



**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: 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

Bevezetés.....	4
Tézisek	5
Új generációs szuperkritikus fluidkromatográfia alkalmazhatósága a növényvédő szermaradványok átfogó vizsgálatában	7
Imazalil nyomon követése a szüretelés után kezelt citromhéjtól egészen az azzal készült süteményig	9
Különböző HILIC, kevert módú és egyéb vizes normál fázisú folyadékkromatográfias elválasztási módszerek alkalmazhatóságának tanulmányozása analitikai kihívást jelentő poláris növényvédő szerek meghatározására, tömegspektrométer alapú detektálással	13
Poláris növényvédő szerek meghatározása olívbogyóból és olívaolajból tömegspektrométerrel csatolt hidrofil kölcönhatás folyadékkromatográfiával.....	15
Kapcsolódó publikációk	18

Bevezetés

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 rájuk tekintenünk. A növényvédő szerekre illetve azok jól definiált metabolitjaira (pl. dimetoát, ometoát) MRL értéket állapítanak meg, viszont korántsem ismert az élelmiszerekben fellelhető, ill. az élelmiszer-feldolgozás 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 esetekben azok szigorítását (vagy akár további metabolit vegyületek bevonását) hozza a jövőben.

Tézisek

1. UPC² kromatográfiás elválasztást követően ESI-MS detektálást alkalmazó mérőrendszert állítottam össze, mellyel növényvédő szerek kromatográfiás 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 (olívabogyó, olívaolaj) élelmiszer-mátrixból történő vizsgálatára is.

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 folyadékkromatográfia 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. Dolgozatom ezen szakaszában 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 kromatográfiás 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.

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 háztartások számára a világhálón fellelhető öt, citromhéj mosási technika határfokát 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 realiztikusabban 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) C_{18} 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 élelmiszer-feldolgozás utáni növényvédő szer és metabolit-analitikai kutatások születését.

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, klórmekvát, 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 hidrophil kölcsönhatás kromatográfiai (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 kémiaailag kötött oszlop (Spherisorb ciano és amino)), továbbá két hagyományos fordított fázisú C₁₈-as oszlop. Különböző kromatográfias beállításokat és paramétereket vizsgáltam meg pozitív (17 célkomponens) és negatív (kilenc célkomponens) ionizációs módban. Annak érdekében, hogy össze tudjam hasonlítani és rangsorolni a különböző kromatográfias 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.

Poláris növényvédő szerek meghatározása olívbogyóból és olívaolajból tömegspektrométerrel csatolt hidrofil kölcsonhatás folyadékkromatográfiával

A poláris növényvédő szerek meghatározása önmagában is kihívás az analitikus számára, ám a zsíros mátrixú mintából való kinyerése szintúgy. A kettős

szerekre, amely lehetővé teszi a módszer alkalmazását rutin elemzéshez. Hasonlóképpen a mátrixhatás alacsony volt az olívaolaj esetén (kb. 20% átlagos jelsupresszió), amíg olívaolaj 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 minimalizálása érdekében: erre megoldást nyújthat a hagyományos tisztítási lépésnek az optimált mintaelőkészítési módszerbe történő iktatása.

Kapcsolódó publikációk

Impakt faktoros publikációk

R. Nortes-Méndez, J. Robles-Molina, R. López-Blanco, **A. Vass**, A. Molina-Díaz, J. F. García-Reyes, Determination of polar pesticides in olive oil and olives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 2016; 158:222-228.

A. Vass, J. Robles-Molina, P. Pérez-Ortega, B. Gilbert-López, M. Dernovics, A. Molina-Díaz, J. F. García-Reyes, Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016; 408(18):4857-4869.

A. Vass, B. A. Rácz, L. Abrankó, Applicability of ultra-performance convergence chromatography, a new generation of supercritical fluid chromatography, for the analysis of pesticide residues. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 2016; 60(2):69-73.

A. Vass, E. Korpics, M. Dernovics, Follow-up of the fate of imazalil from post-harvest lemon surface treatment to a baking experiment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2015; 32(11):1875-1884.

Konferencia kiadványok

A. Vass, J. F. Garcia-Reyes, P. Pérez-Ortega, M. Dernovics, A. Molina-Díaz, Evaluation of different HILIC and normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based quantification of challenging pesticides, In: Róbert Berkecz, Tamás Janáky, Aljosa Mandić, László Thurzó (eds.), 32 nd Informal Meeting on Mass Spectrometry. Balatonszárszó, Magyarország, 2014.05.11-14

J. F. Garcia-Reyes, A. Vass, P. Pérez-Ortega, M. Dernovics, A. Molina-Díaz, Evaluation of different HILIC and normal-phase approaches for the Liquid Chromatography/Mass Spectrometry-based determination of challenging highly polar pesticides, In: 62 nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. Baltimore, Amerikai Egyesült Államok, 2014.06.15-19.

A. Vass, B. A. Rácz, A. László, Applicability of ultra-performance convergence chromatography (UPCC), a new generation supercritical fluid chromatography (SCF), for the analysis of pesticide residues. Veszprémi Műszaki kémiai napok, Veszprém, 2015.04.21-22

A. Vass, E. Korpics, M. Dernovics, From the lemon surface until the baked food product: quantifiable monitoring of the pathway of imazalil, 7. RAFA, Prága, Csehország 2015.11.03-06. ISBN 978-80-7080-934-1