

# **SZAKDOLGOZAT**

**Horváth Anikó**

**2024**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**

**Gödöllői Campus**

**Műszaki Intézet**

**Élelmiszerlánc minőségirányítás szakirányú továbbképzési  
szak**

**TERVEZETT MINŐSÉG AZ ÉLELMISZERANALITIKAI VIZSGÁLATOKBAN**

**Belső konzulens:** Dr. Korzenszky Péter Emőd  
habilitált egyetemi docens

**Belső konzulens  
intézete, tanszéke** MATE, Műszaki Intézet  
Mezőgazdasági és  
Élelmiszeripari Gépek Tanszék

**Készítette:** Horváth Anikó

**Gödöllő  
2024**

**MŰSZAKI INTÉZET  
ÉLELMISZERLÁNC MINŐSÉGIRÁNYÍTÁS  
SZAKIRÁNYÚ TOVÁBBKÉPZÉSI SZAK**

**SZAKDOLGOZAT**

feladatlap

*Horváth Anikó (SGXGGK)*

**részére**

**A szakdolgozat címe:**

**Tervezett minőség az élelmiszeranalitikai vizsgálatokban**

**Feladatkiírás:**

Mutassa be a „Tervezett minőség” előnyeit az élelmiszeranalitikai laboratóriumokban. Ismertesse a módszerfejlesztés és módszer életciklus lépéseit a tervezett minőségű analitika eléréséhez, vezessen végig egy módszerfejlesztési tervezési feladatot.

**Közreműködő tanszék:** Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Gépek Tanszék

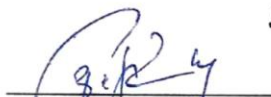
**Külső konzulens:**

**Belső konzulens:** Dr. Korzenszky Péter Emőd, habilitált egyetemi docens, MATE, Műszaki Intézet, Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Gépek Tanszék

**Beadási határidő:** 2024. április 22. (hétfő) 12.00 óra

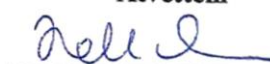
Gödöllő, 2023. november 15.

**Jóváhagyom**

  
Dr. Bártfai Zoltán  
tanszékvezető

  
Dr. Korzenszky Péter  
szakfelelős

**Átvettem**

  
Horváth Anikó  
hallgató

A dolgozat készítőjének külső konzulense nyilatkozom arról, hogy a hallgató az előre egyeztetett konzultációkon megjelent.

Gödöllő, 2024.                      hó                      nap

\_\_\_\_\_  
(külső konzulens)

# Tartalomjegyzék

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| BEVEZETÉS .....                                                                                     | 2  |
| 1. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS .....                                                                    | 4  |
| 1.1. Tervezett analitikai minőség .....                                                             | 4  |
| 1.2. Kockázat alapú módszerfejlesztés és életciklus szemlélet az analitikai vizsgálatok során ..... | 6  |
| 1.3. Nitrózaminok az élelmiszerekben.....                                                           | 9  |
| 1.4. Környezetvédelmi lehetőségek.....                                                              | 12 |
| 1.5. Hatékonyságra törekvés az analitikai módszertervezésben .....                                  | 15 |
| 2. ANALITIKAI MÓDSZERFEJLESZTÉS QBD ELVEK SZERINT .....                                             | 16 |
| 2.1. Előzetes információk összegyűjtése .....                                                       | 16 |
| 2.2. Analitikai cél profil megfogalmazása .....                                                     | 17 |
| 2.3. Analitikai technika kiválasztása .....                                                         | 17 |
| 2.4. Felhasználói igények megfogalmazása.....                                                       | 19 |
| 2.5. Kritikus minőségi jellemzők meghatározása és kezdeti kockázatbecslés .....                     | 20 |
| 2.6. Módszer optimalizálás kísérlettervezéssel .....                                                | 22 |
| 2.7. Robusztus tartomány megadása.....                                                              | 26 |
| 2.8. Kontroll stratégia.....                                                                        | 26 |
| 2.9. Validálás .....                                                                                | 27 |
| 2.10. Rutin használat és folyamatos módszer monitorozás .....                                       | 29 |
| 3. MÓDSZERFEJLESZTÉSI TERV KIDOLGOZÁSA.....                                                         | 32 |
| 3.1. Információk gyűjtése nitrózamin mérésekről .....                                               | 32 |
| 3.2. Nitrózamin mérés célja.....                                                                    | 34 |
| 3.3. Analitikai technika kiválasztása nitrózamin méréshez .....                                     | 34 |
| 3.4. Felhasználói igények nitrózamin mérés során .....                                              | 36 |
| 3.5. Kritikus paraméterek a nitrózaminok vizsgálata során.....                                      | 36 |
| 3.6. Módszer optimalizálás és kísérlettervezés gyakorlata .....                                     | 38 |
| 3.7. Robusztusságvizsgálat (példa) .....                                                            | 47 |
| 3.8. Rendszeralkalmasság ellenőrzése, kontroll stratégia .....                                      | 49 |
| 4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....                                                                 | 50 |
| ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                                 | 53 |
| IRODALOMJEGYZÉK.....                                                                                | 55 |
| TÁBLÁZATOK, ÁBRÁK JEGYZÉKE .....                                                                    | 59 |
| MELLÉKLETEK.....                                                                                    | 60 |

# BEVEZETÉS

Nyers és feldolgozott élelmiszerek minőségének, biztonságának és egészségügyi hatásának meghatározása és előrejelzése egyre fontosabbá válik. Egyre több nyomnyi szennyezőt mutatnak ki, amelyek egészségkárosító hatása a megnövekedett daganatos betegségekben számottevő. A termékfejlesztést a végtermékek minőségének és a gyártási folyamat stabilizálásán túl, a biztonságos élelmiszer előállítás szükségessége vezérli. Jelenkori fejlesztési tevékenységet ugyan befolyásolják az élelmiszeripari hagyományok, de nem szabad figyelmen kívül hagyni az ellátási lánc globalizációját, a folyamatlépések fokozott kiszervezését, ezért standardizált eljárásokra és követelményrendszerekre van szükség a biztonság és minőség folyamatos fenntartásához. Elvárás a gyártók felé a fogyasztók, valamint a szabályozók, vagyis a hatóság részéről, hogy bizonyítottan egészségre nem ártalmas élelmiszereket állítsanak elő. Egyre szigorúbb követelményeknek kell megfelelni a minőség, a biztonság és a környezeti lábnyom tekintetében.

A minőségi koncepciók beépítése a gyártási folyamatba - nemcsak a végtermék minőségi ellenőrzése - elősegíti a javuló termékminőséget és termékbiztonságot. Hozzájárul a specifikációk megfeleléséhez és a folyamatbiztonság növeléséhez, valamint csökkenti a nyersanyag-erőforrás felhasználást és a hulladéktermelést. A tervezett minőség (quality by design) fogalmát Juran használta először (1992). A QbD (Quality by Design) koncepció egy univerzális, átfogó megközelítés, amely három folyamatból áll:

- Minőségi tervezés, amely magában foglalja a megfeleléshez szükséges termékek és folyamatok fejlesztését a vásárlói igények kielégítése érdekében;
- Minőség ellenőrzés, amely a tényleges teljesítmény értékelése és a minőségi céloktól való eltérések korrekciója; valamint
- Minőségfejlesztés, a minőségi teljesítmény magasabb szintre emelése

A tervezett minőség kulcsfontosságú szempontja a kockázatértékelés (Ecsedi et al, 2017), a kritikus folyamatparaméterek meghatározása és kontrol alatt tartása, amelyek befolyásolhatják a végső termékminőséget. QbD szemlélet szerint a fejlesztés legfontosabb lépése annak megértése, hogy az egyes folyamatok, felhasznált anyagok, módszerek hogyan hatnak a végtermék vagy szolgáltatás minőségére.

A laboratóriumi tevékenység minőségbiztosítási rendszere többnyire valamely más tevékenység minőségügyi rendszeréhez kapcsolódik, például a termék gyártásához. Ahhoz, hogy analitikai oldalról garantálni tudjuk a termék minőségét, vagyis megbízható mérési eredményeink legyenek, a technológiában már korábban bevezetett QbD folyamatot

fokozatosan ki kell terjeszteni az analitikai módszerfejlesztésekre is. Kiemelve a kockázatkezelés és folyamat szemlélet fontosságát az analitikai fejlesztések során is. Ez az „Analytical Quality by Design”, vagy rövidítve AQBd.

Dolgozatomban bemutatom a QbD technika alkalmazási lehetőségét és előnyeit az élelmiszeranalitikai vizsgálatok során. Összegyűjtöm, hogy az analitikai vizsgálatok felülvizsgálata és az új módszerek fejlesztése során milyen szempontokat kellene figyelembe venni, hogy az élelmiszerbiztonság szempontjából megbízható (validálható) módszerekkel valid eredményeket kapjunk a mérések során. A vizsgálatok megbízhatósága mellett lényeges fejlesztési követelmény az érzékenység és specifikusság folyamatos növelése, mivel a hatósági elvárások, a kimutatási határok követelményei folyamatosan szigorodnak. Fejlesztési munka során nem szabad figyelmen kívül hagyni a környezetvédelmi megfontolásokat, a vizsgálat ideje és költségek szempontokat sem.

Szakdolgozatomban szeretném bemutatni ennek a komplex igényt kielégítő analitikai fejlesztési munkának a lehetőségeit egy kiragadott példán keresztül. Kiemelném a kockázat elemzés fontosságát, különös tekintettel az optimalizálandó vizsgálati paraméterek kiválasztására. Hangsúlyozom a robusztusság vizsgálat jelentőségét, és ezzel együtt az analitikai készülékek és vizsgálati rendszerek kvalifikálásának szükségességét. Az analitikai készülékek és technikák folyamatos fejlődésével a vizsgáló laboroknak a lehetőségei egyre javulnak arra nézve, hogy kövessék a szigorodó minőségi követelményeket. Mindemellett azonban a vizsgálati módszerek folyamatos ellenőrzésének, felülvizsgálatának és fejlesztésének jogos igénye merül fel a minőségtudatos laboratóriumok és a fogyasztókat képviselő hatóságok részéről.

Kiragadott példám az élelmiszerekben előfordulható nitrózaminok mennyiségi meghatározására kidolgozandó analitikai vizsgálat fejlesztési terve a QbD irányelveknek megfelelően, figyelembe véve a környezetvédelmi szempontokat is. Az elmúlt évtizedekben a gyógyszeripari analízisben előtérbe kerültek a nitrózaminok vizsgálatai, de az élelmiszeranalitikában még nem fektetnek ekkora hangsúlyt ezen anyagok vizsgálatára. Holott a nitrózaminokról tudjuk, hogy egészségre ártalmas, daganatot okozó anyagok és egyes élelmiszerekben a gyártástechnológiából következően bizonyos a jelenlétük. Rákkeltő hatásukat már az ötvenes években leírták. A kisebb molekulatömegű, illékony képviselőik nagymértékben ártalmasak az egészségre. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség állásfoglalása szerint a számos nitrózamin bizonyítottan rákkeltő, a többi pedig emberben valószínűleg, illetve feltételezhetően rákkeltő (Kockazos.hu). 2023. évben újra vizsgálták a nitrózaminok jelenlétét és potenciális veszélyeit az élelmiszerekben, elsősorban feldolgozott húskészítményekben (Gülsüm, 2023; EFSA, 2023).

# 1. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1. Tervezett analitikai minőség

A minőségtervezés gyakorlatilag a minőség termékbe való beletervezését jelenti (Demeter, 2016). Célja, hogy már a terméktervezés során előtérbe helyezze a minőségi szempontokat. Ha egy élelmiszeripari terméket így fejlesztenek, nagyobb az esélye annak, hogy a rutin gyártás során kevesebb hiba fordul elő, és ezáltal nő az élelmiszer megbízhatósága, valamint a termék megfelel majd a fogyasztói és hatósági elvárásoknak (Kovács, 2017).

A „tervezett minőség” az élelmiszergyártás technológiai folyamataiban egyre inkább megvalósul. Az újonnan bevezetett kockázatszemléletű minőségirányítási rendszereknek köszönhetően, vagy a helyes gyártási gyakorlat folyamatos optimalásával az élelmiszeripari vállalkozásokban is megjelent a terméktervezés folyamata. Ha az első tesztelések során kiderül, hogy a tervezett élelmiszeripari termék mégsem felel meg az előre meghatározott minőségi paramétereknek, és hatósági elvárásoknak, újra tervezik. A termék elvárt jellemzőit előre meghatározzák. Ezek a termék összetétele, formája, az összetevők állaga, funkciói, a termék esztétikai megjelenésén kívül, annak élettani hatása, ezen belül például a megengedhető szennyező limitek is. A terméktervezés során dolgozzák ki a gyártás folyamatát és a kapcsolódó szervizszolgáltatásokat. Ez utóbbiak körébe soroljuk a szükséges analitikai vizsgálatokat, és az ehhez szorosan kapcsolódó berendezések karbantartási, kvalifikálási feladatait is.

A termékek és a hozzájuk kapcsolódó szolgáltatások, esetünkben az analitikai vizsgálatok fejlesztésének elvi folyamata lényegében megegyezik (Demeter et al., 2022).

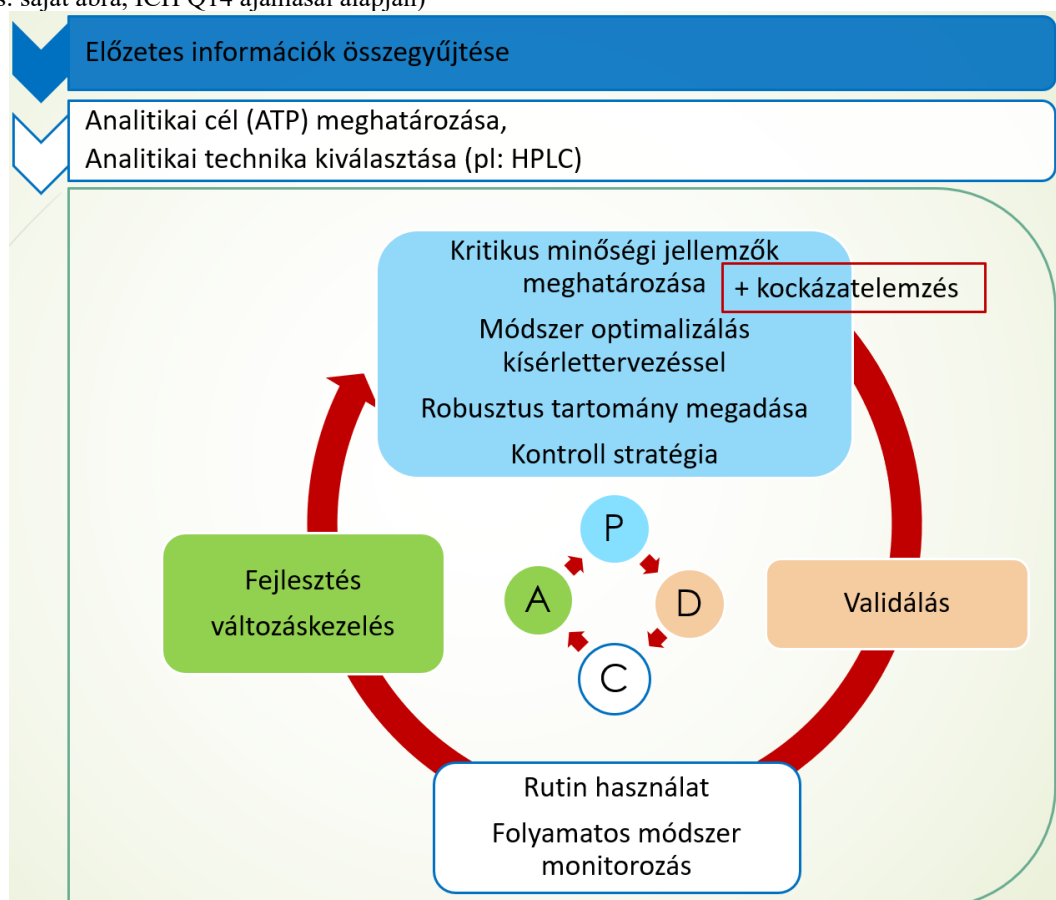
A tervezett analitikai minőség (AQbD, Analytical Quality by Design) bevezetésével az élelmiszeripari laboratóriumokban az a célunk, hogy olyan vizsgálati módszereket fejlesszünk, mellyel az élelmiszer minőségét analitikai oldalról tudjuk garantálni. A megfelelő, vagyis elfogadási határon belüli vizsgálati eredmény egyúttal az élelmiszer megbízhatóságát jelzi. Ehhez szükséges az ellenőrzési pontokat és határértékeket meghatározni, és az ellenőrzési pontokhoz a megfelelő, validálható mérési módszereket kidolgozni. Analitikai vizsgálati módszer fejlesztése során manapság elvárás, hogy modellezzünk, kísérlettervezés és módszeroptimalizálás segítségével értsük meg a mérési paraméterek hatását, és tudatosan válasszuk ki a megfelelő mérési körülményt (Ecsedi et al, 2017). Minden olyan paramétert, amely a vizsgálat eredményét befolyásolhatja, a tudományos ismeretek alapján előre kell jelezni. A kritikus paraméterekre, a vizsgálatok megbízhatóságának tekintetében kockázatot kell értékelni. Folyamatszemlélettel kell fejleszteni és életciklusban kell gondolkodni a

vizsgálati módszer tekintetében. A módszerfejlesztés nem zárul le a validálással. Folyamatos ellenőrzés és rendszeres felülvizsgálat szükséges az egyes analitikai vizsgálatokhoz a tudomány és technika elérhető ismeretei és gyakorlata szerint.

Az élelmiszer-biztonsági irányítási rendszerek szabványban (MSZ EN ISO 22000:2018) szerepelnek a mérések szabályozottságára és mérőeszközök kvalifikáltságára, a monitoring rendszerre és kontrollálási feladatokra vonatkozó alfejezetek. A laboratóriumokra vonatkozó új MSZ EN ISO/IEC 17025:2018 szabvány fő változásai a kockázatkezelések (pl.: eredménymegadás megbízhatósága, eszközök kvalifikáltsága, pártatlanság) hangsúlyozása. A helyes gyógyszergyártási gyakorlatban pedig már kötelező érvényű a kockázat kezelés és folyamat szemlélet nemcsak a technológiai, hanem az analitikai fejlesztések során is. Erről az ICH (a gyógyszergyártás technológiai és minőségi követelményeinek harmonizálására létrehozott nemzetközi tanács) adott ki irányelvet (Q14 számú). Ezek figyelembevételével történő módszerfejlesztési stratégiát szeretném a dolgozatban ismertetni.

A folyamatszemlélet alapján a tervezett minőségű analitikai módszer fejlesztése (AQbD) az 1.ábra szerint valósítható meg.

**1. ábra:** Analitikai módszerfejlesztés QbD szerint  
(forrás: saját ábra, ICH Q14 ajánlásai alapján)



A módszerfejlesztési folyamat lépései a PDCA (Tervezés - Cselekvés - Ellenőrzés – Beavatkozás) ciklikus folyamatnak megfeleltethetőek, a modellben felismerhető a "Deming-kerék" (Berényi, 2011).

## **1.2. Kockázat alapú módszerfejlesztés és életciklus szemlélet az analitikai vizsgálatok során**

Analitikai módszer fejlesztése kezdetén többnyire korlátozott tudással rendelkezünk az analitikai feladatról. Sokszor csak feltételezéseink (hipotéziseink) vannak, hogy milyen irányba célszerű elindulni. A fejlesztési folyamat lényeges része a kezdeti minél szélesebb körű és sok mindenre kiterjedő (termék, alapanyagok, technológia, készülékek stb.) információgyűjtés.

