirosnak számító házi készítésű süteményig (citromos muffin). Összehasonlítottam két, a 2.3.1 fejezetben részletesen ismertetett, gyakran alkalmazott multi-komponenses módszert egész citrom, citromhép és gyümölcshús mátrixra (AOAC 2007.1 és EN 15662:2008). Az összehasonlítás koncentráció meghatározáson, az abból számított anyagmérlegen, és az elkészült extraktum felhasználhatóságán alapszik, amelyet MRM üzemmódban használt HPLC-ESI-MS/MS berendezéssel követtem nyomon. A megfelelő mérési módszer kiválasztását követően a háztartások számára fellelhető, a betakarítás utáni szerek eltávolítására ajánlott citromhép mosási eljárások hatásfokát vizsgáltam meg, és erre a zsírtartalmú minta mátrixra alkalmas mintaelőkészítési módszert fejlesztettem ki. Imazalil sztenderd oldattal illetve imazalillal kezelt citromhéjjal adalékolt házi készítésű sütemény minta segítségével követtem nyomon az imazalil bomlását a sütési folyamat során. A mátrixhatás vizsgálathoz külön mintát készítettem. Végezetül nem célzott imazalil metabolit keresést és szemi-kvantitatív elemzést hajtottunk végre a mosási kísérlet, illetve az adalékolt muffin mintákban talált imazalil metabolitra.

5.2.2. Mintaelőkészítés, használt kromatográfias beállítások

5.2.2.1. Minta kiválasztása és mintaelőkészítés a módszerek összehasonlításához

A kísérletekhez felhasznált, a címke alapján imazalillal kezelt citrom mintákat öt különböző kiskereskedelmi egységben szereztem, be majd 127 növényvédő szermaradványra mennyiségileg analizáltam őket (Kmellár et al. 2010). A megfelelő minta kiválasztása után abból további két kg-ot szereztem be, melyet két részre osztottam: 1 kg-ot egészben, 1 kg citromot pedig meghámozva homogenizáltam, majd a lehámozott citromhéjat szintén külön mintarészként kezeltem. A minták előkészítése két, egymástól részben eltérő QuEChERS módszer alapján történt.

Az EN 15662:2008 mintaelőkészítési módszerrel előkészített mintaoldatok imazalil tartalmát (az első mérést is beleszámolva) egy hónapon keresztül heti rendszerességgel mértem vissza az 5.3.2 fejezetben részletezett módszerrel, hogy megállapítsam a



célkomponens bomlásának mértékét. A mérésekig a mintákat fagyasztóban tároltam $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

5.2.2.3. Mintaelőkészítés AOAC 2007.1 illetve EN 15662:2008 alapján

5.2.2.3.1. AOAC hivatalos módszer alapján elvégzett mintaelőkészítés leírása

A homogenizált citrom mintákból (egész citrom, citrombél) 15,0 g-ot mértem 50 mL-es, kúpos aljú PP centrifugacsövekbe. A citromhéjból 3,75 g került bemérésre, melyet 15 g-ra vízzel egészítettem ki. Mindhárom mintából öt párhuzamos készült. Az extrakcióhoz 15,0 mL CH_3CN -t (1% v/v% ecetsavval), 100 μL TPP-t (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 6,0 g vízmentes MgSO_4 sót és 1,5 g vízmentes nátrium-acetátot kellett a bemért mintákhoz adagolni, majd kézzel 1 percen át erőteljesen rázni. Ezután 1 perces centrifugálás következett ($>1500\text{ g}$). A felülúszóból 5 mL-t 15 mL-es centrifugacsövekbe mértem, amelyek már tartalmaztak 750 mg vízmentes MgSO_4 sót és 250 mg PSA-t. A centrifugacsöveket 30 másodpercig kézzel erőteljesen ráztam, majd 1 percre centrifugába helyeztem ($> 1500\text{ g}$). A felülúszót ötszörösére hígítottam (x5 hígítás = 400 μL mintához 1600 $\mu\text{L H}_2\text{O}$), majd 0,45 μm átmérőjű PTFE szűrőn szűrtem. A citromhéj és egész minta esetén ötszörös helyett ötvenszeres hígítást alkalmaztam majd, az így kapott oldatokat sztenderd addícióval kalibrálva mértem.

5.2.2.3.2. EN 15662:2008 szabvány módszer alapján végzett mintaelőkészítés leírása

A homogenizált citrombélből és egész citromból 10,0-10,0 g-ot, a darált citromhéjból pedig 2,5 g-ot mértem be 50 mL-es PP centrifugacsöbe. A citromhéjat vízzel 10,0 g-ra egészítettem ki (n=5). A bemért darálmányokhoz 10,0 mL CH_3CN -t és 100 μL $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációjú TPP oldatot adtam, majd kézzel erőteljesen ráztam 1 percen keresztül. A kisózási lépést só keverék (4 g vízmentes MgSO_4 , 1 g NaCl, 1 g trinátrium-citrát, 0,5 g dinátrium-hidrogén-citrát) hozzáadásával végeztem. A savas közeg miatt 600 μL 2 M koncentrációjú nátrium-hidroxiddal korrigáltam a minták pH-ját. Ezt követte a centrifugacsövek erőteljes rázása kézzel 1 percen át, majd 5 perces centrifugálás ($> 3000\text{ g}$). A felülúszó 15 mL-es centrifugacsövekbe került, amelyeket egy éjszakára mélyhűtőbe helyeztem ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) a zsír és a viasz kifagyasztásához. a következő napona CH_3CN -es extraktumokból

6 mL-t pipettáztam 15 mL-es PP centrifugacsövekbe, amelyek már tartalmaztak 150 mg PSA-t és 900 mg MgSO_4 -ot. Egy perces erőteljes rázás következett kézzel, majd 5 perces



centrifugálás (> 3000 g), végül a tisztított extraktumokból 4 mL-t csavaros fedelű üvegcsékbe töltöttem át, amelyhez 40 μ L 5 v/v% hangyasavval savanyított CH_3CN -t adagoltam. A gyümülcshús minta esetén ötszörös, a héj és egész gyümölcs minta esetén ötvenszeres hígítást követően 0,45 μ m pórusméretű PTFE szűrőn átszűrt oldatokat használtam fel a műszeres analízishez.

5.2.2.4. Különböző citrom mosási technikák alkalmazása az imazalil eltávolítására

Öt féle citromhéj mosási technikát vizsgáltam (M2/Note 1); ehhez olyan citrom mintát szereztem be, amelynek felülete nem érintkezett semmilyen egyéb szennyeződéssel az adott kereskedelmi egység eladótérében (vásárlók kezén lévő szennyeződés, zsír, stb.), továbbá biztosan egy mintatömegeből származott, így közelítően homogén volt a felületen lévő növényvédő szer bevonat. A mintán nem tüntették fel a kezelés mikéntjét, viszont a minta lédús kiszerelésű (ömlesztett) volt, és így feltételezhetően a gyümölcsök egymáshoz dörzsölődtek a szállítás során. A mosási kísérlethez hat, egyenként nyolc darabos csoportot képeztem (közelítőleg 0,8 kg/csoport) a beszerzett, 4,5 kg tömegű citromból. Az első csoportot mosás nélkül hámoztam meg (kontroll minta). A második csoportot egyesével hideg víz alatt 20 másodpercen keresztül tisztítottam kézzel. A harmadik adagot „dörzsi” szivaccsal (vileda, magyarországi) súroltam hideg folyóvíz alatt, minden egyes darabot 20 másodpercig. A negyedik minta 5%-os almaecetben ázott 10 percig, majd folyó hideg víz alatt „dörzsi” szivaccsal minden darabot 20 másodpercig súroltam. Az utolsó citrom minta minden darabját mosószeres „dörzsi” szivaccsal dörzsöltem folyó hideg víz alatt 20 másodpercen át. Az előkezelt minták héját hámozás után az EN 15662:2008 szabvány módszer alapján készítettem elő a fent leírtak alapján (n=5).

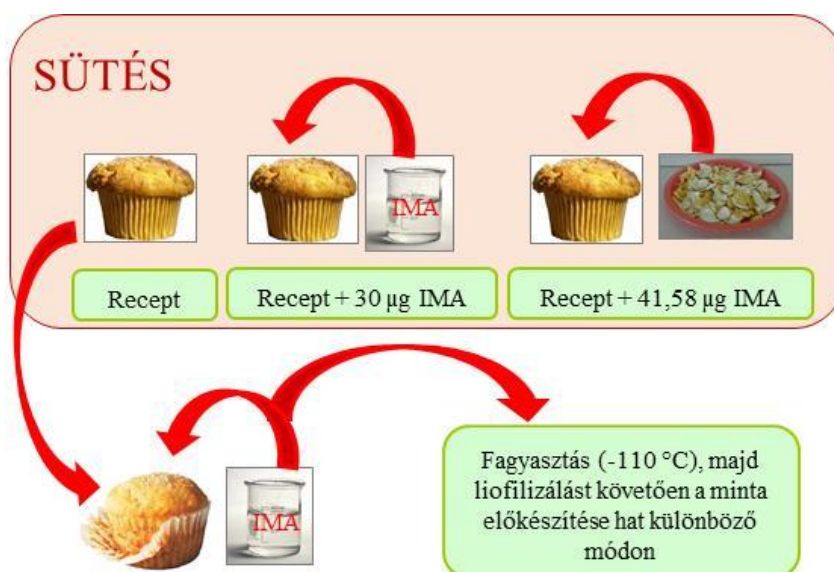
5.2.2.5. Mintaelőkészítési módszer optimalizálása imazalil kimutatására zsíros mintamátrixból

Három adag muffint sütöttem, melyeket az alábbi recept alapján készítettem el (Internet 9). Hozzávalók: két bögre liszt (200 g), fél bögre cukor (62 g), három teáskanál sütőpor (2 g), fél teáskanál só (0,5 g), $\frac{3}{4}$ bögre tej (112 g), $\frac{1}{3}$ bögre olaj (50 mL) és egy darab tojás (28,25 g; négy tojásból tojáslevet készítettem, a legelső tojás pontos tömegét mértem csak meg, és ugyanannyit mértem ki minden alkalommal). A folyékony és a száraz alapanyagokat külön edényzetben kevertem össze, majd egybe öntöttem és kézi mixerrel (Bosch MFQ 3010 magyarországi), homogenizáltam. Sütés után ez szolgált hőkezelt kontroll mintaként és ezt használtam fel a mintaelőkészítési módszer optimalizálásához. A második



adaghoz 30 mL térfogatú, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációjú etanolban imazalil oldatot adtam a folyékony alapanyagokhoz (tej, olaj). A harmadik adag tésztához egy púpos teáskanál (11,0 g), ismert imazalil koncentrációjú ($3,78 \mu\text{g g}^{-1}$) citromhéjat adtam, amellyel így $41,58 \mu\text{g}$ imazalilt mértem be. Az elkészített tésztákat 200°C -on 25 percig sütöttem úgy, hogy az egyes adagok teljes tészta mennyisége egyenként 5 db. muffint adjon ki. A kész muffinok minden egyes darabját sütés előtt és sütés után is lemértem, majd ledaráltam és homogenizáltam. A módszer optimáláshoz 200 g kontroll mintához 200 mL etanolt kevertem, amely $40 \mu\text{g}$ imazalil sztenderdet tartalmazott. Az elegy homogenizálása után a mintát egy órán keresztül a liofilező jégcsapdájában -110°C -on fagyasztottam, majd liofileztem, ezután hat különböző mintaelőkészítési módszer alapján dolgoztam fel. A két multi-komponenses módszert (EN 15662:2008 és AOAC 2007.01) három-három pontban módosítottam, hogy alkalmas legyen zsíros mátrixból történő célkomponens kinyerésére; (i) 5 mL normálhexánt adtam az extraháló oldószerhez, (ii) a PSA mennyiségével megegyező C_{18} szorbenst használtam a tisztítási lépésnél (EN 15662:2008 150 mg, AOAC 2007.1: 250 mg), (iii) a tisztítási lépést megelőzően fagyasztással kezeltem a mintákat a zsírok és olajok kifagyasztásának érdekében (-18°C , 12 óra). A mintaelőkészítés menetét is módosítottam az alábbiak szerint: 5 g darált muffint mértem ki 50 mL-es PTFE centrifugacsövekbe, amelyhez 15 g H_2O -t adagoltam. Az elegyeket 30 percen keresztül homogenizáltam, öt percenként kézzel rázva egy percen keresztül. Ezután következett a fent leírt módosításokkal a hat különböző mintaelőkészítés úgy, hogy a mintákat 4100 g terheléssel centrifugáltam és a kézi homogenizálás idejét megdupláztam. Ebben az esetben sztenderd addíciót használtam a mennyiségi meghatározáshoz (5. ábra).

A HPLC-ESI-QTOF-MS mérésekhez a minta extraktumok 1 mL mennyiségén oldószerváltást hajtottam végre. Az extraktum gyakorlatilag 100% acetonitril összetételűnek tekinthető, amely nem injektálható 10% acetonitrilt tartalmazó induló gradienst, mivel kromatográfiás átérés és instabil retenciós idő jelensége léphet fel. Mivel a vizsgálat célja metabolit kutatás volt, az egymást követő párhuzamos injektálások retenciós idejének ismételtetősége (a rendelkezésre álló, korlátozott opciókkal felszerelt, belső sztenderd segítségével retenciós idő csúszást kompenzálni nem képes szoftver miatt) rendkívül fontos a megerősítés céljából.



5. ábra: Mintaelőkészítési módszer sematikus ábrája

5.2.2.6. Felhasznált statisztikai módszerek

A két multi-komponenses módszerrel (EN 15662:2008 és AOAC 2007.1) kapott eredmények összehasonlításához a különbözőképpen előkészített citromhéj minták, egész citrom minták és citrom gyümülcshús minták mért értékeit kétmintás párosítatlan t-próbával hasonlítottam össze. A mosások összehasonlításához egyutas ANOVA-t használtam, melynek kiegészítő próbája a Welch-teszt. A páronkénti szignifikáns differenciát Tucky vagy Fischer teszttel vizsgáltam meg.

5.2.3. Használt módszerek, készülékeállítások

A HPLC-ESI-MS/MS rendszerben az imazalil mennyiségi meghatározásához az alábbi kromatográfias beállításokat alkalmaztam: oszlopként Zorbax Eclipse XDB-C₈-at (Agilent, 4,6 µm x 150 mm, 5 µm) választottam, melyhez tartozott egy azonos töltetű előtét oszlop. A HPLC oszlopot 30 °C-on temperáltam a mérések során. Az „A” eluens összetétele H₂O 0,1 v/v% hangyasavval, míg a „B” 100% CH₃CN volt. Az injektált mintaoldatokban (10 µL) minden esetben 20% volt a CH₃CN aránya. A műszeres mérés során használt gradiens elúciós program a következő volt: 20% „B” 3 percig, majd 30 perc alatt ért el a gradiens 100% „B”-re, 3 percen keresztül 100% „B”-n maradt, majd 0,1 perc alatt visszatért a kezdeti eluens összetételre, végül 9 percig ekvilibráltam az oszlopot a következő injektálást megelőzően. A térfogatáram 0,6 mL perc⁻¹ volt. A készüléket MRM módban használtam az imazalil peszticid meghatározására. A mintaelőkészítések során belső sztenderdként TPP-t



(Trifenil-foszfát) használtam a mintaelőkészítés jóságának igazolására (tehát nem a mennyiségi átment korrekciójához; 9. táblázat). A koncentráció számításához csak a mennyiségi 297,2/201,0 átmentet vettem figyelembe.

9. táblázat: Az imazalil és a TPP MRM átmenetei és optimált lencse potenciáljai pozitív ion módban

Célkomponens	M	[M+H] ⁺	fragmens	DP	EP	CEP	CE	CXP	R _t (min)
Imazalil	297,2	297	201,0	46	4	14	23	4	13,6
Imazalil			159,0				31	4	
TPP	326,0	327,2	152,2	61	12	17	43	4	26,7
TPP			215,0				33	4	

A feltételezett imazalil metabolitok keresését és az imazalil félkvantitatív meghatározását HPLC-ESI-QTOF-MS berendezéssel végeztem. Az „A” eluens H₂O 0,1 v/v% hangyasavval volt, a „B” pedig 100% CH₃CN 0,1 v/v% hangyasavval kiegészítve. A gradiens elválasztáshoz a következő programot használtam: 0-5 percig 10% „B”, 5-25 percig lineáris gradiens 100% „B”-ig, amelyet további két percig tartott a rendszer, majd 0,1 perc alatt visszatért a gradiens 10% „B”-re, végül 5 perc ekvilibrálás következett. A használt oszlop típusa Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (Agilent, 2,1 mm x 50 mm x 3,5 μm) volt. A tömegspektrométer következő paraméterekkel működött: kapilláris feszültség 3500 V, porlasztó gáz 40 psig, szárító gázáram 5 L perc⁻¹ 325 °C-ra melegítve, a skimmer feszültség 65 V, az oktopol beállítása 1 rf, a fragmentor feszültség pedig 175 V.

5.2.4. Eredmények

5.2.4.1. Mintakiválasztás

A kiskereskedelmi forgalomból beszerzett citrom minták peszticid tartalmát Kmellár és munkatársai (2010) által leírt módszerrel határoztam meg. Mind az öt mintában a csomagoláson feltüntetett imazalilon kívül más szermaradványok is jelen voltak. Az 1., 2., és 5. minta mitózist gátló karbendazimot (az Európai Unióban nem engedélyezett fungicidet) is tartalmazott, ráadásul az 5. mintában mért koncentráció meghaladta az erre a mátrixra megállapított MRL értéket (700 ng kg⁻¹). Ellentmondásosnak tűnhet az, hogy bár betiltott szer, létezik rá határérték; ennek oka, hogy számos „pro-pesticidje” van, melyek bomlástermékeként jelen lehet. Egyik ilyen „pro-pesticidje”, a tiofanát-metil, engedélyezett fungicid, melyből a 2. mintában MRL határérték alatti koncentráció volt mérhető. Metionin szintézist gátló fungicidet, pirimetanilt tartalmazott a 4. minta, míg az 1., 2., 4. és 5. minta



juvenil hormon analóg inszekticidet, piriproxifen tartalmazott. Fontos kiemelni, hogy amíg az 1. és 2. minta piriproxifen tartalma mennyiségi meghatározási határ alattinak adódott, ezzel ellentétben az 5. mintában határérték feletti koncentrációt mértem. iprodiont tartalmazott a 2. és a 4. minta; ez a vegyület elég széles körben alkalmazott, jelátviteli folyamatokat gátló fungicid, ebben a kultúrában azonban nem engedélyezett, sőt a 2. mintában mért koncentráció meghaladta az MRL értéket. Ugyancsak MRL értéket meghaladó koncentrációban mértem klórprofámot a 3. mintából, míg diazinont (szerves foszfonsav észter, inszekticid) mutattam ki nyomokban a 2., 3. és 4. mintákból, amely szintén nem engedélyezett szer. A két multi-komponenses módszer összehasonlításához szükséges kísérletekhez a 2. mintát választottam ki, amelynek imazalil tartalma a legnagyobb volt.

10. táblázat: Az öt különböző kereskedelmi egységből beszerzett citrom minta növényvédő szer profilja Kvellár et al. (2010) módszere szerint (n=3).

Peszticid	MRL $\mu\text{g g}^{-1}$	1. minta $\mu\text{g g}^{-1}$	2. minta $\mu\text{g g}^{-1}$	3. minta $\mu\text{g g}^{-1}$	4. minta $\mu\text{g g}^{-1}$	5. minta $\mu\text{g g}^{-1}$
Karbendazim	0,700	0,030	0,137	-	-	1,243
Klórprofám	0,010*	-	-	0,054	-	-
Diazionon	0,010*	-	<0,005	0,006	<0,005	-
Imazalil	5,000	<0,005	1,474	0,087	1,369	0,983
Iprodione	0,010*	-	0,015	-	0,009	-
Pirimetamil	8,000	-	-	-	0,130	-
Piriproxifen	0,600	<0,005	<0,005	-	0,009	1,377
Tiofanát-metil	8,000	-	1,834	-	-	2,698

*nem engedélyezett növényvédő szer, a fent megjelölnél alacsonyabb meghatározási határral rendelkező készüléken kell mérni

5.2.4.2. AOAC 2007.1 és EN 15662:2008 multi-komponenses módszerek használatának összehasonlítása

A megfelelő imazalil koncentrációjú citrom kiválasztása után a két mintaelőkészítési módszer alapján elkészítettem a mérendő mintaoldatokat a különböző mintarészekre (egész gyümölcs, héj, gyümölcsbőr), minden esetben öt párhuzamossal. A mennyiségi kiértékelést sztenderd addícióval hajtottam végre, 0, 50, 100, 150 ng g⁻¹ koncentrációjú addíciós pontokkal (M2/SM Table 1). A különböző mintarészekben mért átlagos imazalil koncentrációkat ($\mu\text{g mL}^{-1}$ egységben, n=5) és a hozzájuk tartozó kvantitatív paramétereket a 11. táblázatban összesítettem. Ezek közül az egyik fontos paraméter a felhasznált belső sztenderd visszamért koncentrációjának relatív szórása (RSD %). A belső sztenderdet nem az értékek korrigálásához használtam fel, hanem a mintaelőkészítés és a műszeres mérés jóságának



követéséhez. Várakozásaimnak és a szakirodalomnak megfelelően az imazalil főleg a citromhéj mintarészben volt mérhető: az egész citromban mért imazalil koncentráció közel ötöd annyinak bizonyult, mint a citromhéjban meghatározott.

11. táblázat: AOAC 2007.1 és EN 15662:2008 módszerekkel végrehajtott mintaelőkészítés után a különböző mintarészekre mért imazalil koncentráció és további kvantitatív paraméterek

Módszer	Minta rész	Imazalil átlaga, $\mu\text{g g}^{-1}$	TPP integrált terület, RSD%	Imazalil koncentráció, RSD%	Kalibrációs egyenes meredeksége, cps/(ng mL ⁻¹)	R ²
AOAC 2007.1	Citromhéj	7,46	4,7	2,0	3442	0,997
	Citrombél	0,10	4,2	1,5	3679	0,999
	Egész citrom	0,98	24,1	7,2	3694	0,990
EN 15662:2008	Citromhéj	9,32	4,4	2,3	3324	0,999
	Citrombél	0,12	2,9	3,8	3484	0,998
	Egész citrom	2,03	2,8	5,9	3161	0,996

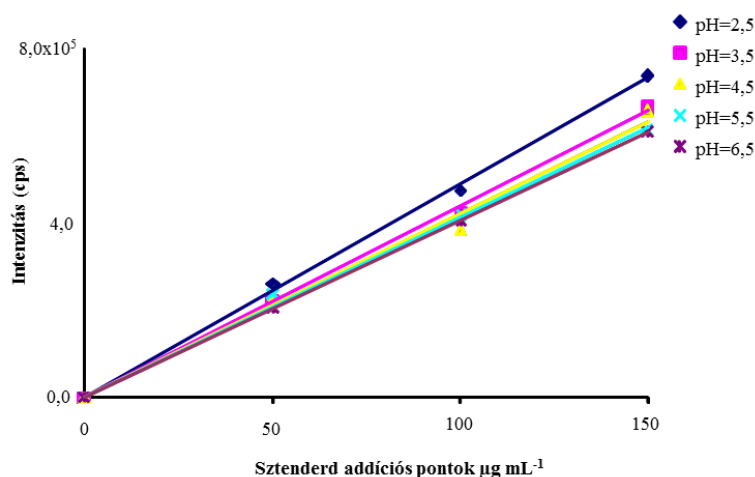
Az EN 15662:2008 mintaelőkészítést követően a mintarészekben mért imazalil koncentráció rendre nagyobb volt, mint az AOAC 2007.1 módszer alapján előkészítettekében. Fontos kiemelni, hogy az AOAC módszerrel előkészített egész citrom minták RSD % értéke 20%-nál nagyobb, noha a belső sztenderd (TPP) RSD %-a nem haladta meg a 10%-ot sem. Ezek alapján elmondható, hogy az AOAC módszerrel egész citromra végzett QuEChERS mintaelőkészítés nem szolgáltatott kellően reprodukálható kinyerési hatásfokot

A kétféle mintaelőkészítés során egyéb eltérések is megfigyelhetők voltak, mint például az elkészített végső analitikai minták eltérő színe. Az AOAC 2007.1 módszer alapján citromhéjból és citrombélből elkészített mintaoldatok áttetszők voltak, ugyanakkor azonos kiindulási alapanyagból az egész citrom végső extraktumának egyik-másik párhuzamosa különböző mélységű sárga színű lett. Az EN 15662:2008 módszerrel előkészített extraktumok közül csak a citromhéj minták voltak színtelenek.

A mintaoldatok különböző színmélysége mellett azt vettem még észre, hogy az AOAC módszer által előírt centrifugálás során, a kisebb fordulatszám és a rövid kezelési idő miatt, a felülúszó kevésbé vált el a sóktól, mint az újabb EN módszer (2008) alapján centrifugált mintáknál, melyekre nagyobb fordulatszámú és hosszabb idejű eljárás volt előírva. Ez pedig azt eredményezte, hogy kevesebb felülúszó keletkezett a régebbi multi-komponenses módszer szerint előkészített mintákból. Mindez azért okoz problémát, mert így nem lehettem benne teljesen biztos, hogy az általam számolt térfogatok megegyeznek-e a tényleges

térfogatokkal. Érdeemes megjegyezni, hogy Kmellár és munkatársai magasabb fordulatszámú centrifugálást és 1,5 g Na-acetát helyett 2,5 g használatát javasolták w(2010). Ezzel a módszerrel ugyanazon mintából a mért imazalil koncentráció $1,47 \mu\text{g g}^{-1}$ -nak adódott, ez az érték magasabb, mint ami az eredeti AOAC 2007.1 módszerrel volt mérhető ($0,98 \mu\text{g g}^{-1}$), viszont még mindig alatta marad a EN 15662:2008 multikomponenses módszerrel mérhető ($2,03 \mu\text{g g}^{-1}$) koncentrációnak. Tehát a centrifugálás intenzitása és a pH nagyban befolyásolja az imazalil kinyerhetőségét.

A pH befolyásolja a mérés érzékenységét is. Különböző kémhatású oldatokban (pH= 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; hangyasav illetve NH_3 oldatokkal beállítva) elkészített különböző koncentrációjú imazalil sztenderdeket mértem meg a HPLC-ESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel. A visszamért célkomponens-koncentráció alakulását a pH függvényében a 6. ábra szemlélteti. A diagramon látható, hogy a mintaoldat pH csökkenésével a mérés érzékenysége nő. Mivel egyik multi-komponenses módszer sem írja elő az egyes minták pH értékének ellenőrzését vagy beállítását közvetlenül a mérés előtt, ezért ennek a mérésre gyakorolt hatását is gorcsó alá vettem. A 6. ábrán bemutatott összefüggés a mátrix illesztett kalibráció nem kellően robusztus jellegére utalhat.



6. ábra: Azonos töménységű imazalil sztenderd oldatok jelintenzitásának alakulása különböző pH értékek függvényében

A mintaelőkészítési multi-komponenses módszerek további összevetéséhez és jóságuk vizsgálatához anyagmérleget készítettem. Ehhez a mintaelőkészítés megkezdése előtt megmértem 1 kg citrom, valamint 1 kg citromhéj és gyümülchús pontos tömegét (gramm pontossággal), majd az ismert mintarész tömegeket megszoroztam az azokból mért imazalil koncentrációkkal, és az egész mintára kapott összes imazalil mennyiséget vettem össze a



gyümölcsbőrre és a héjra kapott imazalil mennyiségének összegével. A kapott eredményeket a 12. táblázat tartalmazza. Az AOAC módszerrel előkészített minták esetén a héj és a gyümölcsbőr mintarészekben található imazalil mennyisége összesen 2,34 mg volt, míg az egész gyümölcsre számolva 1,14 mg - ez utóbbi kevesebb, mint a fele a vártnak. Az EN 15662:2008 mintaelőkészítéssel pontosabb anyagmérleget tudtam visszamérni: a mintarészekben az összes imazalil mennyisége 2,92 mg lett, az egész citromra meghatározott mennyiség pedig 2,35 mg, így a két eredmény megközelítőleg azonosnak tekinthető, figyelembe véve a szórás mértékét és a tömegkorrekciónál használt szorzószámokat.

12. táblázat: Két különböző mintaelőkészítési módszer után meghatározott imazalil koncentráció alapján számított célkomponens anyagmérleg a különböző mintarészekre. IMA=imazalil

Mintarész megnevezése	Mintarész össztömege, g	mg IMA/Mintarész AOAC (2007)	mg IMA/Mintarész EN (2008)
Gyümölcsbőr	855	0,09	0,10
Héj	302	2,26	2,82
Gyümölcsbőr + Héj	1157	2,34	2,92
Egész citrom	1157	1,14	2,36

Ahhoz, a hogy mintaoldatok stabilitásáról képet kapjak, az előkészített minta extraktumokat három hétig tároltam fagyasztoóban (-18 °C) és heti rendszerességgel visszamértem. A 0. héten mért mintákat, azaz az előkészítést követő első mérést tekintettem 100%-nak. Azért, hogy biztonsággal meg tudjam állapítani, a kapott százalékos eltérés ill. koncentráció csökkenés nem szórásból fakad-e, két mintás t-próbát végeztem a tárolás 0. és 3. héten mért párhuzamos koncentráció értékeire (n=5; M2/SM Table 2). A három hetes tárolás során az AOAC mintaelőkészítés alapján készült citromhéj extraktumokban lévő célkomponens nem szenvedett jelentős bomlást (0,1%). Az EN módszer szerinti mintaelőkészítés esetén az imazalil 12,5%-ban bomlott. A P érték kisebb, mint 0,0001, tehát a koncentráció csökkenés nem szórásból fakad. Az egész citrom minta esetén AOAC módszerrel 2,3% volt a mért koncentráció csökkenés. Statisztikailag bizonyítottam, hogy ez szórás jellegű, viszont az EN 15662:2008 módszer szerint készült minták imazalilkoncentráció csökkenése 10,3%, amely szignifikáns csökkenésnek számít (M2/SM Figure 2 b). Az egész citrom mintánál mért eredményekből készített ábrán (M2/SM Figure 2 c) szemmel is látható a koncentráció különbség. Az eltérésnek több oka lehet, például az elhibázott mintaelőkészítés, illetve a pH befolyásoló hatása a mérések során. Mivel azonban minden mintából öt párhuzamos készült, így nem valószínű, hogy hibás volt az összes mintaelőkészítés; sokkal valószínűbb, hogy az AOAC 2007.1 módszer kevésbé robusztus pH kontrolljából fakad az eltérés.



A gyümölcshúsban alig század annyi imazalil volt kimutatható, mint a citromhéjban. A visszamérések során itt sem volt számottevő imazalilkoncentráció csökkenés: a bomlás mértéke AOAC esetén 2,8%, míg az EN módszer alapján készült minták esetén 1,4%-ra tehető. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az EN szabvány módszerrel előkészített citrom mintákból tudtuk reprodukálhatóbban és feltehetően pontosabban kimutatni az imazalil koncentrációját, ezért a további kísérletek során ezen módszer szerint készítettem elő a mintákat.

5.2.4.3. Különböző mosási eljárások hatékonyságának vizsgálata

A 13. táblázatban összegeztem a korábban az 5.2.2.4. fejezetben ismertetett, a citrusok felületi szermaradványainak eltávolítására irányuló mosási kezelések után mért imazalil koncentráció értékeket. A mintaelőkészítés során az EN 15662:2008 szabvány módszer alapján dolgoztam. A kísérlethez nem a 2. mintát használtam.

13. táblázat: Különböző mosási eljárások után mért imazalil koncentrációk és további analitikai mérőszámok

Mosási technika	Imazalil átlag, $\mu\text{g g}^{-1}$	Imazalil koncentráció, RSD%	TPP integrált terület, RSD%	Meredekség, $\text{cps}/(\text{ng mL}^{-1})$	R^2
Kontroll	3,79	5,36	7,90	3170	0,999
Hideg vizes	3,70	5,43	5,35	3652	0,994
Hideg vizes +	3,19	4,58	6,60	3264	0,996
Meleg vizes +	3,60	4,60	4,75	3196	0,999
Almaecetes +	2,66	5,51	10,11	3452	0,995
Mosogatószeres +	3,07	6,78	2,91	3004	0,972

+ = mechanikai behatás háztartási dörzsölő szivaccsal

Minden minta esetén öt párhuzamos mintaelőkészítést végeztem. Az imazalil koncentráció értékei alapján számolt RSD %-ok sehol nem érik el a 15%-ot, ami azt jelenti, hogy kellően reprodukálható kinyerési hatásfokot értem el az analízis során. Krueve és kutatócsoportja (2007) szüretelés utáni felületi kezelésként visszamaradt tiabendazol és imazalil szermaradványok eltávolításra tettek kísérletet narancs minta esetén. Hozzájuk hasonlóan én sem találtam alkalmasnak egyetlen mosási eljárást sem az imazalil legalább egy nagyságrendben történő eltávolítására citrom esetén. A legjobb hatásfokú tisztításnak az almaecetes áztatást követő hidegvizes súrolás bizonyult, ám ezzel is csak a szermaradványok 30%-a volt eltávolítható. A mosási próbákat egyutas ANOVA statisztikai módszerrel is kiértékeltem (M2/Tables 3-5), amely szerint a minta kezelése három csoportra különíthetők el. Az „A” csoport (almaecetes kezelés) a leghatékonyabb. A „B” csoportba tartozó kezelések



hatásfoka statisztikailag megegyezik, tehát a mosogatószer + „dörzsi” szivacs és a hideg vizes „dörzsi” szivacsos mosás ugyanolyan mértékben hatékonyak az imazalil eltávolításában a citrom felületéről. A meleg vizes mosás + „dörzsi” szivacs, illetve hideg vizes mosás statisztikailag nem különülnek el a kontrolltól (C csoport elemei), így kimondható, hogy ezek 95% szignifikancia szint mellett vizsgálva nem tekinthetők semmilyen mértékben sem hatékonyak.

5.2.4.4. Zsíros mátrixra történő módszer adaptáció és adalékolási kísérletek

Az elkészített muffin mintáink zsiradék tartalma már az alapanyag összetételből történő számítások alapján meghaladta a 10%-ot; ez az érték nem tartalmazza a sütés során fellépő folyadékvesztéséből eredő korrekciót. Szegedi és munkatársai által fejlesztett (2011) NIR módszerrel megbecsültem a tényleges sütés utáni zsír és cukor százalékos arányát a kész muffinokban - a vonatkozó eredményeket a 14. táblázatban foglaltam össze.

14. táblázat: A kész muffin minták tényleges zsír és cukor tartalma

Minta típus	Cukor tartalom, m/m%	Zsirtartalom, m/m%
Kontrol muffin	15,2	12,1
IMA oldattal adalékolt muffin	15,6	12,4
Citromhéjjal adalékolt muffin	15,0	11,8

A muffinok zsirtartalma 11,8-12,4 m/m % közé esett. Zsíros édesipari mátrixból történő imazalil kinyerésre nem találtam eljárást a szakirodalomban, ezért hat különböző mintaelőkészítésnek vettem alá a kontroll mintából készített mintát (5.2.2.5 fejezet). Az eredményeket a 15. táblázat összegzi.

15. táblázat: Imazalil visszanyerési hatásfok vizsgálata zsíros mátrixú mintából (n=3)

Adott mintaelőkészítési módszerrel várt imazalil koncentráció, $\mu\text{g g}^{-1}$	Mintaelőkészítési lépések	Imazalil átlag koncentráció, $\mu\text{g g}^{-1}$	Visszanyerés, %
AOAC 2007.1; 0,230	C18	0,12	50,3%
	Hexán	0,13	57,3%
	Fagyasztás	0,20	87,2%
EN 15662:2008; 0,345	C18	0,30	87,6%
	Hexán	0,30	88,5%
	Fagyasztás	0,31	90,7%

Az EN 15662:2008 mindhárom módosítási lépés használata esetén kielégítette a SANTE által támasztott, visszanyerési hatásfokra vonatkozó követelményt (80-120%) (Jogszabály 1). Ennek a kritériumnak az AOAC 2007.1 kifagyasztással való módosítása is eleget tett (87,2%). Mivel a legnagyobb visszanyerési százalékot (90,7%) a fagyasztással módosított EN 15662:2008 módszerrel értem el, ezért a különböző módon adalékolt



muffinok imazalil tartalmát ezzel a mintaelőkészítési módszerrel határoztam meg. Fontos visszautalni Koesukwiwat és csoportjának eredményeire (2010), akik a legmegfelelőbb zsírtalanítási lépésnek zsíros mátrixú sütőipari termékekre a vizsgált 34 célkomponensre (melyek között ugyanakkor az imazalil nem szerepelt) a C₁₈ szorbenssel történő tisztítást találták. Valószínűleg a minta mátrixot alkotó zsiradék szerkezete nagyban befolyásolja, melyik zsírtalanítási lépés eredményez jobb kinyerési hatásfokot.

