

DIPLOMAMUNKA

Ivacs Vince

Ivacs Vince

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

**POSZTHARVESZT FUNGICIDEK KIOLDÓDÁSÁNAK
VIZSGÁLATA ITALOKBAN ÉS LEVEKBEN**

Ivacs Vince

Budapest

2023

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
2. CÉLKITŰZÉSEK	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. Peszticid szermaradék élelmiszerekben	5
3.2. Növényvédőszer-maradékok meghatározására használt mintaelőkészítő módszerek.....	6
3.3. Alternatív mintaelőkészítések peszticiddal szennyezett élelmiszerekre	7
3.4. Növényvédőszer-maradék meghatározásnál alkalmazott műszeres analitikai megoldások	8
3.5. Citrom, mint élelmiszer.....	11
3.6. Citromnál használt posztharveszt fungicidek bemutatása.....	12
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	16
4.1. Felhasznált anyagok és eszközök.....	16
4.2. pH-mérés	17
4.3. Eluens készítése.....	18
4.4. Mintaelőkészítés.....	19
4.4.1. Citrom minták vizsgálata, szermaradék szempontjából homogén mintatömeg előállítása.....	19
4.4.2. Fungicidek vizsgálata különböző italokból/levekből, citromos ízesítést követően	21
4.5. Munkaoldatok elkészítése	24
4.6. Mintaelőkészítési módszer megválasztása a kezelt italok esetén, a módszer részleges validálása.....	25
5. EREDMÉNYEK	29
5.1. Homogenitás vizsgálat	29
5.2. Optimális extrakciós módszer kiválasztása a kezelt italok esetén, a módszer részleges validálása.....	30
5.3. Imazalil és tiabendazol koncentrációinak meghatározása különböző élelmiszer-mátrixokban	33
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	39
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	41

1. BEVEZETÉS

Az élelmiszer előállítók próbálnak megfelelni a fogyasztói igényeknek. Az emberek számára fontos, hogy a megvásárolt termék friss és egészséges, jó minőségű legyen. Minőség alatt nem csupán a termék érzékszervi tulajdonságait értjük, ide tartozik az is, hogy mennyire biztonságos az. Friss gyümölcsök és zöldségek betakarítást követően sok külső hatásnak vannak kitéve. Fontos az állandó hőmérsékleten tartás, az ütdésektől való távoltartás és a mikrobiológiai veszélyek elleni védekezés. Az Európai Unióban, így Magyarországon is rendkívül elterjedt különböző növényvédő szerek használata. A kemikáliák alkalmazásának célja a termelés növelése és a biztonságos termés előállítása. A peszticidekben lévő hatóanyagok azonban az emberi egészségre károsak, vannak köztük karcinogén, teratogén és mutagén vegyületek is. Ezért az EU szigorúan szabályozza ezen szerek használatát és határértékhez (MRL) köti az alkalmazásukat. Egy gyümölcs útja termőföldtől az asztalig igen hosszadalmas főleg, ha azt a gyümölcsöt több ezer kilométerről szállítják. A termelő előállítja, a kereskedő forgalomba hozza, végül a fogyasztó megvásárolja. Mindhárom személynek meg van a maga felelőssége, de a hatósági ellenőrzések kizárólag a termelőt és a forgalmazót terhelheti. Citrom esetén a forgalmazónak kötelező feltüntetni a gyümölcs címkéjén, hogy milyen hatóanyaggal volt kezelve. Ennek a szabályozásnak a célja, hogy a problémát megelőzve, kellő tájékoztatást kapjon a vevő a veszélyről. Azt azonban, hogy a vevő miként használja fel a gyümölcsöt, kizárólag személyes felelősségén múlik. Bevet szokás, hogy alkoholos koktélok és italokat, valamint üdítőitalokat citromkarikákkal/darabkákkal ízesítik. Sokan megfélekednek arról, hogy a gyümölcs héján emberi egészségre ártalmas vegyületek vannak, melyek az italokban a gyümölcstről kioldódnak, végül bekerülnek szervezetünkbe. A fogyasztás gyakoriságának növekedésével pedig nő a megbetegedés kockázata is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Egy molekula kioldódását fiziko-kémiai tulajdonságai mellett az oldódás körülményei befolyásolják, mint pl. a hőmérséklet, az oldószer minősége vagy a pH. A citrom héján lévő karcinogén fungicideket sokszor figyelmen kívül hagyják a fogyasztók. Munkám során négy olyan italban vizsgáltam két, citromnál használt posztharvest fungicid (imazalil, tiabendazol) kioldódását, mely italokat gyakran fogyasztjuk citromos ízesítéssel. Méréseim folyamán arra is kerestem magyarázatot, hogy mi annak az oka, hogy egyik vagy másik italban jobban vagy rosszabbul oldódik ki az adott hatóanyag.

Célom volt továbbá, hogy a vizsgálathoz olyan analitikai módszert fejlesszek, mely rövid, gyors, egyszerű és olcsó.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Peszticid szermaradék élelmiszerekben

Történelem során az elegendő mennyiségű termény előállítása sok esetben nehézségeket okozott a gazdáknak különböző kártevők miatt, melyek a növényeken betegségeket indukáltak. Ma már tudjuk, hogy ezen kártevők ellen hatásosan leginkább peszticidekkel tudunk védekezni. A XIX. század közepén Franciaországban tombolt a filoxéra járvány, mely az akkori szőlőállomány jelentős részét elpusztította. A járvány ellen kifejlesztették a korai bordói levet, amelyhez már akkor is réz-szulfátot és kalcium-oxidot használtak fel. A XX. században egyre több peszticidet kezdtek el alkalmazni, voltak köztük arzén és kéntartalmúak, valamint voltak szervesek is, amelyek klórt és foszfort tartalmaztak. A legismertebbek közt említhetjük a DDT-t, a malationt, a dimetoátot vagy a fentiont. Ezek a szerek rendkívül hatásosak voltak a kártevők ellen, azonban az 1960-as évekre felismerték a környezetre való káros hatásukat is, ami miatt az 1980-as években már többet betiltottak és komoly szabályozásokat hoztak (Graham, 2018). Ma, az Európai Unióban, így Magyarországon is két jogszabály foglalkozik a növényvédő szerekkel a 1107/2009/EK és a 396/2005/EK rendelet. A 396/2005/EK rendelet az Unióban használt növényvédő szerek határértékeivel foglalkozik, annak szabályozásával és megállapításával. Ezt a határértéket MRL-nek (maximum residue level) nevezik, definíció szerint: „az élelmiszerben vagy takarmányban, illetve azok felületén előforduló növényvédő szer maradék koncentrációs szintjének engedélyezett felső értéke, amelyet e rendeletnek megfelelően állapítanak meg, és amely a helyes mezőgazdasági gyakorlaton, valamint a veszélyeztetett fogyasztók védelméhez szükséges legalacsonyabb fogyasztói expozíción alapul”. A rendelet az élelmiszerekben és takarmányokban található növényvédő szer maradékok ellenőrzése érdekében állapítja meg az MRL-t, ezért e maradékok ellenőrzése érdekében a tagállamok nemzeti programot állítanak össze. A nemzeti ellenőrző programok eredményeit el kell küldeni a Bizottság, a Hatóság és a többi tagállam részére, és bele kell foglalni az Unió éves jelentésébe (Internet 14.). Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) minden évben a tagállamoktól beérkezett adatok alapján egy jelentést készít az európai piacon lévő élelmiszerek növényvédő szer maradványairól. 2019-ben összesen 96 302 elemzett minta 96,1%-a maximális maradékanyag szint (MRL) alá esett, 3,9%-a meghaladta ezt a szintet, és ebből 2,3% volt nem megfelelő, azaz a mérési bizonytalanság figyelembevételével az MRL-t meghaladó minta. Szakemberek felmérték, hogy a vizsgált élelmiszerekben lévő szermaradvány mennyisége okozhat-e komolyabb megbetegedést, abban az esetben, ha az

étrendi szokásoknak megfelelően fogyasztják azokat. Az eredmények azt mutatják, hogy a termékek szermaradvány szintjei valószínűleg nem jelentenek aggodalmat a fogyasztók egészségére nézve. A 2021-ben publikált jelentésben megtalálhatóak külön élelmiszerekre és peszticidekre bontva a mért eredmények kiértékelései. Ezekből kiderül, hogy a legalább 50 elemzett mintával rendelkező feldolgozatlan termékek közül a legmagasabb (35%-nál nagyobb) MRL túllépési arányt a szőlőlevélnél mérték, de 30%-nál nagyobb túllépési arány látható a spárgababnál és a korianderlevélnél is. Citrom esetében a megvizsgált minták csupán 6%-nál mutattak ki a megengedett MRL értéknél nagyobb növényvédő szer mennyiséget. Fontos még megjegyezni, hogy az EU-n kívüli országokból behozott egyes növényi eredetű termékek esetében is kiemelten figyelnek a megfelelő MRL értékekre, amiket a rendszeres mérésekkel biztosítanak. Citromot többek között Törökországból, Afrikából és Dél-Amerikából importálnak az EU-ba. 2019-ben a Törökországból behozott, EFSA által bevizsgált 988 citrom mintából csupán 82 esetben találták a megengedett növényvédő szer maradvány mennyiségnél nagyobbat (Authority, 2019). A határértékek megállapításánál érdemes törekedni arra, hogy a konkrét hatóanyag egészségügyi kockázatának felmérése mellett figyelembe vegyünk azt is, hogy társadalmi szinten különböző mértékben vannak tisztában a fogyasztók a szerek veszélyével. Emiatt hangsúlyozni érdemes a megfelelő módon történő elfogyasztását az adott élelmiszernek. Citrom esetében például a gyümölcs héja az, ami leginkább szennyezett, ezért fontos feltüntetni a címkéken, hogy a gyümölcs mely része van kezelve, ezzel megelőzve a problémákat (Internet 14.). Mindenki által ismert szokásként említhetjük a citrusfélék héjának süteménybe reszelését, vagy a citrom-szeletek használatát üdítő italok ízesítésére. Amennyiben a peszticidek megjelennek a héjban, számíthatunk arra, hogy a fogyasztó szermaradékokat fogyaszt az élelmiszerrel együtt.

3.2. Növényvédőszer-maradékok meghatározására használt mintaelőkészítő módszerek

Az elmúlt évtizedek során a műszeres analitika rendkívül gyors ütemben fejlődött és fejlődik mind a mai napig. A technológiai előrelépés a növényvédő szer hatóanyagok élelmiszerekből történő kimutatásában sem maradt el. Élelmiszerekből történő mérések során kulcsszerepe van a megfelelő mintaelőkészítésnek. Az analit megtisztítása különböző mátrixoktól jellemzően extrakciós technikákkal történik. 1993-ban egy új módszert dolgoztak ki gyümölcs és zöldség minták tisztítására, melybe beiktattak szilárd-folyadék fázisú extrakciós (SPE) lépéseket elválasztás előtt és után. A módszert alkalmazták GC/MS,

GC/ECD és GC/NPD analitikai technikákra is. Az SPE újszerű alkalmazása nagy népszerűségnek örvendett köszönhetően annak, hogy a kimutatási határok csökkentek ennek hatására. A mintaelőkészítés azonban akár másfél napig is eltarthatott és emellett jelentős vegyszer, valamint eszközigény jellemezte (Internet 10.).

2003-ban egy új mintaelőkészítési módszert vezettek be, mely a QuEChERS névre hallgat, ami egy anagramma a quick (gyors), easy (egyszerű), cheap (olcsó), effective (hatékony), rugged (robosztus) és safe (biztonságos) szavakból tevődik össze. Az eljárás 10 g, előzetesen homogenizált minta, kezdeti egyfázisú extrakcióját jelenti 10 ml acetonitrillel, 4 g vízmentes MgSO_4 és 1 g NaCl hozzáadásával. Intenzív rázogatós, majd centrifugálás után, a felülúszó acetonitriles fázist tovább tisztítják. 1 ml felülúszóhoz hozzáadnak egy szorbens keveréket, amelyben 150 mg vízmentes MgSO_4 -ot és 25 mg primer szekunder amint (PSA) használnak fel. A PSA megköti a zavaró mátrix-komponenseket, mint a szerves savakat, poláros pigmenteket vagy cukrokat az élelmiszerből. Rázogatós és centrifugálás után megkapjuk a megtisztított mintát, melyet ezt követően analízisnek vetnek alá (Anastassiades et al., 2003). Fontos kiemelni, hogy a szabvány lehetőséget ad a szorbensek kiválasztására mintatípustól függően (Internet 12.). Így például a nagy klorofill-tartalmú saláta minta esetében grafitalizált karbon szorbens használatát írja elő. A QuEChERS mintaelőkészítés újabb változata is elterjedt, melyet citrát-pufferelt QuEChERS-nek hívunk. Ez esetben a kisózás citrát-pufferelt közegben zajlik, mely a gyenge savas karakterű – főleg herbicid – vegyületek kinyerését támogatja (Rejczak és Tuzimski, 2015).

