

nébih

termőföldről
az asztalig

*Igény a pontos minőségi és mennyiségi
vizsgálatokra:*

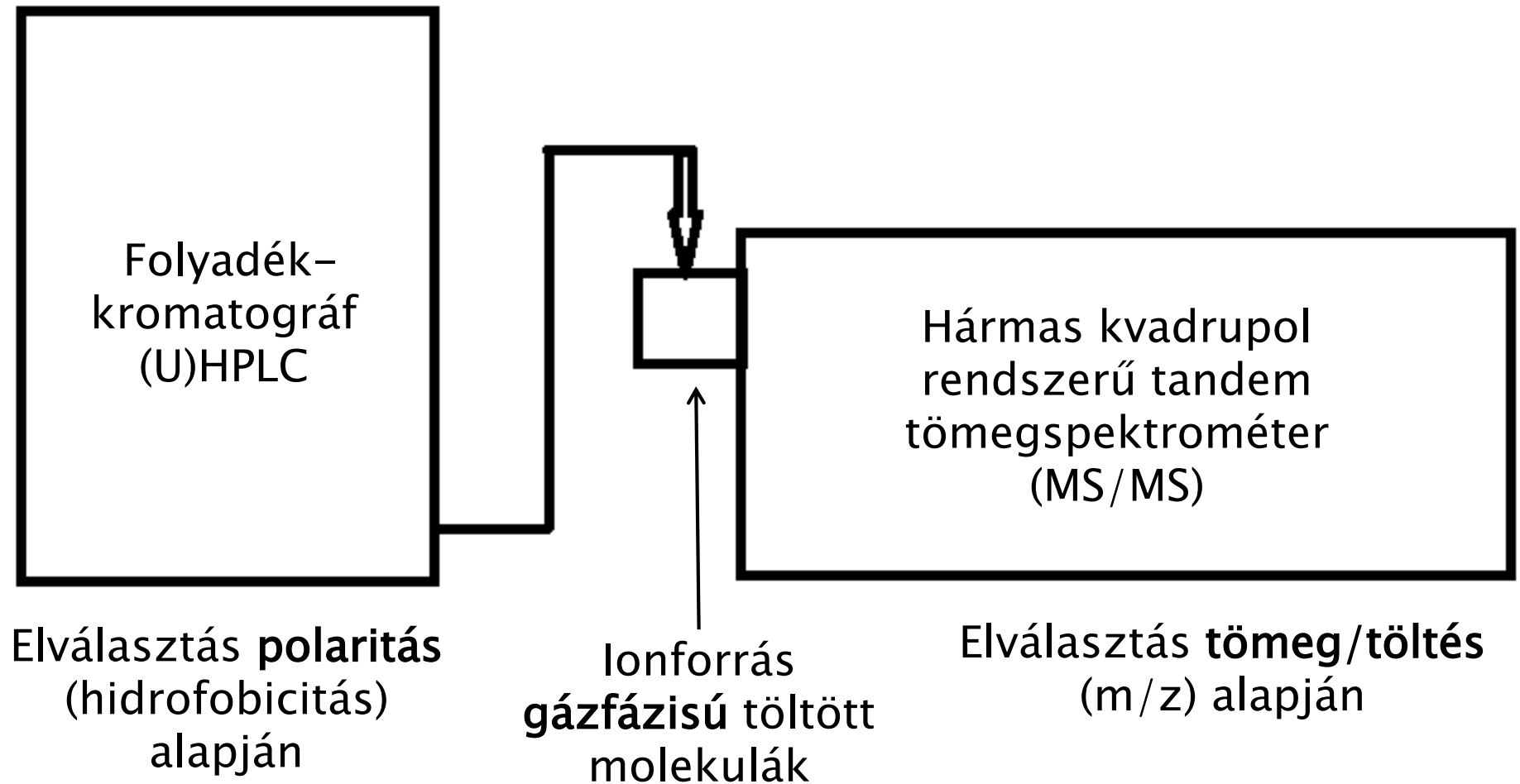
*LC-MS/MS módszerek gyakorlati
alkalmazása az élelmiszer-analitikában*

Tölgyesi Ádám

*Hungalimentária, Budapest
2017. április 26-27.*

Folyadékkromatográfiás hármaskvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS)

Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra



Folyadékkromatográfiás hármas kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS)

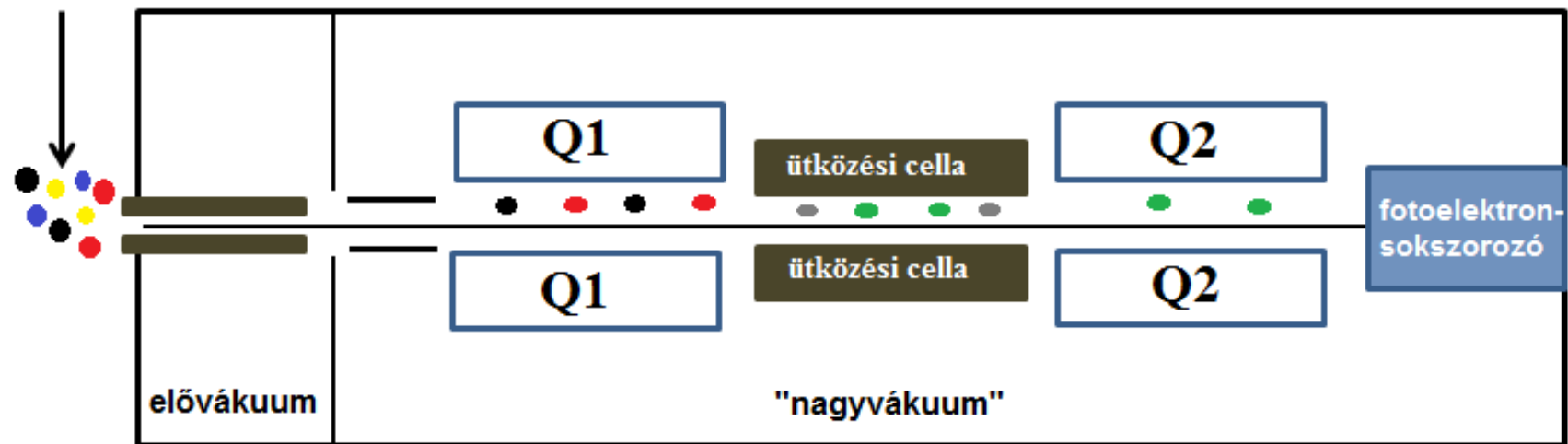
Piros molekula (anyaion) > **célvegyület** (500 m/z)

Fekete molekula (anyaion) > **azonos tömegű** (izobár) vegyület (500 m/z)

Szürke és **zöld** leányionok > ütközési cellában keletkező fragmensek (300 m/z and 400 m/z)

Piros anyaion > **zöld** leányion (ionátmenet)

