

DIPLOMADOLGOZAT

Csokai Lilianna Judit - Diplomadolgozat

Csokai Lilianna Judit

2023.



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

UHPLC-MS/MS analitikai módszer kidolgozása
és validálása cseresznye minták spirotetramát és
metabolitjainak meghatározására
törzsinjektálásos növényvédelmi kezelést
követően

Belső konzulensek: Marczika Andrásné dr. Sörös Csilla
egyetemi docens, MATE, Budai Campus, Élelmiszertudományi és
Technológiai Intézet, Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

Gyuris Rita PhD hallgató,
MATE, Budai Campus, Növényvédelmi Intézet, Rovartani Tanszék

Készítette: Csokai Lilianna Judit

Budapest

2023.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	1
1. A MUNKA CÉLJA.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. Cseresznye, mint gyümölcs.....	4
2.2. Cseresznye, mint nyersanyag.....	4
2.3. Háztáji cseresznyetermesztés.....	5
2.4. A cseresznye növényvédelmi nehézségei.....	5
2.5. Törzsinjektálás a növényvédelemben.....	8
2.6. A peszticidek szabályozása.....	11
2.7. A növényvédelem élelmiszerbiztonsági vonatkozásai.....	11
2.8. Növényvédőszer-maradékok vizsgálati gyakorlata.....	15
2.9. Spirotetramát, mint növényvédőszer-hatóanyag.....	18
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	20
3.1. Felhasznált anyagok.....	20
3.2. Felhasznált eszközök.....	20
3.3. Kezelések.....	21
3.4. Műszeres analitikai mérés technika kidolgozása.....	22
3.5. Mintaelőkészítés kidolgozása.....	23
3.6. Módszervalidálás.....	26
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	28
4.1. Műszeres mérés technika fejlesztése.....	28
4.2. Mintaelőkészítések összehasonlítása.....	31
5.3. Módszervalidálás.....	34
5.3.1. Kimutatási határ (LOD).....	34
5.3.2. Linearitás és mátrixhatás.....	35
5.3.3. Visszanyerhetőség és precizitás, meghatározási határ (LOQ).....	38
5.4. Kezelések eredménye.....	40
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	43

Jelölések, rövidítések jegyzéke

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography; High Pressure Liquid Chromatography)

LOQ: meghatározási határ (Limit of Quantitation)

LOD: kimutatási határ (Limit of Detection)

MS: Tömegspektrometria (Mass Spectrometry)

MSZ: Magyar Nemzeti Szabvány

ISO: A Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization for Standardization)

EB: Európai Bizottság

EK: Európai Közösség

SPIRO: Spirotetramát

GLU: Spirotetramát-enol-glükozid

MONO: mono-hidroxi-spirotetramát

KETO: cisz-keto-hidroxi-spirotetramát

ENOL: Spirotetramát-cisz-enol

MRL: Maximálisan megengedett szermaradék (Maximum Residue Limit/Level)

PSA: primer-szekunder-amin (primary secondary amine)

QuEChERS: mintaelőkészítési módszer; gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

VWR: A VWR International egy amerikai vállalat, amely kutatólaboratóriumi termékek forgalmazásával foglalkozik

ECD: Electron capture detector (elektronbefogadásos detektor)

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a növényvédő szerek alkalmazása általánosan elterjedt a mezőgazdaságban, segítve ezzel a megfelelő minőségű és mennyiségű élelmiszer kínálatot. Azonban a peszticidek használata nem veszélytelen, mivel ezeknek a kémiai anyagoknak a többsége toxikus hatású. Így felhasználásukat szabályozni és ellenőrizni szükséges a fogyasztók biztonsága érdekében, mert a kezelt termésben jelenlévő szermaradék kizárólag egészséget nem károsító mértékben lehet csak jelen.

A termelők célja az értékesíthető minőségű termékek termesztése és áruba bocsátása, melyhez szükséges az élelmiszerek minőségi követelményeknek való megfelelése és a fogyasztók számára történő élelmiszerbiztonsági alkalmassága.

A piacot a fogyasztói magatartás alakítja, de a szállítókra és termelőkre szigorú biztonsági és minőségi szabályok vonatkoznak. A fogyasztói igényekhez való igazodás mellett az előírt határértékek betartására is kell hangsúlyt fektetni. Az ehhez való megfelelést a hatóságok igazolják és ellenőrzik helyi, állami és nemzetközi szinten egyaránt hiszen a termésben a növényvédőszer-maradék a határértéket nem haladhatja meg és fogyasztókat nem veszélyeztetheti (Horváth, 2018).

A peszticid maradék meghatározása szabványokba foglalt előre meghatározott vizsgálatokkal történik. Folyadék- és gázkromatográfiás technikák használatával megfelelően vizsgálhatóak a szermaradékok, többek között a gyomirtó-szerek, rovarirtó-szerek, gombaölő-szerek.

Az alkalmazott készítmény hatóanyaga a mérendő komponens, amely kezelés után átalakulhat egy vagy több, aktív vagy más szempontból releváns metabolitá. Ilyen esetben az anyavegyületen kívül a növényi metabolizációs folyamatok termékeit is vizsgálni szükséges.

A növényvédelmi gyakorlat fejlődésével új technológiák látnak napvilágot, melyek során a metabolizációs utak eltérő módon alakulhatnak. Ilyen, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetemen folyó két doktori dolgozat témájaként szereplő törzsinjektálásos növényvédelem, mely a fás szárúak korszerű kezelési módja. Ennek során a hatóanyag fénytől, hőtől védve direkt módon a fa szállítórendszerébe kerül, mely esetben azonban a növényi metabolizációs folyamatok kifejezettebbek. Ezért fontos, hogy a technológiai

változtatással együtt a hatóanyag toxikokinetikai folyamatait is tisztázzuk, azaz feltérképezzük a metabolizációs termékeket.

Csokai Lilianna Judit - Diplomadolgozat

1. A MUNKA CÉLJA

A kutatás során a törzsinjektálásos növényvédelem eredményességét vizsgáltam szermaradék-analitikai módszerrel, különös tekintettel a metabolizációs termékek mennyiségi változására a kezelés során. A kezelés cseresznye növényvédelme kapcsán történt, Movento készítménnyel. A fa törzsébe injektált növényvédő szer a korábbi vizsgálatok alapján rendkívül hatásos a fő károsítók (levéltetű és cseresznyelég) ellen. A készítmény hatóanyaga (spiroetramát) egy propeszticid, ami a kezelés után egy aktív metabolitá alakul (spiroetramát-enol) a növényi metabolizációs folyamatok eredményeképpen. Ezen kívül további három metabolit (spiroetramát-ketohidroxi, spiroetramát-enolglükózid és spiroetramát-monohidroxi) megjelenését is mutatták korábbi nemzetközi tanulmányok (Zhang *et al.*, 2017). Ezért kutatásom során célul tűztem ki mind az öt vegyületre analitikai módszer kidolgozását és annak validálását. A kész módszerrel pedig a cseresznye szermaradék tartalmát határoztam meg, kiterjesztve a hatóanyagra és a négy metabolitra. A kutatás végén a különböző mintavételi időpontokban vett minták metabolizációs profilozását végeztem el, mely szemlélteti a propeszticid átalakulását az érés során. Ezúton információ nyerhető egy intenzíven metabolizálódó peszticid vegyület viselkedéséről endoterápia során.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Cseresznye, mint gyümölcs

A cseresznye a csonthéjasok családjának legkisebb tagja: *Rosaceae*, nemzetség: *Prunus*; alnemzetség: *cerasus* (meggy) és *avium*. A cseresznye gyümölcsminőségével kapcsolatos fő jellemzők a szín, az édesség, a savanyúság és a szilárdság (Ferretti *et al.*, 2010). Hazánk a világ más országaitól eltérően a meggyet és a cseresznyét külön fajként ismeri el. A cseresznye nagy szerepet játszik az egészséges táplálkozásban. Energiatartalma csekély, ami az alacsony szénhidrát-tartalomtól fakad. Táplálkozás-élettani értékét javarészt a természetben lévő vitaminok és ásványi anyagok határozzák meg (Barta *et al.*, 2007). A megfelelő minőségű terméseknek jó aromájuk, ízük és savtartalmuk van. A gyümölcsre jellemző karakter különböző savak, alkoholok, észterek révén alakul ki. A bennük található tápanyagok nyersen fogyasztva hasznosulnak legjobban a szervezetben, ám a gyümölcsszezon elteltével a téli hónapokban hűtött, fagyasztott vagy egyéb módon tartósított formában is megtalálható és biztonságosan fogyasztható. Az így tartósított gyümölcsök minimálisan kisebb táplálkozás-élettani értékkel rendelkeznek (Barta *et al.*, 2007).

Vitamintartalmát tekintve 100 g cseresznye fogyasztható része átlagosan 0,08 mg karotint, 50 µg B₁-vitamint, 20 µg B₂-vitamint, 8,0 mg C-vitamint, 0,1 mg niacint és 5 µg folsavat tartalmaz. Ásványi anyagokra nézve: 174 mg káliumot, 16,3 mg kalciumot, 16 mg magnéziumot, 0,3 mg vasat, és 20 mg foszfort tartalmaz. Ezen kívül 83,6 g víz, 0,8 g fehérje, 14,0 g szénhidrát (glükóz, fruktóz), valamint 0,7 g sav alkotja, ami 267 kJ energiának felel meg. Ezek alapján a sav-cukor hányados 0,07, míg a meggyben ez az érték 0,20, ennek köszönhetően a cseresznye édesebb ízű, miközben a meggy tartalmaz több cukrot, de sokkal nagyobb savtartalommal párosul (Kanyó *et al.*, 2007; Barta *et al.*, 2007, Dr. Salgó 2009).

A C-vitamin szükségletünk főbb részét a gyümölcsök fogyasztásával elégíthetjük ki, ennek fontos forrása a cseresznye (Kanyó *et al.*, 2007).

2.2. Cseresznye, mint nyersanyag

A cseresznye tápanyagtartalma a termés minőségi attribútumaitól is függ, ami a feldolgozás során az elsődleges besorolási szempont. Hiszen megfelelő minőségű késztermékek előállításához kizárólag érett, romlatlan, sérülésmentes (nem nyüves), lehetőség szerint tiszta, a gyártási célnak megfelelő fajtájú cseresznyéből lehetséges (Barta *et al.*,

2007). Ezek a követelmények termékcsoporthoz lebontva szerepelnek a Magyar Élelmiszerkönyvben.

A Magyar Élelmiszerkönyv a 2-604 számú irányelvében előírja, hogy a gyorsfagyasztott meggy (*Prunus cerasus L.*) I. és II. osztályú termék esetén a minta maximum 2 m/m % -a lehet cseresznyelég által fertőzött. A rendelet külön nem tér ki a cseresznyére, mivel az rendszertanilag (nemzetség) megegyezik a meggyel. Fontos kiemelni, hogy mindkét gyümölcs esetén befőttek és egyéb termékeket tekintve a nyüvesség 0%-ban elfogadott a nyersanyag átvételénél. A kukacosság, azaz a cseresznyelég lárvájának jelenléte ugyanis rontja a termés minőségét, ezáltal azt feldolgozásra alkalmatlanná teszi. A további minőségi és élelmiszerbiztonsági jellemzők szubjektív, érzékszervi megítélés alapján, vagy objektív, műszeres adatok alapján történnek. Peszticid szermaradék esetében nagyműszeres vizsgálatok indokoltak, illetve az Európai Unió által előírt határértéknek (vagy szerződésben kötött szigorúbb feltételeknek) történő megfelelés vehető alapul (Barta *et al.*, 2007).

2.3. Háztáji cseresznyetermesztés

A kiskerti cseresznye termesztés során éppúgy, mint a nagyüzemi gyakorlatban gyakran előfordul a cseresznyelég kártétele. Ennek kapcsán a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Élelmiszerbiztonsági és Kockázatértékelési és a Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezet-védelmi osztály az alábbiakat közölte: a gyümölcslegy lárvája a termésben nagyon ritkán okozhat allergiát (cseresznyenyű fehérje allergia), de nincs adat arról, hogy az egészségre káros volna. A termesztés során a később érő fajtákat károsítja főként a rovar, azonban már egyre több olyan új fajta ismert a piacon – pl. a *Bigarreau Burlat* -, melyet a cseresznyelég nem károsít (Internet 11).

A háztáji gyümölcsösökben a gyümölcslegy elleni védekezés fenntartásával az otthoni termelők segíthetik a kereskedelmi cseresznyeipart (Internet 2). A háztáji termesztés során növényvédelmi célból alkalmazhatóak peszticidek, ugyanakkor ez a gyakorlat tudatosságot igényel, ugyanis ismerni kell a növényvédő szerekkel kapcsolatos előírásokat (például megfelelő dózis, Élelmiszer-egészségügyi Várakozási Idő). A háztáji gyakorlatot nagyban nehezíti, hogy kertekben álló cseresznyefák magasak, széles lombozattal rendelkeznek, ezért permetezési védelmük nehezen, vagy nem megoldható (Internet 12).

2.4. A cseresznye növényvédelmi nehézségei

Az európai cseresznyelégyc (*Rhagoletis cerasi*) az egyik legfontosabb kártevője a cseresznyének. A légy az érésben lévő cseresznye héja alá, a húsába helyezi tojását, majd benne táplálkozik a nyű, melynek testhossza akár 3,5-4 mm is lehet (Internet 3). Az imágók teste tömzsi, fényes, sötétfoszforsárga-fekete és a *notum*-on (rovar mellkasi szegmensének hátsó része) ezüstös foltok láthatók. Az imágók szárnyai átlátszóak, négy sötét csíkkal borítva keresztirányban. Szemeik zöldek, vöröses beütéssel. A fej barna színezetű, míg a *scutellum* (*mesotonum* hátsó része) és a lábak sárgák (Internet 1, Internet 2, Caroll. *et al.*, 2002).



1.ábra: Európai cseresznyelégyc imágó

(Internet 15)

2.ábra: Európai cseresznyelégyc nyű

(Internet 16)

A nyűvek (2.ábra) május végétől július elejéig találhatók meg a termésben. A lárvák a termésében fejlődnek és a cseresznye húsával táplálkoznak. Később a lárvák elhagyják a gyümölcsöt, és a talajban bábozódnak be, ahol képesek a telet átvészelni. Ezt a gyümölcslegyet (1.ábra) Európában és Ázsiában a cseresznyetermesztés legfontosabb kártevőjeként tartják számon. Ugyanakkor károsíthatják a kajszibarack, a lonc, a borbolya, és a madárcseresznye termését is. A fertőzött gyümölcsök idő előtt megpuhulnak, rajtuk barna foltok alakulnak ki, megfonnyadnak, és lehullanak a fáról. A táplálkozást követően a kifejlesztett lárva kilépési lyukat rág a termésen és elhagyja a gyümölcsöt. Az így kialakult seb másodlagos kórokozók melegágya (pl. gyümölcsmonília), melyek gyors terjedése a teljes termésmennyiséget eladhatatlanná teszi. A cseresznyelégyc által okozott kár kezelés nélkül akár 100%-os gyümölcsvesztést is okozhat hazánkban és a világ számos területén, fogyasztásra alkalmatlanná téve a termést (Internet 1, Internet 2).

A kártétel mértéke a korábban részletezett alacsony nyüvességi toleranciaszint miatt szükségessé tette a tökéletes védekezést. Ennek érdekében a védekezés történhet vegyszermentesen (ami például a bio termékek előállításának alapfeltétele) vagy vegyszerrel. A peszticidmentes védekezési lehetőségek közé tartozik a korai és teljes betakarítás, a gyümölcsösök tiszta talajának fenntartása a lehullott gyümölcsök eltávolításával, a vadon élő és elhagyott gazdafák eltávolítása, valamint a kizáró háló elhelyezése a fákon. Ezenkívül a fák lombkoronája alatti talaj-borítással, gyomelhárító szövetrel vagy mulccsal való lefedése segít megakadályozni, hogy a lárvák a talajba fúródjanak, vagy a kifejlett egyedek a talajból kikeljenek (Internet 2). Daniel és munkatársának 2013-as kutatásai alapján a talajtakaró háló 77%-kal csökkentette a repülési aktivitást a gyümölcslegyek körében és 91%-kal kevesebb gyümölcsfertőzés történt a védekezésnek köszönhetően (Daniel *et al.*, 2013). Vegyszeres védekezés esetén a kifejlett egyedeket célzó rovarölőszeres permetezés az elsődleges taktika a cseresznyelég ellen. Ugyanis a lárvák a gyümölcsben fejlődnek, ahol a legtöbb rovarölő szerrel szemben védve vannak (Internet 2). Kiemelendő, hogy betakarításnál figyelembe kell venni a növényvédő szerek élelmezésegészségügyi várakozási idejének (ÉVI) hosszát (Kanyó *et al.*, 2020).