3.3. Alternatív mintaelőkészítések peszticiddel szennyezett élelmiszerekre

Nem csak a QuEChERS alkalmas arra, hogy megfelelően előkészített mintát kapjunk a műszeres mérésre, vannak más alternatív megoldások is. Élelmiszerek mintaelőkészítésénél a következő lehetőségek ismertek: LPME (folyadék fázisú mikroextrakció), LLE (folyadék-folyadék extrakció), SPME (szilárd fázisú mikroextrakció), MSPD (mátrix szilárd fázisú diszperzió), SDME (egy cseppes mikroextrakció) (Pelegrín et al., 2020). 50 peszticid kimutatására alkalmas módszer során mintaelőkészítésnél folyadék fázisú mikroextrakciót használtak és UHPLC-MS/MS technikával analizálták a komponenseket. Szerves oldószerrel extrahálták az analitot a mintából, a keverési időt és az oldószer típusát optimalizálták, majd metanollal deszorbeálták. A technika minimális mintakezelést és oldószerfogyasztást igényel, alacsony kimutatási határ érhető el, több alkoholos ital esetében is kipróbálták, a mátrix-hatás minimális volt (Bolanos et al., 2008). Vannak azonban minták, ahol nem feltétlen szükséges oldószereket felhasználni a tisztításra, hanem elég csupán egy

drasztikus hígítást alkalmazni és analizálni. Ez csak akkor kivitelezhető, ha a mátrixnak nincs akkora zavaró hatása, hogy a mérés során pontatlanságot okozzon. Ezt a mintaelőkészítési technikát „dilute and shoot” (továbbiakban: D&S) módszernek hívják, melynek nagy előnye, hogy költsége minimális és sokkal gyorsabb, mint bármely extrakciós megoldás. Fontos előnye még, hogy a tisztítás során fellépő analit-vesztés nem történhet meg. Ezt a technikát eleve folyadék élelmiszermintáknál alkalmazzák jellemzően. Bor minták elemzése során 185 peszticidet mutattak ki, a mintaelőkészítésnél centrifugálták, hígították, majd szűrték a mintát és injektálták fel a HPLC-MS/MS készülékre. A mátrixhatások az esetek többségében elfogadhatóak voltak, mind a peszticidek, mind a mikotoxinok esetében (Dias et al., 2019). A D&S mintaelőkészítés több ital vizsgálatánál is megfelelő volt. 13 gyümölcsle szermaradványainak meghatározása során, 53 peszticidet mutattak ki, az összesnél az MRL érték alatti volt az eredmény. Mátrixhatás kismértékű volt, sok időt és pénzt spóroltak meg ezzel, a hosszadalmas QuEChERS vagy más extrakciós technikákkal szemben (Ferrer et al., 2011).

3.4. Növényvédőszer-maradék meghatározásnál alkalmazott műszeres analitikai megoldások

Az 1970-es évektől bevezetett, peszticidek szigorú szabályozásával foglalkozó rendeletekkel párhuzamosan, egyre nagyobb figyelem szereződött az emberi egészségre káros hatóanyagok detektálására alkalmas technikák kifejlesztésével foglalkozó szakemberekre. 1980-as években több kutatás született GC-MS és LC-MS detektálásáról, azonban számítástechnikailag a műszerek nem voltak elég fejlettek ahhoz, hogy sokkomponenses módszert tudjanak vele fejleszteni. Az ezredforduló magasságában olyan technológiai fejlődésnek indult a műszeres analitika, hogy meghozta az áttörést növényvédőszer hatóanyagok elemzése terén is és ezzel kezdetét vette a modern peszticid analitika korszak. GC-MS és LC-MS kapcsolt analitikai módszerek a két leggyakrabban alkalmazott technika növényvédőszer maradékok meghatározására. Fontos megjegyezni, hogy a GC nem alkalmas általánosan minden peszticidre. Ennek oka, hogy kizárólag olyan molekulák vizsgálhatóak vele, amelyek hőre stabilak, vagyis nagy hőközlés ellenére sem bomlanak és emellett illékonyak is. Hőre bomlékony és/vagy nem illékony vegyületek mérésére az LC-hez kapcsolt technikák alkalmasak (Kmellár, 2011). A peszticidek ionizációja történhet elektronütközéses módszerrel (EI) és kémiai ionizációval (Alder et al., 2006). A Dempster által kifejlesztett elektronütközéses ionizációt kis molekula tömegű, illékony, hőstabil minták esetén alkalmazzák MS-sel kapcsolva. Az ionizáció a gázfázisú analit molekulák és

az izzószálból származó nagy energiájú elektronok áramának kölcsönhatása révén jön létre. Az EI általában egyszeresen töltött pozitív ionokat hoz létre, kétszeresen vagy háromszorosan töltött ionokat csak nagyon kis mennyiségben (Hocart, 2010). Az ionizációt követően a többletenergia a molekulaion fragmentálódását okozza, és számos fragmentiont eredményez, amelyek az adott ionizációs körülmények között csak az adott molekulára jellemzőek. Az ionforrás tartalmaz egy extrakciós lemezt és egy ionfókuszáló lemezt is, amelyek negatív potenciált hoznak létre, így vonzzák a pozitív töltésű ionokat és gyorsítják az MS felé (Smith, 2013). Elektronütközéses ionizáció előnyét többek között az adja, hogy a mintában lévő vegyületeket az elektronütközéses ionizációjuk által kialakult tömegspektrumok könyvtári keresésével egyértelműen lehet azonosítani. Azonban, GC-MS sztenderd EI-vel meghatározható vegyületek száma korlátozott, mivel a nagyméretű és hőlabilis molekulák nem elemezhetőek (Margolin et al., 2020). A kémiai ionizációs technikát (CI) ritkábban alkalmazzák. Egy reagens gáznak köszönhetően ionizáción esik át a célkomponens. Ilyen reagens gáz lehet az ammónia, a metán vagy az izobutén. A reagens gáz mennyisége jóval nagyobb, mint az analité ($10^4:1$) (Smith, 2013). Kezdetben a reagens gáz ionizálódik, és kémiai lépések sorozatán keresztül ionizálja a célkomponenst. Ez az ionizációs átvitel nagymértékben csökkenti a célkomponens által elnyelt energiát. A kisebb energiahatás miatt a CI-t gyakran „lágy ionizációnak” hívják, mivel az ionizáció után a célkomponens eredeti molekulatömege általában közel változatlan marad (Thomas, 2020). Pozitív vagy negatív CI-MS jobb szelektivitást biztosít számos peszticid esetében az EI-hez képest és a spektrumok általában intenzív protonált vagy negatív töltésű molekulákat és kevesebb fragmentumiont tartalmaznak, mint az EI-nél (Smith, 2013). Ionképzés utáni lépés a különböző tömegű ionok elválasztása m/z érték alapján a tömegspektrométerben. Legelterjedtebb analizátor az ún. kvadrupol (Internet 13.). Lényege, hogy a kvadrupolban lévő négy rúdra egyen- (DC) és váltóáramot (AC) kapcsolunk, aminek hatására az ionforrástól érkező ionok egy ún. oszcilláló mozgást kezdenek el végezni, így lesznek olyan ionok, melyek neki lökődnek a rudaknak, ezáltal elvesztik töltésüket és nem jutnak végig az analizátoron. Egy AC/DC értékhez egy olyan m/z értékű ion tartozik, amely képes végig haladni az analizátoron, így egy elég nagy szelektivitással rendelkező mérésnek tekinthető (Pokol, 2017). A kvadrupolt kétfajta üzemmódban lehet használni. Teljes pásztázási mód esetén az összes iont egy tömegtartományban rögzítik, ez ismeretlen analitok azonosításra, módszerfejlesztésre, valamint nagyobb koncentrációjú analitok minőségi és mennyiségi elemzésére alkalmas. SIM üzemmódban csak a célkomponens ionjait veszik fel, ami nyomelemzésre teszi alkalmassá, mivel így sokkal érzékenyebb (Internet 13.). Az

analizátorból érkező ion a detektorba ütközik. Kvadropolok esetén pontdetektort szoktak használni, ezen belül pedig leginkább elektronsokszorozót alkalmaznak. Ennek előnye, hogy nagyon kicsi áramok is mérhetők (Pokol, 2017).

Az LC-MS készülékekben a vizsgált molekulákat elválasztjuk egymástól, valamilyen ionforrás segítségével ionná alakítjuk, a tömeganalizátorban elemezzük és a legvégén pedig detektáljuk őket. A GC-nél alkalmazott EI és CI ionizáció a mobilfázis folyadék volta miatt nem alkalmazhatóak, ezért lágy ionizációs technikát használnak ionforrásként az LC-MS készülékekhez (Kmellár, 2011). Ha peszticidek tulajdonságai miatt nem mérhetőek GC-vel, az LC alkalmazása a legjobb alternatíva. Az LC is kombinálható egyszeri kvadropollal, tripla kvadropollal vagy TOF analizátorral (Alder et al., 2006). Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás készülék tripla kvadropol analizátorhoz kapcsolva széles körben elterjedt modern technika, amely a peszticidek széles skáláját tudja kvantitatíve mérni. Ennek oka, hogy nagy érzékenysége, szelektivitása és pontossága biztosítja a megbízható adatok szolgáltatását összetett élelmiszer mátrixok esetében is (Internet 10.). Analitikai vizsgálatok esetén kulcskérdés az elemzés időszükséglete. Ultranagy hatékonyságú kromatográfia megjelenésével az elemzési idő rövidült. Ennek oka, hogy UHPLC kolonnák esetén a HPLC kolonnákhoz képest jóval nagyobb nyomás van jelen (1000-1500 bar), ami kisebb szemcseátmérőjű töltet használatát teszi lehetővé (2 μ m) mindez pedig gyorsabb elválasztást eredményez. A nagyobb nyomás több mindent képes azonban befolyásolni. Bevitelt energia hővé alakul, ami eredményeként kereszt- és hosszirányú hőmérséklet gradiens alakul ki, ezért kritikus az oszlop állandó hőmérsékleten történő tartása, de megfelelő termosztáttal orvosolni lehet ezt a problémát. Hatással van továbbá a mozgó fázis viszkozitására és fajlagos térfogatára (Kormány és Fekete, 2019). Legfontosabb előnyei tehát a jobb elválasztás, ami a kisebb pórusméretből következik, kisebb mértékű csúcshőszélesedés és a gyorsabb kromatográfia, ami pedig a nagyobb áramlási sebességnek köszönhető. Hátránya, hogy drágább és a nagy nyomás miatt az amortizáció kockázatával is számolni kell (Dong et al., 2017). Az atmoszférikus nyomású lágy ionizációs technikákon (API) belül három típust különböztetünk meg: atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs (APCI), elektroszpré ionizációs (ESI) és atmoszférikus nyomású foto ionizáció (APPI) (Kmellár, 2011). Peszticid analitikában a leggyakrabban használt ionizációs technika az ESI (Alder et al., 2006). Az elektroszpré ionizáció rendkívül finom technika, azonban hátránya, hogy erősen mátrix-érzékeny. Az ESI-ben létrehozott permetből származó oldószercseppek elpárolognak, ionokká képződnek és így jutnak a tömegspektrométerbe elemzésre. Egyes

ESI forrásokban hőt használnak a deszolválás hatékonyságának növelésére (Clarke, 2017). A mátrixban lévő összetevők az analit választ felerősítik vagy visszaszorítják, ezzel nehézséget okozva a pontos analit mennyiség megállapításában (Niessen et al., 2006). HPLC-ESI-MS esetén sokféleképpen védekezhetünk a jelsuppressziós hatások ellen. Egyik lehetséges megoldás, hogy a mintaelőkészítés során jelentősen megtisztítjuk a mintát olyan szelektív extrakciós lépéssel, mellyel a mátrixot nagy százalékban le tudjuk választani az analitról. Azonban ez növeli a mérés idejét, valamint túlzott tisztítás esetén az analit kimosásának kockázatával is számolni kell. A minta hígításával csökkentjük a bevitt minta mennyiségét, ami miatt a mátrixhatást is visszaszorítjuk, de így a mérés érzékenységét is gyengítjük. Ha az előbb felsorolt módszerek nem elegendőek a mátrixhatás kiküszöböléséhez, olyan kalibrációs technikát kell alkalmazni, amely azt ellensúlyozni képes. Számos ilyen megoldás született már pl. az izotóp-jelzett sztenderd használata, azonban ezek rendkívül drágák és nehezen beszerezhetőek. Egyik legújabb módszer az ún. árnyékcúcs-technika (echo peak). A mintát és a sztenderd oldatot egymás után injektálják kis időkülönbséggel. A mintából és a sztenderből származó analit egymáshoz közel eluálódnak, így a két csúcs retenciós idejének kis különbsége miatt a mátrixhatás elhanyagolható. Azonban ez nagyon jól elválasztható analitokat igényel. Leghatékonyabb módja a módszer helyességét és pontosságát befolyásoló mátrixhatás kivédésének a sztenderd addíció alkalmazása (Stüber és Reemtsma, 2004). „Ha a válaszjel a koncentrációval (mennyiséggel) – vagy annak valamely ismert függvényével – egyenesen arányos, az összefüggés a mérendő komponens ismert mennyiségének hozzáadásával határozható meg” (Pokol, 2017). Sztenderd addícióval kitűnően lehet kompenzálni a mátrixhatást, erre számos példa van (Kowal et al., 2013; Zarebska et al., 2022; Mahmoud et al., 2019). Hasonlóan bevált módszer a mátrix-illesztett kalibráció. A meghatározni kívánt analit mátrixából kell extrakciót végezni, ami a cél peszticidek szempontjából vak, majd az extraktumhoz sztenderd keverék oldatot kell adagolni olyan koncentrációban, mely reprezentálja a kalibrációs sort. Az így felvett kalibrációs egyenes és a minta összemérésekor a mátrixhatás már teljesen ki van küszöbölve. Eerre is számos példa van peszticid analitika területén (Poole, 2007; Rimayi et al., 2015; Fu et al., 2022; Kruve és Leito, 2013; Zhao et al., 2013).

