

Az LC-MS/MS technika lehetőségei a növényvédőszer- maradék analitikában

Szitás Róbert
Dr. Kadenczki Lajos



B.-A.-Z. Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
Növény- és Talajvédelmi Igazgatóság
Növényvédőszer-maradék Analitikai Laboratórium

Zöldség, Gyümölcs és Egyedi Módszerek
Magyar Nemzeti Referencia Laboratóriuma



Szeged, 2010. január 27.

Méréstechnikák I.

- GC-ECD
 - GC-NPD
 - GC-FPD
- termikusan stabil
illékony vegyületek mérése
- GC-MS
 - GC-MS/MS
- a tömegspektrum
kvalitatív információ ad
- HPLC-UV/VIS
 - Fotometria
- UV/VIS-elnyelés, mátrixcsúcsok
hosszadalmas mintaelőkészítés

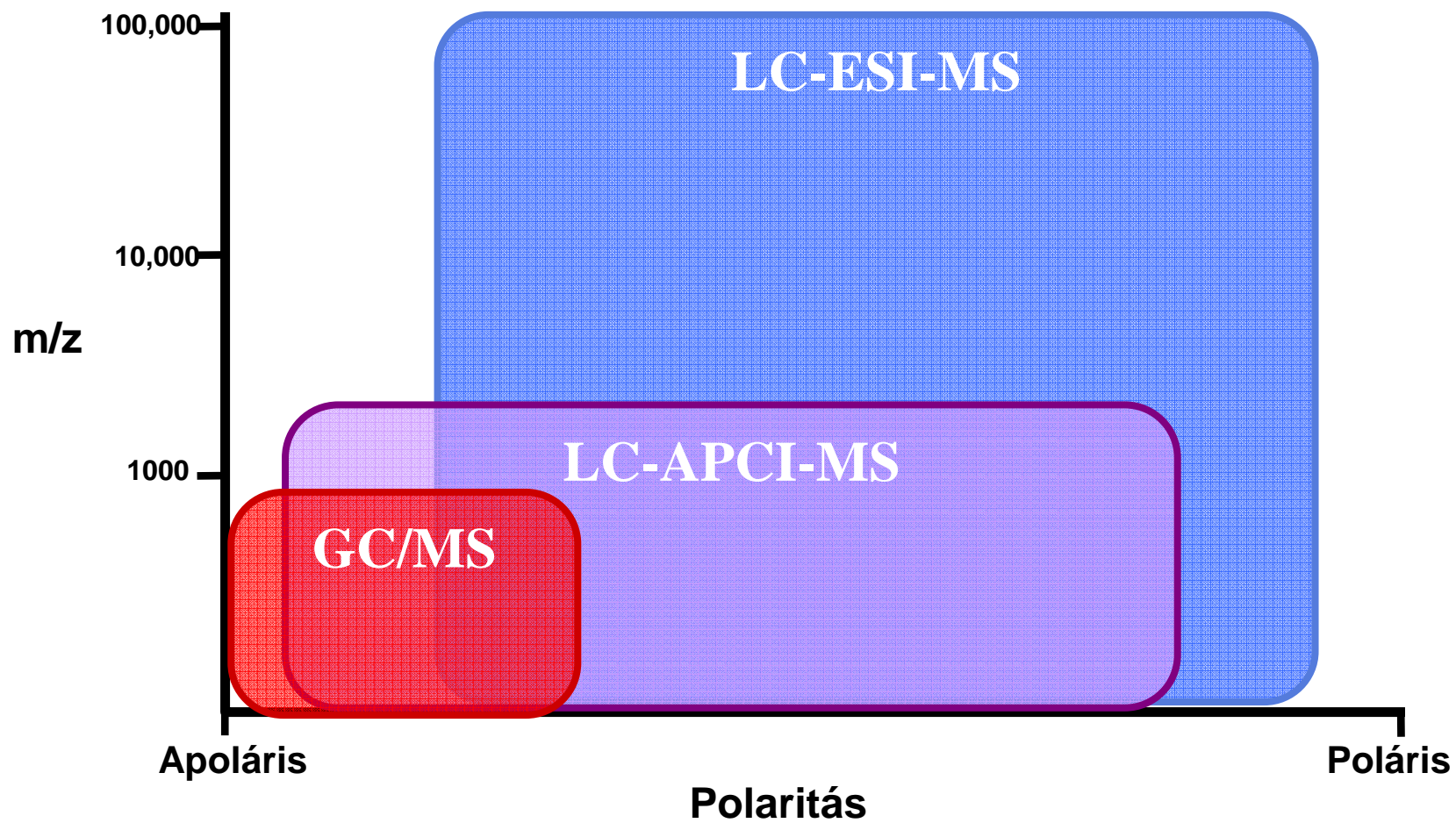
Méréstechnikák II.

LC-MS/MS

a peszticidek széles körében alkalmazható

- illékony és nem illékony vegyületek
- termikusan labilis hatóanyagok
- UV/VIS tartományban nem elnyelő vegyületek
- ionos vegyületek
- komponensek nagy biztonsággal azonosíthatók
- egy futásban nagy számú komponens meghatározása

Méréstechnikák III.



A készülék I.



Prostar HPLC & 320-MS



A készülék II.

Mintabejuttatás

ESI (ElectroSpray Ionization)

- legelterjedtebb a növényvédőszer-maradék analitikában
- direkt feszültség hatására keletkező gázfázisú ionok
- porlasztó- és szárítógáz segítségével
- lágyionizációs technika

APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

- ESI kiegészítője
- nem ionos, illékony vegyületek vizsgálata = nagyobb szelektivitás
- közvetett ionizáció

A készülék III.