Magyarországon a *Rhagoletis cerasi* ellen engedélyezett rovarölő szerek az 1. táblázatban szereplő hatóanyagokkal rendelkeznek. Jól látható, hogy az alapengedéllyel rendelkező rovarölő szerek többségének biológiai spektruma a cseresznyeléggyre irányul, csupán néhány célozza a második fontos kártevőjét, a fekete cseresznye- és meggy levéltetűt (*Myzus cerasi*). A különféle szerek használata mögött a rezisztencia kérdése is rejlik. Ugyanis a rezisztencia kialakulásának csökkentése érdekében változtatni kell a rovarölő szerek osztályait/hatásmódjait (Internet 2).

1. táblázat: cseresznyeléggy ellen használható növényvédő szerek, azok hatóanyagai és biológiai spektrumuk

<i>Növényvédő szer</i>	<i>Hatóanyag</i>	<i>Biológiai spektrum</i>
Decis és Decis Mega	deltametrin	cseresznyeléggy, levéltetvek
Exirel	ciantraniliprol	cseresznyeléggy
Judo	lambda-cihalotrin és pirimikarb	cseresznyeléggy, levéltetvek
Kaiso EG, Karate Zeon 5 CS és Lamdex Extra	lambda-cihalotrin	cseresznyeléggy, levéltetvek

Mospilan 20 SG	acetamiprid	cseresznyelégység, levéltetvek
Movento	spirotetramát	levéltetvek, pajzstetvek

Számos kutatás készült a különféle szerek hatékonyságát vizsgálva a cseresznye károsítói ellen, ezek nagy része már nem engedélyezett toxikológiai tulajdonságuk miatt. Azonban a korábbi kutatásokból is rengeteg következtetés levonható a témával kapcsolatban. Példának okáért 2006-ban Wee és Diane a növényvédő szerek hatását vizsgálták kifejlett és lárvakori cseresznyelegeken (Wee *et al.*, 2006). Eredményeik azt mutatták, hogy a spinozád hatóanyag volt különösen hatásos a kifejlett egyedek ellen, de kevésbé volt hatékony a lárvák ellen. A rovarölő szerek gyümölcsbe való behatolásával kapcsolatban kimutatták, hogy a neonikotinoid rovarölő szerek némelyike áthatol a héjon, és a gyümölcsben lévő rovarpetéket és lárvákat elpusztíthatja (Wee *et al.*, 2006). Így megállapítva, hogy a szerek hatásossága eltérő lehet abban, hogy a kártevőt mely életszakaszában képesek elpusztítani. Dainel és Grunder pedig 2012-ben felismerte az Európai Unió cseresznyeültetvényei veszélyeztetve vannak a már ismert kártevő miatt több szempontból is. Ugyanis Daniel és Grunder szerint a sérült gyümölcsökkel szembeni alacsony tolerancia miatt a piacképes termés érdekében megelőző rovarölő szerek kezelésekre van szükség. Azonban a régi rovarölő szerek fokozatos kivonása az egész Európai Unióban (EU) veszélyezteti a cseresznyetermesztést. (A betiltott szerek veszélyessége nem kérdés, de a helyüket új biztonságosabb peszticidekkel kell pótolni, különben a megmaradt néhány készítmény váltott használatát nem lehet biztosítani és ez rezisztencia kialakulásához vezet.) A védekezés technikai megvalósítása a permetezés, mely technika korlátozza a hatóanyag elsodródása a kezelés során, ezáltal elkerülhetetlen a környezetszennyezés. További korlátként említhető, hogy a módszert megakadályozhatja, ha nem megfelelőek az időjárási körülmények (szél, eső, magas hőmérséklet), s csak a megfelelő méretű fákat lehet hatékonyan kezelni (magassági korlátok). Következésképpen új kezelési technikákra és eszközökre van szükség (Daniel *et al.*, 2012). A felsorolt problémák kiküszöbölésére megfelelő megoldást jelenthet a törzsinjektálással történő növényvédelem (Internet 12).

2.5. Törzsinjektálás a növényvédelemben

A törzsinjektálás során a növényvédő szerek célzott bejuttatását értjük a fás növények szárába vagy törzsébe a permetezés alternatívájaként. Ezt endoterápiának is nevezzük. Ez a

növényvédelemi módszer a 12. századig nyúl vissza, amikor az arab kertészek illatanyagokat, fűszereket, színezékeket és más anyagokat juttattak be a növényeken lévő sebeken keresztül a virágok és gyümölcsök illatának, színének vagy más tulajdonságainak befolyásolására (Roach 1939). Az első dokumentált törzsinjekciós kísérlet a 15. századból származik, Leonardo da Vincitől (Roach 1939), aki mérgező oldatokat és arzént fecskendezett almafákba, hogy megmérgezze a gyümölcsöt, feltehetően azért, hogy megakadályozza a lopást (Leigh *et al.* 2021). Majd az 1900-as évek elejéig tovább kísérleteztek különböző tápoldatok befecskendezésével a tápanyaghiány leküzdésére, valamint különböző szerves és szerves anyagok befecskendezésével a rovar-, gomba- és egyéb betegségek leküzdésére Leigh és munkatársainak 2021-es összegzése alapján (Leigh *et al.* 2021).

Az 1900-as évek elején és közepén a gyümölcsfák injektálására nem sok publikus információ érhető el. 1956-ban Harries kutatása újításnak számított, melyben cseresznyefába injektált növényvédő szer hatásosságát figyelte a rovarok és atkák ellen. Az alábbiakat figyelte meg cseresznyefáknál végzett kísérletek során: a vízoldható vegyületek oldatai, mint a triklórfon és a demeton-S-metil, gyorsan transzlokálódtak a cseresznyefák leveleibe és megfelelő védelmet nyújtottak a kétpettyes pókhálós atka ellen. Számos oldószer és oldat az alkalmazott dózisokban fitotoxikus volt, és jelentős csíkozódást vagy egyenetlen eloszlást okozott a különböző fák ágain, mivel az anyagok sokkal gyorsabban mozogtak hosszanti irányban, mint keresztirányban az injektálás beadásának helyétől.

Jelenleg a gyümölcsfák injektálása a közterületi növényvédelem terjedt el (vadgesztenye aknázólégy ellen, azonban a gyümölcstermesztési gyakorlatban nem jellemző, de ahogy a technika fejlődik, egyre inkább igény mutatkozik ennek bevezetésére. A szakirodalomban sokféle hatóanyagot alkalmaznak, melyek leginkább a régi hatóanyagcsoportokból kerülnek ki, de találkozunk modernebb megoldásokkal is, mint például a tavaly publikált kutatásban szereplő spirotetramát (Nickolas *et al.*, 2022). Nickolas és munkatársai törzsinjektálást végeztek 2 éven keresztül eperfában a darázscincér (*Xylotrechus chinensis*) ellen 3 növényvédő hatóanyaggal (spirotetramát, fipronil, imidakloprid). A kutatás eredményeképpen a fipronil és imidakloprid bizonyult a leghatásosabbnak (Nickolas *et al.*, 2022).

Összességében elmondhatjuk, hogy a törzsinjektálás módszere tehát egyfajta növény-egészségügyi-kezelésnek számít. Alkalmazása során peszticideket és/vagy tápanyagokat juttatnak közvetlenül a fa szállítószövetébe, azaz a xilémbe. A xilém egy ligifikált szövet, amelyen keresztül a folyadékokat egyik részéből a másikba szállítja a növény.

A kezelés az alábbi lépésekből áll: (i) lyukak fúrása a fa törzsébe, (ii) injektáló eszköz segítségével a növényvédő szer bejuttatása a fa xilém rétegébe a furaton keresztül (3. ábra), végül (iii) a furat lezárása erre alkalmas sebkezelővel.



3.ábra: Törzsinjektálás gyakorlata

Az endoterápia során a bejuttatott készítmény a fa szállítórendszerén keresztül (xilém) rövid idő alatt a lombzatba és a gyümölcsbe jut, ezáltal elpusztítja a gyümölcshúsban lévő lárvát vagy akár a tojást is. Ezzel a módszerrel csökkenthető a kijuttatott hatóanyagmennyiség, hiszen azt a táplálkozó lárvák közvetlenül veszik fel, így nagyobb a szer hatékonysága. A zárt xilém rendszer védi a hatóanyagokat az abiotikus transzformáló hatásoktól, mint pl. a napfény. A levelek nem perzselődnek, mint a helytelen permetezési eljárás során, az állat és növényvilágot sem befolyásolja a kezelés, hiszen nincs elsodródás, a kezelés sokkal inkább célzott (Kiss *et al.*, 2021, Internet 7).

Az injektálás előnyei közé tartozik, hogy egyes peszticidek hatása több évig is tarthat a kezelés után, így a kártétel hosszabb távon kivédhető, valamint az endoterápiás növényvédelem időjárástól függetlenül elvégezhető. Bármekkora magasságú fa esetében képes a peszticidet egyenletesen eloszlatni és annak védelmét biztosítani. Érdekességként említhető, hogy az EU növényvédőszer-ellenes közegében elfogadott az injektálás, ugyanis az környezetkímélőnek minősül (Internet 12).

Jelentős információ, hogy míg permetezéssel bármelyik növényfaj megvédhető, addig a törzsinjektálásnál jelenleg a 4. ábrán szereplő fafajok injektálhatóak. Ennek oka az, hogy bizonyos morfológiai bélyegek (pl. törzs tömörsége) megakadályozza a hatóanyag ilyen módon történő szállíthatóságát (Internet 12).

Fafajok injektálhatósága (öt milliliter víz fába préseléséhez szükséges időtartam alapján)	
Nem injektálhatók	bálványfa (<i>Ailanthus altissima</i>), lepényfa (<i>Gleditsia triacanthos</i>), csörgőfa (<i>Koelreuteria paniculata</i>)
Alig injektálhatók	mezei juhar (<i>Acer campestre</i>), hegyi juhar (<i>Acer pseudoplatanus</i>), szivarfa (<i>Catalpa bignonioides</i>), fehér akác (<i>Robinia pseudoacacia</i>)
Nehezen injektálhatók (>60 mp)	zöld juhar (<i>Acer negundo</i>), korai juhar (<i>Acer platanoides</i>), japán akác (<i>Sophora japonica</i>)
Injektálhatók (30-60 mp)	vörös kőris (<i>Fraxinus pennsylvanica</i>), fekete dió (<i>Juglans nigra</i>), körte (<i>Pyrus communis</i>), kajszi (<i>Prunus armeniaca</i>), cseresznye (<i>Prunus cerasifera</i>), mandula (<i>Prunus dulcis</i>), őszibarack (<i>Prunus persica</i>)
Könnyen injektálhatók (<30 mp)	piros virágú gesztenye (<i>Aesculus x carnea</i>), vadgesztenye (<i>Aesculus hippocastanum</i>), nyír (<i>Betula pendula</i>), törökmogyoró (<i>Corylus colurna</i>), cseregalagonya (<i>Crataegus laevigata</i>), dió (<i>Juglans regia</i>), alma (<i>Malus domestica</i>), perzsa varázsfa (<i>Parrotia persica</i>), európai platán (<i>Platanus x hispanica</i>), oszlopos kínai nyár (<i>Populus simonii Fastigiata</i>), kocsányos tölgy (<i>Quercus robur</i>), szomorú fűz (<i>Salix alba Tristis</i>), házi berkenye (<i>Sorbus domestica</i>), ezüst hárs (<i>Tilia tomentosa</i>), vénic szil (<i>Ulmus laevis</i>)
Forrás: Guterath Ádám	

4.ábra: Fafajok injektálhatósága (Internet 12)

2.6. A peszticidek szabályozása

A növény injektálásos védelme esetén is (mint ahogy a permetezésnél is) megjelenik a természetben a peszticid. Így a fogyasztás, feldolgozás előtt meg kell győződni arról, hogy a szermaradék kellően kis mennyiségben van jelen a szüret után. Ennek érdekében az alkalmazható növényvédő szerek használatát szabályozzák.

Az Európai Unió 1107/2009/EK rendelet az irányadó a peszticidek biztonságos alkalmazását tekintve. A rendeletben szereplő szabályok az EU-ban történő növényvédő szer értékesítésre, ellenőrzésre és alkalmazásra térnek ki. Országoként eltérhetnek az engedélyezett készítmények, köszönhetően a piaci igényeknek, valamint a korlátozásoknak és követelményeknek, amik a növényvédő szerek jóváhagyásához elengedhetetlenek, például minimális tisztasági fok, alkalmazás feltételei és módja, valamint a készítmény típusa. Egy hatóanyag 10 évre kaphat engedélyt nemzetközi hatóságok által, majd meghosszabbítva maximum 15 évre. Kérelem alapján lehetséges a hatóanyag jóváhagyásának igénylése a nemzeti hatóságokon keresztül a szükséges tájékoztatás mellékelésével, aminek elbírálása akár 12 hónapig is eltarthat. Kérelmezhető a hatóanyag használata egy másik uniós országban is, ha a kérelmező rendelkezik már engedéllyel valamelyik EU országban a kölcsönös elismerési eljárás segítségével (1107/2009/EK).

2.7. A növényvédelem élelmiszerbiztonsági vonatkozásai

Biztonságos élelmiszerhez az egész élelmiszerláncot, mint folyamatot kell nyomon követni addig, amíg az élelmiszer a fogyasztóhoz nem kerül (termőföldtől az asztalig). A lánc

szereplői a mezőgazdaság, az élelmiszeripar, a kereskedelem és a fogyasztók egyaránt közvetett vagy közvetlen hatással vannak az élelmiszere (Kádár, 2016).

A mezőgazdasági és kiskerti növénytermesztésben használt vegyi anyagok, növényvédő szerek, azaz peszticidek (gyom-, rovar-, rágcsáló-, és gombairtók) maradékai jelenhetnek az élelmiszerekben. Összetételükből és hatásmechanizmusukból adódóan a legtöbb növényvédő szer bizonyos koncentráció felett mérgező, így közvetlenül, vagy közvetve veszélyt jelenthet az ember számára. Tehát szigorú szabályozás és ellenőrzés alatt áll a használatuk. Mindez kiterjed a forgalomba hozandó, feldolgozandó nyersanyagra és nyers élelmiszere egyaránt, figyelembe véve a szerrel történő kezelés utáni élelmezés-egészségügyi várakozási idő leteltét és a szermaradék mennyiségének határérték túllépését (Kádár, 2016).

A tudomány mai állása szerint az élelmiszerek nagyon ritkán mentesek a szennyező anyagoktól, így a minőség mellett a biztonságra is megfelelő hangsúlyt kell fektetni. A biztonsági tényező általánosan a nem hatásos dózis 10^1 - 10^4 -szerese, átlagosan 10^2 -szeres. Tehát az érzékeny egyének érdekében százszoros biztonságúra szükséges korlátozni a szermaradék határértékeket.

A növényvédelemben az élelmiszerbiztonsági előírásoknak történő megfelelést az engedélyező és az ellenőrző hatóság biztosítja. Garantálva azt, hogy növényvédő szerek előírásnak megfelelően lettek-e felhasználva, ezáltal a termelt gyümölcsök megfelelnek-e az élelmiszerbiztonsági követelményeknek. Az ellenőrzés alá tartoznak a szermaradék vizsgálatok is, ahol információt kapunk a növényvédő szerek előírás szerű felhasználásáról és a fogyasztókat érő növényvédőszer-maradék expozícióról. Ezeket a Regionális Szermaradék-analitikai Laboratóriumok végzik, akik a Nemzeti Élelmiszerbiztonsági Hivatalhoz tartoznak, ahol a friss zöldségek, gyümölcsök esetében az import, export, termőhelyi és piaci vizsgálatokra, valamint növényi alapú feldolgozott élelmiszerekre, bébi ital-ételekre és környezetvédelmi vizsgálatokra kerül sor (Kádár, 2016). A következő tényezőkre helyezi a hangsúlyt a szabályozás: az alkalmazott koncentrációra, a várakozási időre (hogy megfelelő mértékben lebomolhasson a szer), és az alkalmazás módjára és összmenyiségére. A megfigyelt és vizsgált szermaradványok listája folyamatosan bővül, köszönhetően az újabb és újabb szerek fejlesztésének és alkalmazásának. Így az élelmiszerláncba bekerülő szennyező anyagok sorát is változás kíséri. Ezzel számolni kell

és ezt körültekintő analitikai ellenőrzéssel, fegyelmezett technológiai felhasználással és a felesleges dózisos elkerülésével lehet kordában tartani (Salgó, 2009).

A 396/2005/EK rendelet felső határértékeket (MRL-Maximum Residue Level) állapít meg és rendelkezik azokról növényvédőszer-maradékokra. Az MRL rendelet szerinti fogalma:

„A megengedett növényvédőszer-maradék határértéke az élelmiszerben vagy takarmányban, illetve azok felületén előforduló növényvédőszer-maradék koncentráció szintjének engedélyezett felső értéke, amelyet az Európai Parlament és a Tanács 396/2005/EK rendeletének megfelelően állapítanak meg, és amely a jó mezőgazdasági gyakorlaton, valamint a veszélyeztetett fogyasztók védelméhez szükséges legalacsonyabb fogyasztói expozíción alapul” (396/2005/EK rendelet).