Első feladatunk az analitikai cél profil, az ATP (Analytical Target Profile) meghatározása. (Ecsedi et al, 2017) Vagyis az analitikai feladat pontos definiálása, annak a tartománynak a kijelölésével, amin belül az analitikai módszer feleljen meg az előre meghatározott követelményeknek. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy már a legelső lépésben meg kell határozni a mérési bizonytalanság elfogadható mértékét. Ki kell jelölni azt a tartományt, amin belül a fejlesztendő módszer validálható, tehát az elvart mértékben precíz és torzítatlan. Analitikai cél ismeretében ki kell választani az analitikai technikát, amely egyáltalán alkalmas lehet erre a feladatra és csak ezután kezdhethetjük a módszerfejlesztést. Az analitikai módszer használhatóságával szemben követelményeket támasztunk. Ezek egyrészt a választott technika elvi lehetőségeiből, a rendelkezésre álló eszközök adottságaiból erednek, más részüket pedig minőségi követelmények, törvényi előírások, vagy éppen a fogyasztók szabják meg. A módszerfejlesztés során a következő PDCA lépések ismétlődnek (Kovács, 2017):

*Plan (P) – Tervezés* (Kovács, 2017):

A „tervezés” fázisa gyakorlatilag az analitikai módszer fejlesztése. Az elvart eredmény esetünkben a validálható analitikai módszer. A végső módszernek része a specifikáció és annak pontossága is. A már használatban lévő vizsgálati módszerek problémáinak felismerése és javítási lehetőségek keresése is a tervezés szakaszba tartozik. A készülő vizsgálati módszert véglegesítése előtt optimalizálni kell. Az optimaláshoz szükséges megadni a kritikus paramétereket. Ehhez meg kell határozni a módszer kritikus jellemzőit (CMA - Critical Method Attributes) a módszervalidálási elvárások és a módszert majd alkalmazó laboratóriumok felhasználói igényei alapján (pl: használandó analitikai készülékek típusai, az oldatok stabilitása, optimális mérési idő). CMA-k teljesülésére nézve kockázatelemzéseket kell végezni. Ez leggyakrabban Ishikawa elemzéssel történik. Fel kell vázolni a lehetséges problémákat a fejlesztendő módszerrel kapcsolatban, valamint a hozzájuk kapcsolódó

információkat. A problémát okozható paramétereket rangsorolni kell, majd kiválasztani azokat, melyekkel elsőként foglalkozni akarunk. Ez a kiválasztás alapvető fontosságú, hiszen minden problémát egyszerre és azonnal nem lehet megoldani. A kiválasztott problémák megoldására kísérlettervet kell készíteni. Kísérletterv alapján következhet a tesztek elvégzése majd értékelésük. A tervezés fázisban a kiválasztott analitikai műszer ismeretében meg kell határozni a robusztus tartományt, amelyen belül a vizsgálati módszer alkalmas lesz feladatának ellátására. Ki kell dolgozni a kontroll stratégiát, meg kell határozni a folyamatjelző rendszeralkalmassági paramétereket.

*Do (D) – Cselekvés (Kovács, 2017):*

A „cselekvés” esetünkben a fejlesztett vizsgálati módszer validálását jelenti. A validálás mérései során használt analitikai berendezéseknek és készülékeknek kvalifikált státuszban kell lenniük. A felhasznált műszereket kalibrálni kell. Kalibrálás, kvalifikálás és validálás egymásra épülő tevékenységek. A kvalifikáláshoz kalibrált mérőműszereket kell használni. Megfelelő, érvényes validálást csak kvalifikált berendezésekkel, kvalifikált környezetben lehet végezni. Kíváncsú, hogy a validálásban a majdani rutin vizsgálatban résztvevő személyzet vegyen részt, akiket erre előre oktatni kell. A validálás az analitikai célkitűzésben foglalt feladatok megvalósíthatóságának ellenőrzése, annak igazolása, hogy a vizsgálati módszer alkalmas arra a feladatra, amire fejlesztettük, és a jövőben is alkalmas lesz. A validálás során igazolni kell, hogy azok a minőségi tulajdonságok, és a hozzájuk kapcsolódó paraméterek, amelyek meghatározóak a minőségi követelmények teljesülése szempontjából, állandóak és megismételhetőek maradnak. Azt, hogy mely vizsgálati paraméterek kritikusak, meg kell határozni és dokumentálni a tervezési fázis kockázatelemzése alapján. Az alkalmasságvizsgálatnak ki kell terjednie az analitikai rendszerre, az analitikai módszerre, valamint a vizsgáló laboratóriumra és személyzetére. Fontos eleme a „cselekvés” fázisnak az adatok összegyűjtése is, amelyek majd az „ellenőrzés” és „beavatkozás” lépésekben történő elemzési feladatokhoz szükségesek.

*Check (C) – Ellenőrzés (Kovács, 2017):*

Az „ellenőrzés” az analitikai célkitűzések és a validálás során nyert információk összevetése. Az ellenőrzés a gyakorlatban a mérési eredmények tanulmányozása, amelyeket a „cselekvés-validálás” lépésben és az azt követő rutin mérések során gyűjtünk össze. Majd ezeket összehasonlítjuk az elvárt eredményekkel, amelyeket a „tervezés” lépésben határoztunk meg a kontroll stratégiában (valójában ez a rendszer alkalmassági vizsgálatok követelménye). A rendszeralkalmassági vizsgálat célja, hogy ellenőrizze, hogy adott mérési körülmények között a rendszer megfelelően működik és alkalmas az analitikai vizsgálat elvégzésére. A fejlesztett

vizsgálati módszer szerves részét képezi. A teljes analitikai rendszer (mérőberendezés, eszközök, vegyszerek, referenciaoldatok stb.) aktuális minőségének jellemzésére szolgál. Rendszeralkalmassági vizsgálatok bevezetése és rendszeres végzése az alapja a jó analitikai gyakorlatnak, alkalmas eszköze a "vis major" kiküszöbölésnek és legkisebb befektetéssel legnagyobb biztonságot adja az analitikai mérések alatt. Rendszeralkalmassági paraméterek többnyire saját elfogadási paraméterek, de ritkán jogszabályi követelmények is lehetnek. Az „ellenőrzés” során tehát eltéréseket keresünk a „tervezés” és „cselekvés” között, valamint megvizsgáljuk a tervezést, hogy a megvalósíthatóság szempontjából mennyire megfelelő és teljes. A tervezésben és a cselekvésben is előfordulhatnak hiányosságok. Az összegyűjtött adatok ábrázolásával (pl. kontroll kártya) a folyamat átláthatóbbá tehető, az ismétlődő PDCA ciklusok trendjei egyértelműen bemutatathatók. Az ellenőrzés különböző okokat tárhat fel a beavatkozásra az analitikai módszer esetén is.

*Act (A) – Beavatkozás (Kovács, 2017):*

A „beavatkozás” zárja, ugyanakkor újraindítja a folyamatot. A negyedik (beavatkozás) lépés a fejlesztett és az elvárt vizsgálati módszer közötti különbségek kiigazításáról és javításáról szól, nem pedig a tervek megvalósításáról. Az ellenőrzés következtetései alapján újabb intézkedésekre és fejlesztésekre lehet szükség, mely átvisz egy következő PDCA ciklusba, egy újabb tervezési fázis kezdődik. Ha egy analitikai módszer eredményeivel elégedettek vagyunk, az jelzés arra, hogy a következő PDCA körben olyan paraméterekre fókuszáljunk, melyek eddig a kezdetben felállított rangsorban lejjebb helyezkedtek el. Ha a tényleges és a tervezett eredmények között jelentős eltérések vannak, intézkedéseket kell bevezetni. Az eltérések vizsgálatakor meg kell állapítani, hogy mi okozza azokat elsősorban. Ezt követően meg kell határozni, hogy hol kell változtatásokat végrehajtani, amely magában foglalhatja a vizsgálati módszer újrfejlesztését is.

*Spirálszerű ismétlődés*

A PDCA módszer egyik alapelve a ciklikusság – ha egy hipotézis beigazolódik vagy elvetődik, a ciklus újraindításával további új ismereteket szerezhethetünk. (Kovács, 2017) A PDCA ismétlődése felfelé ívelő spirált hoz létre. A vizsgálati módszer mindig tovább fejleszthető, a ciklus ismétlések során pedig mindig egy magasabb minőségi szinten hajtjuk végre a lépéseket. Egy új vizsgálati módszer kidolgozásakor, amikor az összes információ még nem áll rendelkezésre nem biztos, hogy rögtön a legjobb módszert fejlesztjük. De folyamatosan tudjuk javítani, ahogy ismereteink, lehetőségeink és tudásunk bővülnek. Ezzel a magasabb szintű tudással javíthatóak a vizsgálati módszerek (pl. kimutatási határ vagy az eredmények szórása csökkenthető). A PDCA minden esetben jó eszköz a kitűzött analitikai célok eléréséhez. A

PDCA logikája nemcsak az új módszerfejlesztésekhez kapcsolódóan használható, hanem a rutinszerűen működő vizsgálati módszerek felülvizsgálatának megtervezéséhez is. Mindig vannak fejlesztendő területek vagy fejlesztési lehetőségek.

A beavatkozást nem mindig követi újratervezés. Az is előfordulhat, hogy helyette a már bevezetett (legjobbnek tartott) módszert kell rögzíteni, és éppen az egységesség a cél, ami kisebb eltérést eredményez a különböző laboratóriumok által mért eredmények között (jártassági vizsgálatok és összehasonlító körmérések). Ilyen esetekben a napi rutin mérések során a validált állapot fenntartása a cél. Ehhez folyamatosan rendszeralkalmassági vizsgálatokat kell végezni, illetve szisztematikus változáskövető rendszert kell bevezetni. Különféle ellenőrzőkártyák segíthetnek ebben (Demeter, 2022). Az ellenőrzőkártya megmutatja, hogy egy vizsgálat jól működik, megbízható a kapott eredmény. Ha nem, akkor még van idő a beavatkozásra, mielőtt valódi élelmiszerbiztonsági probléma merülne fel. A módszerek rendszeres felülvizsgálata elengedhetetlen. Minden olyan esetben, amikor eltérés, változás áll be a laboratórium és az alkalmazott rendszer vagy módszer működtetésében (részleges vagy teljes) újvalidálással kell bizonyítani, hogy valóban képes a laboratórium az adott analitikai feladat megbízható elvégzésére, mérések kivitelezésére.

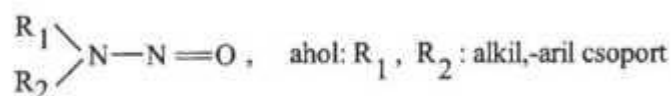
### **1.3. Nitrózaminok az élelmiszerekben**

Az étkezéssel kapcsolatos daganatok gyakorisága és az ezzel összefüggő halálos rákesetek száma a legmagasabb (Horváth,2020). Jelenlegi ismereteink szerint mintegy 750-re tehető azoknak a kémiai vegyületeknek a száma, amelyek bizonyítható módon felelőssé tehetőek a különféle rákok keletkezéséért. Ezek a vegyületek kémiai szerkezetüket tekintve igen eltérőek, közéjük tartoznak a nitrózaminok is. A rák elleni küzdelem egyik fontos területe a megelőzés (prevenció), aminek egyik lehetősége a karcinogén anyagok eliminálása élelmiszereinkből. Ehhez elengedhetetlen az újabb és újabb vizsgálati módszerek kidolgozása, ahogy egyre több vegyületről derül ki annak káros hatása. A nitrózaminok valamennyi vizsgált állatfajban karcinogéneknek bizonyultak, így nagy a valószínűsége, hogy emberre is karcinogének. Az eddig tesztelt több mint 300 vizsgált N-nitroso-vegyület 90%-a bizonyult rákkeltőnek állatkísérletekben és indukált tumort különböző szövetekben. Ismert a nitroso-ureák rákkeltő hatása, melyek képesek a placentán áthatolni és a magzatban rákot előidézni. Nitrózaminok, ahogy az előzőekben ismertettem, számos élelmiszerben előfordulhatnak, például pácolt húskészítményekben, feldolgozott halban, kakaóban, sörben és más alkoholos italokban, feldolgozott zöldségekben, gabonafélékben, tejtermékekben, vagy fermentált, pácolt és

fűszerezett ételekben. A nitrózaminok az élelmiszerelőkészítés és élelmiszerfeldolgozás során is képződhetnek.

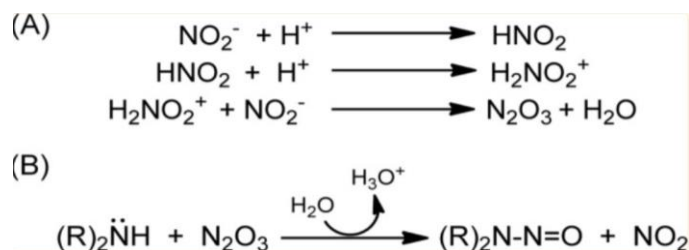
Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) is foglalkozik az élelmiszerekben jelenlévő nitrózaminokból eredő közegészségügyi kockázatokkal. A 2019-es véleménytervezet szerint a nitrózaminok étrendi expozíciója minden korcsoportban aggodalomra adhat okot. Az N-nitrozálható anyagok a bélrendszerben N-nitrózaminokká alakulhatnak, DNS-t módosító vegyületek, ezáltal daganatkeltőek. Bevitelüket a lehető legkisebbre kell szorítani. A nitrózaminok az alábbi általános szerkezeti képlettel (lásd: 2. ábra) leírható vegyületek.

**2. ábra:** Nitrózaminok általános képlete  
(forrás: Horváth, 2020)



A nitrózaminok a nitritek és bizonyos aminok reakciójával savas közegben jöhetnek létre in vitro és in vivo körülmények között is. Pontosabban a szekunder vagy terciér aminok nitrozálószerrel való reakciójában. Az élelmiszerekben a nitrozálószer általában a nitrogén-anhidrid, amely savas, vizes oldatban nitritből képződik. Az aminok jelen vannak a természetben, elsősorban halakban, húspanban és húskészítményekben, de növényi eredetű élelmiszerekben is. A nitrozálási reakció első lépésben a nitrozáló ágens az aminok nitrogénatomjának szabad elektronpárjával kapcsolatot létesít, majd egy proton lehasadásával stabil nitrózaminok keletkeznek (lásd 3. ábra). (Jung et al, 2015) Az élelmiszerekben leggyakrabban fellelhető nitrózaminok a dimetil-nitrózamin (NDMA), a dietil-nitrózamin (NDEA), a nitrozo-pirrolidin (NPYR), és a nitrozo-piperidin (NPIP).

**3. ábra:** Nitrózaminok keletkezése  
(forrás: Jung et al, 2015)



A: Dinitrógén-anhidrid képződés nitritből, B: nitrozálás aminből

Élelmiszerbiztonsági szempontból az élelmiszerekben gyakran és számottevő mennyiségben előforduló nitrátok és főképp a nitritek N-nitrozo vegyületekké (nitrózamin) alakulhatnak az emberi szervezetben. Ezért kell foglalkozni az élelmi anyagok nitrát és nitrit tartalmával, amíg nem tudjuk a nitrózaminokat megfelelő kimutatási határral vizsgálni.

Bizonyos koncentrációban a nitrát- és nitrit ionok növényekben állandóan megtalálhatók, életműködésük számára nélkülözhetetlen anyagok. A nitrátkumulációra hajlamos zöldségfélék (pl. paraj) helytelen és túlzott műtrágyázás következtében a szükségesnél jóval nagyobb mennyiségű nitrátot halmoznak fel, ezáltal magas nitrátértéket képviselnek. A nitrát tartalom azután a helytelen tárolás vagy feldolgozás során nitritté redukálódva több egészségügyi probléma forrása is lehet. Többek között a nitrózaminok keletkezésének is kedvez. Mivel az egészséges táplálkozásban a zöldségféléknek döntő szerepe van, egyre több kutató foglalkozik e növényekben jelenlévő különböző kémiai szennyezőanyagok vizsgálatával. Kimutatták, hogy különösen egyes levélzöldségek és gyökérzöldségek tartalmaznak magas nitrát szennyeződést (1. táblázat).

**1. táblázat:** Néhány zöldségféle nitrát-tartalma  
(forrás: Szigeti, 2010)

| <b>NO<sub>3</sub> mg/kg</b> | <b>Zöldségféle</b>                                                     |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 0 – 200                     | Gyümölcsök, Spárga, Burgonya, Kelbimbó, Zöldborsó, Paprika, Paradicsom |
| 200 – 500                   | Vöröshagyma, Uborka, Brokkoli, Karfiol                                 |
| 500 – 1000                  | Sárgarépa, Kelkáposzta, Fejeskáposzta, Vöröskáposzta                   |
| 1000 – 2000                 | Zeller, Petrezselyem, Karalábé                                         |
| 2000 – 2500                 | Salátafélék, Paraj, Cékla, Retek                                       |

Míg a növényi eredetű élelmiszerek nitrát és nitrit tartalma természetes eredetűnek vagy szennyeződésnek tekinthető, addig bizonyos húsipari termékekben engedélyezett élelmiszer adalékanyagok. A nitrátok bakteriális úton nitritté redukálódva fejtik ki hatásukat. Nitritet két élelmiszercsoport esetében alkalmaznak a gyártásuk folyamán: pácolt húsféléknél (kolbászok, szalámik, sonkák stb.), és sajtoknál. Alkalmazásuk célja: a *Clostridium botulinum* elleni védelem mellett a hús vörös színének stabilizálása és az ízkialakítás. A nitrit legfontosabb szerepe a *Clostridium botulinum* spórák kicsírázásának, majd a toxinképzésnek megakadályozása.

Redukálóanyagokkal (pl. aszkorbinsav) vagy tartósítószer (szorbinsav) hozzáadásával a szükséges minimális nitritkoncentráció jelentősen csökkenthető. Az élelmiszerek és ivóvizek egyre növekvő nitrát és nitrit tartalma is komoly közegészségügyi problémát jelent. Az ivóvíz nitrit és nitrát tartalma hazai megfigyelések szerint korrelál az emésztőtraktus rosszindulatú daganataival. Amit a nitrózaminná való átalakulása okozhat.

A technológiai szennyeződések olyan anyagok, amelyek az élelmiszerekben vagy az élelmiszer összetevőkben képződnek, amikor a feldolgozás során kémiai változásokon mennek keresztül. A feldolgozási módszerek közé tartozik az erjesztés, pácolás, füstölés, szárítás, magas hőmérsékletű főzés stb. A pácolt húsok gyakran tartalmaznak kimutatható mennyiségű nitrózamint, főként a nitrit tartósítószerként való használata miatt. Számos további tényező

befolyásolja képződésüket, például a hőmérséklet, a pH, a feldolgozási körülmények. A húskészítmények mellett más élelmiszerekben, például sörben, pácolt halban, sajtban és szójaszószban is beszámoltak nitrózaminok előfordulásáról (EFSA J, 2023). Sok ételt hőkezelní kell, hogy valóban ehető és emészthető legyen. Ez ízletesebbé is teszi őket, azonban a hőkezelés, akár otthon, akár a gyártás során nem kívánt következményekkel járhat. Egyes tápanyagok, például vitaminok elvesztése mellett potenciálisan káros melléktermékek is kialakulhatnak. A hal- és hústermékek is jelenthetnek veszélyt, mivel amintartalmuk magas és pác-sóként nitrit, illetve nitrát vegyületeket használnak. Ezekből a termékekből 100 pg/kg-os nitrózamin szinteket lehetett mérni. Nitrózamint találtak már sajtban, tejben, szójaolajban. Melegítéssel járó technológiák során növekszik a nitrózamin koncentráció az élelmiszerekben. Ezt elősegíti még az enyhén savas környezet is, mely sok zöldségben és gyümölcsben uralkodik. Hőkezelés közben a különböző aminosavak lebomlása folyamán az aminok mennyisége is nő, amely a nitrózaminok egyik építőköve. A nitrózaminok képződéséhez savas körülmények kellenek, ezért a gyomorsav is elősegítheti kialakulásukat nitritek és bizonyos aminok jelenlétében. Tehát az emberi szervezetben is képződhetnek, de lényegesebb, a közvetlen nitrózamin formában bevitt szennyeződés. Ezért célszerű lenne mérési eredményekkel igazolni, hogy ebből a szempontból biztonságos az adott élelmiszer. Az egyes élelmiszercsoportokban mérhető nitrózamin értékeket az 1. mellékletben foglalom össze.