A 16. táblázatban az optimált mintaelőkészítési módszerrel előkészített muffin minták mérési eredményei szerepelnek. Azokból a muffinokból, amelyekhez a citromhéjat adtam hozzá, több imazalil volt visszamérhető, kisebb szórással (77,7%). Ezzel ellentétben az etanolban oldott imazalilos adalékolás imazalil tartalma jelentősen bomlott a sütés során (200 °C) Feltehetően ennek a jelenségnek az az oka, hogy az imazalil a szedést követő felületi kezelésnél a citromhéj mélyebb kutikula rétegeibe diffundálódott, és így kisebb hődegradációt szenvedett.

16. táblázat: Adalékolási kísérletre kapott imazalil koncentráció eredmények, n=5

Mintára várt koncentráció µg g ⁻¹ tészta	Imazalil átlag koncentráció µg g ⁻¹ tészta	Visszanyerés, %	RSD%
Kontroll,0	0,00	0%	-
Muffin + citromhéj, 0,18	0,17	77,7%	5,7%
Muffin + imazalil 0,073	0,07	47,9%	11,0%

5.2.4.5. Metabolit kutatás

Az imazalil egyetlen ismert bomlásterméke az IMA-M (C₁₁H₁₀N₂OC₁₂+H⁺; *m/z* 257,0248; Picó et al. 2010; Gilbert-López et al., 2007, Thurman et al. 2005). Az imazalil bomlás során egy -C₃H₃ összegképletű csoport veszítést szenved; az így kialakuló vegyület a továbbiakban IMA-M-ként fogom jelölni. Fordított fázisú oszlopon az IMA-M korábbi retenciós idővel jelenik meg, mint az IMA, mivel annál hidrofílebb komponensről van szó. Az IMA-M mindegyik mosási kísérletnek alávetett minta csoport extraktumból kimutatható volt. Mivel nem állt rendelkezésemre sztenderd, ezért csak félkvantitatív mennyiségi analízisre volt lehetőségem: a kontroll mintában található IMA-M EIC kromatogramjának csúcs alatti területét vettem 100%-nak és ehhez hasonlítottam a mosási hatásfok kísérletből származó extraktumokban található bomlástermék csúcs alatti területeit (17. táblázat).



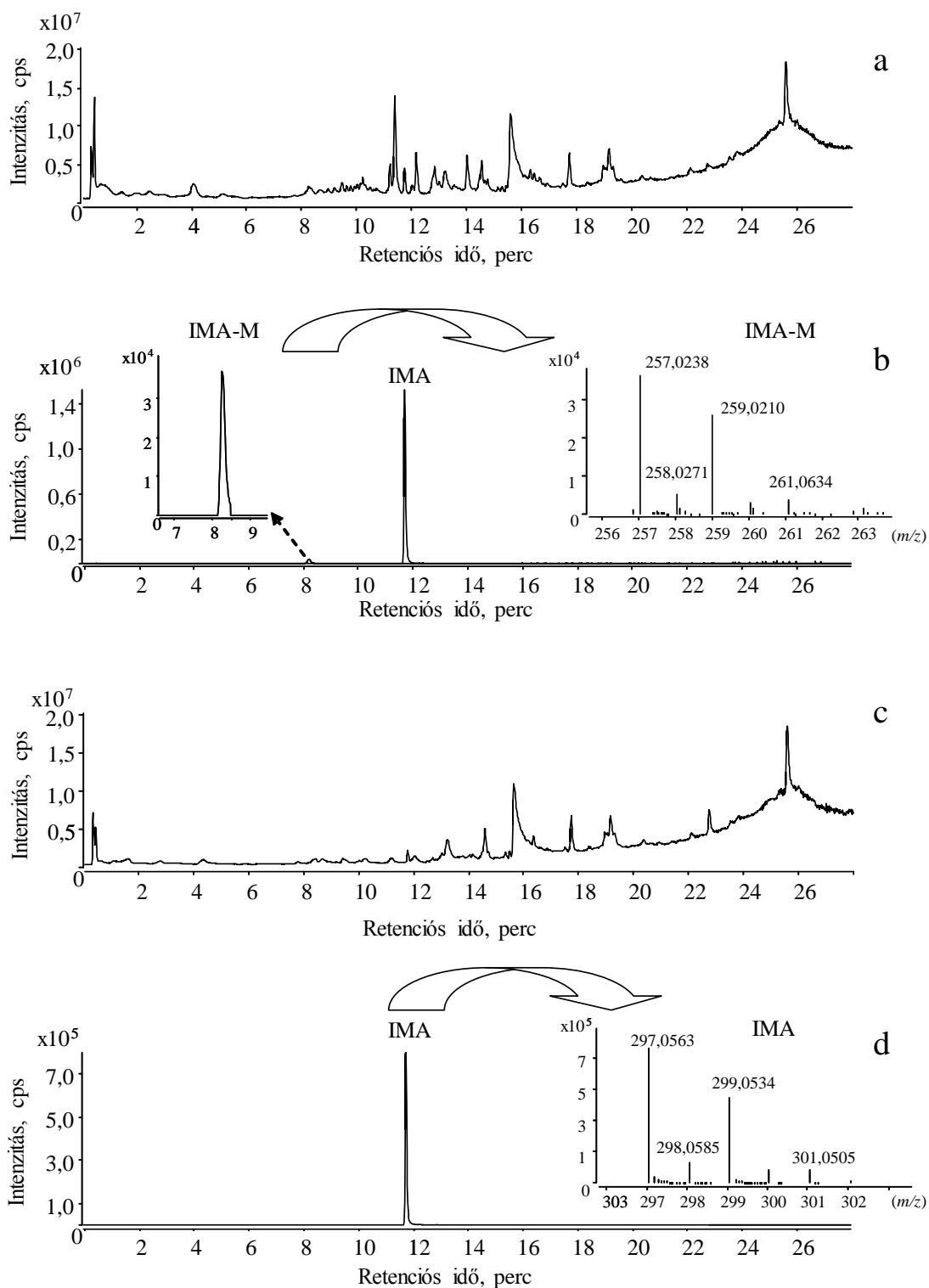
17. táblázat: Az IMA-M félkvantitatív analízisének eredményei a mosási kísérlet mintáiból

Mosási technika	viszonylagos mennyiség
Kontroll	100 %
Hideg vizes	159 %
Hideg vizes +	186 %
Meleg vizes +	146 %
Almaecetes +	186 %
Mosogatószeres +	149 %

+ = mechanikai dörzsölés

A táblázatból látható, hogy mindegyik mosási eljárás hatására nőtt az IMA-M kimutatott mennyisége. A legnagyobb százaléku növekedést az almaecetes áztatás eredményezte. Mivel az imazalil metabolitra még nincs MRL érték, ezért élelmiszerbiztonsági szempontból érdekes a kapott eredmény, hiszen nincs elérhető adat a bomlástermék toxicitásáról.

A muffin mintákat ugyancsak górcső alá vettem metabolomikai szempontból is. Cl-izotóp mintázat alapján mind az ismert, mind a korábbról nem ismert metabolitokat megszerettem volna találni, így erre a célra a Lénárt és munkatársai (2013) által közölt, nem célkomponens kereső automatikus Cl-izotóp mintázat felismerő MFE modellt használtam. A fent leírt metaboliton kívül nem találtam egyéb, Cl-izotóp mintázatot mutató komponenst, és azt is csak azon minta esetén, melynek tésztája citromhéjjal volt addicionálva a sütés előtt (7. ábra)



7. ábra Az adalékolt muffin minták HPLC-ESI-QTOFMS műszerrel mért eredményei: (a) citromhéjjal adalékolt muffin TIC kromatogramja (b) citromhéjjal adalékolt muffinban található IMA EIC kromatogramja és az IMA-M metabolit EIC kromatogramja ill. tömegspektruma citromhéjjal adalékolt muffin mintából extrahálva, (c) IMA oldattal adalékolt muffin TIC kromatogramja, (d) IMA oldattal adalékolt muffin mintában található IMA és az IMA-M EIC kromatogramja.



5.2.5. Összegzés

A gyakorlatban használatos multi-komponenses mintaelőkészítési módszerek összehasonlítása során azt tapasztaltam, hogy az EN 15662:2008 módszer szolgáltatja a pontosabb adatokat imazalilra nézve, citrom mátrixból.

A kipróbált mosási eljárások közül egyik technikával sem értem el legalább egy nagyságrendnyi imazalil csökkenést. A legnagyobb mértékben az almaecetes áztatást követő, „dörzsi” szivacsos, hideg vizes öblítés csökkentette a felületi imazalil koncentrációt (30%).

A zsíros mátrixból történő imazalil kimutatására alkalmazott módszerek közül a tisztítási lépés előtti kifagyasztással (-18 °C, 12 óra) kombinált EN 15662:2008 eredményezte a legjobb kinyerési hatásfokot (90,7%). A házi készítésű muffinok vizsgálata során arra az eredményre jutottam, hogy a nyers tésztahoz etanolban adalékolt imazalil közel 50%-ban bomlott el a hőkezelés hatására, míg a citromhéjat tartalmazó muffinokból a célkomponens 77,7%-ban volt visszamérhető. Feltehetően az imazalil a citromhéj kutikula rétegébe diffundálódott, ezáltal kevésbé degradálódott a hő (200 °C) hatására.

A mosási kísérletekből származó extraktumokat metabolomikai szempontból analizálva megállapítható, hogy az IMA-M metabolit mennyisége minden alkalommal nőtt, ugyanakkor a sütés során nem tapasztaltam számottevő IMA => IMA-M átalakulást. Imazalil oldattal adalékolt házi készítésű muffin mintában nem volt kimutatható mennyiségű IMA-M metabolit. Ebből arra következtethetünk, hogy a citrom mátrix jelenléte szükséges lehet a metabolit képződéséhez illetve az IMA-M a citrom kezelését követően a tárolás során alakul ki.



5.3. Különböző HILIC, kevert módú és egyéb vizes normál fázisú folyadékkromatográfiás elválasztási módszerek alkalmazhatóságának tanulmányozása analitikai kihívást jelentő poláris növényvédő szerek meghatározására, tömegspektrométer alapú detektálással

5.3.1. Célok megfogalmazása

A poláris peszticidek meghatározására számtalan módszer található a szakirodalomban, ugyanakkor ezek mindegyike csak igen alacsony számú növényvédő szert tud egy kromatogramon belül analizálni. PHD értekezésemben kilenc különböző kromatográfiás összeállítás teljesítményjelzőinek összehasonlítását tűztem ki célul 24 kiválasztott célpeszticid (M3/Figure S1) elúciós sajátosságainak vizsgálatával HPLC-ESI-TOF-MS berendezést használva Ezt követően az elválasztási oldalról legelőnyösebb kromatográfiás összeállítás alkalmazhatóságát vizsgáltam meg narancs minta mátrixra UHPLC-HESI-MS/MS és HPLC-ESI-QTOF-MS_2 analitikai rendszerekkel. A fejezetben használt szermaradványnév rövidítéseket a3.táblázat tartalmazza.

5.3.2. Adatértékelési protokoll

A 18. táblázatban foglaltam össze a vizsgálatba vont kromatográfiás oszlopokat, azok paramétereit és a különböző ionizációs módban optimált gradiens beállításokat. Félkvantitatív osztályozási rendszert hoztam létre, hogy a különböző kromatográfiás összeállítások teljesítményjelzői összehasonlíthatóvá váljanak. Az osztályozáshoz használt tapasztalati értéként a holttérfogattól való elválasztás mértéke (SV), a relatív érzékenység (R), és a csúcshélesség (P) szolgált. Az SV valójában a kapacitás faktor, amelyet az elméleti holttérfogatból és a retenciós időből számoltam. A P értéket az eluált csúcsok alapvonalnál mért szélessége adta, az R az $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációjú célkomponens jelenlétére vonatkoztatott csúcs alatti terület. Az optimált kromatográfiás paraméterek megállapítása után a célpeszticideket mind ESI+, mind ESI- módban injektáltam $0,1$ és $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban (n=5) a HPLC-ESI-TOF-MS műszerre, és a mellékletekben található kritérium rendszer szerint értékeltem (M3/Table S6). 100%-nak azt tekintettem, ha minden, az adott módban ionizálódó növényvédő szer a vizsgált jellemzőre pozitív értékelést kapott. Pozitív ion módban 17 vegyület ionizálódik; ha két növényvédő szer a holttérfogatban eluálódik, akkor az SV $15/17=88\%$ -os értéket vesz fel. Egy módszer átlagos teljesítmény százalékát az alábbi képlet szerint határoztam meg:



$(SV(\%)+R(\%)+P(\%))/3$ = a módszer összesített megfelelési százalékos értéke

A komponenseket a retenciós idő, valamint a legintenzívebb izotopológ pontos tömege alapján azonosítottam, figyelembe véve a vizsgált vegyület ionforrásban keletkezett, jellemző fragmenseit, amelyeket korábban tapasztalati úton határoztam meg (M3/Table S1-S2).



18. táblázat: A kilenc felhasznált kromatográfias oszlopra optimalt, részletes kromatográfias paraméterek bemutatása (oszlop temperálás 25 °C; az injektált térfogat minden esetben 20 µL volt).

Oszlop, típus & dimenzió	Eluens	Pozitív módszer (#1) paraméterek ESI (+)	Pozitív módszer (# 2) paraméterek ESI (+)	Negatív módszer paraméterek ESI (-)
1 - Kinetex HILIC; Phenomenex; 4,6 mm x 100 mm, 2,6 µm	A: 100 mM NH ₄ -formiát, pH=2,85 és hangyasav B: CH ₃ CN és 0,1% v/v hangyasav	0-10 perc 90% B-ről 75% B-re 10-11 perc 75% B 11-13 perc 75% B-ről 50% B-re 13-15 perc 50% B 15-17 perc 50% B-ről 2% B-re 17-20 perc 2% B Áramlási sebesség: 1,0 mL perc ⁻¹		0-5 perc 90% B-ről 75% B-re 5-6 perc 75% B-ről 50% B-re 6-8 perc 50% B 8-10 perc 50% B-ről 2% B-re 10-15 perc 2% B Áramlási sebesség: 1,0 mL perc ⁻¹
2 - Zorbax Rapid Resolution High Definition HILIC Plus; Agilent; 2,1 mm x 100 mm, 1,8 µm		0-10 perc 90% B-ről 80% B-re (0,2 mL perc ⁻¹) 10-13 perc 80% B-ről 40% B-re (0,3 mL perc ⁻¹) 13-16 perc 40% B (0,3 mL perc ⁻¹) Ekvibrálási idő: 5 perc		0-10 perc 90% B-ről 40% B-re 10-11 perc 40% B-ről 20% B-re 11-15 perc 20% B Áramlási sebesség: 0,5 mL perc ⁻¹
3 - Obelisc N; Sielc; 2,1 mm x 150 mm, 5 µm	Pozitív módszer: A: 20 mM NH ₄ -formiát, pH= 3,0 és hangyasav; B: CH ₃ CN Negatív módszer: A: víz és 0,1% v/v hangyasav; B: CH ₃ CN	0-1 perc 95% B (0,5 mL perc ⁻¹) 1-7 perc 95% B-ről 20% B-re (0,8 mL perc ⁻¹) 7-15 perc 20% B (0,8 mL perc ⁻¹) Ekvibrálási idő: 15-25 perc	0-1 perc 95% B (0,5 mL perc ⁻¹) 1-10 perc 95% B-ről 35% B-re (0,8 mL perc ⁻¹) 10-11 perc 35% B-ről 20% B-re (0,8 mL perc ⁻¹) 11-15 perc 20% B (0,8 mL perc ⁻¹) Ekvibrálási idő: 15-25 perc	0-4,5 perc 20% B (0,3 mL perc ⁻¹) 4,5-15 perc 20% B (0,8 mL perc ⁻¹)
4 - Obelisc R; Sielc; 2,1 mm x 150 mm, 5 µm	A: 20 mM NH ₄ -formiát, pH= 3,0 és hangyasav; B: CH ₃ CN	0-1 perc 95% B (0,4 mL perc ⁻¹) 1-7 perc 95% B-ről 20% B-re (0,4 mL perc ⁻¹) 7-15 perc 20% B (0,4 mL perc ⁻¹)	0-10 perc 95% B-ről 75% B-re 10-11 perc 75% B-ről 20% B-re 11-15 perc 20% B Áramlási sebesség: 0,4 mL perc ⁻¹	0-4,5 perc 20% B (0,5 mL perc ⁻¹) 4,5-15 perc 20% B (0,8 mL perc ⁻¹)
5 - Zorbax Rx-Sil; Agilent; 3,0 mm x 100 mm, 1,8 µm	A: 100 mM NH ₄ -formiát, pH= 2,85 és hangyasav B: CH ₃ CN és 0,1% v/v hangyasav	0-1 perc 90% B-ről 70% B-re (0,5 mL perc ⁻¹) 1-6 perc 70% B-ről 60% B-re (0,5 mL perc ⁻¹) 6-6,5 perc 60% B-ről 10% B-re (0,8 mL perc ⁻¹) 6,5-12 perc 10% B (0,8 mL perc ⁻¹)	0-10 perc 90% B-ről 80% B-re (0,3 mL perc ⁻¹) 10-13 perc 80% B-ről 40% B-re (0,4 mL perc ⁻¹) 13-20 perc 40% B (0,4 mL perc ⁻¹)	0-1 perc 90% B-ről 70% B-re (0,5 mL perc ⁻¹) 1-7 perc 70% B-ről 60% B-re (0,5 mL perc ⁻¹) 7-7,5 perc 60% B-ről 20% B-re (0,5 mL perc ⁻¹) 7,5-10 perc 20% B (0,5 mL perc ⁻¹)



Oszlop, típus & dimenzió	Eluens	Pozitív módszer (#1) paraméterek ESI (+)	Pozitív módszer (# 2) paraméterek ESI (+)	Negatív módszer paraméterek ESI (-)
6 - Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ ; Agilent; 4,6 mm x 50 mm, 1,8 μm	A: víz és 0,1% v/v hangyasav; B: CH ₃ CN	0-5 perc 5% B 5-15 perc 5% B-ről 100% B-re 15-18 perc 100% B Áramlási sebesség: 0,5 mL perc ⁻¹		0-5 perc 5% B 5-15 perc 5% B-ről 100% B-re 15-18 perc 100% B Áramlási sebesség: 0,5 mL perc ⁻¹
7 - Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ ; Agilent; 2,1 mm x 50 mm, 1,8 μm		0-2 perc 5% B 2-8 perc 5% B-ről 100% B-re 8-10 perc 100% B Áramlási sebesség: 0,5 mL perc ⁻¹		0-2 perc 5% B 2-8 perc 5% B-ről 100% B-re 8-10 perc 100% B Áramlási sebesség: 0,5 mL perc ⁻¹
8 - Waters Spherisorb ciano oszlop 3,0 mm x 125 mm, 5 μm	Pozitív módszer: A: 50 mM NH ₄ -formiát, pH= 4,0 és hangyasav; B: CH ₃ CN és 0,1% v/v hangyasav Negatív módszer: A: víz és 0,1% v/v hangyasav; B: CH ₃ CN és 0,1% v/v hangyasav	0-3 perc 95% B 3-15 perc 95% B-ről 50% B-re 15-18 perc 50% B-ről 30% B-re 18-20 perc 30% B Áramlási sebesség: 0,8 mL perc ⁻¹		0-3 perc 95% B 3-15 perc 95% B-ről 50% B-re 15-18 perc 50% B-ről 30% B-re 18-20 perc 30% B Áramlási sebesség: 0,8 mL perc ⁻¹
9 - Waters Spherisorb amino oszlop 3,0 mm x 125 mm, 5 μm	Pozitív módszer: A: 100 mM NH ₄ -formiát, pH= 2,68 és hangyasav; B: CH ₃ CN és 0,1% v/v hangyasav Negatív módszer: A: 100 mM NH ₄ -formiát, pH= 6,37; B: CH ₃ CN	0-4 perc 95% B 4-15 perc 95% B-ről 70% B-re 15-18 perc 70% B-ről 50% B-re 18-20 perc 50% B-ről 30% B-re Áramlási sebesség: 0,8 mL perc ⁻¹		0-3 perc 95% B 3-15 perc 95% B-ről 50% B-re 15-18 perc 50% B-ről 15% B-re 18-20 perc 15% B Áramlási sebesség: 0,8 mL perc ⁻¹



5.3.3. Eredmények

Kilenc kromatográfias oszlopot illetve az azokra optimalizált kromatográfias módszereket hasonlítottam össze. Az oszlopok között volt egy HILIC „core-shell” technológiával készült oszlop (Jandera 2011), egy kis pórus méretű HILIC (1,8 μm), két zwitterionos jellegű (Sielc Technologies Obelisc N és Obelisc R; Liu & Pohl 2012, Kazarian et al. 2013,2014), három normál fázisú, vízzel kondicionált, HILIC módban használt oszlop (egy „csupasz” szilika és két szilika alapú, kémiaiilag kötött oszlop (Spherisorb ciano és amino)), továbbá két C_{18} -as töltetű oszlop. A továbbiakban sorszámmal fogok hivatkozni az oszlopokra (ld. 18. táblázat első oszlopa).

5.3.3.1. HILIC-ESI-TOF-MS kapcsolt rendszer: általános megfigyelések

A DMIN és MLIN elválasztása nem volt magától értendő a tömegspektrumaik részleges átfedése miatt: a MLIN protonált monoizotópos tömege ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 88,0774) megegyezik a DMIN jellemző fragmens ionjával, és ugyanez a jelenség figyelhető meg a TMIN esetében is. Továbbá a TMIN legintenzívebb ionforrás fragmense megegyezik a DMIN (m/z 106,0863) protonált tömegével (M3/Figure S1). Bár ebből kifolyólag ezek alapvonalon elválasztása elengedhetetlen a spektrális zavarások elkerüléséhez, a 3., 4. és 5. oszlop esetén ezt olyan gradienssel lehet csak megoldani, amely a többi komponensre nézve kedvezőtlen elválasztást eredményezett, így ezeken az oszlopokon két különböző gradiens módszert alkalmaztam.

A HILIC kromatográfia esetén a megoszlást kevert mechanizmus okozza, ezért minden esetben nagyon fontos a megfelelő pH értékre pufferelt eluens használata. Mindemellett kiemelt tényező az injektálásra szánt mintaoldat oldószer összetétele és pH-ja is (Nováková et al. 2014), aminek fontosságát a dikvát példáján mutatnám be. Nem megfelelő puffereltség esetén, ez a vegyület két különböző retenciós idővel érkezik az oszlopról, feltehetően azért, mert különböző ion formában jut az oszlopra. Az 1. oszlopról 6,6 és 14,9 percnél, a 2. oszlopról 8,5 és 14,8 percnél, a 4. oszlopról a #1 módszerrel 3,7 és 8,4 percnél eluálódott a DQ. A megfelelő mintaoldat kiválasztása érdekében három eltérő kémhatású 90:10 v/v% $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ oldatban oldottam a DQ-t, amelyek pH-értékét 2,0; 3,0; és 4,0-re állítottam be hangyasavval. A kromatogramokról kapott két csúcs csúcsalatti területeit egy kromatogramon belül 100%-nak vettem. Az ilyen módon egymáshoz viszonyított relatív csúcs alatti terület arányokat a 19. táblázatban foglaltam össze.

**19. táblázat: Az injektált mintaoldat pH értékének optimalítása; az injektálásokat a 2. oszlopon végeztem pozitív ion módban**

Dikvát oldószer összetétel		90:10% CH ₃ CN:H ₂ O	
pH	m/z	1. csúcs alatti terület %	2. csúcs alatti terület %
4,0	184,0993	1,03	98,97
	183,0917	1,67	98,33
3,0	184,0993	0,37	99,63
	183,0917	0,82	99,18
2,0	184,0993	4,80	95,20
	183,0917	13,36	86,64

A legjobb azonosíthatóságot a pH=3,0 értékre állított 90:10 v/v% CH₃CN:H₂O oldószer összetétel biztosította. Ezért a további kísérleteknél a sztenderd oldatokat minden esetben a víztartalmú eluensben (pH=2,85-3,0) injektáltam az oszlopokra, a kezdeti induló gradiens eluens összetételében, kivéve a 8. számú oszlop esetén, ahol az oszlop anyagi minőségéből fakadóan a kezdeti induló gradiens pH=4,0 értékre volt puffereelve a többi komponens megfelelő elválaszthatóságának érdekében.

5.3.3.2. A különböző kromatográfias megközelítések értékelése

A korábban említett kromatográfias teljesítményjelzőket minden injektálás minden egyes komponenséről (kilenc oszlop, kettő vagy három módszer, n=5) az M3/Table S6 táblázat szerint értékeltem ki. Ennek eredményeit az M3/Tables S10-S51, a detektált retenciós időket az M3/Tables S52-53, az ezekből számított kapacitás faktorokat az M3/Tables S54-55, a csúcsalakokat a M3/Tables S56-57, a relatív érzékenység értékeket az M3/Tables S58-60, az egyes komponensekre számolt LOD értékeket az M3/Tables S8-S9, míg az összesített megfelelési százalékokat 0,1 µg mL⁻¹ injektált sztenderd koncentráció esetén az M3/Tables S61-62 jelű táblázatok ismertetik.

5.3.3.3. 1. Oszlop („core-shell” HILIC)

Az oszlopon használt NH₄-formiát puffer koncentrációját 20 mM - 100 mM tartományban változtattam és különböző pH-értékeken teszteltem 2,85-4,0-ig (pozitív ion módban) ill. 2,85-től 6,50-ig (negatív ion módban). Végül a legalacsonyabb pH-értékre állított legmagasabb, puffer koncentráció eredményezte a legelőnyösebb, azaz a legmagasabb kromatográfias teljesítményjelzőkkel eluálódó csúcsokat. Mindemellett a CH₃CN 0,1% v/v hangyasavval történő savanyítása jobb csúcsalakot eredményezett, mint a savanyítatlan CH₃CN használata. A térfogatáramot a kezdeti 0,5 mL perc⁻¹ áramlási sebességről

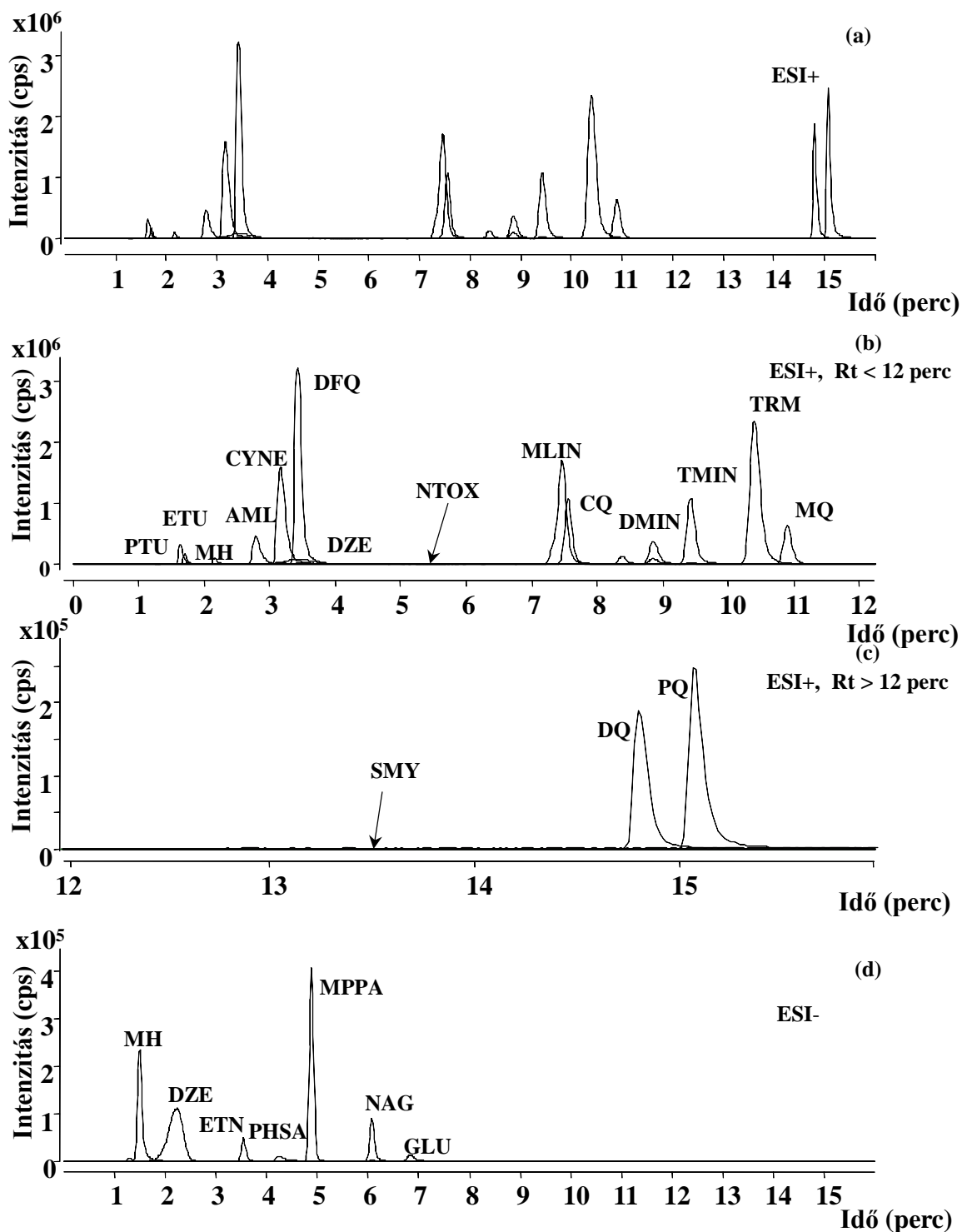


1,0 mL perc⁻¹-re kellett növelnem a PQ és a DQ erős visszatartása miatt. A gradiens a kromatográfias összeállítás által megengedett legalacsonyabb szerves oldószer összetétellel indult és a legnagyobb víztartalmú összetétellel fejeződött be (Whitehead et al. 2010). Ezekkel a feltételekkel az AML, MH, ETU, PTU és CYNE kapacitás faktora nem érte el az 1,0 értéket, ugyanakkor megfelelő csúcsalakkal eluálódtak, ahogyan az a M3/Figure S2 ábrán jól látható. Negatív ion módban a GYPH nem volt detektálható, továbbá az AMPA értékelhetetlen csúcsalakkal eluálódott, valamint az ETN és GLU alacsony relatív érzékenységgel volt csak kimutatható.

5.3.3.4. 2. Oszlop (HILIC 1,8 μm pórusmérettel)

Ennek az oszlopnak a poláris peszticidekre nézve gyengébb volt a visszatartása, mint az 1. oszlopnak, ezért 60 v/v% vizes puffert tartalmazó oldat elegendő volt a legnagyobb visszatartást mutató komponensek oszlopról történő eluálásához. Az áramlási sebesség elúció közbeni növelése (0,2-től 0,3 mL perc⁻¹-ig) elengedhetetlen volt ahhoz, hogy a DQ és PQ megfelelő (nem túl széles) csúcsalakkal érkezzenek a kromatogram végén. A relatív érzékenység kiváló (+++ minősítést kapott) a legtöbb komponens esetén, kivéve a NTOX, SMY és PQ peszticideket. Ezen felül a csúcsalakok is elfogadhatók voltak, kivéve a DZE esetén. A komponenseket megfelelő hatékonysággal választottam el a holtterefogattól, kivéve az ETU, PTU és MH peszticideket, ahogyan azt a 8. ábra mutatja.

Negatív ion módban a 2. oszlop kilencből hét célpeszticidre megfelelőnek bizonyult, ugyanakkor nem találtam a GYPH és AMPA szermaradványokra nézve kedvező kromatográfias elválasztási paramétereket. A teljesítményjelzők az összes detektálható peszticidre megfelelők voltak (8/d. ábra), kivéve az MH-nál, amely a holtterefogatban eluálódott.



8. ábra: A 2. oszlopról eluálódó, pozitív ion módban detektálható célkomponensek $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban injektálva, kivéve a DQ, DZE, NTOX, PQ, és az SMY vegyületeket, melyeknek EIC adatait az $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban injektált mintából emeltem ki. (a) a 17 célkomponens EIC kromatogramjai; (b) 14 komponens EIC kromatogramjai, Rt < 12 perc; (c) három komponens EIC kromatogramja, amelyek 12 perc után eluálódnak; (d) a 2. oszlopról eluálódó, negatív ion módban ionizálódó hét komponens $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban.



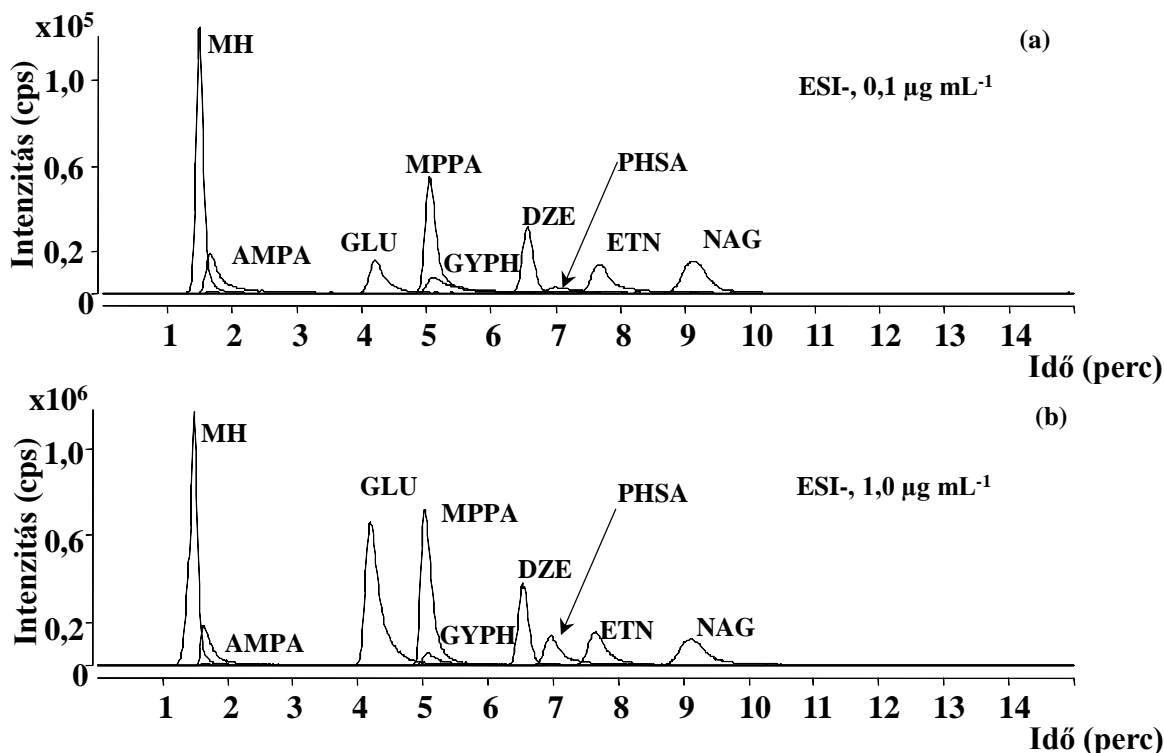
5.3.3.5. 3. Oszlop (kevert módú Obelisc N)

Pozitív ion módban a mozgófázisok különböző kombinációit teszteltem különböző térfogatárammal, melyekből egyik sem bizonyult kielégítőnek a célkomponensek nagyobb hányadára nézve. A PTU és az ETU a holtterfogatban eluálódott, bármilyen módszert alkalmaztam. A PQ, DQ és SMY egyáltalán nem eredményezett csúcsot ezen az oszlopon. A kísérletek végén két kromatográfias módszert véglegesítettem pozitív ion módban; mindkettőben kromatogramon belüli térfogatáram változást kellett alkalmazni (0,5-ről 0,8 mL perc⁻¹-re) abból a célból, hogy megelőzzem a túl nagy mértékű csúcsszélesedést az elúció végső szakaszában. A #1 pozitív módszer nem volt alkalmas a MLIN, DMIN és TMIN alapvonal elválasztásra, ezzel szemben a DZE és a TRM elválasztására megfelelőnek bizonyult. A #2 pozitív módszerrel a DZE és TRM elválasztását nem, viszont a másik három, egymásra spektrális zavarást jelentő növényvédő szert el lehetett választani egymástól.

Negatív ion módban a gyártó előzetes kísérletein alapuló módszer (20 mM NH₄-formiát izokratikus elúciója 70% CH₃CN-nel, 50 °C-on temperálva) nem működött megfelelően a GYPH és az AMPA növényvédő szerekre nézve. Ebből fakadóan 0,1% v/v hangyasavval savanyított H₂O-t és CH₃CN-t alkalmaztam, amely már megfelelő elválasztást eredményezett a kilenc célkomponensre, mind két vizsgált koncentrációban. A felbontás, a relatív érzékenység és a csúcsalak (kivéve a GYPH-t) minden komponens esetén megfelelő volt. Az MH és az AMPA a holtterfogathoz közel eluálódott. Ahogy azt korábbi tanulmányokban már leírták (Yoshioka et al. 2011, Whitehead et al. 2010), azt tapasztaltam, hogy ez az oszlop csak izokratikus körülmények között működik reprodukálhatóan. Amikor gradiens elúciót alkalmaztam, a csúcsalakok nem követték az ideális (közel gauss-i) formát, és a retenciós idők sem voltak reprodukálhatók egymást követő injektálások esetén.