A tömeganalizátor

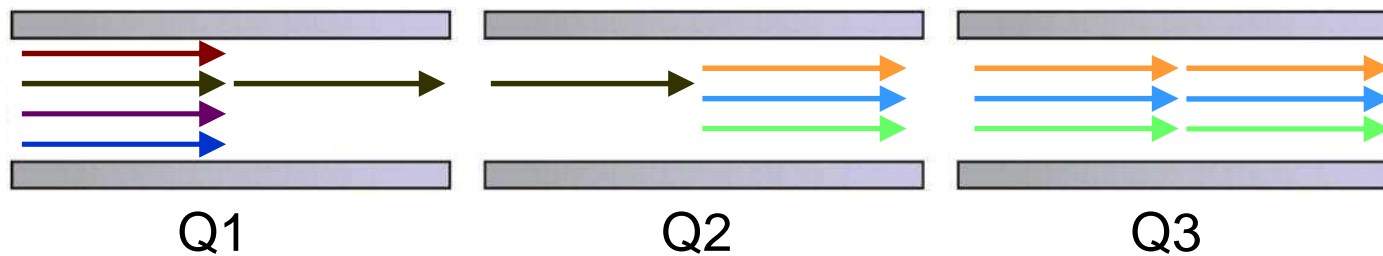
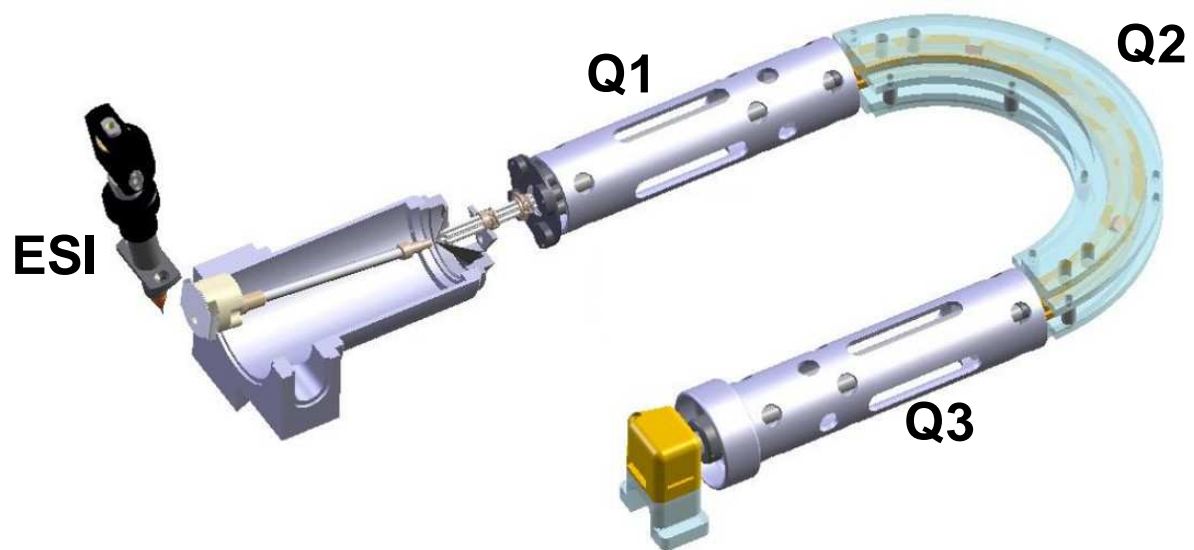
Triple Quadrupole

- az egyik legjobb és legelterjedtebb kvantitatív analitikai MS
- széles linearitási tartomány
- gyors = sok átmenet mérhető egyszerre

- viszonylag kis m/z felbontás
- kevés szerkezeti információt tartalmazó spektrum

A készülék IV.

A tömeganalizátor

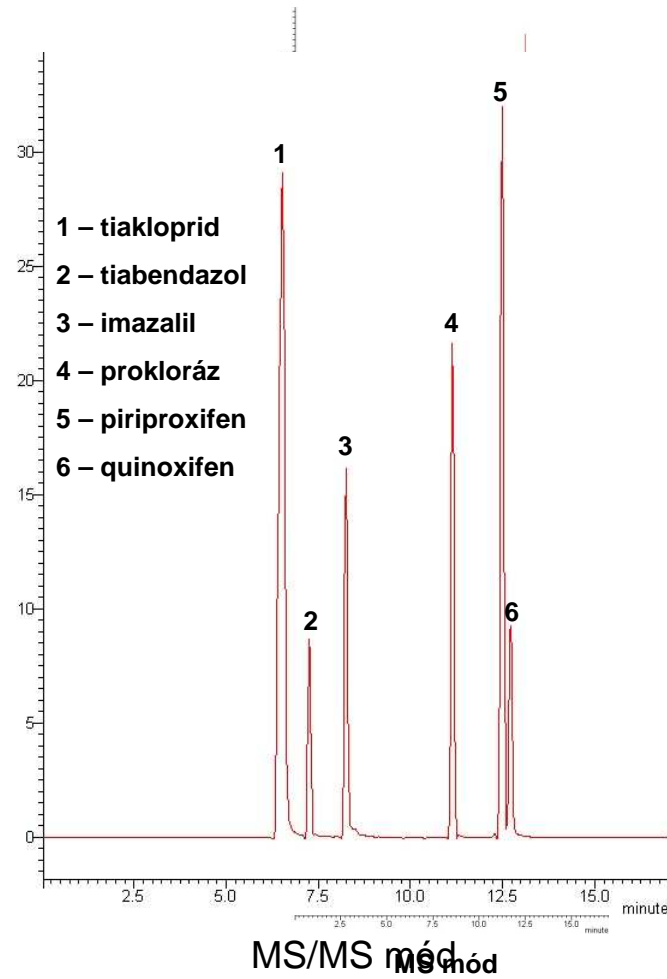
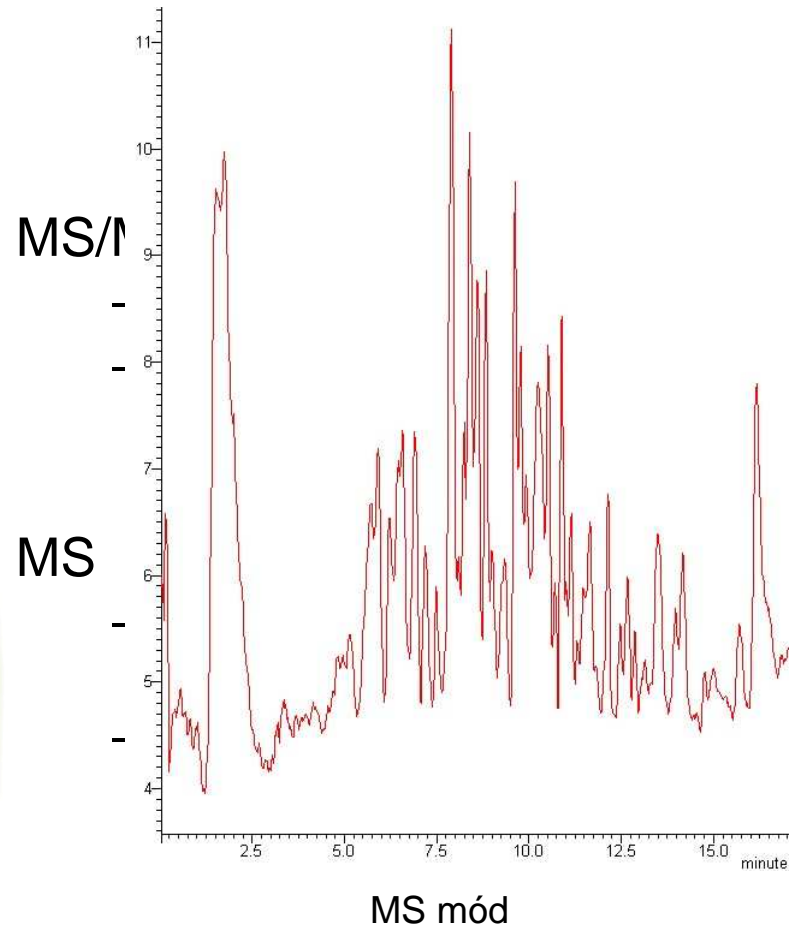