3.5. Citrom, mint élelmiszer

A citrom (*Citrus limon*) sárga vagy halványsárga, 5-10 maggal rendelkező gyümölcs, amely kedvező érzékszervi és kémiai tulajdonságai miatt sokféleképpen felhasználható. A

gyümölcs levét magas savtartalma és fanyar íze miatt gyakran alkalmazzák élelmiszer összetevőként (Goodrich, 2003). A világ fő citrom termelői között említhetjük USA-t, Olaszországot, Törökországot, Izraelt, Spanyolországot, Görögországot és Indiát (Internet 9.). Azonban Argentína termeszt a legtöbb citromot, évente 1,2 millió tonnát (Sania et al., 2020). A citromban és a gyümölcs levében megtalálható bioaktív anyagok közül a legfontosabb csoport a flavonoidok. Gyümölcsben és a gyümöcslében megtalálható másik fontos vegyületcsoport a fenolsavak. A citrom számos makroelemet is tartalmaz többek között kalciumot, magnéziumot, foszfort, káliumot és nátriumot. A gyümölcsben található illóolajok fő összetevői a monoterpének. Közülük a legnagyobb mennyiségben a következők találhatóak meg: a limoném (69,9%) és a β -piném (11,2%). Sokoldalúságának köszönhetően több összetevőjét az élelmiszeripar is felhasználja. Limonádék és üdítőitalok ízesítésére használják leginkább, de kitűnő tartósítószer is savtartalma miatt. Elsősorban friss gyümölcsként fogyasztják, de feldolgozzák gyümölcslevek és lekvárok elkészítésére is (Klimek-Szczykutowicz et al., 2020). Számos pozitív tulajdonsággal rendelkezik az emberi szervezet számára. Több vitamint (niacin, riboflavin, tiamin, kolin, pantoténsav, C-vitamin, B6-vitamin) tartalmaz (Internet 9.). Citrusfélék és azokból készült levek kitűnő antioxidáns források, a gyümölcsben lévő aszkorbinsav, flavonoidok és fenolos vegyületek miatt (Sania et al., 2020).

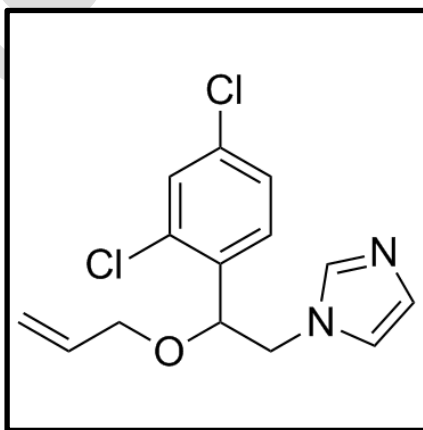
3.6. Citromnál használt posztharveszt fungicidek bemutatása

Magyarországi éghajlati viszonyok nem teszik lehetővé a citrom termesztését, ezért külföldről vagyunk kénytelenek importálni. A gyümölcs útja akár több ezer kilométer is lehet, hiszen kapható Dél-Afrikából, Dél-Amerikából vagy Spanyolországból behozott áru.

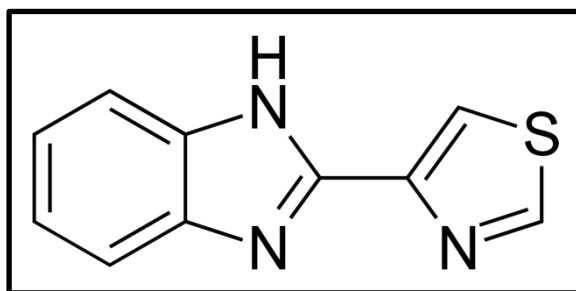
Értékesítés szempontjából kulcskérdés, hogy a hosszú szállítás során, hogyan tudja biztosítani a gyártó a gyümölcsök frissességét. Ma már bevett szokás a posztharveszt fungicidek használata, melyek citrom esetén általában az imazalil és a tiabendazol hatóanyagok. Betakarítás után számos megbetegedés alakulhat ki a gyümölcsök felületén, melyekért alapvetően három gombafaj felelős: a *Penicillium digitatum*, a *Penicillium italicum* és a *Geotrichum citri-aurantii*. Két legjellemzőbb posztharveszt megbetegedés a zöld és a kék penész, előbbi a *P. digitatum*, míg utóbbit a *P. italicum* okozza. *Geotrichum citri-aurantii* a gyümölcs felületén lévő sérüléseken keresztül fertőzi meg azt, melynek a hosszú tárolás igencsak kedvez. Az így kialakult betegséget savanyú rothadásnak hívják, ami a *Pencillium* fajok által közvetített fertőzések után a második leggyakoribb. Betakarítás után 24 órán belül merítéses vagy permetezős technikával viszik fel a fungicideket a citrom

felületére. Az imazalil és a tiabendazol hatékony a *Penicillium* fajok ellen azonban nem képes megelőzni a savanyú rothadást, ezért klórt is alkalmaznak. Ilyenkor megfelelő pH és hőmérséklet viszonyok mellett tudják maximalizálni a fungicidek hatását, melyeket rendkívül magas (1000 ppm) koncentrációjú oldat formájában használják (Ismail és Zhang, 2004; Internet 6.). Minden peszticidet, így az imazalilt és a tiabendazolt is az EU különböző időközönként felülvizsgálja, valamint megállapít egy MRL értéket. Jelenleg az imazalil 2024-ig, míg a tiabendazol 2032-ig van engedélyeztetve. A megállapított határérték előbbi esetén 5 ppm, utóbbinál 7 ppm citromra (Internet 7.). A fogyasztók érdekében az Európai Unió rendelettel szabályozza különböző élelmiszerek címkéjén feltüntetendő információkat. A rendelet értelmében a címkén világosan és érthetően kell feltüntetni az egészségre káros összetevőket, így citrom esetén a használt fungicideket (Internet 11.).

A citromot leginkább frissen használják fel italok ízesítésére. Ilyenkor a héj felületén lévő hatóanyagok kioldódhatnak és átkerülhetnek a folyadék fázisba, amelyet elfogyasztunk. Az, hogy a felületről százalékosan mennyi hatóanyag oldódik ki, több tényezőtől függ. Az ital összetételétől (egy vagy többkomponensű, oldatról vagy emulzióról beszélünk stb.), a folyadék pH-tól (az adott hatóanyag milyen mikrospeciesz formájában van jelen), a hőmérséklettől (magasabb hőmérsékleten segíti az oldódást), keveréstől (intenzívebb keverés szintén fokozza az extrakciót). További fontos befolyásoló tényező a két fungicid fiziko-kémiai tulajdonságai, melyek között ugyan vannak hasonlóságok, de jelentős eltérést is találunk.



1. ábra Imazalil molekulaszervezete (Internet 1.)



2. ábra Tiabendazol molekulaszervezete (Internet 2.)

1. táblázat Fungicidek összehasonlítása tulajdonságaik alapján (Internet 3., 4., 5., 8.)

	Imazalil	Tiabendazol
Összegképlet	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	C ₁₀ H ₇ N ₃ S
Oldhatóság vízben (g/l)	0,184	0,030
Oldhatóság etanolban (g/l)	500<	7,9
Oldhatóság metanolban (g/l)	500<	9,3
Max oldhatóság vízben pH=5 (g/l)	0,95	0,16
Max oldhatóság vízben pH=7 (g/l)	0,22	0,03
Max oldhatóság vízben pH=9 (g/l)	0,18	0,03
Gőznyomás (mPa)	0,1580	0,0005
logP	2,56	2,39
Stabilitás	stabil, hidrolízisre nem alkalmas	stabil, hidrolízisre nem alkalmas
pK _a	6,49	4,73

A vegyületek fiziko-kémiai megítélésénél kulcskérdés a vízdékonyság, mely alapvetően meghatározza a vízbázisú italokba való kioldódást. Az imazalil egy imidazol szerkezetű vegyület, mely a peszticidek között közepes vízdékonysággal jellemezhető. Szerves oldószerekben – mint az alkoholok – jobban oldódik. Gőznyomása a tiabendazolhoz képest három nagyságrenddel kisebb, nem illékony. Mindkét vegyület gyenge bázisnak számít, emiatt a pH csökkenésével egyre inkább protonált formában vannak jelen, ami növeli az oldhatóságot.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált anyagok és eszközök

A vizsgálatokhoz használt MS tisztaságú ionmentes víz előállítása Millipore Milli-Q készülékkel történt. Az eluens elkészítéséhez felhasznált UHPLC tisztaságú metanolt, trinátrium-citrátot és nátrium-kloridot VWR szállította, a hangyasav és a PSA a Sigma-Aldrich-tól került megrendelésre. A minták szűréséhez felhasznált fecskendőket és szűrőbetéteket a Labex Ltd. szállította. A mintaelőkészítésnél felhasznált magnézium-szulfátot és dinátrium-hidrogén-citrátot a Thermo Fischer gyártotta. A sztenderd mix oldathoz felhasznált imazalil és tiabendazol sztenderdeket szintén a Sigma-Aldrich-tól volt rendelve.

A növényvédő szerek kimutatáshoz és a módszer részleges validáláshoz Agilent Ultivo típusú UHPLC-QqQ-MS/MS készüléket használtam. A készülékhez tartozó Agilent MassHunter nevű szoftverrel végeztem a program megírását és az eredmények kiértékelését. A vizsgált fungicidek tömegátmeneteit az 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat Hatóanyagok tömegátmenetei

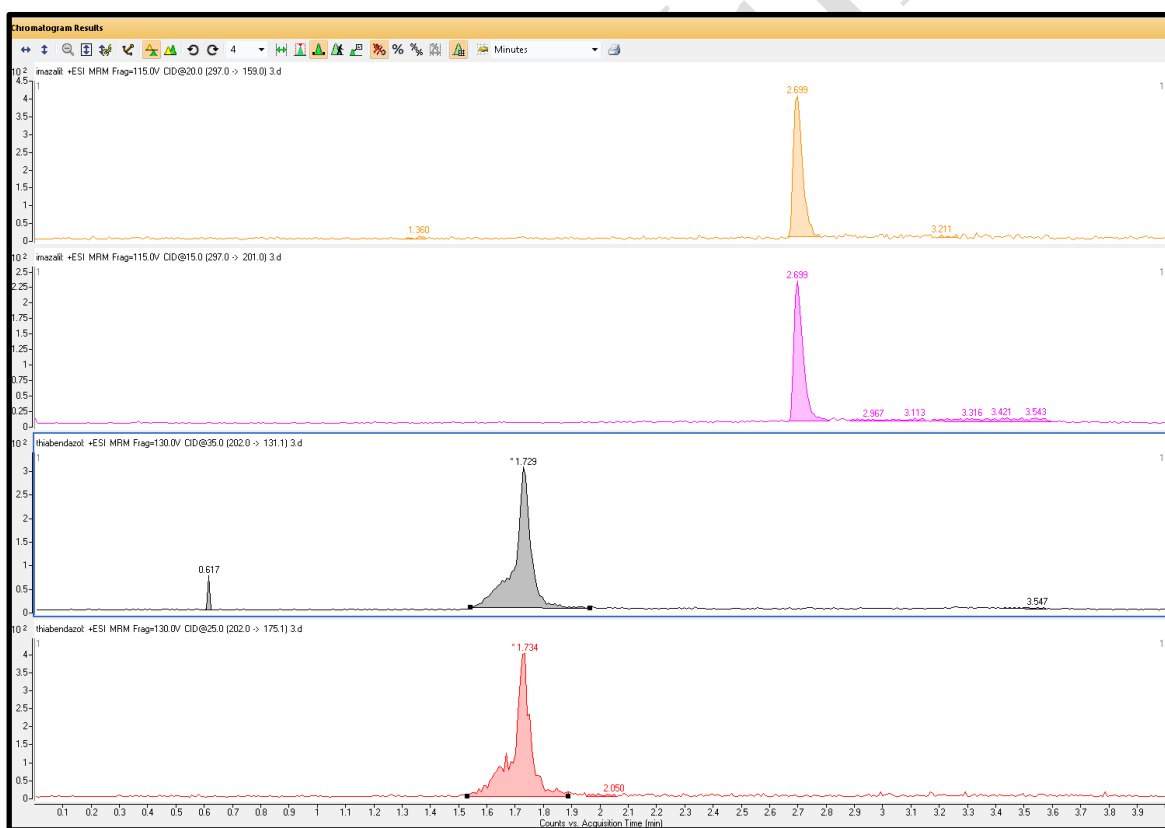
Hatóanyag	Anyai ion tömege (m/z)	Fragment ion 1 (m/z)	Fragment ion 2 (m/z)
Imazalil	297	201	159
Tiabendazol	202	175	131

Az elválasztáshoz Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 1,8 μ m 2,1x50 mm fordított fázisú kromatográfiás oszlopot használtam, amelyet 40 °C hőmérsékleten alkalmaztam. Az injektálási térfogatot 3 μ l-re állítottam be. Az ionizációnál alkalmazott gáz hőmérséklete 300 °C, térfogatárama 12 l/perc volt. A mérésekhez a következő gradiens programot alkalmaztam.