Viszonylag kevés számú injektálás után (> 20) már súlyos oszlopvézést tapasztaltam, amely pozitív ion módban megemelte az alapvonalat és ezáltal rontotta az oszlopra adódó, összesített átlagos százalékban kifejezett teljesítményjelzőt. Ez a jelenség negatív ion módban is tapasztalható volt, bár kisebb mértékben. Érdeemes megjegyezni, hogy oszlop ekvibrálási problémával is szembesültem. Az optimált paraméterekkel a retenciós idő és a csúcs alatti területek reprodukálhatósága (RSD <10 %) megfelelő volt, de sok egymást követő injektálás után (több mint 20) a retenciós időben csúszás volt tapasztalható. A jelenség megszüntetésének érdekében ismételt ekvibrálásra volt szükség, azaz 1 órán keresztül

0,1 mL perc⁻¹ térfogatáramú. 50 mM koncentrációjú NH₄-formiáttal, majd az injektálást megelőzően a felhasznált eluens összetétellel kellett mosni az oszlopot.



9. ábra: A 3. oszlopról eluálódó, negatív ion módban detektálható kilenc peszticid egymásra illesztett EIC kromatogramjai 0,1 µg mL⁻¹ (a) és 1,0 µg mL⁻¹ (b) koncentrációban.

5.3.3.6. 4. Oszlop (kevert módú Obelisc R)

A QuPpe (4.1, 4.2) módszerben leírt eljárás használata esetén a célkomponensek nagy százaléka (MH, AML, PTU, ETU és CYNE) a holtterefogatban eluálódott. Vizsgálataim során két módszert optimaltam: az #1 pozitív módszerbe izokratikus induló szakaszt tettem, amely azt eredményezte, hogy már csak két vegyület, a PTU és az ETU eluálódott a holtterefogatban. Mivel ez a módszer nem volt alkalmas a MLIN és a DMIN alapvonal elválasztására, ezért egy második módszerre is szükség volt. Érdekes módon a TMIN erről az oszlopról az előző kettő komponenstől szignifikánsan eltérő retencióval eluálódott (M3/Figure S3). A #2 pozitív módszer alkalmas volt a MLIN és a DMIN alapvonal elválasztására, ezzel a spektrális zavarás kiküszöbölésére is. Az elnyújtott kromatogram három perc széles DZE csúcsot eredményezett. A relatív érzékenység nem volt kielégítő, ami részben a mind negatív, mind pozitív módban tapasztalt oszlopvézésnek tulajdonítható.



Negatív ion módban az MPPA, GYPH, ETN és DZE csúcsait leszámítva értékelhetetlen kromatográfiás teljesítményjelzőket tapasztaltam.

5.3.3.7. 5. Oszlop (kis pórusméretű normál-fázis, „csupasz” szilika oszlop)

Az optimalizációs folyamatok során kiderült, hogy a 0,1% v/v hangyasavval savanyított CH_3CN használatánál a PTU és ETU csúcsok csúcsalakja torzul, és a két vegyület a holtterefogatban eluálódott, akárcsak az MH. Hangyasav használata nélkül (#1 pozitív módszer) az MH, a PTU és az ETU ugyancsak a holtterefogatban eluálódtak, bár megfelelő csúcsalakkal. Az NH_4 -formiátot különböző koncentrációkban alkalmaztam (10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM) a savanyítatlan CH_3CN -nel. A pufferkoncentráció növelésével a PTU és az ETU kivételével mindegyik célkomponens erősebb retenciót mutatott. Az SMY alacsony koncentrációjú (10-40 mM) NH_4 -formiát alkalmazása esetén nem volt detektálható, és csak 100 mM NH_4 -formiát használata eredményezett elfogadható csúcsalakot. Végezetül 100 mM koncentrációjú, $\text{pH}=2,85$ kémhatásúra beállított NH_4 -formiátot és nem savanyított CH_3CN -t alkalmaztam eluensként. Az #1 pozitív módszer esetén a térfogatáramot erőteljesen megnöveltem, hogy a DQ, PQ, DZE és a CYNE megfelelő csúcsalakkal eluálódjon, de mint azt a korábbi oszlopoknál észrevettem, ez a MLIN, DMIN és TMIN alapvonal elválasztásának nem kedvezett. A legtöbb komponens megfelelő érzékenységgel volt mérhető, kivéve a NTOX és SMY peszticideket. A második két lépcsős gradiens (#2 pozitív módszer) megfelelőnek bizonyult a három, egymást spektrálisan zavaró komponens elválasztására (MLIN, DMIN és TMIN), ugyanakkor értékelhetetlenül széles csúcsalakot eredményezett a CYNE, DZE és MQ célkomponensekre nézve (M3/Figure S4).

Negatív ion módban alacsony relatív érzékenységet (R) mértem az AMPA és GYPH célpeszticidekre. Az MH a holtterefogatban eluálódott. A legtöbb komponens megfelelő teljesítményjelzőkkel volt detektálható.

5.3.3.8. 6. (fordított fázisú C_{18}) és 7. (fordított fázisú UHPLC C_{18}) Oszlop

Ahogy az elméletileg várható volt, szinte az összes vizsgált szer a holtterefogatban eluálódott, kivéve a DFQ, CYNE és a PTU peszticideket. Mindez önmagában alkalmatlanná teszi az oszlopokat a célkomponensek elválasztására annak ellenére, hogy a relatív érzékenység kiváló volt minden vizsgált vegyület esetén (M3/Figure S5).



5.3.3.9. 8. Oszlop (normál fázis, szilika alapú, propil-ciano oszlop)

Ekpe és munkatársainak leírását (2001) követve a ciano oszlopot izokratikus elúcióval próbáltam ki először. Mozgófázisként CH_3CN (0,1% v/v hangyasav) és H_2O (0,1% v/v hangyasav) elegyét alkalmaztam különböző arányban. Kevés számú komponens bizonyult elválaszthatónak a holtterfogattól annak ellenére, hogy csak 10% volt a vizes fázis aránya. Gradiens elúciót alkalmazva a komponensek nagy része elválasztható volt, kivéve a DQ, PQ és DFQ peszticideket, amelyek meglehetősen széles csúcsalakkal rendelkeztek és a MLIN, DMIN, melyek alapvonal elválasztása nem valósult meg. Ennek kiküszöbölése érdekében különböző koncentrációjú puffereket próbáltam ki (20, 50, 100 mM NH_4 -formiát, pH=4,0). Az 50 mM koncentrációjú NH_4 -formiát tartalmú eluens esetén már sikeres volt a MLIN és DMIN alapvonal elválasztása (M3/Figure S6), továbbá 20 mM pufferkoncentrációnál már a DQ, PQ és DFQ is detektálhatóvá vált. A pH=4,0 miatt a PQ és a DQ kettős ion formában voltak jelen az oszlopon, amelyek eltérő retenciós idővel eluálódtak. A PTU és az ETU a holtterfogatban eluálódott, míg a DZE kiértékelhetetlenül széles csúcsalakkal, az SMY pedig alacsony relatív intenzitással volt csak detektálható.

Negatív ion módban szintén különböző koncentrációjú NH_4 -formiát puffer oldatokat teszteltem (0, 50, 100 mM), de mindösszesen csak az MH-t és a DZE-t tudtam megfelelő csúcsalakkal eluálni. Az ETN, GLU és a NAG ugyan adott csúcsot, de azok szélességük miatt értékelhetetlenek voltak.

5.3.3.10. 9. Oszlop (normál fázis, szilika alapú, aminopropil)

Akárcsak a 8. oszlop esetén, a 9. oszlopnál is NH_4 -formiát puffert használtam. Az MQ, CQ, PQ, DQ és DFQ visszatartását a nagyobb pufferkoncentráció javította, míg a PTU, ETU és MH visszatartására semmilyen hatást nem gyakorolt a pufferkoncentráció növelése. A módszerfejlesztés végeztével pH=2,68 kémhatású, 100 mM koncentrációjú NH_4 -formiátot és CH_3CN -t (0,1% v/v hangyasav) használtam eluensként. Ezekkel a kondíciókkal és az optimált gradienssel a DMIN, TMIN és MLIN megfelelő érzékenységgel, sikeresen volt elválasztható egymástól. A komponensek jelentős százaléka nem a holtterfogatban eluálódott, kivételt képez a PTU, ETU és a DFQ. A DQ és PQ csúcsait nem sikerült alapvonalig elválasztani, és a DZE értékelhetetlenül széles csúccsal eluálódott (M3/Figure S6 d).

Negatív módban pH=6,37 kémhatású, 100 mM koncentrációjú NH_4 -formiát és CH_3CN (0,1% v/v hangyasav) eredményezte a legjobb elválasztást: ezzel az összeállítással



kilencből három növényvédő szert sikerrel tartottam vissza (MH, DZE, GLU), de a GLU és a DZE elfogadhatatlanul széles csúcsalakkal eluálódott.

5.3.3.11. A különböző kromatográfiai megközelítések összesítő értékelése

A különböző kromatográfiai megközelítések összehasonlítása érdekében az eluált csúcsokat teljesítményjelzőkön alapuló félkvantitatív osztályozási rendszerrel minősítettem (M3/Table S6). A százalékban kifejezett, összesített teljesítményjelzőket a 20. és 21. táblázatokban foglaltam össze a pozitív és negatív ion módban ionizálódó komponensekre. Pozitív ion módban a 2. oszlop (HILIC UHPLC) és a hozzá tartozó módszer bizonyult a legjobbnak mindkét vizsgált koncentrációban (19. táblázat (90%) M3/Table 61 (92%)). A sorban másodikként ugyanazon megfelelési százalékkal (86%) az 1., 4., 5., és 9. oszlopok következtek. Ezeket az alacsonyabb célkomponens koncentrációban megállapított megfelelési százalék segítségével tudtam rangsorba állítani. A rangsorban a 2. oszlopot követve a második helyet a 9. oszlop (aminoropil) 90%-os eredménnyel, míg a harmadik helyet az 1. oszlop (core-shell HILIC) foglalja el (84%). Ugyanakkor szem előtt kell tartani, hogy az 1. oszlop erős visszatartása miatt igen nagy mennyiségű oldószer használatát igényeli. A sorban ezeket az oszlopokat követték az 5. („csupasz” szilika), 8. (ciano) illetve a 4. oszlop (Obelisc R), amely jelentős oszlopvézést mutatott. A 3. oszlop (Obelisc N) százalékban kifejezett teljesítmény értéke igen alacsony volt. A két fordított fázisú oszlopra kapott eredmény meglehetősen lehet, mert az egyes komponensekre a relatív érzékenység minden esetben kiváló volt, mivel azok minden visszatartás nélkül jutottak az ionforrásba.

Másfelől negatív ion módban a 3. oszlop (Obelisc N) bizonyult a legmegfelelőbbnek (89%) a tapasztalt oszlopvézést és a komponensek retenciós idejében megfigyelt csúszása ellenére. Ez volt az egyetlen vizsgált kromatográfiai összeállítás, amely képes volt mind a kilenc, negatív ion módban ionizálódó komponens egy kromatogramon belüli elválasztására, beleértve a GYPH-ot és az AMPA-t. Továbbá az Obelisc N eredményezte a legmagasabb relatív érzékenységet negatív ion módban az összes vizsgált peszticidre (21. táblázat), valamint azonos megfelelési százalékokat mértem mindkét vizsgált koncentrációban. Az 5. számú oszlop elfogadható eredményeket mutatott a vizsgált teljesítményjelzőkre kilenc peszticid esetén (összesen 82%, amiből 89% az SV, 78% az R és 78% a P). A 2. oszlopot 74%-os összesített megfelelési százalékkal harmadiknak rangsoroltam, ezt követte az 1. oszlop 69%-kal, majd sorrendben a 4., 6., 7., 8. és 9. oszlopok.



20. táblázat: Összesített megfelelési százalék a kilenc vizsgált oszlopon használt módszerre pozitív ion módban. A táblázatban feltüntetett adatok $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban injektált sztenderd keverék adataira épülnek (n=5).

Oszlop	Módszer	SV	R	P	Összesen	Megjegyzések
1	pos	71%	94%	94%	86%	Ez az oszlop volt a legrobosztusabb.
2	pos	82%	94%	94%	90%	Egyike a pozitív ion módban ionizálódó komponensek meghatározására alkalmas módszereknek. Optimális DQ és PQ kellő érzékenységgel történő meghatározásra.
3	pos # 1	59%	65%	53%	59%	Jelentős oszlopvérvzés.
	pos #2	71%	82%	65%	73%	
4	pos #1	76%	88%	88%	84%	Jelentős oszlopvérvzés. Magas relatív érzékenység.
	pos #2	82%	88%	88%	86%	
5	pos #1	65%	76%	88%	76%	Az #1 módszer alkalmasabb a DZE, a #2 módszer alkalmas MLIN, DMIN, és TMIN meghatározására. Kompromisszumos elúció megvalósítása nem lehetséges.
	pos #2	82%	94%	82%	86%	
6	pos	18%	88%	82%	63%	A DFQ-ot, CYNE-t és PTU-t leszámítva minden célkomponens a holtterfogóban eluálódott.
7	pos	18%	100%	88%	69%	A DFQ-ot, CYNE-t és PTU-t leszámítva minden célkomponens a holtterfogóban eluálódott.
8	pos	88%	94%	71%	84%	PTU és ETU a holtterfogóban eluálódtak, a PQ, az MH és a NTOX csak $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban voltak meghatározhatók.
9	pos	82%	100%	76%	86%	PTU, ETU, DFQ a holtterfogóban eluálódtak. Kiváló érzékenység minden komponensre.



21. táblázat: Összesített megfelelési százalék a kilenc vizsgált oszlopon használt módszerre negatív ion módban. A táblázatban feltüntetett adatok $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban injektált sztenderd keverék adataira épülnek (n=5).

Oszlop	Módszer	SV	S	P	Összesen	Megjegyzések
1	neg	78%	56%	67%	67%	Nem alkalmas AMPA és GYPH meghatározására.
2	neg	78%	78%	67%	74%	Nem alkalmas AMPA és GYPH meghatározására.
3	neg	78%	100%	89%	89%	Ez az oszlop alkalmas az AMPA és a GYPH meghatározására megfelelő intenzitással mindkét vizsgált koncentrációban. A retenciós idő állandósága nagyban függ az ekvilibrálástól eltelt időtől.
4	neg	67%	44%	56%	56%	Nem alkalmas a negatív ion módban ionizálódó komponensek meghatározására.
5	neg	89%	78%	78%	81%	Mindkét vizsgált koncentráció tartományban megfelelőnek bizonyult.
6	neg	0%	100%	67%	56%	A komponensek a holtterfogóban eluálódtak. A GYPH és a PHSÁ értékelhetetlen csúcsalakkal jelentkeztek.
7	neg	0%	100%	67%	56%	A komponensek a holtterfogóban eluálódtak. A GYPH és a PHSÁ értékelhetetlen csúcsalakkal jelentkeztek.
8	neg	56%	56%	11%	41%	Nem alkalmas a negatív ion módban ionizálódó komponensek meghatározására.
9	neg	33%	33%	11%	26%	Nem alkalmas a negatív ion módban ionizáló komponensek meghatározására.



5.3.3.12. Poláris peszticidek meghatározása narancs mintából UHPLC-HESI-MS/MS és HPLC-ESI-QTOF-MS_2 kapcsolt analitikai rendszerekkel

A kísérleteket narancs mátrixra pozitív ion módban a 2. oszloppal végeztem, mivel annak az összesített százalékban kifejezett teljesítményjelzője bizonyult a legjobbnak. A HPLC-ESI-QTOF-MS_2 kapcsolt analitikai rendszert „*full scan*” módban alkalmaztam úgy, hogy CID-et használtam azzal a két különböző fragmentációs feszültséggel, amely az adott meghatározni kívánt peszticid leányion képzésének a legjobban kedvezett (M3/Table S63). A 22. táblázatban összegyűjtöttem a célvegyületekre megállapított MRL értékeket (Ekpe et al. 2001, Jogszabály 4.). A QuPPE módszerben leírt sztenderd addícióval állapítottam meg a mennyiségi meghatározási határt. Ez adalékolással történt: narancs darálmányt adalékoltam 1000 mg L^{-1} koncentrációjú sztenderd oldattal úgy, hogy a minta koncentrációja a célkomponensekre nézve $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ legyen. Az HPLC-ESI-QTOF-MS_2 analitikai összeállítással sikerült a narancs mintában engedélyezett szermaradványokat $0,003\text{-}0,56 \text{ mg kg}^{-1}$ meghatározási határral megmérni. A kapott eredmények a legtöbb esetben alatta voltak a narancsra megállapított MRL értékeknek, tehát megfelelőnek tekinthetők (kivéve a DZE-t és az MH-t).

A módszer érzékenységének növelése érdekében UHPLC-HESI-MS/MS rendszerösszeállításra váltottam, amelyet MRM módban üzemeltettem. Az eredmények ezzel a másodikként választott kapcsolt rendszerrel egyértelműen jobbnak bizonyultak minden vizsgált peszticid esetén. A mennyiségi meghatározási határ kellően alacsony, kivéve az MH esetén, amelynél a mennyiségi meghatározási határ nagyon közel volt a narancs mintára megállapított MRL értékhez (22. táblázat). Az eredmény nem meglepő, hiszen Wang és kutatócsoportja is azt tapasztalta, hogy az MH igen csekély a ionizációs határfokkal rendelkezik ESI ionforrásban (Wang et al. 2015). Fontos kiemelni, hogy mindkét LC-MS rendszer használatakor megfelelő kromatográfiás minőségi mutatókat értem el. A csúcs alatti területek RSD értéke minden esetben kisebb volt, mint 10%, és a retenciók idői reprodukálhatónak bizonyultak ($n=5$). A módszert egy spanyolországi labor (Laboratory of Foodomics, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC) 28049 Madrid, SPAIN) bevonta a rutin mérések sorába. Azt tapasztalták, hogy 300 valódi mátrixú minta injektálását követően a 2. oszlop sem retenciók időbeni csúszást, sem pedig teljesítmény jelzőkben mérhető romlást nem mutatott.

Az adalékolt narancs mintaoldat illetve a sztenderd oldat injektálásával kapott kalibrációs egyenesek meredekségének összehasonlításával mátrixhatás vizsgálatot is végeztem. Annak érdekében, hogy az injektált mintaoldat oldószer összetétele megegyezzen az induló gradiens eluens összetételével, az oldatot CH_3CN -nel ötszörösére és tízszeresére hígítottam. Megállapítható, hogy a



mátrixhatás főként csak a vizsgált célpeszticid egyedi visszatartásától, kapacitás faktorától függ, mivel a kalkulált mátrixhatás mindkét hígítás esetén ugyanannyi volt (M3/Table S64). Nagy mennyiségű narancs mátrix alkotó eluálódik közel a holtterefogathoz, ezért az olyan korán eluálódó célkomponensek ionizációját, mint az ETU, MH és PTU, a mátrix valóban sokkal nagyobb mértékben befolyásolta.

22. táblázat: Az optimált paraméterekkel narancs mátrixból UHPLC-HESI-MS/MS és HPLC-ESI-QTOF-MS_2 kapcsolt analitikai rendszerekkel meghatározott peszticidok LOD értékei, azok RSD%-a, valamint az adott mátrixra megállapított MRL értékei (LOD: $S/N*3/$ koncentráció; LOQ: $S/N*10/$ koncentráció)

Komponens	LOQ ^a (QTOF), RSD,		LOQ ^a (MS/MS), RSD,		MRL (narancs),
	$\mu\text{g kg}^{-1}$	%	$\mu\text{g kg}^{-1}$	%	$\mu\text{g kg}^{-1}$
Amitrol	9,1	2,9	1,0	2,9	10
Klórmeqvát	8,3	1,9	0,6	3,6	50
Ciromazin	9,9	4,1	0,7	1,6	50
Daminozid	59,8	4,1	2,5	2,4	20
Dietanolamin	10,1	3,2	1,5	6,0	-
Difenzokvát	6,2	3,9	0,2	2,0	-
Dikvát	10,2	4,3	0,4	4,3	50
Etiléntiokarbamid	520	2,3	15	4,2	-
Maleinsav-hidrazid	560	7,1	625	5,2	200
Mepikvát	3,3	4,5	0,3	1,6	50
Morfolin	30,1	2,2	5,0	3,4	-
Nereistoxin	60,2	3,1	0,8	1,6	-
Parakvát	17,3	3,1	0,8	14,2	20
Propilén tiourea	500	2,2	5,0	1,5	-
Sztreptomycin	540	12,1	8,0	12,5	-
Trietanolamin	170	4,1	0,3	5,2	-
Trimetilszulfónium	80,2	2,5	0,5	1,7	500

^aVégső LOQ (1:5 hígítás után injektált extrakt)

5.3.4. Összegzés

Ebben a kísérletsorozatban LC-MS rendszerekhez használható (U)HPLC oszlopokat hasonlítottam össze 24 peszticid vizsgálatával. Az volt a célom, hogy egyénileg meghatározott tapasztalati teljesítményjelzők segítségével kiválasszam azt az optimális típust, amely lehetővé teszi a legtöbb célkomponens egy kromatogramból történő meghatározását. A célvegyületek komplexitásából adódóan nehéz volt olyan kromatográfias összeállítást találni, amely képes lett



volna egyetlen injektálással kiváló teljesítményjelzőket mutatni a komponensek mindegyikére. Ezért különböző összetételű, koncentrációjú, áramlási sebességű mozgófázisokat vizsgáltam különféle gradiensekkel. A kis szemcseméretű (1,8 μm) UHPLC HILIC oszlop ugyanazzal a mozgófázis összetétellel megfelelő eredménnyel szolgált a vizsgált peszticidekre mind a két ionizációs módban, leszámítva a GYPH-ot, és annak bomlástermékét, az AMPA-t. Ezeknek az anionos komponenseknek az elválasztására és meghatározására a vizsgált oszlopok közül egyedül az Obelisc N oszlop volt alkalmas. Végezetül, a pozitív ion módban optimálisnak talált kromatográfiás megközelítéssel (UHPLC HILIC) sikeresen választottam el és határoztam meg UHPLC-HESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel MRM módban a 17 pozitív ion módban mérhető célpeszticidet narancs mátrixból olyan alacsony mennyiségi meghatározási határokkal, amelyek alatta voltak az erre a mátrixra megállapított MRL értékeknek.



5.4. Poláris növényvédő szerek meghatározása olívaolajból és olívaolajból tömegspektrométerrel csatolt hidrofil kölcsönhatás folyadékkromatográfiával

5.4.1. Célok megfogalmazása

Dolgozatom ezen szakaszában az ezt megelőző fejezetben leírt optimált módszereket igyekeztünk egy újabb mátrixra adaptálni. A poláris peszticidek jelenléte szűz olívaolajban valószínűtlen az eltérő fizikai-kémiai tulajdonságoknak köszönhetően, ugyanis a szűz olívaolaj előállítási folyamata során a poláris vegyületek előnyben részesítik a technológiailag eltávolításra kerülő vizes fázist. Ezzel ellentétben az olívaolaj jelentős százaléka víz, és számos poláris komponenst tartalmaz. A választásunk azért esett olívaolaj és olívaolaj mátrixra, mert egyrészt a mediterrán étrend jelentős összetevői, továbbá legjobb tudomásunk szerint nem áll rendelkezésre poláris szermaradványok olívaolajból történő kimutatására használható analitikai eljárás. Mivel az olívaolaj különös keveréke a zsíros és víztartalmú fázisnak, a poláris szennyezők viselkedésének tanulmányozása érdekes konklúziókkal szolgálhat. Hét poláris peszticidet választottunk ki (amitrol, ciromazin, dikvát, parakvát, mepikvát, trimetilszulfónium (trimesium, glifozát ellenion) és foszetil-alumínium), amelyeknek kémiai-fizikai jellemzőit és ionizációs módját az értekezés 2.3.2. fejezetében található 3. táblázat tartalmazza. Olyan szereket választottunk ki, melyeket valóban használnak olíva kultúrákban és szerepelnek az (EC) 396/2005 rendeletben (Jogsabály 4).

5.4.2. Mintaelőkészítés

A mintaelőkészítést a 2.3.2 fejezetben részletesen ismertetett QuPPE módszergyűjteményben leírtak alapján végeztük:

Olívaolaj: 10,0 g mintát mértünk 50,0 mL térfogatú centrifugacsőbe, majd 10 mL 1 v/v % hangyasavval savanyított CH_3OH -t és 10,0 mL H_2O -t adtunk hozzá. Egy perces rázást követően a DQ és a PQ kinyerése céljából hőkezeltük az extraktumot (80 °C, 15 perc), majd újabb 1 perces rázás és centrifugálási lépés következett (3 perc, 3500 g). A minta 1,0 mL-ét ötszörösére hígítottuk 0,1 v/v% hangyasavval savanyított CH_3CN -nel, centrifugáltuk (3 perc, 3500 g), szűrtük (0,45 μm pórusméretű PTFE szűrőn). A szűrletet 1:10 arányban hígítottuk tovább, és a kapott oldatot közvetlenül a méréséhez használtunk fel.

Olívaolaj: 10,0 g mintát mértünk 50,0 mL térfogatú centrifugacsőbe, majd az olíva pogácsa víztartalma (50%; Ghanbari et al. 2012) miatt 5,0 mL H_2O -t és 10 mL 1 v/v % hangyasavval savanyított CH_3OH adtunk hozzá. A hőkezelési lépést ki kellett iktatni, mivel ez a folyamat zavaros fázist eredményezett. A következő lépés az 1 perces rázás és centrifugálás volt (3 perc, 3500 g). A



minta 1,0 mL-ét ötszörösére hígítottuk 0,1 v/v% hangyasavval savanyított CH₃CN-nel, centrifugáltuk (3 perc, 3500 g), szűrtük (0,45 µm pórusméretű PTFE szűrőn). A szűrletet 1:10 arányban hígítottuk tovább, majd közvetlenül a méréshez használtuk fel. A mérésekhez az Anyagok és módszerek fejezetben részletesen ismertetett HPLC-ESI-TOF-MS és UHPLC-HESI-MS/MS kapcsolt analitikai rendszereket használtuk. Az elválasztáshoz a 18. táblázatban feltüntetett 2. oszlopot használtuk pozitív ion módban.

A HPLC-ESI-TOF-MS műszeregyüttes alkalmazása esetén a FOSAL megfelelő csúcsalakjának ill. ion intenzitásának eléréséhez negatív ion módban, eltérő elúciós profilú gradienssel kellett dolgoznunk (18. táblázat, 2. oszlop, ESI- módszer, 0,3 mL perc⁻¹). Az UHPLC-HESI-MS/MS használata esetén nem volt szükség különleges elúciós megoldásra a FOSAL –hoz, mivel a készülék képes egy kromatogramon belül változtatni az ionizáció polaritását.

5.4.3. Eredmények

5.4.3.1. Mintaelőkészítés optimalálása

Bár az olívaolaj elvileg komplex és bonyolult mátrixnak számít a magas zsírtartalma miatt (közel 100%), a poláris peszticideket célzó mintaelőkészítésénél azonban nem jelentett számottevő kihívást: a metanolos-vizes extrakció során tiszta, a zsíros mátrixból koextrahálódó komponenseket nem tartalmazó oldatot kaptunk. Ezzel ellentétben az olívaolaj egyike a legproblémásabb mátrixoknak a peszticid analitikában, mivel zsíros és vízoldható komponensek kombinációja építi fel. Ez az összetétel megakadályozza azoknak a mintaelőkészítési lépéseknek a használatát, amelyek tiszta mintaoldatot eredményeznek számottevő egyéb komponens kinyerése vagy jelentős célkomponens veszteség nélkül. Emiatt többféle minta kezelési módszernek vetettük alá a metanolos olíva extraktumot azzal a céllal, hogy a zavaró komponenseket eltávolítsuk és tiszta, az MS számára megfelelő analitikai mintához jussunk. Az első kísérlet során a mintát különböző hígításokban vizsgáltuk, 10-, 20- és 50-szeres hígítási sorban. Továbbá, különböző minta tisztítási módszerek hatásfokát is vizsgáltuk annak érdekében, hogy minimálisra csökkentsük az alkalmazandó hígítási tényezőt. A nem poláris interferáló komponensek eltávolításához acetonitrillel telített n-hexánt vagy petrolétert alkalmaztunk, azonban a folyadék-folyadék extrakció nem eredményezett tiszta oldatot; feltehetően több poláris komponens került oldatba, így ezt a stratégiát elvetettük, mert nem járt semmilyen gyakorlati haszonnal.

Alternatívaként két különböző mechanizmusú szilárd fázisú extrakciós lépést vettünk elő: az egyik szilárd fázisnak C₁₈-as patront választottuk, amely a nem poláris komponensek visszatartásával tiszta oldatot eredményezhet; a másik alternatíva egy gyenge kationcserélő SPE



patron volt(pl. Oasis MCX), amely szelektíven visszatartja a célkomponenseket. Az első esetben, a C₁₈-as fázist használva különböző víztartalmú eleggyel próbáltuk mosni a patronra juttatott, kezdetben 50% víz - 50% CH₃CN tartalmú olívbogyó extraktumot. A magasabb százalékban hozzáadott vízzel képesek voltunk tiszta extraktumhoz jutni, ugyanakkor a magas víztartalmú (70-90%) extraktum összeegyeztethetetlen a HILIC kromatográfia induló gradiensevel, mivel rosszabb csúcs alakot és csökkenő visszanyerési értékeket eredményezett. Az Oasis MCX patronnal hozzávetőlegesen tiszta oldathoz jutottunk, azonban az ioncserélő kölcsönhatások erősítése érdekében, a vizsgált peszticideket ionos formába kellett juttatnunk az extrakció előtt, ami. tekintve a célkomponensek szerkezetét és pK_a értékét .eltérő mintakezelési eljárást igényelt volna. Így tehát nem volt lehetséges olyan kezelést találni és alkalmazni, amely alkalmas lett volna mindegyik célkomponens visszatartására. A kvaterner ammónium sók feltételezhetően túl erős visszatartást mutattak a patronon, ezért elveszték a vizsgálat szempontjából. Ezeket a megfigyeléseket mérlegelve a kezdeti extraktum tízszeres hígítású, tisztítási lépés beiktatása nélkül nyert oldatát találtuk a legalkalmasabbnak a kísérletek folytatásához. Noha a hígítás eredményezte a legnagyobb mátrixhatással járó elúciót, ugyanakkor a legjobb visszanyerési határfokokat is az egyes komponensekre. (M4/Figure S3).

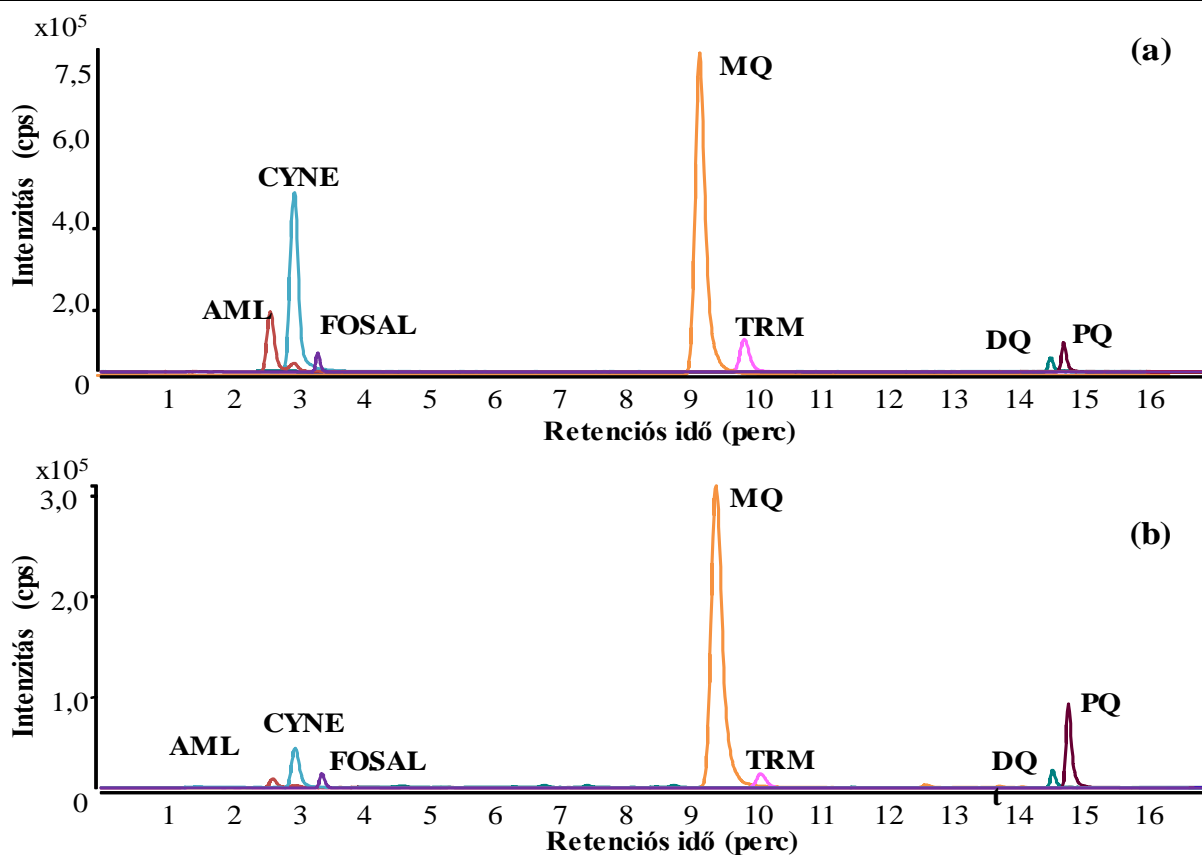
5.4.3.2. HPLC-ESI-TOF-MS kapcsolt rendszerrel tett megfigyelések

Mindegyik vizsgált peszticid ionizálódott pozitív ion módban, kivéve a FOSAL-t, amely határozottan jobb intenzitás értéket és csúcsokat mutatott negatív ion módban, dedikált gradiens elúciót használva (M4/Figure S4).

A célkomponenseket pontos tömeg és retenciós idő alapján azonosítottuk. A protonált ion forma eredményezte a legintenzívebb csúcsot a TRM, az AML és a CYNE esetén, míg az alkalmazott fragmentor feszültség miatt a PQ metil-csoport veszteséggel mutatta a legintenzívebb átmenetét ionforrás fragmensként. A FOSAL foszfát-csoport veszteséssel jelentkezett, a DQ kétszeresen töltött, az MQ pedig egyszeresen töltött ionként volt detektálható (23. táblázat). Figyelembe véve a komponensek hozzávetőleges stabilitását ill. megoszlását a poláris vagy ion formák között, megerősítő fragmentációs vizsgálatokra lehet szükség az egyes növényvédő szermaradványok teljes biztonsággal történő azonosításához.

23. táblázat: Minőségi meghatározásra szolgáló paraméterek HPLC-ECI-TOFMS műszeregyüttes használata esetén.

Komponens	Összegképlet	Rt perc	Kiválasztott ion	Elméleti <i>m/z</i>	Tapasztalati <i>m/z</i>	Hiba ppm
PQ	$C_{12}H_{14}N_2^{+2}$	14,782	$[M-CH_3]^+$	171,0917	171,0918	-0,68
DQ	$C_{12}H_{12}N_2^{+2}$	14,563	$[2M-2H]^{2+}$	183,0917	183,0918	-0,68
MQ	$C_7H_{16}N^+$	9,308	$[M]^+$	114,1277	114,1281	-3,01
TRM	$C_3H_8S^+$	9,954	$[M+H]^+$	77,0419	77,0423	-4,88
AML	$C_2H_4N_4$	2,617	$[M+H]^+$	85,0509	85,0516	-8,23
CYNE	$C_6H_{10}N_6$	2,979	$[M+H]^+$	167,1040	167,1038	1,01
FOSAL	$[(C_2H_6PO_3)]_3Al^{+3}$	3,340	$[C_2H_6PO_3]$	109,0060	109,0057	2,75



10. ábra: Mátrix illesztett sztenderd addíció során ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) HILIC-ESI-TOF-MS alapú vizsgálattal rögzített és egymásra illesztett EIC kromatogramok: (a) olívaolaj mintára; (b) olajbogyó mintára.