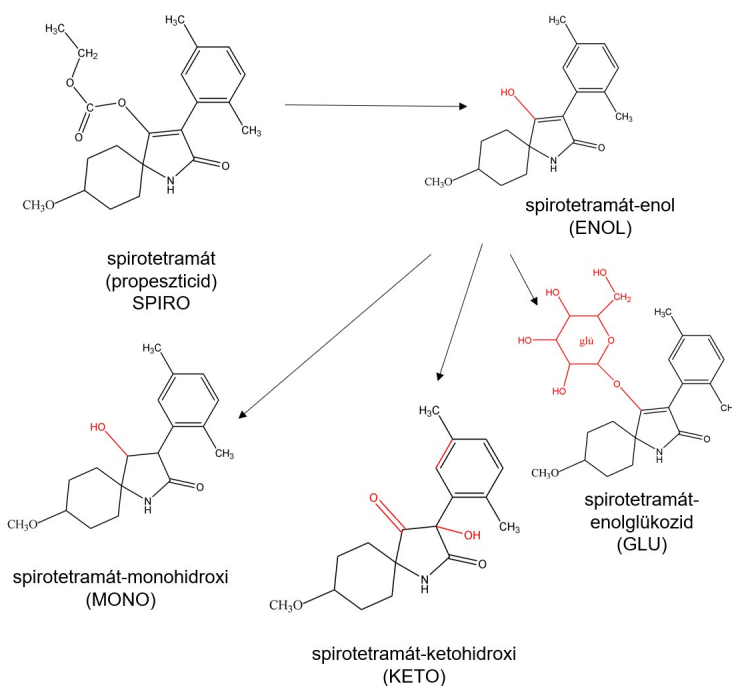
Tehát az MRL (Maximum Residue Limit), a maximálisan megengedhető „szermaradék szint” az a legmagasabb peszticid maradék koncentráció, amely jogilag elfogadott. Ez a határérték peszticidenként és élelmiszerenként változik, s általános mérvadóként 0,01 mg/kg alapértelmezett határérték szerepel mindazon élelmiszerekre, ahol határérték nem került külön megállapításra. Az engedélyezett MRL egy online folyamatosan frissülő peszticid adatbázisban szerepel az Európai Bizottság vezetésében EU Pesticide Database néven. Itt látható az egyes peszticidek engedélyének státusza, veszélyességi osztálya és az egyes toxikológiai paraméterek adatai is az MRL határértékek mellett (ARfD, AOEL és ADI) (Internet 8).

A fentebb említett szermaradék definíció számos metabolitot is magába foglal, mivel a hatóanyagok képesek átalakulni és ennek következtében már az átalakult vegyületek is megtalálhatóak a növényben. Ezek a vegyületek az anyavegyülethez hasonlóan toxikusak lehetnek bizonyos dózisban, így ilyen esetekben metabolitokra lebontva is rendelkezik MRL határértékről az Európai Bizottság.

Példának okáért a spirotetramát hatóanyag esetében is tartalmaz az EU peszticid adatbázisa az anyavegyületre és az egyik (spirotetramát-enol) metabolitjára MRL határértéket mely 3 mg/kg friss cseresznyére nézve (azaz spirotetramát + spirotetramát-enol, spirotetramátban kifejezve) (Internet 6). Érdekesség azonban, hogy 2019-ig négy metabolit szerepelt a meghatározott MRL definícióban az EU szermaradék szabályozás során (5. ábra). Ezt követően metabolizációs vizsgálatok, maradékanyag-vizsgálatok és toxikológiai kockázatértékelés szerint változtattak az előíráson. A módosítás szerint nem szükséges mindegyik metabolit mennyiségét vizsgálni az élelmiszerben, csupán az

anyavegyület és a spirotetramát-enol forma mérése előírt (Internet 10). A 5. ábrán látható módon alakul ki a négy metabolit az anyavegyületből, ahol a két felső vegyület (SPIRO és ENOL rövidítéssel jelölve) mennyisége van MRL határértékhez kötve, jelenleg.

A hatóanyagnak megnevezett vegyület (SPIRO) képes biokémiai folyamatok útján átalakulni aktív hatóanyaggá, ezt másnéven a spirotetramát propeszticid tulajdonságának nevezzük. A belőle keletkező spirotetramát-enol hidrolízissel jön létre az anyavegyületből, közepesen hidrofíl ($\log P = 2,7$) és gyenge savas karakterrel rendelkezik ($pK_a = 4,8$), ennek köszönhetően floémszisztémikus kinetikai tulajdonság jellemzi, amely rendkívül kedvező a növényvédelmi gyakorlatban, ugyanis kétirányú (felfele és lefele, ambimobil) transzlokációt jelent (Sörös, 2019; Arnaudov *et al.*, 2020). A hatóanyag mozgóképességét tehát a belőle képződő degradációs termékek nagyban befolyásolják, amelyek mind jelen vannak a növényi részekben a kezelés után, beleértve az élelmiszerként fogyasztandó termést is.



5.ábra: A spirotetramát metabolitok képződésének útjai (és a dolgozatban használt rövidítései)

Yulong és munkatársai 2013-as kutatásuk során a spirotetramát metabolitikus folyamatait követték nyomon gyümölcsökben és zöldségekben. UHPLC-MS/MS technológiával és QuEChERS mintaelőkészítéssel jó specifitással sikerült elválasztaniuk az 5 célvegyületet 6 perc alatt. A vizsgált minták között szerepelt a cseresznyéhez hasonló csonthéjas termés is

(barack). Összegezve az eredményt, kiváló linearitás, ismételhetség, pontosság, precizitás, szelektivitás és megfelelő visszanyerési értékeket kaptak (14% alatti RSD-vel), alacsony LOD és LOQ értékekkel, így a módszer megbízható és hatékonyak bizonyult a spirotetramát-szermaradvány rutinszerű ellenőrzésére gyümölcs- és zöldségmintákban (Yolung *et al.*, 2013).

2.8. Növényvédőszer-maradékok vizsgálati gyakorlata

A peszticid maradványok meghatározása során a vizsgálandó anyagból mintavétel történik, majd az azonosítandó anyag kivonása és ennek tisztítása, végül pedig a minőségi és a mennyiségi meghatározás következik. Kizárólag megfelelően tervezett és lebonyolított mintavételből készülhet megbízható vizsgálati eredmény. A vett minta a tétel különböző részeiről kell, hogy származzon, s ezt homogenizálva reprezentálhatja a teljes tétel szermaradék tartalmát. A mintaelőkészítésének legfontosabb eleme az analit kivonása a mintamátrixból. Ezt követi a kivonat tisztítása és szűrése a mérési eredmény pontosabbá tételéhez és a mérés zavartalan kivitelezéséhez (az esetleges zavaró komponensek a mérési eredményt eltorzítják, esetleg a műszerben is kárt tehetnek) (Tömösközi *et al.*, 2014).

A következő szabványok, rendeletek és útmutatók adnak keretet a mintavételekhez és mérésekhez peszticid szermaradék analízis esetén.

MSZ EN 15662:2018-as szabványnak megfelelően határozható meg növényi eredetű élelmiszereknek peszticid szermaradéka. Az alkalmazott ún. „QuEChERS” módszer-t a 2000-es évek elején fejlesztették ki (Anastassiades *et al.*, 2003), de számos változata is használatos (Anastassiades *et al.*, 2007; Lehotay *et al.*, 2005). Ez a mozaikszó a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, azaz a Gyors, Egyszerű, Olcsó, Hatékony, Robusztus és Biztonságos tulajdonságokat takarja. A módszer nagy előnye, hogy a tisztítási és extrakciós lépéseket leegyszerűsíti, valamint akár 300-500 eltérő növényvédőszer-maradék kinyerésére is alkalmas egymás mellett, köszönhetően a kompomisszumos oldószerválasztásnak. A labor műszerezettségétől függ a meghatározható hatóanyagok köre.

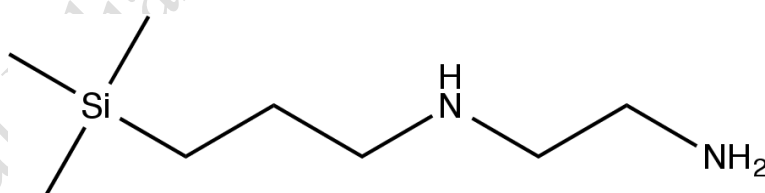
A Codex Alimentarius Főbizottság és az Európai Bizottság útmutatói a vizsgálatok megfelelő minőségének biztosítását szolgálják (Codex Alimentarius Commission, 1999; Codex Alimentarius Comission, 2017; SANTE 18813/2017). Az analitikai vizsgálat lépéseit és a lépésekhez szükséges feltételeket meghatározzák ezen dokumentumok a mintavételtől kezdve az eredmények kiértékeléséig. Az alábbi rendeletek élelmiszer és

takarmány mintavételezést foglalják magukba: EB 2002/63/EK; EB 152/2009/EK. A követelmények közé tartozik a megfelelő tárolási és szállítási körülmények biztosítása (alacsony hőmérséklet), dokumentációja. Ugyanis a minta szermaradék tartalma nem változhat (elpárolgás, bomlás) a megbízható mérés érdekében.

A műszeres szermaradék-meghatározást a SANTE 11312/2021-es útmutató alapján történő validálás és módszerfejlesztés előzi meg. Valamint az ISO/IEC 17025 sztenderd (ISO 2017) az általános követelmény a laboratóriumokkal szemben melyek az ellenőrző vizsgálatokat végzik, e szerint akkreditálva kell legyenek és elvárt a rendszeres jártassági tesztekben való részvétel. Az EU Referencialabor adatbázis (EB, 2018) segíti a szermaradék mérésért felelős analitikai laboratóriumok munkáját, ahol regisztrációt követően a peszticid maradék vizsgálathoz hasznos információk szerepelnek (Horváth, 2018).

A SANTE 11312/2021 -es útmutató és a MSZ EN 15662:2018 szabvány külön kitér a különböző növényi termékekre és növényvédő szerekre, s ettől függően szabályozza az eljárást. Kiemelendő a mintaelőkészítési rész, ahol fontos szerepet játszik a tisztító szorbensek használata és azok használatának eltérése az egyes mátrixoknál.

Az egyik fontos tisztító szorbens a primer szekunder amin (6. ábra: PSA) amely szabványos QuEChERS mintaelőkészítés során a gyümölcssavak eltávolítására szolgál. Ez egy gyenge anioncserélő SPE-szorbens, amely erős savak és polisavas vegyületek vizes mintákból történő kivonásánál használatos (Internet 13).



6.ábra: PSA szorbens képlete (Internet 14)

A savak kivonása ajánlatos, ugyanis zavarhatják a mérés technikát, ezáltal csökken a mérés érzékenysége. Ugyanakkor savas karakterű peszticidek esetén alkalmazásukat felül kell vizsgálni, hiszen kivonják a mérendő alkotót is a mintából, így alulmérést eredményeznek. Ilyen savas karakterrel rendelkezik a spirotetrmát enol is, így ez esetben is kérdéses, hogy a szorbens használatából származó haszon vagy az abból fakadó hiátus lehet a nagyobb probléma. A cseresznye esetében a szabvány szerint javasolt citrát-pufferelt QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) módszer, valamint a növényi eredetű

élelmiszermintákhoz ajánlott nagyműszeres peszticid szermaradék meghatározási módszer használatos (MSZ EN 15662; 2018).

A PSA használata Junli és munkatársai szerint nem zavarta a mérést, mikor 2023-as kutatásukban a spirotetramát és négy metabolitjának koncentrációját vizsgálták UHPLC-MS/MS technológiával káposzta mátrixban. Az általuk használt QuEchERS mintaelőkészítés megfelelő volt az analit kinyerésére, az átlagos visszanyerése a káposztában 74~110% volt, míg a relatív szórás (RSD) 1~6%, a mennyiségi határérték (LOQ) pedig 0,01 mg kg⁻¹ volt. A spirotetramát maradványa így <0,05~0,33 mg/kg tartományban volt, a krónikus étrendi kockázat 17,56%, az akut étrendi kockázat pedig 0,025~0,049% volt, ami elfogadható étrendi beviteli kockázatot jelent.

Spirotetramát vizsgálata során a metabolizációs terméke(i)re is figyelemmel kell lenni, ennek tudatában a mintaelőkészítést és az analízist is minden vizsgálandó vegyület tulajdonságaihoz kell igazítani.

A peszticid szermaradék meghatározás GC vagy LC-MS/MS módszerrel (MSZ EN 122393:2014) is megvalósítható. A detektálást tekintve GC esetén ECD-vel (elektronbefogadós detektor) vagy MS-el (tömegspektrométer) történhet. A felsorolt vizsgálati lehetőségek közül a spirotetramát gyümölcs (pl.: cseresznye) mátrixból folyadékkromatográfiás fordított fázisú módszerrel megfelelően analizálható, majd ESI MS/MS-el detektálható. Az elválasztás fultranagy nyomású változatát ultranagy nyomású folyadékkromatográfiának nevezik (UHPLC: ultra - high pressure liquid chromatography), ahol leggyakrabban C18-as kolonnán történik az elválasztás, amely a legelterjedtebb fordított fázisú töltet, az apoláris komponensekkel szemben legnagyobb visszatartással bír (Lázár, 2013). Az UHPLC-nél alkalmazott gyakori alapfázis - nagy nyomástűrése okán - a szilikagél (Tömösközi *et al.*, 2014).

Az MS, mint detektálási módszer az elektroporlasztásos ionizációs technikával (ESI) összekapcsolva megfelelően azonosítani képes az analitot (Pokol *et al.*, 2011). Az ESI a legelterjedtebben használt ionforrás technika, mivel egyidejűleg specifikus és univerzális (Lázár, 2013; Pokol *et al.*, 2011). Ehhez kapcsolva a tömegspektrométer a vegyületek detektálására és azonosítására képes. A három kvadrupól tandem módban használva a vizsgált komponens minőségi azonosítása lehetséges (Lázár, 2013).

Az MRM egy érzékeny és specifikus technika a célzott analit minőségi és mennyiségi meghatározására. Olyan tandem MS (MS/MS) feltérképező mód, amely tripla

kvadrupólusos vagy hibrid quad/trap elrendeződésű lehet (hasonlóan működik mindkét műszertípus: az ionciklust és az m/z egyedi alakulását tekintve bármely időpontban a teljes m/z -tartományban képesek előre meghatározott ionokat kiválasztani az elemzéshez). Az MRM módszerben kulcsfontosságú lépés a prekursorionok és a hozzájuk tartozó termékionok kiválasztása. Az MS első kvadrupólja (Q1) képes kiválasztani és továbbítani a prekursorionokat a második kvadrupólhoz (Q2) további frakmentációs célokra. Ami az így kapott termékionokat a harmadik kvadrupólhoz (Q3) irányítja, amely csak az előre meghatározott m/z értékű és kiválasztott termékionokat detektálja. E két szelektáló lépésnek köszönhetően mondható specifikusnak az MRM módszer (Jingjing *et al.*, 2013).

Ciu és munkatársai 2018-as kutatása során növényvédőszer-maradék analitikai vizsgálatához fejlesztettek módszert többek között spiroetramátra zöldség és gyümölcs mátrixok szermaradék analíziséhez. A tanulmányban gyors, nagy érzékenységgű és szelektív módszert fejlesztettek ki a szulfoxaflór, pirofluquinazon és spiroetramát szermaradékok egyidejű meghatározására gyümölcsökben (alma, szőlő és eper) és zöldségekben (uborka, hagyma, kínai káposzta, spenót és walesi hagyma) ultrateljesítményű folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometriával (UPLC-MS/MS). A célvegyületeket a mintákból acetonitrillel extrahálták, majd diszperzív szilárd fázisú extrakcióval tisztították, amelyhez primer szekunder amin (PSA) és C18 szilárd fázisként használtak, mielőtt C18 oszlopon elválasztották volna őket. Az uborkához, szőlőhöz, almához és mogyoróhagymához adott szulfoxaflór, pirofluquinazon és spiroetramát átlagos visszanyerése 79,9% és 103,9% között mozgott, a relatív szórás (RSD) 3,3% és 8,8% között volt. A mennyiségi meghatározási határértékek (LOQ) 0,334, 0,040 és 0,378 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a kimutatási határértékek (LOD) pedig 0,100, 0,012 2 és 0,133 $\mu\text{g}/\text{kg}$ voltak a szulfoxaflór, a pirofluquinazon és a spiroetramát esetében. A következtetésük szerint a módszer megfelelt a gyümölcsökben és zöldségekben található szulfoxaflór-, pirofluquinazon- és spiroetramát-maradékok meghatározására.

2.9. Spiroetramát, mint növényvédőszer-hatóanyag

A spiroetramát 2007 óta hatóságilag engedélyezett peszticid hatóanyag Tunéziában és 2014. május 1 óta az Európai Unió is elfogadta (Internet 4). A spiroetramát jelenleg a Movento nevű készítményben található meg, melyben a koncentrációja 100 g/l . Engedélyokirat száma: 04.2/7527-1/2016 (NÉBIH). A készítmény vizes szuszpenzióban elérhető formuláció (SC), a hatóanyag LD50 értéke 2000 mg/ttkg. A készítmény

cseresznyében engedélyezett, cseresznye levéltetű és pajzstetvek ellen, viszont cseresznyelég ellen nem tesz említést az engedélyokirata (Internet 9, Internet 5).