A készülék V.

spike-olt mandarin extrakt

spike-olt mandarin extrakt

MS vs MS/MS



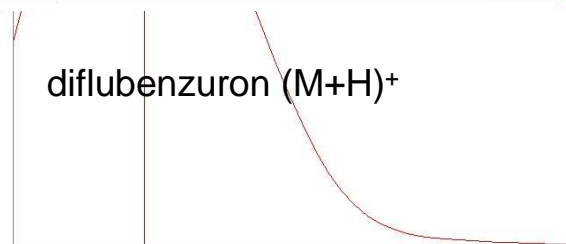
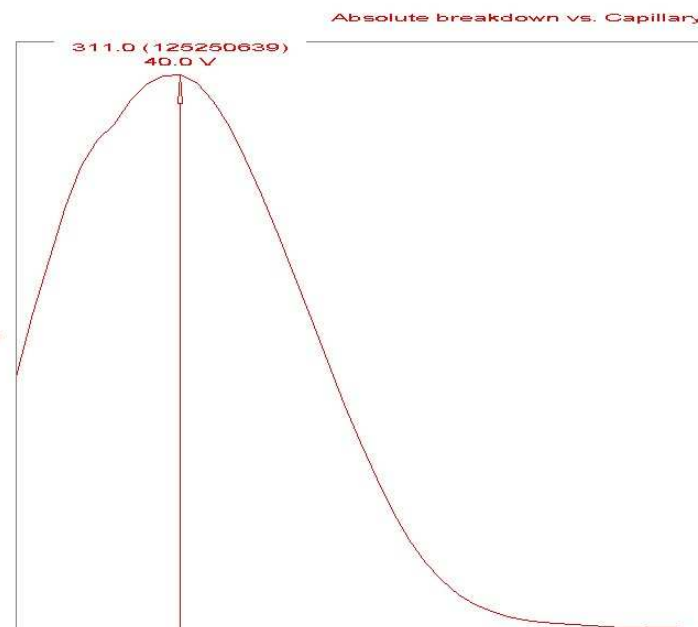
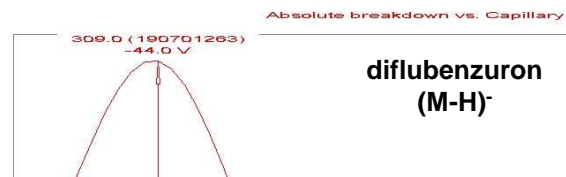
LC-MS/MS mérés felépítése I.

Az anyai ion

- leggyakoribb ionok:
 $(M+H)^+$, $(M-H)^-$, $(M+NH_4)^+$
- az eluensrendszer befolyásolja az érzékenységet, ua. az elválasztást is

Az ionbevitel optimalizálása

- célja: maximális ionmennyiséget juttatni az MS-be
- az ionok a Q1-en keresztül az ütközési cellába jutnak



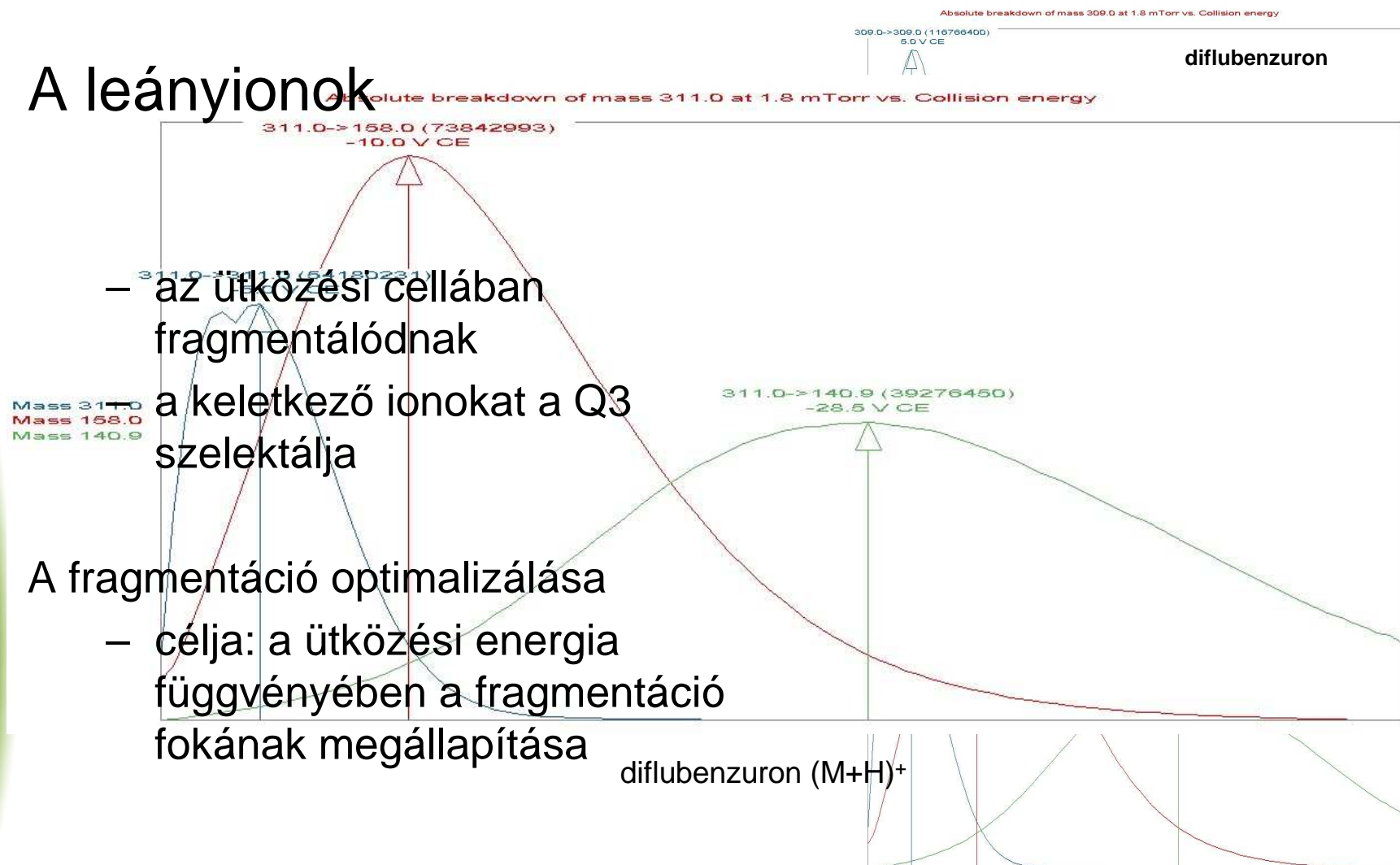
LC-MS/MS mérés felépítése II.