#### **1.4. Környezetvédelmi lehetőségek**

Miközben piaci és hatósági elvárás, hogy modern analitikai eszközökkel képesek legyünk egyre kisebb koncentrációban az egészségre ártalmas anyagok kimutatására élelmi anyagokban, az erre alkalmas technikák (pl. folyadékkromatográfia) a legkörnyezetszennyezőbb eljárások közé tartoznak. Jogos elvárás, hogy az analitikai fejlesztések ne csak egyirányúan a szelektivitás és érzékenység fokozására irányuljanak, hanem egyúttal a környezetbarát technikák felé mozduljanak. Ahogy a szintetikus gyártási folyamatokban már elkezdtek a zöld kémia alapelveit bevezetni, át kell ültetni az analitikai kémiai folyamatokba is. Az új készülékek beszerzésénél legyen szempont a környezettudatosság (mind a készülék használata, előállítása és majdani megsemmisítése, mind fejlesztése során), ne csak az analitikai specifikációk. Az új vizsgálati módszerek tervezésekor, de a szabványosított módszerek felülvizsgálatakor is szempont legyen, hogy használatuk minél kevesebb környezeti terheléssel járjon együtt (lásd 4. ábra).

**4. ábra** A zöld analitikai kémia (GAC) elveinek és a tervezett analitikai minőség (AQbD) lépéseinek integrálása a fenntartható analitikai módszerekhez.  
(forrás: saját ábra Faresa, 2022 alapján)



A modellként választott, folyadékkromatográfiás (HPLC) vizsgálatok a legelterjedtebb műszeres analitikai módszerek élelmi anyagok vizsgálata során. Ez az analitikai technika a vizsgálandó vegyületek elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására is alkalmas egyidejűleg. A HPLC rendszer (analitikai mérő berendezés) a következő alkotórészekből áll: a kromatográfiás töltetet (állófázist) tartalmazó oszlopból (kolonnából), a mobil fázist (mozgó fázist, eluent) az oszlopon átnyomó pumpából, injektorból, valamint az egymástól elváló molekulák időben eltérő megjelenését jelző detektorból. Az analízis sikerességét jelző retenciós idő, vagyis az elválasztott molekulák időben elkülönülő megjelenése - az álló fázis, a vizsgált molekula és a mozgó fázis közötti kölcsönhatásoktól függ. A folyadékkromatográfia nagy mennyiségű veszélyes szerves oldószert használó technika. A környezettudatos tendencia vezet a zöld analitikai kémia (GAC) fejlesztésének irányába. A Green Analytical Chemistry (GAC) olyan analitikai módszerek tervezésének koncepciója, amelyek egyaránt barátságosak a vegyészek és a környezet számára. (Anastas, 1998) Szükséges, hogy a GAC-alapú módszerek megőrizzék ugyanazt az analitikai teljesítményt, mint a hagyományos társaiké. A nagy oldószerfelhasználás különösen az élelmiszer elemzéseknél aggályos, ahol a bonyolult mintakivonás és kromatográfia használata rutinszerűen történik. A zöld analitikai kémiai módszerek célja, hogy csökkentsük a toxikus reagens felhasználást, az oldószerek kevésbé toxikusra cserélésével és kevesebb reagenst

használó módszerek fejlesztésével. Mindezt természetesen a szelektivitás és érzékenység megtartásával. Ezen kívül az újabb fejlesztésű készülékek segítségével cél az analitikai teljesítmény fokozása, az esetleges szennyező anyagok egyre kisebb koncentrációinak kimutatása, egyre többféle élelmi anyagból, tehát egyre bonyolultabb mátrixokból. Bár az ilyen „zöld” jellegű fejlesztések előnyösen csökkentik a környezetterhelést, a minőségellenőrzésben még korlátozottak a lehetőségek. A fő okok egyrészt a szabályozás, például a szabványokban leírt analitikai módszerek általában nem „zöldek”, másrészt az ismeretek és tapasztalatok hiánya, végül pedig a zöld analitikára alkalmas nagyobb teljesítményű berendezések beszerzéséből adódó költségek. Sajnos egy gyors analitikai vizsgálatra alkalmas UHPLC (ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfia) műszer ára jóval meghaladja a hagyományos vizsgálatokhoz alkalmas készülék beszerzési árát. Érdekes már beszerzéskor mérlegelni a hosszú távú üzemeltetési költségeket, amelyben már lehet versenyképes. A zöld technológiák bevezetése és használata több erőforrást, valamint több tudást is igényel. Ennek a tudásbázis bővítésnek is kulcsfontosságú eleme a tervezett minőség - quality-by-design (QbD) koncepció elterjesztése. (Saroj, 2018). A tudatos és tervezett analitikai fejlesztésben egyre inkább a zöld kémia elveit vesszük figyelembe, különösen az UHPLC technikák esetében (Darji, 2023).

Az oldószerek megválasztása mellett a sok kísérletes módszerfejlesztés helyett át kell térni a kockázatalapú tervezésre és redukált kísérlettervek futtatására és statisztikai értékelésére. (Faresa,2022) A kísérlettervezés (Design of Experiments, DOE) matematikai modelleket használ a kísérletek optimális tervezésére. Ennek eredményeképpen a különböző jellemzők vagy tényezők (faktorok) különböző értékeinek sokféle lehetséges kombinációjából csak a szükségeseket kipróbálva a lehető legtöbb következtetést vonják le. A kísérlettervezés a módszer fejlesztési és optimalizálási folyamatok során számos előnnyel jár. Ezen előnyök közé tartozik a jobb analitikai minőség (szelektív, érzékenyebb vizsgálati módszerek), a kísérletek számának csökkenése, valamint a laboratóriumi erőforrások és a képzett munkaerő iránti igény csökkenése. (Szabó-Ecsedi, 2017) Ebben számos módszerfejlesztő szoftver lehet segítségünkre, többek között a beszédes nevű „DryLab”. Ezzel a szoftverrel, néhány előzetes kísérlet után, 12 db szélső pont kimérésével 1 000 000 kromatogramot tudunk becsülni, és azokból statisztikai értékeléssel az optimális kromatográfiás körülményt kiválasztani.

Zöld kémia fejlesztési segítségként megfogalmazták a zöld kémia 12 pontját (Anastas,1998), és 2000-ben megjelent a Magyar Kémikusok lapjában is (Barta, 2000). Ezeket a 2. mellékletben ismertetem. Elsősorban az általános munkafolyamatok optimalizálásánál, az új módszerek kidolgozásánál és új műszerbeszerzésnél van lehetőségünk a „zöld” szempontokat előtérbe helyezni.

## 1.5. Hatékonyságra törekvés az analitikai módszertervezésben

Az analitikai költségek kézbe tartása érdekében a laboratóriumok (élelmiszer vállalatok laboratóriumai vagy független laboratóriumok) igyekeznek a vizsgálati módszerek komplexitását csökkenteni (Demeter, 2022). Ennek néhány lehetősége:

- Analitikai műszerek számának csökkentése. A kevesebb analitikai műszer azt jelenti, hogy minden típusból, ami a termékek vizsgálatához szükséges, kevesebb kell. A különféle vizsgálatokhoz alkalmas típuszámot nem lehet csökkenteni, az analitikai műszerek egyre specifikusabb vizsgálatokra alkalmasak. Ugyanakkor a gépidő optimális kihasználásával, a készülékek tervezett karbantartásával, modern, gyorsabb módszerek fejlesztésével a készülék darabszám egy bizonyos fokig észszerűen csökkenthető. Ezáltal csökkennek a kalibrálási, kvalifikálási költségek, kevesebb pótalkatrész raktáron tartása szükséges, kevesebb készülék, kevesebb energiával, erőforrással üzemeltethető.
- Standardizálás. Több élelmiszerfélése analitikai vizsgálatára alkalmas általános módszerek kidolgozásával csökkenthetőek a validálási, készülék, eszköz és referencia anyag költségek. Például nitrózaminok mérése tejtermékekben és húskészítményekben történhet azonos kromatográfiás módszerrel, de eltérő mintelőkészítéssel. Így egy darab analitikai készüléken, egy darab analitikai kolonnán, ugyanazzal a referencia anyaggal a legkülönbözőbb anyagok vizsgálhatóak egy független laboratóriumban. Hasonló példa a növényvédőszer maradványok vizsgálata a legkülönbözőbb élelmi anyagokból.
- Módszerfejlesztés. Meglévő módszerek felülvizsgálata hatékonysági szempontból, áttérés gyors analitikai módszerekre a hagyományos analitikai módszerekről.

## 2. ANALITIKAI MÓDSZERFEJLESZTÉS QBD ELVEK SZERINT

Analitikai módszerfejlesztés a QbD elvek szerint az 1. ábrán bemutatott ciklikusan ismétélhető folyamatban valósítható meg (lista a 3. mellékletben található). Szakdolgozatomban ezt a 10 lépéses módszerfejlesztési stratégiát az általános elvek ismertetése mellett egy konkrét példán, az alábbi fiktív folyadékkromatográfiás fejlesztési feladatra mutatom be: *Feldolgozott húskészítmények nitrózamin tartalmának meghatározása*. A megengedett nitrózamin mennyisége: 26,5 ng /nap (gyógyszerkészítmények limitértéke alapján vett érték).

Ha a vizsgálati mintában a mérendő komponensek keverve vannak (pl. élelmiszer mátrixban szeretnénk a kis mennyiségben jelen levő szennyezőket vizsgálni), az egyes komponensek mennyiségéről és minőségéről nem tudunk információt szerezni. Ha el tudjuk választani a komponenseket akkor könnyebben meg tudjuk határozni a minőségét és/vagy a mennyiségét.

Analitikai módszerek fejlesztése tulajdonképpen két fejlesztési folyamatot takar: a mintaelőkészítési eljárás fejlesztését és az analitikai mérőmódszer fejlesztését. A mintaelőkészítési lépések fejlesztése az élelmiszeranalitikai módszerfejlesztés során legalább akkora kihívást jelent, mint az analitikai (pl. kromatográfiás) mérőmódszer fejlesztése. A két rész közül a módszerfejlesztést rendszerint az analitikai mérőmódszer fejlesztésével kezdjük, a fejlesztés kezdeti szakaszában már rendelkezésre álló referencia anyagok (standard anyagok) birtokában. Azonban előbb-utóbb eljutunk a módszerfejlesztés során olyan szakaszba, ahol a mintaelőkészítést és analitikai fejlesztést összehangoltan kell végezni. Jelen szakdolgozatban az analitikai fejlesztésre fókuszálok.

### 2.1. Előzetes információk összegyűjtése

Információk összegyűjtése a gyakorlatban a nemzetközi és hazai irodalomban fellelhető adatok, mások által leírt módszerek, eredmények, applikációk megkeresése. Manapság leginkább interneten irodalmazunk mind a vizsgálandó komponensről, mind a vizsgálati mintáról. Ha szabványban rögzített vizsgálati feladatot kapunk, akkor is érdemes a plusz információkat begyűjteni a szabvány módszer verifikálásához, további fejlesztéséhez, optimalizálásához. Élelmiszerekben az idegen anyagok (pl. kémiai szennyezők) kimutatása, azonosítása és mennyiségének meghatározása igen sokféle módon történhet. A választott analitikai módszert mindig a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonsága és várható mennyisége határozza meg. Esetünkben a húskészítmények ng/kg szintű nitrózamin tartalmának kimutatása és meghatározása nehéz feladat. A rendkívül összetett és változó mátrixból kell nagyon kis

mennyiséget (ppb) kimutatni. Az érzékeny, specifikus módszerek költséges műszerezettséget igényelnek. A mérendő komponenseket (esetünkben nitrózaminokat) szelektíven el kell választani az élelmiszer komponensektől, hogy mérhető legyen ilyen kis koncentrációban. Így pl. gáz- vagy folyadékkromatográf szükséges vizsgálatukhoz. A kis kimutatási határ miatt lehetőleg érzékeny, nagyon kis mennyiségek kimutatására alkalmas detektor szükséges.

Még nem áll rendelkezésre olyan átfogó vizsgálati módszer, amely alkalmas mind az illékony, mind a nem illékony nitrózaminok azonosítására és egyidejű mennyiségi meghatározására minden olyan élelmiszertípusban, amely tartalmazhatja e szennyező anyagokat (azaz húskészítményekben, tejtermékekben, tenger gyümölcseiben, zöldségekben és alkoholtartalmú italokban). A téma aktualitása miatt rengeteg irodalmat lehet találni. A legtöbb publikált módszer alkalmazható húskészítmények elemzésére, kimutatási határuk 0,003–20 µg/kg között van, és főként illékony nitrózaminokat kimutató gázkromatográfián alapulnak. Az élelmiszer-analízis legújabb fejlesztéseivel egyre szélesebb körben terjed a folyadékkromatográfia tömegdetektorral, amely lehetővé teszi mind az illékony, mind a nem illékony nitrózaminok egyidejű meghatározását egy mintából. Ezeket a módszereket kezdik alkalmazni a húskészítmények nitrózamin elemzésére.

## **2.2. Analitikai cél profil megfogalmazása**

Miután összegyűjtöttük az irodalomban fellelhető információt a mérési feladról, és kiválasztottuk a kivitelezhető analitikai elvet, a következő lépés az analitikai cél profil, az ATP (Analytical Target Profile) meghatározása. Vagyis annak a tartománynak a kijelölése, amin belül az analitikai módszer megfelel az előre meghatározott követelményeknek. A fejlesztési feladat eredménye a validálható módszer, a gyakorlatban ez azt jelenti, hogy meg kell határozni a validálási követelményeket, a validálás folyamán vizsgálandó teljesítményjellemzőket. Az ATP megfogalmazásával egyúttal meghatározzuk a módszer célját is, amely befolyásolja a módszertervezését és a fejlesztést. Ehhez szükséges információk a vizsgálandó húskészítmények paraméterei (pl. víz/zsír/fehérjetartalom) hatósági vagy fogyasztói követelmények (példánkban: nitrózamin limit), az előzőleg begyűjtött ismeretek és a laborok mérési igényei (Ecsedi et al, 2017).

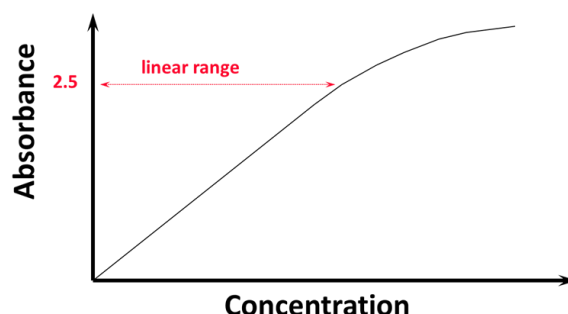
## **2.3. Analitikai technika kiválasztása**

Az analitikai technika kiválasztásánál elsődleges szempont, hogy a megfogalmazott analitikai cél profilt teljesíteni tudjuk, validálható módszert kell fejleszteni. Többnyire a fő kérdés, hogy a mérendő komponenst hogyan tudjuk detektálni. Megfelelően érzékeny és specifikus vagy

szelektív detektor szükséges. Gyakori, hogy az élelmiszeranyag, mint mátrix, zavarja a vizsgálandó komponens meghatározását, ezért elterjedtek az elválasztástechnikai (pl. kromatográfiás) módszerek. Illékony komponensek vizsgálatára a gázkromatográfia, nem illékony, de oldatba vihető komponensek vizsgálatára a folyadékkromatográfia a legelterjedtebb analitikai technikák. A vizsgálandó szennyezők, növényvédőszer, antibiotikum maradványok, tartósítószer, és egyéb anyagok koncentrációja és detektálhatósága határozza meg, hogy milyen detektort kell alkalmaznunk az elválasztás után. A detektorválasztás pedig behatárolja, hogy milyen felszereltségű (pumparendszer, nyomástűrés, váltószeleppel szerelt stb.) kromatográfiás készülékre kell módszert fejlesztenünk.

A detektor választásnál figyelembe kell venni, hogy a vizsgálandó komponens jelet adjon, tehát kimutatható legyen, valamint a detektor érzékenységét, vagyis a detektálás alsó határát (DAH). Kimutathatóság szempontjából megkülönböztetünk univerzális, szinte minden anyagot vizsgáló detektorokat, és specifikus, tehát csak valamilyen jellegzetes fizikai-kémiai tulajdonsággal rendelkező anyagcsoportot vizsgálni képes detektorokat. Univerzális detektorok a fénylenyelésen, fényszóráson alapuló detektorok, illetve a tömegérzékeny detektorok. Specifikus detektor például a fluoreszcens detektor, amikor a vizsgálandó komponensnek fluoreszcens tulajdonsággal kell bírnia, különben nem látható a vizsgálat során. A detektálás alsó határa az adott anyagra jellemző koncentráció mely a detektor cellában áthaladva a zaj 3-szorosának megfelelő jelet ad. A detektor érzékenysége a mennyiségi elemzéshez szükséges mutatószám, az analitikai egyenes meredeksége, illetve nem lineáris tartományban a jel koncentráció szerinti deriváltja (lásd 5. ábra). Lineáris tartományban a detektált jel lineárisan arányos az anyagmennyiséggel, vagyis a vizsgálandó komponens koncentrációjával. Mennyiségi meghatározásnál a detektor lineáris tartományában kell dolgozni

**5. ábra** Detektor válaszjel a koncentráció függvényében  
(forrás: Snyder, 1988)



Folyadékkromatográfiás elválasztásokban leggyakrabban az fényelnyelésen alapuló (UV) detektálást alkalmazzuk, de a fejlesztés során a labor felszereltségétől függően másfajta detektálási típusokat is szükséges kipróbálni. 2. táblázatban foglaltam össze az egyes detektor típusok kimutatási határát és specifikusságukat.

**2. táblázat:** Detektor típusok detektálási alsó határa és specifikusságuk

(forrás: saját táblázat)

| Detektor                    | DAH (mg)            | Univerzális |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| UV (fényelnyelésen alapuló) | $10^{-3}$           | +           |
| RI (törésmutató)            | $10^{-1}$           | ++          |
| EC (elektrokémiai)          | $10^{-5}$           | -           |
| FLR (fluoreszcens)          | $10^{-6}$           | -           |
| CAD (korona kisüléssel)     | $10^{-3}$           | +           |
| ELSD (fényszóráson alapuló) | $10^{-3}$           | ++          |
| MS(tömegspektrométer))      | $10^{-4} - 10^{-6}$ | ++          |

-: nem univerzális, specifikus detektor;

+: anyagok többsége vizsgálható, de vannak kivételek;

++: teljes mértékben univerzális detektor

Előfordulnak olyan fejlesztési feladatok is, amikor több készülék-detektor-állófázis lehetőség közül lehet választani. Ilyenkor mérlegelni kell, hogy melyik technikának milyen előnye van, illetve a kezdeti kockázatelemzést ki kell terjeszteni az analitikai technika, a készülék típus kiválasztás szempontjaira is. Ilyen szempontok lehetnek a hatékonyság, mérési idő, mérési költségek, kimutatási határ, készülék robusztusság, környezetvédelem, esetleg tartalék készülék, személyzet tapasztalata, gyakorlata, társ laborokkal való összemérés lehetősége stb.

## 2.4. Felhasználói igények megfogalmazása

A felhasználó igények alatt analitikai módszerfejlesztés során a módszert alkalmazó laboratóriumok által támasztott igényeket értjük. Például:

- Analitikai készülékkel kapcsolatos felhasználói igények: pl. az alkalmas készülékek típusai közül valamelyik kedveltebb (pl. kompakt vagy moduláris készülék); készülék gyártója ismert; rendelkezésre áll - vagy könnyen és időben beszerezhető a készülék; a munkaerő már ismeri, nem kell új képzés, hogy használni tudják; elérhető és megfelelő a szerviz szolgáltatás; már ismert vagy könnyen megtanulható kvalifikált szoftver tartozik a készülékhez)
- Oldatok stabilitása (pl. napi rutin mérések során párhuzamosan legalább 6 vizsgálati minta előkészíthető legyen bomlás nélkül, egy műszakban kivitelezhető legyen)
- Optimális mérési idő (pl. legalább 6 vizsgálati minta mérhető legyen egy munkanap alatt) módszerfejlesztés egyik célja az analízis idő csökkentése. Ennek egyik megoldási lehetősége folyadékkromatográfiában a gradiens elúció. Vagyis a futás alatt a retenció

(visszatartást) hatást csökkentjük az idő függvényében. Ez azonban a készülék oldaláról is további feltételek teljesülését igényli a pumparendszer oldaláról.