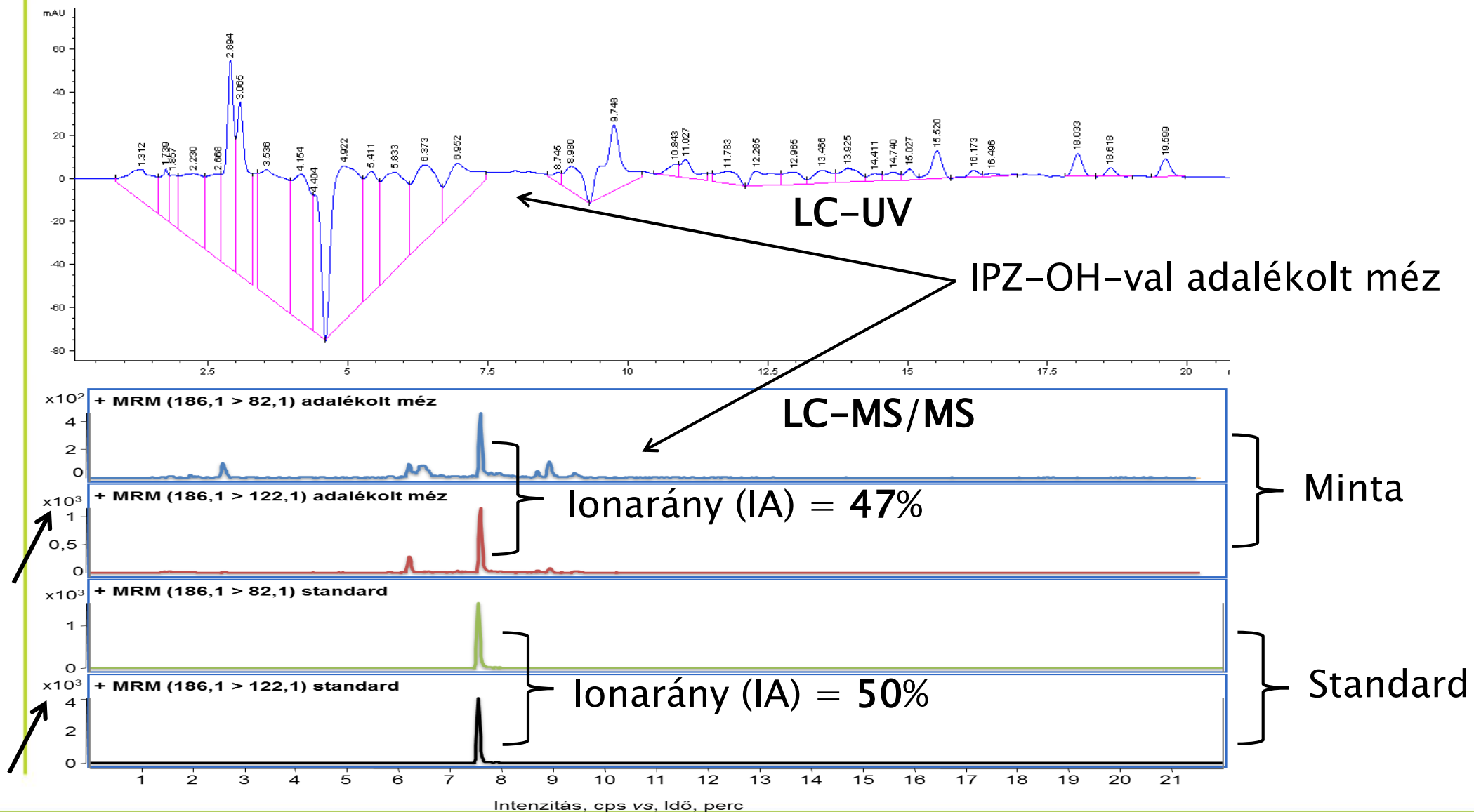
Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra



Tandem tömegspektrométer (hármas kvadrupol rendszerű)

LC-UV vs. LC-MS/MS kromatogram

Minőségi
azonosítás:
1. Retenciós
idő
2. Ionarány:
a két
ionátmenet
intenzitásának
aránya

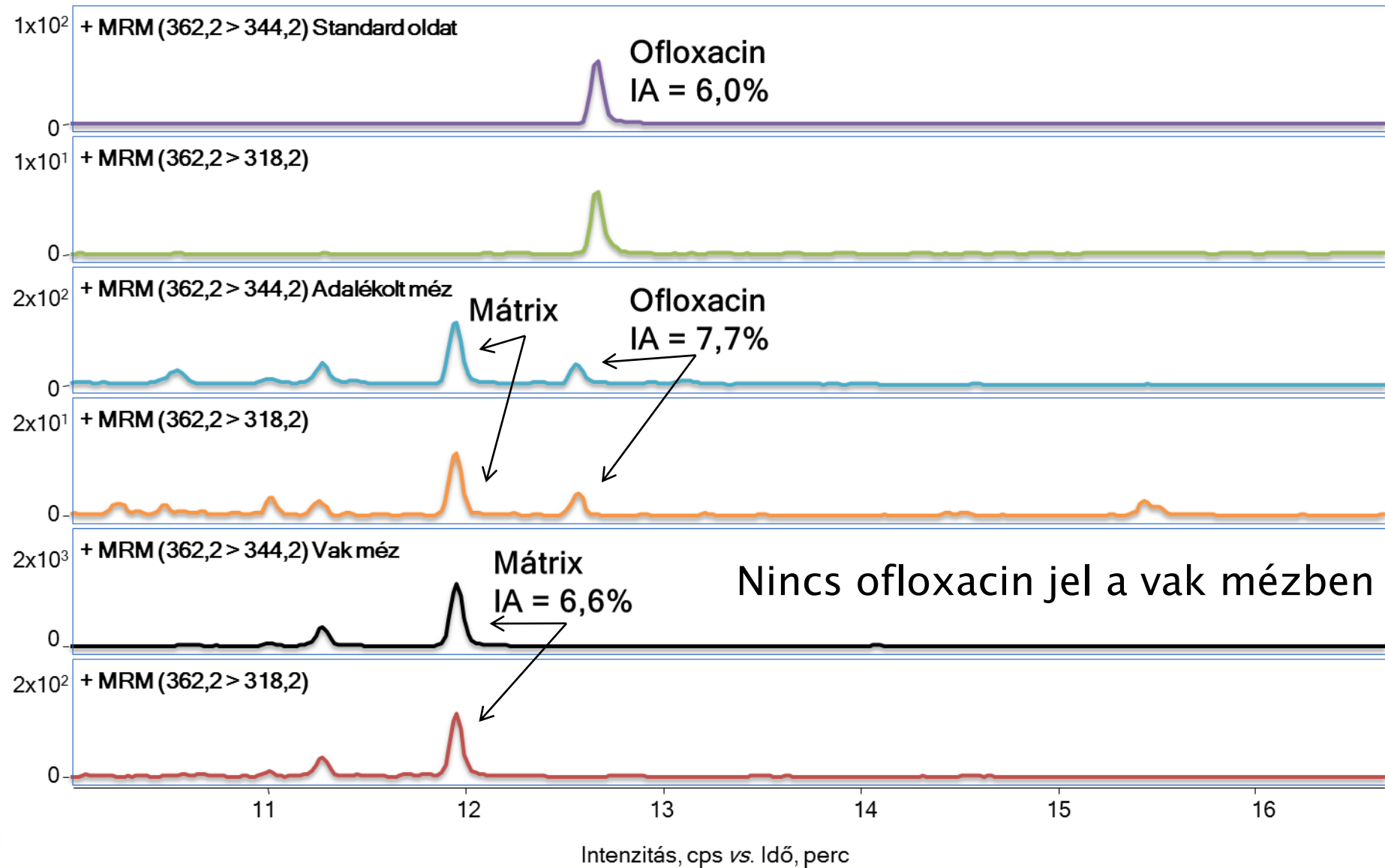


Ofloxacin mézben

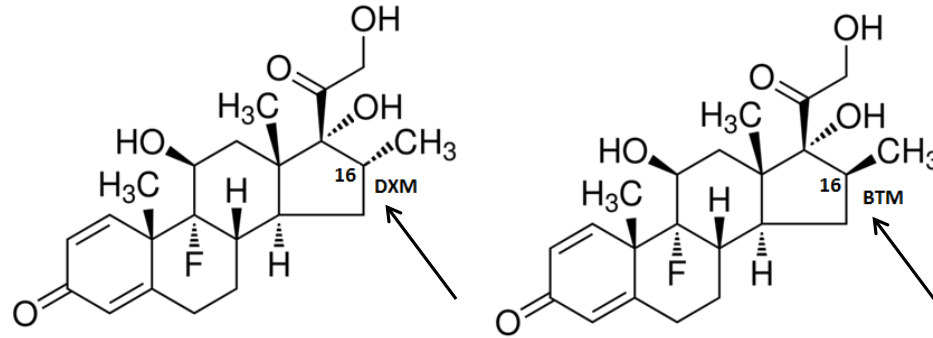
Ionarány (IA) a standardban **6%**.