A leányionok

- az ütközési cellában fragmentálódnak
- a keletkező ionokat a Q3 szelektálja

A fragmentáció optimalizálása

- célja: a ütközési energia függvényében a fragmentáció fokának megállapítása

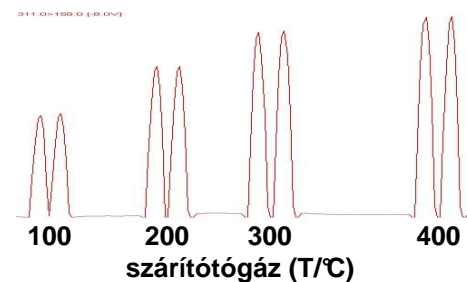
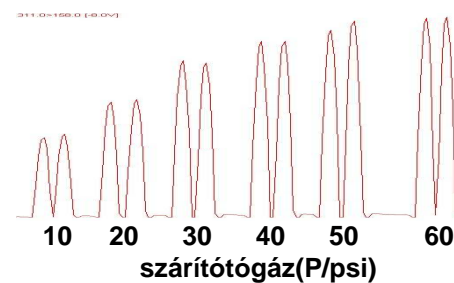
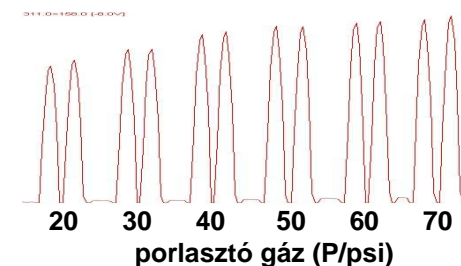


LC-MS/MS mérés felépítése III.

Az ionizációs körülmények


- gázáramok és hőmérsékletek beállítása
- porlasztótű pozicionálás
- főleg egyedi módszereknél van jelentősége
- multimódszereknél kompromisszumra van szükség

diflubenzuron (M+H)⁺ 311,0 → 158,0



LC-MS/MS mérés felépítése IV.

A kolonna

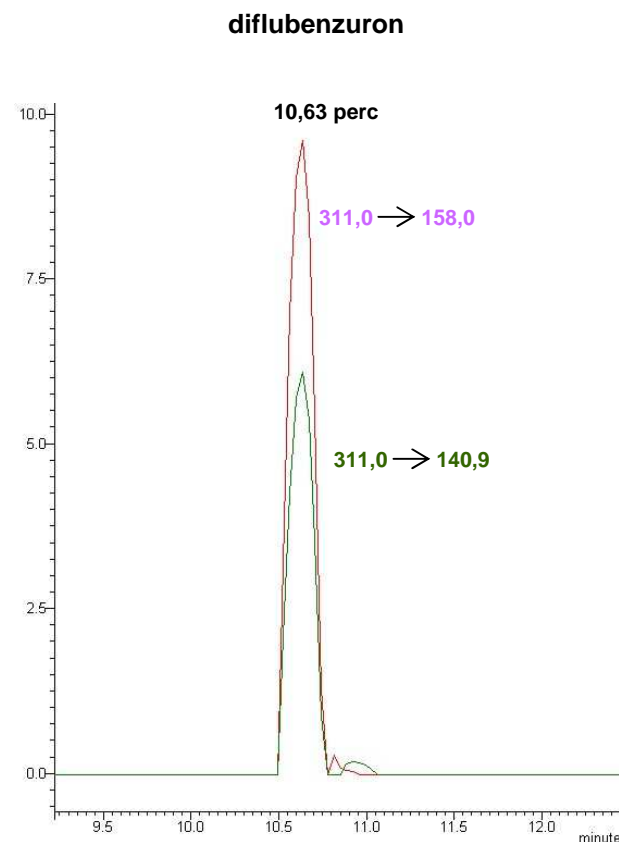
 Ultra C-18 100×2,1mm, 3µm

Kémiai jelleg szerint lehet

- C18, C8; stb.
- polárisan módosított fordított fázisok
- HILIC
- ioncserélő oszlopok
- stb.

Dimenzió

- kis ID és szemcseméret = nagy hatékonyság

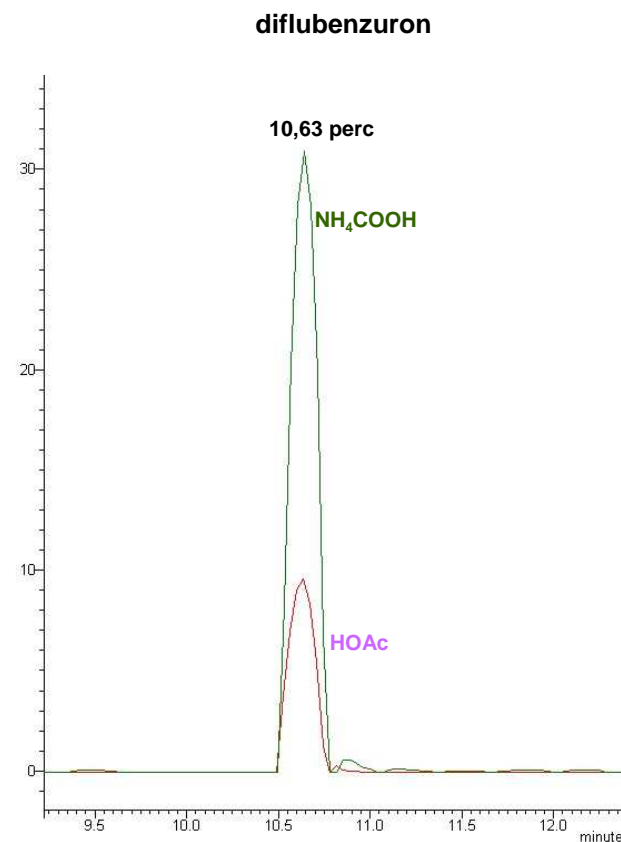


LC-MS/MS mérés felépítése V.

Az eluensrendszer

Gradienselúció

- víz
- MeOH vagy ACN
- pufferek az ionképzés segítésére
(HCOOH, HOAc, NH₄COOH, NH₄OAc, stb.)
- ~200 – 300 µl/min áramlási sebesség ESI esetén



LC-MS/MS mérés felépítése VI.

Mérőmódszer szerkesztése

Dwell time:

- egy átmenet mérési ideje

Scan time:

- egy teljes szkennelési ciklus mérési ideje

Szegmensek:

- különálló mérőblokkok
- több komponens mérésére
- nagyobb érzékenység elérése

Time segment 2 of 4

Start at retention time: 17.50 Min.