3. táblázat Gradiens program

Idő (perc)	„A” eluens aránya (%)	„B” eluens aránya (%)	Térfogatáram (ml/perc)	Max. nyomás (bar)
0.00	95.00	5.00	0.400	1200.00
1.80	50.00	50.00	0.400	1200.00
3.00	0.00	100.00	0.400	1200.00
3.10	95.00	5.00	0.400	1200.00
4.00	95.00	5.00	0.400	1200.00

Az alkalmazott gradiens program megfelelőnek bizonyult, torzulásmentes csúcsokat eredményezett (3. ábra).



3. ábra Második kalibrációs pontban vizsgált hatóanyagok kromatogramja külső kalibráció esetén

4.2. pH-mérés

A folyadékok pH-ját egy HANNA Instruments által gyártott készülékkel mértem meg. Először pH=4-es, majd pH=7-es pufferrel kalibráltam a készüléket és megmértem a kóla, a sör és a salátalé pH-ját. A pH kizárólag vizes közegben értelmezhető, ezért a gabonapárlat,

mely egy etanol – víz elegy mérése kihívásokat állított a mérés elé. A fent említett két pufferrel és vízmentes etanollal elkészítettem a kalibrációhoz szükséges etanolos puffereket. 10 ml-es mérőlombikba automata pipetta segítségével kimértem 3,75 ml vízmentes etanolt, majd az adott pufferrel jelre állítottam. Miután a 4-es és 7-es pH-jú pufferre is kalibráltam a készüléket megmértem a gabonapárlat pH-ját.

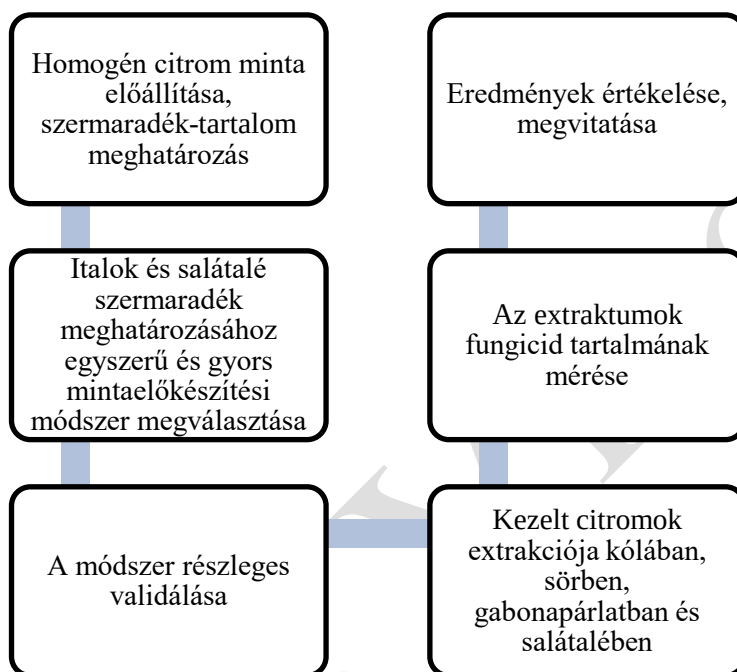
4.3. Eluens készítése

„A” eluens elkészítéséhez 200 ml-es mérőlombikba kimértem nagyjából 150 ml MS tisztaságú ioncserélt vizet. Automata pipetta segítségével hozzáadtam 200 μ l tömény hangyasavat, végül jelre állítottam.

„B” eluens elkészítéséhez UHPLC tisztaságú metanolt használtam fel. A metanolból szintén nagyjából 150 ml-t mértem ki egy 200 ml-es mérőlombikba, majd hozzáadtam automata pipetta segítségével 200 μ l tömény hangyasavat, végül jelre állítottam.

4.4. Mintaelőkészítés

Ahhoz, hogy a gyümölcsben található fungicidek pontos koncentrációját megállapítsuk több lépéses mintaelőkészítés szükséges. A mérés után már ismerjük a citromok hatóanyag tartalmát, így az italokban való kioldódás után képet kapunk arról is, hogy az eredetileg a citromban lévő szerek mekkora százalékban képesek az italokba jutni. A következő folyamatábrán bemutatom, milyen műveleti lépések követték egymást méréseim során.



4. ábra Mérések folyamatábrája

4.4.1. Citrom minták vizsgálata, szermaradék szempontjából homogén mintatömeg előállítása

A citromok esetében a posztharveszt fungicideket merítéses vagy permetezős technikával viszik fel a gyümölcs héjára. Az azonban, hogy mennyire homogén a hatóanyagok eloszlása a kezelendő felületen, már kérdéses. A későbbi mérések miatt fontos volt megállapítani a hatóanyag-eloszlás homogenitását, illetve fontos volt számomra egy homogén mintatömeg előállítása annak érdekében, hogy pontos következtetéseket vonjak le a későbbiekben, a kioldódással kapcsolatban. 4 kg citromot egy tiszta, konyhai kés segítségével nagyjából 1 cm-es kockákra aprítottam. Figyeltem arra, hogy a kockák azonos mennyiségben (felszínnel) tartalmazzanak citromhéjat. A leaprított citrom darabokat tálcára egymás mellé helyezve lefagyasztottam, ezáltal a kockák könnyen elválaszthatóak lettek egymástól. Másnap a citrom darabokat alaposan, 20 percig homogenizáltam. Ezt egy nagyobb méretű steril, műanyag vödörben végeztem állandó forgatással. Az így előállított mintatömeget a mérések

között folyamatosan mélyhűtőben tároltam, hogy a fungicid molekulák ne induljanak bomlásnak. A homogenizált citrom mintákból 10 párhuzamos méréssel meghatároztam az imazalil és tiabendazol koncentrációkat mg/kg nedves tömeg egységben. Ehhez kimértem 10x100 g citromot táramérlegen, melyeket konyhai aprítóval homogénre daráltam. Ezt követően mindegyik párhuzamosból 10,0-10,0 g-ot kimértem, melyeket citrát-pufferelt szabványos QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) módszer alapján készítettem elő (MSZ EN 15662; 2018). A mintákhoz adtam 100 µl 50 µg/ml koncentrációjú trifenil-foszfátot (TPP), 10,0 ml acetonitrilt, valamint 0,6 ml 5 mol/dm³ NaOH oldatot. Ezt követte az intenzív kézi rázás 1 percig, hogy az oldószer és a minta megfelelően elegyedjen egymással. Rázás után következett a kisózás, amihez előre kimértem az anyagokat bemérő csónakokba. 4,0 MgSO₄-ot és 2,5 g puffer sókeveréket (1 g NaCl, 1 g trinátrium-citrát, 0,5 g dinátrium-hidrogén-citrát) tartalmazott egy-egy bemérő csónak, ezzel együtt szintén 1 percig intenzíven ráztam a csöveket. Utána centrifugáltam a mintákat 6000 RPM fordulatszámon 5 percig, így szétvált a szerves és a vizes fázis. A centrifugált mintákat fagyasztóba helyeztem egy éjszakára. Másnap a felülúszó szerves fázisból 6 ml-t átpipettáztam egy 15 ml-es PTFE mintatartó edénybe, amelybe már előzetesen kimértem 900 mg MgSO₄-ot és 150 mg primer-szekunder amint (PSA) tisztító szorbenseket. A centrifugacsöveket 30 másodpercig kézzel ráztam, majd ismét 5 percig 6000 RPM fordulatszámmal centrifugáltam a mintákat. A felülúszó fázisból 4 ml-t kipipettáztam egy 4 ml térfogatú üvegedénybe, majd 10 µl 5%-os hangyasav oldattal megsavanyítottam, hogy a célkomponenseket stabilizáljam. Ezeket az extraktumokat egészen a mérésig fagyasztóban tároltam és csak a mérés előtt hígítottam.



5. ábra Extraktumok hígítás előtt

A hígításhoz az extraktumokból 100 µl-t kimértem, majd hozzáadtam 400µl acetonitrilt és 500µl MS tisztaságú desztillált vizet. A mintákat keverés és szűrés után mértem.

4.4.2. Fungicidek vizsgálata különböző italokból/levekből, citromos ízesítést követően
Ebben a munkaszakaszban kísérletet állítottam be annak vizsgálatára, hogy a fungicidekkel szennyezett citrommal ízesített (áztatott) italokba, illetve salátalébe vajon mennyi hatóanyag oldódik ki és ezáltal kerülhet elfogyasztásra. Imazalil és tiabendazol kioldódását a következő négy italban, illetve lében vizsgáltam: kóla, búzasör, gabonapárlat, ecetes salátalé. A termékek pontos nevét, valamint a salátalé pontos összetételét az M1 melléklet tartalmazza. A citrom mintaszaks esetén feltételeztem az inhomogén eloszlást, ezért igyekeztem a kezeléseket is több párhuzamos mérésenként végezni. Egyenként öt párhuzamossal és egy kontrollkezeléssel végeztem a vizsgálatokat. Mindegyik esetben a fagyasztott citrom darabok és az adott folyadék bemérése nagyjából definiált, de pontosan feljegyzett tömegekre történt. 250 ml-es főzőpohárba bemértem a citromkockákat és az italokat úgy, hogy a koncentráció 50-70 g citrom/100 ml folyadék közé essen. Tömegeket és a koncentrációkat a következő táblázatban foglalom össze.