## 2.5. Kritikus minőségi jellemzők meghatározása és kezdeti kockázatbecslés

Az analitikai cél alapján kiválasztott analitikai technika minőségi jellemzőinek meghatározása a következő feladat a fejlesztés során. Az analitikai cél a validálható mérési módszer. Megfelelő, tehát az elvárt validálási követelményeknek eleget tesz. De sok egyéb tulajdonságnak is meg kell felelni, pl. meglévő készülékkel mérhető, gyors, kevés oldószerigényű módszer, etanolt használunk acetonitril helyett, ismert beszállítótól beszerezhető eszközökkel kivitelezhető stb. Minden elvárásra nem tudunk azonnal módszert fejleszteni. Kiinduláshoz először meg kell határozni a módszer kritikus jellemzőit (CMA - Critical Method Attributes) a módszervalidálási elvárások és a felhasználói igények alapján, és azokra koncentrálni kell kezdeni a módszerfejlesztést.

A kritikus jellemzők teljesülésére nézve kockázatelemzést kell végezni. Például:

- Összegyűjtjük a módszert befolyásoló lehetséges tényezőket (pl: környezet, módszer, műszerek, dolgozók stb.)
- Halszálka (Ishikawa) diagramon ábrázolva ok-okozati viszonyba állítjuk az egyes tényezőket a kritikus módszer jellemzőivel (tényezők – CMA).
- A tényezőket és módszer paramétereket értékeljük természetük szerint (úgynevezett CNX osztályozás), és becsüljük hatásukat a módszer teljesítőképességére nézve (pl. Failure Mode Effects Analysis/FMEA segítségével)

Számba kell venni mi minden befolyásolhatja a mérési módszert rutin használat közben. Miután végéig gondoltuk a lehetséges tényezők körét, rangsorolni kell őket. A kezdeti kockázatelemzést mindig a legfontosabb 4-6 tényező elemzésével kezdjük. Egy analitikai módszert sok minden befolyásol, a legjellemzőbb tényezők:

- *környezet*: Labor hőmérséklet, fény, páratartalom egyes analitikai folyamatokat jelentősen befolyásolhatnak. Kromatográfiás mérések zárt rendszerben történnek, ezért ebben a fejlesztési munkában, ez kevésbé befolyásoló tényező.
- *anyag*: Analitikai vizsgálat során használt anyagok minősége, tisztasága erőteljesen befolyásolhatja az analitikai eredményt és annak megbízhatóságát. A kockázatelemzést erre tényezőre el kell végezni.
- *műszerek*: Folyadékkromatográf állapotával, kvalifikált státuszával kiemelten foglalkozni kell. Ha az analitikai vizsgálatához egyéb műszert is kell használni, pl. mérleg, pH mérő, akkor azok tulajdonságait (pl. elvárt pontosságát) is elemezni kell.

- *munkaerő*: Analitikai vizsgálat eredményét humán erőforrás képzettsége, gyakorlata, pszichés állapota, pártatlansága erősen befolyásolhatja, ezért kockázati tényezőként kell kezelni.
- *módszer*: Kromatográfias paramétereknek nagyon nagy hatása van az analitikai eredményre, mivel meghatározzák a komponensek (vizsgálandó és mátrix anyagok) elválasztását, ezáltal minőségi és mennyiségi értékelhetőségét. Ezek a fejlesztés kulcsfontosságú paraméterei.
- *mintaelőkészítés*: Egy olyan bonyolult mátrix esetén, mint az élelmiszerek ugyancsak nagy hatással van a mérési eredményre, kockázati tényezőként kell kezelni.

Az összegyűjtött kockázati tényezőket halszála (Ishikawa) diagramon ábrázoljuk. Ok-okozati viszonyba állítjuk őket a módszert meghatározó kritikus módszer jellemzőkkel. Elkészítéséhez a 4. mellékletben gyűjtöttem össze hasznos kérdéseket (példa: 3. fejezet, 10. ábra).

#### *CNX besorolás*

A tényezőket és módszer paramétereket értékeljük természetük szerint, és három osztályt különböztetünk meg:

- kézben tartandók (controlled; C),
- lehetséges zavaró hatásúak, (noise; N)
- kísérletileg meghatározandók (eXperimented; X).

A módszerfejlesztés folyamán eltérő módon kezeljük a különböző osztályokba sorolt paramétereket.

**C:** Kézben tartandó paraméterek a következő esetekben fordulnak elő:

- ismert a megoldás irodalomból vagy korábbi tapasztalatokból és alkalmazzuk is
- meg tudom szerezni a szükséges információt (pl. további irodalmazással, modellező szoftverekkel),
- nincs lehetőség, vagy szükség a paraméter változtatás okozta hatás vizsgálatára (pl.: szabványban előírt a mintaelőkészítés folyamatán az agitációs idő)

**N:** Lehetséges zavaró hatásokra nincs ráhatásunk. Ide soroljuk a véletlenszerű paramétereket, illetve az analitikus által közvetlenül nem befolyásolható paramétereket (pl. vegyszer minősége, labor hőmérséklete)

**X:** Kísérletileg meghatározandó paraméterekre a fejlesztés ezen szakaszában nem tudom a megoldást, de végzek rá kísérletet. A meghatározandó paramétereket (X) egy vagy több paraméteres kísérlettervezés szerinti kísérletekkel állapítjuk meg (DoE).

### *FMEA (Failure Mode Effects Analysis; hibamód- és -hatás elemzés)*

Az analitikai módszer teljesítményét elméletileg befolyásoló tényezőket (pl. műszerek, dolgozók) és módszer paramétereit (pl. eluens pH, hőmérséklet), kockázatok osztályba sorolásához elemezni kell. A tényezők és módszer paraméterek hatását megbecsüljük a módszer teljesítőképességére nézve az FMEA táblázatok segítségével:

- az események bekövetkezésének gyakoriságát (F)
- a lehetséges következmények súlyosságát (S),
- valamint azok észlelhetőségét (D).

A besorolási kategóriák száma általában 3 - 5. Az érték növekedésével a paramétert egyre kockázatosabbnak ítéljük. (FMEA értékelésre példa a 6. mellékletben látható)

Az elfogadható és a nem elfogadható kockázati osztályok határait a kockázati rangsor érték (Risk Priority Number; RPN) alapján határozzuk meg:  $RPN = F \cdot S \cdot D$

A magas kockázati osztályba sorolt tényezőkkel kiemelten foglalkozni kell, a cél az, hogy a módszerfejlesztés során minél alacsonyabb értékre csökkentsük a kockázatokat.

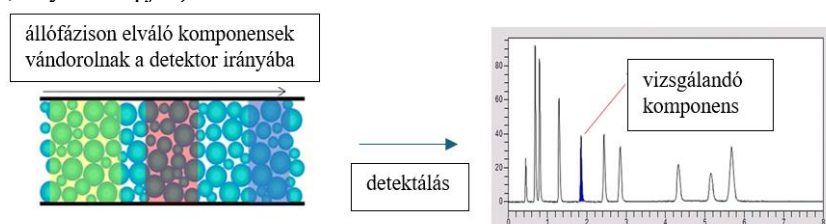
A kockázatértékelést a módszerfejlesztés főbb mérföldköveinél megismételjük, és vizsgáljuk az egyes hatások kockázatának változását. A rendszeralkalmassági vizsgálatok előírásakor mindenképp, hiszen a magasabb kockázati tényezőket kell folyamatosan ellenőrizni). A módszerfejlesztési jelentésnek ezeket az elemzéseket tartalmaznia kell.

## **2.6. Módszer optimalizálás kísérlettervezéssel**

Manapság nagyon gyakran alkalmazott technika élelmiszeripari analitikában a fordított fázisú folyadékkromatográfia. Példánkban, a nitrózaminok mérésére is alkalmas tömeg detektálással. A folyadékkromatográfiás elválasztás során olyan kölcsönhatások jönnek létre

- az elválasztandó komponensek fizikai és kémiai tulajdonságai miatt (ionizáltság, hidrofóbicitás, polaritás),
  - az állófázis felületi tulajdonságai miatt (ionizáltság, hidrofóbicitás, polaritás),
  - adott mérési körülmények (mozgófázis összetétel, pH, ionerősség, hőmérséklet) között,
- amelyek lehetővé teszik, hogy a komponensek különböző erősséggel kötődjenek az állófázishoz. Az elválasztás azáltal jön létre az állófázis felületén, hogy a komponensek és az állófázis között létrejövő szorpciós-deszorpciós folyamatok (megoszlás az állófázis és a mozgófázis között) miatt az erősen kötődő komponensek több, míg a gyengébben kötődő komponensek kevesebb időt töltenek az állófázishoz kötve. Végeredményként a különböző erősséggel kötődő komponensek időben elválasztva eluálthatók a kolonnáról és eltérő időben jutnak a detektorba (lásd 6. ábra).

**6. ábra** Folyadékkromatográfiás elválasztás sémája  
(forrás: saját ábra, Snyder alapján)



A fellépő kölcsönhatások álló fázis és a komponens között a következők lehetnek:

- szorpciós kölcsönhatások: adszorpció és abszorpció,
- van der Waals-féle gyenge kölcsönhatások,
- sztérikus hatások,
- H-hidas kölcsönhatás,
- sav-bázis kölcsönhatások,
- ionos kölcsönhatás,
- komplexképzés,
- enzim-szubsztrátum kapcsolat.

QbD szemléletű módszerfejlesztés során törekszünk rá, hogy megértsük a vizsgálat során zajló folyamatokat, feltárjuk a jelentősebb hatásokat, melyek az eredmény megbízhatósága szempontjából kockázatosak, derítsük fel közben tarthatóságukat és tudatosan avatkozunk be, így elérve az optimális eredményt.

Kromatográfiás módszerfejlesztés során legtöbbször optimalizálandó paraméterek:

- állófázis,
- mozgófázis,
- egyéb: pl. hőmérséklet, áramlási sebesség, injektált anyagmennyiség.

Módszerfejlesztés alapvető követelménye a megbízható analitikai eredmény szolgáltatásán kívül a hatékonyság növelése, vagyis az analitikai eredmények, valamint az előállításukhoz felhasznált források közötti kapcsolat optimalizálása. Cél, hogy az elválasztás ideje lehetőleg a legkisebb legyen, ami azt jelenti, hogy a kromatográfiás elválasztás során a legrövidebb idő alatt, minél több (lehetőleg az összes) komponenst el lehessen választani. Ez sok esetben csak akkor valósítható meg, ha a komponensek csúcshélessége viszonylag kicsi (rövid idő alatt sok komponens el lehet választani, mert keskeny sávokban eluálódnak és jutnak a detektorba). Ezért kromatográfiás vizsgálatokban a hatékonyság egyik jellemzője, ezáltal optimalizálandó paraméter az elméleti tányérszám (jele:  $N$ ). A másik fontos paraméter a felbontás (jele:  $R_s$ ), amely arra ad információt, hogy az egyes komponensek milyen mértékben választhatóak el. Ugyanis, ha a komponensek detektorba jutó csúcsai nem válnak el alapvonalig, akkor zavarják egymás

menyiségi meghatározását, az eredmény torz és pontatlan lesz. Az alábbi (3.) táblázatban foglaltam össze a fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés kiindulási paramétereinek általános lehetőségeit. Az egyedi esetekben ezeket kell mérlegelni, és az előzetesen feltérképezett feladat tulajdonságai szerint kiválasztani a kiindulási pontot. Majd ebből kiindulva lehetőség szerint kísérlettervezés eredményeként kapott információ alapján kedvező irányú változtatásokkal optimalni a vizsgálati körülményeket.

**3. táblázat:** Fordított fázisú HPLC módszerfejlesztés kiindulási paramétereit  
(forrás: saját táblázat)

| Paraméter                                                                          | Preferált kiindulási módszerfejlesztő paraméterek                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Álló fázis<br>Méret<br>Töltet<br>Fázis                                             | 75x2,1 mm – 150x4,6 mm<br>2 µm alatti (héj szerkezetű) – 2,6 µm (porózus)<br>C-18                                                                      |
| Mozgó fázis<br>Oldószer A/B<br>%B<br>Puffer<br>pH<br>Adalékok<br>Áramlási sebesség | Víz/alkohol vagy víz/acetonitril<br>Változó<br>10-100mM foszfát puffer<br>2-7<br>1-20mM (heptánszulfonsav Na sója, Terc-butil-amin)<br>0,5 -1,5 ml/min |
| Hőmérséklet                                                                        | 20-60 °C                                                                                                                                               |
| Áramlási sebesség                                                                  | 0,3 – 1,5 ml/perc                                                                                                                                      |
| Minta mennyiség<br>Térfogat<br>Tömeg                                               | 50 µl<br>50 µg                                                                                                                                         |

### 2.6.1. Kísérlettervezés

Kísérletterv (design of experiment, DoE) célja, hogy az analitikai mérést optimalizáljuk. További cél, hogy az adott információ megszerzéséhez a lehető legkevesebb kísérletet kelljen elvégeznünk. A kísérlettervnek még a kísérletek elvégzése előtt rendelkezésre kell állnia.

A kísérlettervben a faktornak (független változó) nevezzük az olyan mérhető, változó mennyiséget, amely adott időpontban meghatározott értéket vesz fel, és segítségével a vizsgált objektum működése befolyásolható. A faktorok lehetnek:

- mennyiségi (pl. hőmérséklet, mozgófázis összetétel),
- minőségi (pl. állófázis, készülék).

Kísérlettervezés során egyszerre több faktor szintjét változtatjuk. A teljes faktoriális kísérlet egy olyan módszer, amely lehetővé teszi az egyes faktorok és ezek együttes hatásának vizsgálatát a minőségi jellemzőre vonatkozóan. Ezáltal lehetővé válik a beállításokhoz kapcsolódó középértékek és az úgynevezett hatások számítása. Megkülönböztetjük a főhatásokat, amelyek az egyes faktorok beállításából erednek, és a kölcsönhatásokat, amelyek

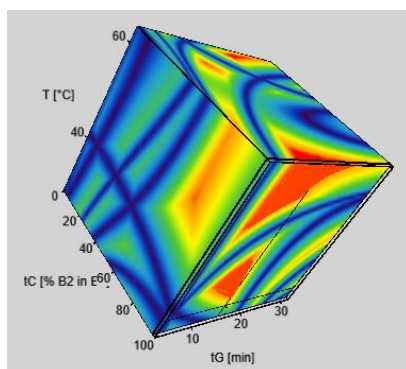
több faktor egyidejű változtatása eredményeképpen keletkeznek. Rendszeresen vizsgált faktorkok folyadékkromatográfiában: hőmérséklet (T), gradiens idő (tG), gradiens meredekség (kiinduló- végső B%), eluens pH és összetétele (szerves minősége/mennyisége), állófázis minősége.

A faktorkok kiválasztását követő lépés a szintek számának és értékeinek meghatározása. A szintek azon faktorértékek, amiket kipróbálunk a kísérletek során. Elsőként tisztáznunk kell, hogy milyen értékhatárok között változtathatjuk a kísérletek során az egyes befolyásoló tényezők értékeit. Legtöbbször két értéket jelölünk meg feltételezve, hogy közöttük lineárisan viselkedik a folyamat. Amennyiben nem vagyunk biztosak a lineáris viselkedésben, három vagy több szint kijelölése szükséges.

### 2.6.2. Kísérlettervezés optimalizáló szoftverrel

Kromatográfiás módszer optimálásához több gyártó is ajánl módszerfejlesztő szoftvert, amelyekkel a kísérlettervezés kivitelezése, illetve értékelése könnyen és látványosan megvalósítható (pl: DryLab vagy LabSolutions Method Development). A szoftveres módszerfejlesztés előnyei, hogy gyorsabb, mint a manuális próbálgatás, objektív, könnyebben dokumentálható és visszakereshető a kapott információ. Lényegesen kevesebb mérés szükséges, mint manuális próbálgatással. Ezáltal időt és oldószert takarítunk meg. Mindegyik szoftver használatával a kritikusnak ítélt faktorkok és értékeik kiválasztása az első lépés, amelyhez elengedhetetlen az előzetes kockázatbecslés. Majd a kockázatosnak talált és kiválasztott paraméterekkel kísérlettervet szerkesztünk. Szoftveres módszerfejlesztésnél gyakran lehetőségünk van redukált kísérletterv kivitelezésre és értékelésre is, ezáltal még több időt és vegyszert spórolhatunk. Kimérjük a kísérleti tér szükséges pontjait, majd a szoftver segítségével statisztikai értékeléssel megállapítjuk az optimális kromatográfiás mérési körülményeket. Fejlesztő szoftverekkel a kísérletterv értékelés látványos és gyors (lásd 7. ábra).

**7. ábra** Kísérletterv értékelése kromatográfiás fejlesztő/optimalizáló szoftverrel  
(forrás: saját ábra, korábbi szoftveres módszerfejlesztés DryLab kockája)



A néhány szélső értéken lemért kromatogram adataiból statisztikai módszerekkel sok ezer elméleti lehetőséget számolnak ki, majd vizuálisan megjelenítik, hogy a kísérleti tér (design space) mely pontján felelne meg a módszer az előre definiált követelménynek. Esetünkben a követelmény, hogy felbontás érték ( $R_s$ ) legyen nagyobb, mint 1,2. Az általam ismert szoftverek színek alapján a vizsgált kísérleti térben piros színnel értékelt területeken a módszer megfelelő lehet. A kapott ábráról ki kell választani egy kedvező paraméter kombinációt. Egyes szoftverek fel is ajánlják a legkedvezőbbnek számolt mérési módszer paramétereit.

## **2.7. Robusztus tartomány megadása**

Az optimális mérési paraméterek kiválasztása után meg kell vizsgálni, hogy a fejlesztett módszer mennyire robusztus. A robusztusság vizsgálat arra ad választ, hogy a módszer paramétereinek kismértékű, tudatos megváltoztatása mennyiben befolyásolja a mérési eredményeket, pl. hogyan változik a szelektivitás és a felbontás ( $R_s$ ) értéke, és ezek hogyan befolyásolják a mennyiségi meghatározást. Ha az eredményekre a változtatás nincs, vagy csak alig van hatással, azt mondjuk, hogy az adott analitikai módszer robusztus. Szignifikáns változásnak tekintendő, ha pl. kromatográfiában két komponens összeecsúszik, vagyis nem teljesül az alapvonalas elválasztás, illetve, ha a mennyiségi meghatározás során eltérő eredményt kapunk.

Az alkalmazott módszertől függ, hogy melyik kromatográfiás paramétert milyen mértékben változtassuk robusztusság vizsgálatához. A vizsgálati tervben előre rögzíteni kell a változtatni kívánt paramétereket és a változtatás mértékét. Vizsgált kromatográfiás paraméterek a kockázatbecslés alapján legtöbbször: pH, puffer koncentráció, oszlop hőmérséklet, eluens összetétel, áramlási sebesség; gradiens módszer esetén a gradiens ideje vagy meredeksége. Az egyes komponenseket egyedileg is változtathatjuk. Ennek a módszernek nagy hátránya, hogy időigényes és a különböző faktorok egymásra gyakorolt hatását nem tudjuk vizsgálni. Az előbb már említett módszerfejlesztő szoftverek lehetővé tesznek egy kísérlettervezéssel kivitelezett módszer robusztusság vizsgálatot is, ahol a kritikusnak ítélt körülmények hatásait és azok kölcsönhatásait tudjuk modellezni.