Collect Data CID gas on Syringe On

Scan Time (in Seconds): 1.800 Mass peak width in amu: Quad 1 1.0 Quad 3 1.5 Copy to all

Mass List

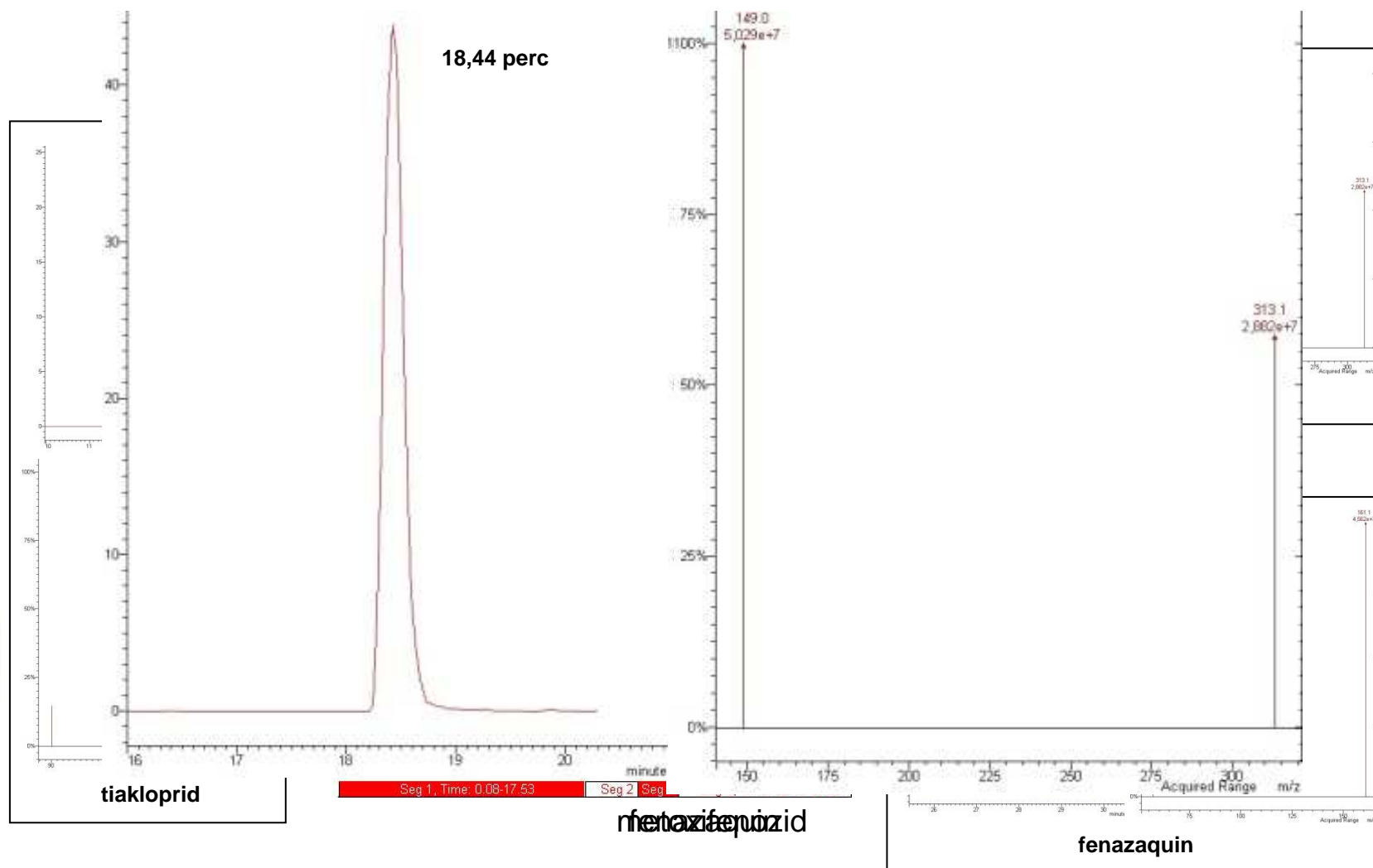
	Polarity	Q1 First Mass	Q1 Last Mass	Q3 First Mass	Q3 Last Mass	Capillary	Collision Energy	Req. Dwell Time
47	Pos.	304,30		130,00		68,000	19,000	0,015
48	Pos.	304,30		147,00		68,000	24,000	0,015
49	Pos.	308,20		70,00		36,000	16,500	0,015
50	Pos.	308,20		125,00		36,000	32,500	0,015
51	Pos.	311,00		140,90		40,000	28,500	0,015
52	Pos.	311,00		158,00		40,000	10,000	0,015
53	Pos.	312,10		92,20		48,000	19,000	0,015
54	Pos.	312,10		236,10		48,000	11,000	0,015
55	Pos.	316,10		165,10		64,000	23,000	0,015
56	Pos.	316,10		247,00		64,000	15,000	0,015
57	Pos.	318,10		70,20		44,000	19,000	0,015
58	Pos.	318,10		125,20		44,000	23,500	0,015
59	Pos.	321,20		119,00		32,000	14,000	0,015
60	Pos.	321,20		203,00		32,000	7,000	0,015
61	Pos.	325,10		108,00		44,000	11,000	0,015
62	Pos.	325,10		261,00		44,000	9,000	0,015
63	Pos.	327,20		116,00		32,000	17,500	0,015
64	Pos.	327,20		205,10		32,000	7,000	0,015

2

LC-MS/MS mérés felépítése VII.