Hatásos a fehér legyek, levéltetvek és egyéb szűrő-szívó rovarok ellen, ugyanis ACC-gátlóként (acetyl-coenzyme-A-karboxiláz) hat, ezzel szakítva meg a rovarok lipid-bioszintézisét. A már említett ambimobil tulajdonságának köszönhetően képes a növény érhalózatán keresztül felfelé és lefelé is szállítódnia (Internet 5; Internet 9). Alacsony vagy mérsékelt akut toxicitásának számít, potenciálisan szenzibilizáló hatású a bőrre és szemirritáló lehet. Vizsgálatok során nem mutatkozott rákkeltőnek patkányok körében, azonban egy dán kutatás során kiderült, hogy káros a vízi gerinctelenekre, de nem veszélyes a méhekre (Internet 5; US EPA, 2008). A spirotetramát mivel propeszticid, még nem rendelkezik aktív toxikológiai hatással. A toxikológiai hatásért felelős vegyület a spirotetramát-enol, mely az anyagvegyületből alakul ki metabolikus (vagy egyéb degradációs) folyamatok eredményeképpen (5. ábra). A növényi szervezet is képes elvégezni ezt az átalakítást, létrehozva az ENOL formát. Érdeemes megjegyezni a gyengén savas tulajdonságát e metabolitnak, mely hasonlóan a fenolhoz, az aromás gyűrűhöz kapcsolódó enol-csoportnak köszönhető. Ez a gyenge savi jelleg lehetővé teszi a floémbe jutást, ezáltal kétirányú szisztemizáció figyelhető meg a vegyületre nézve, ami növényvédelmi szempontból kiemelkedően előnyös jelleg. Szem előtt kell tartani azonban a többi metabolitot is, tekintve, hogy a hatóanyag-transzformáció nem áll meg az ENOL szintjén. Az ENOL mellett 3 másik metabolit is jelen van releváns mennyiségben a bomlás követően, ezek a spirotetramát monohidroxi (MONO), a spirotetramát ketohidroxi (KETO) és a kettes fázisreakció metabolitja, a spirotetramát glükózilált alakja (GLU) (Kiss *et al.*, 2022).

Nauen és munkatársai 2008-as kutatása is megerősíti a korábban leírt tulajdonságokat a spirotetramátról. Véleményük szerint a rovarölő szerek meglévő kémiai osztályaival szembeni keresztrezisztencia hiánya miatt a spirotetramát felbecsülhetetlen értékű új eszköz lesz a rovarölőszer-rezisztencia kezelésére számos növénykultúrában és kártevők ellen világszerte. Ugyanis, fizikai-kémiai tulajdonságai meglehetősen különböznek a tetron spirodiklofen és spiromezifen (szintén ebbe a hatástani csoportba tartozó) hatóanyagokhoz képest. Így nagyon jó termékbiztonságot ad, kiváló fotostabilitással rendelkezik, és széles hőmérséklet-tartományban aktív. A spirotetramát továbbá nagyon jó szermaradék-aktivitással rendelkezik a kétirányú transzlokációnak köszönhetően. Ezek a

kiemelkedő tulajdonságok egyedülállóak a közelmúltban kifejlesztett rovarölő szerek között (Nauen *et al.*, 2008).

Csokai Lilianna Judit - Diplomadolgozat

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kutatás során a Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet Élelmiszerkémia és -Analitika Tanszékén végeztem el méréseket.

3.1. Felhasznált anyagok

A mérés során használt sztenderdeket és vegyszereket az 2. táblázat tartalmazza. A felhasznált vegyszerek LC-MS tisztaságúak voltak.

2.táblázat: A vizsgálat során felhasznált anyagok és vegyszerek

<i>Megnevezés (használt rövidítés)</i>	<i>Képlet</i>	<i>Gyártó/Előállítás módja</i>
spirotetramát (SPIRO)	$C_{21}H_{27}NO_5$	Sigma Aldrich Kft.
spirotetramát-cisz-enol(ENOL)	$C_{18}H_{23}NO_3$	Sigma Aldrich Kft.
spirotetramát-mono-hidroxi (MONO)	$C_{18}H_{25}NO_3$	Sigma Aldrich Kft.
spirotetramát-cisz-keto-hidroxi (KETO)	$C_{18}H_{23}NO_4$	Sigma Aldrich Kft.
spirotetramát-enol-glükozid (GLU)	$C_{24}H_{33}NO_8$	Sigma Aldrich Kft.
Acetonitril	CH_3CN	VWR
Methanol	CH_3OH	VWR
Hangyasav	CH_2O_2	Sigma Aldrich Kft.
desztillált víz	H_2O	Millipore Milli Q rendszerrel előállítva
nátrium-klorid	$NaCl$	VWR
magnézium-szulfát	$MgSO_4$	Thermo-Fischer
dinátrium-hidrogén-citrát	$C_6H_6Na_2O_7$	Thermo-Fischer
PSA	-	Sigma-Aldrich Kft.
TPP	$C_{18}H_{15}O_4P$	ACROS ORGANICS
trinátrium-citrát	$Na_3C_6H_5O_7$	VWR
Movento készítmény	-	Bayer CropScience

3.2. Felhasznált eszközök

A mérés során használt eszközöket a 2. sz. melléklet tartalmazza, valamint a szükséges növényvédőszer-maradék méréseket egy folyadékkromatográfiás elválasztással és tömegspektrometriás detektálással kiviteleztem a tanszéken lévő Agilent Ultivo típusú UHPLC-QqQ-MS/MS készülék segítségével. Az elválasztás során alkalmazott UHPLC rendszer egy oszloptermosztátból, egy nagynyomású pumpából és egy automata mintaadagoló egységből áll. ESI ionforrás segítségével és ehhez kapcsolt MS/MS technikával történt a detektálás. A mérések során Agilent Eclipse Plus C18 (megnevezés: Oktadecil RP-18, ODS; RRHD 1,8 μ m; 2,1 x 50 mm) kolonnát használtam. Az injektálási

térfogat 5 µl, az oszlop hőmérséklete 40 °C, a mérési idő 5 perc az áramlási sebesség pedig 0,4 ml/ perc volt.

A detektor három kvadrupól tömeganalizátort tartalmazott, ahol az első kvadrupól (Q1) izolálta a célkomponens prekursor ionját, a második kvadrupól (Q2) egy ütközési cella volt, mely nitrogéngázzal működött, ahol az anyai ion fragmentálódott újbóli ütközés hatására, s a fragmentálódott ionokat (termékion/leányion) a harmadik kvadrupól (Q3) analizálta.

A mozgó fázis (eluens) összetétel változott az elváztási folyamat során a 3.táblázatban látható módon.

3.táblázat: Eluens összetétele gradiens elúció során

idő (perc)	A (%)	B (%)	Áramlási sebesség (ml/perc)	nyomás maximuma (bar)
0,00	70,00	30,00	0,40	1200,00
4,20	0,00	100,00	0,40	1200,00
4,21	70,00	30,00	0,40	1200,00
5	70,00	30,00	0,40	--

3.3. Kezelések

A kísérlet 2022 április-május időszakában vette kezdetét a Soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaság intenzív cseresznye ültetvényében a törzsinjektálással, ahol azonos korú, fejlettségű és fajtájú cseresznyefákkal (5 m magasság, 12-15 cm törzsátmérő) történt a kutatás. Az injektálással kezelt fák mellett permetezéssel növényvédelem is történt, ennek adatai szerepelnek a 4. táblázatban.

A kontroll fánál 1 kezelés történt míg a törzsinjektálás és permetezés esetén 3 ismétléssel ment végbe a kezelés.

Az injektálás megvalósításához a fák törzsébe adott méretű lyukak fúrása volt az első lépés (3-4 mm átmérőjű, 40 mm hosszú), majd injektáló berendezés segítségével spiritetramát hatóanyagú Movento készítményt juttattak 4 furatba/fa annak törzsén egyenletesen eloszlata, amit végezetül fasebkezelővel lezártak. A kezelések négy dózisban, és mindegyik dózis három ismétlésben ment végbe.

4.táblázat: Permetezéssel és törzsinjektálásos kezelések (Ő: őszi lomb minta, L: levélminta, CS: cseresznye minta)

Fa sorszáma	Injektált hatóanyag mennyiség (a.i. g), (lyukak száma x lémmennyiség lyukanként)	Ismétlések száma	Kezelés időpontja	Mintavétel típusa és ideje
1(kontroll)	0 (4 x 10 ml)	1	2022.05.12.	2022.06.15. (CS, L)
2	0,3 g (4 x 10 ml)	3	2022.05.12.	2022.06.15. (CS)
3	0,61g (4x 10 ml)	3	2022.05.12.	2022.06.15. (CS)
4	1,21g (4x 10 ml)	3	2022.05.12.	2022.06.15. (CS)
5	3,64 g (4x 10 ml)	3	2022.05.12.	2022.06.15. (CS, L), 2022.10.24 (Ő)
6P (permetezés)	0,3 g/fa	3	2022.06.08.	2022.06.21. (CS, L)

A cseresznyeérésekor mintavétel történt 2022 júliusában. Ezt követően fagyasztozóban tároltuk a gyümölcsöt, hogy a mérésig változatlan maradjon annak peszticid tartalma.

Valamint eltérő időközönként levél mintavételre is sor került (a kezelés után pár héttel, őszi lombhullásnál), a hatóanyag metabolizációs folyamatainak megértéséhez. Ezeknek a mintáknak a tárolása is fagyasztozóban történt a mérésig, s későbbi előkészítésük során minimális víz hozzáadásával tettük könnyebben kinyerhetővé az analitokat a levelekből.

3.4. Műszeres analitikai mérés technika kidolgozása

MRM átmenetek beállítását előzetesen témavezetőm végezte. Ennek eredményeit táblázatos formában az 5. fejezetben részletezem.

Ionforrás paraméterek optimalizálása volt a kísérlet során az első műszerrel kapcsolatos feladatom. Az ionforrás paramétereket változtatva módszereket írtunk és vizsgáltuk az optimális beállítást a megközelítőleg 1mg/kg sztenderd keverék (MIX) oldatot használva.

Az optimalizálás során megfigyeltem, hogy a metabolitok bomlása a készülékben is könnyen végbemegy. A SPIRO észterkötése és a GLU félacetálos kötése instabil, ezért az ionforrásban ENOL-lá alakulnak. Fontos kiemelni, hogy ez az átalakulás az elválasztástechnikát követően történik, azaz az ENOL-ra jellemző tömegátmenetet adják, de a SPIRO és a GLU jellemző retenciós idejénél. Amennyiben az átalakulás a sztenderdben (mátrix illesztett) és a mintában azonos határfokú, nem okoz mérési hibát. Fontosnak tartottuk azonban olyan ionforrás-paraméterek beállítását, ahol a SPIRO és a

GLU legkevésbé alakul át ENOL-lá, ezért erre törekedtem az optimalálás során. Az alap paraméter beállítások a következők voltak (egyszerre csak egy paraméteren változtattam a többin nem): Gas Temperature (GT): 250 °C; Gas Flow (GF): 13 l/min; Nebulizer (N): 40 psi; Capillary voltage (Cv): 3000V. Mind a 4 paramétert 3-3 különböző beállításban vizsgáltam, szám szerint: GT: 200 °C, 250 °C, 300 °C; GF: 8 l/min, 10.5 l/min, 13 l/min; N: 20 psi, 40 psi, 60 psi; Cv: 2500 V, 3000 V, 3500 V.

3.5. Mintaelőkészítés kidolgozása

A cseresznye mintamátrix előkészítésénél 3 fajta módszert alkalmaztam párhuzamosan, hogy kiderüljön, melyik a legalkalmasabb a gyümölcsben lévő szermaradék kinyerésére. E három módszer a Quechers a módosított Quechers ahol PSA szorbens-t nem használok és a Dilute and shoot. Ehhez a 3 módszerhez ugyanolyan eluenseket és MIX munkaoldatot használtam a mérés során.

A peszticid mentes cseresznyemintából (kontroll) (mag nélkül) kb. 200 gramm mennyiséget elektromos darálóval homogenizáltam, majd simítózáras zacskóba töltöttem. A mintából kimértem 50 ml-es centrifugacsövekbe 10,00-10,00 gramm-ot 9 párhuzamosban. A minták közül hat esetben standard keveréket addicionáltam az MRL-t (3mg/kg) megközelítő, de annál alacsonyabb koncentrációban, ezáltal 0.6 mg/kg-ra adalékoltam a cseresznyét. Három különböző mintaelőkészítést próbáltam ki, mindegyik esetében két mintát adalékoltam az adott koncentrációra és egyet vaknak hagytam.

Eluens készítése:

A mérés során két eluenst használtam együttesen, ezek jelölése „A” és „B” eluens a továbbiakban.

Összetétel:

„A” eluens: Desztillált víz + 0,1 % Hangyasav

„B” eluens: Metanol + 0,1 % Hangyasav

A készítés elején meghatároztam a szükséges végtérfogatot mindkét eluenshez, ami 500 ml lett. Így 500 µl tömény hangyasav bemérésére volt szükség az „A” és a „B” eluenshez is.

Az „A” eluens készítése során egy 500 ml-es mérőlombikba öntöttem desztillált vizet a jel alá, majd a tömény hangyasav hozzáadását követően jelre állítottam és homogenizáltam.

Végül eluens tartó üvegbe töltöttem és feliratoztam a kész oldatot. Eltarthatósági ideje 4°C-on tárolva 1 hét.

Az „B” eluens készítése során egy 500 ml-es mérőlombikba öntöttem metanolt a jel alá, majd a tömény hangyasav hozzáadását követően jelre állítottam és homogenizáltam. Végül eluens tartó üvegbe töltöttem és feliratoztam a kész oldatot. Eltarthatósági ideje 4°C-on tárolva 1 hónap.

A 100 mg/L-es MIX munkaoldat a 5. táblázatban szereplő összetevőkből áll és a megfelelő koncentrációt acetonitrillel és az egyedi standard oldatok összemérésével állítottam össze. Ebben az oldatban minden komponens koncentrációja 100 mg/L, az oldószer pedig acetonitril.

1 ml végtérfogatú, 100 mg/L koncentrációjú MIX munkaoldat készítése:

5.táblázat: MIX munkaoldat összetevői

	kezdeti koncentráció (µg/ml)	felhasznált mennyiség (µl)
SPIRO	2468,5	40,5
GLU	2324,2	43,0
MON O	2230,9	44,8
ENOL	762,2	131,2
KETO	2115,9	47,3

Quechers

Először a magyar szabvány szerint kifejlesztett citrát-pufferelt QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) módszert alkalmaztam, amely módszer a növényi eredetű élelmiszermintákhoz ajánlott (MSZ EN 15662; 2018).

A fagyasztott cseresznye mintát felengedtem és elektromos daráló segítségével egyneműsítettem, majd 10,00 gramm (mag nélküli) mennyiségeket mértem be analitikai mérlegen 50 ml-es centrifugacsövekbe. Két mintához 60 µl 100 mg/L töménységű MIX munkaoldatot, a harmadikhoz pedig 60 µl acetonitrilt, majd mindhez 100 µl 50 µg/ml triphenyl phosphate (TPP, „surrogate standard”) és 10,0 ml acetonitrilt adtam. Intenzíven ráztam az elegyet ezt követően 1 percig annak érdekében, hogy az extrahálószer jól elegyedhessen a mintával. Ezt követően a kisózás érdekében 4,0 mg MgSO₄-t és 2,5g puffer-só mix-et (1 gramm NaCl; 1 gramm trinátrium-citrát; 0,5 gramm dinátrium-hidrogén-citrát) adtam az extraktumhoz, és intenzíven ráztam 1 percig ismét. A mintákat

6000 rpm fordulattal centrifugáltam 5 percig a vizes és a szerves oldószeres fázis szétválasztása érdekében. A centrifuga lejárta után 15 ml-es centrifugacsövekbe a felülúszó szerves fázisból 6 ml-t kipipettáztam, amikbe korábban 900,0 mg $MgSO_4$ -ot (szerves fázisban maradt víz eltávolítása érdekében) és 150,0 mg primer-szekunder-amint (PSA-t, amely a szerves savak megkötésére szolgál) mértem be. Majd a szerves fázist tartalmazó centrifugacsövet 0,5 percig intenzív kézi rázás követte és 5 perc 6000 rpm fordulatszámú centrifugálás újból. Végül a felülúszó szerves fázisból 4,0 ml-t kipipettáztam egy 4 ml térfogatú vialba (mintatartó üvegcsébe), a kipipetázott oldatot 10 μ l 5 % hangyasavval ($HCOOH$) savanyítottam annak érdekében, hogy a célkomponensek stabilizálva legyenek. Ezen savanyított kivonatok mérés utáni maradékait a bennük lévő peszticidek bomlásának elkerülése végett mélyfagyasztóba tettem ($-80\text{ }^\circ\text{C}$), hogy később is felhasználhatóak legyenek az esetleges újramérésekhez.