5.4.3.2. UHPLC-HESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel tett megfigyelések

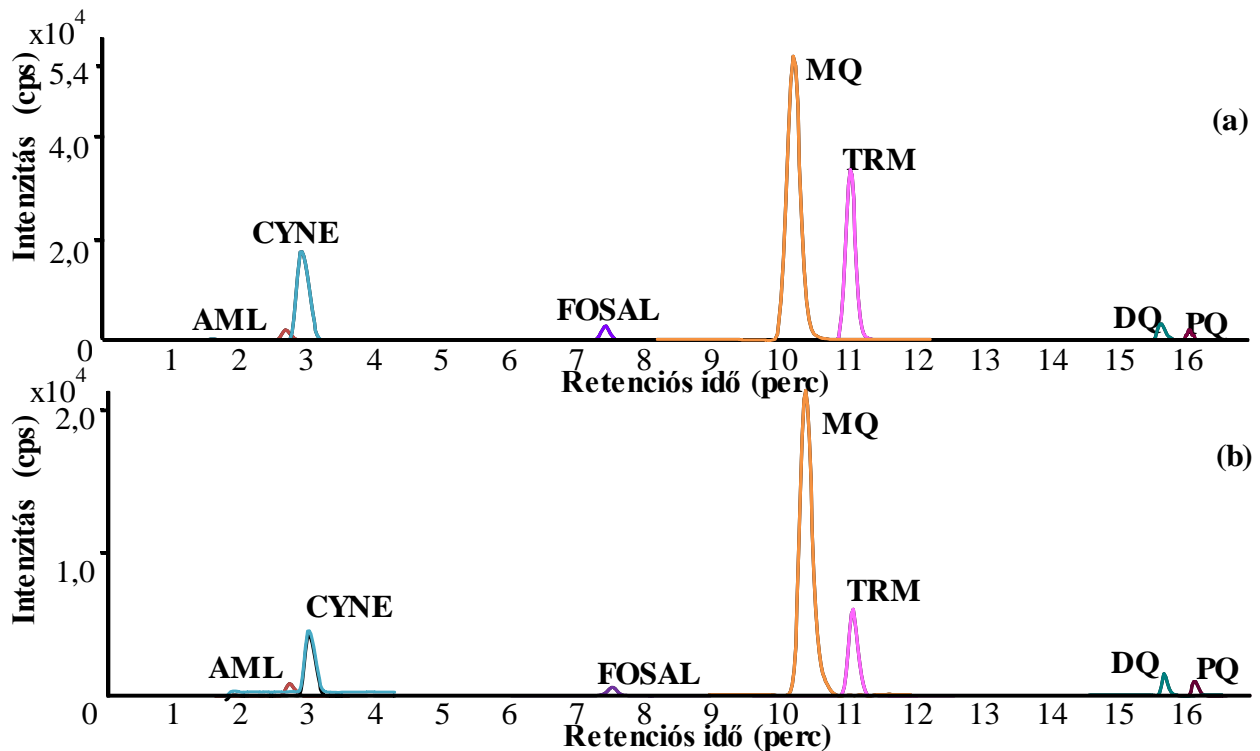
A tandem tömegspektrométert MRM módban üzemeltettünk. A célkomponensekből általánosságban $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ koncentrációjú törzsoldatot készítettünk (egyes vegyületek esetén, mint pl a DQ, PQ, az alacsony érzékenység miatt magasabb koncentrációjú - dikvát esetén $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, parakvát esetén $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ - oldatot alkalmaztunk), majd fecskendő pumpa segítségével juttattuk

őket egy T-idom segítségével az UHPLC által szállított eluens térfogatáramba ($0,3 \text{ mL perc}^{-1}$ $100 \text{ mM NH}_4\text{-formiát}$). A legintenzívebb két ionátmenetre optimáltuk az MRM átmeneteket. Az optimált MRM értékeket és az azokhoz tartozó feszültség értékeket a 24. táblázatban foglaltuk össze. A készülék lehetővé teszi a negatív és a pozitív ionizációs mód váltott használatát, így a FOSAL anyaiionja ill. az optimált leányionjai kellően intenzívnek bizonyultak a kvantitatív meghatározáshoz.

24. táblázat: A célkomponensekre optimált MRM paraméterek UHPLC-HESI-MS/MS használata esetén

Komponens	ESI	Rt, perc	[M] m/z	[FR ₁] m/z	CE V	[FR ₂] m/z	CE, V	Lens, V
PQ	+	2,6	85,2	43,4	26	57,3	18	47
DQ	+	3,0	167,1	85,3	20	68,3	35	79
MQ	+	15,6	183,1	157,2	23	78,2	41	87
TRM	+	16,0	171,1	77,3	38	155,1	31	122
AML	+	10,5	114,2	98,2	26	58,4	25	69
CYNE	+	11,1	77,2	62,3	28	47,4	15	30
FOSAL	-	7,5	109,1	81,3	11	63,2	30	47

[M]: anya ion; [FR₁]: kvantitatív fragmens; [FR₂]: kvalitatív fragmens.



11. ábra: Mátrix illesztett sztenderd addíció során UHPLC-HESI-MS/MS kapcsolt rendszerrel mért és egymásra illesztett kvantitatív MRM átmenetek (CYNE, MQ, TRM és DQ $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$; AML, FOSAL és PQ, $10 \mu\text{g kg}^{-1}$): (a) olívaolaj mintára; (b) olajbogyó mintára.



5.4.3.3. Analitikai teljesítményjelzők

A kinyerési hatások tanulmányozásához két koncentráció tartományban adalékolt mintákat használtunk (n=6). Az olívaolaj 0,1 mg kg⁻¹ és 0,5 mg kg⁻¹, az olívbogyó pedig 0,1 mg kg⁻¹ és 5,0 mg kg⁻¹ koncentrációban lett adalékolva a hét vizsgált növényvédő szer sztenderddel. UHPLC-HESI-MS/MS berendezést használva olívaolaj esetén megfelelő (70-120 %) (Jogsabály 1) kinyerési hatást tudunk elérni, ugyanakkor az olívbogyó mintából a DQ, PQ és AML csak igen alacsony kinyerési hatásokkal volt detektálható (25. táblázat). Az összes többi vizsgált peszticidnél megfelelő visszanyerési hatást értünk el mindkét koncentrációban adalékolt mintából.

Ezek az eredmények rávilágítanak az olívbogyó komplex mátrix jellegére és arra, hogy mennyire nagy kihívásokkal találja szembe magát az analitikus, aki minta tisztítási lépést tervez (a célkomponensek jelentősebb mértékű vesztesége nélkül) erre a lipofil és hidrofil vegyületeket egyaránt tartalmazó mintára. A visszanyerési arányok igen alacsonynak bizonyultak; az olívbogyó poláris frakciójából az egyszerű mintaelőkészítés eredményeként feltételezhetően nagyon sok kölcsönhatás származott a célkomponensek és a mátrixalkotók között, ami jelentős veszteséget eredményezett DQ és PQ komponensek esetén. Másfelől az extraktumok komplexitásának ellenére összességében a meghatározási módszerek kinyerési hatásfoka kielégítőnek, pontossága pedig megfelelőnek bizonyult: az RSD % minden komponens esetén kisebb volt, mint 15% mindkét mátrixból.

Mivel komplex mátrixszal volt dolgunk, ezért egyértelmű, hogy a mátrix hatást is célszerű kiértékelni, amelyet összehasonlítással végeztük: az injektált sztenderd oldat kiemelt ion kromatogramjait hasonlítottuk az injektált extraktumból kiemelt ion kromatogramokhoz. Nem meglepő módon a komplexebb olívbogyó extraktumok nagyobb ionelnyomást eredményeztek (>33%) minden célkomponens esetén, ezzel szemben az olívaolaj mátrixnál az elnyomás mértéke nem haladta meg a 20%-ot. Az eredményeket a 25. táblázatban összegeztük.



25. táblázat: Az UHPLC-HESI-MS/MS kapcsolt analitikai rendszerrel mért kinyerési hatások vizsgálatok olívaolaj és olívabogyó mintából.

NÉV	olívaolaj				olívabogyó			
	0,1 mg kg ⁻¹		0,5 mg kg ⁻¹		0,1 mg kg ⁻¹		5,0 mg kg ⁻¹	
	Kinyerési hatások, %	RSD %	Kinyerési hatások, %	RSD %	Kinyerési hatások, %	RSD %	Kinyerési hatások, %	RSD %
PQ	58,0	8,8	71,5	14,1	7,1	5,8	7,4	9,9
DQ	68,6	5,0	78,6	13,2	5,8	4,1	4,8	12,5
MQ	101,8	8,0	74,7	3,0	121,9	4,0	68,6	5,4
TRM	117,6	13,8	84,4	4,2	101,9	14,8	57,2	14,6
AML	64,6	9,5	81,9	14,3	26,6	4,6	11,6	8,9
CYNE	106,1	6,0	98,5	8,7	93,8	5,4	54,2	2,8
FOSAL	120,5	9,4	96,2	12,0	95,3	2,2	99,9	6,3

A kalibrációs egyenesek linearitását, a mátrixhatást és a mennyiségi meghatározási határt ugyancsak összehasonlítottuk mindkét mátrixra HPLC-ESI-TOF-MS műszeregyüttessel is. A hat ponton adalékolt kalibrációs egyenesek olívabogyó extraktum esetén 10-10000 µg kg⁻¹, olívaolaj esetén pedig 10-1000 µg kg⁻¹ közé estek. A mintákat az extrakció elvégzése előtt adalékoltuk a megfelelő mennyiségű sztenderddel, így korrigálva a mintaelőkészítés közben fellépő esetleges veszteségeket. Az adalékolás az adott koncentrációtartományban lineárisnak bizonyult minden vizsgált növényvédő szerre ($R^2 \geq 0,992$) (26. táblázat). A mennyiségi meghatározási határt a jel/zaj arányból állapítottuk meg minden esetben a legalacsonyabb adalékolt mintából számolva; HPLC-ESI-TOF-MS esetén a legintenzívebb izotópológot, UHPLC-HESI-MS/MS esetén pedig a kvantitatív MRM átmenetet használtuk fel. A hármas quadrupól rendszerrel alacsonyabb LOQ-t értünk el a növényvédő szerekre; ez alól kivételt képez az olívaolajból meghatározott PQ és FOSAL páros. Az UHPLC-HESI-MS/MS rendszerrel elérhető LOQ értékek elegendően alacsonyak voltak ahhoz, hogy a célkomponensek meghatározhatók legyenek a jelenleg hatályos jogszabályok szerint, MRL határértékeken belül (Jogszabály 4, 10, 11, Ghanbari et al. 2012, López Blanco et al. 2016).

26. táblázat: Az UHPLC-HESI-MS/MS és HPLC-ESI-TOF-MS rendszerekkel mért LOQ, linearitás, érzékenység, illetve mátrixhatás értéket.

NÉV	Mátrixhatás, %	Linearitás, R ²	Csúcs alatti terület ^a RSD%	Rt ^a RSD, %	LOQ TOF, µg kg ⁻¹	LOQ MS/MS µg kg ⁻¹	MRL ^b , µg kg ⁻¹
Olívaolaj							
PQ	0,8	0,9927	6,58	0,06	3,3	5,0	100
DQ	-14	0,9992	7,05	0,07	2,7	2,0	250
MQ	-41	0,9988	4,05	0,16	0,5	0,1	250
TRM	-18	0,9925	1,5	0,13	0,3	0,1	5000
AML	-24	0,9999	2,38	0,76	57	4,0	250
CYNE	-5	0,9987	2,92	0,36	7,8	0,5	250
FOSAL	-52	0,9932	3,92	0,13	1,1	10	10000
Olívabogyó							
PQ	-33	0,9977	7,63	0,07	45	15	20
DQ	-62	0,9933	6,07	0,07	100	25	50
MQ	-43	0,9964	2,5	0,24	3,0	1,0	50
TRM	-71	0,9968	0,9	0,25	30	1,0	1000
AML	-80	0,9978	2,67	0,81	600	40	50
CYNE	-55	0,992	1,95	0,58	7,5	6,6	50
FOSAL	-68	0,9935	3,52	0,65	40	20	2000

^a UHPLC-HESI-MS/MS műszeregyüttes precizitása (csúcs alatti terület, retenciós idő)

^b olívabogyóra és olívaolajra hatályos MRL értékek

A műszeregyüttes precizitásának megállapításához az elkészült extraktumot adalékoltunk a célvegyületek sztenderd oldatával (n=7). A csúcs alatti területekből számolt RSD % nem haladta meg a 10%-ot és a retenciós idő eltérések (RSD %) 1%-on belül voltak mindkét vizsgált mátrix esetén; ezeket az eredményeket a 26. táblázat rögzíti. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a kidolgozott módszer megfelel a SANTE által támasztott ismételtetési követelményeknek (Jogszabály 1). A csúcsalakok minden esetben kielégítőek voltak: a 10-11. ábrák mutatják a két minta két különböző koncentrációban rögzített EIC kromatogramjait mindkét korábban ismertetett műszeregyüttessel.



5.4.4. Összegzés

Ebben a fejezetben poláris peszticidek mennyiségi meghatározására alkalmas módszert fejlesztettünk olíwabogyó és olívaolaj mátrixokra HPLC-ESI-TOF-MS és UHPLC-HESI-MS/MS kapcsolt analitikai rendszereken. Noha a poláris növényvédő szerek olíva, ill. olívaolaj mátrixból történő meghatározása megfelelő kinyerési hatásfokú volt, kisebb vagy közepes mátrixhatást tapasztaltunk, függetlenül a meghatározáshoz használt készülék érzékenységétől. Az olíva mátrix összetettsége rontotta az analitikai teljesítményjelzőket, többek között a meghatározási határt, ugyanakkor az olívaolajra kapott eredmények kielégítőek voltak. Az olíwabogyó esetén a mátrix bonyolultságából kifolyólag alacsony, bár elfogadható kinyerési hatásfokot mértünk a DQ, PQ és AML növényvédő szerekre, amely lehetővé teszi a módszer rutin eljárásként történő alkalmazását. Hasonlóképpen, a mátrixhatás alacsony volt az olívaolaj esetén (kb. 20% átlagos jelsupresszió), míg olíwabogyó esetén ez az érték sokkal magasabbnak adódott (30-50%). Összességében az UHPLC(HILIC)-MS/MS módszer alkalmasnak bizonyult poláris növényvédő szerek olíva és olívaolajból történő meghatározására $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ mennyiségi meghatározási határral, amely jelentősen alatta van a jelenlegi MRL értékeknek. Ugyanakkor további vizsgálatokra lenne szükség a célkomponens-veszteségek minimalizálásának érdekében, amire megoldást nyújthat a hagyományos tisztítási lépésnek a kidolgozott minta-előkészítési módszerbe történő iktatása.



6.1. ÖSSZEFOGLALÁS

6.1.1. Új generációs szuperkritikus fluidkromatográfia alkalmazhatósága a növényvédő szermaradványok átfogó vizsgálatában

Élelmiszerbiztonsági szempontból elengedhetetlen a növényvédő szerek folyamatos ellenőrzése, megfelelő nyilvántartása és monitorozása. Ma a multi-komponenses növényvédő szer elemzést alapvetően tömegspektrométerrel végzik (MS, MSⁿ). A tömegspektrométer előtti elválasztási módszer rendszerint folyadékromatográfia vagy gázkromatográfia. A két elválasztási módszer nem helyettesíti, hanem inkább kiegészíti egymást. Az elmúlt tíz évben jelentősen nőtt az LC-MS alkalmazások száma annak ellenére, hogy számos növényvédő szer (mint például kvintozen, aldrin, folpet, heptaklór) kizárólag GC-kompatibilisek. Ebben a fejezetben egy új generációs szuperkritikus fluid kromatográfiai rendszer (UPC²) csatolását oldottam meg ESI-MS műszerhez és alkalmaztam mind GC, mind pedig LC kompatibilis növényvédő szerek egyidejű meghatározására. Munkám során a célkomponensek kromatográfias viselkedését tanulmányoztam különböző UPC² beállítások mellett. Reprezentatív célkomponensként 30 növényvédő szer lett kiválasztva a következő szempontok szerint: LC és GC elválaszthatóság, pK_{o/w} érték, valamint az EN 15662:2008 mintaelőkészítési módszerrel való kompatibilitás. Az UPC²-PDA rendszerben detektált komponens csúcsokat kapacitás faktorok, azaz elúciós idő alapján hasonlítottam össze az LC-MS és GC-MS-ben tapasztalt elúciós profillal annak érdekében, hogy megállapítsam, egy adott komponens viselkedése UPC² rendszerben inkább LC vagy GC elválasztáshoz hasonlatos. A kísérletsorozatból az a következtetés vonható le, hogy az UPC² rendszerben megvalósuló, eddig nem minden esetben feltárt elúciós folyamatot teljesen alternatív rendszerként kell kezelni, azaz nem hasonlítható egyértelműen sem LC, sem pedig a GC kromatográfiához. Továbbá megállapítást nyert, hogy a CO₂ jelentősen és hátrányosan befolyásolja az ESI ionforrásba bejutó növényvédő szerek ionizációját, és porlasztást elősegítő víztartalmú oldat nélkül nem működőképes az ESI-MS csatolás. A mérhető komponensek számát nagy mértékben befolyásolja a koeluensként rendszerbe juttatott szerves oldószer minősége. Amennyiben metanolt használtam koeluensként, kisebb ionszupressziót tapasztaltam, mint acetonitril használata esetén. Érdekes megfigyelésként említhető, hogy a koeluens minőségének függvényében nemcsak az elúciós idő, hanem a komponensek elúciós sorrendje is változhat. Egyértelműen megállapítható, hogy amíg az RP rendszerben az acetonitril az „erősebb” szerves oldószer, addig az UPC² rendszerben a metanol elúciós erőssége a nagyobb.



6.1.2. Imazalil nyomon követése a szüretelés után kezelt citromhéjtól egészen az azzal készült süteményig

Az imazalil egyike a citrus gyümölcsök felületén leggyakrabban alkalmazott, szüretelés utáni gombaölő szereknek. A használati jellegéből fakadóan az imazalil főként a citrusok külső felületén található. A citrom és a narancs héját gyakorta alkalmazzák az ételek ízesítéséhez élelmiszerkészítés és feldolgozás során, ebből kifolyólag gyakori jelenség, hogy az imazalil a gyümölcshéjjal együtt átkerül az elkészült ételbe is. Figyelembe véve az imazalil viszonylag nagy stabilitását, mennyisége az elkészült ételekben nem elhanyagolható. Ebben a tanulmányban célul tűztem ki, hogy az imazalilt mennyiségileg nyomon követem a szerrel kezelt gyümölcstől egészen a házi készítésű citromos süteményig (muffin). Első lépésként imazalillal kezelt citromot vásároltam helyi forgalmazóknál, majd a háztarások számára a világhálón fellelhető öt, citromhéj mosási technika hatásfokát vettem górcső alá tudományos igényességgel. Ezt követően két módszer (EN 15662:2008, AOAC 2007.1) alkalmasságát vizsgáltam és hasonlítottam össze a citrom mátrixban és az elkülönített citrom részekben (héj, gyümölcshús, egész citrom) található imazalil szermaradvány mennyiségi meghatározásánál. 12 m/m% zsírtartalmú muffin mintát készítettem hagyományos sütési eljárással, amelyet vagy kontrollnak használtam, vagy pedig adalékoltam meghatározott imazalil tartalmú citromhéjjal ill. etanolban oldott imazalil sztenderddel. Az ily módon készült minta sokkal realisztikusabban adta vissza a háztartási körülményeket, mintha egyéb, akár boltban kapható muffin mintával hajtottam volna végre ezt a lépést, kihagyva a mátrix hőkezelés hatására történő megváltozását.

Az elkészült zsíros mátrixú, imazalillal adalékolt mintából az imazalil pontos mennyiségi meghatározásához mintaelőkészítési módszert kellett optimálnom, mely alapjául az EN 15662:2008 és AOAC 2007.1 módszerek szolgáltak, három módosítással: (i) hexánt adtam az extrakciós oldathoz, (ii) a tisztítási lépést megelőzőleg egy éjszakán át kifagyasztottam a minta zsírtartalmát, (iii) C₁₈ szorbenst használtam a mintaelőkészítés tisztítási lépésében. A célkomponens mennyiségi meghatározásához HPLC-ESI-MS/MS mérési összeállítást alkalmaztam, míg a vélhetően fellelhető bomlástermékek, metabolitok azonosítását és félkvantitatív nyomon követését HPLC-ESI-QTOF-MS rendszerrel hajtottam végre.

Az EN 15662:2008 módszer és annak módosított változatai nyújtottak jobb, többnyire 90% vagy magasabb kinyerési hatásfokot. A legjobb kinyerési hatásfokot a kifagyasztásos lépéssel bővített mintaelőkészítés esetén tapasztaltam, ami találkozik a jelenleg hatályos SANTE ajánlásával. A sütés következtében bekövetkezett bomlás számottevően magasabb volt akkor,



amikor az imazalil adagolást etanolban oldott imazalillal hajtottam végre, mint abban az esetben, amikor citromhéjjal (52% vs. 22%).

Ez a megfigyelés hívja fel a figyelmet arra, hogy a növényvédő szerek stabilitását nagymértékben befolyásolja annak az élelmiszerekbe történő bekerülésének módja. Fontos kiemelni, hogy Európában a csecsemőételeken kívül semmilyen szabályozás vagy határérték nincsen arra nézve, hogy a kész élelmiszerekben milyen mennyiségben lehetnek jelen a növényvédő szermaradványok, így ez a tanulmány talán elősegítheti hasonló témájú, valós élelmiszerfeldolgozás utáni növényvédő szer és metabolit-analitikai kutatások születését.

6.1.3. Különböző HILIC, kevert módú és egyéb vizes normál fázisú folyadékkromatográfiás elválasztási módszerek alkalmazhatóságának tanulmányozása analitikai kihívást jelentő poláris növényvédő szerek meghatározására, tömegspektrométer alapú detektálással

A vizsgálat célja az volt, hogy számszerűen értékelni tudjam különböző, tömegspektrométerrel csatolt kromatográfiás módszerek teljesítményét (LC-MS(/MS) 24 erősen poláris növényvédő szer meghatározása esetén. A kiválasztott célkomponensek név szerint a következők voltak: amino-metil-foszfonsav, amitrol, klórmkvát, ciromazin, daminozid, dietanolamin, difenzokvát, dikvát, etefon, glufozinát-ammónium, glufozinát-N-acetil, glifozát, etiléntiokarbamid, maleinsav-hidrazid, mepikvát, 3-(metil foszfinil)-propionsav, morfolin, nereistoxin, parakvát, foszfonsav, propilén tiourea, sztreptomycin, trietanolamin, és trimetil-szulfónium jodid. Mivel a vizsgált vegyületek gyakran nem vizsgálhatóak a hagyományos RP alapú elválasztással, ezért a multi-komponenses módszer fejlesztéséhez kilenc különböző, többnyire nem RP alapú kromatográfiás összeállítást vizsgáltam. Ezek között volt két hidrofil kölcsönhatás kromatográfiái (HILIC) módszer, két kevert módú oszlop (Sielc Technologies Obelisc N és Obelisc R), három normál fázisú oszlop HILIC üzemmódban alkalmazva (csupasz szilika és két szilika-bázisú kémiaiilag kötött oszlop (Spherisorb ciano és amino)), továbbá két hagyományos fordított fázisú C₁₈-as oszlop. Különböző kromatográfiás beállításokat és paramétereket vizsgáltam meg pozitív (17 célkomponens) és negatív (kilenc célkomponens) ionizációs módban. Annak érdekében, hogy össze tudjam hasonlítani és rangsorolni a különböző kromatográfiás megközelítéseket, osztályozást hajtottam végre, azaz olyan mérőszámot generáltam, amely százalékban kifejezve összesítette a tapasztalati úton megállapított teljesítményjelzőket. A mérőszám az alábbi három fő jellemzőből tevődött össze: (i) kapacitás faktor (SV), azaz holtterefogattól való elválás mértéke, (ii) relatív érzékenység és (iii) csúcshélesség. Noha egyetlenegy fejlesztett módszer sem volt önmagában alkalmas mind a 24 növényvédő szer elválasztására egy futtatásból, az optimális



elválasztást az 1,8 μm szemcseméretű UHPLC HILIC oszloppal értem el pozitív ionizációs módban. Ezzel az oszloppal képes voltam 22 célkomponens elválasztására a 24-ből. A glifozát és amino-metil-foszfonsav növényvédő szereket kizárólag a zwitterionos jellegű kevert elválasztási módú (Obelisc N) oszloppal tudtam kielégítő analitikai jellemzőkkel elválasztani. Ez az oszlop bizonyult egyedül alkalmasnak a negatív ionizációs módban ionizálódó növényvédő szerek mindegyikének elválasztására. Végezetül a minősítő rendszer segítségével kiválasztott módszer (UHPLC HILIC) alkalmasnak bizonyult a poláris növényvédő szerek narancs mintából való mennyiségi meghatározására sztenderd addíciót alkalmazva. A mennyiségi meghatározási határok a kiválasztott célkomponensekre nézve 0,003-tól 0,56 mg kg^{-1} -nak adódtak.

6.1.4. Poláris növényvédő szerek meghatározása olíwabogyóból és olívaolajból tömegspektrométerrel csatolt hidrofil kölcsönhatás folyadékkromatográfiával

A poláris növényvédő szerek meghatározása önmagában is kihívás az analitikus számára, ám a zsíros mátrixú mintából való kinyerése szintúgy. A kettős kihívás együttes megoldásához tandem tömegspektrometriával (ESI-MS/MS) és repülési idő tömegspektrométerrel (ESI-TOF-MS) csatolt hidrofil kölcsönhatás folyadékkromatográfiát alkalmaztunk amitrol, ciromazin, dikvát, parakvát, mepikvát, rimetilszulfónium (trimesium, glifozát ellenion) és foszetil-alumínium célkomponensekre. A mintaelőkészítési módszer víz-metanolos extrakció volt. A mintaelőkészítés teljesítményének értékelését a célkomponensek kinyerési hatásfokával és a tanulmányozott minták mátrixhatásával határoztuk meg.

Noha a poláris növényvédő szerek olíva ill. olívaolaj mátrixból történő meghatározása megfelelő kinyerési hatásfokú volt, kisebb vagy közepes mátrixhatást tapasztaltunk, függetlenül a meghatározáshoz használt készülék érzékenységétől. Az olíva mátrix összetettsége rontotta az analitikai teljesítményjelzőket, többek között a meghatározási határt. Az olívaolajra kapott eredmények kielégítőek voltak. Az olíwabogyó esetén a mátrix bonyolultságából kifolyólag alacsony, bár elfogadható kinyerési hatásfokot mértünk a dikvát, parakvát és amitrol növényvédő szerekre, amely lehetővé teszi a módszer alkalmazását rutin elemzéshez. Hasonlóképpen a mátrixhatás alacsony volt az olívaolaj esetén (kb. 20% átlagos jelsuppresszió), amíg olíwabogyó esetén ez az érték sokkal magasabb volt (30-50%). Összességében az UHPLC(HILIC)-MS/MS módszer alkalmasnak bizonyult poláris növényvédő szerek olíva és olívaolajból történő meghatározására 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ meghatározási határral, ami teljesíti a jelenlegi MRL értéket. Ugyanakkor további vizsgálatokra lenne szükség a mátrix hatás célkomponens veszteségének



minimalizálás érdekében: erre megoldást nyújthat a hagyományos tisztítási lépésnek az optimált mintaelőkészítési módszerbe történő iktatása.

6.2. SUMMARY

6.2.1. Applicability of ultra performance convergence chromatography, a new generation of supercritical fluid chromatography, for the analysis of pesticide residues

Monitoring and controlling a wide variety of pesticide residues is an essential part of food safety. In the field of multiresidue pesticide analysis, HPLC and GC-based mass spectrometry (MS) methods are the preferred choices and they are considered complementary to each other. In the latest years, there has been a remarkable increase in the number of LC-MS applications; nevertheless, there are compounds such as quintozene, aldrin, folpet, and heptachlor that are typically GC-amenable and LC separation cannot provide satisfactory chromatographic results. In our study, an ultra-performance convergent chromatography (UPC²), a new generation supercritical fluid chromatography (SCF), coupled to ESI-MS/MS system was applied to separate a set of pesticides to investigate their chromatographic behavior under various UPC² conditions. The 30 components involved in the study were representatively selected based on LC and GC compatibility, pK_o/w values and compatibility with the EN 15662:2008 sample preparation method. Chromatographic parameters such as the capacity factor and the peak shape of tested pesticides were compared to the corresponding data obtained from LC-MS and GC-MS runs. Based on these results, an attempt was made to estimate the similarity of the chromatographic behavior of the tested pesticides in the UPC² system with the one observed with GC and LC separations. It can be concluded that separation mechanisms relevant to the studied compounds in the UPC² system do not resemble to what is known in LC or GC systems, which indicates that UPC² can be considered as an alternative chromatographic approach with not yet fully established separation mechanisms. Furthermore, our findings indicate that using CO₂ in the UPC² mobile phase has a significant influence on ESI-MS ionization. That is, the number of detected components highly depends on the mobile phase composition used. In case methanol was used as a mobile phase modifier (co-eluent) in CO₂, lower ion suppression was observed compared to the case when acetonitrile was used. An interesting observation was also made regarding the eluotropic strength of acetonitrile and methanol acting as modifiers of the CO₂ mobile phase of the UPC² system: acetonitrile that is considered the stronger eluent in RP-LC separations compared to methanol turned out to be weaker when the same



compounds were separated in an UPC² system with CO₂ as the main constituent of the mobile phase.

6.2.2. Follow-up of the fate of imazalil from post-harvest lemon surface treatment to a baking experiment

Imazalil is one of the most widespread fungicides used for the post-harvest treatment of citrus species and it is therefore localized mostly on the surface of fruits. As citrus peel is often used as a spice for food processing and preparation, the carry-over of imazalil from citrus fruits to food products is an obvious and frequent event. Taking into account the relatively high stability of imazalil, the residual amount of this fungicide may not be negligible.

The goal of our comprehensive study was to quantitatively monitor the pathway of imazalil throughout a complete food preparation process. That is, imazalil-treated lemon batches were purchased from local markets, and the cleaning efficiency of household related washing procedures was determined first. After determining separately the imazalil contents of lemon peels and pulps, lemon peels were used to prepare a high-fat matrix cake that went through a usual baking /200 °C/ step, which models more closely the real household situation than spiking any food product with the standard solution of imazalil and avoiding any heat treatments to facilitate sample preparation issues.

In order to quantitatively extract imazalil from the baked fatty cake matrix, the sample preparation approach was adapted and validated on the basis of the EN 15662:2008 and the AOAC 2007.1 methods with three modifications, i.e., (i) hexane was added to the extraction solution, (ii) the cleaning step was applied after an overnight-long freeze-out step; (iii) the C₁₈ sorbent was added at the cleaning step of the sample preparation. Imazalil was quantified with the help of an HPLC-ESI-MS/MS setup, while imazalil degradation was followed with an HPLC-ESI-QTOF-MS system.

As a conclusion, EN 15662:2008 method and its modifications generally resulted in better recovery values, mostly exceeding 90%, which meets the actual SANTE recommendations, provided the freezing step was included in the sample preparation process. The degradation of imazalil during the baking process was significantly higher when this analyte was spiked to the cake matrix in standard solution form than in the case of preparing the cake with imazalil-containing lemon peel (52% vs. 22%). This observation calls the attention to the careful evaluation of pesticide stability data that are based on solution spiking experiments.

Taking into consideration the washing procedures of the entire lemon samples as well, the overall carry-over rate of imazalil from the lemon until the baked cake products ranged between



55-76%. However, there is no regulation in the EU for pesticide residues in final food products except for some special commodities such as baby foods, this high level of residual imazalil should trigger more real world scenario based experiments in this field.

6.2.3. Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides

The aim of the study was to evaluate the performance of different chromatographic approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS(/MS)) determination of 24 selected highly polar pesticides and residues, namely, aminomethylphosphonic acid, amitrol, chlormequat, cyromazine, daminozide, dietanolamin, difenzoquat, diquat, ethephon, glufosinate-ammonium, glufosinate-N-acetyl, glyphosate, 2-imidazolidinethione, maleic hydrazide, mepiquat, 3-(methylphosphinico)propionic acid, morpholine, nereistoxin, paraquat, phosphorous acid, propylene thiourea, streptomycin, triethanolamine, and trimethylsulfonium iodide. The studied compounds, that are unsuitable in most cases for conventional LC-MS(/MS) multiresidue methods were tested under nine different chromatographic conditions, including two different hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) columns, two mixed-mode columns (Sielc Technologies Obelisc N and Obelisc R), three normal phase columns operated in HILIC-mode (bare silica and two silica-based chemically bonded columns (Spherisorb cyano and amino)), and two standard reversed-phase C₁₈ columns. Different sets of chromatographic parameters in positive (for 17 analytes) and negative ionization modes (for nine analytes) were examined. In order to compare and contrast the different approaches, a semi-quantitative classification was proposed, which was calculated as the percentage of an empirical performance value consisting of three main features: (i) the capacity factor (k) to measure analyte separation from the void, (ii) the relative response factor (sensitivity) and (iii) peak shape based on analytes' peak width. While no single method was able to provide appropriate detection of all the 24 studied species in a single run, the best suited approach for the compounds ionized in positive mode was the one based on a UHPLC HILIC column with 1.8 μm particle size, which provided appropriate results for 22 out of the 24 species tested. In contrast, the detection of glyphosate and aminomethylphosphonic acid could only be achieved with a zwitterionic-type mixed-mode column (Obelisc N). This column, however, proved to be suitable only for the pesticides detected in negative ion mode. Finally, the selected approach (UHPLC HILIC) was found to be useful for the determination of pesticides in oranges using HILIC-ESI-QTOF-MS with the limits of quantitation in the range from 0.003 to 0.56 mg kg⁻¹.



6.2.4. Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry

Quantifying polar pesticides is a real big challenge in itself, but the fatty food matrix also renders the analytical task often difficult. To solve this double challenge, two HPLC-MS methods were developed for the determination of polar pesticides in olive oil and olive samples. First, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) separation followed by mass spectrometric detection with tandem mass spectrometry using a triple quadrupole instrument operated in multiple reaction monitoring mode (HILIC-ESI-MS/MS) was addressed. In the second method, the same chromatographic set-up was coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (HILIC-ESI-TOF-MS). The selected polar pesticides included in the study were amitrol, cyromazine, diquat, paraquat, mepiquat, trimethylsulfonium (trimesium, glyphosate counterion) and fosetyl-aluminum. The sample preparation procedure was based on liquid partitioning with methanol. The performance of sample extraction was evaluated in terms of analyte recovery and matrix effects both in olive oil and in olive matrices. While the developed method for the determination of pesticides in olives and olive oil exhibited appropriate recoveries. Regardless which instruments were used - minor or moderate matrix effects and high sensitivity - the complexity of olive matrix hampers the performance and analytical parameters such as limit of quantifications. The results obtained for olive oil were satisfactory, while, because of the high matrix complexity of olives, poor recovery rates were obtained for diquat, paraquat and amitrol, although with a reasonable precision enabling its use in routine analysis. Similarly, matrix effects were minor in the case of olive oil (ca. 20% average signal), while significantly higher suppression was observed for olives (30-50%). The studied approaches were found to be useful for the determination of the selected pesticides in olive oil and olive matrices with the limits of quantitation below $5.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ in compliance with MRLs. However, the use of the tandem mass spectrometry (UHPLC(HILIC)-MS/MS) method still allowed the quantification of the target pesticides in compliance with the actual MRLs. Further progress should be conducted to minimize matrix effects and losses of these challenging analytes by means of additional tailored clean-up steps.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálámat kifejezni mindazoknak, akik közvetlenül, közvetve, kisebb vagy nagyobb mértékben hozzájárultak ahhoz, hogy doktori disszertációm elkészülhessen.

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Dernovics Mihálynak, akivel 2009 óta együtt dolgozom, akitől rengeteget tanultam, és akinek segítségére egész PhD tanulmányom alatt számíthattam.

Másodsorban köszönöm a Jaén-i Egyetem Juan-Francisco García-Reyes által vezetett csoportjának azt a kedvességet és segítőkészséget, melyet külföldi tartózkodásom során irányomba tanúsítottak. Úgy érzem, nagyon sokat köszönhetek JuanFra-nak, akitől a Jaénben töltött öt hónap alatt nem csupán lehetőséget és anyagi támogatást kaptam a kutatásaimhoz, hanem szakmai fejlődésemhez is nagymértékben hozzájárult.

Külön köszönöm mindkét diplomázó hallgatónak, Korpics Evelinnek és Rácz Barnabás Andrásnak, hogy lelkiismeretesen hajtottak végre minden feladatot, amit rájuk bízam, és hogy hatékonyan tudunk együtt dolgozni.

Szeretném megköszönni Dr. Lelik Lászlónak és Dr. Szekeres Andrásnak, hogy a rövid határidő ellenére elvállalták doktori dolgozatom kázi bírálatát.

Szeretném megköszönni az Alkalmazott Kémia Tanszék minden volt és jelenlegi dolgozójának, hogy barátságos légkört teremtettek.