## **2.8. Kontroll stratégia**

A kontroll stratégia kidolgozása kromatográfiás vizsgálatokhoz gyakorlatilag a rendszeralkalmassági paraméterek meghatározása. A rendszeralkalmassági vizsgálat célja, hogy ellenőrizze, hogy adott mérési körülmények között a rendszer megfelelően működik és alkalmas vizsgálatok lefolytatására. A rendszer ellenőrzésére szolgáló oldatok alkalmazása,

melynek kromatográfiás paramétereit vizsgálva következtethetünk a mérő rendszerünk jóságára és alkalmasságára.

A rendszeralkalmassági paraméterként a rendszer aktuális állapotát mutató jellemzőt kell választani. A paraméter kiválasztása függ az adott vizsgálatról, berendezéstől, mintaelőkészítéstől stb. Rutin mérés során a rendszeralkalmasságot minden alkalommal a mérés megkezdése előtt és a végén vizsgálni kell. A rendszeralkalmasság ellenőrzéséhez szükséges oldat elkészítését a módszerleiratnak és a validálási tervnek tartalmaznia kell, azonban nem kötelező külön oldatot kijelölni, ha pl. a standard oldat is alkalmas a rendszeralkalmasság meghatározására. Legtöbbször a kromatográfiás elválasztást és detektálás érzékenységét kell rutin mérések előtt ellenőrizni. Validálás során kell majd véglegesíteni az adott módszerhez tartozó rendszeralkalmassági oldatot és megerősíteni az elfogadási kritériumait. Ezeket a vizsgálatok végzése során ellenőrizni kötelező.

A módszerfejlesztési fázis lezárásaként újabb kockázatelemzést végzünk. FMEA táblázatot kell újra kitölteni. A kockázatoknak csökkenni kell az alkalmazott lépések hatásaként. Ezzel a végső kockázatbecsléssel bizonyítjuk be, hogy a módszer megfelel a kitűzött céloknak és a kritikus paramétereket a módszerfejlesztéskor figyelembe vettük. Az így fejlesztett módszer transzferálása kevesebb analitikai problémát vet fel, várhatóan kevesebb nem megfelelő (trenden kívüli vagy specifikáción kívüli) eredményt kapunk. Abban az esetben, amikor megfelel a módszer a fentebb megfogalmazott összes követelménynek, akkor a validálási tervet el kell készíteni. Ha nem felel meg a módszer a követelményeknek, akkor változtatni szükséges rajta. A problémától függően az oldószert, az oszlopot vagy a kromatográfiás rendszer beállításait kell módosítani.

## **2.9. Validálás**

Vizsgálati módszer validálásával dokumentáltan bizonyítjuk, hogy az adott analitikai eljárás alkalmas a vizsgálandó termék bizonyos minőségi jellemzőjének megbízható, pontos mérésére a validálást végző laboratóriumban. Validálást megelőzően validálási tervet kell készíteni, amely a kvantitatív vizsgálati módszerek típusának megfelelően előírja a validálási eljárás gyakorlati megvalósítását a vonatkozó szabályozások (pl. ISO 17025; belső szabályozások) szerint.

*A validálási munka elkezdéséhez szükséges feltételek:*

**A:** Mérőkészülékek, amit a validálás méréseihez használunk rendelkezzenek:

- a módszerben előírt műszaki paraméterekkel, és felszereltséggel;
- az érvényes kalibrálási, kvalifikálási dokumentumokkal:
  - Telepítésminősítés (IQ, installation qualification) – Az eszköz telepítésekor végzett első kvalifikálási művelet, annak dokumentált igazolása, hogy a telepítés megfelelően történt, a szükséges alkatrészek, kiegészítők és dokumentáció rendelkezésre állnak.
  - Működési minősítés (OQ, operation qualification) keretében meg kell győződni arról, hogy a készülék képes a specifikációknak megfelelően működni.
  - Teljesítményminősítés (PQ, performance qualification) során azt igazoljuk, hogy az eszköz a rutinhasználat körülményi között képes az elvárt teljesítményt nyújtani.

Robusztusság vizsgálat alapján értékelni kell, hogy legalább milyen pontossággal és precizitással kell a beállított paraméter értékeket tartani az egyes készülékmoduloknak, eszközöknek. A kvalifikálás dokumentumait ezzel összhangban kell hozni. Kvalifikálás keretében meg kell győződni arról, hogy a készülék képes az elvárásoknak megfelelően működni. Kvalifikálás általában olyan tesztlépésekből áll, amik célzottan egy-egy funkció megfelelő működének a vizsgálatára szolgálnak (pl. áramlási sebesség teszt; hőmérséklet teszt). Kvalifikációs mérések kivitelezése során tesztelni kell a legrosszabb esetet vagy szélső értékek mérésével (pl. készüléken használt legkisebb és legnagyobb áramlási sebességen is igazolni kell a szállítás pontosságát), a +/- ingadozásokat meg kell adni a szórások kimérésével.

- az informatikai rendszerek, szoftverek érvényes validálási dokumentumaival.

**B:** Felhasználható anyagok a módszer validálásához megfelelő mennyiségben és az előírt minőségben álljanak rendelkezésre, lejáratí idő érvényességén belül:

- validálási minta (+mátrix),
- referencia anyag,
- ha szükséges ismert bomlástermékek vagy szennyezők.

**C:** Szükséges dokumentumok:

- Álljon rendelkezésre a vizsgálandó anyag adott kritériumának megfelelő analitikai módszer leírása. A módszer leírása megfelelő részletességgel tartalmazza a mérési eljárás lépéseit és minden olyan információt, amely a vizsgálat elvégzéséhez elengedhetetlen.
- Legyen hozzáférhető a fejlesztési jelentés.

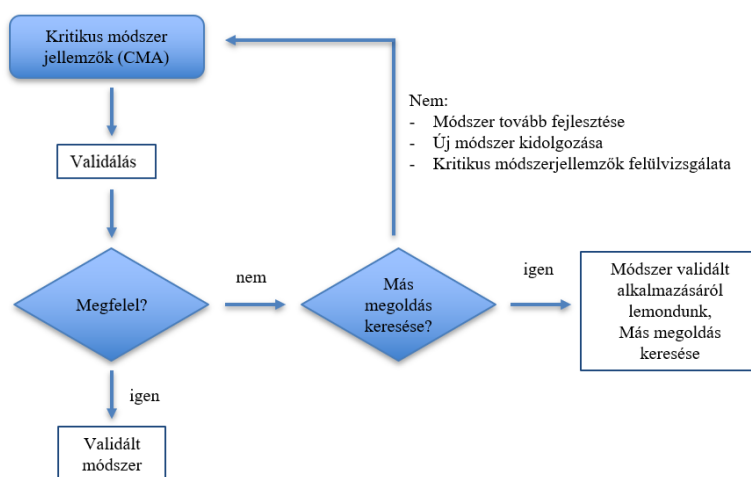
**D:** Az eredménymegadás formája/pontossága és az eredmények elfogadási kritériumai.

**E:** Képzett, felhatalmazott és tapasztalt személyzet.

Analitikai vizsgálatok validálása során értékelendő teljesítményjellemzők: Szelektivitás/specifikusság, precizitás, linearitás, torzítatlanság, tartomány, detektálási határ, mennyiségi meghatározás alsó határa, oldatstabilitás. (részletesen: lásd 5. melléklet)

Validálási jelentésben nyilatkozni kell a validált állapotról. A fejlesztett és validálásra tervezett módszer megfelelt az előre támasztott követelményeknek vagy sem. Megfelelés esetén, rutin vizsgálatokra használható, folyamatos monitorozással (lásd **1. ábra**: Analitikai módszerfejlesztés QbD szerint). Ha nem felel meg valamelyik kritérium, akkor a módszer további fejlesztése, új módszer kidolgozása, kritériumok felülvizsgálata vagy új megoldás keresése szükséges (Lásd 8. ábra.)

**8. ábra** Döntés a validált státuszról  
(forrás: saját ábra)



## 2.10. Rutin használat és folyamatos módszer monitorozás

Ha sikeres az analitikai módszer validálása, akkor folyamatos monitorozás mellett használatba lehet venni. Rutin használat során feladatunk a validált állapot fenntartása és ellenőrzése. Ehhez eszközeink:

- rendszeralkalmassági vizsgálatok
- ellenőrző kártyák
- változáskövetés (change control)

### *Rendszeralkalmassági vizsgálatok*

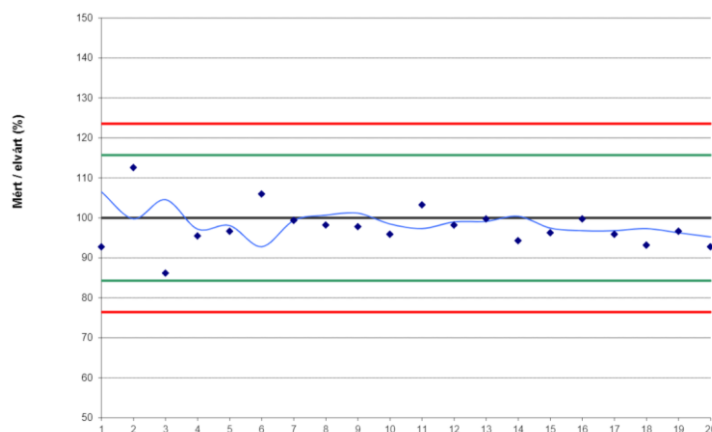
Rendszeralkalmassági vizsgálat során ellenőrizzük az analitikai készülék és analitikai módszer, tehát a mérési rendszerünk megfelelőségét. Már a módszerfejlesztés és validálás során is végig ellenőrizni kell a rendszer alkalmasságát. Validálási jelentésben pontosítani és véglegesíteni

kell az alkalmazását. Rutin mérések elején minden alkalommal ajánlott a rendszeralkalmasság ellenőrzése. Napi rutin mérések közbeni ellenőrzés szükségességét mérlegelni kell. Ha validáláskor, vagy monitorozás közben az derül ki, hogy mérési sorozat közben is ellenőrizni kell bizonyos paramétereket, akkor pontosan le kell írni, hogy teljes, vagy részleges vizsgálat legyen. Mérések legvégén minden esetben ajánlott a rendszeralkalmasságot ellenőrizni. Ezzel tudjuk igazolni, hogy a mérési folyamat teljes egészében megfelelő volt a rendszerünk. Régi, jól működő módszereknél ritkítható a rendszeralkalmassági vizsgálatok száma. Ha új termékre kell kiterjeszteni a vizsgálatot, vagy változik az alapanyag, technológia, végtermék, vagy gyártási módszer, akkor felül kell vizsgálni, hogy a korábbi eljárás alkalmas-e még az analitikai rendszer ellenőrzésére.

### *Kontroll kártya*

Attól fogva, hogy a módszert beillesztjük a rutinszerű alkalmazásba, rendszeres vizsgálatokkal kell biztosítani, hogy a rendszer állandó szabályozás alatt maradjon. Ez a fázis a „rutinszerű minőségsszabályozás”. A rutinszerű minőségsszabályozás eszköze az ellenőrző kártya. (Rikker, 2013) Célja a rutinelemzés folyamatos ellenőrzése, a hibák feltárása, eredmények helyességének igazolása. (9 . ábra)

**9. ábra** Kontroll kártya  
(forrás: Rikker, 2013)



A mérési módszer valamely paraméterének vagy az eredmények szórásának előzetes becslése szükséges. Az előkészítés szakaszában egy kísérleti periódushoz legalább 20 középérték ismerete szükséges. Elemzési sorozatonként legalább egy ellenőrző érték kell használhatóságához. Az ellenőrző értékek mérési gyakoriságának meghatározása a laboratórium felelőssége, célszerű figyelembe venni a lényeges hibák kockázatait és a lehetséges következmények súlyosságát. Az ellenőrző kártya hosszú ideig tartó használatakor frissíteni kell az ellenőrző és figyelmeztető határokat.

A következő helyzetekben ajánlatos beavatkozni:

- 1 ellenőrző érték kívül esik az ellenőrző határokon,
- 2 egymást követő ellenőrző érték a figyelmeztető határon,
- 7 egymást követő ellenőrző érték emelkedő tendenciájú,
- 7 egymást követő ellenőrző érték csökkenő tendenciájú,
- 11 egymást követő ellenőrző értékből 10 a középvonal egyik oldalán helyezkedik el,
- 14 egymást követő ellenőrző pont le-föl váltakozik.

Kontroll kártya típusai:

- Eredménykártya: vizsgálati eredmények ellenőrzése ugyanolyan típusú mintából történik
- Középérték-ellenőrzőkártya: Sorozatonként meghatározott számú ellenőrző minta átlagát ábrázolják vagy a kalibráció ellenőrzésére használják
- Visszanyerési-ellenőrzőkártya: A mátrixhatásból eredő rendszeres hibák feltárására alkalmasak. Minden mátrixtípushoz külön visszanyerési ellenőrző kártyára van szükség, mert a jelentősen különböző összetételű mintákban eltérő típusú és nagyságú hibák jelentkezhetnek.
- Vakpróbaérték-ellenőrzőkártya: a következő hibaforrások azonosításhoz használják: vegyszerek szennyezettsége; a reakcióedények és a mérőrendszer szennyezettsége; műszerhiba (például alapvonal-elcsúszás).

#### *Módszer életciklus követése/ változáskövetés*

Analitikai módszer rutin használata során gyűjteni kell milyen problémák, eltérések, hibák merülnek fel, és ezek felderítésére milyen kísérleteket végzünk, milyen megoldásokat találtunk. Az analitikai módszereket rendszeresen felül kell vizsgálni mind teljesítőképesség, hatékonyság, mind gazdaságossági és környezetvédelmi szempontokból.

Minden olyan esetben, amikor eltérés, változás áll be a laboratórium és az alkalmazott rendszer vagy módszer működtetésében részleges vagy teljes újvalidálással kell bizonyítani, hogy valóban képes a laboratórium az adott analitikai feladat megbízható elvégzésére.

### 3. MÓDSZERFEJLESZTÉSI TERV KIDOLGOZÁSA

A fejlesztési terv elkészítésének gyakorlati kivitelezését a példának választott nitrózamin vizsgálatra mutatom be.

#### 3.1. Információk gyűjtése nitrózamin mérésekről

##### 3.1.1. Ismert analitikai technikák

Nitrózaminok vizsgálata analitikai szempontból bonyolult élelmiszer mátrixból nagyon kis mennyiségű (ppb szintű) szennyező kimutatása. Ezért minden leírt módszer valamilyen elválasztástechnikai módszer, tipikusan kromatográfiás elválasztás. A kromatográfiás technikákban van egy állófázis, ezen át folyamatosan áramlik egy mozgófázis. A mozgófázisba pillanatszerűen, nagyon kis térfogatban bejuttatjuk a vizsgálandó mintát. Az állófázisra érve a minta különböző komponensei megkötődnek, majd deszorbeálódnak, majd megint megkötődnek, megint deszorbeálódnak és így haladnak végig az állófázissal töltött kolonnán, majd jutnak a detektorba. A különböző komponensek eltérő idő alatt érnek végig az állófázison, mert eltérő erősséggel kötődnek az állófázishoz. A gyengébben kötődő komponens előbb ér a detektorba, mint az erősen kötődő komponens, így a különböző komponensek időben fizikailag elválnak egymástól.

##### *Gázkromatográfia*

Gázkromatográfiás vizsgálatoknál a mozgó fázis gáz. Ezzel a technikával csak illékony komponensek vizsgálhatók. Mivel a nitrózaminok többségében illékony vegyületek, célszerűnek tűnik első megközelítésben gázkromatográfiás vizsgálatot fejleszteni méréseikre. A nitrózaminok várhatóan nagyon kis koncentrációban (pg/ml – ng/ml) lesznek jelen az élelmi anyagokból készíthető vizsgálati oldatban, ezért csak a nagyon kis érzékenységű, és specifikus detektorok megfelelőek. Például Kocak és munkatársai (Kocak, 2012) nitrogén szelektív detektorral tudtak néhány ng/ml koncentrációban mérni gázkromatográfiás elválasztás után. Míg tömegdetektálási technikával már 0,1 ng/ml riportálási határokat is el lehet érni (Lehotay, 2015). Ugyanakkor a GC vizsgálat körülményei többnyire megegyeznek a nitrózamin képződésnek kedvező körülményekkel (magas hőmérséklet, savas környezet, nitrogéntartalmú komponensek jelenléte), ezért előfordulhat in situ nitrózamin képződés a mérés során, ezzel meghamisítva és bizonytalaná téve az eredményeket.

##### *Folyadékkromatográfia*

Tömegspektroszkópiai detektálási technika fejlődésével (megjelentek a hármas kvadrupol tömegszelektív detektorok) a folyadékkromatográfiás vizsgálatok is előtérbe kerültek nagyon

kis koncentrációk kimutatására. Tömeg detektálással és deuterált belső standardok használatával pontos mennyiségi mérések lehetségesek (Hermann, 2014). Kimutatási határuk a legújabb módszerekben kisebb, mint a gázkromatográfiás vizsgálatoké. Ultra-nagy hatékonyságú folyadékkromatográf (UHPLC) használatával a mérési idő is jelentősen csökkenthető, a vizsgálathoz szükséges oldószer mennyisége pedig radikálisan csökken. Ami környezetvédelmi és gazdaságossági szempontból kedvező. A folyadékkromatográfiás vizsgálat körülményei pedig kevésbé kedveznek az in situ nitrózamin képződésnek. A mérési bizonytalanság ezáltal csökkenthető. A szakirodalmi cikkek alapján a nitrózamin célvegyületek megfelelő visszatartással választhatók el a legelterjedtebb fordított fázisú kromatográfiás technikával, a könnyen hozzáférhető C18 állófázisokon (Rane et al., 2018; Ripollés et al., 2011; Steed et al., 2018). Szakirodalom alapján a kis molekulatömegű, poláris nitrózaminok hatékonyabban ionizálódnak APCI (atmoszférikus kémiai ionizációs) ionforrásban, mint ESI (elektrospray ionizációs) ionforrásban (Chang et al., 2020; Ripollés et al., 2011; Tölgyesi, 2021). Az APCI ionforrás alkalmazása során jóval kisebb mátrixhatásokkal kell számolnunk, ami alacsony limit koncentrációk esetén nem elhanyagolható tényező előnyös a bonyolult mátrixú minták vizsgálatában. A nitrózaminok ilyen kis koncentrációban történő vizsgálatára húskészítményekből az irodalmi adatok alapján ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszert kell fejleszteni speciális tömeg detektálással.

### **3.1.2. Mintaelőkészítés lehetőségei**

#### *Klasszikus mintaelőkészítési technikák*

Élelmi anyagok mintaelőkészítése gyakran bonyolult, sok lépéses. Félő, hogy a vizsgálandó komponens (nitrózamin) elveszik mintaelőkészítés közben, mivel illékony és nagyon kis koncentrációban van jelen a vizsgálati mintában. Az élelmiszerek bonyolult mátrixok analitikai szempontból. A vizsgálandó komponenst, jelen esetben a nitrózaminokat vizsgálat előtt célszerű elválasztani a mintaelőkészítés tisztító lépéseiben a mátrix komponensek nagy részétől fizikai eszközökkel. Különböző extrakciós technikák fejlődtek az elmúlt évtizedek során, pl folyadék-folyadék extrakció, szilárd fázisú extrakció, szuperkritikus extrakció.

#### *„QuEChERS” mintaelőkészítési technika*

QuEChERS mozaikszó (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) jelentése: gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos. Ez a mintaelőkészítési technika alapvetően egy szerves oldószeres, (acetonitriles) extrakció, majd  $\text{MgSO}_4$  és  $\text{NaCl}$ -dal történő kisózás, végül a tisztítás, mely igen sok lehetőséget rejt magában. A tisztítás többnyire szilárd fázisú extrakció, aminek a mátrixtól függően nagyon sok változata van. Analitikai eszközgyártók előre

töltött „kit”-eket árulnak a különböző élelmiszer mátrixokhoz a mintaelőkészítés egyszerűsítéséhez. Példánkban is célszerű a QuEChERS technikát előnyben részesíteni a fejlesztési folyamat során.