4. táblázat Minták összetétele extrakció során

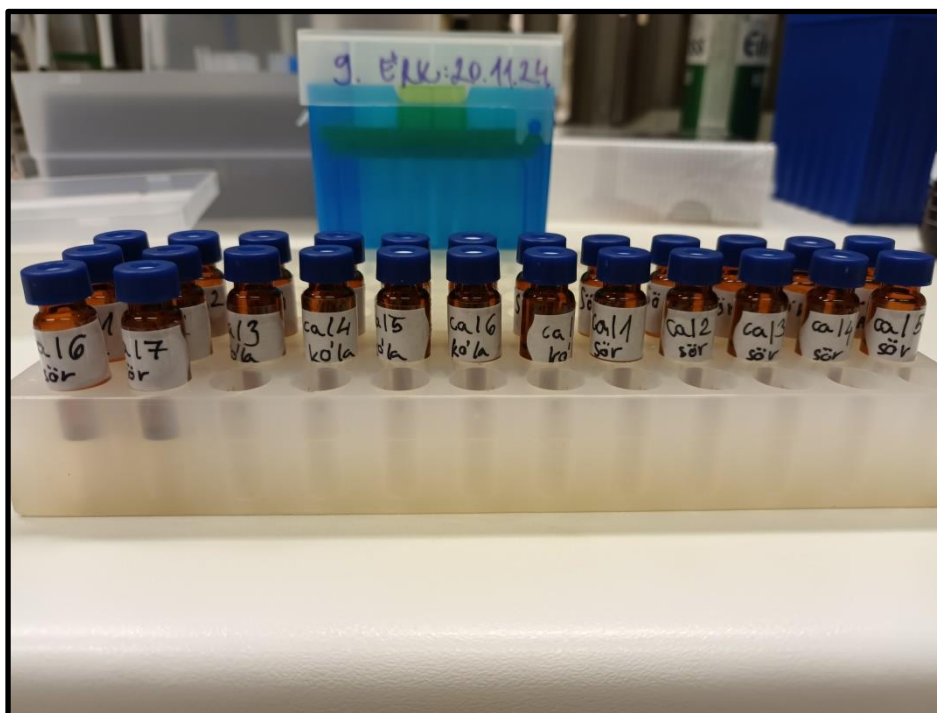
	Bemért citrom (g)	Bemért ital/lé (g)	Koncentráció (g citrom/100ml folyadék)
Kóla1	74,966	130,256	57,55
Kóla2	77,037	127,722	60,31
Kóla3	71,184	124,264	57,28
Kóla4	76,655	122,871	62,38
Kóla5	74,911	123,476	60,66
Sör1	82,992	121,001	68,59
Sör2	70,381	124,812	56,38
Sör3	71,725	120,743	59,40
Sör4	69,461	121,024	57,39
Sör5	72,785	121,192	60,06
Gabonapárlat1	47,649	80,144	59,45
Gabonapárlat2	43,013	80,186	53,64
Gabonapárlat3	44,166	80,048	55,17
Gabonapárlat4	44,015	80,341	54,79
Gabonapárlat5	43,836	80,243	54,63
Salátalé1	42,244	80,100	52,74
Salátalé2	45,507	78,498	57,97
Salátalé3	41,830	82,139	50,93
Salátalé4	40,172	79,955	50,24
Salátalé5	42,087	83,646	50,32

Bemérés után pontosan két óráig kevertettem a mintákat egy rázógép segítségével. A keverési időt úgy választottam meg, hogy a fagyott minták az italban felolvadjanak, az elegy ezután melegedjen fel szobahőmérsékletre, majd – a vacsoraasztalnál kevergetett citrommal ízesített üdítő italt utánozva – maradjon kb. 60 perc a hatóanyagok kioldódására is.



6. ábra Citromok extrakciója kólával és sörrel

Extrakció után hígítottam a mintákat. Automata pipetta segítségével kimértem 4-4 ml-t mindegyik főzőpohárból, melyeket a szénsavas minták esetén ultrahanggal gáztalanítottam, majd előkészítettem az elemzésre. A mérésekhez 10-szeres hígítást alkalmaztam: 100 μ l extraktumhoz adtam 400 μ l vizet és 500 μ l acetonitrilt. Ezután homogenizáltam és leszűrtem az oldatokat.



7. ábra Hígított és leszűrt minták, műszeres mérés előtt

Az összes italhoz külön, 7 pontból álló mátrix-illesztett kalibráció oldatsorozatot készítettem. Ennek összetétele megegyezik a lentebb ismertetett mátrix-illesztett D&S kalibrációs oldatsorozattal, csak ebben az esetben mind a négy folyadékra elvégeztem külön-külön.

4.5. Munkaoldatok elkészítése

Mérésekhez készítettem imazalilból és tiabendazolból egy-egy sztenderd törzsoldatot. 99,8%-os tisztaságú imazalil sztenderdből egy barna kis üvegbe kimértem nagyjából 10 mg-ot analitikai mérlegen és feljegyeztem a pontos tömegét (10,0 mg), majd automata pipetta segítségével hozzáadtam a letárazott üvegcséhez 5 ml acetonitrilt és ennek is felírtam a pontos tömegét (3976,2 mg). Az ACN sűrűségének és tömegének ismeretében kiszámítottam a pontos térfogatát, majd megadtam az oldat koncentrációját mg/ml-ben (1,9803 mg/ml). A tiabendazol esetében ugyanígy jártam el. A két fungicid sztenderd oldat összeállítását a következő táblázatban foglalom össze.

5. táblázat Imazalil és tiabendazol sztenderd törzsoldatok

	Tisztaság (%)	Bemérés (mg)	m _{standard} (mg)	m _{ACN} (mg)	δ _{ACN} (g/cm ³)	V _{ACN} (ml)	Koncentráció (mg/ml)
Imazalil	99,8	10,0	9,98	3976,2	0,789	5,0395	1,9803
Tiabendazol	99,9	10,3	10,29	3969,0	0,789	5,0304	2,0455

A két sztenderd törzsoldatból összeállítottam a 100 ppm-es (100 µg/ml) sztenderd MIX munkaoldatot (továbbiakban: 100 ppm STD MIX). 1 ml oldathoz automata pipetta segítségével kimértem imazalil sztenderd törzsoldatból 50,5 µl-t és tiabendazol sztenderd törzsoldatból 48,9 µl-t, végül 900,6 µl acetonitrillel kiegészítettem és homogenizáltam. A kalibrációs oldatsorokhoz a 100 ppm-es STD MIX munkaoldatot százszorosára hígítottam, így 1 ppm-es STD MIX munkaoldatot kaptam.

4.6. Mintaelőkészítési módszer megválasztása a kezelt italok esetén, a módszer részleges validálása

A módszer részleges validálása előtt meg kellett győződnem arról, hogy melyik a legmegfelelőbb mintaelőkészítési eljárás a kezelt italok szermaradék koncentrációjának meghatározására. Ezt két mátrixra is elvégeztem (kóla, búzasör), így nagyobb bizonyossággal választhattam ki a jobbik technikát. QuEChERS valamint D&S mintaelőkészítést végeztem kóla és búzasör italokból, melyeket előzetesen mesterségesen adalékoltam ismert mennyiségű sztenderdekkel. A döntést, két analitikai teljesítményjellemző, a mátrixhatás és a kinyerés alapján hoztam meg.

Mátrixhatást a mátrix-illesztett kalibrációs egyenes és a külső kalibrációs egyenes meredekségeinek egymáshoz való viszonyából tudjuk származtatni.

Kinyerés alatt, az analitikai eljárás során visszanyert anyag valódi koncentrációjának százalékos értékét értjük. Az adalékolt mintáknak a pontos koncentrációit, a mátrix-illesztett kalibrációs egyenes egyenletéből számoltam, majd elosztottam az elméleti koncentrációval, vagyis 50 ppb-vel. Ezt megszorozva 100-zal kaptam a kinyerési %-ot minden pontra, amelyek átlagából a módszer visszanyerését származtattam.

Akkor beszélünk lineáris összefüggésről, ha a mért jel (terület) és a célkomponens koncentrációja között egyenes arány áll fent. A módszer linearitásának meghatározásához hét pontra készítettem egy kalibrációs sort, ahol a tagok mindegyike ugyanannyi mátrixot (100 µl) és ugyanolyan arányban jelenlévő oldószereket tartalmazott (acetonitril, víz), mint amennyi a mintákban volt. Ezzel elérve azt, hogy a mintákat és a kalibrációs pontokat közel azonos mátrixhatás érte.

Igyekeztem olyan módszert választani, mely a gyakorlatban is könnyebben kivitelezhető, olcsóbb és a részleges validálással igazolni tudtam annak megfelelőségét.

A kinyerés és a mátrixhatás meghatározásához, szükségem volt egy mátrix-illesztett kalibrációs sorra, valamint egy külső kalibrációs oldatsorozatra. A külső kalibrációs oldatsorozat nem tartalmazott italt, vagyis mátrixmentes volt, aminek segítségével ki tudtam fejezni a mátrixhatást. A mátrix-illesztett kalibrációs sorra kapott egyenes egyenlet segítségével kiszámítottam az adalékolt minták imazalil és tiabendazol tartalmát, amivel pedig a kinyerést tudtam meghatározni.

QuEChERS esetén vettem 6 db centrifuga csövet, melyekbe 10,0 g italt (kóla, búzasör) mértem, öt esetben automata pipetta segítségével 50 µl 100 ppm-es STD MIX munkaoldatot adalékoltam az italokhoz, egyhez 50 µl acetonitrilt adtam. Így a sztenderddel adalékolt minták 500 ppb koncentrációjának adódtak imazalilre és tiabendazolra vonatkoztatva, míg a hatodik a vakminta volt. Összemérés után alaposan homogenizáltam az elegyeket, majd elvégeztem velük a QuEChERS mintaelőkészítést. A kinyert extraktumokat mérés előtt hígítottam, 100 µl extraktumhoz adtam 400 µl acetonitrilt és 500 µl vizet, homogenizáltam és leszűrtem 0,22 µm pórusméretű PTFE szűrőn.

D&S esetében ugyanígy 6 db centrifuga csőbe mértem ki az italokat és ugyanúgy 500 ppb-re adalékoltam a mintákat. A mintákat, homogenizálása után, ultrahangos fürdőben gáztalanítottam 10 perc alatt és csak ezután hígítottam ki őket. Fontos, hogy mivel ez nem acetonitriles extrakció, hanem vizes fázisú hígítás, így az extraktumok vizesek, ezért 100 µl extraktumhoz 400 µl vizet és 500 µl acetonitrilt adtam, a megfelelő oldószer összetétel végett. Homogenizálás után ugyanúgy szűrtem a mintákat. A két mintaelőkészítés közti lényeges különbség a tisztítási lépések megléte/hiánya. QuEChERS esetén a különböző sók hozzáadásával mátrixokat kötünk meg, amelyek centrifugálás után leválaszthatóak, míg hígításnál ez kimarad.

Szpájkolás után összeállítottam a mátrix-illesztett kalibrációs sort kólára és búzasörre egyaránt. Mindkét mintaelőkészítésből visszamaradt vakminta volt a mátrix, amit minden kalibrációs taghoz adtam, így biztosítva az azonos mátrixhatást. Összesen négy kalibrációs oldatsorozatot készítettem: D&S kóla és búzasör, valamint QuEChERS kóla és búzasör. A kalibrációs sorokat a következő három táblázat alapján állítottam össze.

6. táblázat Mátrix-illesztett kalibrációs pontok összetétele QuEChERS esetén

A kalibrációs oldat koncentrációja (ng/ml)	Mátrix (μ l)	1 ppm STD MIX (μ l)	ACN (μ l)	Víz (μ l)
0	100	0	400	500
5	100	5	395	500
10	100	10	390	500
25	100	25	375	500
50	100	50	350	500
150	100	150	250	500
300	100	300	100	500

7. táblázat Mátrix-illesztett kalibrációs pontok összetétele D&S esetén

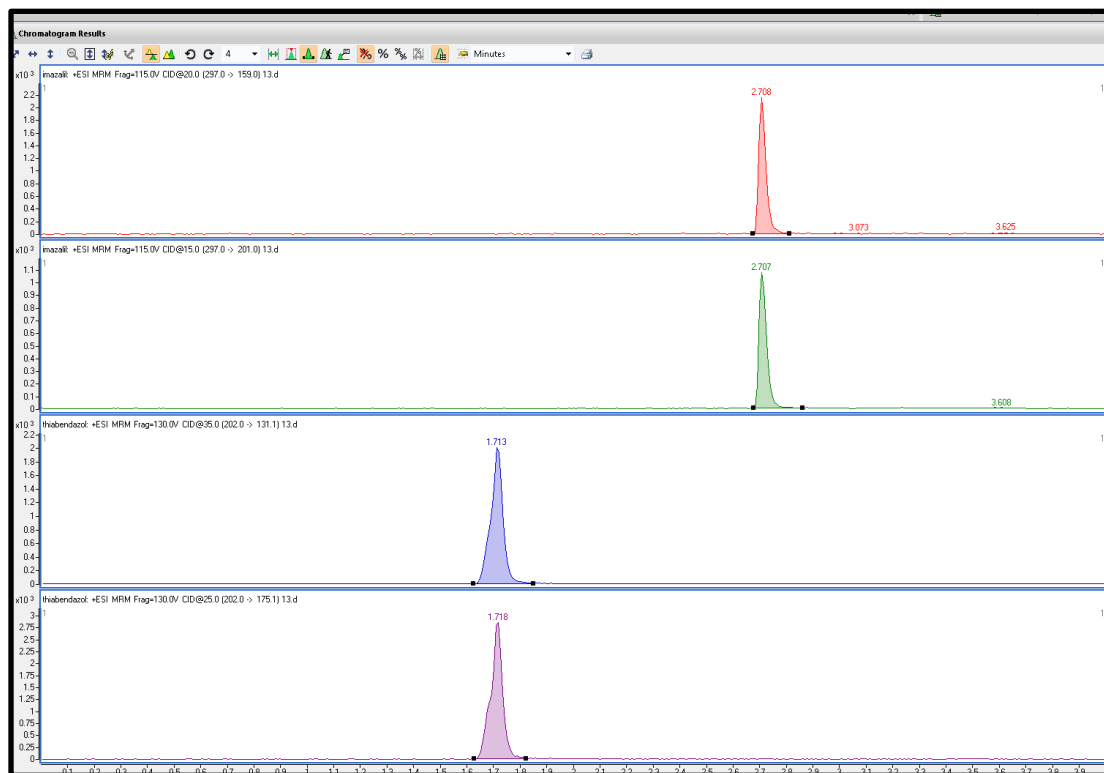
A kalibráció oldat koncentrációja (ng/ml)	Mátrix (μ l)	1 ppm STD MIX (μ l)	ACN (μ l)	Víz (μ l)
0	100	0	500	400
5	100	5	495	400
10	100	10	490	400
25	100	25	475	400
50	100	50	450	400
150	100	150	350	400
300	100	300	200	400

8. táblázat Külső kalibrációs pontok összetétele

A kalibrációs oldat koncentrációja (ng/ml)	1 ppm STD MIX (μ l)	ACN (μ l)	Víz (μ l)
0	0	500	500
5	5	495	500
10	10	490	500
25	25	475	500
50	50	450	500
150	150	350	500
300	300	200	500

5. EREDMÉNYEK

Célkitűzéseim között szerepelt egy gyors és egyszerű mintaelőkészítési és mérési módszer kidolgozása a megfogalmazott feladatokra. A multikomponenses peszticid meghatározásra korábban kidolgozott mérési módszert ezáltal rövidítenem kellett. Ehhez rövidebb oszlopot választottam, valamint meredekebb grádiens profillal igyekeztem a kromatográfiás időt lerövidíteni.