Dr. Fodor Péternek azt, hogy meglátta bennem a lehetőséget és tanszéki mérnökként való alkalmazással bekerültem a tanszéki vérkeringésb, nem utolsó sorban a „noszogatásáért” a dolgozat elkészülésével kapcsolatban.

Köszönöm Dr. Abrankó Lászlónak, hogy segített felvenni a kapcsolatot Dr. Juhász Tamással, a Waters Kft. alkalmazottjával és így lehetőségem nyílt az UPC² demo-készülék használatára.

Hálával tartozom Marczika Andrásné Dr. Sörös Csilla és Dr. Kosáry Juditnak, hogy mindig fordulhattam hozzájuk, ha kérdésem volt. Firisz Zsuzsának, hogy mindig számíthattam a segítségére, ha rajtam kívül álló okok miatt elcsúsztam az aznap tervezett munkával, így vagy bezárnak, vagy kizavarnak az épületből, és hogy mindig ott volt, ha nyomta valami a lelkem.

Dr. Papp Nóri! Köszönöm a barátságodat, és hogy együtt szenvedtünk a TOF tisztításával és szervizelésével - együtt jobb volt. Mint ahogy köszönöm doktorandusz társaim barátságát: Albert Kriszta, Györey Anca, Németh Anikó, Egressy-Molnár Orsolya, Lénárt Jocó, Polgár László, Nagy Ádám, Dorkó Lilla, Varga Áron és még sorolhatnám. ☺

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családom, Édesanyám és Édesapám lelki és anyagi támogatását. Az a tény, hogy befejezhettem doktoranduszi pályafutásomat az Alkalmazott Kémia Tanszéken, szüleimet büszkeséggel töltötte el, ami számomra ösztönző volt. Ugyanilyen ösztönző erővel szolgált testvérem, Vass Szilviának a fordított pszichológiája, aminek a doktori pályafutásom éveitől kezdve mindig hangot adott. ☺ Katrenák Máténak és Annának is hálával tartozom, hogy könnyebbé, szervezetté tették a mindennapjaimat, otthont biztosítottak számomra, hogy számíthattam rájuk az ügyes-bajos dolgaim intézésében annak érdekében, hogy ez a dolgozat időben elkészülhessen.

KÖSZÖNÖM MINDENKINEK!

MELLÉKLETEK

Referenciák

- Abdullah, M. P., Daud, J., Hong, K. S., & Yew, C. H. (1995). Improved method for the determination of glyphosate in water. *Journal of Chromatography A*, 697(1-2), 363-369.
- Acedo-Valenzuela, M. I., Galeano-Díaz, T., Mora-Díez, N., & Silva-Rodríguez, A. (2004). Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 519(1), 65-71.
- Agüera, A., Piedra, L., Hernando, M. D., Fernández-Alba, A. R., & Contreras, M. (2000). Splitless large-volume GC-MS injection for the analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in vegetables using a miniaturised ethyl acetate extraction. *Analyst*, 125(8), 1397-1402.
- Ahuj, S., Scypinski, S. (2001) Handbook of modern pharmaceutical analysis, ISBN 9780120455553, Marcel Dekker Inc, New York Basel
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., & Vieth, B. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, 25(6), 838-865.
- Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 499(C), 177-196.
- Altieri, G., Di Renzo, G. C., Genovese, F., Calandra, M., & Strano, M. C. (2013). A new method for the postharvest application of imazalil fungicide to citrus fruit. *Biosystems Engineering*, 115(4), 434-443.
- Anagnostopoulos, C., Bourmpopoulou, A., & Miliadis, G. (2013). Development and validation of a dispersive solid phase extraction liquid chromatography mass spectrometry method with electrospray ionization for the determination of multiclass pesticides and metabolites in meat and milk. *Analytical Letters*, 46(16), 2526-2541.
- Anagnostopoulos, C., Liapis, K., Haroutounian, S. A., & Miliadis, G. E. (2014). Development of an Easy Multiresidue Method for Fat-Soluble Pesticides in Animal Products Using Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 7(1), 205-216.
- Andraščíková M., & Hrouzková S. (2013). A comparative study of three modifications of the QuEChERS method for determination of endocrine disrupting pesticide residues in lemon matrices by fast GC-MS. *Analytical Methods*, 5(6), 1374-1384.
- Andraščíková, M., Matisová, E., & Hrouzková, S. (2015). Liquid phase microextraction techniques as a sample preparation step for analysis of pesticide residues in food. *Separation and Purification Reviews*, 44(1), 1-18.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-

R

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

- phase extraction' for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist*, 86 (2), 412-431.
- Anastassiades, M., Scherbaum, E., Taşdelen, B., & Štajnbaher, D. (2007) Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*, 439-458
- Arend, M. W., & Ballschmiter, K. (2000). A new sample preparation technique for organochlorines in cod liver oil combining SPE and NP-HPLC with HRGC-ECD. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(4), 324-328.
- Berger, T. A. (1995). Feasibility of screening large aqueous samples for thermally unstable pesticides using high efficiency packed column supercritical fluid chromatography with multiple detectors. *Chromatographia*, 41(7-8), 471-484.
- Bernal, J., Ares, A. M., Pól, J., & Wiedmer, S. K. (2011). Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7438-7452.
- Bernal, J. L., Jiménez, J. J., Rivera, J. M., Toribio, L., & Del Nozal Ma, J. (1996). On-line solid-phase extraction coupled to supercritical fluid chromatography with diode array detection for the determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 754(1-2), 145-157.
- Besil, N., Pérez-Parada, A., Cesio, V., Varela, P., Rivas, F., & Heinzen, H. (2016). Degradation of imazalil, orthophenylphenol and pyrimethanil in Clementine mandarins under conventional postharvest industrial conditions at 4 °C. *Food Chemistry*, 194, 1132-1137.
- Beyer, A., & Biziuk, M. (2010). Comparison of efficiency of different sorbents used during clean-up of extracts for determination of polychlorinated biphenyls and pesticide residues in low-fat food. *Food Research International*, 43(3), 831-837.
- Bicchi, C., Balbo, C., D'Amato, A., & Panero, O. (1996). SFC-UV determination of diflubenzuron residues, teflubenzuron and triflumuron in apple and pear pulps for baby food. *Chromatographia*, 43(7-8), 439-443.
- Boersema, P. J., Mohammed, S., & Heck, A. J. R. (2008). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 151-159.
- Chang, H. C. K., & Taylor, L. T. (1990). Use of sulfur chemiluminescence detection after supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 517(C), 491-501.
- Chauve, B., Guillarme, D., Cléon, P., & Veuthey, J. L. (2010). Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds. *Journal of Separation Science*, 33(6-7), 752-764.
- Chen, Z., Dong, F., Xu, J., Liu, X., Cheng, Y., Liu, N., Tao, Y., Pan, X., & Zheng, Y. (2014) Stereoselective separation and pharmacokinetic dissipation of the chiral neonicotinoid

- sulfoxaflor in soil by ultraperformance convergence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(26), 6677–6690.
- Cherta, L., Portolés, T., Beltran, J., Pitarch, E., Mol, J. G. J., & Hernández, F. (2013). Application of gas chromatography-(triple quadrupole) mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for the determination of multiclass pesticides in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1314, 224-240.
- Choi, S., Kim, S., Shin, J. Y., Kim, M., & Kim, J. H. (2015). Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 173, 1236-1242.
- Chu, B. L., Guo, B. Y., Peng, Z., Wang, Z., Guo, G., & Lin, J. M. (2007). Studies on degradation of imazalil enantiomers in soil using capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 30(6), 923-929.
- Chung, S. W. C., & Chan, B. T.P. (2010). Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types *Journal of Chromatography A*, 1217(29), 4815–4824.
- Churms, S. C. (1996). Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. *Journal of Chromatography A*, 720(2), 75-91.
- Da Rosa, J. S., Freitas-Silva, O., Pacheco, S., De Oliveira Godoy, R. L., & De Rezende, C. M. (2012). LC-MS based screening and targeted profiling methods for complex plant: Coffee a case study. *Current Drug Metabolism*, 13(9), 1244-1250.
- Daunoravičius, Ž., Juknaite, I., Naujalis, E., & Padaruskas, A. (2006). Simple and rapid determination of denaturants in alcohol formulations by hydrophilic interaction chromatography. *Chromatographia*, 63(7-8), 373-377.
- De Waard, M. A., Groeneweg, H., & Van Nistelrooy, J. G. M. (1982). Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88(3), 99-112.
- Dugay, J., & Hennion, M. C. (1995). Evaluation of the performance of analytical procedures for the trace-level determination of aminotriazole in drinking waters. *Trends in Analytical Chemistry*, 14(8), 407-414.
- Eaton, S. F., & McDonald, P. D. (2012). Waters ACQUITY UPC2 system for convergence chromatography. *Chimica Oggi/Chemistry Today*, 30(6), 2-3.
- EFSA Technical Report 2014: EN-674, Outcome of the consultation with Member States, the applicant and EFSA on the pesticide risk assessment of confirmatory data for the a imazalil,

- Parma, Italy active substance; [cited 2015 July 28]. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/674e.pdf>.
- Egbuta, C., Lo, J., & Ghosh, D. (2014). Mechanism of inhibition of estrogen biosynthesis by azole fungicides. *Endocrinology*, *155*(12), 4622-4628.
- El-Saeid, M. H. (2003). Pesticide residues in canned foods, fruits, and vegetables: the application of Supercritical Fluid Extraction and chromatographic techniques in the analysis. *The Scientific World Journal [electronic resource]*, *3*, 1314-1326.
- Ekpe A., Tong J. H., & Rodriguez, L. (2001). High performance liquid chromatographic method development and validation for the simultaneous quantitation of naproxen sodium and pseudoephedrine hydrochloride impurities. *Journal of Chromatographic Science* *39*(3), 81-86.
- Ericsson, M., & Colmsjö, A. (2000). Dynamic microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, *877*(1-2), 141-151.
- Evans, C. S., Startin, J. R., Goodall, D. M., & Keely, B. J. (2000). Improved sensitivity in detection of chlormequat by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *897*(1-2), 399-404.
- Fekete Jenő, 2009 A folyadékkromatográfia újabb fejlesztési irányai-HILIC, ISBN 978 963 06 8017 2. Merck Kft., Budapest
- Fernandes, V. C., Domingues, V. F., Mateus, N., & Delerue-Matos, C. (2013). Multiresidue pesticides analysis in soils using modified QuEChERS with disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction. *Journal of Separation Science*, *36*(2), 376-382.
- Feste, A. S., & Khan, I. (1993). Separation of glucooligosaccharides and polysaccharide hydrolysates by gradient elution hydrophilic interaction chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, *630*(2), 129-139.
- Frear, D. S., Swanson, H. R., & Mansager, E. R. (1989). Picloram metabolism in leafy spurge: Isolation and identification of glucose and gentiobiose conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*(5), 1408-1412.
- Gao, J., Wang, J., Zuo, M., Ma, L., Cui, Y., Yang, T., & Ding M (2015). A highly sensitive method for simultaneous determination of the quaternary ammonium pesticides chlormequat and mepiquat in pears and potatoes by modified QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *RSC Advances*, *5*(8), 5895-5903.
- Gao, M., Zhou, Y., Sheng, Y., Zhao, S., Deng, X., Guo, Ding Z , Wang G., & Peng T (2014). Determination of 12 bisphenol substances in functional foods by QuEChERS and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)*, *32*(11), 1201-1208.

- Garbis, S. D., Melse-Boonstra, A., West, C. E., & Van Breemen, R. B. (2001). Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography - Tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73(22), 5358-5364.
- García De Llasera, M. P., Gómez-Almaraz, L., Vera-Avila, L. E., & Peña-Alvarez, A. (2005) Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. *Journal of Chromatography A*, 1093(1-2), 139-146.
- Ghanbari R., Anwar F., Alkharfy K. M., Gilani A. H., Saari N. (2012) Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)-A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 1291-1340.
- Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Mezcua M., Molina-Díaz A., & Fernández-Alba AR. (2007) Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 55(26), 10548-10556.
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review. *Talanta*, 79(2), 109-128.
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Lozano, A., Fernández-Alba, A. R., & Molina-Díaz, A. (2010). Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. *Journal of Chromatography A*, 1217(39), 6022-6035.
- Gilbert-López, B., Jaén-Martos, L., García-Reyes, J. F., Villar-Pulido, M., Polgar, L., Ramos-Martos, N., & Molina-Díaz, A. (2012). Study on the occurrence of pesticide residues in fruit-based soft drinks from the EU market and morocco using liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Control*, 26(2), 341-346.
- Grumbach, E. S., Wagrowski-Diehl, D. M., Mazzeo, J. R., Alden, B., & Iraneta, P. C. (2004). Hydrophilic interaction chromatography using silica columns for the retention of polar analytes and enhanced ESI-MS sensitivity. *LC-GC North America*, 22(10), 1010-1023.
- Guo, Y. (2005). Analysis of quaternary amine compounds by hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry (HILIC/MS). *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28(4), 497-512.
- Guo, Y., & Gaiki, S. (2005). Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1074(1-2), 71-80.
- Hansen, L. G., & Lambert, R. J. (1987). Transfer of toxic trace substances by way of food animals: selected examples. *Journal of Environmental Quality*, 16(3), 200-205.

R

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

- Hao, Z., Xiao, B., & Weng, N. (2008). Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science*, 31(9), 1449-1464.
- Hartmann, E., Chen, Y., Mant, C. T., Jungbauer, A., & Hodges, R. S. (2003). Comparison of reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for the separation of amphipathic helical peptides with l- and d-amino acid substitutions in the hydrophilic face. *Journal of Chromatography A*, 1009(1-2), 61-71.
- Hau, J., Riediker, S., Varga, N., & Stadler, R. H. (2000). Determination of the plant growth regulator chlormequat in food by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 878(1), 77-86.
- Hawthorne, S. B., & Miller, D. J. (1988). Supercritical fluid chromatography/mass spectrometry using a simple capillary-direct interface. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 330(3), 235-236.
- Hayama, T., Yoshida, H., Todoroki, K., Nohta, H., & Yamaguchi, M. (2008). Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(14), 2203-2210.
- Hazime, R., Nguyen, Q. H., Ferronato, C., Salvador, A., Jaber, F., & Chovelon, J. M. (2014). Comparative study of imazalil degradation in three systems: UV/TiO₂, UV/ K₂S₂O₈ and UV/TiO₂/K₂S₂O₈. *Applied Catalysis B: Environmental*, 144, 286-291.
- Hemström, P., Szumski, M., & Irgum, K. (2006). Atom-transfer radical graft polymerization initiated directly from silica applied to functionalization of stationary phases for high-performance liquid chromatography in the hydrophilic interaction chromatography mode. *Analytical Chemistry*, 78(20), 7098-7103.
- Hengel, M. J., Jordan, R., & Maguire, W. (2014). Development and validation of a standardized method for the determination of morpholine residues in fruit commodities by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3697-3701.
- Hunter, K. (1985). High-performance liquid chromatographic strategies for the determination and confirmation of anticoagulant rodenticide in animal tissues. *Journal of Chromatography A*, 321(C), 255-272.
- Iijima, S. (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56-58.
- Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., & Tanaka, N. (2008). Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), 474-503.

- Ishibashi, M., Ando, T., Sakai, M., Matsubara, A., Uchikata, T., Fukusaki, E., & Bamba T. (2012). High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1266, 143-148.
- Ishibashi, M., Izumi, Y., Sakai, M., Ando, T., Fukusaki, E., & Bamba, T. (2015). High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), 4457-4463.
- Internet 1: <http://www.frac.info/> hozzáférés dátuma: 2016-03-22
- Internet 2: <http://www.irc-online.org/> hozzáférés dátuma: 2016-03-22
- Internet 3: <http://www.hracglobal.com/> hozzáférés dátuma: 2016-03-22
- Internet 4: QuPPE 7.1 Anastassiades M, Kolberg DI, Eichorn E, Benkestein A, Lukacevic S, Mack D, Wildgrube _C, Sigalova I, Dörk D, Barth A. Quick method for the analysis of residues of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin involving simultaneous extraction with methanol and LC-MS/MS determination (QuPPE-Method) Version 8.0, <http://www.crl-pesticides.eu>. hozzáférés dátuma: 2016-03-22
- Internet 5: QuPPE 8.1 Anastassiades M, Kolberg DI, Eichorn E, Benkestein A, Lukacevic S, Quick method for the analysis of residues of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin involving simultaneous extraction with methanol and LC-MS/MS determination (QuPPE-Method) Version 7.1, <http://www.crl-pesticides.eu>. hozzáférés dátuma: 2015-03-22
- Internet 6: LC-QTOF-MS/MS method for the simultaneous full scan and MS/MS analysis of pesticides in fruit and vegetables http://www.eurlpesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?LabID=500&CntID=1001&The_me_ID=1&Pdf=False&Lang=EN, hozzáférés dátuma: 2016-03-30
- Internet 7: http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database-redirect/index_en.htm, hozzáférés dátuma: 2016-03-30
- Internet 8: Douce, D., Hanock, P., Dudd, S., Mol, H G.J., Application of GC-triple quadrupole MS/MS for multi-residue analysis of pesticides in complex matrices <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000987en.pdf>, hozzáférés dátuma: 2015-05-04
- Internet 9: <http://allrecipes.com/recipe/lemon-muffins/> , hozzáférés dátuma: 2014-12-26.
- Itagaki, T., Jason Lai, S., & Binder, S. R. (1997). A rapid monitoring method of paraquat and diquat in serum and urine using ion-pairing bare-silica stationary phase HPLC following a single acidification step of sample pretreatment. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 20(20), 3339-3350.
- Ito, Y., Goto, T., Oka, H., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Takahashi, N., & Nakazawa, H. (2003). Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil, and o-phenylphenol in citrus

fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 861-866.

Jandera, P., & Hájek, T. (2009). Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *Journal of Separation Science*, 32(21), 3603-3619.

Jandera, P. (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, 29(1-2), 1-25.

Jentoft, R. E., & Gouw, T. H. (1970). Pressure-programmed supercritical fluidchromatography of wide molecular weight range mixture. *Journal of Chromatography Science*, 8(3),138-142.

Jiang, W., Fischer, G., Girmay, Y., & Irgum, K. (2006). Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode. *Journal of Chromatography A*, 1127(1-2), 82-91.

Jiang, Y., Cao, Z., Jia, R., Qi, H., & Chen, M. (2012). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid ice using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)*, 30(1), 39-44.

Jogszabály 1 "SANTE/11945/2015 Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.", 01. January. 2016.

Jogszabály 2 "17/1999. (VI. 16.) EüM rendelet az élelmiszerek vegyi szennyezettségének megengedhető mértékéről", 1999. június 16.

Jogszabály 3 "A Tanács 91/414/EGK irányelve a növényvédő szerek forgalomba hozataláról", 1991. július 15.

Jogszabály 4 "Az Európai Parlament és a Tanács 396/2005/EK rendelete a növényi és állati eredetű élelmiszerekben és takarmányokban, illetve azok felületén található megengedett növényvédő szer-maradékok határértékéről, valamint a 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról", 2005. február 23.

Jogszabály 5 "A Bizottság 212/2013/EU rendelete a 396/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet I. mellékletének az említett mellékletben felsorolt termékekre vonatkozó kiegészítések és módosítások tekintetében való felváltásából", 2013. március 11.

Jogszabály 6 "A Bizottság 149/2008/EK rendelete az I. mellékletben felsorolt termékek megengedett szermaradék-határértékeit megállapító II., III. és IV. melléklet létrehozása által a 96/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet módosításáról", 2008. január 29.

Jogszabály 7 "A Bizottság 839/2008/EK rendelete a bizonyos termékekben, illetve azok felületén található növényvédőszer-maradékok megengedett határértékéről szóló 396/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet II., III. és IV. mellékletének módosításáról", 2008. július 31.

R

Peszticid analitikai eljárások fejlesztése

- Jogszabály 8 “A Bizottság 260/2008/EK rendelete a 396/2005/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletnek a betakarítást követően füstölőszerrel végrehajtott kezelésre tekintettel eltérés hatálya alá eső hatóanyag-termék kombinációk jegyzékéről rendelkező VII. melléklet megállapításával történő módosításáról”, 2008. március 18.
- Jogszabály 9 “35/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet a csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabona alapú élelmiszerekről és bébiételekről”, 2004. április 21.
- Jogszabály 10 “Spanish Regulation. Real Decreto 290/2003 de 7 de marzo, por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal. BOE n 58, pp. 9299-9308.” 2003. március 7.
- Jogszabály 11”Commission Implementing Regulation (EU) No 400/2014 concerning a coordinated multiannual control programme of the Union for 2015, 2016 and 2017 to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides and to assess the consumer exposure to pesticide residues in and on food of plant and animal origin.” 2014. április 22.
- Kalinowski, H. T., & Smith, R. D. (1988). Pressure programmed microbore column supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for the determination of organophosphorus insecticides. *Analytical Chemistry*, 60(6), 529-535.
- Kambhampati, I., Roinestad, K. S., Hartman, T. G., Rosen, J. D., Fukuda, E. K., Lippincott, R. L., & Rosen, R. T. (1994). Determination of diquat and paraquat in water using high-performance liquid chromatography with confirmation by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 688(1-2), 67-73.
- Karayannis, N. M., Corwin, A. H., Baker, E. W., Klesper, E., & Walter, J. A. (1968). Apparatus and materials for hyperpressure gas chromatography of nonvolatile compounds. *Analytical Chemistry*, 40(11), 1736-1739.
- Kassim, D. M., Zainel, H. A., Al-Asaf, S. A., & Talib, E. K. (1988). The temperature dependence of the solubility of carbon dioxide in several extraction solvents. *Fluid Phase Equilibri*, 1(3), 287-294.
- Kazarian, A. A., Taylos M. R., Haddad, P. R., Nesterenko, P. V. & Paull, B. (2013). Single column comprehensive analysis of pharmaceutical preparations using dual-injection mixed-mode (ion-exchange and reversed-phase) and hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analitics* 86, 174-181.
- Kazarian, A. A., Nesterenko, P. N., Soisungnoen, P., Burakham, R., Srijaranai, S. & Paull, B. (2014). Comprehensive analysis of pharmaceutical products using simultaneous mixed-mode (ion-exchange/reversed-phase) and hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 37(16), 2138-2144.
- Kerlé, D., Ludwig, R., Geiger, A., & Paschek, D. (2009). Temperature dependence of the solubility of carbon dioxide in imidazolium-based ionic liquids. *Journal of Physical Chemistry B*. 113(38), 12727-12735.

- Klesper, E.; Corwin, A. H. & Turner, D. A. Y. (1962). High pressure gas chromatography above critical temperatures. *Journal of Organic Chemistry*, 27, 700-701
- Kittlaus, S., Schimanke, J., Kempe, G., & Speer, K. (2013). Development and validation of an efficient automated method for the analysis of 300 pesticides in foods using two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1283, 98-109.
- Kmellár, B., Abrankó, L., Fodor, P., & Lehotay, S.J. (2010). Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(10), 1415-1430.
- Koesukwiwat, U., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Dorweiler, K. J. & Leepipatpib, N. (2010). Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts, and doughs. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58(10), 5950-5958.
- Krämer, W. & Schirmer, U. Jeschke, P. Witschel, W. (2012) Modern Crop Protection Compounds, ISBN: 9783527329656, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany
- Kruve, A., Lamos, A., Kirillova, J., & Herodes, K. (2007). Pesticide residues in commercially available oranges and evaluation of potential washing methods. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences: Chemistry*, 56(3), 134-141.
- Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2007_a). Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 195-228.
- Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2007_b). Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6), 1663-1683.
- Lamouroux, C., Foglia, G., & Le Rouzo, G. (2011). How to separate ionic liquids: Use of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and mixed mode phases. *Journal of Chromatography A*, 1218(20), 3022-3028.
- Lankova, D., Kockovska, M., Lacina, O., Kalachova, K., Pulkrabova, J., & Hajslova, J. (2013). Rapid and simple method for determination of hexabromocyclododecanes and other LC-MS-MS-amenable brominated flame retardants in fish Rapid Detection in Food and Feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(24), 7829-7839.
- Lehotay, S. J., Maštovská, K., & Yun, S. J. (2005). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist*, 88(2), 630-638.
- Lehotay, S.J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W. D., Mastovska, K., Hoh, E., & Leepipatpiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the

analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1212(16), 2548-2560

- Lénárt, J., Bujna, E., Kovács, B., Békefi, E., Száraz, L. & Dernovics, M. (2013). Metabolomic approach assisted high resolution LC-ESI-MS based identification of a xenobiotic derivative of fenhexamid produced by *Lactobacillus casei*. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 61(37), 8969-8975.
- León, N., Pastor, A., & Yusá V. (2016). Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 149, 43-52.
- Li, F., & Hsieh, Y. (2008). Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for chemical analysis. *Journal of Separation Science*, 31(8), 1231-1237.
- Li, B., Zhao, H., Liu, J., Liu, W., Fan, S., Wu, G., & Zhao, R. (2015). Application of ultra-high performance supercritical fluid chromatography for the determination of carotenoids in dietary supplements. *Journal of Chromatography A*, 1425, 287-292
- Lin, F., Xie, X., Fan, N., Tu, Y., Chen, Y., Liao, W. & Hsieh, Y. (2015) Fast analysis of common fatty acids in edible vegetable oils by ultra-performance convergence chromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)*, 33(4), 397-402
- Liu, X., & Pohl, C. A., (2008). New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants. *Journal of Chromatography A*, 1191(1-2), 83-89.
- Liu, X. & Pohl, C. (2012). Comparison of reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimodal stationary phases and their use in active pharmaceutical ingredient and counterion determinations. *Journal of Chromatography A* 1232(6), 190-195.
- López Blanco, R., Gilbert-López, B., Rojas-Jiménez, J., Robles-Molina, J., Ramos-Martos, N., García-Reyes, J. F. & Molina-Díaz, A. (2016). Evaluation of processing factors for selected organic contaminants during virgin olive oil production: distribution of BTEXS during olives processing. *Food Chemistry*. 199, 273-279.
- Lopez-Avila, V., Charan, C. & Beckert, W. F. (1994) Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments. *Analytical Chemistry*, 66(7), 1097-1106
- Luke, M. A., Froberg, J. E., & Masumoto, H. T. (1975). Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58(5), 1020-1026.
- Lüttge, U., & Higinbotham, N. (1979). Transport in Plants. *Springer-Verlag New York Inc.* ISBN 0-387-90383-6 New York, ISBN:3-540-90383-6 Berlin, Hindelberg

R

Peszticid analitikai eljárások fejlesztése

- Martínez-Domínguez, G., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2016). Multi-class methodology to determine pesticides and mycotoxins in green tea and royal jelly supplements by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, *197*, 907-915.
- McCalley, D. V., & Neue, U. D. (2008). Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1192*(2), 225-229.
- McKay, A. H., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2012). Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. *Plant Disease*, *96*(2), 235-242.
- Michel, M., & Buszewski, B. (2002). HPLC determination of pesticide residue isolated from food matrices. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *25*(13-15), 2293-2306.
- Mol, H. G. J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., De Rijk, T. C., Stolker, A. A. M., & Mulder, P. P. J. (2008). Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry*, *80*(24), 9450-9459.
- Moni, L., Ciogli, A., D'Acquarica, I., Dondoni, A., Gasparri, F., & Marra, A. (2010). Synthesis of sugar-based silica gels by copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition via a single-step azido-activated silica intermediate and the use of the gels in hydrophilic interaction chromatography. *Chemistry - A European Journal*, *16*(19), 5712-5722.
- Murugaverl, B., Voorhees, K. J., & DeLuca, S. J. (1993). Utilization of a benchtop mass spectrometer with capillary supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *633*(1-2), 195-205.
- Nácher-Mestre, J., Serrano, R., Portolós, T., Berntssen, M. H. G., Pérez-Sánchez, J., & Hernández, F. (2014). Screening of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in feeds and fish tissues by gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(10), 2165-2174.
- Nagatomi, Y., Yoshioka, T., Yanagisawa, M., Uyama, A., & Mochizuki, N. (2013). Rapid analysis of paraquat and diquat in beer and malt using LC-MS/MS. *Journal of Pesticide Science*, *38*(3), 144-146.
- Nischang, I., Teasdale, I., & Bröggemann, O. (2010). Towards porous polymer monoliths for the efficient, retention-independent performance in the isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1217*(48), 7514-7522.

R

Peszticid analitikai eljárások fejlesztése

- Nollet L. M. L., M. L., & Rathore H. S. (2010) Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis , ISBN-13: 978-142008245-6 CRC Press Tylor& Farncis group. London New York
- Nougadère, A., Sirot, V., Kadar, A., Fastier, A., Truchot, E., Vergnet, C., Hommet Baylé, J., Gros, P., Leblanc, JC. (2012) Total diet study on pesticide residues in France: levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environment International*, 45, 135–150
- Nováková, L., Havláková, L., & Vlčková, H. (2014). Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 63, 55-
- Núñez, O., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2002). Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water. *Journal of Chromatography A*, 946(1-2), 275-282.
- Oh, J. A., Lee, J. B., Lee, S. H., & Shin, H. S. (2014). Ultra-trace level determination of diquat and paraquat residues in surface and drinking water using ion-pair liquid chromatography with tandem mass spectrometry: A comparison of direct injection and solid-phase extraction methods. *Journal of Separation Science*, 37(20), 2900-2910.
- Olsen, B. A. (2001). Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A*, 913(1-2), 113-122.
- Olson, L. K., & Caruso, J. A. (1992). Determination of halogenated compounds with supercritical fluid chromatography-microwave-induced plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7(6), 993-998.
- Omar, N., Bakar, J., & Muhammad, K. (2013). Determination of organochlorine pesticides in shrimp by gas chromatography-mass spectrometry using a modified QuEChERS approach. *Food Control*, 34(2), 318-322.
- Orlando, E. A., & Simionato, A. V. C. (2013). Extraction of tetracyclenic antibiotic residues from fish filet: Comparison and optimization of different procedures using liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1307, 111-118.
- Palou, L., Smilanick, J. L., & Droby, S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 4(2), 1-16.
- Park, K. H., Choi, J. H., Abd El-Aty, A. M., Musfiqur Rahman, M., Jang, J., Ko, A. Y., Kwon, K. S., Park, H. R., Kim, H.S., & Shim, J. H. (2013). Quantifying fenobucarb residue levels in beef muscles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and QuEChERS sample preparation. *Food Chemistry*, 138(4), 2306-2311.
- Picó, Y., Farrá, M., Segarra, R., & Barceló, D. (2010). Profiling of compounds and degradation products from the postharvest treatment of pears and apples by ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 81(1-2), 281-293.

R

Peszticid analitikai eljárások fejlesztése

- Polgár, L., Kmellár, B., García-Reyes, J. F., & Fodor, P. (2012). Comprehensive evaluation of the clean-up step in QuEChERS procedure for the multi-residue determination of pesticides in different vegetable oils using LC-MS/MS. *Analytical Methods*, 4(4), 1142-1148.
- Popp, M., Hann, S., Mentler, A., Fuerhacker, M., Stingeder, G., & Koellensperger, G. (2008). Determination of glyphosate and AMPA in surface and waste water using high-performance ion chromatography coupled to inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry (HPIC-ICP-DRC-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(2), 695-699.
- Pyo, D., Kim, H., Li, W., & Lee, M. L. (1997). Supercritical fluid chromatographic detection by use of a parallel flow restrictor. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 20(20), 3389-3399.
- Qin, Y., Zhao, P., Fan, S., Han, Y., Li, Y., Zou, N., Song, S., Zhang, Y., Li, F., Li, X., & Pan, C. (2015). The comparison of dispersive solid phase extraction and multi-plug filtration cleanup method based on multi-walled carbon nanotubes for pesticides multi-residue analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1385, 1-11.
- Quiming, N. S., Denola, N. L., Ueta, I., Saito, Y., Tatematsu, S., & Jinno, K. (2007). Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on a diol column in hydrophilic interaction chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 598(1), 41-50.
- Sadowska-Rociek, A., Surma, M., & Cieslik, E. (2014). Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), 1326-1338.
- Saito, M. (2012). History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(6), 590-599.
- Sanguinetti, P. (2005). Psychology of crop protection. *Chemistry and Industry (London)*(20), 17.
- Santiago, D. E., Araña, J., González-Díaz, O., Henríquez-Cárdenes, E., Ortega-Méndez, J., Pulido-Melián, E., Dona-Rodríguez, J.M., & Pérez-Peña, J. (2015). Treatment of wastewater containing imazalil by means of fenton-based processes. *Desalination and Water Treatment*, 35(13), 13865-13877.
- Sartarelli, N. C., De MacEdo, A. N., De Sousa, J. P., Nogueira, A. R. D. A., & Brondi, S. H. G. (2012). Determination of chlorfenvinphos, fipronil, and cypermethrin residues in meat and bovine fat using quechers method and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 35(13), 1895-1908.
- Schenck, F. J., Callery, P., Gannett, P. M., Daft, J. R., & Lehotay, S. J. (2002). Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist*, 85(5), 1177-1180.

- Shi, H., Taylor, L. T., Fujinari, E. M., & Yan, X. (1997). Sulfur-selective chemiluminescence detection with packed column supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 779(1-2), 307-313.
- Shimabukuro, R. H. (1985). Detoxification of herbicides. *Weed Physiology* (2), 215–240
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). Introduction to Modern Liquid Chromatography. ISBN: 978-0-470-16754-0, John Wiley and Sons, New York
- Spagou, K., Tsoukali, H., Raikos, N., Gika, H., Wilson, I. D., & Theodoridis, G. (2010). Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomic studies. *Journal of Separation Science*, 33(6-7), 716-727.
- Stachniuk, A., & Fornal, E. (2015). Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1654–1665.
- Startin, J. R., Hird, S. J., Sykes, M. D., Taylor, J. C., & Hill, A. R. C. (1999). Determination of residues of the plant growth regulator chlormequat in pears by ion-exchange high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analyst*, 124(7), 1011-1015.
- Strege, M. A. (1998). Hydrophilic Interaction Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. *Analytical Chemistry*, 70(13), 2439-2445.
- Strode, I. J. T. B., & Taylor, L. T. (1996). Optimization of electron-capture detector when using packed-column supercritical fluid chromatography with modified carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 723(2), 361-369.
- Sugiyama, K., Saito, M., Hondo, T., & Senda, M. (1985) New double-stage separation analysis method: Directly coupled laboratory-scale supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography, monitored with a multiwavelength ultraviolet detector. *Journal of Chromatography A*, 332(9), 107-116.
- Suzuki, Y., & Kaneko, T. (2009). Rapid and simple detection of paraquat and diquat in beverages using pipette-tip solid-phase extraction. *Bunseki Kagaku*, 58(12), 1029-1034.
- Szabvány 1: MSZ EN 12393-1:2014 Növényi eredetű élelmiszerek. A peszticid szermaradékok GC vagy LC-MS/MS meghatározásának módszerei. 1. rész: Általános megfontolások
- Szabvány 2: MSZ EN 12393-2:2014 Növényi eredetű élelmiszerek. A peszticid szermaradékok GC vagy LC-MS/MS meghatározásának módszerei. 2. rész: Extrakciós és tisztítási módszerek
- Szabvány 3: MSZ EN 12393-3:2014 Növényi eredetű élelmiszerek. A peszticid szermaradékok GC vagy LC-MS/MS meghatározásának módszerei. 3. rész: Meghatározás és megerősítő vizsgálatok

R

Peszticid analitikai eljárások fejlesztése

- Szabvány 4: MSZ EN 15637:2009 Növényi eredetű élelmiszerek. Peszticid szermaradékok metanolos extrakciót és kovaföldes tisztítást követő meghatározása LC-MS/MS-sel
- Szabvány 5: MSZ EN 15662:2009 Növényi eredetű élelmiszerek. Peszticid szermaradékok acetonnitriles extrakciót/szétválasztást és diszperziós SPE tisztítást követő meghatározása GC-MS-sel és/vagy LC-MS/MS-sel. QuEChERS-módszer
- Szabvány 6: MSZ EN 15741:2009 Takarmányok. Az OC-pestticidek és a PCB-k meghatározása GC/MS módszerrel
- Szabvány 7: MSZ EN 15742:2009 Takarmányok. Az OC-pestticidek és a PCB-k meghatározása GC/ECD módszerrel
- Szabvány 8: MSZ EN 16693:2016 Vízhőminőség. A szerves klórtartalmú pestticidek (OCP) meghatározása a teljes vízmintában. Szilárd fázisú extrakció (SPE) SPE-korongokkal, gázkromatográfiás tömegspektrometriával (GC-MS)
- Szabvány 9: MSZ EN 15054:2006 Zsírszegény élelmiszerek. A klórmekvát és mepikvát meghatározása. LC-MS módszer
- Szabvány 10: MSZ EN 15055:2006 Zsírszegény élelmiszerek. A klórmekvát és mepikvát meghatározása. LC-MS/MS módszer
- Szabvány 11: AOAC 2007.01. AOAC Official Method 2007.01 Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry
- Szigedi, T., Dernovics, M., & Fodor, M. (2011). Determination of protein, lipid and sugar contents of bakery products by using fourier-transform near infrared spectroscopy. *Acta Alimentaria*, 40(SUPPL. 21), 40, 222-229.
- Tankiewicz, M., Fenik, J., & Biziuk, M. (2010). Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. *Talanta*, 86(1), 8-22.
- Tarver, E. E., & Hill Jr, H. H. (1992). Comparison of a pulsed electron capture detector and a Fourier transform ion mobility detector after capillary supercritical fluid chromatography. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 344(10-11), 453-459.
- Taylor, L. T. (2009). Supercritical fluid chromatography for the 21st century. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 566-573.
- Thier, H-P. & Krichoff J.(1987). Manual of pesticide residue analysis-HILIC, ISBN 3-572-27017-5, Deutsche Forschungsgemeinschaft
- Thurman, E.M., Ferrer, I., Zweigenbaum, J.A., García-Reyes, J.F., Woodman, M., & Fernández-Alba, A.R. (2005). Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid

- chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082(1), 71-80.
- Tian, H. (2011). Uncertainty analysis of chlormequat residue in fruits by LC-MS-MS. *Chromatographia*, 73(5-6), 457-462.
- Tolstikov, V. V., & Fiehn, O. (2002). Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 301(2), 298-307.
- Tölgyesi L., Kele P., Torkos K. (2010) Determination of propylenethiourea, the main metabolite of propineb, in tomato by HILIC-MS. *Chromatographia* 71(1), 75-80.
- Uygun, U., Koksel, H., & Atli, A. (2005). Residue levels of malathion and its metabolites and fenitrothion in post-harvest treated wheat during storage, milling and baking. *Food Chemistry*, 92(4), 643-647.
- Uygun, U., Özkara, R., Özbey, A., & Koksel, H. (2007). Residue levels of malathion and fenitrothion and their metabolites in postharvest treated barley during storage and malting. *Food Chemistry*, 100(3), 1165-1169.
- Uygun, U., Senoz, B., & Koksel, H. (2008). Dissipation of organophosphorus pesticides in wheat during pasta processing. *Food Chemistry*, 109(2), 355-360.
- Uygun, U., Senoz, B., Öztürk, S., & Koksel, H. (2009). Degradation of organophosphorus pesticides in wheat during cookie processing. *Food Chemistry*, 117(2), 261-264.
- Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., & Hall, J. C. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, 51(4), 472-495.
- Voorhees, K. J., Gharaibeh, A. A., & Murugaverl, B. (1998). Integrated SFE/SFC/MS System for the Analysis of Pesticides in Animal Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2353-2359.
- Wang, J. H., Lu, X. Y., Huang, M., Wu, Z., Ma, G. P., & Xu, C. Y. (2007). Rapid screening and confirmation of chlormequat and mepiquat residues in tomato and its products using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 35(10), 1509-1512.
- Wang, L., Fei, T., Qi, D., Sha, Y., Wu, D., & Liu, B. (2015) Development of microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of maleic hydrazide residues in tobacco. *Analytical Methods* 12(7), 5103-5107.
- Weatherston, I., & Minks, A. K. (1995). Regulation of semiochemicals - global aspects. *Integrated Pest Management Reviews*, 1(1), 1-13.
- Wheeler, J. R., & McNally, M. E. (1987). Comparison of packed column and capillary column supercritical fluid chromatography and high-performance liquid chromatography using

representative herbicides and pesticides as typical moderate polarity and molecular weight range molecules. *Journal of Chromatography A*, 410(C), 343-353.