Az elkészült oldatokat mérés előtt hígítottam az alábbi arányok szerint: 200 μ l minta: 300 μ l acetonitril: 500 μ l ionmentes víz, annak érdekében, hogy a szerves és vizes fázis aránya megegyezzen a mátrixra illesztett kalibráció egyes pontjainak szerves-vizes fázis arányával, s a mátrix mennyisége (20%) is megegyezzen a mintaoldatok és a kalibráló oldatok esetében. Így biztosítva van az, hogy a kalibrálopontokban a mátrixhatás ugyanazon súllyal tud megjelenni, mint ahogy a mintákban jelen van. Az oldatokat PTFE szűrőn átszűrtem (0,22 μ m pórusméretű hidrophil szűrőn), ekkor a minták már közvetlen mérésre alkalmasak.

Quechers PSA nélkül

Ez a mintaelőkészítési módszer mindenben megegyezik az előzővel (Quechers) a PSA alkalmazásának kivételével. Azaz a szerves savak megkötése ennél a mintaelőkészítési módszernél nem valósul meg.

Dilute-and-shoot módszer

10 gramm bemért cseresznyéhez 60 μ l 100 mg/L mix munkaoldatot adtam, két mintához egyenként, a harmadikhoz pedig 60 μ l acetonitrilt tettem. Ezt követően 100 μ l 50 μ g/ml koncentrációjú triphenyl phosphate-ot (TPP-t, „surrogate standardet”) és 10,0 ml acetonitril-víz-hangyasav (50:49:1) elegyet adtam a mintákhoz. Majd 10 intenzív rázást és utána 5 perc 6000 rpm fordulatu centrifugálást követően a fázisok szétváltak és 4,0 ml felülúszót pipettáztam vialba és savanyítottam 10 μ l 5%-os hangyasavval. Ezt követően az

előző két mintaelőkészítési módszer lépéseivel megegyezően történt az extraktumok hígítása, rázása és szűrése majd mérése és/vagy fagyasztása (tárolása).

3.6. Módszervalidálás

A spirotramát hatóanyagra cseresznye minta esetén történő módszerfejlesztést és validálást a hatályos SANTE 12682/2019 útmutatásainak megfelelően végeztem a Quechers mintaelőkészítés módosításával (PSA elhagyása).

A validálás során szükséges volt egy standard törzsoldatra, mely tartalmazza a spirotramát mellett a metabolitokat is, valamint egy reprezentatív mátrixra, ami nem tartalmaz peszticidet (növényvédőszer-mentes cseresznye extraktum), melynek alkalmazása elengedhetetlen a multi- és az egyedi komponens módszerek validálása során. A validálás során az általam vizsgált cseresznye minta a SANTE 11312/2021 dokumentumban lévő 'A melléklet' 1. pontjába tartozó „magas víztartalmú mátrix” csoportban szerepel, és csonthéjas kategóriába tartozik.

A fenti teljesítményjellemzők az LOD kivételével a SANTE 11312/2021 dokumentumban kerültek meghatározásra (1. sz. melléklet). Mérésem során az LOD (kimutatási határ), LOQ (meghatározási határ), linearitás, mátrixhatás, precizitás (ismételhetőség + reprodukálhatóság) és a visszanyerés kerül meghatározásra.

A linearitás vizsgálatát 13 szinten végeztem el mátrixszal és anélkül. A kalibrációs koncentrációk a következők voltak növekvő sorrendben ng/ml mértékegységben: 0; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 125; 250; 500. Majd mindegyik specieszre kifejeztem az egyenes egyenletét és az R^2 -et, így vizsgálva azt, hogy a teljes tartományon belül lineáris-e a koncentráció-terület összefüggés. Ugyanezen kalibrációkkal végeztem el a mátrixhatás vizsgálatát, ahol összehasonlítottam a mátrix-illesztett és az oldószeres kalibrációs egyenesek meredekségét. Ezek egymáshoz viszonyításával számoltam a mátrix-hatást minden komponensre.

A precizitás és a visszanyerhetőség meghatározását két célszinten határoztam meg. Az első a szint 25 ng/ml koncentrációnál (analitikai mintára számolva) az LOQ közelében, a második pedig az MRL szint közelében 300 ng/ml (analitikai mintára számolva) koncentrációnál történt. Ezen a két célszinten történt 7 párhuzamos mintával a bemérés,

amelyből a legjobban kiugró értéket elhagyva a szabvány által előírt 6 párhuzamos eredmények átlagával számolva kaptam meg a visszanyerés és precizitás értékeket. A méréshez mátrix-illesztett kalibrációs sort készítettem mely 7 pontból állt. A kalibrációs koncentrációk a következők voltak növekvő sorrendben ng/ml mértékegységben: 3; 5; 25; 50; 100; 250; 500. A kalibrációs egyenes segítségével a mért koncentrációkat meghatároztam. Kiértékelés során a precizitást a kapott 6 párhuzamos mérés átlagolt koncentrációjából és szórásából számoltam ki az egyes szinteken.

$$\text{Precizitás}(\%) = \frac{6 \text{ párhuzamos mérés szórása}}{6 \text{ párhuzamos mérés átlaga}} \times 100$$

A visszanyerést pedig a kapott és az eredeti koncentráció hányadosából határoztam meg.

$$\text{Visszanyerés}(\%) = \frac{6 \text{ párhuzamos mérés átlaga}}{\text{Minták eredeti koncentrációja}} \times 100$$

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1. Műszeres mérés technika fejlesztése

Komponensfüggő paraméterek optimalizálása

Az előzetesen beállított komponensfüggő paraméterekhez az alkalmazott készülék Agilent Optimizer szoftverének adatbázis kezelő programját használtunk.

Az optimalizálás során a spiroetramátra és metabolitjaira alsó és felső értéktartomány lett megadva a fragmentációs feszültség (Fr), valamint az ütközési cella (collision energy-CE) értékeire, így lefedve a meghatározandó értéktartományt. Az UHPLC készülékben oszlop nélkül egy összekötőelemmel zajlott a mérés. Tekintettel arra, hogy az adott komponens igen rövid idő alatt jutna el a detektorba a kolonna használatával, ami alatt a készüléknek nem lenne elég ideje végig tesztelni minden beállítást. Az optimalizálás alacsony áramlási sebességgel és nagy térfogatáramú injektálással zajlott, így hosszabb időbe telt míg a komponensek az ionizátorba jutottak az összekötő elemen keresztül. A cél az volt, hogy a készülék a feszültségintervallum egyes értékeit oly módon állítsa be, hogy a legmagasabb válaszjelhez tartozó paramétert rögzítse. Az optimalizálás elvégzése során a spiroetramátra és metabolitjaira nézve az alábbi komponensfüggő paraméter értékeket kaptam (6. táblázat).

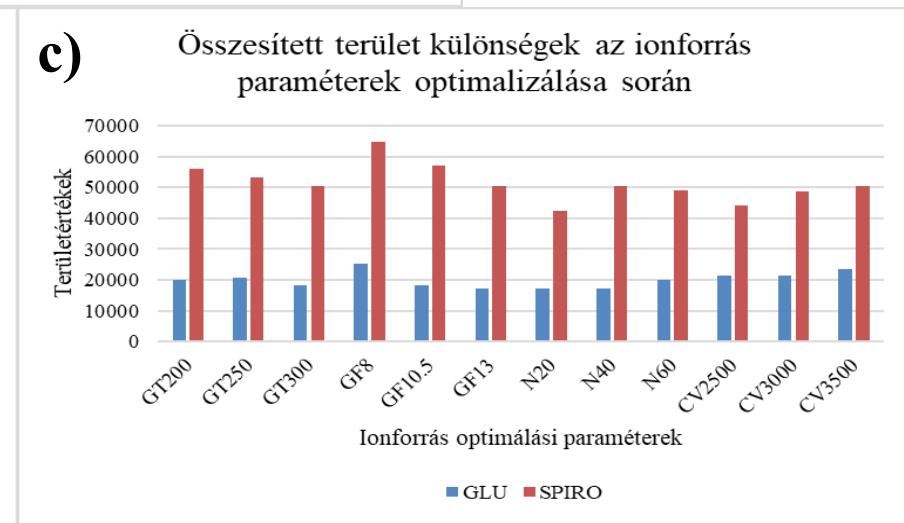
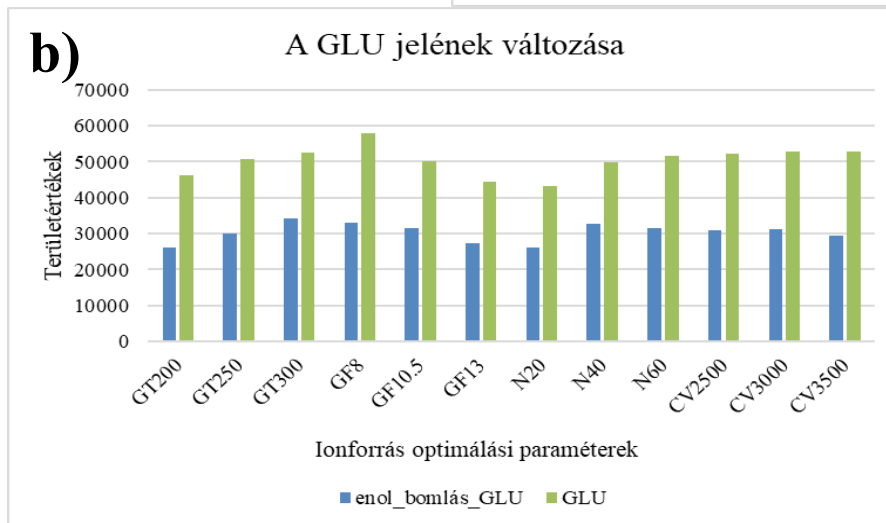
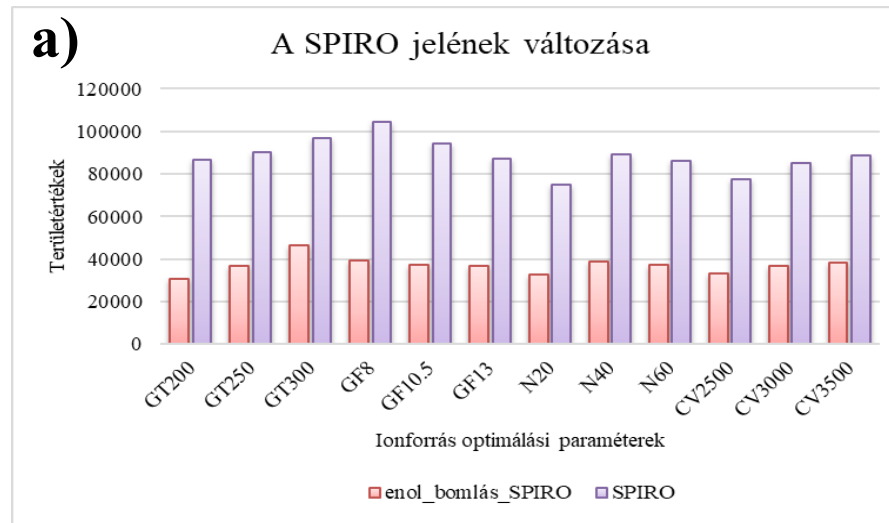
6.táblázat: LC-MS komponensfüggő paraméterei

Komponens neve	Prekurzor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)	Fragmentációs feszültség (V)	CE (V)
ENOL	302,2	270,1; 216,1	168	19; 27
GLU	464,2	302,2; 270,1; 216	96	16; 36; 52
KETO	318,2	300,2; 268,1	96	10; 18
MONO	304,2	254,2; 131; 118,4	144	30; 38
SPIRO	374,2	330,2; 302,2; 270,1	128	12; 24

Ionforrás paraméterek optimalizálása

Ehhez a méréshez már kromatográfias oszlopot is használtam, az anyag és módszerek részben leírtak alapján történt az optimalizálás, majd a kapott paraméterekhez a program terület értékeket rendelt. Ezt követően a legnagyobb területértékeket vettem figyelembe az optimalizálás során és az ENOL bomlásának mértékét követtem a SPIRO és a GLU

komponensekhez kötődően. Célom az volt, hogy a paramétereket úgy állítsam be, hogy a két speciesz a legkevésbé szenvedjen bomlást, valamint az ENOL a legnagyobb jelet produkálja. A GLU és SPIRO jelének változása az optimalizálás során hasonlóan alakult (7. ábra a) és b)). A mérési eredményt SPIRO esetében a 7. ábra a) része, GLU esetében a 7. ábra b) része mutatja be. Látható, hogy a GF: 8 l/min és GT: 300 °C paraméterek beállítása mindkét komponens esetében a legnagyobb területértékeket produkálta, továbbá SPIRO-nál az N:40 psi, és Cv:3500 V; GLU-nál pedig az N:60 psi, és Cv: 3000 V; 3500V beállítások mutatták a legnagyobb terület értékeket (7 a), b) ábra) A legkisebb bomlás megítélése érdekében a bomlástermék (ENOL) és az anyavegyületek (SPIRO és GLU) különbségét is kiszámoltam (7. ábra c) része).



7.ábra: a) SPIRO jelének változása ionforrás paraméterek optimalizálása során. A piros oszlop a SPIRO bomlásából származó ENOL, a kék oszlop pedig a SPIRO kvantitatív tömegátmenetének jelét (terület) mutatja. b) GLU jelének változása ionforrás paraméterek optimalizálása során. A kék oszlop a GLU bomlásából származó ENOL, a zöld oszlop pedig a GLU kvantitatív tömegátmenetének jelét (terület) mutatja. c) GLU jelének változása ionforrás paraméterek optimalizálása során. A kék oszlop a GLU bomlásából származó ENOL, a zöld oszlop pedig a GLU kvantitatív tömegátmenetének jelét (terület) mutatja.

A legnagyobb jelre és a legkisebb bomlásra törekedve a legnagyobb különbségeket kerestem. A mérési eredmények kiértékelése alapján az elfogadott és a további mérések során alkalmazott paraméterek a következők lettek: GT: 250 °C, GF: 8 l/min, N: 40 psi, Cv: 3000 V (7. táblázat).

7.táblázat: Az optimalizált ionforrás paraméterek

Az ionforrás függő paraméterek	
Gas temperature (°C)	250
Gas flow (L/min)	8
Nebulizer (psi)	40
Capillary voltage (V)	3000

A grádiens program változtatásával az elválasztási paramétereket is optimaltam.

A végleges retenciós idők komponensenként a 8.táblázat láthatóak, a sorrend pedig a következő lett: GLU, MONO, ENOL, KETO, és végül a SPIRO speciesz.

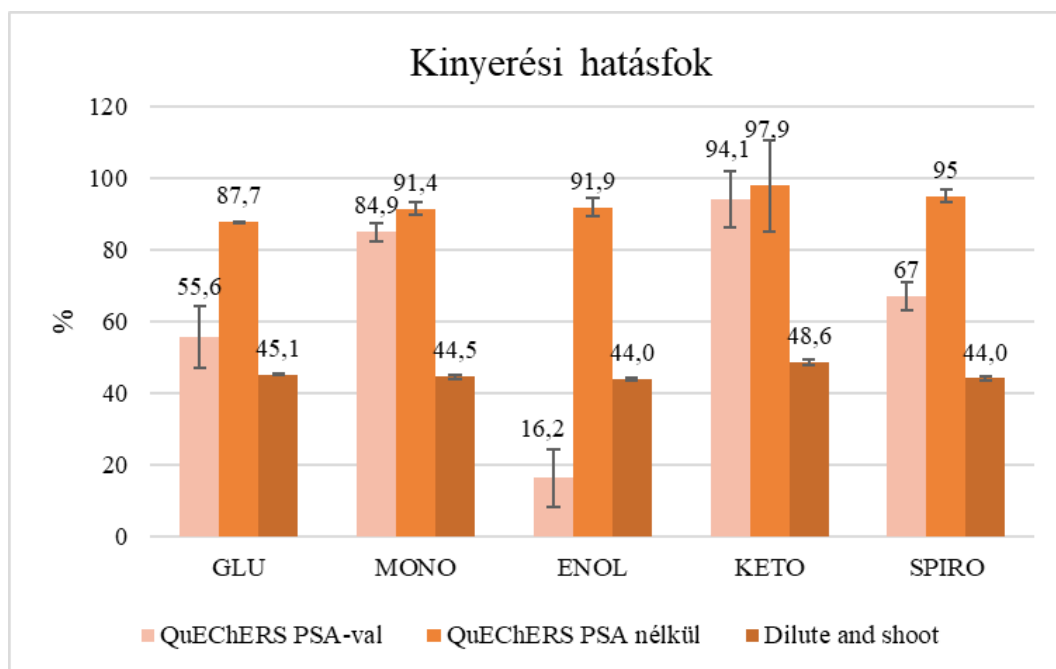
8. táblázat: Komponensek végleges retenciós ideje

Komponens neve	retenciós idő (perc)
GLU	1,05
MONO	2,20
ENOL	2,55
KETO	2,85
SPIRO	3,40

4.2. Mintaelőkészítések összehasonlítása

A validálás megkezdése előtt a mintaelőkészítés módszere volt a legmeghatározóbb kérdés, ahol 3 módszert hasonlítottam össze adalékolt cseresznye mátrix vizsgálata során. Elsősorban a PSA tisztító szorbens hatását vizsgáltam a specieszekre, hiszen szakirodalmi kutatás alapján feltételezhető, hogy az enol-OH csoport savas karaktere miatt ezt a módosulatot a szorbens képes megkötni (Maria *et al.*, 2019). Ezen okból kifolyólag 0,6 mg/kg-re adalékoltam vak cseresznye mátrixot (2-2 párhuzamosban, valamint 1 minta adalékolás nélkül is) mind az öt módosulattal egyaránt így vizsgáltam meg a kinyerési hatásfokot az említett PSA szorbens használata mellett és annak hiányában, valamint dilute-and-shoot módszerrel is. Ezt megelőzően azt is megvizsgáltam, hogy a három vak

mátrixra felépített kalibrációs egyenesek esetén miképpen alakul a meredekség. Ez adatból a kinyerési módszerek mátrix-hatását vizsgáltam meg és hasonlítottam össze.