8. ábra Sör mintából mért hatóanyagok kromatogramja

A csúcsok teljes mértékben elkülönülnek, a komponensek kellő mértékben elváltak egymástól és mindössze 4 perc alatt detektálható a két vegyület az injektálástól számítva.

5.1. Homogenitás vizsgálat

Analitikai kémiában a homogén minta előállításának kulcsszerepe van a későbbi elemzések során. Ez por és folyadék minták esetén egészen egyszerű, azonban esetünkben a citrom héján lévő fungicidek vizsgálatánál egy viszonylag kötött viaszos réteggel találkozunk, amely inhomogénen oszlik el a gyümölcsön (a sarkoknál feltehetően nagyobb a mennyisége), ezáltal a viaszos rétegbe penetrált hatóanyagok is feltehetően inhomogén módon oszlanak el. Ez az elgondolás megnehezíti a dolgunkat. Lehetőségeimhez mérten igyekeztem minél homogénebbé tenni a citrom mintát, de ez korántsem volt könnyű feladat.

A megoldást a relatív nagy mennyiségű mintapopuláció előállítása jelentette (4kg), a relatív kis méretre aprított gyümölcshús (1cm, mellyel a kezelés a valóságnak megfelelően elvégezhető) és a fagyasztott állapotban elvégzett homogenizálás (a kockák mintegy "gurultak" egymáson). Fontos volt az is, hogy minél több párhuzamos mérés segítségével igyekezzünk a valódi koncentrációértéket megközelíteni. A tíz párhuzamos előkészítésből mért imazalil és tiabendazol koncentrációk kiszámításával kifejeztem a citrom minta átlagos szermaradék koncentrációját, a koncentrációk szórásából pedig képet kaphatunk a homogén minta előállításának sikerességéről.

9. táblázat Citrom fungicid tartalma

	Tiabendazol (mg/kg)	Imazalil (mg/kg)
Citrom1	0,784	1,126
Citrom2	0,776	1,272
Citrom3	0,789	0,886
Citrom4	1,121	1,831
Citrom5	1,039	1,699
Citrom6	0,791	1,995
Citrom7	1,400	1,451
Citrom8	1,139	1,696
Citrom9	0,920	1,729
Citrom10	0,993	1,263
Átlag	0,975	1,494
Szórás	0,205	0,352

Imazalil esetén 5 ppm, míg tiabendazolnál 7 ppm a maximálisan megengedett szermaradék mennyiség citromnál az EU-ban. Imazalilnál 1,5 ppm-t, míg tiabendazolnál 1,0 ppm-et kaptam, vagyis a minták határérték alatti koncentrációban tartalmazták a fungicideket.

Szórásnál megfigyelhető, hogy mindkét fungicid esetén kb. az átlag 20%-val térnek el egymástól a minták. A homogén minta előállítását sikeresnek gondolom a szórásértékek alapján.

5.2. Optimális extrakciós módszer kiválasztása a kezelt italok esetén, a módszer részleges validálása

Célkitűzésem másik fontos pontja olyan mintaelőkészítési módszer megválasztása volt, mely gyors és olcsó, ugyanakkor alkalmas a kérdésként megfogalmazott feladat megválaszolására. Két mintaelőkészítési módszert hasonlítottam össze a citrommal kezelt

italok esetében, a QuEChERS-t és a hígítást, vagyis a D&S módszert. A mintaelőkészítéseket két italra végeztem el, búzasörre és kólára, mátrix-illesztett kalibrációval meghatároztam a minták hatóanyag tartalmát, melyek ismert mennyiségét korábban hozzáadtam sztenderd mix formában, kifejeztem a kinyerést és a mátrixhatás, amihez egy külső kalibrációs oldatsorozatot is készítettem. A mátrixhatás és a kinyerés összehasonlításával kiválasztottam az alkalmasabb módszert.

Mátrixhatást a külső kalibrációs egyenes és a mátrix-illesztett kalibrációs egyenes meredekségeinek összehasonlításával tudjuk kifejezni. Mindkét ital és azon belül mindkét hatóanyag esetében megadom a meredekségeket a két mintaelőkészítés esetén a következő táblázatban.

10. táblázat Mintaelőkészítések összehasonlítása

	Kalibrációs egyenesek meredeksége (a)	a_{mátrix}/ a_{külső}	Korrelációs koefficiens (R²)	Mátrixhatás (%)
Tiabendazol (kóla, Q)	344,62	1,02	0,9978	2%
Tiabendazol (kóla, D&S)	332,39	0,98	0,9996	-2%
Imazalil (kóla, Q)	159,53	0,89	0,9984	-11%
Imazalil (kóla, D&S)	163,35	0,92	0,9991	-8%
Tiabendazol (sör, Q)	329,91	0,97	0,9999	-3%
Tiabendazol (sör, D&S)	296,25	0,87	0,9999	-13%
Imazalil (sör, Q)	162,35	0,91	0,9996	-9%
Imazalil (sör, D&S)	131,26	0,74	0,9983	-26%
Külső kalibráció tiabendazol	339,04	-	0,9998	-
Külső kalibráció imazalil	178,48	-	0,9990	-

Q: QuEChERS; D&S: dilute and shoot

A SANTE/12682/2019 előírása szerint, amennyiben a mátrix jelerősítő (+) vagy szuppresszáló (-) hatása meghaladja az oldószeres sztenderd oldathoz (külső kalibráció) viszonyított 20 %-ot, úgy a mátrix hatását a kalibráció során figyelembe kell venni. Ez alapján sörben mért imazalil esetén D&S mintaelőkészítéssel a mátrixhatás meghaladja ezt az értéket (-26%). Emiatt mátrix-illesztett kalibrációs módszert szükséges használnunk. Megfigyelhető, hogy a két mintaelőkészítés között nem jelentős a különbség. Láthatjuk, hogy az imazalil kólában történő mérésén kívül a D&S módszernek jelentősebb jelsuppresszáló hatása van, mint a QuEChERS módszernek, mely a nagyobb mátrix-terheléssel magyarázható, de ennek mértéke nem jelentős. Ha figyelembe vesszük a

QuEChERS mintaelőkészítés anyag-, idő- és pénzköltségét, akkor a D&S módszert érdemes választani.

Előírás szerint az átlagos visszanyerésnek a 70-120%-os tartományon belül kell lennie. A mérések során 98-135% között mozogtak az értékek, a következő táblázatban összefoglalom a két hatóanyag kinyeréseit a minták átlagából számolva.

11. táblázat Kinyerések összehasonlítása

	Kinyerés (RSD%)
Tiabendazol (kóla, Q)	124 (0,01)
Tiabendazol (kóla, D&S)	135 (0,03)
Tiabendazol (sör, Q)	129 (0,02)
Tiabendazol (sör, D&S)	131 (0,10)
Imazalil (kóla, Q)	98 (0,06)
Imazalil (kóla, D&S)	109 (0,02)
Imazalil (sör, Q)	101 (0,03)
Imazalil (sör, D&S)	125 (0,03)

Eredetileg 500 ppb-re adalékoltam a mintákat és ennél nagyobb értékeket kaptam végeredménynek, vagyis több lett a kinyerés, mint 100%. Ennek oka a mérés hibája. Mivel ebben a vizsgálatban nem egy határértékhez hasonlítom a szermaradék koncentrációkat, hanem mintaelőkészítési módszereket hasonlítok össze, az előírtnál nagyobb hibával terhelt kinyerési értékeket elfogadottnak tekintem. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét technika megfelelő mértékű kinyerést eredményezett. A két vizsgálat alapján a lényegesen egyszerűbb és olcsóbb, csupán egy rövid lépéssel kivitelezhető D&S technikát választottam az italok/salátalé szermaradék-tartalmának vizsgálatára.

Az előző mérések által a kiválasztott módszer (D&S) részleges validálását is elvégeztem. Ezzel a kifejezéssel illetem az angol „in-house validation” fogalmat, amely azt jelenti, hogy esetünkben a multikomponenses validált módszer átdolgozásáról van szó, ezáltal csak a lényegi teljesítményjellemzőket vizsgálom. A kinyerés és mátrixhatás vizsgálatokat fent leírtam, a linearitás vizsgálatot utólag elvégeztem a D&S mátrix-illesztett kalibrációs oldatsorozat segítségével. Összesen hét pontra végeztem kalibrációt, minden pontban a kapott területet ábrázoltam a koncentráció függvényében. A pontokra illesztett egyenes

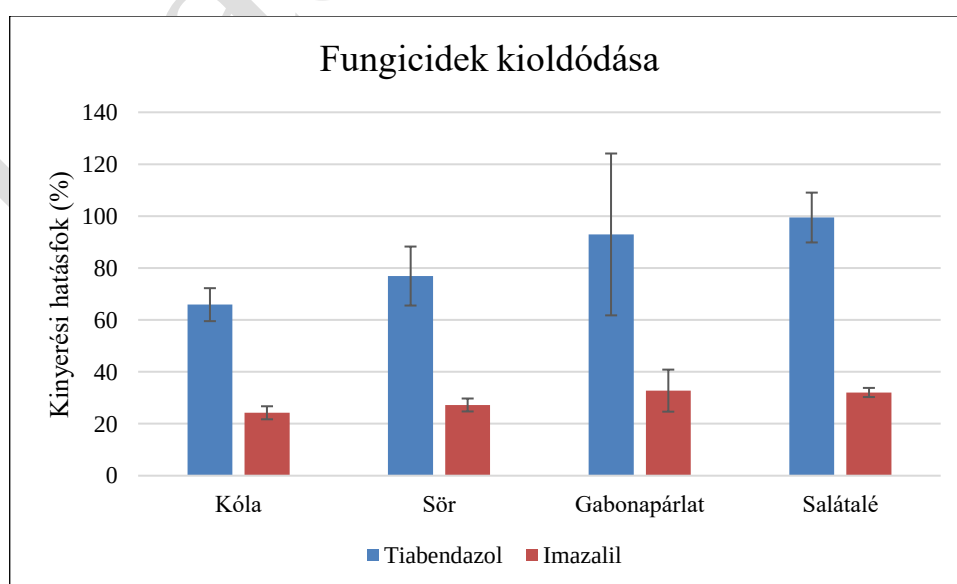
egyenletének korrelációs együtthatója tiabendazol és imazalil esetén is legalább 0,995 vagyis 5-300 µg/l tartományban lineárisnak mondható a módszer.

12. táblázat Linearitás vizsgálat

	Kalibrációs egyenes korrelációs együtthatója	Linearitási tartomány (µg/l)
Tiabendazol sör	0,9999	5-300
Tiabendazol kóla	0,9996	5-300
Imazalil sör	0,9983	5-300
Imazalil kóla	0,9991	5-300

5.3. Imazalil és tiabendazol koncentrációinak meghatározása különböző élelmiszermátrixokban

A homogenitás vizsgálat során mért adatok alapján a vizsgált citrom átlagosan 0,975 mg tiabendazolt és 1,495 mg imazalilt tartalmazott kilogrammonként. Az összes hatóanyag kioldódása italonként eltérő volt és a két fungicid között is különbség volt megfigyelhető. Minden ital esetén öt párhuzamosból mértem a két hatóanyag koncentrációját és ezeket viszonyítottam a citromok átlagos fungicid tartalmához, amiből meghatároztam a kioldódási hatásfokot (%), melyeket a következő diagramon mutatok be.