Ionarány (IA) elfogadható a mintában **3 – 9%** között az EU 2002/657/EC alapján

Azonosítást csak referencia anyaggal lehetett egyértelműen elvégezni.

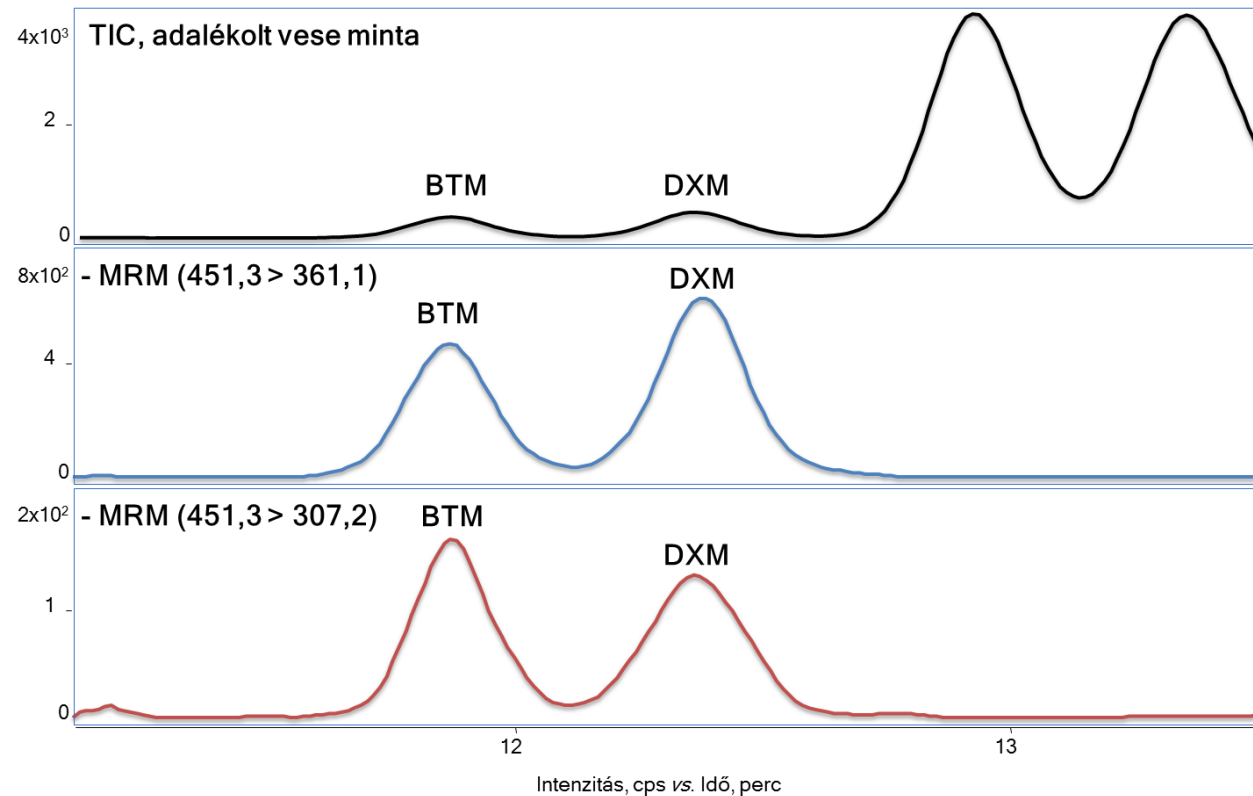


Szteroid epimerek elválasztása



Dexametazon (DXM) és betametazon (BTM) csak a 16-os pozícióban lévő metil csoport térállásában különböznek.

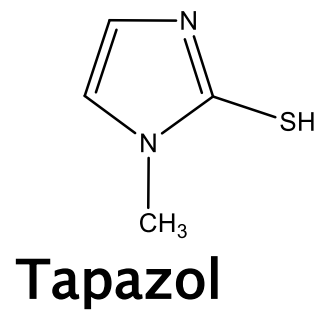
A HPLC elválasztásnak elsődleges szerepe van!



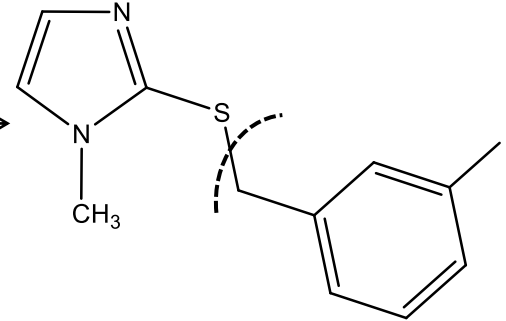
Ionátmeneteik megegyeznek.

Nagyfelbontású LC elválasztás. (fenil-hexil)