3-OH-karbofurán	Diklórmid	Fenpropatrin	Karbendazim	Monokrotofosz	Spinozad
Acefát	Dikrotofosz	Fenpropimorf	Karbofurán	Ometoát	Spirodiklofen
Acetamidrid	Dimetoát	Fluazinam	Karboxin	Oxadixil	Spiroxamin
Aldikarb	Dimetomorf	Flucitrinát	Klofentezin	Oxamil	Tebufenozid
Aldikarb-Szulfon	Dimoxistrobin	Fludioxonil	Klór-antraniliprol	Paklobutrazol	Tebufenpirad
Aldikarb-Szulfoxid	Dinikonazol	Flufenacet	Klotianidin	Pencikuron	Tebukonazol
Azoxistrobin	Dinokap	Flufenoxuron	Linuron	Penkonazol	Teflubenzuron
Benomyl	Ditianon	Flufenzin	Lufenuron	Pikoxistrobin	Tetrazonazol
Bromoxynil	Diuron	Fluquikonazol	Malaoxon	Piraklostrobin	Tiabendazol
Bromukonazol	Epoikonazol	Flutriafol	Mekarbam	Piridaben	Tiakloprid
Buprofezin	Etiofenkarb	Fluzilazol	Mepronil	Piridafention	Tiametoxam
Ciazofamid	Etiofenkarb-szulfon	Fosthiazate	Mesotrione	Pirifenox	Tiodikarb
Ciklozidim	Etiofenkarb-szulfoxid	Haloxifop-R-metil	Metamitron	Pirimetanil	Tiofanát-metil
Cimoxanil	Etofenprox	Hexaflumuron	Metidation	Piriproxifen	Triallát
Ciprodinil	Etofumezát	Hexakonazol	Metiokarb	Prokloráz	Trifloxistrobin
Ciprokonazol	Famoxadon	Hexitiazox	Metiokarb-szulfon	Propamokarb	Triflumizol
Demeton-S-metil	Fenamidon	Imazalil	Metiokarb-szulfoxid	Propargit	Triflumuron
Demeton-S-metilszulfon	Fenarimol	Imidakloprid	Metkonazol	Propizamid	Triforin
Dietiofenkarb	Fenazaquin	Indoxakarb	Metobromuron	Propizoklór	Tritikonazol
Difenokonazol	Fenbukonazol	loxynil	Metomil	Propoxur	LC-MS std. mix
Diflubenzuron	Fenhexamid	Iprovalikarb	Metoxifenozyd	Proquinazid	
Diflufenikán	Fenoxikarb	Izoxaflutol	Metrafenon	Protiokonazol	
Diklofluand	Fenpiroximát	Karbaril	Miklobutanil	Quinoxifen	

LC-MS/MS mérés felépítése VIII.



A szekvencia

- kalibráló std. oldatok
- minta extraktok
- visszanyerési vizsgálatok

	Sample Name	Sample Type	Cal. level
1		Activate Method	
2	solvent	Analysis	
3	M691/10/1 10ng/ml	Calibration	1
4	M691/2/7 100ng/ml	Calibration	2
5	M691/3/7 500ng/ml	Calibration	3
6	MB QCh 1g/ml	Analysis	
7	Sz511 1g/ml	Analysis	
8	Sz511+H1 0.05(M691)	Analysis	
9	Sz511+H2 0.05(M691)	Analysis	
10	Sz511+H3 0.05(M691)	Analysis	
11	H591 1g/ml	Analysis	
12	H592 1g/ml	Analysis	
13	H593 1g/ml	Analysis	
14	H594 1g/ml	Analysis	
15	H595 1g/ml	Analysis	
16	H596 1g/ml	Analysis	
17	H597 1g/ml	Analysis	
18	H598 1g/ml	Analysis	
19	M691/10/1 10ng/ml	Calibration	1
20	M691/2/7 100ng/ml	Calibration	2
21	M691/3/7 500ng/ml	Calibration	3

Kalibráció I.

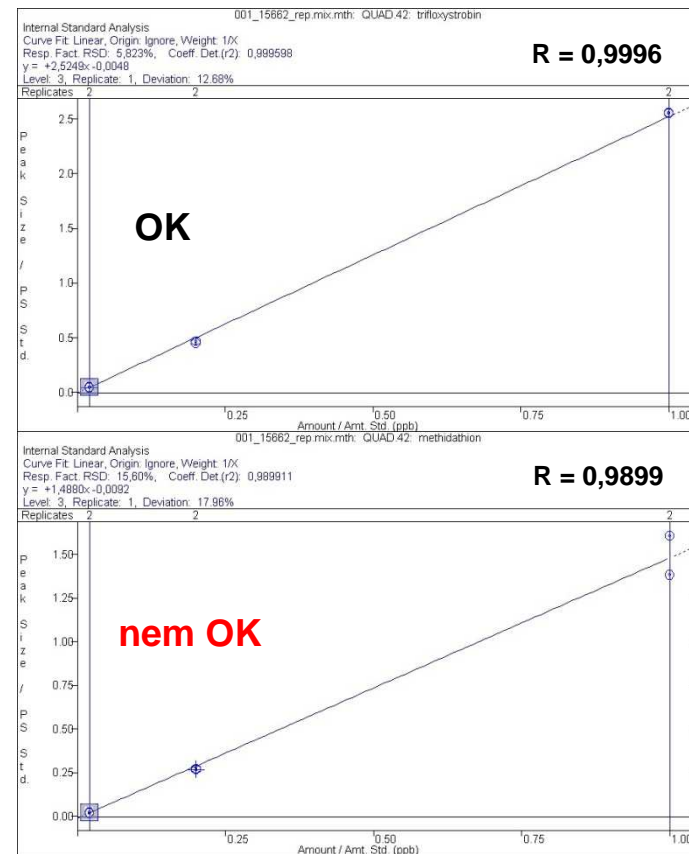
- külső standard
- belső standard (trifenil-foszfát)
- matrix matched (ált. uborka mátrix)
- standard addíció
- izotóp jelzett standard-ek

Kalibráció II.

Bracketting kalibráció

Kettős szerep:

- kalibrálás
- system suitability




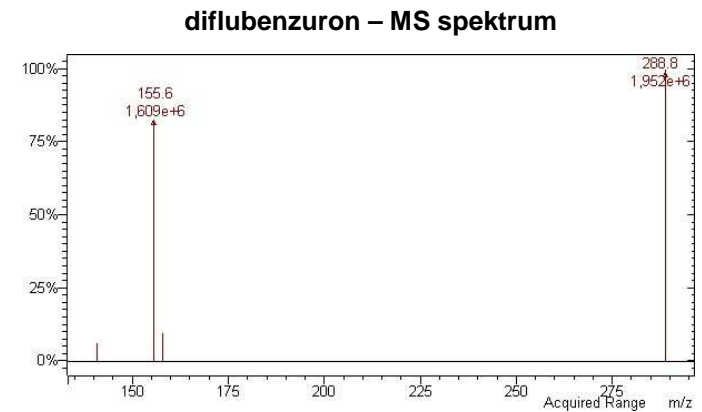
Visszanyerési vizsgálatok

- 20 – 30 mintánként,
de legalább méréssorozatonként
Reprezentatív standard mix
- évente min. 2x
LC-MS standard mix
- 3 paralell hozzáadás
- 0,01 – 0,1 ppm tartományban
- $70\% \leq R \leq 120\%$