### 3.2. Nitrózamin mérés célja

A fejlesztés analitikai célja a validálható mérési módszer. Ehhez az alábbi analitikai cél profilokat (ATP-ket) fogalmazzuk meg: a módszer legyen:

- szelektív (pl. a leggyakrabban előforduló 4 db nitrózaminra)
- torzítatlan, lineáris és precíz a mérési tartományban (pl: kimutatási határtól a specifikációs limit legalább 120%-ig)
- robusztus a mintaelőkészítésre és analitikai mérésre egyaránt
- mennyiségi meghatározás alsó határa legfeljebb 50%-a lehet a specifikációs szintnek.

### 3.3. Analitikai technika kiválasztása nitrózamin méréshez

Előzetes információgyűjtés alapján tudjuk, hogy folyadék kromatográfiás mérést kell fejleszteni. Annak eldöntésére, hogy a HPLC technikán belül melyik típust válasszuk, a vizsgálandó komponens fizikai-kémiai tulajdonságai a meghatározóak. Ha nem találtunk elegendő információt, akkor úgynevezett screening vagy tájékozódó méréseket végezzünk, annak eldöntésére, hogy milyen irányban induljunk. A 4. táblázatban a leggyakoribb folyadékkromatográfiás technikákat foglaltam össze.

**4. táblázat:** Folyadékkromatográfiás technikák  
(forrás: saját táblázat)

| Módszer                                      | Leírás                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fordított fázisú kromatográfia (RP)          | Az állófázis apoláris, a mozgófázis poláris, víz és szerves oldószer keveréke. Vízben oldható anyagok elválasztására széleskörben alkalmazott. Semleges, savas és bázikus karakterű anyagok vizsgálatára is alkalmas módszer. Környezetvédelmi minták, növényvédőszermaradványok, kismolekulák vizsgálatára tipikusan alkalmazott technika. |
| Normális fázisú kromatográfia (NP)           | Az állófázis poláris, a mozgófázis kevésbé poláris szerves oldószerek keverékéből áll. Vízben nem oldható anyagok és izomerek elválasztására alkalmazzák elsősorban.                                                                                                                                                                        |
| Hidrofil kölcsönhatású kromatográfia (HILIC) | Az állófázis poláris, a mozgófázis víz és szerves oldószer keveréke, erősen poláris vegyületek (pl. szerves savak) elválasztására használják.                                                                                                                                                                                               |
| Ioncserés kromatográfia (IEC)                | Az állófázis töltött csoportokat tartalmaz, amelyek megkötik a minta ellentétes töltésű ionjait, a mozgófázis sót és puffert tartalmazó vizes oldat. Általában nagyméretű biomolekulák elválasztására használják.                                                                                                                           |
| Ionpároképző kromatográfia (IPC)             | A fordított fázisú kromatográfiával megegyezik, azzal a különbséggel, hogy a mozgófázishoz ionpároképző reagenst adunk, amely kölcsönhatába lép a minta ellentétes töltésű ionjaival. Azon bázisok és savak elválasztására alkalmas, melyeknek kis visszatartása van fordított fázisú rendszerben.                                          |

|                                    |                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Méretkizárásos kromatográfia (SEC) | Az állófázis inert, a mozgófázis lehet víz vagy szerves oldószer, az elválasztás a molekulatömeg alapján, elsősorban nagyméretű biomolekulák elválasztására használják. |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Nitrózaminok vizsgálatára az irodalmi adatok alapján a fordított fázisú folyadékkromatográfiás technikát választjuk, mivel vízben oldható, poláros kismolekulák.

A nitrózaminok UV detektorral vizsgálhatók lennének, de az elvárt kis koncentrációban nem elég érzékeny a fényelnyelésen alapuló UV detektor típus. A kimutatási határ csökkentésének lehetősége lenne a kromatográfiás oszlopra injektált anyagmennyiség növelése. Ez a nagy mennyiségű mátrix jelenléte miatt azonban az állófázis és detektor túlterhelését okozná. A nano- és pikogramm koncentrációjú anyagok vizsgálatára tömegspektrometriás detektálási mód kell, ezen belül is a nagy felbontású hármass kvadrupólus rendszer (TQMS).

A tömegspektrometriás detektálás előnyei:

- Mennyiségi analízisre jól alkalmazható, mert széles a linearitási tartománya, alacsony kimutatási határa (DAH)
- Nagy szelektivitás (komponenseket tömegszám alapján könnyű azonosítani)
- Univerzális (minden anyagnak van tömege, az ionforrás és ionizációs körülmények helyes megválasztásával az anyagok túlnyomó többsége ionizálható és tömeg detektorban vizsgálható)
- Gyors módszerek fejleszthetőek, előnyös az UHPLC-hez kapcsolni. Ekkor kevesebb az oldószer felhasználás is
- Robusztus detektor (kromatográfiás paraméterek kis mértékű változtatása esetén is, ugyanazt az eredményt szolgáltatja a nagymértékű szelektivitása miatt).

Hátránya, hogy képzett személyzetet igényel a használata.

Hatékonyság növelése (idő és oldószer megtakarítás) is az ultranagyhatékonyságú kromatográfiás (UHPLC) készülék irányába tereli a fejlesztést, különösen igaz ez a tömeg detektoros vizsgálatokra. Ezek a detektorok jobban kihasználhatók, és még kisebb koncentrációk vizsgálhatóak az UHPLC technika segítségével. Ha laboratóriumunk nem rendelkezik a feladathoz szükséges felszereltségű (UHPLC-TQMS) analitikai készülékkel, nem tudjuk sikeresen megoldani ezt az analitikai feladatot. Példánkban, TQMS detektor nélkül nem tudjuk az elvárt kimutatási határral mérni az élelmi anyagokban a nitrózamin szennyezőket. A módszerfejlesztést irodalmi szempontok figyelembevételével APCI ionforrást alkalmazva kezdjük. A kromatográfiás paraméterek optimalizálását követően az ionforrás paramétereinek finom hangolásával tovább fokozható lesz a célvegyületek ionizációjának hatékonysága.

Az eluensek (mozgófázis) kiválasztása során elsődleges szempont, hogy kompatibilis legyen, tehát oldódjon benne a vizsgálandó komponens, a mintaelőkészítéshez használt oldószerrel elegyedjen, és a szükséges detektor is használható legyen. Figyelembe véve a környezetvédelmi szempontokat is, első kísérletekben az irodalomban talált módszerek alapján vizet és metanolt alkalmazunk. Ehhez kis mennyiségben MS detektor használatakor hangyasavat adunk, amely elősegíti az ionforrásban a protonált molekulaionok képződését (George et al., 2018), ezáltal kisebb anyagmennyiség lesz kimutatható. Ha a készülékünk nyomáshatára megengedi etanollal is kezdhjük a fejlesztést, törekedve a zöld analitika irányába.

Az állófázis (kromatográfiás oszlop) kiválasztásra több kiválasztási metodika létezik:

- az oszlopgyártók különféle applikációkat adnak ki a legkülönbözőbb komponensek vizsgálatához, módszerfejlesztő kiteket árulnak, segítve a választást
- fejlesztő szoftver is segítheti a megfelelő oszlop, vagy alternatív oszlop kiválasztását,
- az irodalomban talált és abban sikeresen alkalmazott állófázis vagy azzal hasonló tulajdonságú (de modernebb) oszlop kipróbálása
- saját tapasztalatból hasonló kromatográfiás tulajdonságokkal rendelkező anyagok esetében már bevált kolonna használata

Irodalmi adatok alapján C18 állófázist választunk. Nitrózamin vizsgálatához alkalmas készülék-detektor-állófázis választás lehetőségek a várhatóan kis mérendő koncentráció miatt erősen korlátozottak.

### **3.4. Felhasználói igények nitrózamin mérés során**

Az analitikai feladat példánkban nagyban meghatározza a szükséges technikai felszereltséget. Nitrózaminok vizsgálatához a készüléknek speciális tulajdonságokkal kell rendelkeznie, a felhasználó igények az analitikai készülék választásnál háttérbe szorúlnak. Olyan szempontokat kell figyelembe venni, hogy ha új készüléket kell erre a vizsgálatra beszerezni, akkor az illeszkedjék az eddig is használt készülékparkba; a szoftver ismerős legyen; a személyzet képes legyen használni. Az oldatstabilitás és mérési idő szempontok lesznek a módszerfejlesztés során, hogy a későbbi rutin munka szervezése könnyebb legyen a felhasználóknak.

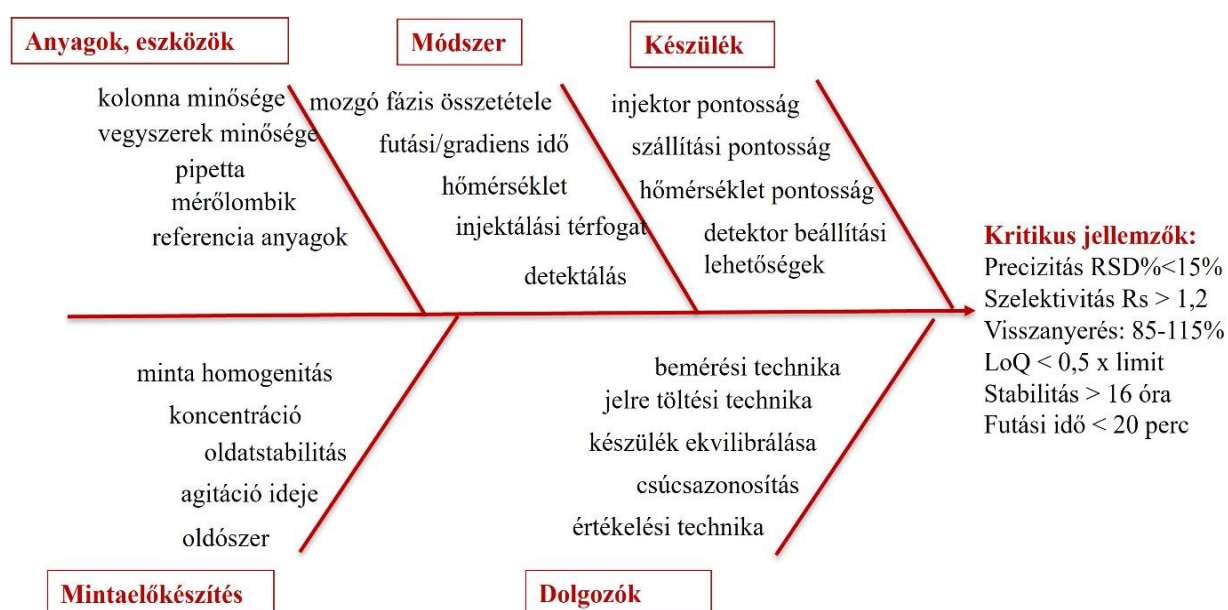
### **3.5. Kritikus paraméterek a nitrózaminok vizsgálata során**

A vizsgálati módszer (esetünkben HPLC mérés) kritikus paramétereit a módszervalidálási elvárások és a felhasználói igények alapján kell meghatározni, és ezekre koncentrálni kell kezdeni a módszerfejlesztést. Pédánkban a kritikus módszerjellemzők (CMA) az általános validálási követelmények és korábban említett igények alapján az alábbiak lehetnek:

- módszerprecizitás: 15%-os RSD%-kal teljesüljön
- specifikusság: kritikus csúcspár felbontás ( $R_s$ ) értéke legyen nagyobb, mint 1,2
- torzítatlanság: visszanyerés 85 -115%-ban teljesüljön a mérési tartományban
- DL, QL értékek megfelelően kicsik legyen
- oldatstabilitás legalább 16 óra
- mérési idő legfeljebb 20 perc/injektálás.

Nitrózaminok vizsgálatához az analitikai technika és mérési tapasztalatok alapján a *kockázatosnak ítélt tényezők: anyagok és eszközök, HPLC készülék, kromatográfiás módszer, a mintaelőkészítés és munkaerő*. Talán legnépszerűbb és legátláthatóbb módszer, ha halszálla diagramon ábrázoljuk a kockázati tényezőket és ok-okozati viszonyba állítjuk a módszert meghatározó kritikus módszer jellemzőkkel (CMA). (Lásd 10. ábra).

**10. ábra** Ishikawa diagramm HPLC módszerfejlesztés kezdeti kockázatbecsléshez (példa)  
(forrás: saját ábra)



A 6. melléklet példatáblázataiban az Ishikawa diagram alapján a meghatározott tényezők és a hozzájuk rendelt paraméterek hatásainak kockázatértékelését mutatom be a tervezett nitrózamin vizsgálat módszerfejlesztéshez. Hibamód és hatások vizsgálatával (Failure Mode and Effects Analysis, FMEA) lehet legegyszerűbben elvégezni. FMEA olyan elemzési módszer, mely segít feltárni a fejlesztendő módszerben a hiba-lehetőségeket és hiba-hatásokat, és rangsorolásukkal egyúttal azok értékelésére is alkalmas. Az értékelés alapján magas kockázatúnak ítélt paraméterek a tervezett kromatográfiás vizsgálati módszerben: az *állófázis- és mozgófázis választás, oldószer gradiens, hőmérséklet*. A HPLC készülék tekintetében a *detektor beállítás*

és az *injektálás* magas kockázatú, a mintaelőkészítés során pedig a *mátrix hatásra* kell gondosan ügyelni. A humán kockázatok közül a *komponens azonosítását* találtuk magas kockázatú paraméternek. Ezekkel kiemelten foglalkozni kell majd az optimalálás és robusztusságvizsgálat során.

### 3.6. Módszer optimalizálás és kísérlettervezés gyakorlata

Dolgozatomban példaként a fenti tényezők közül a kromatográfiás mérési módszernek a paraméter optimalizálási és kísérlettervezési folyamatát mutatom be részletesen. Ehhez a tényezőhöz FMEA alapján magas kockázatúnak értékelt paraméterek: állófázis- és mozgófázis választás, oldószer gradiens, hőmérséklet.

#### 3.6.1. Állófázis választás szempontjai

A vizsgálandó vegyületek kémia tulajdonságai alapján kell kiválasztani az állófázist. Az állófázis folyadékkromatográfiában legtöbbször fém csőbe töltött szemcsék. A kereskedelmi forgalomban kapható töltetek túlnyomóan szilikagél alapúak. A leggyakrabban használt fordított fázisú technikában az állófázis többnyire valamilyen apoláros szénhidrogén láncsal módosított szilikagél. Az 5. táblázatban összegyűjtöttem a leggyakrabban használt állófázis típusokat.

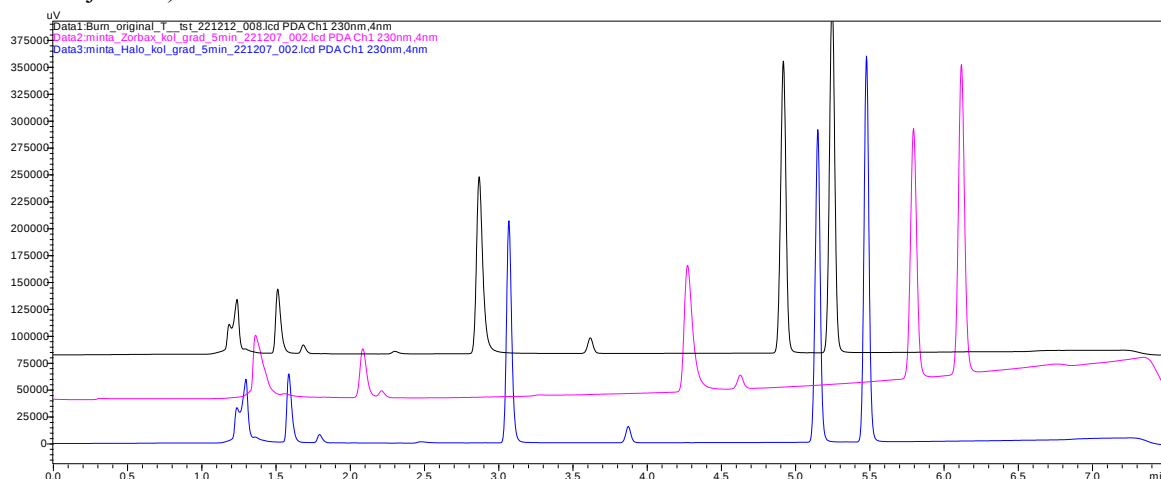
**5. táblázat:** Leggyakoribb állófázis töltet típusok  
(forrás: saját táblázat)

|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Si (szilika)                  | Normál fázisú töltet, különösen poláris, nem ionos vegyületek elválasztására alkalmas. Vízzel, víztartalmú oldószerrel nem szabad együtt használni, mert a víz deaktiválja a felületét. A szilikagél-hordozós töltetek mechanikailag meglehetősen erősek, így a kolonnák még néhány nagyobb lökést is elviselnek. |
| C8 (RP-8)<br>C18 (RP-18; ODS) | A legelterjedtebb fordított fázisú töltetek, apoláris komponensekkel szemben a legnagyobb visszatartással bír. Különösen alkalmasak gyógyszer-hatóanyagok, növényvédősszer maradványok, környezetvédelmi mérések céljaira.                                                                                        |
| C6H5 (fenil)                  | Az aromás vegyületekkel szemben különösen nagy szelektivitással rendelkező, fordított fázisú töltet, de hidrofób kölcsönhatásos kromatográfiában is alkalmazható.                                                                                                                                                 |
| CN (cianopropil)              | Vegyes tulajdonságú, enyhén poláris szorbens, fordított fázisú és normál fázisú töltetként is használható. Gradiens elválasztásokra különösen alkalmas, mert az egyensúlyi helyzetet gyorsan eléri. Bizonyos gyógyszerek analízise során kiterjedten alkalmazzák.                                                 |
| NH2 (aminopropil)             | Fordított és normál fázisú, valamint gyenge anioncserélő töltetként egyaránt alkalmazható. Normál fázisként szelektivitása a szilikához hasonló, nagy előnye azonban, hogy nem deaktiválja a felületét a víz.                                                                                                     |
| SAX WAX<br>SCX WCX            | Többféle erős vagy gyenge típusú (S vagy W) kation vagy anioncserélő (CX vagy AX) tulajdonságú töltetek, amelyek bázisok, savak, sók nukleozidok, nukleotidok elválasztására használhatók.                                                                                                                        |

A módosító csoportok közül leggyakoribb a C18 lánc. Ezen belül is több ezer típusú állófázis közül választhatunk. A következő ábrán bemutatom, hogy milyen nagy különbség lehetséges „azonos” C18 töltetekkel mért kromatogramok között. A példához a következő három

modellvegyületet választottam: koffein, benzoesav és szorbinsav. Az ábrán ebben a sorrendben eluálódnak a komponensek mindhárom esetben. Az analízis körülményei azonosak, 1 ml/perc áramlási sebesség, 50 °C, az eluensben a szerves módosító metanol, a puffer pH-ja 3,8. Az állófázisok mindhárom esetben azonosan C18 alkil láncal módosított szilikagélek, csak a láncok eltérő módon kötődnek az alap szilikáéhoz.

**11. ábra** Állófázis változtatás hatása a retenciós időre  
(forrás: saját ábra)



A visszatartást, ezáltal a komponensek elválasztását nemcsak a módosító lánc minősége (esetünkben C18) határozza meg, hanem nagyon sok tényező befolyásolja még:

- a szilikagélhez való kötés módja az alkil láncnak (térhálós, vagy lineáris),
- hány darab C18 lánc van egységnyi felületen,
- a szemcse teljes egészében átjárható, úgynevezett porózus, vagy egy tömör maggal rendelkező héjszerkezetű gömb,
- esetleg az első szilanizálás (C18 lánc kapcsolás) után további utószilanizálás történt,
- vagy a C18 lánc nem közvetlenül a szilikáéhoz kapcsolódik, hanem egy etilén hídon keresztül kapcsolják hozzá.