Tireosztatikumok (tapazol) meghatározása

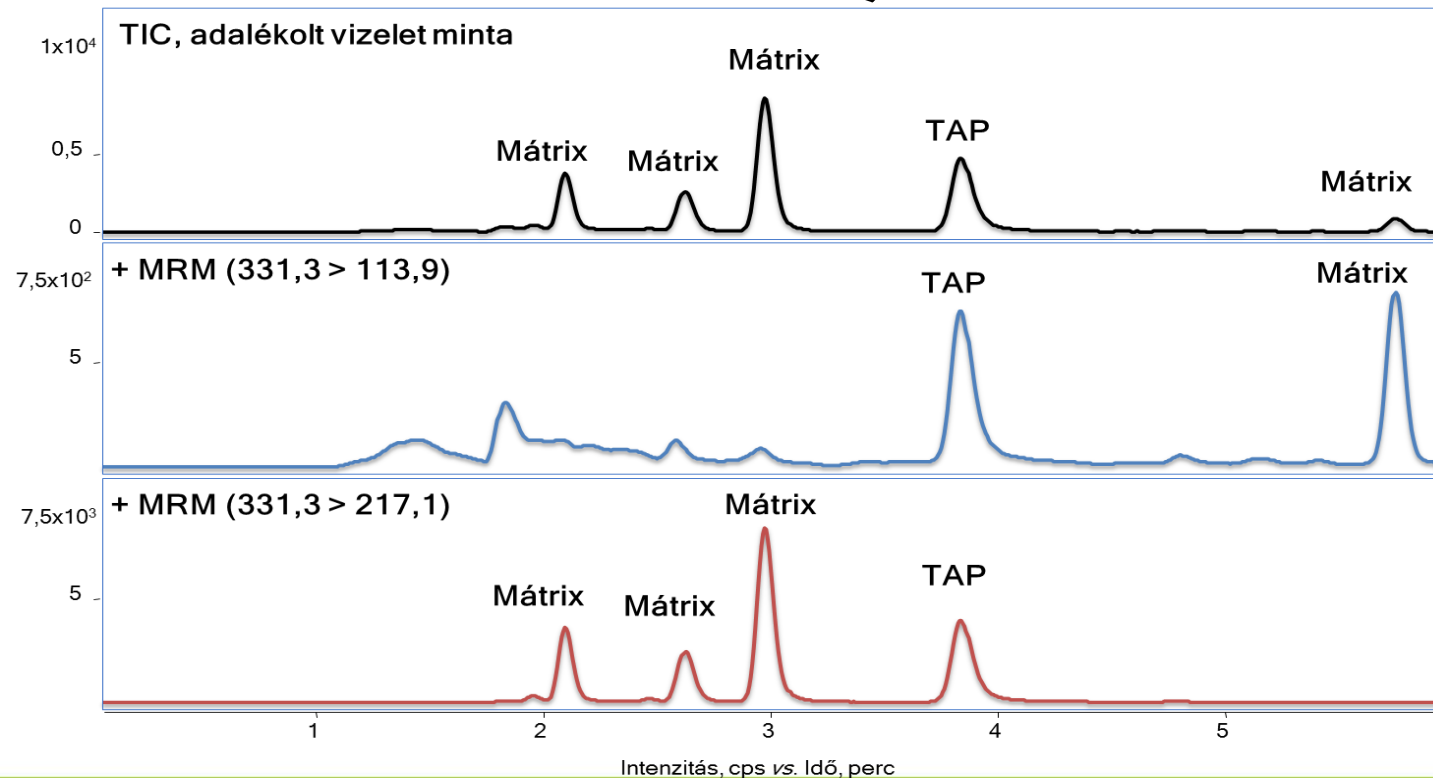


Származék
-képzés



A származékképző szer
217-es ionjával minden
származékolt mátrix is
rendelkezik, a **szelektivitás**
így csökken!

A HPLC
elválasztásnak
elsődleges
szerepe van!



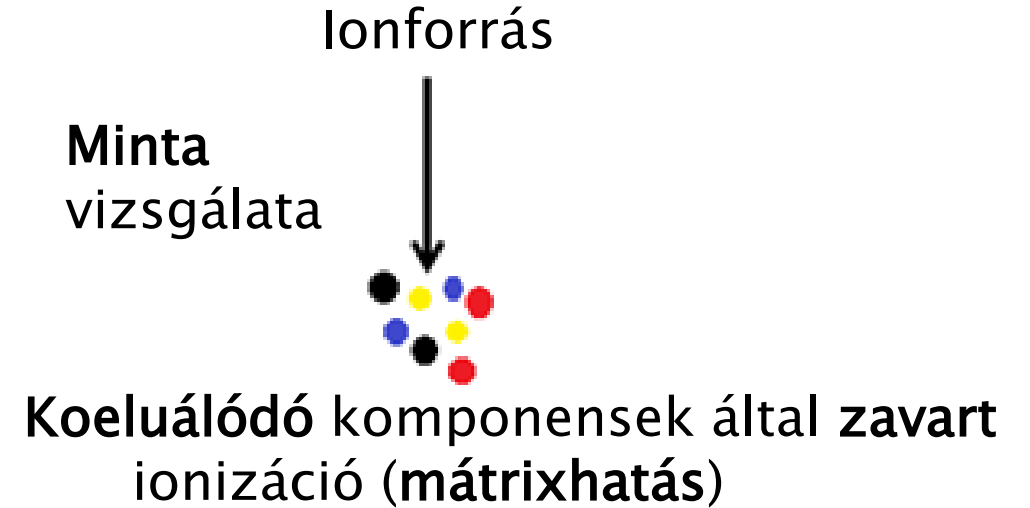
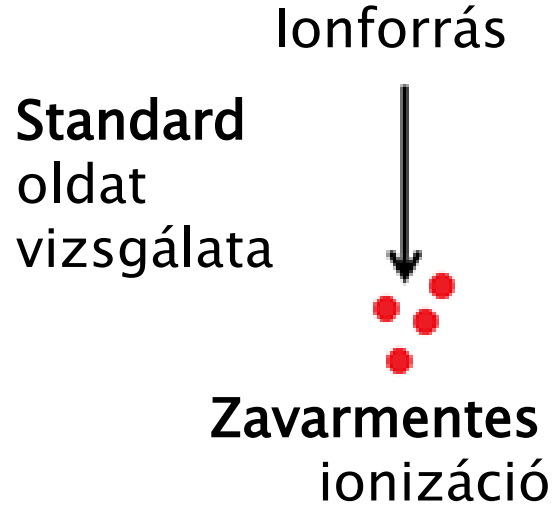
Minőségi azonosítás LC–MS/MS technikával

Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra

- ✓ Csak analitikai **standarddal** valósítható meg.
- ✓ Nem elég a retenciós idő + ionarányok egyezése; a **jel/zaj viszonyt** is figyelembe kell venni.
- ✓ Az **(U)HPLC** elválasztás jelentősége:
 - i. **Szelektív meghatározás.**
 - ii. **Mátrixhatás csökkentése > mennyiségi értékelés javítása.**

Mennyiségi meghatározás LC-MS/MS technikával

Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra



Mátrixhatás: mintáról – mintára változhat (eredettől függően).

A mennyiségi értékelés $\gg$ **mátrixhatás** figyelembevétele:

1. Mátrixra illesztett kalibráció
2. Izotóphígítás
3. Standard addíció

Mátrixra illesztett kalibráció

Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra

- ✓ Azonos mátrixból készül a kalibráció, mint a tesztminta.
- ✓ Csak **közelítés**.
- ✓ Eredettől függően:
 - Más **minőségű** és
 - Más **mennyiségű** endogén komponensek jelennek meg a háttérben.
 - **Minta-tisztítást** (szilárd fázisú vagy folyadék–folyadék extrakció) vagy hígítást igényel.

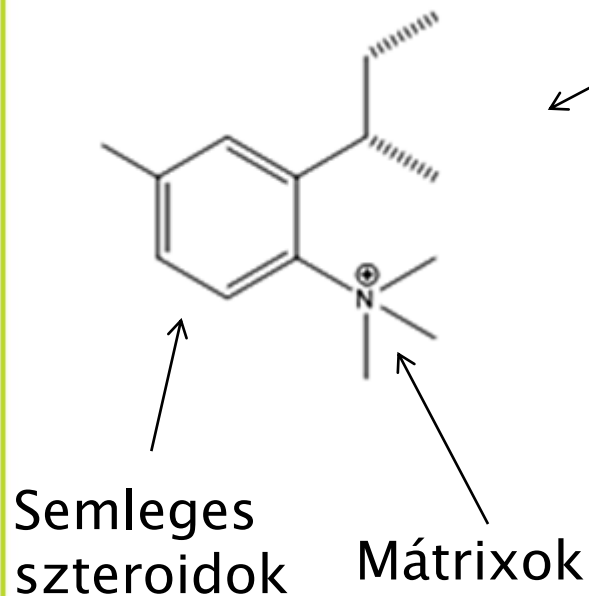
Minta-tisztítás

1. Milyen **jellegű** (savas, neutrális, bázikus) zavaró komponenseket kell eltávolítani?
2. **Ortogonalitás**: eltérő elvű tisztítás (ioncserés), mint a HPLC elválasztás (fordított fázisú)

Kortikoszteroidok meghatározása vizeletből

- ✓ Minta-tisztítás: gyenge savas mátrixok elválasztása az LC-MS/MS vizsgálat előtt.
- ✓ LC-MS/MS elválasztás: **fordított fázisú HPLC**.
- ✓ Minta-tisztítás: kevert módú **anioncserélőn**, lúgos pH-n (ioncserés, eltérő elvű).