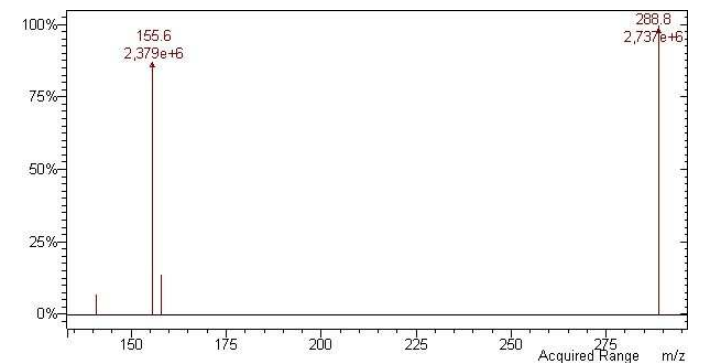
Aldikarb	Mepanipirim
Boszkalid	Metamidofosz
Buprofezin	Metidation
Cimoxanil	Miklobutanil
Ciprodinil	Penkonazol
Demeton-S-metil	Pirimifosz-metil
Diazinon	Prokloráz
Diklofluamid	Procimidon
Fenhexamid	Propamokarb
Fenpropatrin	Pirimetanil
Hexaklórbenzol	Spinozad
Hexakonazol	Spiroxamin
Imazalil	Tiabendazol
Imidakloprid	Tiakloprid
Lambda-cihalotrin	Tolilfluamid
Lindán	Trifloxistrobin
Karbendazim	Vinklozolin
Klofentezin	
Reprezentatív std. mix	

Megerősítő vizsgálatok

- ismételt, párhuzamos mintafeldolgozás
- más jellegű oszlop
 Synergi Fusion
polárisan módosított C-18
50×2,0 mm; 4µm
- más eluensrendszer
- csak a kérdéses hatóanyagokra
→ nagyobb érzékenység érhető el
- több ion mérése
- ha lehet más mérés technikával is (GC)



10 ng/ml – standard



bébiétel – 0,013 mg/kg

Gyakorlati problémák I.

QuEChERS

Extrakció

- 5 – 10 g minta
- 10 ml ACN
- 6,5 g extrakciós sókeverék
(4g MgSO_4 , 1g NaCl, 1g Na_3 -citrát,
0,5g Na_2 -citrát • 1,5 H_2O)



Clean-up

- 6 ml extrakt
- 1050 mg tisztító sókeverék
(900 mg MgSO_4 , 150 mg PSA)



Gyakorlati problémák II.

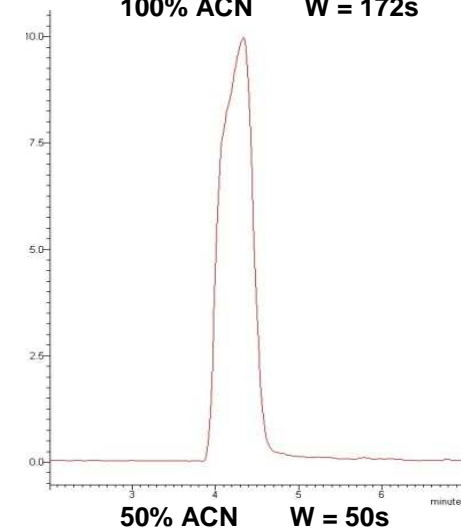
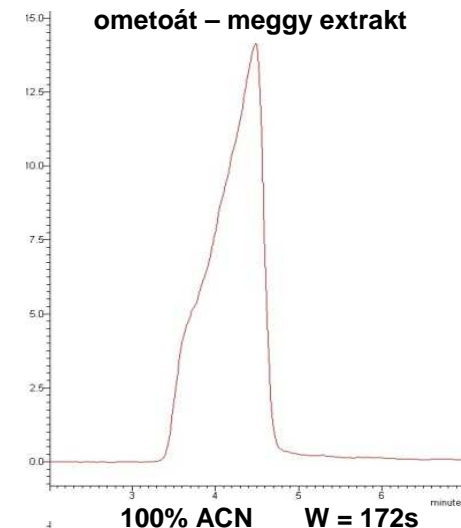
QuEChERS

- tisztítás után 100% ACN:

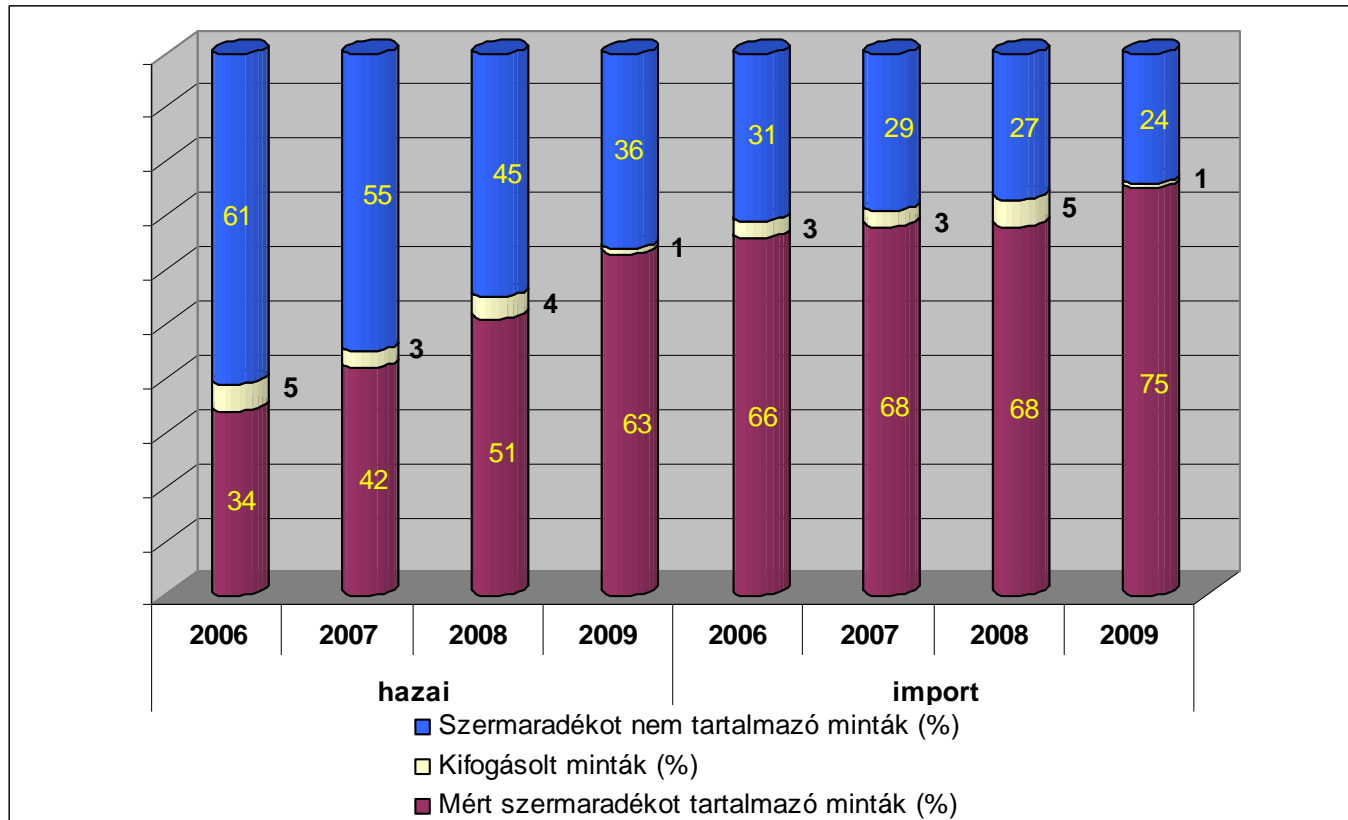
hidrofil komponensek esetén elnyuló csúcs
megoldás: hígítás vízzel