Az állófázis kiválasztása nagyban befolyásolja a fejlesztendő módszer sikerességét. Célszerű alapos irodalmazás után minél több lehetséges típust kipróbálni. Igyekezzünk megbízható gyártótól, jól reprodukálható kolonnát választani. Tartsuk szem előtt, hogy a kolonna elhasználódik, és tönkre lehet tenni, ezért mindig csak pontosan ismert előéletű kolonnán kezdjünk bele módszerfejlesztésbe. Az állófázis anyagi minőségét az elválasztandó komponensek kémiai tulajdonságai határozzák meg. Fizikai paramétereit azonban más szempontok alapján választjuk:

*Szemcseméretet befolyásoló tényezők:*

- Milyen kromatográfiás készülékünk van? – hagyományos vagy ultranagy hatákonyságú
- Hány komponenst, milyen sebességgel szeretnénk elválasztani? - nagy injektálási szám, sok komponens esetén kis szemcseméret vagy héjszerkezetű töltet javasolt
- Milyen a vizsgálandó komponens/mátrix arány a vizsgálandó oldatban?

Ha kis koncentrációjú szennyezőket kell meghatározni bonyolult mátrixban, mint esetünkben, akkor tapasztalatok alapján a porózus, nagyobb szemcseméretű töltetek használata indokolt.

*Kolonna hosszúság választás szempontjai*

Feladat komplexitása (elválasztandó komponensek száma) is hatással van a kolonna fizikai paramétereire, elsősorban a kolonna hosszára. Oszlop hosszúsággal növelni tudjuk az elválasztandó komponensek számát, de a készüléken megengedhető nyomásesés behatárolja a lehetőségeket. Ne feledjük azonban, az oszlophossz növeléssel nő az analízis ideje, és több oldószer szükséges egy méréshez, ami kedvezőtlen környezetvédelmi szempontból is.

*Kolonna átmérőt befolyásoló tényezők*

- Milyen áramlási sebességgel célszerű mérni?
- Állandó lineáris áramlási sebesség (aminek optimuma van az adott rendszerre) mellett a térfogat áramlási sebesség arányos az oszlop belső átmérőjének a négyzetével. Ezért nem mindegy milyen belső átmérőjű kolonnát választunk. pl.: esetünkbe nem szükséges TQMS APCI detektor használatakor az ideális áramlási sebesség: 0,4-0,8 ml/perc.
- Anyagi és egyúttal környezetvédelmi okokból célszerű minél kisebb kolonnát választani, hogy minél kevesebb mozgó fázist kelljen használni.
- Oszlopátmérő az oszloptöltés minőségét befolyásolja kolonnagyártás során.

### **3.6.2. Mozgó fázis kiválasztásának szempontjai**

Fordított fázisú folyadékkromatográfiában a mozgó fázis többnyire víz (ami leginkább valamilyen stabil pH-jú puffer oldat) + polaritást módosító szerves oldószer.

Ionos vagy könnyen ionizálható vegyületek vizsgálata során víz helyett, stabil pH-jú puffer oldat használata fontos, hogy a vizsgálandó molekula egységes formában legyen jelen a vizsgálat időtartama alatt. Szerves oldószer gyakran metanol (MeOH) vagy acetonitril (ACN). Egyre ritkábban a környezetvédelmi szempontok figyelembevétele miatt tetrahidrofuran (THF). Zöld kémia terjedésével előtérbe került az etanol és propanol használata.

Fejlesztéskor optimalizálandó a mozgófázisban: pH, puffer só koncentrációja, szerves oldószer mennyisége és minősége.

## Mozgó fázis pH-ja

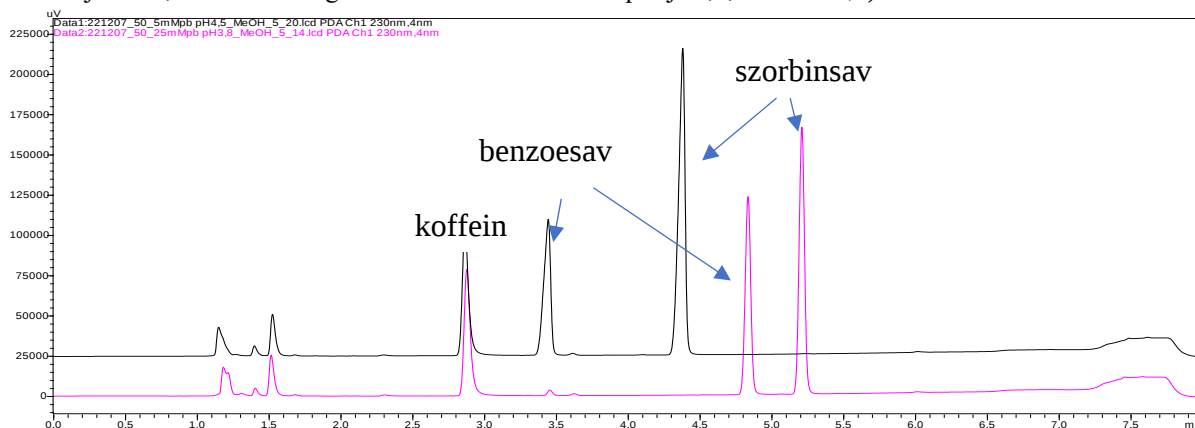
Kromatográfiás szempontból a vegyületek négy csoportra oszthatóak:

- Kromatográfiás szempontból semleges vegyületek
- Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek, amelyek könnyen ionizálhatóak
- Bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek, amelyek könnyen ionizálhatóak
- Ionos vegyületek

Folyadékkromatográfiás vizsgálat során a vizsgálandó komponensek oldott formában vannak jelen. Ha egy molekula könnyen ionizálható, akkor az oldószer pH-jától függően ionos vagy ionvisszaszorított állapotban lehet jelen. Ez egy egyensúlyi folyamat, amelyben a komponens akkor van esélyünk ion visszaszorított formában tartani, ha az oldószer, vagyis a mozgófázis pH értéke a vizsgálandó komponens disszociációs állandójából képezhető  $pK_a$  érték + 2 vagy - 2 tartományon kívül esik, attól függően, hogy savas vagy bázikus karakterű a molekula. Az ionvisszaszorított forma jelenti az apolárisabb molekuláris formát, amely kölcsönhatása fordított fázisú kromatográfiában az állófázissal nagyobb, mint az ionos formáé. Ilyen esetben a kölcsönhatási lehetőségek száma kevesebb, nincs több egyensúly egymás mellett, ezért keskenyebb és szimmetrikus csúcs várható. N értéke kisebb, ami optimalizálás szempontjából előnyös. A folyamatok könnyebben kézben tarthatóak. Ennek illusztrálására bemutatom az előzőekben már használt modell vegyületekkel készült kromatogramokat a következő (12.) ábrán. Különböző pH-jú mozgófázisokkal mért kromatogramokon jól látszik, hogy a kromatográfiásan semleges koffein (elsőnek eluálódó komponens) mindegyik vizsgált pH-n, ugyanolyan retenciós idővel detektálható (2,9 perc). Míg a savas karakterű anyagok retenciós ideje erősen változik a pH hatására. A kromatográfiás körülmények, a puffer pH-n kívül azonosak voltak.

### 12. ábra pH hatása a retenciós időre

(forrás: saját ábra, felső kromatogram felvételekor az eluens pH-ja 4,5, az alsón 3,8)



*A puffer oldatokkal szemben támasztott követelmények:*

- Megfelelő puffer kapacitás az adott pH tartományban.
- Megfelelő oldhatóság.
- Stabilitás.
- Kompatibilitás a készülékkel: pl. alkalmazhatóság LCMS detektorhoz.

A pufferek pufferkapacitása a  $pK_a \pm 1$  pH tartományban a legnagyobb, a koncentráció tekintetében a 10 mmol körüli érték elegendő. Ennél nagyobb koncentrációt csak indokolt esetben alkalmazunk, mert a magas sókoncentráció használata megrövidíti a kromatográfiás oszlop (állófázis) élettartamát és készüléket is károsíthatja. Ha a vizsgálandó vegyületek igénylik a pH kontrollt, akkor érdemes alacsony pH-n kezdeni a fejlesztést, mert ott az állófázis szilikagél alapon lévő szabad szilanolcsoportok disszociálatlan állapotban vannak. Így elkerülhetjük a nem kívánt ionos kölcsönhatást az állófázis és a bázikus tulajdonságú vizsgálandó anyag között. A pH növelésének a kolonnák felső használati pH értéke szab határt. Az alap szilikagél oldódik 8 feletti pH értéken. A nagy visszatartás és gyenge kölcsönhatás lehetőséget ad, hogy a szerkezetileg kismértékben különböző vegyületeket is alapvonalig, megfelelő felbontással ( $R_s$ ) elválasszuk. pH-nak jelentős, retenciót befolyásoló hatása van az elválasztásra. Ez egyrészt előnyt jelenthet a szelektivitás befolyásolása szempontjából. Másrészt hátrány, mert kis pH eltérések jelentős retenciós időbeli eltéréseket eredményezhetnek, vagyis a folyadékkromatográfiás módszer nem lesz robusztus.

Ha kromatográfiásan semleges anyagokat kell vizsgálni, mint például a nitrózaminok, amelyek nem igénylik a pH kontrollt akkor érdemes a legegyszerűbb eluens összetétellel kezdeni a fejlesztést. A mátrix komponensektől való elválasztás miatt ezekben az esetekben is előfordulhat, hogy szükség lesz majd stabil pH-jú puffert tartalmazó mozgó fázis használatára, ha a mátrix komponensek érzékenyek a pH-ra.

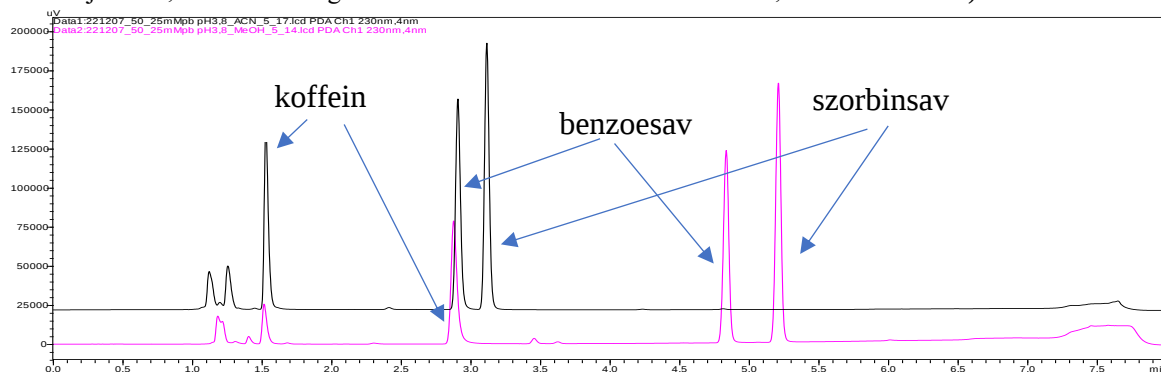
*Szerves oldószer minősége és mennyisége, oldószer gradiens:*

Szerves oldószer polaritásával tudjuk befolyásolni az álló és mozgófázis közötti megoszlást, ezáltal a komponensek visszatartását. Fordított fázisú kromatográfiában minél apolárisabb egy oldószer, annál „erősebb” eluensnek bizonyul, vagyis a vizsgálandó komponensek gyorsabban eluálódnak használatával. Figyelembe kell vennünk az oldószer viszkozitását. Mivel az állófázison át kell hajszolnunk a mozgófázist, ez csak túlnyomással lehetséges. Az oldószer viszkozitása viszont erősen befolyásolja a kolonnán történő nyomásesést, ezért hiába környezetvédelmi szempontból az etanol előnyös, jó polaritású oldószer lenne, nem tudjuk minden készülékekkel használni. A leggyakrabban használt metanol és acetonitril összehasonlításához, ugyancsak a korábbi 3 komponenst használtam. A kromatográfiás

paraméterek a mozgó fázis szerves módosítóján kívül azonosak voltak. A 13. ábrán bemutatom milyen nagy hatást okoz az oldószer váltás.

### 13. ábra Szerves oldószer váltás az eluensben hatása az elválasztásra

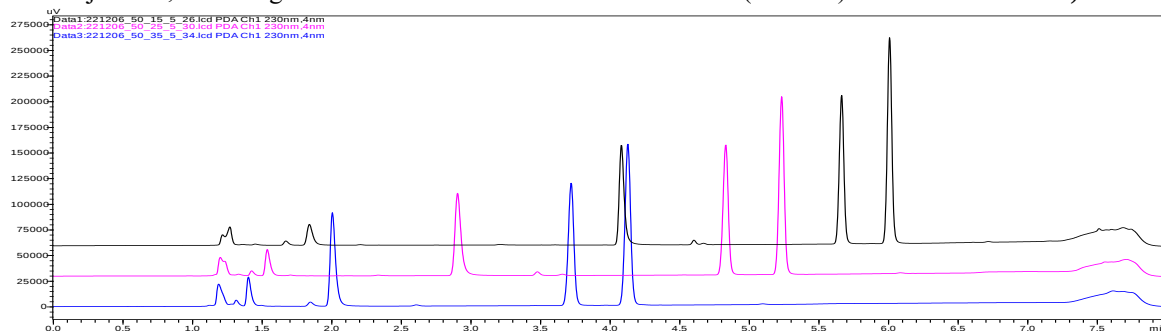
(forrás: saját ábra, felső kromatogram felvételek az eluensben acetonitril, az alsón metanol)



A szerves oldószer mennyiségével finomítani lehet az elválasztást. Elsősorban gradiens módszerek használatakor használjuk ki. Az időben egyre erősödő eluens használatával az egymástól eltérő kémiai szerkezetű komponensek egyenletes időközönként rövidebb idő alatt detektorba juttathatók, mint állandó eluens összetétel mellett. A kiindulási szerves tartalom változtatása elsősorban a kromatogram elején okoz változást, lásd 14 ábra. Ha a kromatogram végén szeretnénk egymástól eltávolítani ( $R_s$  növelése érdekében) a különböző komponenseket, akkor pedig a gradiens idő változtatásával tudunk hatást elérni (lásd 15. ábra)

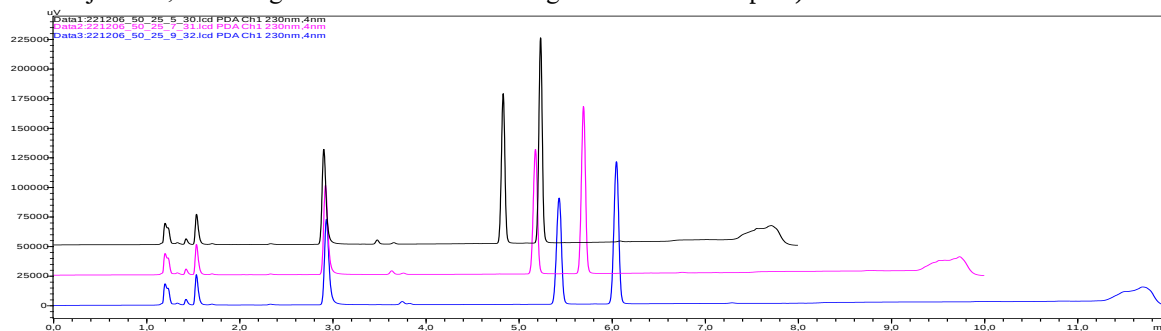
### 14. ábra Szerves módosító hatása az elválasztásra – kezdeti koncentráció változtatás

(forrás: saját ábra, kromatogramokon fentről lefelé a kiindulási szerves (metanol) tartalom 15-25-35%)



### 15. ábra Szerves módosító hatása az elválasztásra – gradiens idő változtatás

(forrás: saját ábra, kromatogramokon fentről lefelé a gradiens idő 5-7-9 perc)



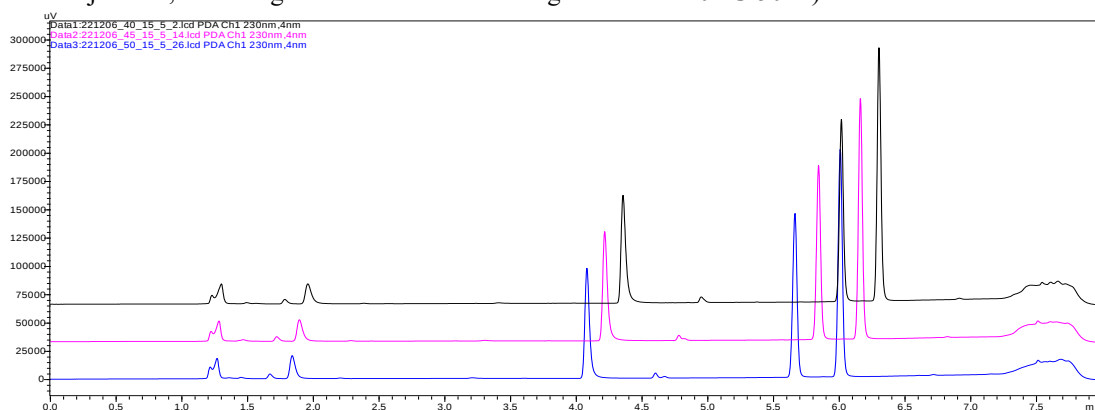
### 3.6.3. Hőmérséklet és egyéb hatások

#### *Hőmérséklet hatása*

A kolonna hőmérséklet változtatását a szelektivitásának módosítására, finomhangolására használhatjuk. Változtatásával a mozgófázis és az elválasztandó komponensek tulajdonságai is megváltoznak, kölcsönhatások erőssége változik, hőmérséklet emelésével csökken a mozgófázis viszkozitása ezért a diffúziós folyamatok felgyorsulnak, a komponensek ionizációs tulajdonsága változhat, valamint konformációs tulajdonságai is módosulhatnak. A hőmérséklet emelésével a visszatartás általában csökken (lásd 16. ábra), ennek bemutatására ugyancsak a korábbi 3 komponenst használtam. A kromatográfiás paraméterek a kolonnahőmérsékleten kívül azonosak voltak.

#### **16. ábra** Hőmérséklet hatása az elválasztásra

(forrás: saját ábra, kromatogramokon fentről lefelé a gradiens idő 40-45-50°C)



Hőmérséklet emelésével viszkozitást csökkentjük, tehát nagyobb térfogat-áramlási sebességgel is tudunk dolgozni, ezzel pedig jelentősen lecsökkenthetjük az elemzési időt. Módszerek egyik kritikus eleme, különösen magas kolonna hőmérsékletű vizsgálatoknál kritikus a készülék termosztát megbízhatósága, a mozgófázis megfelelő előmelegítése. A vizsgálandó komponens hőtűrésére ügyelni kell a hőmérséklet választásnál.

#### *Áramlási sebesség*

Áramlási sebességnek folyadékkromatográfiás rendszerekben optimuma van a hatékonyság szempontjából. Figyelembe kell venni a készülék adottságait (nyomás határ) és a választott kolonna fizikai paramétereit a nyomás miatt. Egyes detektorok alacsonyabb áramlási sebességgel tudnak nagyobb érzékenységgel dolgozni. Nitrózamin mérésekre használható TQMS detektor esetén az optimális áramlási sebesség 0,3-0,8 ml/perc között van. Célszerű lesz ebben a tartományban meghatározni a használt áramlási sebességet.

### 3.6.4. Szelektivitást befolyásoló fő tényezők összefoglalása:

- Kromatográfiás oszlop (állófázis minősége, geometria)
- Mozgófázis mennyiségi és minőségi összetétele (szerves oldószer)
- Mozgófázis összetétel változásának sebessége (gradiens meredekség és idő)
- pH
- Kolonnatér hőmérséklet.

Szelektivitás jellemző paramétere: a csúcsfelbontás ( $R_s$ ). A kromatográfiás rendszer felbontása jellemzi az elválasztás hatásosságát, és megadja, hogy milyen mértékben sikerült a két egymás után eluálódó komponenst két különálló sáv formájában elválasztani. Felbontás 3 összetevője:

- Visszatartás ( $k'$ ), ami megmutatja az egyes komponensek kölcsönhatását az állófázissal. A komponens az elválasztás során mennyi időt tartózkodik az állófázison viszonyítva a mozgófázisban eltöltött időhöz képest.
- Szelektivitás ( $\alpha$ ), ami két komponens elúciós különbségét mutatja meg.  $\alpha$  az a paraméter, mely megmutatja, hogy lehetséges-e egyáltalán az elválasztás
- Tányérszám ( $N$ ), hatékonyság jellemzője. Elméleti tányérnak nevezzük az oszlopnak azt a kis részét, ahol az elválasztandó anyagok a két fázis (álló - mozgó) között egyensúlyban vannak.