Ortogonalis
minta-
tisztítás

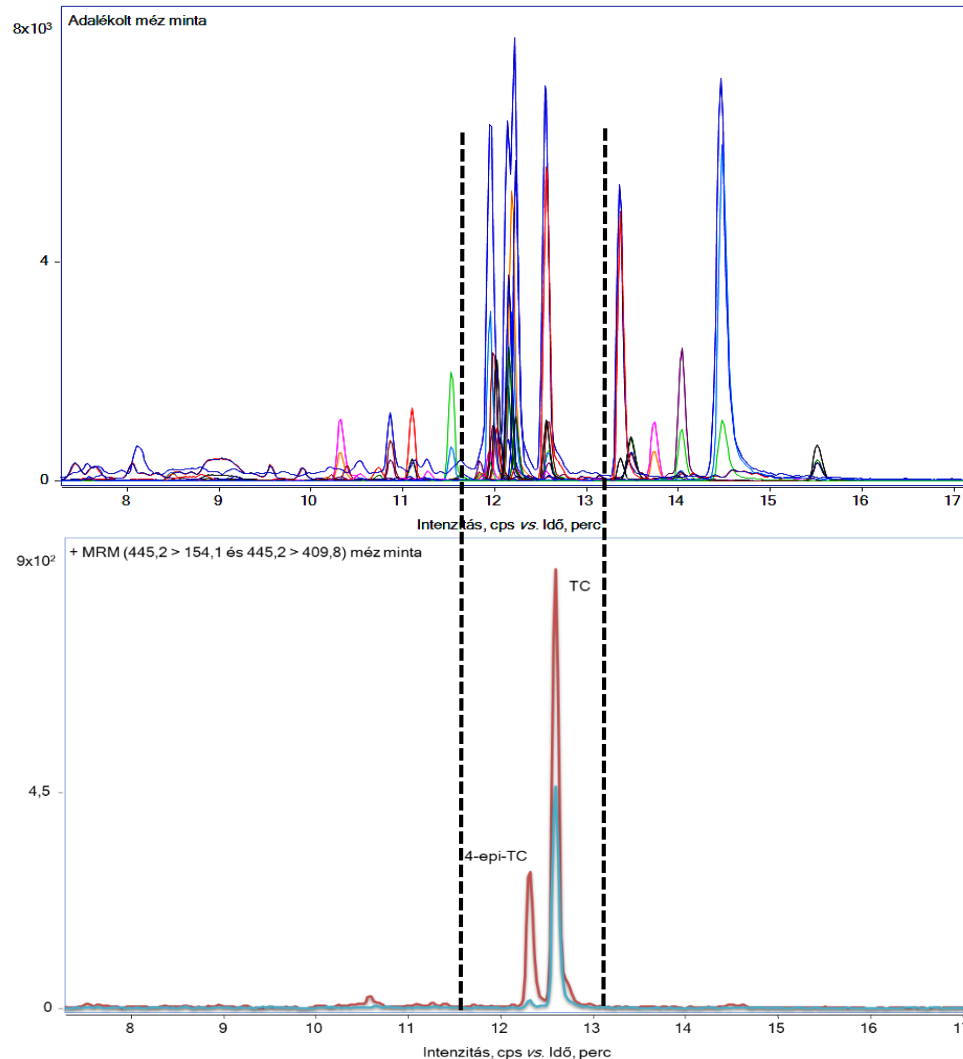


Nemzetközi körvizsgálat 2009 és 2016

Minta	Detektált komponens	Mért érték (ng/mL)	Z-érték	Értékelés
1	Metilprednizolon	0,67	0,14	Megfelelő
2	Metilprednizolon	0,12	-0,44	Megfelelő
3	Metilprednizolon	2,16	-0,40	Megfelelő
4	Metilprednizon	0,84	-0,06	Megfelelő
5	Dexametazon	1,56	0,03	Megfelelő
6	Prednizolon	2,05	-0,26	Megfelelő
7	Prednizolon	4,95	-0,30	Megfelelő

Mátrixra illesztett kalibráció többkomponenses (33) módszerben

Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra



Kalibrációs minta: 11,5 – 13,2
perc között 17 célkomponens
eluálódik.

Tesztminta: csak a TC-t és a 4-epi-
TC-t tartalmazza (14,8 µg/kg) >
> más a **háttér**, mint a kalibrációban.

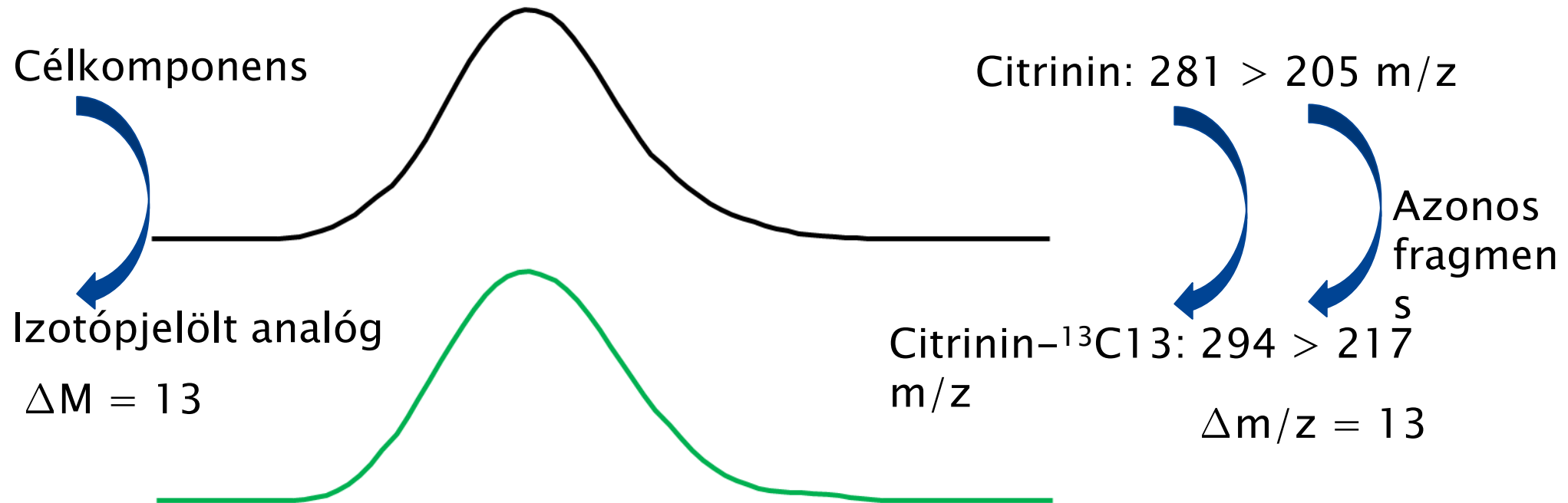
Σkonc: 45,2 µg/kg (csak
szűrőműszernek)
(többkomponenses kalibrációról).

Σkonc: 12,6 µg/kg (megerősítő
módszerrel).