- viszonylag kis tisztaságú az extrakt:

az oszlopok gyorsabban elszennyeződnek

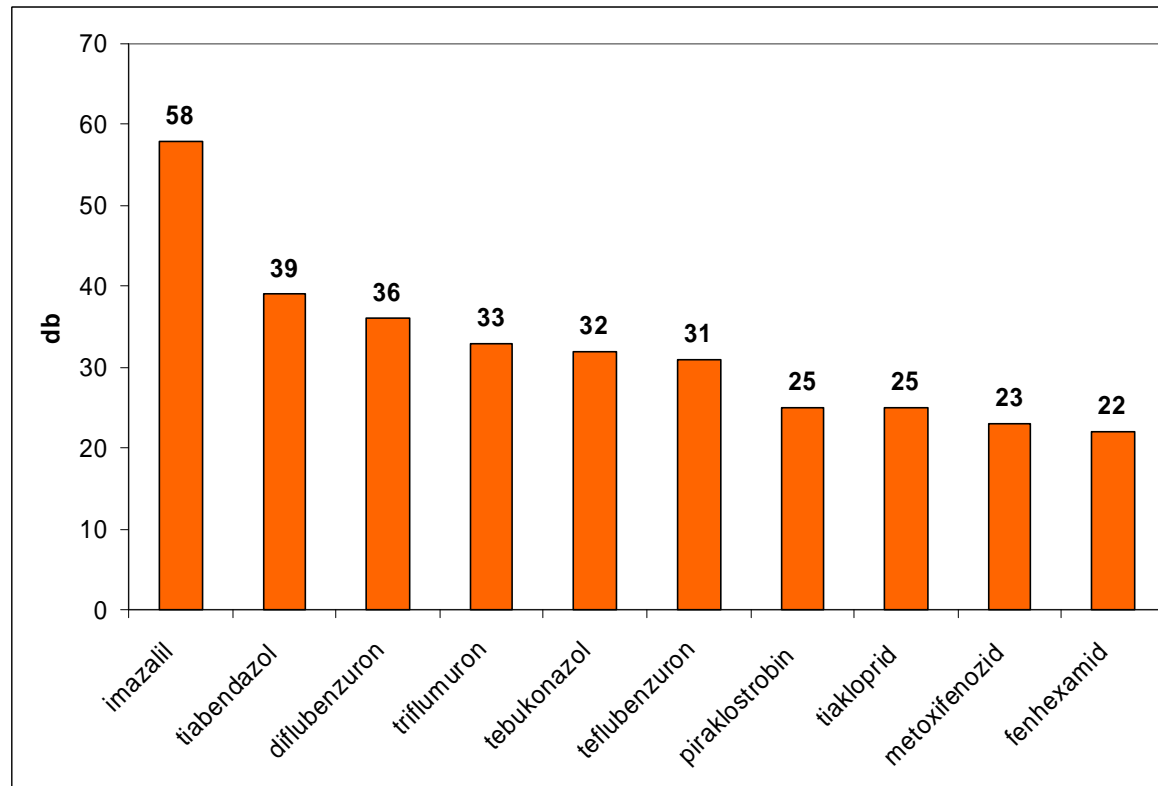


Pozitív minták megoszlása az elmúlt négy évben



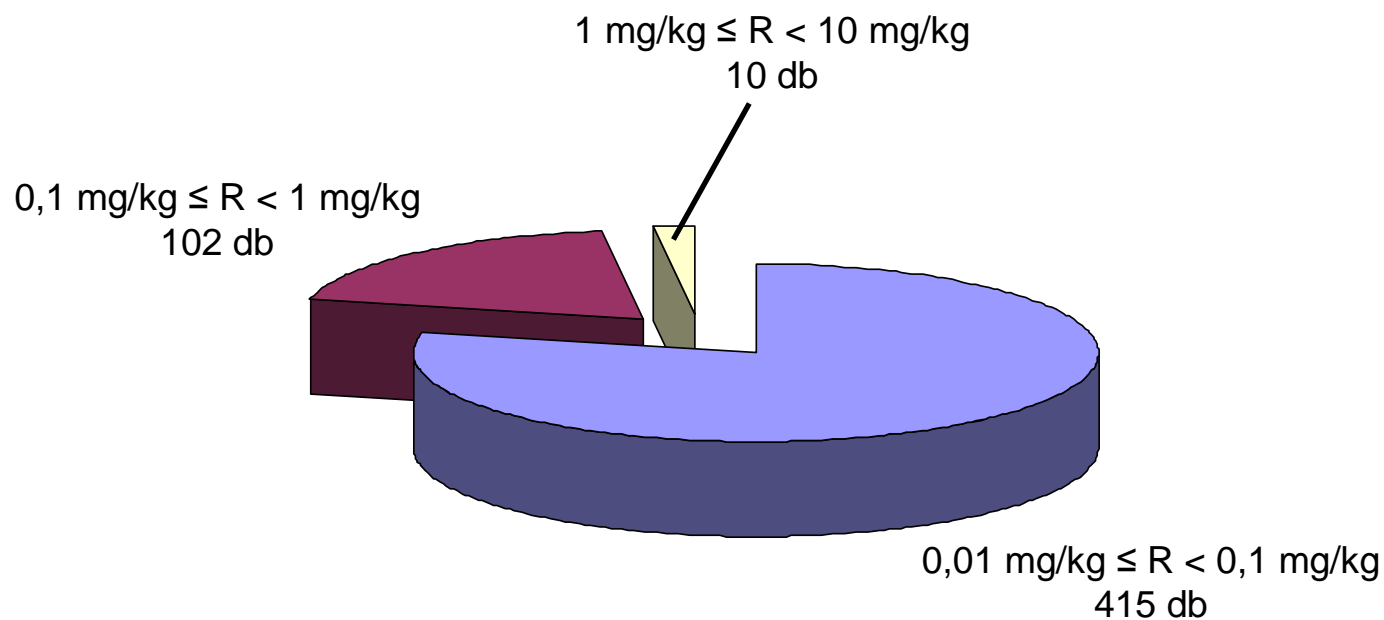
LC-MS/MS-sel leggyakrabban detektált hatóanyagok

512 vizsgált mintából 288 pozitív minta



LC-MS/MS-sel detektált hatóanyagok koncentrációeloszlása

512 vizsgált mintából 288 pozitív minta



Köszönöm a figyelmet!