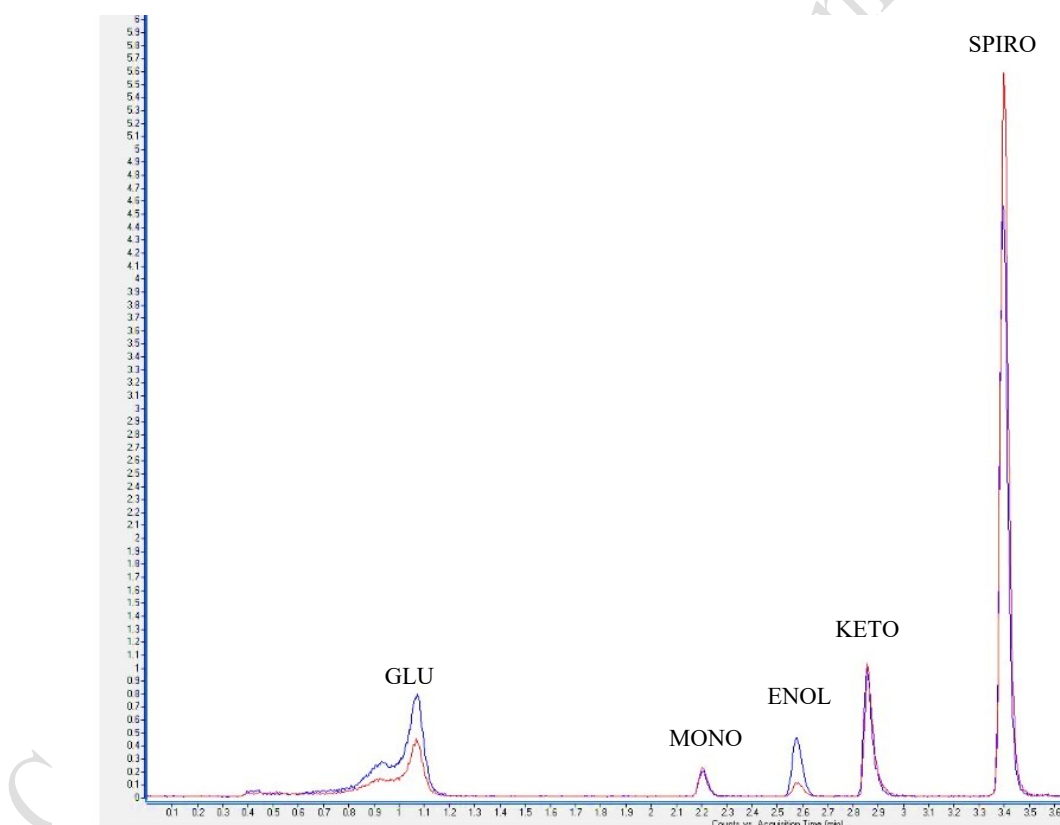
8.ábra: Kinyerési hatások az egyes komponenseknél mintaelőkészítésként

A 9. táblázatban szerepelnek a mérés során kapott kalibrációs egyenesek meredekségei és R^2 értékei, amik a PSA nélküli QuEChERS esetén egyöntetűen 0,98 felett voltak. Jól látható, hogy a meredekségek különbözőképpen alakultak az öt speciesz esetén. A legnagyobb érték a SPIRO, a legkisebb a MONO esetén alakult, mindhárom kinyerési módszerrel. Azt is elmondhatjuk, hogy a mátrixhatás a dilute-and-shoot módszer esetén nagyobb, hiszen mindenhol szupresszált a jel a másik két módszerhez képest. A GLU kivételével a második módszer (Quechers) nagyobb meredekséget okozott, mint az első (Quechers PSA nélkül). A módszerválasztást azonban sokkal inkább a kinyerési adatok döntenek el. A Dilute and shoot előkészítés esetén a cseresznye mátrixban mért peszticidre számítva túl alacsony lett a kinyerési hatások, mely feltehetően a tisztítási lépések hiányával magyarázható, ezáltal a mátrix valamely módon esetlegesen megkötheti a komponenseket. Ezért elmondható, hogy nem alkalmas ez a módszer a feladatra. A 8. ábrán látható, hogy a 3 vizsgált mintaelőkészítés közül az ENOL a PSA nélküli módszer esetén volt a legjobban kinyerhető a mintából, míg a PSA alkalmazásával – feltételezésünk bizonyítást nyert -, a szorbens valóban megköthette a savas karakterű specieszt, ezáltal annak alacsony kinyerését eredményezve. Így a cseresznye mátrixban történő spirotetramát

szermaradék mérés validálása során a Quechers PSA nélküli módosított változatát használtam a minták előkészítéséhez.

9.táblázat: Kalibrációs egyenesek meredekségei és R^2 értékei a 3 mintaelőkészítés összehasonlításánál

	QuEChERS-PSA nélkül		QuEChERS		Dilute and Shoot	
	Meredekség	R^2	Meredekség	R^2	Meredekség	R^2
GLU	217,31	1,00	196,04	1,00	183,99	0,98
MONO	36,27	0,98	46,31	1,00	34,93	0,98
ENOL	71,37	0,98	92,06	1,00	71,70	0,99
KETO	132,60	1,00	160,31	1,00	104,05	0,95
SPIRO	232,38	0,98	403,24	0,96	234,55	0,98



9.ábra: Kromatogram a PSA és PSA nélküli mérésekről

A 9. ábrán a két kromatogram csak a mintaelőkészítésnél tér el, ahol piros színnel jelölt PSA-val és a sötét kék színnel jelölt kromatogramot PSA nélküli mintaelőkészítés előzte meg. A komponensek a várt sorrendben és a megállapított retenciós időnél jöttek le az

oszlopról. A két kromatogram egyszerre történő ábrázolása jól kiemeli a különbségeket, amely a GLU esetén felfedezhetően kisebb görbe alatti területtel bír PSA-val történő mintaelőkészítés esetén és az ENOL-nál drasztikusan kisebb görbe alatti terület figyelhető meg. Az eltérések a PSA használatával végzett mintaelőkészítésre vezethetőek vissza.

Ám fontos kiemelni, hogy az MSZ EN 15662-es szabvány nem hagyja el a PSA-szorbens használatát spirotetramát esetében, ebből kifolyólag a növényvédőszer-maradék ellenőrző laboratóriumok sem változtatnak az előkészítés módján. Azonban jelen kutatás fő kérdése elsősorban nem a szermaradék koncentráció mennyisége (azaz nem élelmiszerbiztonsági), hanem növényvédelmi kérdésre szeretnénk választ kapni. Ami szerint a propeszticid-peszticid átalakulás milyen határfokkal zajlik le az endoterápiás és a permetezési kezelések esetében.

5.3. Módszervalidálás

Validálás alatt értendő egy analitikai módszer, illetve mérés adott feladatra való alkalmasságának gyakorlati igazolása, így biztosítva azt, hogy az „analitikai rendszerünk” a használni kívánt célnak megfelel. Ezt az analitikai megfelelést a teljesítményjellemzők megadásával jellemezzük. A mérések sorozatán, azaz a validálás során meghatározásra kerül, hogy milyen értékeket vesznek fel az adott analitikai rendszer teljesítményjellemzői, s ezen teljesítményjellemzők összevetésre kerülnek az elvárt értékekkel.

5.3.1. Kimutatási határ (LOD)

A kimutatási határérték (LOD) a meghatározandó komponens legkisebb mennyisége, ami biztonsággal megkülönböztethető a vakmintától és a zajtól. Ennek a paraméternek a meghatározását vizuálisan végeztem el, S/N arány módszerével, s kiválasztottam azt a koncentráció értéket, ahol a jel nagysága minimum háromszorosa a zajnak.

A LOD analitikai mintára megadva ng/ml mértékegységgel, instrument detection limit (IDL) megnevezéssel is illetik.

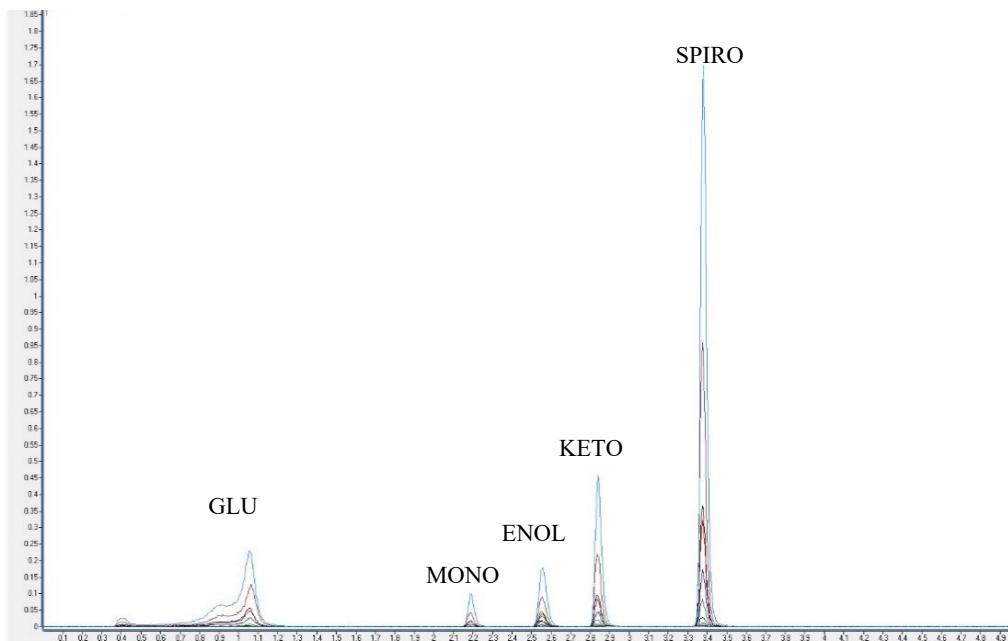
10.táblázat: Kimutatási határértékek az egyes metabolitoknál és az anyagvegyületnél

LOD	analitikai mintában (ng/ml)	cseresznyében mg/kg (ppm)
SPIRO	5,0	0,025
GLU	5,0	0,025
KETO	5,0	0,025
MONO	10,0	0,050
ENOL	5,0	0,025

Így az analitikai módszerre meghatározott kimutatási határértékek komponensenként a következők lettek: a SPIRO, GLU, KETO, és ENOL esetén 5 ng/ml analitikai mintára nézve, ami cseresznyére átszámítva 0,025 mg/kg; MONO -nál ez az érték 12,5 ng/ml, átszámítva pedig 0,0626 mg/kg (10. táblázat).

5.3.2. Linearitás és mátrixhatás

A linearitás vizsgálata során 5 szinten szükséges ellenőrizni az érzékenységet. A mérés során 13 szinten végeztem a vizsgálatot, a következő ábrán a kromatogramok együttesen ábrázolva láthatóak, azok egybeesése igazolja a nagyfokú linearitást a komponensek különböző koncentrációs szintjei között (10. ábra). A validálás során a linearitás meghatározását a mátrix illesztett kalibrációs pontok segítségével végeztem el. Az alsó határa a linearitás tartományának az LOD volt minden esetben, felső határként pedig a követelményeknek való megfelelés szolgált. A SANTE által előírt linearitásvizsgálat során 500 µg/kg koncentrációsztig a görbe alatti terület és a koncentráció között lineáris összefüggés tapasztalható minden specieszre nézve. A kalibrációs görbék determinációs együtthatója (R^2) $\geq 0,99$, a mátrix illesztett kalibrációs görbére kapott determinációs együtthatók RSD értéke 0,084 %, míg a mátrix nélküli kalibráció során kapott együtthatók RSD értéke 0,136 %. Az eredményeket komponensekre lebontva a 11.táblázat tartalmazza.



10.ábra: Linearitás vizsgálata során kapott kromatogramok együttesen ábrázolva

11.táblázat: Linearitás és mátrixhatás meghatározása

Linearitás	Mátrixszal		Mátrix nélkül	
	Meredekség	R ²	Meredekség	R ²
GLU	117,003	0,996	131,014	0,998
ENOL	73,640	0,999	65,313	0,999
KETO	127,993	0,998	155,971	0,999
SPIRO	233,277	0,998	216,061	0,998
MONO	43,036	0,999	38,679	0,995
szórás	-	0,001	-	0,001
átlag	-	0,998	-	0,998
RSD (%)	-	0,084	-	0,136

Mátrixhatás vizsgálata során összehasonlítottam a mátrix-illesztett és az oldószeres standard oldatokat. S a lent látható képlet segítségével, vagyis a kalibrációs egyenesek hányadosából megállapítottam adott komponens mátrix érzékenységét.

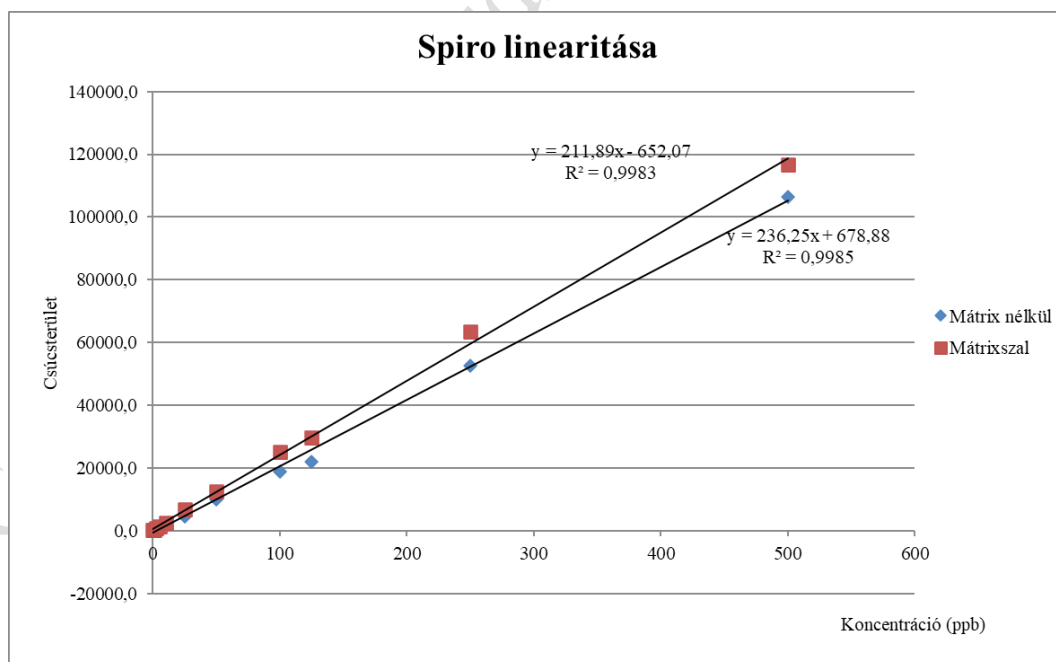
$$ME(\%) = \frac{\text{mátrixra illesztett kalibráció meredeksége}}{\text{oldószeres kalibráció meredeksége}} \times 100$$

Amely érzékenységi értéket figyelembe kell venni, amennyiben 20 %-nál nagyobb jelelnyomás vagy erősítés jelenik meg, azaz a mátrixhatással számolni kell a kalibráció során. A 12. táblázatban szereplő értékek alapján a mátrixhatás nem lépte át egyik esetben sem a 20%-os jelerősítést, vagy elnyomást, de a KETO esetében megközelítette azt. A GLU és KETO metabolit esetén jeltompítás látható -18%-os és -11%-os értékben, míg az ENOL, SPIRO és MONO komponensek esetén jelerősítés történt.

12.táblázat: Mátrixhatás értékek az egyes komponenseknél

Mátrixhatás (%)	
GLU	-11
ENOL	+13
KETO	-18
SPIRO	+8
MONO	+11

A kis mértékű mátrixhatást egy példán, a SPIRO komponens kalibrációs egyeneseivel mutatom be a 11. ábrán. Enyhe 8 %-os jelerősítés figyelhető meg a mátrixhatás következtében és a teljes tartományon belül lineáris a koncentráció-terület összefüggés mindkét kalibráció esetén.