Izotóphígítás

Belső standard (ISTD): izotópjelölt analóg (e.g. ^{13}C , ^2H , ^{15}N)

Igény a pontos minőségi és mennyiségi vizsgálatokra

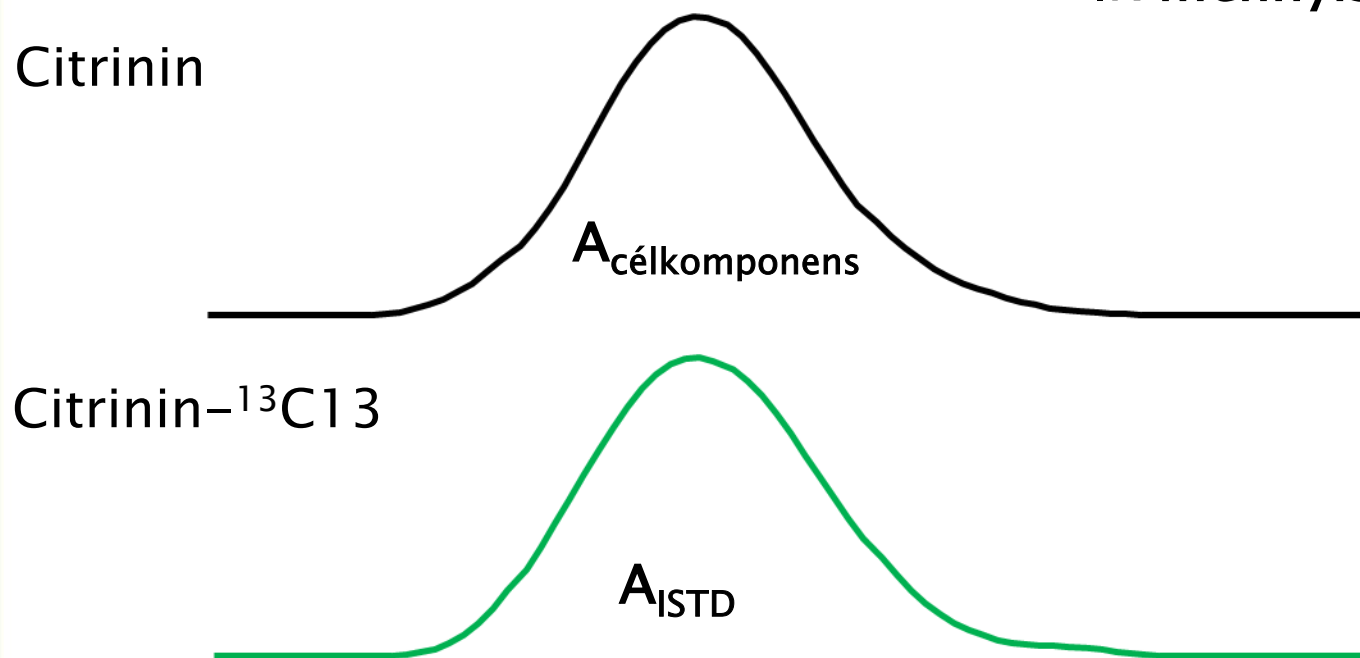


Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra

Izotóphígítás

$$\text{Izotóp arány (IR)} = A_{\text{célkomponens}} / A_{\text{ISTD}}$$

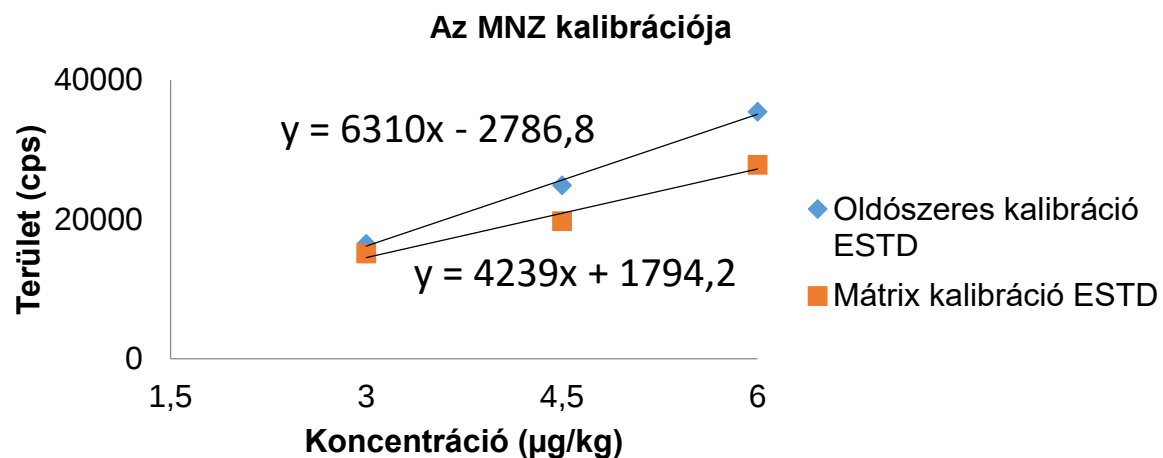
- ✓ IR független a mátrixhatástól
- ✓ IR mennyiségi értékeléshez



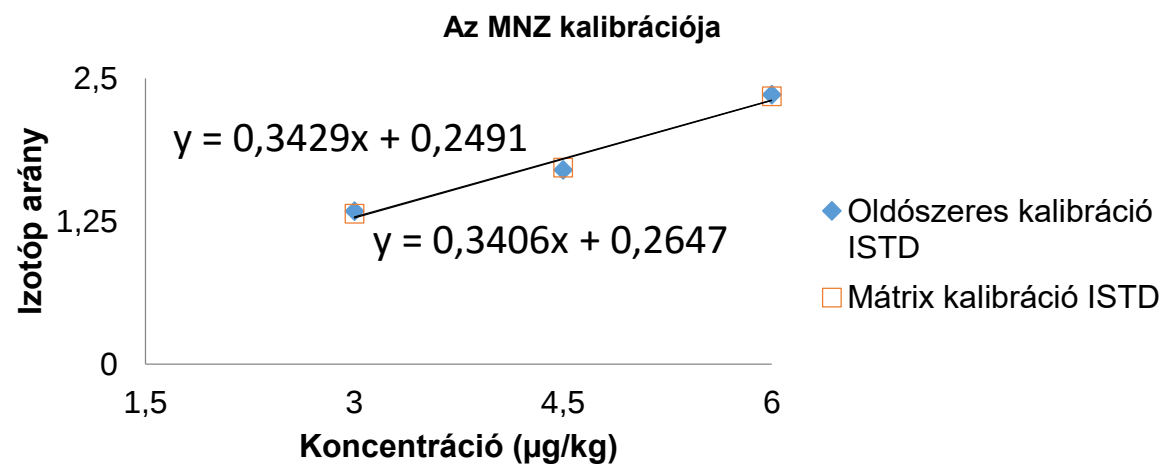
1. Retenciós idők egyezése?!
2. Izotóptisztaság

Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra

Izotóphígítás



Mátrix nélküli („oldószeres”) és
mátrixra illesztett kalibráció
ISTD nélkül.