Whitehead, R. D., Montesano, M. A., Jayatilaka, N. K., Buckley, B., Winnik, B., Needham, L. L., & Barr, D. B. (2010) Method for measurement of the quaternary aperse compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878(27), 2548-2553.

Wu, J. Y., Bicker, W., & Lindner, W. (2008). Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode. *Journal of Separation Science*, 31(9), 1492-1503.

Yolci Omeroglu, P., Ambrus, Á., Boyacioglu, D., & Majzik, E. S. (2014). A case study to assess the sample preparation error in pesticide residue analysis. *Food Analytical Methods*, 8(2), 474-482.

Yoshioka, N., Asano, M., Kuse, A., Mitsuhashi, T., Nagasaki, Y., & Ueno, Y. (2011) Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(23), 3675-3680.

Yu, Z., Jin, F., Hu, J., Zhang, X., Sun, J., & Yang, M. (2010). An improved method for analyzing chlormequat and mepiquat in source waters by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 678(1), 90-95.

Zegers, B. N., Hessels, R., Jagesar, J., Rozenbrand, J., Lingeman, H., & Brinkman, U. A. T. (1995). Photoionization detection in packed-capillary liquid and supercritical-fluid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 18(3), 413-440.

Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A., & Chen, F. (2012). A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3), 900-925.

Zhao, T. J., Qi, H.-Y., Chen, J., & Shi, Y.P. (2015). Quantitative analysis of five toxic alkaloids in *Aconitum pendulum* using ultra-performance convergence chromatography (UPC²) coupled with mass spectrometry. *RSC Advances*, 5(126), 103869-103875.

Zhou, L., Liu, X., Kang, S., Zhang, F., & Pan, C. (2013). A rapid determination method for ethylenethiourea in potato and cucumber by modified QuEChERS-High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1355-1359.

Zhu, B.-Y., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (1991). Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, 548, 13-24.

Táblázat 1: HPLC-ESI-MS rendszerben CH₃CN koeluenssel a különböző hőmérsékleten detektálható komponenshez tartó retenciós idők.

Hőmérséklet	30°C		40°C		50°C		60°C	
	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2
Aldrin								
Azinfosz-metil		17,64		17,06		16,50		17,72
Azoxistrobin	18,34		17,91		17,48		16,98	
Boszkalid	18,60	18,74	18,32	18,33	17,88	17,89	17,44	17,45
Brómpropilát								
Karbendazim	1,76		1,71		1,69		1,65	
Klórprofám		18,41		18,23		18,13		17,61
Diazinon	22,17		21,84		21,40		20,91	
Diklorán								
Diklórvosz	12,60		12,16		11,82		11,39	
Dimetoát	8,89		8,55		7,94		7,71	
Eszfenvalerát		31,86		31,10		30,32		29,56
Fenhexamid	18,82		18,50		18,05		17,69	
Flutriafol		14,40		14,20		13,78		13,50
Folpet	16,98		16,72		16,40		16,13	
Heptaklór								
Pendarimetalin	29,21		28,39		27,60		26,79	
Permetrin		33,03		32,21		31,43		30,60
Piperonil-butoxid	24,49	24,44	23,98	23,98	23,47	23,49	22,95	22,97
Pirimikarb	7,25		7,23		7,43		7,62	
Pirimifosz-metil	22,21		21,86		21,46		20,99	
Prokloráz	17,71		17,78		17,61		17,49	
Kvintozen		15,15		15,70		15,70		15,80
Spiroxamin		15,99		15,85		15,62		15,30
Tau-fluvalinát		28,94		28,33		27,64		27,08
Tebufenpirád		23,72		23,35		22,90		22,44
Tiabendazol	1,74		1,72		1,67		1,67	
Triadimenol	16,94		16,75		16,41		16,10	
Trifloxistrobin	23,68		23,29		22,80		22,23	
α-Endoszulfán		16,90		16,70		16,40		16,10

Táblázat 3: UPC²-ESI-MS rendszerben CH₃CN koeluenssel a különböző hőmérsékleten detektálható komponenshez tartó retenciós idők.

Hőmérséklet	40 °C		50 °C		60 °C		70 °C	
	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2
Aldrin		x		x		x		x
Azinfosz-metil		4,48		4,49		4,58		4,75
Azoxistrobin	9,37		9,46		9,41		9,29	
Boszkalid	7,96	7,9	7,86	7,86	7,7	7,75	7,74	7,74
Brómpropilát		x		x		x		
Karbendazim	x		x		x		x	
Klórprofám		2,34		2,38		2,37		2,44
Diazinon	3,71		3,64		3,61		3,61	
Diklorán		x		x		x		x
Diklórvosz	3,51		3,52		3,53		3,55	
Dimetoát	8,6		8,45		8,26		8,14	
Eszfenvalerát		x		x		x		x
Fenhexamid	x		x		x		x	
Flutriafol		x		x				x
Folpet	x		x		x		x	
Heptaklór		x		x		x		x
Pendarimetalin	1,92		1,83		1,95		2,08	
Permetrin		1,88		x		x		x
Piperonil-butoxid	5,29	5,32	5,21	5,18	5,14	5,12	5	5,11
Pirimikarb	9,14		8,85		8,5		8,22	
Pirimifosz-metil	3,71		3,64		3,58		2,91	
Prokloráz	5,33		5,25		5,17		5,12	
Kvintozen		x		x		x		x
Spiroxamin		x		x		x		x
Tau-fluvalinát		2,07		2,34		2,44		2,47
Tebufenpirád		7,83		7,65		7,5		7,35
Tiabendazol	x		x		x			
Triadimenol	x		x		x		x	
Trifloxistrobin	2,95		2,92		3		3,16	
α-Endoszulfán		9,38		9,22		9,23		9,31

Táblázat 4: UPC²-ESI-MS rendszerben CH₃OH koeluenssel a különböző hőmérsékleten detektálható komponenshez tartó retenciós idők.

Hőmérséklet	40 °C		50 °C		60 °C		70 °C	
	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2	Mix1	Mix2
Aldrin		1,52		1,53		1,53		1,54
Azinfosz-metil		2,53		2,61		2,77		2,95
Azoxistrobin	3,73		3,97		4,08		4,19	
Boszkalid	4,27	4,24	4,33	4,31	4,51	4,49	4,58	4,66
Brómpropilát		x		x		x		x
Karbendazim	3,52		3,52		3,69		3,73	
Klórprofám		1,95		1,96		2		2,06
Diazinon	1,98		1,96		2,07		2,05	
Diklorán		x		x		x		x
Diklórvosz	1,86		1,88		1,92		1,88	
Dimetoát	3,42		3,43		3,57		3,58	
Eszfenvalerát		2,11		2,16		2,25		2,35
Fenhexamid	3,85		3,91		4,08		4,13	
Flutriafol		3,57		3,66		3,79		3,94
Folpet	3,35		3,38		3,52		3,55	
Heptaklór		11,4		11,39		11,39		11,4
Pendarimetalin	1,85		1,85		1,9		1,87	
Permetrin		1,51		1,52		1,53		1,54
Piperonil-butoxid	2,14	2,11	2,15	2,15	2,27	2,24	2,31	2,36
Pirimikarb	2,84		2,86		2,96		2,97	
Pirimifosz-metil	1,9		1,91		1,97		1,94	
Prokloráz	4,22		4,3		4,5		4,57	
Kvintozen		2,78		2,85		2,24		2,37
Spiroxamin	6,4		4,14		6,23		5,91	
Tau-fluvalinát		x		x				x
Tebufenpirád	2,83	2,78		2,85		2,97		3,06
Tiabendazol	x		x		x	x	x	
Triadimenol	3,35		3,38		3,51		3,55	
Trifloxistrobin	1,94		1,95		2,06		2,07	
α-Endoszulfán		x	3,82		4,07		4,18	x

M2: Supplementary material for the study: „Follow-up of the fate of imazalil from post-harvest lemon surface treatment to a baking experiment”

Note 1: The washing processes were collected from the grey literature as follows (all accessed for the latest time at 10/04/2015):

www.ehow.com/how_8246895_cook-lemon-zest-peel.html

www.wikihow.com/Zest-a-Lemon

<http://homemakersdaily.com/how-and-why-to-wash-produce-before-eating/>

<http://dontwastethecrumbs.com/2013/04/how-to-clean-produce-naturally-using-apple-cider-vinegar/>

SM Table 1: Preparation of working solutions of imazalil

Working solutions, ng mL ⁻¹	CH ₃ CN, μL	Milli-Q water, μL	10 μg mL ⁻¹ standard solution of imazalil, μL
0	2000	8000	0
250	1750	8000	250
500	1500	8000	500
750	1250	8000	750

SM Table 2: Statistical analysis of the data on IMA concentration obtained with the two different sample preparation methods, AOAC 2007.1 and EN 15662:2008. The difference and the significance were confirmed with unpaired two-sample t-tests with 95% confidence interval

Sample parts	P-value for the analysis following AOAC 2007.1	P-value for the analysis following EN 15662:2008
lemon peel	0.9899	0.0146
whole lemon	0.8875	0.0062
lemon pulp	0.2082	0.8915

SM Table 3: Statistical analysis of the different washing treatments with a confidence interval of 95%. F=F value, DF1= Degrees of freedom1 DF2= Degrees of freedom, Pr>F relation between the F value and P value

Statistics	F	DF1	DF2	Pr > F
Welch-statistics	26.903	5.000	11.159	0.000
Browne-Forsythe F-ratio	29.178	5.000	22.167	0.000

SM Table 4: Analysis of variance of the different washing treatments. DF= Degrees of freedom, SS= Sum of squares, MS= Mean squares, F= F value, Pr>F relation between the F value and P value

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	5	4.745	0.949	29.178	< 0.0001
Error	24	0.781	0.033		
Corrected Total	29	5.525			

Computed against model $Y = \text{Mean}(Y)$

SM Table 5: Fisher-Tuckey (round robin test; LSD) analysis of the differences between the different washing treatments with a confidence interval of 95%. LSD= Fisher's Least Significant Difference

Category	LS means	Groups		
Apple cider vinegar kitchen brush	2.662	A		
Detergent kitchen brush	3.070		B	
Cold water kitchen brush	3.192		B	
Hot water kitchen brush	3.596			C
Cold water	3.698			C
Control	3.788			C

SM Table 6: Sugar and fat contents of the baked cake samples (calculated from the recipe)

Sample type	Sugar content, m/m%	Fat content, m/m%
Control cake	15.2	12.1
Cake spiked with IMA solution	15.6	12.4
Cake prepared with lemon peel	15.0	11.8

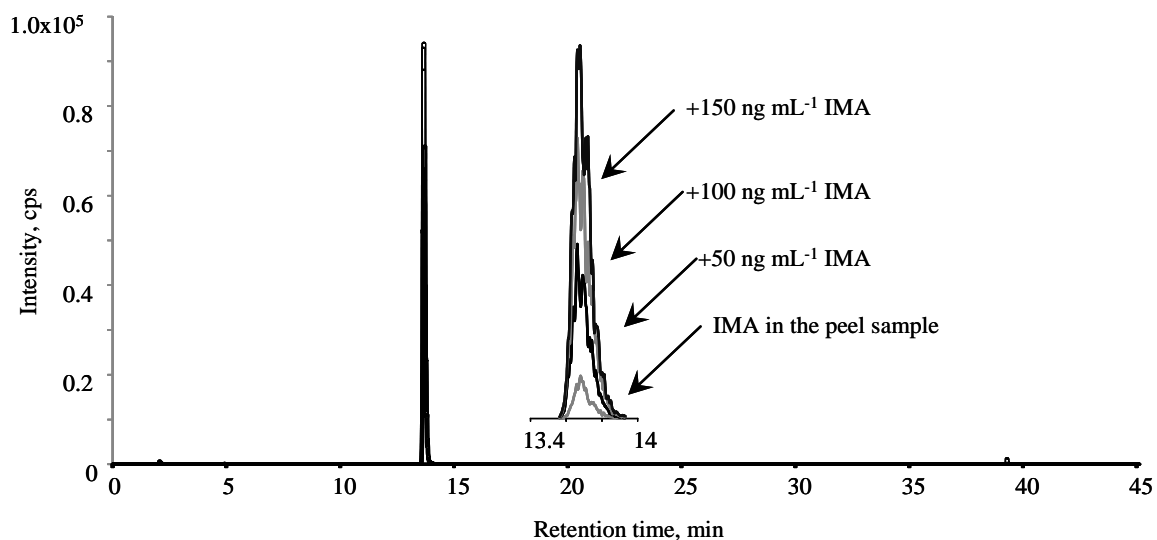
SM Table 7: Data of cake samples prepared for the baking experiments

Sample	cake spiked with imazalil	cake prepared with lemon peel
dough weight corrected for dry matter, g	386.4	409.6
IMA addition	30.0 μg IMA in ethanol solution	41.6 μg IMA in 11.00 g peel
μg IMA g^{-1} dough	0.11	0.07
μg IMA in 5.0 g sample	0.54	0.37
μg IMA in 1.0 ml analytical sample	0.22	0.15

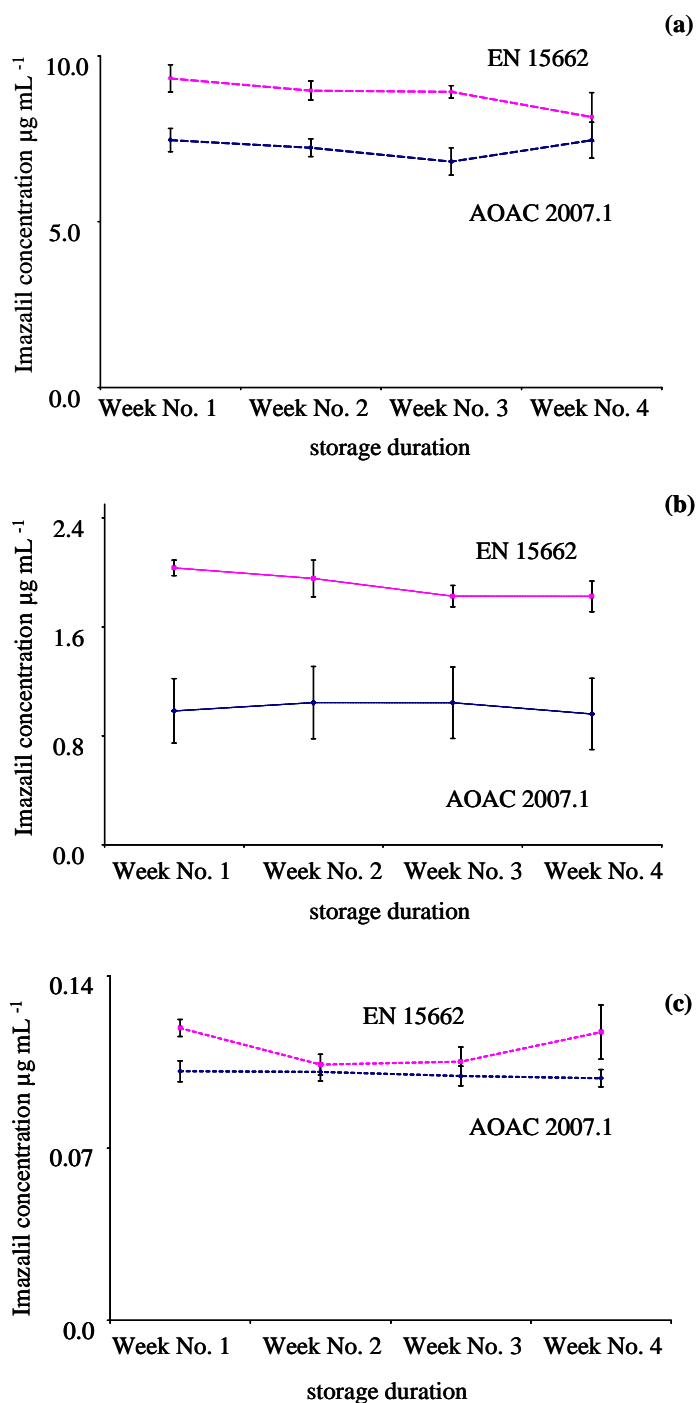
SM Table 8: Weights of cake samples and calculated dry matter values

Control dough	424 g	Dough spiked with imazalil solution	482 g	Dough prepared with lemon peel	454 g
dough before baking, g	cake after baking, g	dough before baking, g	cake after baking, g	dough before baking, g	cake after baking, g
80.0	67.2	86.0	74.0	80.0	67.4
80.0	66.1	86.0	73.6	82.0	69.8
79.0	68.4	87.0	73.7	80.0	68.9
80.0	67.1	87.0	72.1	80.0	68.2
80.0	68.0	86.0	73.7	80.0	67.9
399.0	336.8	432.0	367.1	402.0	342.2
dry matter	84.4%		85.0%		85.1%

M2

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

SM Figure 1: LC/MS/MS chromatograms of the lemon peel sample and its standard addition based calibration, monitoring the m/z 297/201 transition of imazalil



SM Figure 2: Changes in the concentration of imazalil in the analytical samples prepared from lemon peel (a), whole lemon fruit (b) and lemon pulp samples (c) during the storage at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. The marked error-bars represent the measured ± 1 standard deviation of the five parallels. The measured IMA concentration of “Week 0” before storage and the freezing is considered 100%. Pink line refers to the method EN 15662:2008, while blue lines refer to AOAC 2007.1.

M3: Supplementary material: „Study of different HILIC, mixed-mode and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides”

Sample treatment for the determination of polar pesticides in oranges by HILIC-QTOFMS and HILIC-MS/MS

10 g of previously homogenized orange were weighted in a 50 mL centrifuge tube. Then, 10 mL of MeOH with 1% of formic acid and 1.5 g of ultrapure water were added. The mixture was shaken vigorously for 1 minute by hand and the tube was centrifuged during 3 minutes at 3500 rpm. Finally an aliquot of 1 mL of the supernatant was taken for analysis. A 1:5 dilution (100 μ L extract + 400 μ L of initial mobile phase) was applied to the extract to minimize matrix effects, so that the final composition of the extract (0.2 g orange /mL extract) matched that of the selected initial mobile phase.

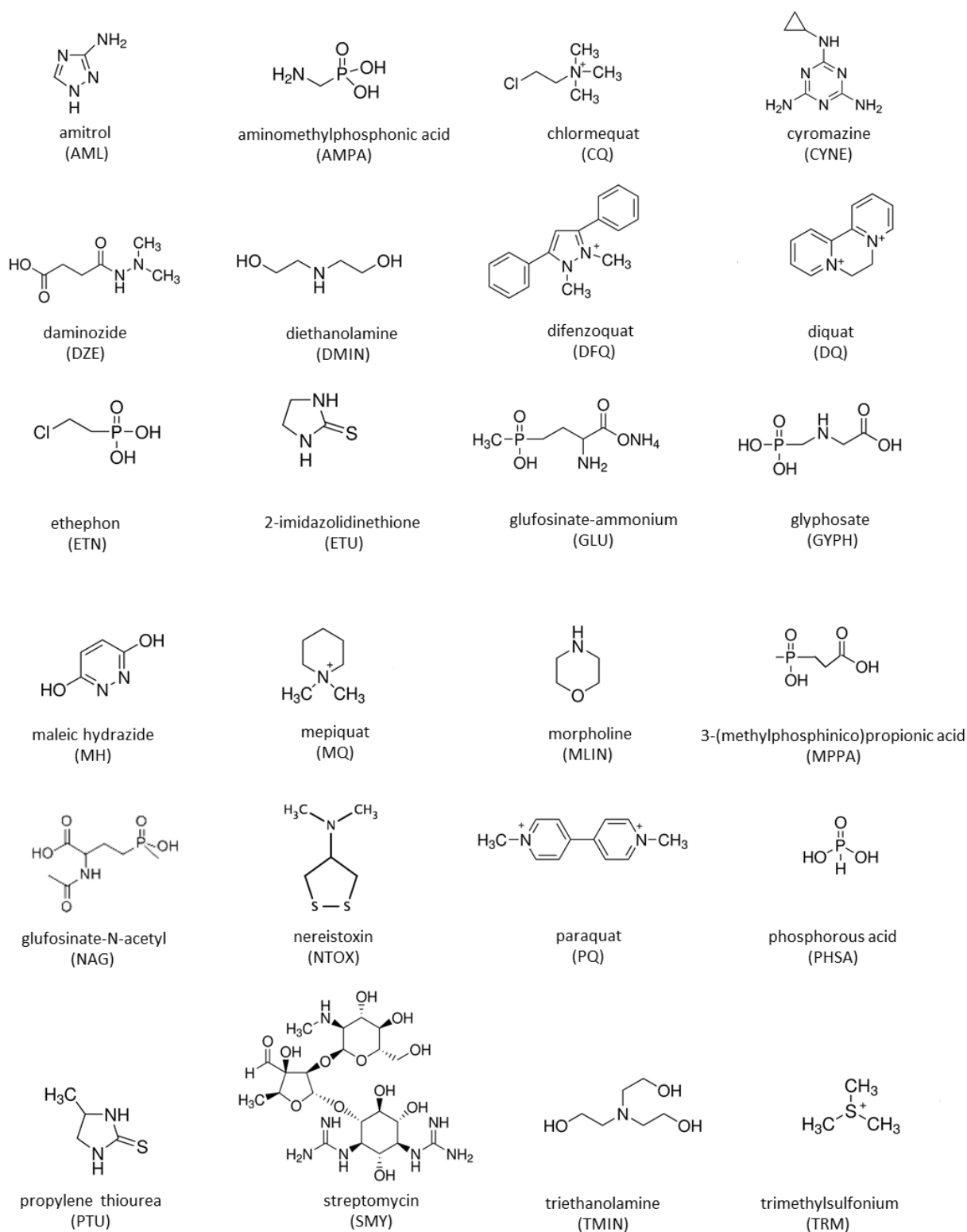
Figure S1. Structures of the 24 selected analytes.

Figure S2. Extracted ion chromatograms (EICs) obtained for selected pesticides at $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ except for DFQ and MQ ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) on column 1 (a) EICs of all the 17 compounds tested in positive ionization method (b) EICs of 14 target components eluting at $\text{RT} \leq 10 \text{ min}$ (c) EICs of three components eluting after 10 min, (d) EICs obtained for seven analytes at $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ in negative mode.

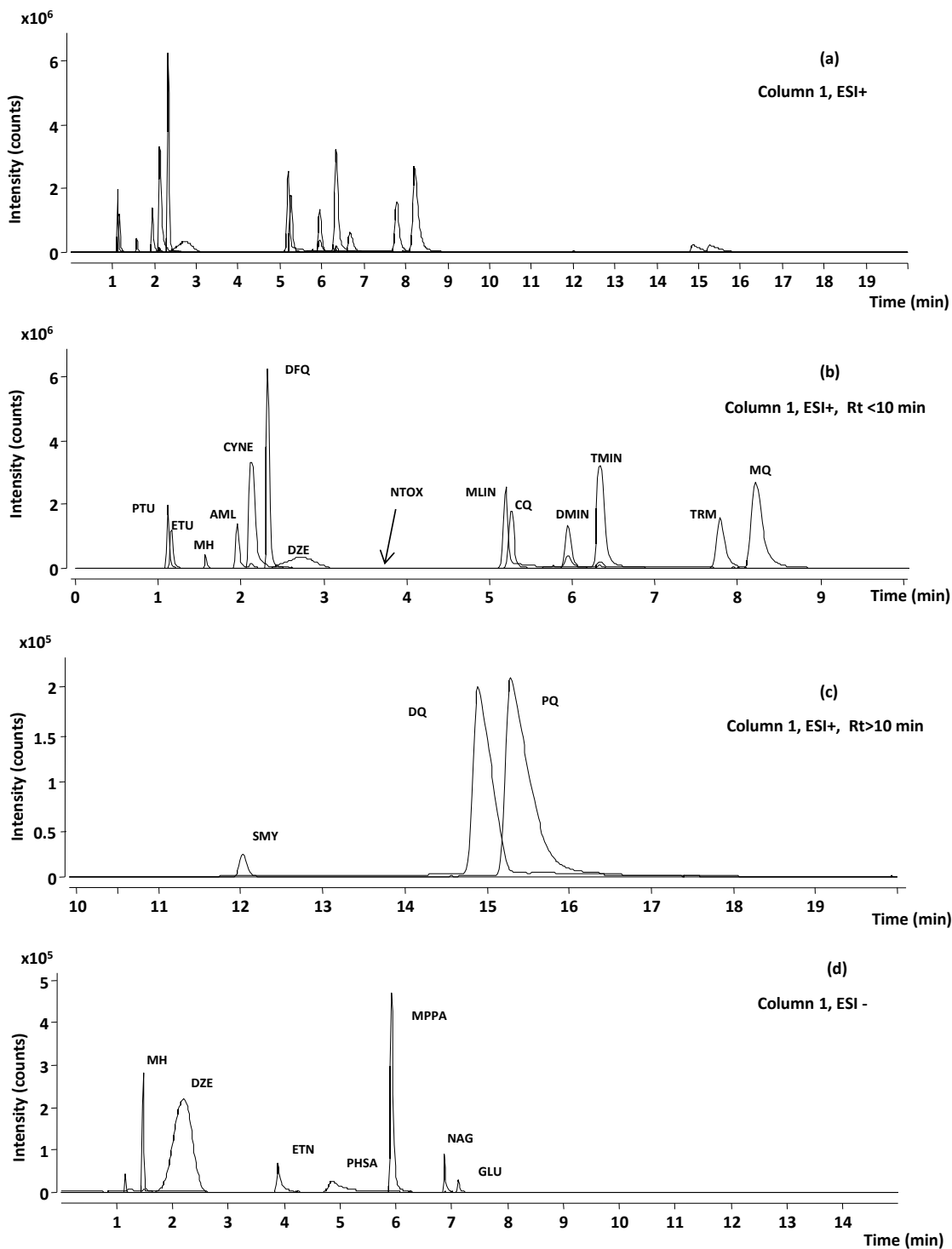


Figure S3. EICs obtained with column 4 with the positive method #1, at $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ for DQ, DZE, NTOX, PQ, and SMY and at $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the rest of compounds; **(a)** EICs of all the 17 compounds tested in positive ionization mode; **(b)** EICs of PTU and ETU eluting at $R_t \leq 3$ min; **(c)** EICs of the target components eluting between 3 and 5 min R_t (EIC of DFQ not shown); **(d)** EICs of four analytes eluting after 5 min.

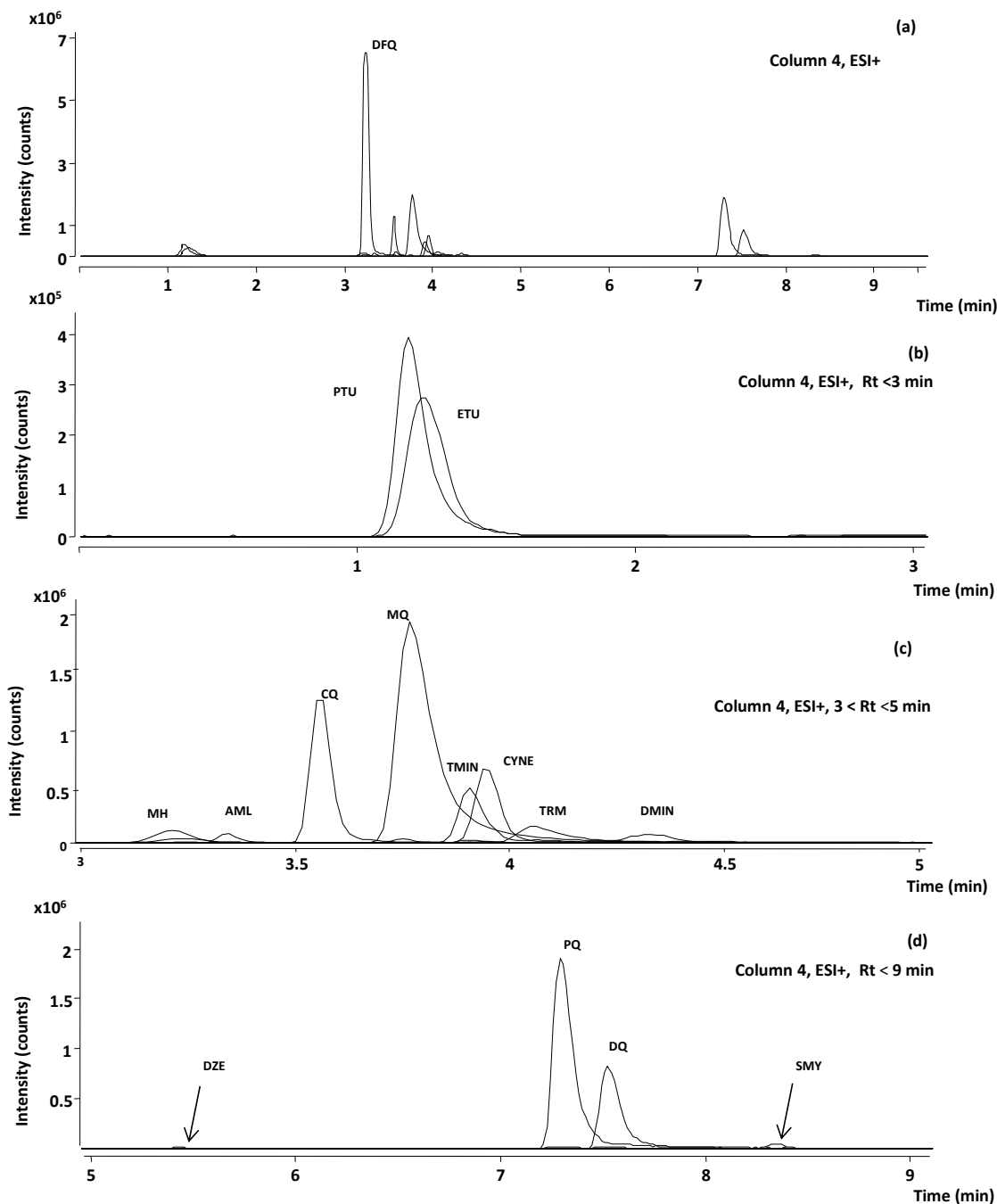


Figure S4. EICs obtained with column 5 (positive method #2) for 12 pesticides at $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (and $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ for DQ, DZE, NTOX, PQ, and SMY): **(a)** EICs of all the 17 pesticides tested in positive ion mode; **(b)** EICs of the standards eluting at $R_t \leq 10$ min (EIC of DFQ not shown); **(c)** EICs of seven pesticides eluting after 10 min; **(d)** EICs obtained in negative mode for seven analytes at $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

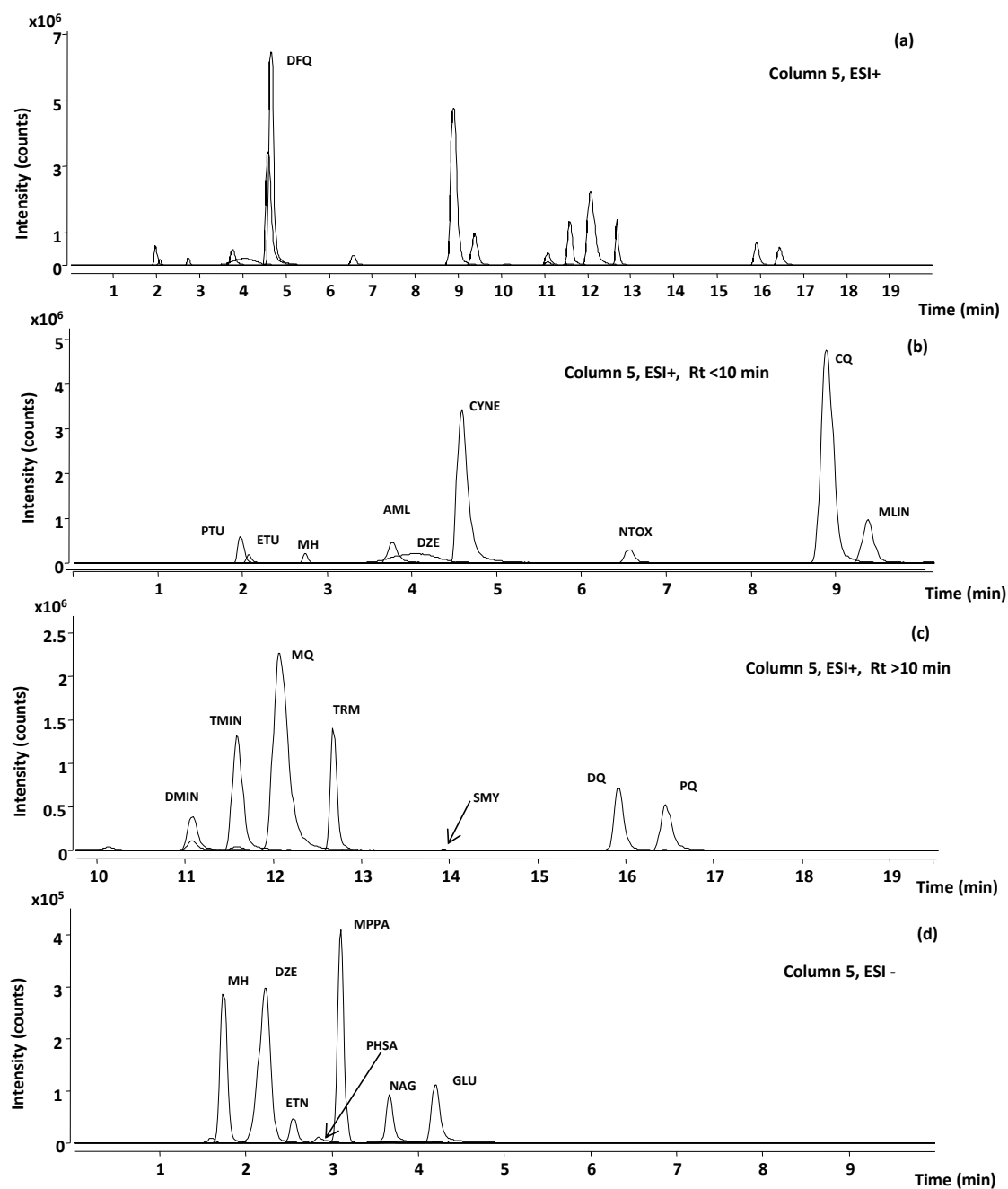


Figure S5. EICs obtained for column 6 in positive ionization method for 15 pesticides (*i.e.*, DQ and PQ could not be detected) at $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. **(a)** EICs of the 15 eluted compounds in positive ion mode. **(b)** EICs of five selected components eluting before $R_t=3$ min. **(c)** EICs of four selected analytes eluting before 3 min. **(d)** EICs of two selected analytes (MLIN and NTOX) eluting before 3 min.