9. ábra Hatóanyagok kioldódásának alakulása a négy mátrixban

Az ábráról leolvasható, hogy mindkét hatóanyag esetén a gabonapárlatban és salátalében nagyobb koncentráció adódott, mint a kólában és a sörben. Relatív szórással (RSD%) ki tudjuk fejezni, hogy az eredmények szórása az átlaghoz viszonyítva milyen nagyságú, amivel közelíteni tudjuk az eredmények eloszlásának sikerességét. Kóla, sör és salátalé esetén az RSD%-ok a két hatóanyag esetén 5 és 14% között mozogtak, ami megfelelő eredménynek számít. Gabonapárlatnál valószínű, hogy az áztatott citromokon a hatóanyagok eloszlása nem volt homogén, mert tiabendazolnál 34, míg imazalinál 24%-os relatív szórást tapasztaltunk.

Szignifikancia vizsgálatot is végeztem a különbségek kifejezése érdekében, melynek eredményeképpen elmondható, hogy a saláta-sör és a saláta-kóla vonatkozásokban találtam szignifikáns eltérést mindkét hatóanyag kioldódásában.

A vizsgálatot t-próba segítségével végeztem el.

13. táblázat Szignifikancia vizsgálat

	p (tiabendazol)	p (imazalil)
Gabonapárlat és sör	0,31153	0,18312
Gabonapárlat és saláta	0,66699	0,85415
Gabonapárlat és kóla	0,09381	0,05468
Salátalé és sör	0,00952	0,00768
Salátalé és kóla	0,00018	0,00045
Sör és kóla	0,09498	0,09392

Két adathalmazról akkor mondhatjuk, hogy szignifikánsan különbözik, ha $p \leq 0,05$. Salátalé és kóla, valamint salátalé és sör összehasonlításánál szignifikáns, míg gabonapárlat és kóla esetén látható különbség figyelhető meg. Feltételezésem szerint kóla és sör esetén a kisebb mértékű kioldódást az italok valamely tulajdonsága vagy összetevői(je) gátolták.

Miáltal a kezelést azonos módon, szermaradék szempontjából homogén citrommal végeztem el, az eredményekben megnyilvánuló különbség csak a folyadékokban létező különbségekre vezethető vissza. Ezért megvizsgáltam a téma szempontjából releváns tulajdonságokat az italok és salátalé esetében.

A gabonapárlat egy etanol-víz, kétkomponensű egy fázisú elegy alkoholra vonatkoztatva 37,5 V/V%-os. Sör esetében az alkohol aránya elhanyagolható (5%), kóla és az ecetes salátalé nem tartalmazott etanolt. Az 1. táblázatban közölt oldhatóságra vonatkozó adatokat

tekintetbe véve arra számítanánk, hogy a gabonapárlatban nagyobb koncentrációban vannak jelen a hatóanyagok, mint a vizes mátrixokban. Eredményeim ezt az elgondolást nem támasztották alá.

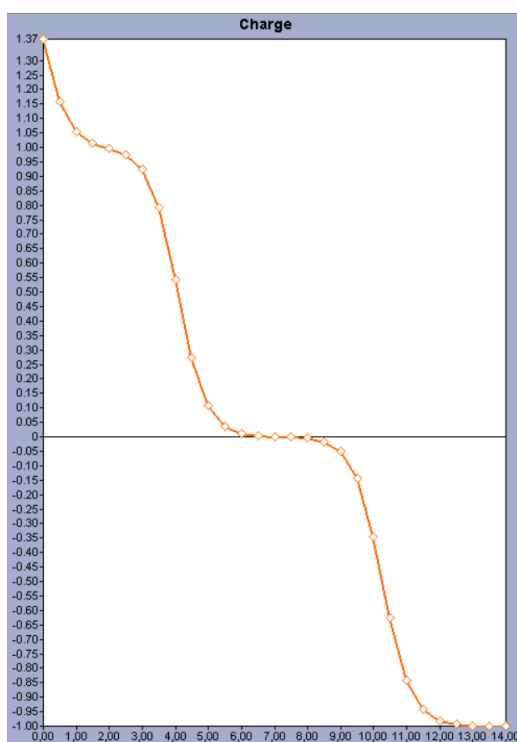
További eltérésként mutatható be a folyadékok pH értéke és a szárazanyag-tartalom. Szeretném hangsúlyozni, hogy munkám során szárazanyag-tartalom meghatározást nem végeztem. Ez a minőségjellemző csupán a dolgozat értékelési fázisában merült fel mérési eredményeim magyarázatául. Emiatt irodalmi értékeket (salátalé esetén számolt értéket) mutatok be a 11. táblázatban.

14. táblázat Italok pH-ja és szárazanyag-tartalma (Amari et al., 2019)

	pH	Szárazanyag tartalom (g/l)*
Kóla	2,56	110-112
Salátalé	3,20	18-20
Sör	4,15	35-37
Gabonapárlat	5,49	0-1

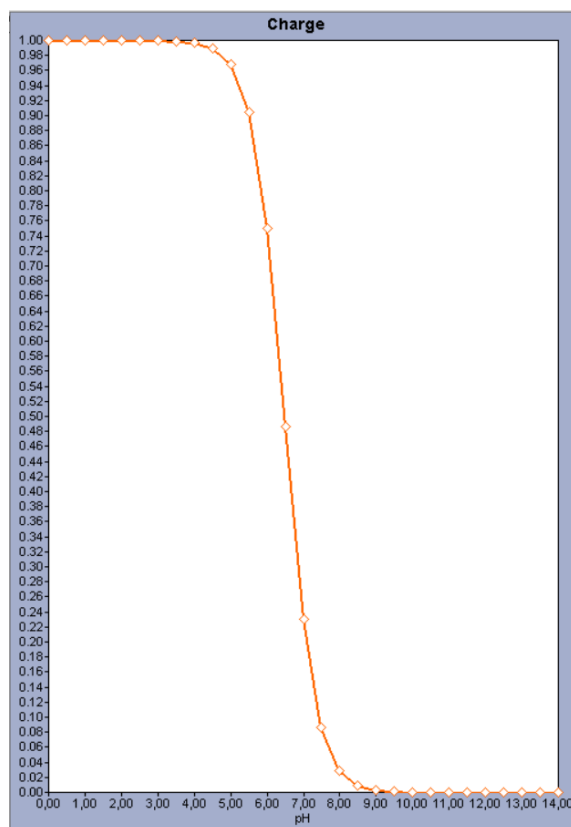
***irodalmi értékek alapján**

A pH-nak azért van jelentősége, mert a két hatóanyag disszociációs formája függ a közeg kémhatásától. Gyenge bázisok révén a hidrogénion koncentráció növekedésével egyre inkább protonált formát vesznek fel a molekulák. A pK_a értékek alapján láthatjuk, hogy mely pH-n milyen mikrospeciesz domináns előfordulása jellemző.



10. ábra Tiabendazol formájának változása a pH függvényében

Tiabendazol izoelektromos pontja $\text{pH}=7,17$ értéken van, ami azt jelenti, hogy ekkor még a vegyület kifelé semleges töltésű. Ha csökken a pH, folyamatosan nő a protonált forma aránya, ez a gabonapárlat pH-ján még csekély, de nagyjából 5-ös pH-tól exponenciálisan megnő. Ez azt jelenti, hogy a minták közül a gabonapárlat, sör, a salátalé és a kóla esetében ebben a sorrendben növekvő ionos molekulaforma arányra számíthatunk, mely nagyobb vízdékonyságot jelent. Azonban mérési eredményeim erre a magyarázatra rácsafolnak.



11. ábra Imazalil formájának változása a pH függvényében

Imazalil esetén ilyen különbségről nem beszélhetünk, mind a négy ital pH-ján egyértelműen protonált formát vesz fel a molekula (11. ábra). A kioldódási eredmények azonban ez esetben sem támasztják alá a fenti elgondolást.

Véleményem szerint a magyarázat az italok szárazanyag-tartalmában keresendő. Az anyagok oldódása során az oldószer molekulái szolvátburkot képeznek az oldott anyag molekulái körül, melyet víz esetén hidrátburoknak hívunk. Ha bármilyen vegyület oldódását vizsgálnánk ioncserélt vízben és egy olyan közegben, ami nagy százalékban tartalmaz valamilyen oldott anyagot (pl. cukrot), akkor előbbinél sokkal hatékonyabb lenne az oldódás, mert a víz molekulák kizárólag a vegyület molekuláit veszik körbe utóbbival pedig gátolva vannak a jelentős mértékű oldott anyag miatt. Az oldódás környezeti paraméterek változtatásával befolyásolható, például a hőmérséklet növelésével, a mechanikai behatás fokozásával vagy az extrakció idejének meghosszabbításával. Azonban esetünkben ezek a környezeti paraméterek mind a négy ital esetében azonosak voltak. A kóla magas koncentrációban (112 g/l) cukrot, a sör szacharidok mellett az erjesztés során az élesztőgomba által termelt egyéb szerves vegyületeket tartalmaz. Salátalé nagyjából tized annyi, míg a gabonapárlat egyáltalán nem tartalmaz szárazanyagot. Ennek oka technológiai,

hiszen a lepárlással készült alkoholos italok esetén a végtermék egy etanol – víz elegy, amely csekély mértékben tartalmaz egyéb illékony komponenseket és mivel ennél az italfajtánál egy többszöri aktív szén szűrés is követi a lepárlást, valamint nem alkalmaznak hordós érlelést, teljes mértékben kizárható a számottevő szárazanyag jelenléte.

Összességében tehát azt feltételezem, hogy a kioldódásban jelentkező különbséget nem az oldhatóságot befolyásoló víz-alkohol arány, és nem a folyadékok pH-ja közti különbség, hanem azok szárazanyagtartalma okozta.

A második megállapításom a két hatóanyag közötti eltérésre vonatkozik. A diagrammokról jól látszik, hogy a tiabendazol jóval nagyobb mértékben oldódott ki bármelyik ital esetén, mint az imazalil. Ha az oldhatósági adatokat megvizsgáljuk (1. táblázat), arra számíthatunk, hogy az imazalil hatszor jobban oldódik a vizes közegben, mint társa. Mégis, kísérletemben az eredmények éppen fordítva alakultak. Ennek oka véleményem szerint a kezelési technológiában keresendő. Fentebb említettem, hogy a fungicideket kétféle módon szokták felvinni a citromok felületére: merítéses vagy permetező technikával. Mindkét technikánál előre elkészítenek egy magas koncentrációjú fungicid oldatot, melybe merítik vagy amellyel permetezik a gyümölcsöket. A hatóanyagokat tartalmazó készítmények kiszerezésében azonban lehetnek különbségek. Egyre inkább nagyobb teret nyer az ún. nanokformaként kapható szerek, mellyel a hatóanyagok kioldódása sokkal hatékonyabb, gyorsabb és a kezelés is ezáltal egyszerűbb és hatásosabb. Amennyiben például a tiabendazolt ilyen formában juttatják a felületre, olyannyira megváltozik a hatóanyag fiziko-kémiai tulajdonsága, amely esetleg magyarázatul szolgálhat az általam tapasztalt adatokra.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Fogyasztói igényeknek megfelelően az élelmiszerelőállítók igyekeznek megfelelni az elvárásoknak, miszerint az elfogyasztott élelmiszer legyen jó minőségű, egészséges és biztonságos. Gyümölcsök és zöldségek esetén külső veszélyek ellen növényvédő szerekkel védekeznek a termelők. A használat célja, hogy a terményt megóvják a megbetegedésektől és emellett a termés hozamot is közel állandó szinten tudja tartani időjárási viszonyoktól függetlenül. A szerek eltérő hatásmechanizmusú hatóanyagokat tartalmaznak, melyek gátolják a gyümölcsök egészségét veszélyeztető kórokozókat. Magyarországi éghajlati viszonyok nem teszik lehetővé, hogy déli gyümölcsöket állítsunk elő, így azt külföldről vagyunk kénytelenek importálni. Citrom leginkább Argentínából, Dél-Afrikából, Spanyolországból és Törökországból kerül megrendelésre. A több ezer kilométeres út alatt a szállítónak feladata gondoskodni a gyümölcs védelméről, melyben segítséget nyújtanak a betakarítás utáni, ún. posztharvest fungicidek. A gyümölcs héján egy viszonylag stabil viasz réteg alakul ki, mely tartalmazza az emberi egészségre káros fungicideket, ezért fontos, hogy a gyümölcsöt miként fogyasztjuk el. Például gyakori fogyasztási mód a citromszeletek italokba áztatása.

Célkitűzéseim között szerepelt egy gyors, egyszerű, hatékony módszer megalkotása a citromnál leginkább használt két posztharvest fungicid (imazalil, tiabendazol) koncentrációinak meghatározására citrommal áztatott italokból, valamint emellett ok-okozati összefüggéseket találni a hatóanyagok viselkedésére különböző közegekben.