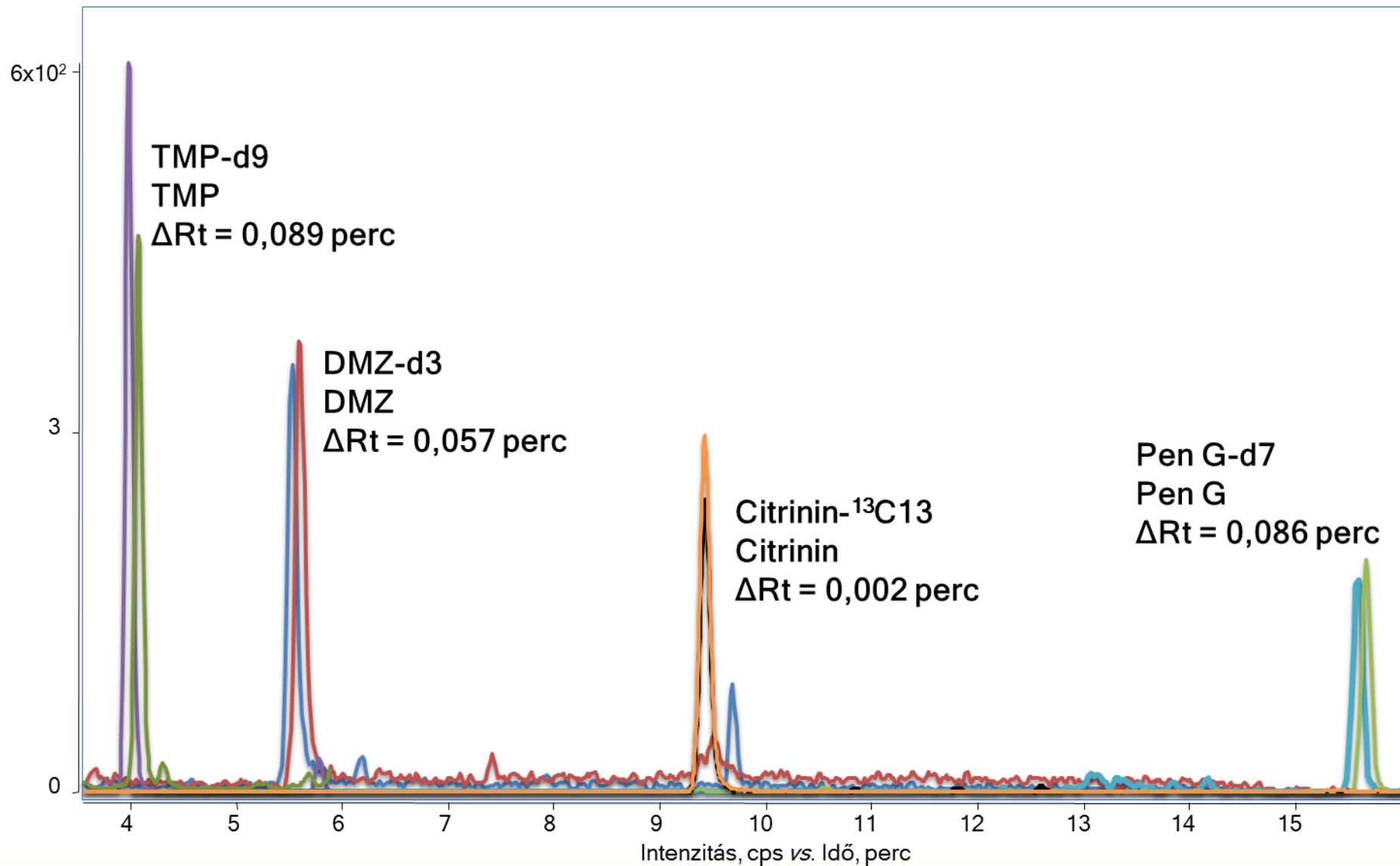


Mátrix nélküli („oldószeres”) és
mátrixra illesztett kalibráció
ISTD-vel.

ISTD: MNZ- $^{13}\text{C}_2$ - $^{15}\text{N}_2$

Izotóphígítás

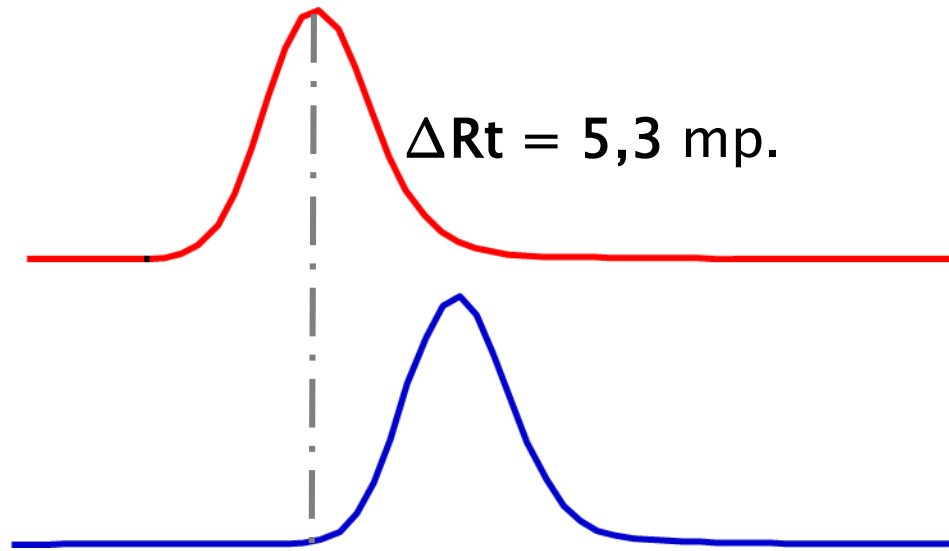
Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra



Izotóphígítás

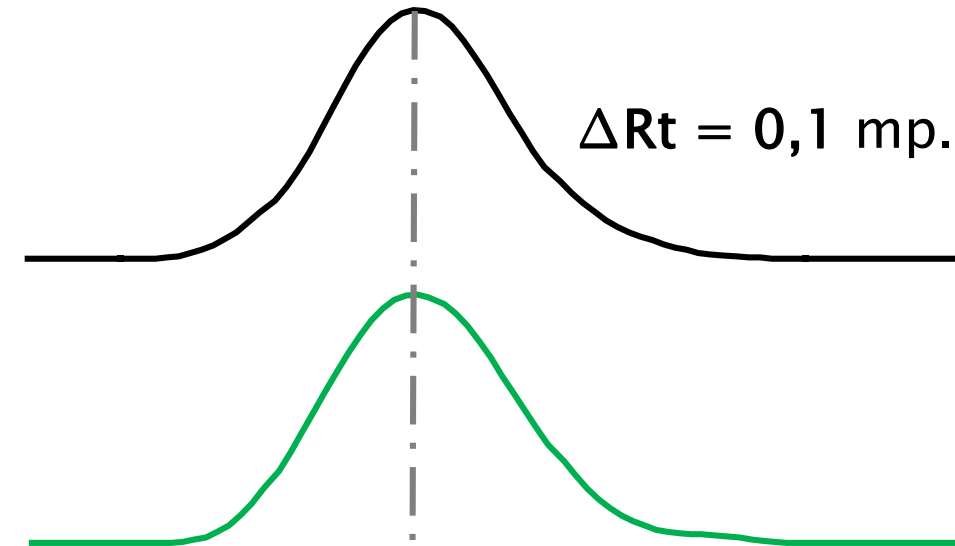
Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra

Deutérium (^2H) jelzett ISTD



trimetoprim- d_9 és trimetoprim

^{13}C jelzett ISTD



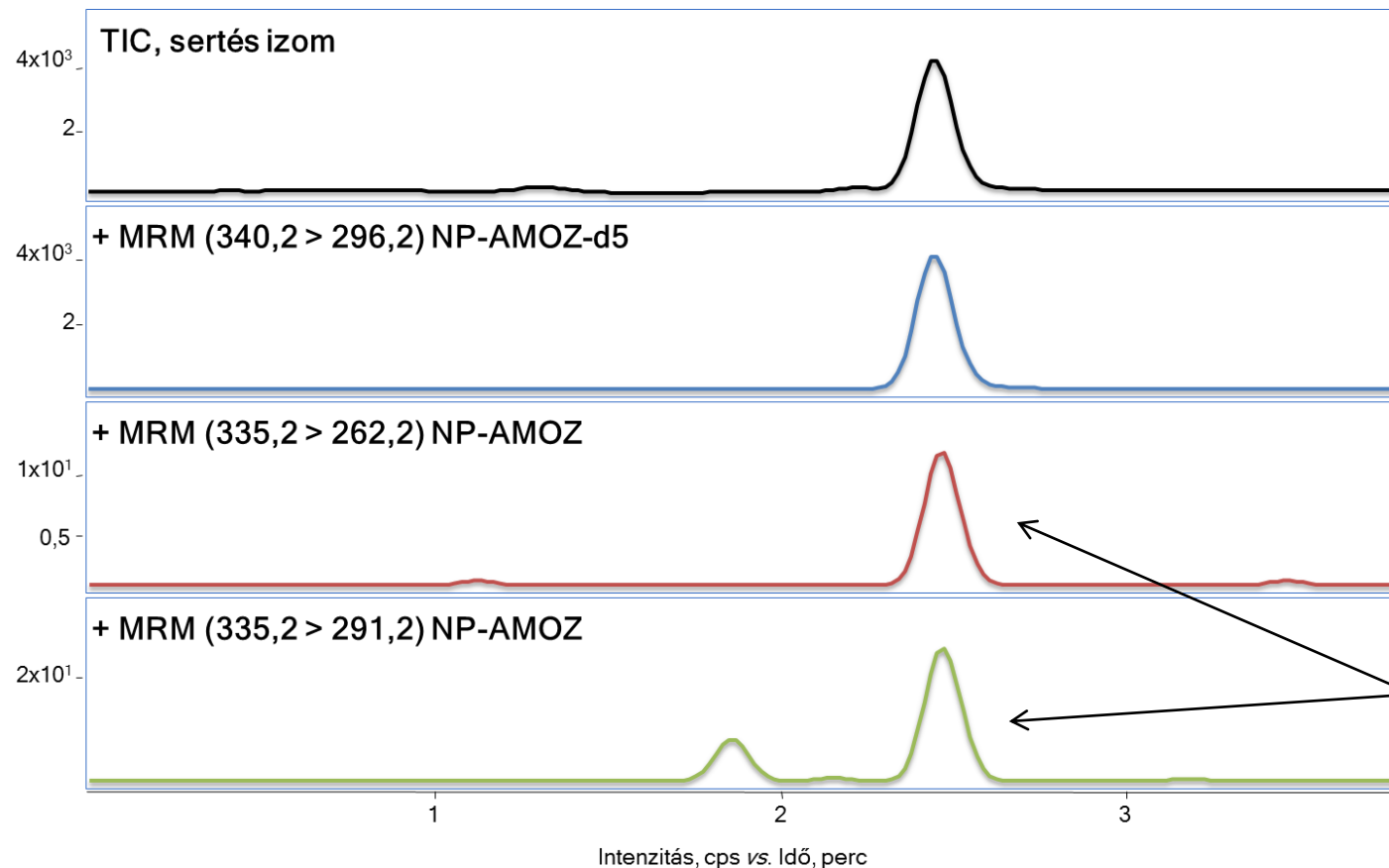
citrinin- $^{13}\text{C}_{13}$ és citrinin

Wang et al., JPBA 43 (2007) 701:

1,2 másodperc különbség a retenciós időben >> **20%-kal** eltérő koncentráció a referencia értékhez képest.

Izotóptisztaság

Izotóphígítás



NP-AMAZ-d5-tel
adalékolt **vak** minta.

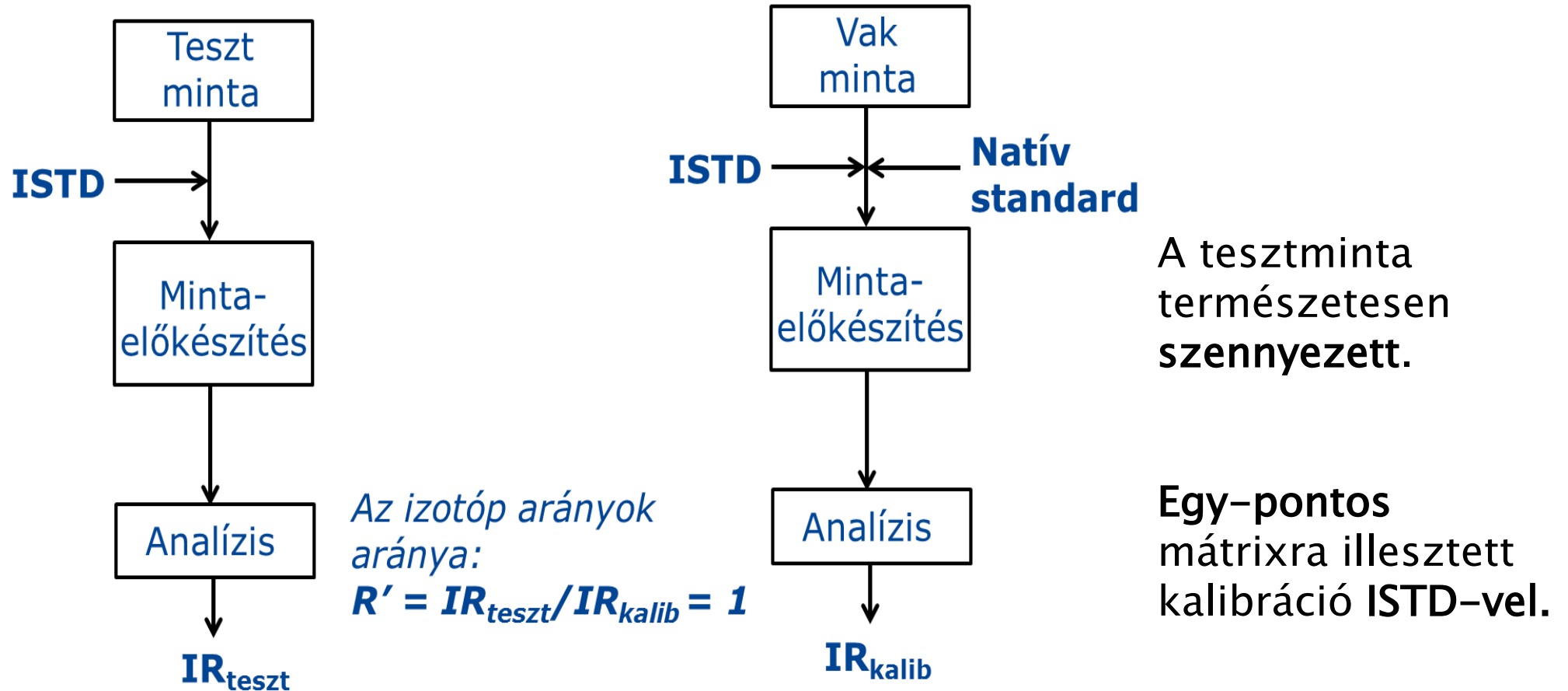
Az ISTD oldata
tartalmaz **nem jelzett**
célkomponenst is.

Megjelenik a
célkomponens a **vak**
mintában.

Befolyásolja a **kisebb** izotóp arányokat.

„Pontosan egyező” dupla izotóphígítás

Referencia
értékek
meghatározás
a



Az izotóp arányok a tesztminában és a kalibrációs mintában egyeznek.

Összefoglalás

Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra

- ✓ (U)HPLC elválasztás fontossága (azonos szerkezetű vegyületek vizsgálata, pl. **szulfonamidok**).
- ✓ Minta-tisztítás jelentősége (ortogonalitás).
- ✓ A mátrixra illesztett kalibráció korlátai (pl. többkomponenses módszerek)
- ✓ Izotóphígítás (deuterált *vs.* ^{13}C standardok)
- ✓ Izotóptisztaság

Igény a pontos
minőségi és
mennyiségi
vizsgálatokra

Köszönetnyilvánítás

Simon Andreának

Pálffi Évának

Kremniczky Tímeának

Dernovics Mihálynak

Andreas Breidbach-nak

*Köszönöm a
figyelmet!*