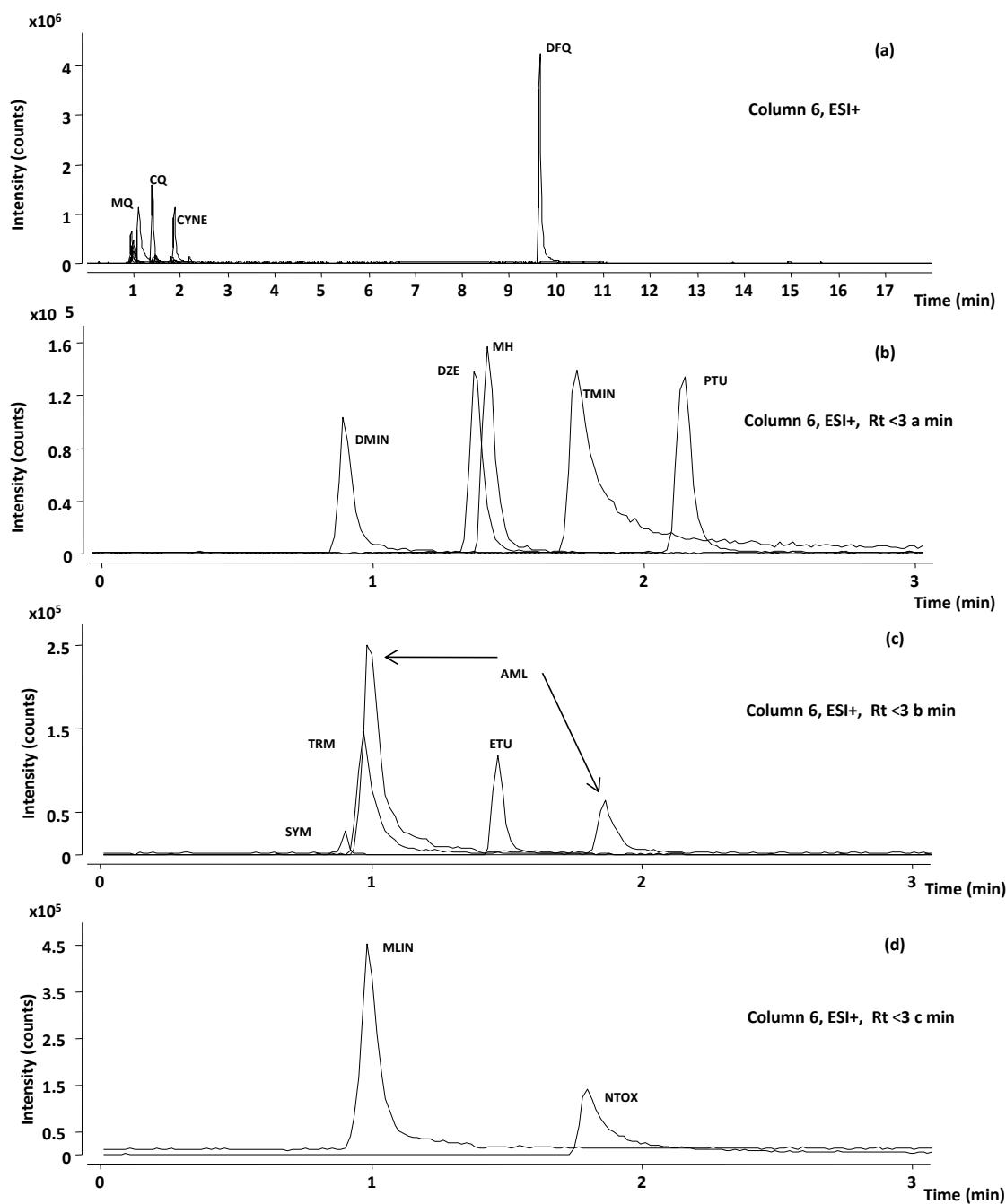


Figure S6. EICs obtained with column 8 in positive method for 17 analytes at $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$; **(a)** EICs of all the 17 pesticides tested in positive ionization mode; **(b)** EICs of the standards eluting between 0 and 5 minutes; **(c)** EICs of components eluting after 5 min; **(d)** EICs obtained for column 9 in positive ionization method for 17 pesticides.

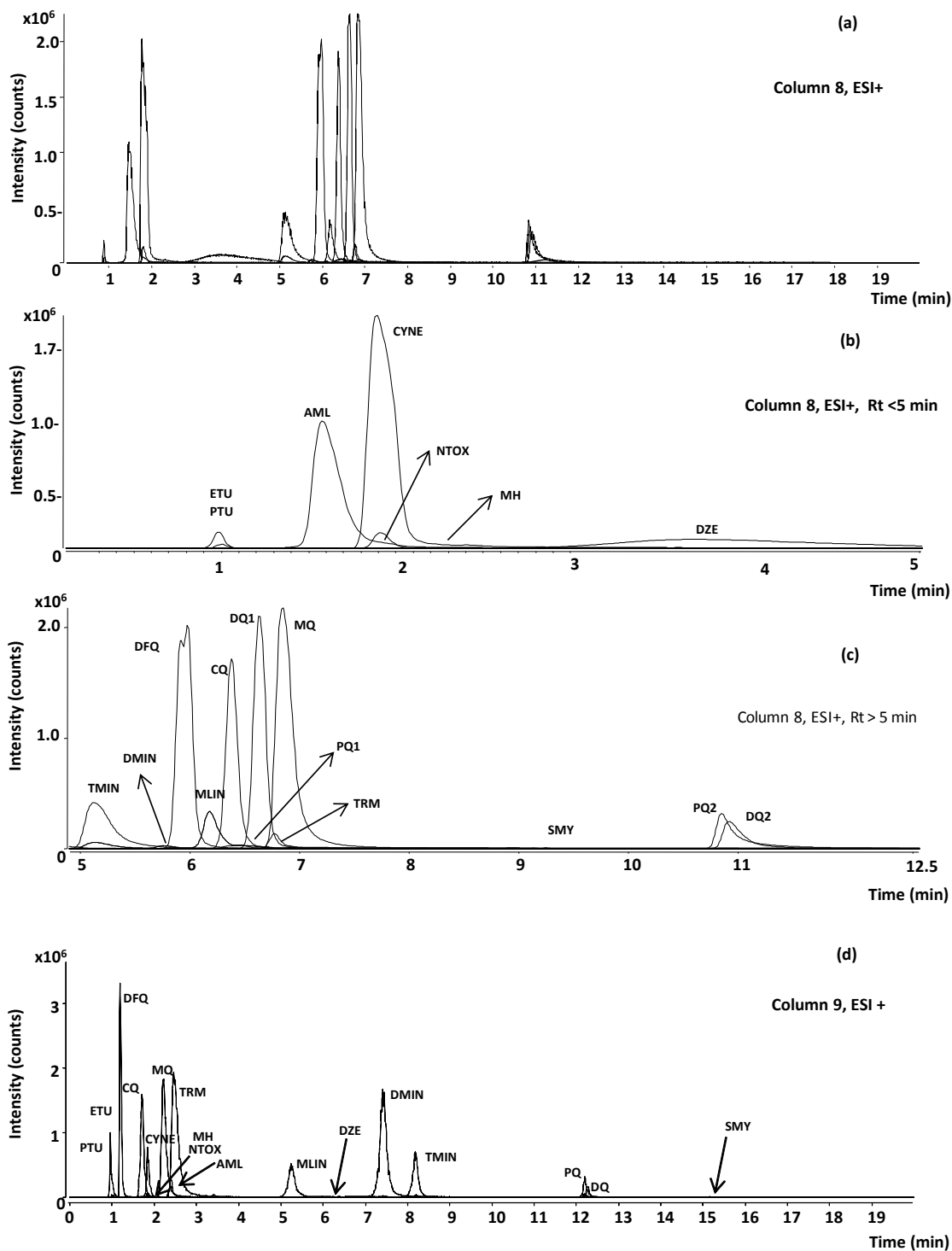


Table S1. Preparation of stock solutions.

No.	Compound	Manufacturer	Solvent used*	Bottle
1	amitrol	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
2	aminomethylphosphonic acid	Sigma-Aldrich	H ₂ O	glass
3	chlormequat	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
4	cyromazine	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
5	daminozide	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
6	diethanolamine	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
7	difenzoquat	Sigma-Aldrich	CH ₃ CN	glass
8	diquat	Dr. Ehrenstorfer	CH ₃ OH+1 v/v% HCOOH	plastic
9	ethephon	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH+1 v/v% HCOOH	glass
10	2-imidazolidinethione	Sigma-Aldrich	CH ₃ CN	glass
11	glufosinate	Sigma-Aldrich	H ₂ O:CH ₃ OH, 2:1	glass
12	glyphosate	Sigma-Aldrich	H ₂ O:CH ₃ OH, 3:1	plastic
13	maleic hydrazine	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
14	mepiquat	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
15	morpholine	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
16	3-(methylphosphinico)propionic acid	Dr. Ehrenstorfer	CH ₃ CN	glass
17	glufosinate-N-acetyl	Dr. Ehrenstorfer	CH ₃ OH	glass
18	nerisetoxin	Dr. Ehrenstorfer	H ₂ O:CH ₃ OH, 3:1	glass
19	paraquat	Dr. Ehrenstorfer	MeOH+1 v/v% HCOOH	plastic
20	phosphorous acid	Sigma-Aldrich	H ₂ O	glass
21	propylene thiourea	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
22	streptomycin	Sigma-Aldrich	H ₂ O:CH ₃ OH, 1:1	plastic
23	triethanolamine	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass
24	trimesium	Sigma-Aldrich	CH ₃ OH	glass

*Stock standard solutions were prepared by dissolving an accurately weighted portion of the pesticides (approximately 25 mg powder or liquid) in 50 mL of an appropriate solvent, and they were stored at -18°C.

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S2. Characteristic ions displayed by the polar pesticides (17) detected in positive ionization mode.

Name	Composition	[M] ⁺	[M+H] ⁺	[M-H ₂ O] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+H ₂ O] ⁺	[2M-2H] ²⁺	[M-C ₂ H ₃] ⁺	[M-CH ₃] ⁺	[M] ²⁺	Other fragments
amitrol	C ₂ H ₄ N ₄		85.0509								
chlormequat	C ₅ H ₁₃ CIN	122.0737		104.1082							
cyromazine	C ₆ H ₁₀ N ₆		167.1040								
daminozide	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃		161.0921	143.0821	183.0740						
diethanolamine	C ₄ H ₁₁ NO ₂		106.0866								88.0757
difenzoquat	C ₁₇ H ₁₇ N ₂	249.1392									
diquat	C ₁₂ H ₁₂ N ₂	184.0993					183.09171	157.0766		92.0495	
2-imidazolidinethione	C ₃ H ₆ N ₂ S		103.0324								
maleic hydrazide	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂		113.0346								
mepiquat	C ₇ H ₁₆ N	114.1283									
morpholine	C ₄ H ₉ NO		88.0757								
neriestoxin	C ₅ H ₁₁ NS ₂		150.0405								104.9831
paraquat	C ₁₂ H ₁₄ N ₂	186.1157							171.0922	93.0573	
propylene thiourea	C ₄ H ₈ N ₂ S		117.0483								
streptomycin	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂		582.2729			600.2835					
triethanolamine	C ₆ H ₁₅ NO ₃		150.1125	132.1019							88.0757
trimesium	C ₃ H ₉ S ⁺		77.0425								

¹Takino, M., Daishima, S., Yamaguchi, K. Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *Analytical Sciences*; 2000, 16, 707-712.

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S3. Characteristic ions displayed by the polar pesticides (9) detected in negative ionization mode.

Name	Composition	[M-H] ⁻	[M-H ₂ O] ⁻	[M+Na-2H] ⁻	[M-CO ₂] ⁻	[M-HCl] ⁻	[PO ₃] ⁻	[PO ₂] ⁻
aminomethylphosphonic acid	CH ₆ NO ₃ P	110.0013						
daminozide	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	159.0775						
ethephon	C ₂ H ₆ ClO ₃ P	142.967				106.9904	78.9599	
glufosinate	C ₅ H ₁₂ NO ₄ P	180.0431			136.0576			
glyphosate	C ₃ H ₈ NO ₅ P	168.0067	149.9962	189.9899	124.0169		78.9599	62.9643
maleic hydrazide	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	111.0200						
3-(methylphosphinico)propionic acid	C ₄ H ₉ O ₄ P	151.0166						
glufosinate-N-acetyl	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P	222.0537						
phosphorous acid	H ₃ O ₃ P	80.9747						

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S4. LC–MS/MS SRM identification parameters of the studied compounds: retention time and optimized MS/MS transitions.

The cycle time was 1s, Q1 resolution 1.2 (FWHM), Q3 resolution 0.7 (FWHM) and CID (collision-induced dissociation) 1.5 (mTorr).

Compound	RT (min)	Precursor (m/z)	Product 1 (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)	Product 2 (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)	Product 3 (m/z)	CE (V)	RF Lens (V)
TRM	11.03	77.2	62.3	15.1	30	47.4	27.6	30	61.3	14.6	30
AML	2.54	85.2	57.3	17.6	47	58.3	17.6	47	43.4	25.6	47
MLIN	7.79	88.2	70.3	13.6	45	68.3	16.6	45	45.4	25.1	45
ETU	1.49	103.1	70.3	25.6	47	60.3	34.6	47	86.3	17.6	47
DMIN	9.17	106.2	88.3	9.1	42	70.4	13.1	42	45.5	21.6	42
MH	1.94	113.1	85.3	18.0	72	53.3	31.0	72	95.1	16.0	72
MQ	10.42	114.2	98.3	26.1	69	99.2	20.6	69	58.4	25.1	69
PTU	1.43	117.1	58.4	15.1	50	60.3	30.1	50	72.2	24.1	50
CQ	7.69	122.1	58.4	27.1	65	63.3	21.6	65	59.4	20.6	65
NTOX	5.27	150.1	105.1	17.1	49	61.3	27.6	49	71.3	42.1	49
TMIN	9.73	150.1	132.1	12.6	53	70.3	20.1	53	88.2	17.1	53
DZE	3.05	161.1	143.1	9.6	46	44.5	19.6	46	100.2	16.6	46
CYNE	2.91	167.1	85.3	19.6	79	68.3	34.6	79	108.1	22.1	79
PQ	15.87	171.1	77.2	37.6	122	155.1	30.6	122	103.2	30.1	122
DQ	15.56	183.1	157.1	22.6	87	78.2	40.6	87	168.1	21.6	87
DFQ	3.16	249.2	130.2	41.1	118	193.1	29.1	118	233.1	34.1	118
SMY	14.07	600.3	582.2	17.6	117				263.1	35.6	117
SMY	14.07	582.3				221.1	43.6	235			

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S5. Typical operating pressures of the different columns tested.

Column #		Method Pos #1	Method Pos #2	Method Neg
1	start pressure (bar)	94.94	94.94	94.94
	finish pressure (bar)	212.99	212.99	212.99
2	start pressure (bar)	105.74	105.74	161.65
	finish pressure (bar)	339.71	339.71	379.10
3	start pressure (bar)	49.10	49.15	79.93
	finish pressure (bar)	204.98	205.60	136.51
4	start pressure (bar)	35.78	36.35	119.89
	finish pressure (bar)	98.88	98.60	193.90
5	start pressure (bar)	115.90	69.28	115.82
	finish pressure (bar)	421.55	200.30	270.95
6	start pressure (bar)	107.92	107.92	107.92
	finish pressure (bar)	40.60	40.60	40.60
7	start pressure (bar)	367.35	367.35	367.35
	finish pressure (bar)	150.32	150.32	150.32
8	start pressure (bar)	22.52	22.52	21.52
	finish pressure (bar)	55.75	55.75	53.37
9	start pressure (bar)	49.80	49.80	60.34
	finish pressure (bar)	146.50	146.50	145.66

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S6. Grading system for the evaluation of performance: separation from the void (SV), relative response factor (R), and peak width (P).

Capacity factor	SV < 1	-
	SV > 1	+
Relative response factor	R < 1*10 ⁵	-
	1*10 ⁵ cps < R < 5*10 ⁵	+
	5*10 ⁵ cps < R < 1*10 ⁶	++
	R > 1*10 ⁶	+++
Peak width	P > 1.0 min	-
	0.5 min < P < 1.0 min	+
	0.3 min < P < 0.5 min	++
	0.1 min < P < 0.3 min	+++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S7. Dead volume in mL calculated for each column at different flow rates (*).

column size	2.6 μm x 4.6 mm x 100 mm	1.8 μm x 2.1 mm x 100 mm	5.0 μm x 2.1 mm x 150 mm	5.0 μm x 2.1 mm x 150 mm	1.8 μm x 3.0mm x 100 mm	1.8 μm x 4.6 mm x 50 mm	1.8 μm x 2.1 mm x 50 mm	5.0 μm x 3.0 mm x 125 mm	5.0 μm x 3.0 mm x 125 mm
number	Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Column 5	Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
name	Phenomenex Kinetex	Zorbax RRHD	Sielc Technologies Obelisc N	Sielc Technologies Obelisc R	Zorbax RX-Sil	Zorbax XDB C ₁₈	Zorbax Eclipse Plus	Waters Spherisorb cyano	Waters Spherisorb amino
0.2	5.57	1.16	1.74	1.74	2.37	2.78	0.58	2.96	2.96
0.3	3.71	0.77	1.16	1.16	1.58	1.86	0.39	1.97	1.97
0.4	2.78	0.58	0.87	0.87	1.18	1.39	0.29	1.48	1.48
0.5	2.23	0.46	0.70	0.70	0.95	1.11	0.23	1.18	1.18
0.8	1.39	0.29	0.44	0.44	0.58	0.70	0.15	0.74	0.74
1.0	1.11	0.23	0.35	0.35	0.47	0.56	0.12	0.59	0.59

(*) Column volume $V = r^2 \cdot \pi \cdot L$ (ml), corrected with the free volume of analytical columns (67%) $V_{\text{free}} = r^2 \cdot \pi \cdot L / 1000 \cdot 0.67$ (ml) and with the accurate flow rate $t_0 = V_{\text{free}} \cdot V_{\text{flowrate}}$ (min)

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S8. Limits of detection calculated for positive methods with the different columns tested; “x” refers to not applicable.

compounds		AML	CQT	CYNE	DZE	DMIN	DfQT	DQT	ETU	MH	MQT	MLIN	NTOX	PQT	PTU	SMY	TMIN	TRM
		Positive methods, LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)																
Column 1		0.5	0.1	0.1	3.8	0.7	<0.05	0.4	1.2	1.7	0.1	1.2	60.2	25.3	0.9	4.3	0.5	0.3
Column 2		0.3	0.1	0.1	0.1	1.7	<0.05	17.4	1.4	0.3	<0.05	0.3	3.2	5.8	1.2	12.9	18.8	0.1
Column 3	# 1	3.5	0.2	0.9	2.4	x	<0.05	x	4.4	1.9	1.7	x	81.6	x	2.4	x	1.9	20.1
Column 3	# 2	3.7	0.1	1.1	1.4	2.8	<0.05	x	3.9	1.8	1.1	17.4	5.4	x	2.2	x	1.8	7.8
Column 4	# 1	<0.05	0.1	0.6	x	1.7	<0.05	0.5	6.0	44.7	0.9	0.6	3.9	0.2	8.3	5.0	1.2	0.3
Column 4	# 2	0.9	0.1	0.8	9.1	3.1	<0.05	1.9	13.4	6.7	0.1	x	2.0	33.0	9.6	6.3	0.6	0.7
Column 5	# 1	0.4	0.1	0.2	6.0	x	<0.05	44.0	1.9	1.4	<0.05	x	253.2	2.9	2.8	2.0	0.8	0.3
Column 5	# 2	0.3	0.1	0.2	1.0	0.5	<0.05	44.0	0.3	0.6	<0.05	0.4	2.0	31.1	0.2	3.2	0.4	0.1
Column 6		3.0	2.3	1.7	2.2	2.8	<0.05	x	2.2	2.8	0.9	8.5	15.9	x	2.9	4.5	1.9	5.5
Column 7		1.7	0.8	0.7	3.0	4.0	<0.05	x	3.6	1.2	0.2	5.1	6.8	11.4	1.5	7.0	2.2	1.4
Column 8		0.5	0.2	0.4	22.3	7.9	0.1	1.1	3.8	69.2	0.2	7.6	6.6	8.2	2.4	68.7	9.3	0.9
Column 9		0.8	0.3	0.6	5.9	1.9	0.2	0.9	3.3	7.7	0.5	0.5	9.6	3.5	1.4	9.6	11.2	0.2

The limits of detection values (LODs) were calculated as the minimum concentration of the analyte whose extracted ion chromatogram (with a narrow mass window extraction of ± 20 ppm without smooth filters) showed a signal-to-noise ratio at (S/N) = 3:1.

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S9. Limits of detection calculated in negative methods with the different columns tested; “x” refers to not applicable.

compounds	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
	Negative method, LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)								
Column 1	732	16.5	22.3	51.9	x	6.11	4.6	4.6	110
Column 2	579	5.3	41.7	26.8	882	1.6	6.4	8.3	40.8
Column 3	10.8	3.3	6.1	5.5	10.1	1.2	1.4	4.6	40.7
Column 4	8.4	1.4	15.7	3.8	59.1	1.9	6.8	x	39.3
Column 5	79.5	0.4	0.9	0.8	87.6	0.2	0.1	0.5	13.2
Column 6	6.8	2.9	4.8	5.2	42.3	1.9	6.1	5.1	89.8
Column 7	5.0	8.6	5.7	4.6	9.7	1.4	5.2	5.0	8.6
Column 8	x	6.7	152	>1	x	13.4	x	50.0	x
Column 9	x	14.8	x	49.0	x	9.1	x	x	x

The limits of detection values (LODs) were calculated as the minimum concentration of the analyte whose extracted ion chromatogram peak (with a narrow mass window extraction of ± 20 ppm without smooth filters) showed a signal-to-noise ratio at $(S/N) = 3:1$.

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S10. Assorted data for column 1 (positive mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive mode	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
P	++	++	++	-	+++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	-	+++	+++	++	++
SM	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+++	+	++	++
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	-+++	++++	-+++	++++	++++	++++	++++	-+++	-+++	++++	++++	+++	+++	-+++	+++	++++	++++

Table S11. Assorted data for column 1 (positive mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive mode	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
R	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	-	+++	++	+	+++	+++
P	++	+	+++	-	++	++	+	+++	+++	+	++	++	+	+++	+++	++	++
SM	++	+	+	++	++	+	+	+++	++	+	++	-	-	++	++	++	++
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	-+++	++++	-+++	+++	++++	++++	++++	-+++	-+++	++++	++++	+++	+++	-+++	++++	++++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S12. Assorted data for column 1 (negative mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	+	+	+	+	-	-	+	+	+
R	-	++	-	-	-	++	++	+	+
P	-	+	++	+++	-	+++	++	+++	-
SM	+++	+	-	++	-	++	+	+	-
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	+++++	+++	+++	----	++++	+++++	+++++	+++

Table S13. Assorted data for column 1 (negative mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	+	+	+	+	-	-	+	+	+
R	-	++	-	-	-	++	++	+	+
P	-	+	++	+++	-	+++	++	+++	-
SM	+++	+	-	++	-	++	+	+	-
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	+++	+++++	+++	+++	----	++++	+++++	+++++	+++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S14. Assorted data for column 2 (positive mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive mode	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
P	+	+	+	-	+	+	+	++	++	+	+	++	+++	++	+++	+	+
SM	+	++	+	++	++	+	++	++	+	++	++	+	+	-	+	++	++
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	----	++++	++++	++++	++++	----	++++	++++	++++

Table S15. Assorted data for column 2 (positive mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive mode	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
P	+	+	+	-	+	+	+	+++	+++	-	+	+	+	+++	+	+	+
SM	++	+	++	+	++	-	++	-	+	+	+	+	+	-	++	+	++
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	++++	++++	+++-	++++	----	----	++++	++++	++++	++++	----	++++	++++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S16. Assorted data for column 2 (negative mode) and concentration of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-(*)	+	+	-	-	-	+	+	-(*)
R	-(*)	+++	+	-	-	+++	+	+	-(*)
P	-(*)	-	++	-	-	+++	+	+++	-(*)
SM	-(*)	+	++	-	-	++	+	++	-(*)
Overall (SV, R, P, SM) $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$	----	++++	++++	----	----	++++	++++	++++	----

(*) not detected

Table S17. Assorted data for column 2 (negative mode) and concentration of $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	+	+	+	+	-	-	+	+	+
R	-	+++	+	+	-	+++	+++	++	+
P	-	-	+++	+	-	+++	++	++	+
SM	-	+	+	+	-	+	+	+	-
Overall (SV, R, P, SM) $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$	+	++++	++++	++++	----	++++	++++	++++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S18. Assorted data for column 3 (positive mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive method #1	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
R	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	-	+	-	+++	-	+++	+++
P	+++	++	+++	-	-	++	-	+++	+++	-	-	+	-	+++	-	++	-
SM	++	+	++	+	-	++	-	++	+	+	-	-	-	+	-	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	++++	----	++++	----	++++	++++	++++	---	++-	----	++++	----	++++	++++

Table S19. Assorted data for column 3 (positive mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive method #1	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
R	++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-	+++	+++
P	+++	++	++	-	-	++	-	+++	++	-	-	+++	-	+++	-	++	-
SM	+	+	+	++	-	++	-	-	++	-	-	+	-	-	+++	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	++++	----	++++	----	++++	++++	++++	----	+++	----	+++	+++	++++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S20. Assorted data for column 3 (positive mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive method #2	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+	-	+++	-	+++	+++
P	+++	++	+++	-	++	++	-	+++	++	-	++	+++	-	+++	-	++	-
SM	++	+++	++	++	++	+++	-	++	+	+	+	-	-	++	-	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	++++	++++	++++	++++	++-	----	++++	----	++++	++++

Table S21. Assorted data for column 3 (positive mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive method #2	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
R	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	++	-	+++	-	+++	+++
P	++	+	++	-	++	++	-	+++	++	-	++	+++	-	+++	-	+	-
SM	+	+	++	++	++	+++	-	-	++	-	+	++	-	-	+	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	+++	++++	+++	++++	++++	----	+++	+++	++++	+++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S22. Assorted data for column 3 (negative mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	+	+	+	+	-	+	+	+
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
P	+	+	+	+	-	+	++	+	+
SM	-	+++	+	+	-	+	+	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	----	++++	++++	++++	----	----	++++	++++	++++

Table S23. Assorted data for column 3 (negative mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	+	+	+	+	-	+	+	+
R	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
P	+	++	+	+	-	+	++	-	+
SM	-	++	+	+	-	-	+	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	----	++++	++++	++++	----	----	++++	+++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S24. Assorted data for column 4 (positive mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive method #1	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
R	+++	+++	+++	+	-	+++	-	+++	+	+++	-	+++	-	+++	-	+++	+++
P	+++	++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	+++	-	+++	++	+++	+++	+++	+
SM	++	+	++	-	-	+	++	+	++	+	-	++	++	+	+++	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	+++	----	++++	+++	----	++++	++++	----	++++	+++	----	++++	+++	++++

Table S25. Assorted data for column 4 (positive mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive method #1	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
R	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+	+++	-	++	++	++	+	+++	+++
P	+++	+++	+++	+++	-	+	++	++	+++	+++	-	++	++	++	++	+++	+
SM	++	+	+++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	+	+	++	++	-
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	++++	----	++++	++++	----	++++	++++	----	++++	++++	----	++++	++++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S26. Assorted data for column 4 (positive mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive method #2	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
R	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++
P	++	+	++	-	+	+	-	+++	+++	-	+	++	-	++	-	++	+
SM	++	++	++	-	++	+++	-	+	++	+	++	++	-	+	-	++	++
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	----	++++	++++	----	++++	++++	++++	++++	++++	----	++++	----	++++	++++

Table S27. Assorted data for column 4 (positive mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive method #2	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
R	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
P	+	+	+	-	+	+	++	++	++	-	+	++	++	++	+++	++	+
SM	++	++	+++	-	+	+	+	+	++	-	++	++	+	-	++	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	----	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	----	++++	++++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S28. Assorted data for column 4 (negative mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	+	+	+	+	-	+	-	+
R	-	+	-	+	-	+	+	-	-
P	++	+++	-	+	-	-	-	-	-
SM	+	++	+	++	-	+++	++	-	++
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	----	++++	+++	++++	+---	---	++++	---	+++

Table S29. Assorted data for column 4 (negative mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	+	+	+	+	-	+	-	+
R	-	+	+	+	-	-	+	-	-
P	++	+++	+	+	-	+	-	-	-
SM	+	++	+	++	-	+++	++	-	++
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	----	++++	++++	++++	+---	---	++++	---	+++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S34. Assorted data for column 5 (negative mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	+	+	+	+	+	-	+	+	-
R	-	+++	+	+	-	+++	+++	+	-
P	-	++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-
SM	+	++	+	++	-	+++	++	-	-
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	+---	++++	+++	+++	+---	++++	++++	+++	----

Table S35. Assorted data for column 5 (negative mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	+	+	+	+	+	-	+	+++	+
R	-	+++	+	+	-	+++	+++	+	+
P	-	++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++
SM	+	++	+	++	-	+++	++	-	++
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	+---	++++	++++	++++	+---	++++	++++	+++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S36. Assorted data for column 6 (positive mode) and concentration of 0.1 µg mL⁻¹

Positive mode	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++
P	++	++	++	++	+++	++	-	+++	+++	-	+++	++	-	++	-	+	++
SM	++	-	+	+	+	+	-	++	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 µg mL⁻¹	++++	+++	++++	++++	++++	++++	----	++++	++++	+++	++++	+++	----	++++	----	++++	++++

Table S37. Assorted data for column 6 (positive mode) and concentration of 1.0 µg mL⁻¹

Positive mode	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+	+++	+++
P	+++	+++	+	++	+++	+	-	++	++	-	+++	+	-	++	++	+++	+
SM	+	+	+	+	++	-	-	++	++	-	+	-	-	++	+	+	+
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 µg mL⁻¹	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	+++	----	++++	++++	++++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S40. Assorted data for column 7 (positive mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive mode	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+++	+++
P	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SM	++	+	+	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	++	++
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	++++

Table S41. Assorted data for column 7 (positive mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Positive mode	AML	CQ	CYNE	DZE	DMIN	DFQ	DQ	ETU	MH	MQ	MLIN	NTOX	PQ	PTU	SMY	TMIN	TRM
SV	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++
P	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
SM	+	-	+	+	++	-	++	+	++	-	+	-	++	++	+	+	++
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S42. Assorted data for column 7 (negative mode) and concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R	+++	++	+++	+	+	+++	+++	++	++
P	-	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-
SM	-	+	+	-	-	++	+	+	-
Overall (SV, R, P, SM) 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	---	+++	+++	---	---	+++	+++	+++	---

Table S43. Assorted data for column 7 (negative mode) and concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++
P	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-
SM	-	+	+++	+	-	++	-	++	+
Overall (SV, R, P, SM) 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	---	+++	+++	+++	---	+++	---	+++	---

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S46. Assorted data for column 8 (negative mode) concentration of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	+	-	-	-	+	-	-	-
R	-	+++	-	-	-	+	-	-	-
P	-	+	-	-	-	++	-	-	-
SM	-	++	-	-	-	++	-	-	-
Overall (SV, R, P, SM) $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$	----	++++	----	----	----	++++	----	----	----

Table S47. Assorted data for column 8 (negative mode) and concentration of $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	+	+	+	-	+	-	+	-
R	-	+++	++	+	-	++	-	+++	-
P	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
SM	-	++	+	+	-	++	-	+	-
Overall (SV, R, P, SM) $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$	----	++++	++++	++++	----	++++	----	++++	----

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S50. Assorted data for column 9 (negative mode) and concentration of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	+	-	-	-	+	-	-	-
R	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
P	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SM	-	+++	-	-	-	+	-	-	-
Overall (SV, R, P, SM) $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$	-----	++++	----	----	----	++++	----	----	----

Table S51. Assorted data for column 9 (negative mode) and concentration of $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Negative mode	AMPA	DZE	ETN	GLU	GYPH	MH	MPPA	NAG	PHSA
SV	-	+	-	+	-	+	-	-	-
R	-	+++	-	+	-	+++	-	-	-
P	-	-	-	-	-	++	-	-	-
SM	-	+++	-	+	-	++	-	-	-
Overall (SV, R, P, SM) $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$	----	++++	----	++++	----	++++	----	----	----

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S52. Retention time (RT, min) data obtained in positive ionization mode for all columns tested (“x” refers to not applicable).

Compound	Column 1	Column 2	Column 3		Column 4		Column 5		Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
			#1	#2	#1	#2	#1	#2				
AML	1.95	2.79	4.89	6.34	3.35	3.79	2.02	3.74	0.98	0.28	1.48	2.40
CQ	5.27	7.08	4.89	6.35	3.57	4.94	2.88	8.83	1.07	0.29	6.40	1.71
CYNE	2.12	3.13	4.89	6.35	3.95	6.35	2.07	4.52	1.79	0.48	1.82	1.85
DZE	2.75	3.04	3.14	3.27	5.44	x	2.23	3.96	1.44	0.40	3.76	7.09
DMIN	5.95	8.60	x	8.37	x	7.71	x	10.98	0.93	0.26	5.77	8.20
DFQ	2.35	3.27	4.73	5.99	3.25	3.89	1.95	4.59	9.51	4.10	5.94	1.23
DQ	14.89	14.80		x	8.47	12.68	7.41	15.91	0.96	0.33	6.66	12.27
ETU	1.13	1.72	0.94	0.95	1.19	1.17	1.18	1.96	2.19	0.40	0.90	1.07
MH	1.57	2.14	1.76	1.77	3.21	3.37	1.63	2.72	1.47	0.40	2.00	3.40
MQ	8.21	10.08	6.21	7.13	3.78	5.52	3.76	11.94	1.11	0.40	6.87	2.21
MLIN	5.19	7.24	x	7.67	x	6.84	x	9.31	0.98	0.27	6.20	5.24
NTOX	3.55	5.08	4.90	6.34	3.76	5.74	2.37	6.56	1.70	0.45	1.85	1.85
PQ	15.43	15.06	x	x	7.32	12.61	7.65	16.44	x	0.35	10.93	12.19
PTU	1.19	1.83	0.98	0.98	1.22	1.22	1.23	2.03	1.47	0.55	0.88	0.96
SMY	12.02	13.45	4.24	6.13	8.36	12.97	5.35	13.93	0.84	0.26	9.83	15.16
TMIN	6.33	9.18	6.02	7.95	3.91	6.59	3.02	11.49	0.95	0.27	5.13	7.43
TRM	7.79	10.61	6.38	7.94	4.08	6.40	3.72	12.63	0.95	0.27	6.79	2.46

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S53. Retention time (RT, min) data obtained in negative ionization mode for all columns tested (“x” refers to not applicable).

Compound	Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Column 5	Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
AMPA	6.87	5.48	1.66	0.98	3.62	0.97	0.30	x	x
DZE	2.31	2.24	5.91	1.20	2.22	1.36	0.40	10.99	14.18
TN	3.89	3.54	6.61	7.63	2.54	0.98	0.39	8.65	x
GLU	7.12	6.88	4.21	2.47	4.18	1.06	0.32	17.19	18.48
GYPH	x	x	5.01	3.53	3.76	1.35	0.33	x	x
MH	1.51	1.47	2.19	0.97	1.72	1.37	0.41	1.13	9.30
MPPA	5.93	4.89	4.97	7.78	3.09	1.27	0.40	x	x
NAG	6.87	6.09	7.53	x	3.65	1.23	0.40	10.53	x
PHSA	4.86	4.23	6.19	5.51	2.99	0.99	0.33	x	x

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S54. Capacity factor (k) = separation from the void (SV) values achieved with the different columns in positive ionization mode (“x” refers to not applicable).