A módszert tekintve számos ponton sikerült a célt megvalósítani: (i) a mintaelőkészítés ún. D&S módszer, mely csupán egy egyszerű hígítása a mintamátrixnak, (ii) az eluens összetételét tekintve sómentes, hiszen a két vegyület protonálódva ionizálódik, valamint (iii) a kromatográfiás elválasztás csupán 4 percet vesz igénybe.

Egy komponens kioldódását több tényező befolyásolja. Itt említhetjük az oldhatóságát az adott oldószerben, a közeg pH-ját és hőmérsékletét vagy az oldódás idejét. Méréseim során négy eltérő tulajdonságú italban/lében vizsgáltam a két hatóanyag kioldódását citromból a fogyasztói szokásoknak megfelelően. Üdítőitalba, sörbe, gabonapárlatba és salátalébe áztattam be a citromokat, az így nyert extraktumokból az általam kidolgozott és részlegesen validált módszerrel megmértem a két hatóanyag koncentrációját. Leghatékonyabban a salátalé és a gabonapárlat volt képes kinyerni a citrom felületéről a fungicideket, melynek

oka meglepő módon nem a közeg pH-ja vagy a hatóanyagok oldhatósága volt, hanem a folyadékokban lévő szárazanyag-tartalom, feltételezésem szerint.

Dolgozatomban felhívom a figyelmet a citrom italok ízesítésére alkalmazott felhasználási mód veszélyeire. Mérési adataimból az látszik, hogy a vizsgált fungicidek mérhető koncentrációban kioldódnak az italokba, ezért expozíciós veszélyt jelentenek a fogyasztók felé. A kioldódás a kisebb szárazanyag-tartalmú italokban jelentősebb. Peszticid MRL határérték az italokra nincs megállapítva az Európai Unióban, ezért azok vizsgálata sincs fókuszban. TDK munkám tanulsága, hogy italok ízesítésére kezeletlen héjú citromot alkalmazzunk minden esetben.

7. IRODALOMJEGYZÉK

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, pp. 838-865.

Amari, A., Schröen, K. (2019): Batch stripping of flavour active compounds from beer: Effect of dry matter and ethanol on equilibrium and mass transfer in a packed column. *Food and Bioproducts Processing*, 118, pp. 306-317.

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stainbahr, D., Schenk, F. J. (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86, 2. szám, pp. 412-431.

Authority, European Food Safety (2019): The 2019 European Union report on pesticide residue in food, *EFSA Journal* 19, 4. szám

Bolanos, P. P., Romero-Gonzalez, R., Frenich, A. G., Martínez Vidal, J. L. (2008): Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1208, 1-2. szám, pp. 16-24.

Clarke, W. (2017): *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Academic Press, pp. 1-15.

Dias, J. V., Nunes, M. G. P., Pizzutti, I. R., Reichart, B., Jung, A. A., Cardoso, C. D. (2019): Simultaneous determination of pesticides and mycotoxins in wine by direct injection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Food Chemistry*, 293, pp.83-91.

Dong, M. W., Guillarme, D., (2017): UHPLC 2: Benefits. *LC GC North America*, 35, 8. szám, pp. 486-495.

Ferrer, C., Martinez-Bueno, M. J., Lozano, A., Fernandez-Alba, A. R., (2011): Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection. One year pilot survey. *Talanta*, 83, 5. szám, pp. 1552-1561.

Fu, Y., Zhang, J., Qin, J., Dou, X., Luo, J., Yang, M., (2022): Representative matrices for use in matrix-matched calibration in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis

of pesticide residues in different types of food-medicine plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 111, pp. 1046-17.

Goodrich, R. (2003): *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, pp. 1354-1359.

Graham, A. M. (2018): *A history of pesticides*, CABI, pp. 1-13.

Hocart, C. H., (2010): *Comprehensive natural products II*. pp. 327-388.

Internet 1. Imazalil molekulaszerkezete <https://www.medchemexpress.com/Imazalil.html> (hozzáférés dátuma: 2022.10.11.)

Internet 2. Tiabendazol molekulaszerkezete <https://hu.wikipedia.org/wiki/Tiabendazol> (hozzáférés dátuma: 2022.10.11.)

Internet 3. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/390.htm> (hozzáférés dátuma: 2022.10.11.)

Internet 4. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/629>. (hozzáférés dátuma: 2022.10.11.)

Internet 5. <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/23391.pdf> (hozzáférés dátuma: 2022.10.11.)

Internet 6. <https://citrusaustralia.com.au/wp-content/uploads/Lluis-Palou-Trends-in-Citrus-Postharvest-Diseases-in-Spain.pdf> (hozzáférés dátuma: 2022.10.10.)

Internet 7. https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en (hozzáférés dátuma: 2022.10.11.)

Internet 8. https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/imazalil.pdf (hozzáférés dátuma: 2022.10.11.)

Internet 9. https://www.researchgate.net/publication/318360553_Lemon_A_Versatile_Fruit_of_Multiple_Uses (hozzáférés dátuma: 2022.10.07.)

Internet 10. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003643en.pdf> (hozzáférés dátuma: 2022.09.13.)

Internet 11. 1169/2011/EU rendelet, a fogyasztók élelmiszerekkel kapcsolatos tájékoztatásáról <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:hu:PDF> (hozzáférés dátuma: 2022.10.10.)

Internet 12. MSZ EN 15662 <https://www.mszt.hu/hu-hu/szabvanyositas/hirek/2022/04/elelmiszer-vizsgalati-szabvanyok-magyarul> (hozzáférés dátuma: 2022.10.10.)

Internet 13. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gc-ms-principle-instrument-and-analyses-and-gc-msms-362513> (hozzáférés dátuma: 2022.10.07.)

Internet 14. 396/2005/EK, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396&from=HU> (hozzáférés dátuma: 2022.09.13.)

Ismail, M., Zhang, J., (2004): Post-harvest Citrus Diseases and their control. *Outlooks on Pest Management*, 15, 1. szám, pp. 29-35.

Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., Ekiert, H., (2020): Citrus limon (Lemon) Phenomenon—A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. *Plants*, 9, 1. szám, pp. 119.

Kmellár B., (2011): Multikomponenses növényvédőszer-maradék meghatározás lehetőségei élelmiszerekből tömegspektrometriás módszerekkel. pp. 46-50.

Kormány R., Fekete Sz., (2019): Az ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia határai. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 125, 3. szám, pp. 134-142.

Kowal, S., Balsaa, P., Werres, F., Schmidt, T. C., (2013): Fully automated standard addition method for the quantification of 29 polar pesticide metabolites in different water bodies using LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 19. szám, pp. 6337-6351.

Kruve, A., Leito, I., (2013): Comparison of different methods aiming to account for/overcome matrix effects in LC/ESI/MS on the example of pesticide analyses. *Analytical Methods*, 5, 12. szám, pp. 3035.

Mahmoud, M. H., Khorshid, M. A., El-Marsafy, A. M., Souaya, E., (2019): Validation of short run time LC-ESI (+) MS/MS method for determination of twenty recommended pesticide residues in food based on QuEChERS extraction technique. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 99, 5. szám, pp. 409-427.

- Margolin, K. J., Elkabets, O., Amirav, A., (2020): A comparison of electron ionization mass spectra obtained at 70 eV, low electron energies, and with cold EI and their NIST library identification probabilities. *Journal of Mass Spectrometry*, 12, 55. szám
- Niessen, W. M. A., Manini, P., Andreoli, R., (2006): Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25, 6. szám, pp. 881-899.
- Pelegri n, C. J., Flores, Y., Jim nez, A., Garr gos, M. C. (2020): Recent trends in the analysis of chemical contaminants in beverages. *MDPI*, 32. 6. szám, pp. 1-29.
- Pokol Gy. (szerk.) (2017): Analitikai k mia. Typotex Kiad , Budapest, 381-387. o.
- Poole, C. F., (2007): Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1158, 1-2. szám, pp. 241-250.
- Rejczak, T., Tuzimski, T. (2015): A review of recent developments and trend sin the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry* 13, pp. 980-1010.
- Rimayi, C., Odusanya, D., Mtunzi, F., Tsoka, S., (2015): Alternative calibration techniques for counteracting the matrix effects in GC–MS–SPE pesticide residue analysis – A statistical approach. *Chemosphere*, 118, pp. 35-43.
- Sania, R., Mona, H. S., Sharif, M. S., Khurram, H. S., Nageena, S., Sumaira, P., Maryam, M., Muhammad, F., (2020): Biological attributes of lemon: A review. *Journal of Addiction Medicine and Therapeutic Science*, 6, 1. szám, pp. 30-34.
- Smith, R. W. (2013): Encyclopedia of Forensic Sciences. Academic Press, pp. 603-608.
- St ber, M., Reemtsma, T., (2004): Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 4. szám, pp. 910-916.
- Thomas, S. N. (2020): Contemporary Practice in Clinical Chemistry. Academic Press, pp. 171-185.
- Zarebska, M., Hordyjewicz-Baran, Z., Wasilewzski, T., Zajszy-Turko, E., Stanek, N., (2022): A New LC-MS Method for Evaluating the Efficacy of Pesticide Residue Removal from Fruit Surfaces by Washing Agents. *Processes*, 10, 4. szám, pp. 793.

Zhao, P., Fan, S., Yu, C., Zhang, J., Pan, C., (2013): Multiplug filtration clean-up with multiwalled carbon nanotubes in the analysis of pesticide residues using LC-ESI-MS/MS: Sample Preparation. *Journal of Separation Science*, 36, 20. szám, pp. 3379-3386.

Ivacs Vince

MELLÉKLET

M1 ábra

Név	Összetevők
Cola ízű szénsavas üdítőital	víz, fruktóz-glükóz szirup, szén-dioxid, szulfitos-ammóniás karamell, foszforsav, természetes aromák koffeinnel
Szüretlen világos búzasör	víz, búzamaláta, árpamaláta, komló, sörélesztő
Zubrowka Biala vodka	etanol, víz
Salátalé	víz, ecet, cukor, só

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a diplomamunkám elkészítéséhez nyújtott minden segítségét Marczika Andrásné Dr. Sörös Csilla Tanárnőnek.

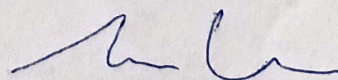
Ivacs Vince

Szerzői nyilatkozat

Alulírott Ivacs Vince (Élelmiszerbiztonsági és -minőségi mérnök MSc, nappali tagozat) kijelentem, hogy a *Posztharvest fungicidek kioldódásának vizsgálata italokban és levekben* című diplomamunka a saját munkám eredménye. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

Budapest, 2023. 10. 30.



a hallgató aláírása

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: MSc Élelmiszerbiztonsági és –minőségi mérnök

Diplomadolgozat készítés helye: Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

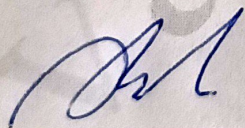
Hallgató: Ivacs Vince

A diplomadolgozat címe: Posztharvest fungicidek kioldódásának vizsgálata italokban és levekben

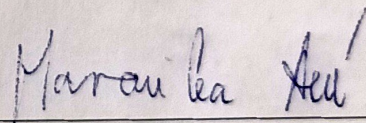
Konzulens: Marczika Andrásné Dr. Sörös Csilla

Külső konzulens esetén tanszéki felelős : -

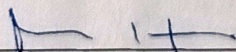
Beadás dátuma: 2023. 10. 30.



diplomadolgozat készítés helyének vezetője
Dr. Abrankó László



konzulens
Marczika Andrásné Dr. Sörös Csilla



Mohácsiné dr. Farkas Csilla
szakfelelős

NYILATKOZAT

a szakdolgozat, diplomamunka nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A szerző neve: Ivacs Vince

A dolgozat címe: Posztharvest fungicidek kioldódásának vizsgálata italokban és levekben

A megjelenés éve: 2023

A tanszék neve: Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomamunka egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom.

A leadott dolgozat, mely védett, a szerző nevének vízjelével ellátott pdf dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

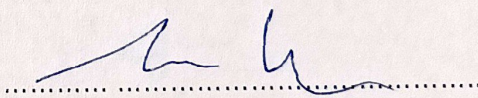
Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a MATE Budai Campus Igazgatóság Entz Ferenc Könyvtár és Levéltár szakdolgozat archívumába.

A dolgozat bibliográfiai leírása az Entz Ferenc Könyvtár és Levéltár elektronikus katalógusából érhető el: <http://opac3.entzferenc.uni-mate.hu/>. A teljes szöveg kizárólag a Budai Campus számítógépeiről tekinthető meg.

Tudomásul veszem, hogy a vízjel nélkül leadott dokumentum szerzői jogai sérülhetnek.

A Nyilatkozat a dolgozat adatainak megadásával érvényes, melyet az elektronikus hordozóval együtt leadok.

Budapest, 2023. 10. 30.



.....
a szerző aláírása