11. ábra: SPIRO linearitása és mátrixhatása a kalibrációs függvények tükrében

5.3.3. Visszanyerhetőség és precizitás, meghatározási határ (LOQ)

A meghatározási határérték (LOQ) az a legalacsonyabb adalékolási szint, amely a visszanyerésre és precizitásra vonatkozó azonosítási- és módszerfejlesztési kritériumoknak megfelelő. Ez azt jelenti, hogy ezen a szinten pontosan és precízen tudunk már mérni, azaz az analit azon legalacsonyabb koncentrációja, amely szabványos vizsgálatokkal bizonyossággal mérhető. Dolgozatomban a 25ng/ml-es szintet céloztuk meg a LOQ értékének, ezért erre a koncentrációra történt az adalékolás (ez cseresznyére számolva 125ng/g).

A visszanyerhetőség pedig azt jelenti, hogy az MRL körüli koncentrációsinten milyen arányban sikerül az adalékolt analitokat visszamérnünk. Mialatt az MRL 1500ng/g cseresznyére, ezért a mintaelőkészítés során a HPLC kisüveg koncentrációja ezen a szinten 300ng/ml-nek adódik (hígítási faktorunk =5). Ezért ez utóbbi szintre állítottuk be minden analit esetén az adalékolási koncentrációt.

A korábbi fejezetben leírt módon történt a két célszinten mért eredmények meghatározása és kifejezése a LOQ, a visszanyerhetőség és precizitás tekintetében.

Hat párhuzamos adalékolással a SANTE által előírt módon, azokat átlagolva és azokból szórást számolva az eredeti adalékolt koncentrációs szint 70-120%-át kell kapnunk a módszer elfogadásához, minden speciesz esetén. A precizitás két módon értelmezhető. Az általam végzett értelmezés szerint a precizitást úgy hívjuk, hogy ismételhetőség (RSD_r) = ismételhetőség (repeatability), más néven intra-day precision: ismételten alkalmazzuk ugyanazon analitikai folyamatot egy nap alatt. Ebben az esetben az RSD nem lehet nagyobb 20%-nál.

A 13. táblázatban láthatóak a 25 ng/ml szinten mért kinyerési és precizitási értékek, amelyekre vonatkozóan az elvárt teljesítményszint a 70-120% kinyerés és a 20% alatti szórás. A kinyerési értékeket tekintve látható, hogy SPIRO értéke az elvárásnak nem felelt meg, míg a többi metabolit a szabvány alapján 6 párhuzamos méréssel megfelelően visszanyerhető.

Precizitási eredmények esetén is szintén 4 speciesz felelt meg az 5-ből, itt a KETO precizitás értéke viszont duplája a maximális 20%-nak így arra a specieszre nem volt elég precíz a mérés 6 párhuzamos alapján. Azonban érdemes említést tenni arról, hogy az MRL-szabvány az ENOL és a SPIRO szermaradék koncentrációt szabályozza, ezért élelmiszerbiztonsági szempontból a SPIRO-ra kapott kinyerés alacsony értékkel korrigálni

kell. Munkánk célja nem ez volt, hanem az, hogy kezelés során a metabolizációs profilt vizsgáljuk, ehhez a feladathoz nem feltétlenül szükséges ilyen alacsony érték. Összegezve az alsó célszinten történő kinyerés és precizitás eredményeket az LOQ értéke 25 ng/ml-nek fele meg a GLU, ENOL és a MONO esetében. A másik két speciesz ezen a szinten mérve nem határozható meg kellően precízen (KETO esetén) vagy pontosan (SPIRO esetén).

13. Táblázat: Kinyerés és precizitás validálási paraméterek 25 ng/ml szinten mérve

		GLU	KETO	SPIRO	ENOL	MONO
koncentráció (ng/ml)		25	25	25	25	25
25 ng/ml szinten kinyert koncentráció (ng/ml)	1	22,73	16,78	18,56	19,61	18,61
	2	24,06	41,67	14,75	18,98	16,65
	3	32,83	44,36	15,45	17,06	18,21
	4	31,15	17,46	16,07	17,96	20,87
	5	21,97	33,74	17,27	18,31	15,16
	6	23,70	19,71	12,85	19,70	16,73
Átlag		26,07	28,95	15,82	18,60	17,71
Szórás		4,67	12,55	1,99	1,02	1,98
Kinyerés		104%	116%	63%	74%	71%
Precizitás		18%	43%	13%	5%	11%

A 14. táblázatban pedig a 300 ng/ml szinten mért kinyerési és precizitás értékek olvashatóak.

Mind az 5 komponens kinyerhetősége megfelelt a SANTE előírásnak. Precizításra számolt eredmények közül 4 speciesz megfelelt és 1 túllépte a 20%-os maximum értéket. Az európai peszticid adatbázisban szereplő szabályozásokhoz mérten a SPIRO és az ENOL is megfelelt az 300 ng/ml szinten történő kinyerési előírásnak (SANTE 11312/2021), azonban az ENOL esetén nem bizonyult precíznek a mérés.

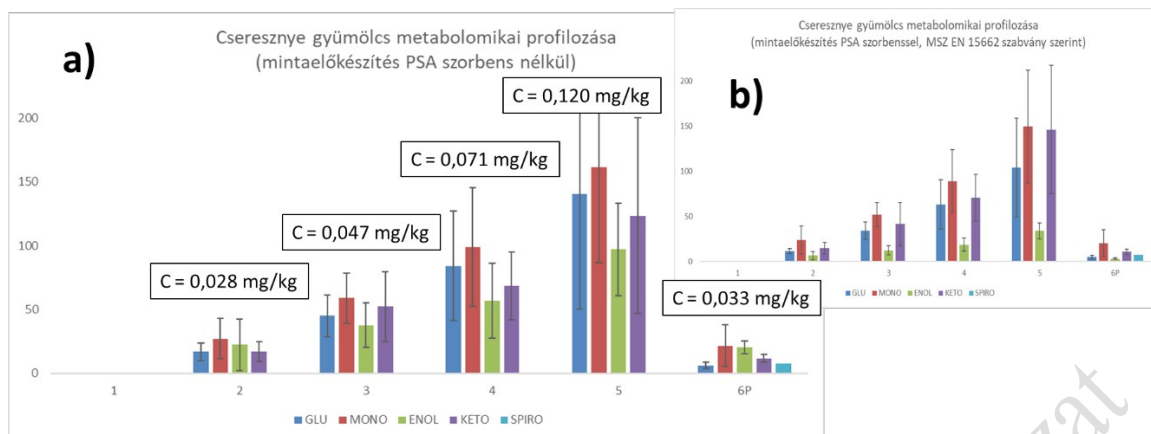
14.táblázat: Kinyerés és precizitás validálási paramétere 300 ng/ml szinten mérve

		GLU	KETO	SPIRO	ENOL	MONO
koncentráció (ng/ml)		300	300	300	300	300
300 ng/ml szinten kinyert koncentráció (ng/ml)	1	427,56	298,38	288,00	80,10	312,11
	2	285,59	275,35	246,63	278,28	263,30
	3	370,75	322,48	240,93	83,66	265,92
	4	357,09	263,50	252,45	284,24	264,07
	5	328,58	285,58	265,49	292,38	275,56
	6	308,50	271,15	243,89	276,72	258,64
Átlag		346,35	286,07	256,23	215,90	273,27
Szórás		50,49	21,56	17,82	103,96	19,83
Kinyerés %		115%	95%	85%	72%	91%
Precizitás %		15%	8%	7%	48%	7%

5.4. Kezelések eredménye

Szermaradék mérés

Cseresznye metabolomikai profil vizsgálata törzsinjektálást és permetezést követően az alábbiak szerint történt. A validálás végeztével a törzsinjektált cseresznyefák termését és levelét is megvizsgáltuk szermaradék mennyiségüket tekintve. A 12. ábrán jól látható a különböző metabolitok koncentrációja a cseresznye minta esetében. Ahogyan az várható volt, a SPIRO anyavegyület az injektálást követően lebomlott, így a metabolitjai vették át a helyet a termésben. A GLU és a MONO formátum dominált, de másik két metabolit is jelen volt (KETO, ENOL). A 12-as ábra a) részén a vizsgálat az általunk módosított Quechers mintaelőkészítéssel történt (PSA szorbens nélkül), a b) részen pedig a szabvány szerint Quechers-el előkészített minta metabolomikai profilozása látszik. A mintaelőkészítési optimalás során megfigyeltek és a szakirodalmi tapasztalatok után a mérési eredmények is igazolták azt, hogy az ENOL-t képes megkötni a szorbens és így a mérésig nem jut el a mintán keresztül a szermaradék ezen része teljes valójában. Ez a táblázat jó összevetési példa arra nézve, hogy milyen esetleges veszteségek léphetnek fel, ha a peszticid mérése előtt nem kellő kutatással és körültekintéssel választjuk ki a megfelelő paramétereket, anyagokat és módszereket.

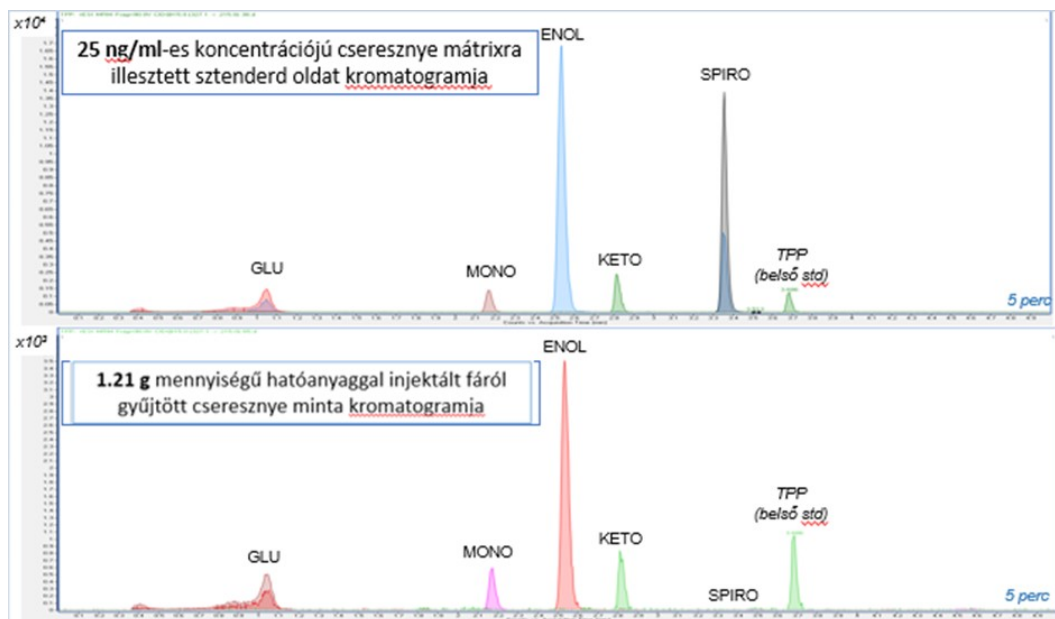


12.ábra: Cseresznye minta szermaradék koncentrációja, spirotetramát-specieszekre nézve. a) ábra: kinyerési értékek a módosított QuEChERS-el (PSA nélkül), b) ábra: kinyerési értékek a normál QuEChERS alkalmazásával (PSA-val) (Kiss *et al.*, 2022).

A vizsgálata során mért szermaradékok koncentrációját az MRL definíció alapján az ún. konverziós faktor segítségével adtuk meg „spirotetramát+spirotetramát-enol, spirotetramátban kifejezve” (Kiss *et al.* 2022).

Az injektálással kezelt cseresznye minták mellett a kontrollként tekintett permetezett fákról szedett termést is mértük. Ezek a SPIRO specieszt mérhető koncentrációban tartalmazták, ami az injektált mintákra nem volt jellemző. Tehát a növény lassabban bontja le azt a növényvédő szert melyet a külső környezetéből vesz fel. A kezelések dózisa is nagyban eltért, ugyanis az injektált mintákba kevesebb peszticid került (mint a permetezettékbe) és az gyorsan, egyenletesen szívódott fel a növényben biztosítva a védelmet a cseresznyelég ellen ugyanannyira, mint a permetezett kontroll esetén. A következtetéseket levonva elmondható, hogy a mért koncentrációk a bejuttatott dózis nagyságával korreláltak.

Élelmiszerbiztonsági szempontból a kezelések után maradt peszticid koncentrációk nem lépték át az MRL határértéket (3mg/kg cseresznye) egyik dózis esetén sem, az eredmények még a 10%-át sem közelítették ennek az értéknek. A permetezéssel kezelt fák termésében mért koncentráció korrelált a legkisebb dózissal injektált minták eredményeivel, ennek következtében a permetezéssel megegyező hatásfokú lehet ez a méretű dózis.



13.ábra: Adalékolt minta és injektált minta kromatogramja

A felső ábrán (13. ábra) egy 25ng/ml-es töménységű sztenderd oldat teljesion-kromatogramja látható. A vizsgált specieszek szépen elváltak egymástól az 5 perc alatt és megfelelő érzékenységgel rendelkezik a mérés. Az alsó képen pedig egy törzsinjektálással kezelt fáról gyűjtött cseresznye minta kromatogramja látható (13. ábra). Ezek összehasonlítása során a korábban említett anyavegyület átalakulása jól megfigyelhető, hiszen az adalékolt minta minden specieszt tartalmaz így a kromatogramról is ez olvasható le. Tehát az injektálás után az anyavegyület a 4 metabolitra bomlik, szinte teljesen eltűnve a növényben, mire a cseresznye érése befejeződik. Ekkor annak koncentrációja oly alacsony lesz, hogy már az nem mérhető a szermaradék meghatározása során.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az analitikai módszerfejlesztés és validálás sikeres volt, hiszen a cseresznye peszticid tartalma nagy biztonsággal kimutatható lett. A mért hatóanyagok 5 perces kromatográfias futtatás során váltak el egymástól. A validálás a SANTE előírásnak megfelelően a mért teljesítményjellemzőkkel történt, kivétel ez alól az ENOL precizitása 300ng/ml-es szinten, ahol 6 párhuzamos mérés alapján nem felelt meg a speciesz. A felső szinten (300ng/ml) mért visszanyerhetőség 72-155% közé esett minden minta esetén, az alsó szinten pedig a SPIRO kivételével 71-116% közötti értékeket mértem. Így a SPIRO meghatározása esetén korrigálni kell az alacsony kinyerési hatásfokkal (63%). A törzsinjektált fákról gyűjtött minták specieszek koncentrációja az MRL szint közelében sem volt így az ENOL precizitásának nemmegfelelőség felett eltekinthetünk. A szermaradék meghatározás az elvárt eredményeket hozta ennek tükrében. A termékek élelmiszerbiztonsági kockázatot nem rejtenek magukban az alkalmazott növényvédelem szempontjából, azaz fogyaszthatóak és tovább feldolgozásra alkalmasak.

A kutatás során az injektált növényvédőszer metabolizációs folyamatainak nyomonkövetése megvalósult a különböző időpontokban szedett levél és termés minták mérésével. A validált analitikai módszernek köszönhetően a spirotetramát anyavegyület és a metabolitok minőségi és mennyiségi meghatározása során sikerrel jártunk. A kromatogramokon láthatóvá vált ahogy az idő előrehaladtával a minták a SPIRO vegyületből egyre kevesebbet tartalmaznak és az abból létrejövő metabolitok egyre nagyobb mennyiségben fedezhetők fel, ez intenzívebb metabolizációs folyamatokra utal.

A már említett élelmiszerbiztonsági megfelelés mellett az alkalmazott dózisok egytől egyig megakadályozták a cseresznyelégység kártételét. További kutatandó terület a védelem hatásossága hosszútávon, azaz elegendő védelmet nyújt-e törzsinjektálás több éven keresztül?

IRODALMI HIVATKOZÁS

1. Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck 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, 412-431.
2. Anastassiades, M., Scherbaum, E., Tasdelen, B., Stajnbaher, D. (2007): Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: Ohkawa HMH, Lee, P. W. (szerk), Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety.
3. Arnaudov, V., Petkova, R., 2020. Spirotetramat (Movento®): new systemic insecticide for control of green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphidae) on peach. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 26 (No 2), 431–434.
4. Arthur C. Costonis (1981): Tree injection: Perspective Macro-Injection/Micro-Injection, Journal of Arboriculture 7
<https://doi.org/10.48044/jauf.1981.066> (Hozzáférés időpontja: 2023.08.26.)
5. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 396/2005/EK RENDELETE: a növényi és állati eredetű élelmiszerekben és takarmányokban, illetve azok felületén található megengedett növényvédőszer-maradékok határértékéről, valamint a 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról, részlet 70/6.
6. AZ EURÓPAI PARLAMENT ÉS A TANÁCS 1107/2009/EK RENDELETE: a növényvédő szerek forgalomba hozataláról, valamint a 79/117/EGK és a 91/414/EGK tanácsi irányelvek hatályon kívül helyezéséről
7. Carroll L.E., I.M. White, A. Freidberg, A.L. Norrbom, M.J. Dallwitz, and F.C. Thompson (2002): *Rhagoletis cerasi* (Linnaeus). Pest fruit flies of the world. https://www.delta-intkey.com/ffa/www/rha_cera.htm (Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 26.)
8. Codex Alimentarius Commission (1999): CAC GL 33/1999 Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs.