Compound	Column 1	Column 2	Column 3		Column 4		Column 5		Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
			# 1	# 2	# 1	# 2	# 1	# 2				
AML	0.8	1.4	6.1	8.2	2.8	3.4	1.1	1.4	0.0	0.2	1.0	2.2
CQ	3.7	5.1	6.1	8.2	3.1	4.7	2.0	4.6	0.0	0.3	7.6	1.3
CYNE	0.9	1.7	6.1	8.2	3.5	6.3	1.2	1.9	0.6	1.0	1.5	1.5
DZE	1.5	1.6	3.5	3.7	5.2	x	1.3	1.5	0.3	0.8	4.1	8.6
DMIN	4.4	6.4	x	11.1	x	7.9	x	5.9	0.0	0.1	6.8	10.1
DFQ	1.1	1.8	5.9	7.7	2.7	3.5	1.1	1.9	7.6	16.8	7.0	0.7
DQ	12.4	11.8	x	x	8.7	13.6	6.8	9.1	0.1	0.4	8.0	15.6
ETU	0.0	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.2	0.2	1.0	0.7	0.2	0.4
MH	0.4	0.8	1.6	1.6	2.7	2.9	0.7	0.7	0.3	0.8	1.7	3.6
MQ	6.4	7.7	8.0	9.3	3.3	5.3	3.0	6.6	0.0	0.7	8.3	2.0
MLIN	3.7	5.2	x	10.1	x	6.9	x	4.9	0.0	0.2	7.4	6.1
NTOX	2.2	3.4	6.1	8.2	3.3	5.6	1.5	3.2	0.5	0.9	1.5	1.5
PQ	12.9	12.0	x	x	7.4	13.5	7.0	9.4	x	0.5	13.8	15.5
PTU	0.1	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	1.4	0.2	0.3
SMY	9.8	10.6	5.2	7.9	8.6	13.9	4.6	7.8	0.0	0.1	12.3	19.5
TMIN	4.7	6.9	7.7	10.5	3.5	6.6	2.2	6.3	0.0	0.2	5.9	9.0
TRM	6.0	10.6	8.3	10.5	3.7	6.4	2.9	7.0	0.0	0.2	8.2	2.3

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S55. Capacity factor (k) = separation from the void (SV) values achieved with the different columns in negative ionization mode (“x” refers to not applicable).

Compound	Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Column 5	Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
AMPA	5.2	6.1	0.4	0.4	2.8	0.0	0.3	x	x
DZE	1.1	1.9	4.1	1.0	1.3	0.2	0.8	22.2	27.4
TN	2.5	3.6	4.7	9.9	1.7	0.0	0.7	17.3	
GLU	5.4	7.9	2.6	2.5	3.4	0.0	0.4	35.3	36.0
GYPH	x	x	3.3	4.0	3.0	0.2	0.4	x	x
MH	0.4	0.9	0.9	0.4	0.8	0.2	0.8	1.4	17.6
MPPA	4.3	5.3	3.3	10.1	2.3	0.1	0.7	x	x
NAG	5.2	6.9	5.5	x	2.8	0.1	0.7	21.2	x
PHSA	3.4	4.5	4.3	6.9	2.1	0.0	0.4	x	x

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S56. Peak width (P, min) data obtained with the different methods in positive ionization mode at a concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (“x” refers to not applicable).

Method	Column 1	Column 2	Column 3		Column 4		Column 5		Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
			# 1	# 2	# 1	# 2	# 1	# 2				
AML	0.30	0.66	0.15	0.18	0.19	0.41	0.26	0.54	0.37	0.18	0.31	0.34
CQ	0.46	0.78	0.32	0.33	0.31	0.68	0.34	0.78	0.37	0.20	0.45	0.41
CYNE	0.34	0.67	0.21	0.27	0.21	0.48	0.37	0.72	0.45	0.20	0.38	0.66
DZE	1.02	1.24	1.29	1.33	0.22	1.66	0.33	1.42	0.31	0.19	1.09	1.70
DMIN	0.29	0.54	x	0.41	x	0.40	x	0.52	0.25	0.19	0.33	0.70
DFQ	0.38	0.58	0.40	0.48	0.40	0.51	0.36	0.72	0.50	0.30	0.47	0.31
DQ	0.52	0.71	x	x	0.20	0.65*	0.14	0.45*	0.25*	0.11	0.6*	0.31
ETU	0.21	0.40	0.20	0.21	0.23	0.22	0.21	0.29	0.25	0.14	0.22	0.18
MH	0.15	0.32	0.22	0.31	0.18	0.24	0.17	0.28	0.24	0.11	0.23	0.42
MQ	0.75	0.92	2.34	2.32	0.29	1.11	0.45	0.93	0.42	0.25	1.29	0.62
MLIN	0.30	0.54	x	0.41	x	0.62	x	0.54	0.27	0.18	0.44	0.59
NTOX	0.17	0.46	0.12*	0.07	0.18	0.43	0.33*	0.41	0.46	0.27	0.45	0.35
PQ	1.06	0.28	x	x	0.30	0.43*	0.25	0.48*	x	0.17	1.27*	0.55
PTU	0.21	0.31	0.21	0.23	0.25	0.32	0.18	0.26	0.28	0.21	0.27	0.22
SMY	0.17	0.22	0.16*	0.12	0.14	0.27	0.65*	0.21*	0.08	0.13	1.91*	0.36
TMIN	0.31	0.51	0.42	0.52	0.24	0.46	0.30	0.71	0.33	0.19	0.41	1.10
TRM	0.45	0.69	1.07	1.08	0.73	0.85	0.27	0.45	0.30	0.19	0.74	0.39

* data obtained at 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ because of the low relative response factor

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S57. Peak width (P, min) data obtained in negative ionization mode at a concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (“x” refers to not applicable).

	Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Column 5	Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
AMPA	1.32	2.21*	0.78	0.36	1.56	1.03	0.92	x	x
DZE	0.85	1.01	0.35	0.21	0.48	0.19	0.16	0.79	14.18
TN	0.35	0.28	0.82	0.98*	0.23	0.87	0.19	7.83*	x
GLU	0.23	0.65*	0.88	0.72	0.27	0.98	0.37	4.44*	18.48*
GYPH	x	x	1.03	1.55	1.61	0.15	0.54	x	x
MH	0.22	0.22	0.45	0.34*	0.27	0.19	0.17	0.35	9.30
MPPA	0.24	0.30	0.39	1.13	0.22	0.27	0.16	x	x
NAG	0.21	0.22	0.92	x	0.27	0.20	0.14	6.92*	x
PHSA	1.00	0.74*	0.99	1.10	0.33*	0.95	0.60	x	x

* data obtained at 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ because of the low relative response factor

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S58. Relative response factors (R) achieved with the different methods in positive ionization mode at a concentration of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (“x” refers to not applicable).

	Column 1	Column 2	Column 3		Column 4		Column 5		Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
			#1	#2	#1	#2	#1	#2				
AML	1.1E+06	3.0E+06	1.8E+05	2.1E+05	2.6E+05	8.4E+05	1.1E+06	4.1E+06	1.6E+06	9.0E+05	2.7E+06	4.9E+05
CQ	8.7E+06	2.4E+07	2.5E+06	3.3E+06	5.3E+06	1.6E+07	8.4E+06	2.6E+07	3.6E+06	2.4E+06	2.7E+06	9.1E+06
CYNE	7.1E+06	2.0E+07	1.3E+06	1.5E+06	1.3E+06	1.7E+06	6.5E+06	1.7E+07	4.3E+06	2.6E+06	7.5E+06	3.7E+06
DZE	8.4E+05	4.7E+06	1.6E+06	6.6E+06	3.1E+04	x	2.3E+05	7.8E+06	1.4E+06	7.1E+05	9.5E+05	5.9E+05
DMIN	1.1E+06	2.8E+06	1.9E+05	8.2E+05	x	8.8E+05	x	3.3E+06	8.0E+05	4.9E+05	3.2E+05	7.3E+05
DFQ	9.2E+06	3.2E+07	9.6E+06	1.2E+07	1.7E+07	3.5E+07	1.0E+07	2.9E+07	1.4E+07	6.9E+06	5.5E+06	8.7E+06
DQ	2.6E+05	9.2E+05	x	x	4.8E+03	x	3.0E+04	x	x	1.5E+04	3.7E+05	8.3E+05
ETU	6.7E+05	2.1E+06	4.3E+05	6.4E+05	3.0E+05	5.0E+05	5.0E+05	1.6E+06	1.1E+06	3.0E+05	4.1E+04	1.5E+05
MH	1.2E+05	1.0E+06	1.7E+05	1.7E+05	2.3E+04	5.2E+04	1.1E+05	4.9E+05	6.0E+05	3.1E+05	x	3.7E+04
MQ	1.4E+07	4.4E+07	4.9E+06	7.8E+06	1.2E+07	3.0E+07	1.1E+07	2.8E+07	6.4E+06	3.7E+06	4.5E+06	1.4E+07
MLIN	1.9E+06	1.1E+07	x	2.9E+06	x	6.0E+06	x	9.2E+06	3.1E+06	2.0E+06	8.8E+05	5.2E+06
NTOX	5.7E+03	1.5E+05	x	1.9E+04	1.3E+05	1.2E+06	x	1.4E+05	3.4E+06	2.5E+06	1.7E+05	3.5E+04
PQ	1.4E+05	1.6E+05	x	x	9.1E+03	x	7.2E+04	x	x	2.0E+04	x	1.5E+05
PTU	3.8E+05	8.9E+05	2.1E+05	3.4E+05	1.2E+05	2.2E+05	3.2E+05	9.3E+05	6.7E+05	6.8E+05	1.1E+05	3.3E+05
SMY	2.1E+04	1.2E+04	x	x	2.2E+03	x	x	x	4.8E+03	6.7E+03	x	1.6E+04
TMIN	4.2E+06	9.6E+06	1.4E+06	2.5E+06	1.1E+06	2.8E+06	2.6E+06	1.1E+07	1.9E+06	1.0E+06	1.5E+06	1.9E+06
TRM	1.9E+06	7.2E+06	5.4E+05	1.4E+06	1.1E+06	4.8E+06	1.0E+06	3.9E+06	1.2E+06	9.0E+05	5.5E+05	3.9E+06

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S59. Relative response factors (R) achieved with the different methods in positive ionization mode at a concentration of 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (“x” refers to not applicable).

	Column 1	Column 2	Column 3		Column 4		Column 5		Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
			#1	#2	#1	#2	#1	#2				
AML	2.8E+06	8.3E+06	6.1E+05	8.0E+05	3.2E+06	6.5E+06	3.8E+06	8.8E+06	7.5E+06	3.5E+06	8.8E+06	1.5E+06
CQ	2.2E+07	6.0E+07	1.3E+07	1.3E+07	2.2E+07	4.8E+07	2.3E+07	6.4E+07	1.3E+07	6.6E+06	1.6E+07	2.3E+07
CYNE	1.3E+07	4.3E+07	5.7E+06	6.6E+06	6.4E+06	4.9E+06	2.2E+07	4.5E+07	1.9E+07	8.4E+06	1.9E+07	1.1E+07
DZE	1.1E+06	2.0E+07	6.9E+06	3.3E+07	3.3E+05	x	1.3E+06	4.1E+07	8.7E+06	4.1E+06	9.4E+06	5.0E+06
DMIN	9.1E+05	1.8E+07	x	6.5E+06	x	6.6E+06	x	1.5E+07	4.2E+06	2.1E+06	2.4E+06	5.9E+06
DFQ	1.7E+07	7.0E+07	2.6E+07	3.0E+07	3.5E+07	6.3E+07	2.6E+07	6.7E+07	4.2E+07	1.6E+07	2.1E+07	2.0E+07
DQ	1.7E+07	4.9E+07	x	4.1E+05	3.3E+06	3.6E+06	2.1E+06	5.5E+06	1.8E+05	4.4E+05	2.1E+07	5.0E+06
ETU	1.9E+06	2.5E+06	3.0E+06	4.4E+06	2.2E+06	2.9E+06	3.3E+06	1.0E+07	7.7E+06	1.7E+06	3.0E+05	1.1E+06
MH	4.2E+05	5.2E+06	3.8E+06	3.7E+06	2.2E+05	5.4E+05	1.1E+06	3.8E+06	3.6E+06	1.7E+06	1.3E+05	2.9E+05
MQ	4.5E+07	9.9E+07	5.5E+07	8.8E+07	4.2E+07	9.9E+07	3.4E+07	9.4E+07	3.2E+07	1.9E+07	2.2E+07	4.0E+07
MLIN	4.6E+06	4.1E+07	x	2.3E+07	x	6.6E+07	x	4.6E+07	1.3E+07	6.4E+06	6.7E+06	3.2E+07
NTOX	6.2E+04	1.7E+06	4.1E+04	1.8E+05	6.4E+05	5.7E+06	3.9E+04	2.2E+06	2.3E+07	8.0E+06	1.6E+06	3.2E+05
PQ	3.7E+06	3.8E+06	x	x	7.2E+06	2.4E+06	3.2E+06	4.8E+06	x	3.2E+05	2.1E+06	1.8E+06
PTU	9.8E+05	3.5E+06	1.2E+06	1.1E+06	9.6E+05	1.5E+06	1.6E+06	5.2E+06	3.7E+06	4.3E+06	1.2E+06	2.8E+06
SMY	9.8E+04	6.7E+04	5.2E+03	x	1.0E+05	6.9E+04	5.8E+04	4.4E+04	3.8E+05	1.1E+05	7.4E+04	1.3E+05
TMIN	9.2E+06	5.3E+07	8.1E+06	1.7E+07	6.2E+06	9.1E+06	1.1E+07	4.2E+07	8.0E+06	4.1E+06	1.7E+07	1.9E+07
TRM	3.2E+06	3.8E+07	4.7E+06	1.4E+07	1.0E+07	2.8E+07	1.9E+06	1.4E+07	6.8E+06	3.4E+06	3.4E+06	2.2E+07

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S60. Relative response factors (R) achieved in negative ionization mode at a concentration of 1.0 µg mL⁻¹ (“x” refers to not applicable)

Compound/column	Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Column 5	Column 6	Column 7	Column 8	Column 9
AMPA	2.9E+04	8.0E+04	8.6E+05	3.4E+04	5.7E+04	9.1E+05	7.2E+05	x	x
DZE	6.3E+05	2.1E+06	3.3E+06	2.9E+05	1.8E+06	8.1E+05	9.6E+05	1.2E+06	3.8E+06
TN	4.8E+04	2.9E+05	2.7E+06	8.8E+04	2.9E+05	1.4E+06	9.6E+05	8.6E+05	
GLU	5.2E+04	1.4E+05	1.0E+07	1.9E+05	4.2E+05	6.6E+05	1.0E+06	1.4E+05	1.9E+05
GYPH	x	x	5.6E+05	6.1E+04	5.3E+04	6.5E+05	6.7E+05	x	x
MH	5.5E+05	1.5E+06	8.8E+06	4.3E+05	1.6E+06	1.4E+06	1.1E+06	6.9E+05	1.7E+06
MPPA	5.6E+05	1.5E+06	6.3E+06	2.0E+05	3.3E+06	2.0E+06	2.5E+06	x	x
NAG	1.2E+05	6.0E+05	2.9E+06	x	4.2E+05	2.2E+06	1.6E+06	1.0E+06	x
PHSA	1.4E+05	1.5E+05	2.1E+06	7.1E+04	1.8E+05	6.3E+05	6.2E+05	x	x

M3

Peszticid analitikai eljárások
fejlesztése

Vass Andrea

Table S61. Suitability percentage values for positive ionization methods at a concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$					
Column	Method	SV	R	P	Overall
1	pos	71%	94%	88%	84%
2	pos	82%	100%	94%	92%
3	pos # 1	59%	71%	53%	61%
	pos # 2	71%	82%	65%	73%
4	pos # 1	76%	59%	88%	75%
	pos # 2	65%	76%	71%	71%
5	pos # 1	59%	76%	76%	71%
	pos # 2	71%	82%	76%	76%
6	pos	18%	88%	76%	61%
7	pos	18%	100%	100%	73%
8	pos	71%	82%	71%	75%
9	pos	82%	100%	88%	90%

Table S62. Suitability percentage values for negative ionization methods at a concentration of 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$					
Column	Method	SV	R	P	Overall
1	neg	78%	56%	67%	67%
2	neg	44%	56%	44%	48%
3	neg	78%	100%	89%	89%
4	neg	67%	44%	33%	48%
5	neg	78%	67%	67%	70%
6	neg	0%	100%	67%	56%
7	neg	0%	100%	67%	56%
8	neg	22%	22%	22%	22%
9	neg	22%	22%	11%	19%

Table S63. All-ion mode CID fragmentation of the selected compounds using HILIC-ESI-QTOF-MS

	0 V					10 V	20 V	30 V
	m/z	formula	error (ppm)	DBE	Abund	Abund	Abund	Abund
TRM	77.0426	C ₃ H ₉ S	-6,14	0	15678	19789	20018	16829
	62.0194	C ₂ H ₆ S	-15,75	0,5	0	0	900	1869
AML	85.0515	C ₂ H ₅ N ₄	-6,22	3	64091	70733	61319	37076
	57.0456	C ₂ H ₅ N ₂	-16,31	2	0	0	2926	4484
	43.0301	CH ₃ N ₂	-20,23	2	0	0	0	5129
MLIN	88.0762	C ₄ H ₁₀ NO	-5,69	1	431062	456747	290493	99200
	70.066	C ₄ H ₈ N	-1217	2	289	10472	58020	51977
	45.0344	C ₂ H ₅ O	-19,83	1	0	1201	10665	25401
	44.0504	C ₂ H ₆ N	-21,1	1	0	1887	18470	33263
	42.0342	C ₂ H ₄ N	-21,58	2	0	1002	12351	27715
DMIN	106.0869	C ₄ H ₁₂ NO ₂	-6,13	0	235665	69997	10890	7110
	88.0766	C ₄ H ₁₀ NO	-10,81	1	7402	51960	8097	1700
	70.0662	C ₄ H ₈ N	-15,82	2	1653	33520	21189	3787
	45.0345	C ₂ H ₅ O	-23,67	1	0	5690	21919	17027
ETU	103.0328	C ₃ H ₇ N ₂ S	-3,31	2	24502	20577	9698	7044
	69.0454	C ₃ H ₅ N ₂	-11,27	3	0	1083	6627	10010
	44.0503	C ₂ H ₆ N	-20,83	1	0	3300	7930	6916
NTOX	150.0405	C ₅ H ₁₂ NS ₂	1,61	1	8192	4652	0	0
	104.9827	C ₃ H ₅ S ₂	-1,63	2	0	2204	4585	1498
	70.996	C ₃ H ₃ S	-8,63	3	0	0	0	769
	61.0118	C ₂ H ₅ S	-14,99	1	0	0	1530	852
MH	113.0348	C ₄ H ₅ N ₂ O ₂	-2,25	4	5551	9925	11364	8707
	85.0396	C ₃ H ₅ N ₂ O	0,88	3	0	0	0	632
	40.0789	C ₂ H ₂ N	-19,49	3	0	0	0	532
MQ	114.1279	C ₇ H ₁₆ N	-1,29	1	782561	807772	662129	101997
	98.0969	C ₆ H ₁₂ N	-4,73	2	557	7541	127157	280360
	58.0661	C ₃ H ₈ N	-10,23	1	0	6080	117553	202011
PTU	117.0481	C ₄ H ₈ N ₂ S	-0,06	2	60346	63022	30479	24403
	100.0215	C ₄ H ₆ NS	0,31	3	0	0	0	680
	59.1905	CH ₂ NS	-5,03	2	0	0	1250	3201
CQ	122.0732	C ₅ H ₁₃ ClN	-0,48	0	841085	840677	460371	70836
	106.0425	C ₄ H ₉ ClN	-6,6	1	0	901	5292	2242
	63.0006	C ₂ H ₄ Cl	15,77	1	298	14121	171989	107554
	58.0661	C ₃ H ₇ N	-17,49	1	0	28263	391818	660425
DZE	161.0919	C ₆ H ₁₃ N ₂ O ₃	1,31	2	39445	5857	0	0
	143.0814	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₂	0,69	3	2063	19558	4747	590
	101.0235	C ₄ H ₅ O ₃	-2,1	3	0	566	523	0
	115.0968	C ₅ H ₁₁ N ₂ O	-2,21	2	0	396	807	178
	61.0768	C ₂ H ₉ N ₂	-13,51	0	119	2536	1660	515
	44.0503	C ₂ H ₆ N	-19,67	1	0	2062	7323	5917

0 V						10 V	20 V	30 V
	m/z	Ion formula	error (ppm)	DBE	Abund	Abund	Abund	Abund
TMIN	150.1123	C ₆ H ₁₆ NO ₃	0,88	0	166149	172811	9666	0
	132.1019	C ₆ H ₁₄ NO ₂	0,37	1	290	50318	23062	613
	114.0916	C ₆ H ₁₂ NO	-2,48	2	0	6697	9351	535
	88.0765	C ₄ H ₁₀ NO	-9,29	1	0	3818	35711	4597
	70.0661	C ₄ H ₈ N	-14,62	2	0	1528	60711	30215
	45.0345	C ₂ H ₅ O	-23,21	1	0	182	23181	30426
CYNE	167.1039	C ₆ H ₁₁ N ₆	0,37	5	210148	182637	1082637	62137
	125.0823	C ₅ H ₉ N ₄	-1,35	4	0	2094	15795	4922
	85.0515	C ₂ H ₅ N ₄	-7,74	3	0	0	22059	12078
	60.0566	C ₃ H ₆ N ₃	-16,15	1	0	1986	22921	15120
	56.0504	C ₃ H ₆ N	-16,63	2	0	0	3623	21031
	43.0299	CH ₃ N ₂	-20,29	2	0	0	3344	12551
DQ	183.0918	C ₂₄ H ₂₂ N ₄	-0,97	9+9	1598	1867	43324	20594
	157.0758	C ₁₀ H ₉ N ₂	1,56	8	0	174	32252	31419
	92.05	C ₁₂ H ₁₂ N ₂	-2,75	9	0	0	18322	13048
PQ	186.1144	C ₁₂ H ₁₄ N ₂	3,95	7,5	32307	23512	4729	3155
	171.0916	C ₁₁ H ₁₁ N ₂	0,48	8	316	12147	30801	27462
	93.0577	C ₁₂ H ₁₄ N ₂	-2,21	8	24953	57218	51580	41566
DFQ	186.1144	C ₁₇ H ₁₇ N ₂	0,64	11	216615	248519	205733	194885
	193.0883	C ₁₄ H ₁₁ N	1,51	10,5	0	0	3413	82242
	131.0727	C ₉ H ₉ N	2,23	6,5	0	0	2087	68612
	118.0651	C ₈ H ₈ N	0,59	6	0	0	2766	69320
SMY	600.282	C ₂₁ H ₄₂ N ₇ O ₁₃	0,43	5	1996	1485	503	373
	582.2729	C ₂₁ H ₄₀ N ₇ O ₁₂	-0,85	6	509	2011	3924	3438
	263.1467	C ₈ H ₁₉ N ₆ O ₄	-1,77	3	0	0	249	446

Table S64. Matrix effects obtained by the comparison of slopes from calibration curves in solvent and matrix matched standards, during the determination of polar pesticides in orange using UHPLC(HILIC)-ESI-QTOF-MS and UHPLC(HILIC)-ESI-MS/MS with a triple quadrupole in the MRM mode.

Compound	Matrix Effects (QTOF)		Matrix Effects (LC-MS/MS (QQQ))	
	matrix diluted 1:1 (% Signal variation)	matrix diluted 1:10 (% Signal variation)	matrix diluted 1:1 (% Signal variation)	matrix diluted 1:10 (% Signal variation)
Amitrol	-9.4	-8.8	6.8	4.1
Chlormequat	-51.3	-51.2	-55.4	-27.8
Cyromazine	-51.3	-54.6	36.4	26.8
Daminozide	-61.8	-54.2	3.7	7.3
Diethanolamine	-22.3	-9.9	8.5	-3.3
Difenzoquat	-51.6	-51.0	-18.7	-5.7
Diquat	-44.8	-45.0	-68.2	-60.4
2-imidazolidinethoïne	-89.0	-85.9	-40.6	-25.5
Maleic hydrazide	-83.2	-83.5	-29.5	-8.0
Mepiquat	-51.5	-47.7	-16.5	-5.0
Morpholine	-59.6	-50.9	-58.6	-45.0
Nereistoxin	-28.3	-22.0	-15.9	-4.3
Paraquat	-28.0	-9.9	-15.9	-13.7
Propylene thiourea	-90.8	-86.0	-47.6	-34.9
Streptomycin	-64.0	-67.4	-79.9	-74.6
Triethanolamine	-16.0	-12.8	17.7	-4.6
Trimethylsulfonium	-46.5	-45.2	-45.2	-11.9

M4: Supplementary Material of „Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry”

Table S1. Structures and chemical information of target pesticides

Compound	Structure	Molecular formula	Exact mass (m/z)	Log P	Chemical class	Use
Cyromazine		C ₆ H ₁₀ N ₆	166.0967	-0,06	Triazine	Insecticide
Mepiquat chloride		C ₇ H ₁₆ ClN	149.0971	-2.82	Quaternary ammonium salt	Herbicide, grown regulator
Diquat dibromide		C ₁₂ H ₁₂ Br ₂ N ₂	341.9367	-4,6	Bipyridil (Quaternary ammonium salt)	Herbicide
Paraquat dicloride		C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂	256.0534	-4,5	Bipyridil (Quaternary ammonium salt)	Herbicide
Amitrol		C ₂ H ₄ N ₄	84.0436	-0,97	Triazole	Herbicide
Sulfosat (Glyphosate-trimesium)		C ₆ H ₁₆ NO ₅ PS	245.0487	-2,9	Organophosphate/ glycine derivative	Herbicide
Fosetyl-aluminum		C ₆ H ₁₈ AlO ₉ P ₃	353.9979	-2,1	Organophosphate	Fungicide

^a PubChem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>)

^b EURL DataPool (<http://www.eurl-pesticides-datapool.eu/>)

M4 Pesticid analitikai eljárások fejlesztése

Figure S1. Extracted Ion Chromatograms (EICs) for selected pesticides by UHPLC-TOFMS using a standard reverse phase column (C18 ZORBAX, 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m particle size)

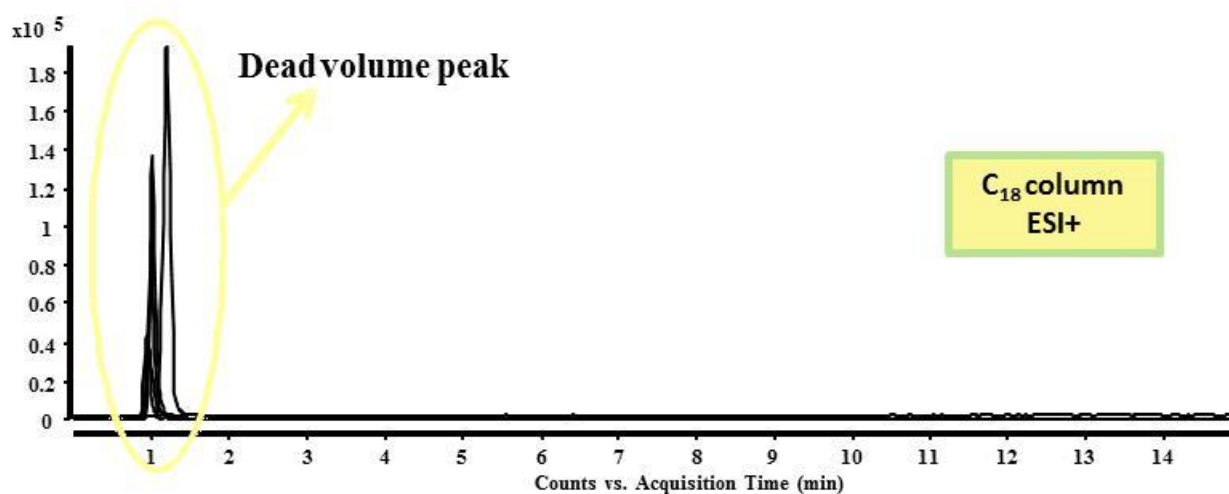


Figure S2. Overlapped total ion chromatograms (TICs) of spiked samples of olive oil and olives by UHPLC(HILIC)-TOFMS analysis

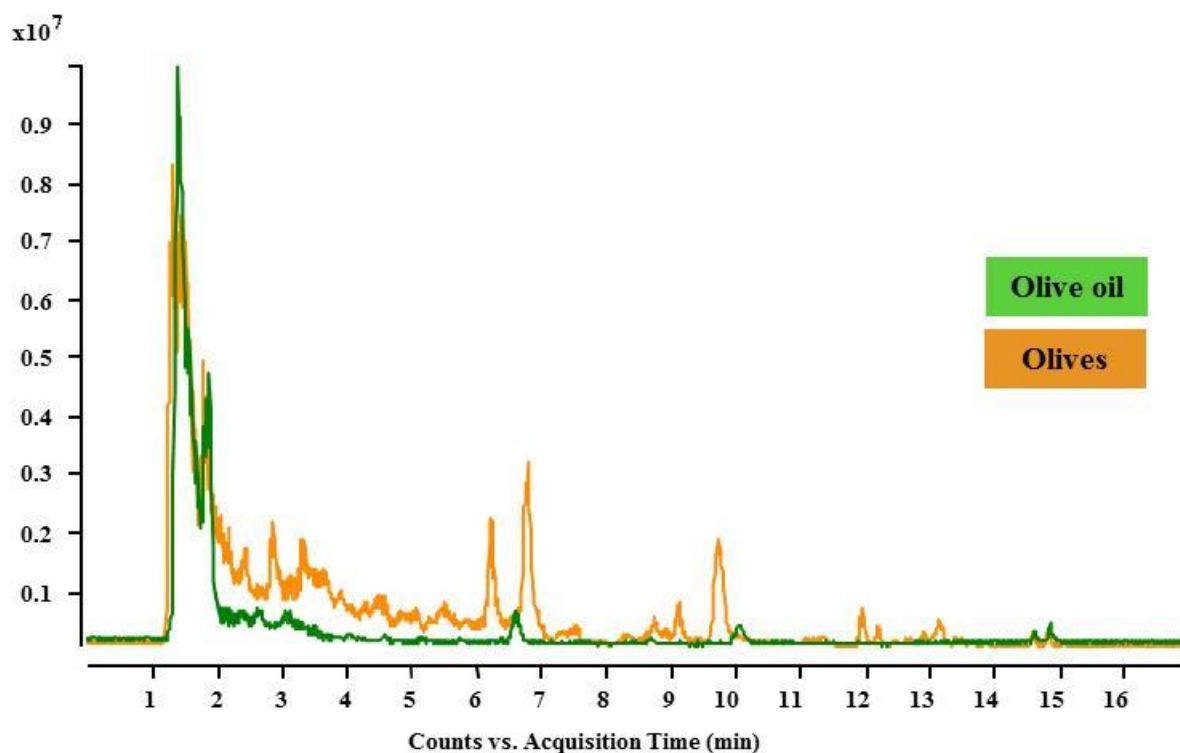


Figure S3. Overlapped TIC chromatograms of olive extracts: (A) solvent, (B) after clean-up procedure with C_{18} cartridges; (C) after clean-up procedure with MCX cartridges; (D) 1:10 dilution without clean-up.

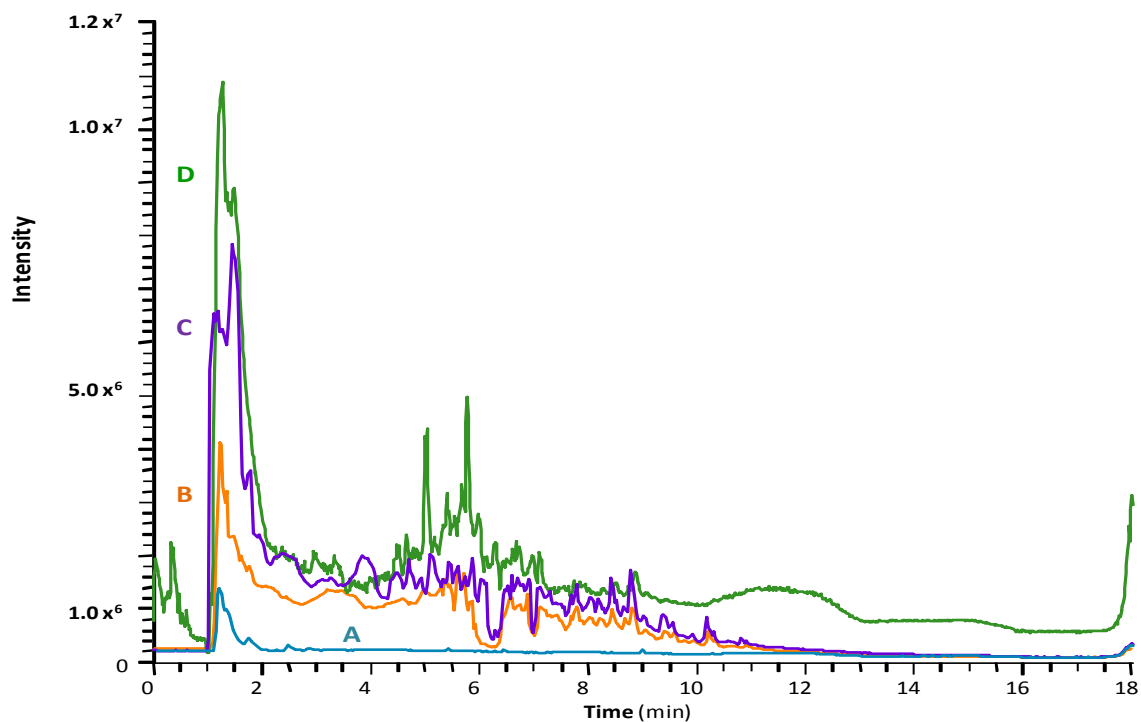
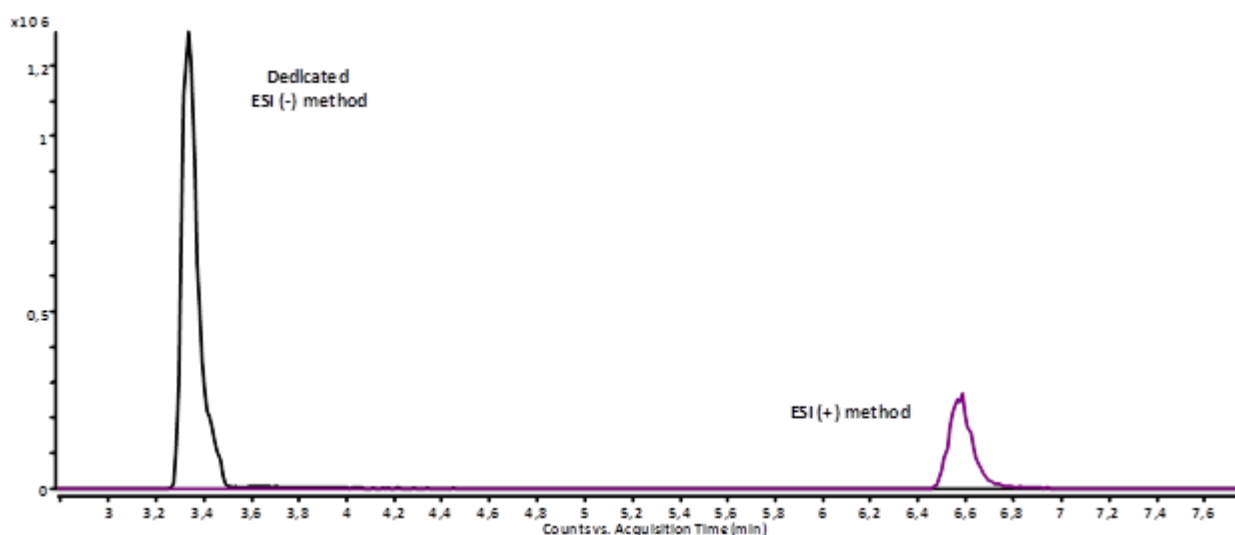


Figure S4. Comparison of EICs peaks (HILIC-TOFMS) of fosetyl-aluminum obtained with a dedicated negative ionization method or using the standard positive method chosen for the rest of compounds included in the study.



NYILATKOZAT

(A Kormány 33/2007. (III.7.) Korm. Rendelete szerint)

Alulírott Vass Andrea

Kijelentem, hogy a Szent István Egyetemhez benyújtott

„**PESZTICID ANALITIKAI ELJÁRÁSOK FEJLESZTÉSE**”

c.

értekezést korábban más intézményhez nem nyújtottam be és azt nem utasították el.

Dátum: Budapest, 2017. június. 06.

.....
Alírás

Nyilatkozat

Alulírot, Vass Andrea doktorjelölt kijelentem, hogy a benyújtott PhD értekezésem önálló szellemi alkotásom.

Dátum: Budapest, 2017.június.06.

.....
Jelölt aláírása