9. Codex Alimentarius Commission (2017): CAC/GL 90-2017 Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed, 13 pp.
10. Cui S., Li Z., Cheng G., Li R., Wang Y., Zhang X., Zhao F. (2018): Determination of sulfoxaflor, pyrifluquinazon and spirotetramat residues in fruits and vegetables by UPLC-MS/MS, Food Science, Vol. 39,8, 302-308.
11. Daniel C., Baker B. (2013): Dispersal of *Rhagoletis cerasi* in commercial cherry orchards: efficacy of soil covering nets for cherry fruit fly control. Insects 4(1):168-176
DOI: [10.3390/insects4010168](https://doi.org/10.3390/insects4010168)
12. Daniel C., Grunder J. (2012): Integrated Management of European Cherry Fruit Fly *Rhagoletis cerasi* (L.): Situation in Switzerland and Europe. Insects 3:956–988.
DOI: 10.3390/insects3040956.
13. Dr. Barta József, Dr. Biacs Péter, Dr. Deák Tibor, Dr. Hidegkuti Gyula, Dr. Körmöndy Imre, Monspartné dr. Sényi Judit, Dr. Rák István, Stégerné Dr. Máté Mónika, Dr. Vatai Gyula, Dr. Vukov Konstantin (2007): Növényi nyersanyagok feldolgozás technológiai műveletei, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 11-14; 62-63.
14. Dr. Kanyó Teréz, Kasza József (2007): Tartósítóiipari technológia I., FVM Vidékfejlesztési, Képzési és Szaktanácsadási Intézet, Budapest, 22-26, 34-35.
15. Dr. Kanyó Teréz, Kasza József (2020): Tartósítóiipari technológia II., Herman Ottó Intézet Nonprofit Kft., Budapest, 50-51.
16. Dr. Lázár István (2013): Elválasztástechnika, Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Debrecen, 52; 83-94-95-103;
17. Dr. Tömösközi Sándor, Dr. Sarkadi Lívია, Dr. Lelik László (2014): Élelmiszer – analitika II., Nemzeti Agrárszaktanácsadási, Képzési és Vidékfejlesztési Intézet, Budapest, 128-130, 134-136, 151-154, 166, 244, 251-254.
18. Dr. Salgó András (2009): Élelmiszer – kémia, Vidékfejlesztési, Képzési és Szaktanácsadási Intézet, Budapest, 88, 157-158, 163-164.
19. EB 2002/63/EK irányelve (2002) a növényi és állati eredetű termékekben és azok felszínén található peszticid-szermaradványok hatásági ellenőrzésére szolgáló közösségi mintavételi módszerek megállapításáról és a 79/700/EGK irányelv hatályon kívül helyezéséről, EGT vonatkozású szöveg (Az Európai Unió Hivatalos Lapja 87, 30–43.)

20. EB 152/2009/EK rendelete (2009) a takarmányok hatósági ellenőrzése során alkalmazott mintavételi és vizsgálati módszerek megállapításáról, EGT-vonatkozású szöveg (Az Európai Unió Hivatalos Lapja 54, 1–130.)
21. EB (2018): EU Reference laboratories for residues of pesticides. <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=100&Lang=EN> (Hozzáférés dátuma: 2023. 08. 30.)
22. F.H. Harries (1965): Control of insects and mites on fruit trees by trunk injection, *Journal of Economic Entomology*, Vol 58, 4, 631-634. <https://doi.org/10.1093/jee/58.4.631>
23. G. Ferretti, Tiziana Bacchetti, Alberto Belleggia, Davide Neri (2010): Cherry Antioxidants: From Farm to Table, *Molecules*, 15, 6993-6994. DOI: 10.3390/molecules15106993
24. Horváth Zsuzsanna (2018): Modell a kockázat alapú növényvédőszer-maradék monitoring programok tervezéséhez, Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
25. ISO (2017): General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO 17025 <https://www.iso.org/publication/PUB100424.html> (Hozzáférés dátuma: 2023. 08. 29.)
26. Jingjing Y., Mark D., Willcox, Michele C. M., Valerie W., Belinda S., Bradley J. W., Peter H. G., John H. K., Yong L. (2013): Chapter Four – Tear Fluid Protein Biomarkers, *Advances in Clinical Chemistry*, Volume 62;151-196 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800096-0.00004-4>
27. Junli C., Jindong L., Pengcheng R., Yanli Q., Shu Q. (2023): The residue and dietary assessment of spirotetramat and its four metabolites in cabbage using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Molecules* 28, 4763 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28124763>
28. Kádár Róbertné (2016): Élelmiszerbiztonság, Herman Ottó Intézet, Budapest, 56-57; 84; 94-95; 146-147.
29. Kiss Lajos, Csokai Lilianna Judit, Gyuris Rita, Szabó Árpád, Gutermuth Ádám, Sörös Csilla (2023): Metabolomikai tanulmányok a spirotetramát vonatkozásában cseresznye törzsinjektálása során

30. Lehotay, S.J., Maštovská, K., Lightfield, A.R. (2005): Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables, *J. AOAC International* 88, 615-629.
31. Leigh A., Ute A. Jonathan C. (2021): Trunk injection to deliver crop protection materials: an overview of basic principles and practical considerations
DOI: doi.org/10.32473/edis-HS1426-2021
32. Lelik László, Dr. Sarkadi Lívია, Dr. Tömösközi Sándor (2013): Élelmiszer – analitikai gyakorlat II., Nemzeti Agrárszaktanácsadási, Képzési és Vidékfejlesztési Intézet, Budapest, 178.
33. Magyar Élelmiszerkönyv 2-604 számú irányelv: Egyes gyorsfagyasztott élelmiszerek, Gyorsfagyasztott meggy, 19-20.
34. Maria A., Alba B., Luis C. C., Luna G., Samira J., Aija K., Renata L., Jose O. M., Ileana M., Stefanie N., Ragnor P., Hermine R., Alejandro R., Angela S., Miguel S., Alois S., Anne T., Benedicte V., Alessia V. (2019): Modification of the existing maximum residue levels for spirotetramat in small fruits and berries, *EFSA Journal*
DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5904
35. MSZ EN 12393-1:2014: Növényi eredetű élelmiszerek. A peszticid szermaradékok GC vagy LC-MS/MS meghatározásának módszerei: 1.rész: Általános megfontolások
36. MSZ EN 12393-2:2014: Növényi eredetű élelmiszerek. A peszticid szermaradékok GC vagy LC-MS/MS meghatározásának módszerei: 2.rész: Extrakciós és tisztítási módszerek,
37. MSZ EN 12393-3:2014: Növényi eredetű élelmiszerek. A peszticid szermaradékok GC vagy LC-MS/MS meghatározásának módszerei: 3.rész: Meghatározás és megerősítő vizsgálatok
38. MSZ EN 15662 Magyar Szabvány (2018): Növényi eredetű élelmiszerek. Peszticid szermaradékok meghatározásának multimódszere, acetonitriles extrakciót/ szétválasztást és diszperziós SPE tisztítást követő GC- és LC-alapú vizsgálattal. Moduláris QuEChERS módszer.
39. N.-J. Salazar-López, M.-L. Aldana-Madrid, M.-I. Silveira-Gramont, J.-L. Aguiar (2016): Spirotetramat – An Alternative for the Control of Parasitic Sucking Insects and its Fate in the Environment, *Insecticides Resistance*
DOI: 10.5772/61322

40. Nickolas G. K., Maria C. B., Anna S., Erifili P. N., Georgios T. P. (2022): Trunk Injection with Insecticides Manages *Xylotrechus chinensis*, *Insects* 13, 1106.
DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13121106>
41. Pokol György, Gyurcsányi E. Róbert, Simon András, Bezúr László, Horvai György, Horváth Viola, Dudás Katalin Mária (2011): *Analitikai kémia*, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, 284-301;351-357.
42. Qingtao Zhang, Yuling Chen, Shouyi Wang, Yurong Yu, Ping Lu, Deyu Hu, Zaihui Yang (2017): Dissipation, residues and risk assessment of spirotetramat and its four metabolites in citrus and soil under field conditions by LC-MS/MS, State Key Laboratory Breeding Base of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering
43. R. Nauen, U. Reckmann, J. Thomzik and W. Thielert (2008): Biological profile of spirotetramat (Movento) – a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species, *Bayer CropScience Journal* 61, 245-278.
44. SANTE 18813/2017: EB Directorate-General For Health And Food Safety, Safety of the Food Chain Pesticides and biocides (DG SANTE): Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. 46 pp.
45. SANTE 11312/2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2021.
46. Sörös Csilla (2019): *Növényvédelmi Kémia és Toxikológia*. Typotex, Budapest. ISBN: 978 963 493 057 0
47. US EPA. 2008. *Pesticide Fact Sheet, Conditional Registration, Spirotetramate*
<https://www.thebeeyard.org/wp-content/uploads/2010/03/plugin-spirotetramat.pdf>
(Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 31.)
48. W.A. Roach (1939): Plant Injection as a Physiological Method, *Annals of Botany*, Vol. 3, No. 9 (155-226) <https://www.jstor.org/stable/42906705> (Hozzáférés időpontja 2023.08.26.)
49. Wee. L. Yee, Diane G. Alston (2006): Effects of Spinosad, Spinosad Bait, and Chloronicotinyl Insecticides on Mortality and Control of Adult and Larval Western Cherry Fruit Fly (Diptera: Tephritidae), *Horticultural Entomology*, 1722-1732.
<http://jee.oxfordjournals.org/> (Hozzáférés dátuma: 2023.09.20.)

50. Yulong Z., Xingang L., Jun. Xu., Fengshou D., Xuyang L., Minmin L., Lifang D., Yongquan Z., (2013): Simultaneous determination of spirotetramat and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, Vol.1299, 71-77.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.049>

Internet:

1. Internet 1: *Rhagoletis cerasi* https://en.wikipedia.org/wiki/Rhagoletis_cerasi
(Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 26.)
2. Internet 2: European Cherry Fruit Fly
<https://extension.usu.edu/pests/research/european-cherry-fruit-fly> (Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 26.)
3. Internet 3: Canadian Food Inspection Agency (CFIA). 2016. *Rhagoletis cerasi* (European cherry fruit fly) – Fact Sheet.
<https://inspection.canada.ca/plant-health/invasive-species/insects/european-cherry-fruit-fly/fact-sheet/eng/1467913088353/1467914654510> (Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 26.)
4. Internet 4: Spirotetramat https://en.wikipedia.org/wiki/Spirotetramat#cite_ref-2
(Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 26.)
5. Internet 5: Movento
https://agro.bayer.co.hu/termek/novenyvedelmi_termek/rovarolo_szerek/index.php?id=47 (Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 26.)
6. Internet 6: Pesticide residues: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls/details?lg_code=EN&pest_res_id_list=2750&product_id_list=31 (Hozzáférés időpontja: 2023.08.29.)
7. Internet 7: Növényi endoterápia: <https://www.jardineriaon.com/hu/endoterapia.html>
(Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 29.)
8. Internet 8: EU Pesticides Database: https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en (Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 29.)

9. Internet 9: AGROMEDIUM:
<https://agromedium.com/hu-hu/novenyvedo-szer/movento-e7f6455d/> (Hozzáférés időpontja: 2023. 08. 29.)
10. Internet 10: EU Pesticides Database 2019-es változás
https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls/details?lg_code=EN&pest_res_id_list=2750&product_id_list=31 (Hozzáférés időpontja: 2023.08.30.)
11. Internet 11: <https://balintgazda.hu/aktualis-kert/aprilis/mitol-kukacos-a-cseresznye.html> (Hozzáférés időpontja: 2023.09.18.)
12. Internet 12: <https://magyarmezogazdasag.hu/2022/08/16/novenyorvoskozteruleten-permetezes-van-injektalas/> (Hozzáférés időpontja: 2023.09.20.)
13. Internet 13: <https://www.thomasci.com/scientific-supplies/Primary-Secondary-Amine> (Hozzáférés időpontja: 2023. 09. 21.)
14. Internet 14: <https://www.semanticscholar.org/paper/QuEChERS-%28Quick%2C-Easy%2C-Cheap%2C-Effective%2C-Rugged%2C-%E2%80%93-Schmidt/f9529e8a3fd775609d83d0139cd245971c8d3b63> (Hozzáférés időpontja: 2023. 09. 21.)
15. Internet 15: <https://www.izeltlabuak.hu/faj/europai-cseresznyelegy> (Hozzáférés időpontja: 2023.09.29.)
16. Internet 16: <https://agroforum.hu/szaktanacsadas-kerdesek/mit-tehetek-kukacos-cseresznye-ellen/> (Hozzáférés időpontja: 2023.09.29.)

Mellékletek

1. sz. melléklet: Validálási paraméterek és kritériumok (SANTE 11312/2021)

PARAMÉTER	ELLENŐRZÉS módja	KRITÉRIUM
<i>Ionarány</i>	A kvalitatív és kvantitatív MRM átmetek ionarány ellenőrzése.	A standard oldatokra számolt átlagos ionaránytól való eltérés $\pm 30\%$ lehet.
<i>Linearitás/érzékenység</i>	A linearitást 5 szinten szükséges ellenőrizni.	A számolt koncentráció valós értéktől való eltérése $\leq \pm 20\%$ lehet.
<i>LOD</i>	A meghatározandó komponens legkisebb mennyisége, ami biztonsággal megkülönböztethető a vakmintától és a zajtól.	$S/N > 3$.
<i>LOQ</i>	A legalacsonyabb adalékolási szint, amely a visszanyerésre és precizitásra vonatkozó azonosítási- és módszerfejlesztési kritériumoknak megfelelő.	$\leq \text{MRL}$
<i>Mátrixhatás</i>	Össze kell hasonlítani a mátrix-illesztett és az oldószeres standard oldatsorozatok válaszejét.	A 20% -nál nagyobb jelelnyomás és erősítés esetén a mátrixhatást figyelembe kell venni a kalibráció során.
<i>Precizitás (RSD_r)</i>	Adagolási szinteken ismételtetési RSD _r .	$\leq 20\%$
<i>Precizitás (RSD_{wr})</i>	Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság a mérések validálási/verifikálási adatai alapján.	$\leq 20\%$
<i>Retenció idő</i>		± 0.1 perc
<i>Robosztusság</i>	Az „on-going” módszer validálási, valamint verifikálási adataiból történő átlagos visszanyerés és RSD _{wr} .	Átlagos visszanyerés: $70\text{-}120\%$, az RSD _{wr} $\leq 20\%$ lehet.
<i>Specifikusság</i>	A reagens-, valamint a kontroll vakminták válaszejele.	Nem lehet detektálható csúcs.
<i>Visszanyerhetőség</i>	Adalékolt szintek átlagos visszanyerése.	$70\text{-}120\%$

2. sz. melléklet: A vizsgálat során felhasznált eszközök

Megnevezés	Gyártó
centrifugacső (15-50 ml)	VWR
vial (mintatartó edény)	VWR
PTFE szűrő (0,22 µm)	VWR
elektromos daráló	BOSCH
analitikai mérleg	Explorer OHAUS
automata pipetta	VWR
laboratóriumi centrifuga	HERMLE (Z20 6A)
fagyasztószekrény	ZANUSSI
500 ml-es mérőlombik	-
eluens tartó üveg	-
vortex mixer	IKA (lab dancer)

Csokai Lilianna Judit - Diplomamunka

Köszönetnyilvánítás

Jelen dolgozat elkészítése során számtalan segítséget kaptam, amikért végtelenül hálás vagyok.

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőimnek, Marczika Andrásné dr. Sörös Csillának és Gyuris Ritának, az odaadó segítségüket, akik a laboratóriumi méréseimet vezették és a dolgozatom készülését ellenőrizték és felügyelték, miközben hasznos szakmai tanácsokkal láttak el.

Továbbá köszönettel tartozom hallgatótársaimnak, akik a kutatás során rengeteg segítséget nyújtottak, és számos hasznos tanáccsal láttak el.

Végül hálával tartozom a családomnak türelméért és feltétel nélküli szeretetéért.

1 Korinthus 10:31

Csokai Lilianna Judit - Diplomadolgozat

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréseről és eredetiségéről

A hallgató neve: Csokai Lilianna Judit

A Hallgató Neptun kódja: EQDZIJ

A dolgozat címe: UHPLC-MS/MS analitikai módszer kidolgozása és validálása cseresznye minták spirotramát és metabolitjainak meghatározására törzsinjektációs növényvédelmi kezelést követően

A megjelenés éve: 2023

A konzulensek intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Növényvédelmi Intézet

A konzulensek tanszékének a neve: Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék, Rovartani Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

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

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2023. év 11. hó 02. nap



Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Csokai Lilianna Judit (EQDZIJ) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védésre **javaslom** / **nem javaslom**¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: 2023. év 11. hó 03. nap

belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.

NYILATKOZAT

Csokai Lilianna Judit (EQDZIJ) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védésre **javaslom** / **nem javaslom**¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: Budapest, 2023. 11. 03.



belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.