A 6. táblázatban foglaltam össze az egyes paraméterek hogyan befolyásolják a csúcsfelbontást, melyik összetevőre vannak hatással.

**6. táblázat:** Kromatográfiás paraméterek hatása a felbontásra

(forrás: saját táblázat)

| Paraméterek                                             | $k'$ | $\alpha$ | $N$ |
|---------------------------------------------------------|------|----------|-----|
| eluens szerves oldószer mennyisége                      | ++   | +        | -   |
| szerves oldószer minősége (acetonitril, alkoholok stb.) | +    | ++       | -   |
| kolonnatér hőmérséklet                                  | +    | +        | +   |
| oszlop típusa (C18, fenil, ciano, stb..)                | +    | ++       | -   |
| puffer koncentráció                                     | +    | +        | -   |
| ionpároképző reagens koncentrációja                     | ++   | ++       | +   |
| oszlop hossza                                           | 0    | 0        | ++  |
| oszlop szemcsemérete                                    | 0    | 0        | ++  |
| áramlási sebesség                                       | 0    | 0        | +   |
| rendszer nyomása                                        | -    | -        | +   |

++ jelentős hatás, + kisebb hatás, - kis hatás, 0 nincs hatás

### 3.6.5. Kísérletterv nitrózamin kromatográfiás módszerfejlesztéséhez

Manapság elvárás, hogy ne a tudományos alapon választott kiindulási paraméterek empirikus változtatásával fejlesszünk kromatográfiás módszert, hanem tervezzünk kísérletsorozatot. Majd annak értékelése alapján válasszuk ki a kromatográfiás paramétereket, amelyeket tovább optimalizálhatunk. Fő szabályok kísérlettervezéshez: A „feltérképezési” (screening) szakaszban történik meg az állófázis és oldószer kiválasztása. Ezt követi egy „optimalizálás” szakasz. Egyes paramétereket (faktorok) az alábbi értékek között javasolt vizsgálni:

- A hosszabb gradiens idő (tG) általában két-háromszorosa a rövidebbnek
- kolonna hőmérsékletek közötti különbség ( $\Delta T$ ) ne haladja meg a 30°C-ot
- eluens pH különbség ( $\Delta pH$ ) 0,5 – 1,0 legyen legfeljebb, célszerű 3 szinten vizsgálni
- Kiindulási szerves tartalom: 5-20%
- Végő szerves tartalom: 40 -95%.

Olyan kiinduló és végő eluens összetételt válasszunk, ahol a legkevésbé visszatartott komponensnek is van már visszatartása, illetve az összes komponens eluálódjon az összes kísérletben. A szerves módosító mennyiségének a hatása a fordított fázisú folyadék-kromatográfiában hatalmas. Legnagyobb a befolyása a szelektivitásra, illetve az egyes anyagok retenciójára. Amennyiben a vizsgálandó vegyületek valamelyike rendelkezik protonfunkciós csoporttal (savas vagy bázikus karakterrel), akkor a mozgófázis pH-ja is nagy jelentőséggel bír. Esetünkben a mátrix miatt lehet majd szükség pH kontrollra. A szelektivitás változtatása szempontjából jól ki tudjuk használni ezt a paramétert, hiszen, ha a protonfunkciós csoporttal rendelkező vizsgálandó anyag a retenciója pH-függő lesz. Ezáltal a szelektivitás ( $\alpha$ ) és a felbontás ( $R_s$ ) szabályozható, a pH-által pontosan beállítható lesz. Amennyiben egyik faktornak a pH-t választottuk célszerű az alacsonyabb és magasabb pH-n is elvégezni ugyanazokat a kísérleteket, mert a komponensek ionizáltsági viszonyai nagymértékben befolyásolják a retenciót. Előzetes kísérletek szerint úgy válasszuk meg a pH-t és a gradiens összetételét, hogy az összes komponens eluálódjon.

Ha kromatográfiásan semleges anyagokat vizsgálunk, mint pl. a nitrózaminok, akkor az előkísérletek során a pH helyett a szerves módosítóra kell helyeznünk a hangsúlyt. A megfelelő visszatartás feltétel teljesülését acetonitrilt tartalmazó rendszerben célszerű elvégezni, mivel az acetonitril erősebb eluens, mint az alkoholok, vagyis a komponensek korábban eluálódnak. Ugyanezen ok miatt a gradiens idejét és meredekségét etanolt tartalmazó rendszerben érdemes meghatározni, hogy az összes komponens eluálódjon a gradiens időn belül az összes kísérletben. Sok esetben a terner (3 komponensű) mozgófázis összetétel eltérő szelektivitást eredményez a folyadékkromatográfiában, mintha külön-külön alkalmaznánk a módosítókat.

### 3.7. Robusztusságvizsgálat (példa)

Példának választott optimált módszerben az alábbi paramétereket találtuk kritikusnak, ezért a robusztusság vizsgálatot ezekre a paraméterekre végeztük el: kolonnatér hőmérséklet, mozgó fázis szerves aránya és a pH. Optimálisnak talált értékek: 44°C; 50-50% acetonitril (ACN)-etanol; pH= 8,0. A változások hatását  $2^3$  típusú kísérleti tervvel (teljes terv, 8 kísérlet, egy centrum ponttal, ami az optimalizált érték) vizsgáltuk. (lásd 7.táblázat)

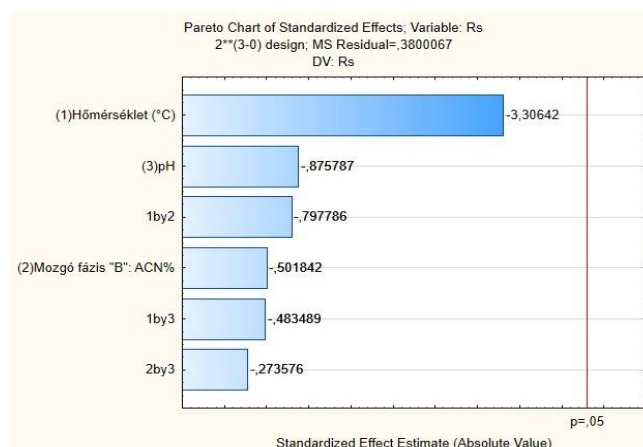
**7. táblázat:** Kísérleti terv példa robusztusság vizsgálatához (példa)  
(forrás: saját táblázat)

| #           | Kolonnatér hőmérséklet (°C) | Mozgó fázis szerves arány: Acetonitril/Etanol (V/V) | mozgófázis pH |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------|---------------|
| 1           | 42                          | 55:45                                               | 7,8           |
| 2           | 42                          | 45:55                                               | 7,8           |
| 3           | 46                          | 55:45                                               | 7,8           |
| 4           | 46                          | 45:55                                               | 7,8           |
| 5           | 42                          | 55:45                                               | 8,2           |
| 6           | 42                          | 45:55                                               | 8,2           |
| 7           | 46                          | 55:45                                               | 8,2           |
| 8           | 46                          | 45:55                                               | 8,2           |
| 9 (Centrum) | 44                          | 50:50                                               | 8,0           |

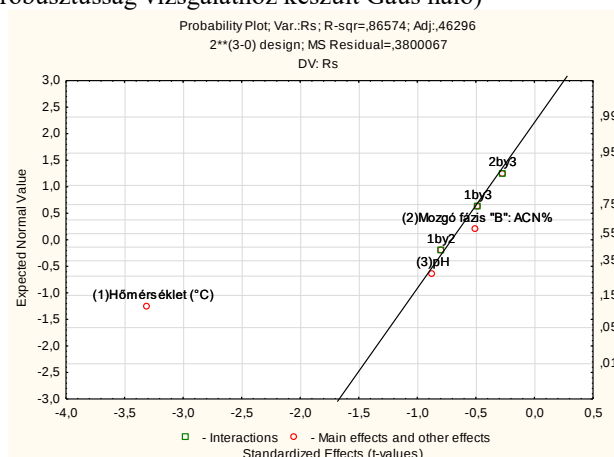
A mérési adatokat statisztikai módszerekkel elemezzük. Pl.:

- Pareto Diagramon ábrázoljuk (17. ábra)
- Gaus-hálón jelenítjük meg (18. ábra)
- ANOVA táblázattal értékeljük (8. táblázat)

**17. ábra** Robusztusság vizsgálat eredménye Pareto-diagramon ábrázolva (példa)  
(forrás: saját ábra, korábbi robusztusság vizsgálat Pareto diagramja, kritikus paraméterek hatása a felbontásra (Rs))



**18. ábra** Változó hatások ábrázolása Gaus hálón ábrázolva (példa)  
(forrás: saját ábra, korábbi robusztusság vizsgálathoz készült Gaus háló)



**8. táblázat:** ANOVA táblázat (példa robusztusság értékeléshez)  
(forrás: saját táblázat)

|                                  | SS       | df | MS       | F        | p        |
|----------------------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| <b>(1) Hőmérséklet (°C)</b>      | 4,154403 | 1  | 4,154403 | 10,93245 | 0,080571 |
| <b>(2) Mozgó fázis "B": ACN%</b> | 0,095703 | 1  | 0,095703 | 0,25185  | 0,665576 |
| <b>(3) pH</b>                    | 0,291466 | 1  | 0,291466 | 0,76700  | 0,473506 |
| <b>1 by 2</b>                    | 0,241860 | 1  | 0,241860 | 0,63646  | 0,508667 |
| <b>1 by 3</b>                    | 0,088831 | 1  | 0,088831 | 0,23376  | 0,676504 |
| <b>2 by 3</b>                    | 0,028441 | 1  | 0,028441 | 0,07484  | 0,810074 |
| <b>Error</b>                     | 0,760013 | 2  | 0,380007 |          |          |
| <b>Total SS</b>                  | 5,660718 | 8  |          |          |          |

A fenti példában például a módszer a statisztikai adatok alapján nem szignifikánsan, de érzékeny a hőmérséklet változtatására. Már 2°C eltérés is hatással lehet a mérési eredményekre, bár szignifikáns hatást 95%-os választott konfidenciaszinten nem okoz. Ilyen esetben meg kell győződni, hogy a mérő berendezés képes a kolonnatér hőmérsékletét 2°C -os biztonsággal pontosan és precízen tartani. Tehát a beállított érték megfelel a valódi hőmérséklet értéknek, és nem ingadozik mérés során a hőmérséklet 2°C-nál nagyobb mértékben. Ugyanígy kell eljárni minden kritikusnak talált paraméter esetén. Megvizsgálni azt a tartományt, amelyen belül robusztus a rendszer, és ellenőrizni kell a kvalifikálást, hogy ennek megfelelnek az egyes készülék egységek. Magas kockázatú paraméter lehet még az áramlási sebesség, vagy a szerves koncentráció a mozgó fázisban. Ilyenkor pl. a pumpa szállítás kvalifikációját kell ellenőrizni, hogy a készülék teljesítménye megfeleljen az analitikai elvárásoknak az adott módszernél. További magas kockázatú paraméterek még a pH pontossága, a detektor paraméterek beállításai vagy az injektálás pontossága is.

### 3.8. Rendszeralkalmasság ellenőrzése, kontroll stratégia

HPLC mérések során a rendszeralkalmasság vizsgálat elsősorban az érzékenység és szelektivitás igazolására szolgál. A példának választott nitrozamin vizsgálati módszerben az elválasztás vagy a szelektivitás a szelektív MS detektálási mód miatt nem lesz kritikus, ha sikerül olyan módszert fejleszteni, hogy a vizsgált komponensek jelentős retenció idő különbséggel jutnak a detektorba, és a mátrixból sem lesz zavaró komponens a környezetükben. Más esetben magas kockázatú paraméter lesz. Szennyező vizsgálati módszereknél az érzékenységét ellenőrizni kell, vagyis a detektálhatóságot a jel/zaj viszony érték meghatározásával. Általában ellenőrizni kell a rendszer precizitást, kellő számú párhuzamos injektálás terület adataiból számolt RSD% értékkel. Célszerű a kolonna hatékonyságot (elméleti tányérszám) is ellenőrizni. A tervezett folyadékkromatográfiás szennyezőanyag vizsgálatnál lehetséges kontroll stratégia a következő lehet:

#### *Szelektivitás követelménye*

- Ismert szennyezővel addicionált oldatban egyértelmű csúcsazonosítás.

#### *Rendszerérzékenység követelménye*

- A vak oldatban ne legyen detektálható jel a vizsgált komponens retenció idejénél.
- Jel/Zaj viszony:  $S/N \geq 3$  (vizsgált komponens csúcsra detektorérzékenység ellenőrző oldatban).

#### *Rendszerprecizitás követelménye*

- $RSD\% \leq 10,0 \%$  (vizsgált komponens csúcsterületre a standard oldatokban)
- $RSD\% \leq 1 \%$  (vizsgált komponens csúcs retenció idejére).

#### *Kolonna hatékonyság követelménye*

- Elméleti tányérszám (N):  $N \geq 2000$  vizsgált komponens csúcsra (standard oldatban).

## 4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A tervezett minőség koncepció bemutatására analitikai módszerfejlesztések során az alábbi példa feladatot választottam: feldolgozott húskészítmények nitrózamin tartalmának meghatározására alkalmas mérési módszer, amellyel 26 ng/nap határérték rutin ellenőrzését lehet megvalósítani.

Nitrózaminok ilyen kis koncentrációban történő vizsgálatára az irodalmi adatok alapján ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) módszert kell fejleszteni speciális tömeg detektálással (TQ-MS APCI ionforrás). A mintaelőkészítés gyorsítása miatt célszerű a QuEChERS technikát választani. Már a mintaelőkészítési eljárás kidolgozása során igyekszünk fizikailag a lehető legtöbb zavaró mátrix komponenstől megszabadulni, de figyelembe véve a nitrózaminok kémiai szerkezetét, oldhatóságát, polarizáltságát, a választott példánkban nem tudunk mátrixmentes vizsgálandó oldatot előállítani. Ezért célszerű lesz a mérőberendezést váltószeleppel felszerelni, hogy a kromatográfiás módszerrel majd elválasztott túlnyomó többségben jelen levő élelmi anyag komponenseket (mátrix anyagokat) ne juttassuk a detektor ionforrásba, megakadályozva annak korai elszennyeződését.

Nyomnyi mennyiségű szennyezők kimutatására alkalmas analitikai módszer célkitűzése: legyen szelektív, torzítatlan és precíz a mérési tartományban. Legyen robusztus a mintaelőkészítésre és analitikai mérésre egyaránt.

Az analitikai feladat példánkban nagyban meghatározza a szükséges technikai felszereltséget. Nitrózaminok vizsgálatához a készüléknek speciális tulajdonságokkal kell rendelkeznie, a felhasználó igények az analitikai készülék választásnál háttérbe szorulnak. Olyan szempontokat kell figyelembe venni, hogy ha új készüléket kell erre a vizsgálatra beszerezni, akkor az illeszkedjék az eddig is használt készülékparkba; a szoftver ismerős legyen; a személyzet képes legyen használni. Az oldatstabilitás és mérési idő szempontok lesznek a módszerfejlesztés során, hogy a későbbi rutin munka szervezése könnyebb legyen a felhasználóknak.

Nitrózaminok HPLC vizsgálatához kockázatosnak ítélt tényezők: anyagok és eszközök, HPLC készülék, munkaerő, kromatográfiás módszer és a mintaelőkészítés.

Az FMEA értékelés alapján magas kockázatúnak ítélt paraméterek a tervezett kromatográfiás módszerben: az *állófázis -és mozgófázis* választás, *oldószer gradiens és hőmérséklet*. A HPLC készülék tekintetében a *detektor beállítás* és az *injektálás* magas kockázatú, a mintaelőkészítés során pedig a *mátrix hatásra* kell gondosan ügyelni a magas kockázat miatt. A humán kockázatok közül a *komponens azonosítását* találtam magas kockázatú paraméternek.

Állófázisnak irodalmi adatokból kiindulva C18 fázist választunk, megbízható gyártótól (pl. Shimadzu), lehetőleg ismert kolonnatípust, amelynek sarzsról sarzsa való reprodukálhatósága megfelelő. Ha kis koncentrációjú szennyezőket kell meghatározni bonyolult mátrixban, mint esetünkben, akkor tapasztalatok alapján a porózus, nagyobb szemcseméretű töltetek használata indokolt. Ha találunk releváns applikációt, az abban leírt kolonnát is választhatjuk kiindulási alapnak. Az állófázis magas kockázatának csökkentéséhez több kolonnán teszteljük a módszert. Amelyiken a legjobbnak találjuk a kritikus módszer paramétereit ( $R_s$ ,  $N$ , DAH) azt a kolonnát választjuk majd a rutin vizsgálatokhoz.

Mozgófázis választásnál szempont a vizsgálandó komponens anyagi minősége, polaritása. Nitrózaminok vízben oldható poláros kismolekulák, fordított fázisú kromatográfiás oldószerek közül kell választani. Ha a készülékünk nyomáshatára megengedi etanollal kezdjük a fejlesztést, törekedve a zöld analitika irányába.

Nitrózamin mennyiségének meghatározáshoz a módszerfejlesztést irodalomban talált adatok alapján az alábbi kiindulási paraméterekkel célszerű elkezdni (9. táblázat):

**9. táblázat:** Kiindulási kromatográfiás paraméterek nitrózamin vizsgálatához  
(forrás: saját táblázat)

|                       |                                                        |                  |                  |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| Készülék:             | HPLC - MS TQ (Pl: Nexera XS+LCMS-8060)                 |                  |                  |
| Oszlop                | Shimadzu, Shim-pack GIST-AQ, C18, 100x4,6mm, 3 $\mu$ m |                  |                  |
| Oszloptér hőmérséklet | 40°C                                                   |                  |                  |
| Mozgófázis A          | 1000 ml víz + 1,0 ml hangyasav                         |                  |                  |
| Mozgófázis B          | 1000 ml etanol + 1,0 ml hangyasav                      |                  |                  |
| Áramlási sebesség     | 0,7 ml/perc                                            |                  |                  |
| Gradiensprofil        | Idő [perc]                                             | Mozgófázis A (%) | Mozgófázis B (%) |
|                       | 0                                                      | 10               | 90               |
|                       | 12                                                     | 90               | 10               |
| Analízis idő          | 16 perc                                                |                  |                  |
| Injektált térfogat    | 10 $\mu$ L                                             |                  |                  |
| Detektálás            | MS APCI pozitív ionizáció                              |                  |                  |

Magas kockázatúnak értékelt további paraméterek (mérési idő – kolonna hőmérséklet – eluens összetétel) optimalizálásra kísérlettervet készítünk (példa) a 10. táblázatban:

**10. táblázat:** Kísérletterv nitrózamin vizsgálatához  
(forrás: saját táblázat)

| faktor                              | érték  |        |      |
|-------------------------------------|--------|--------|------|
| mérési idő: tG (perc)               | tG 1   | tG 2   |      |
| Gradiens meredekség: 10-75%         | 10perc | 30perc |      |
| T (°C)                              | T 1    | T 2    |      |
| kolonna hőmérséklet                 | 30°C   | 60°C   |      |
| eluens összetétel: tC% [B2 a B1ben] | tC 1%  | tC2%   | tC3% |
| B1: acetonitril; B2: etanol         | 0%     | 50%    | 100% |

Az optimált módszer robusztusságát is ugyanezekre a paraméterekre kell majd vizsgálni. Ezáltal a magas kockázatok csökkenthetők lesznek. Kísérletterv mérései során a mintatáblában érdemes egy kísérleti ponton több oldatot is injektálni a könnyebb azonosításhoz: pl. oldószer, vak, ismert egyedi komponensek, vagy olyan arányban és mennyiségben, hogy egyértelműen azonosítható legyen, mátrix, mintaoldat, addicionált oldat.

A HPLC készülék tényező magas kockázatúnak talált paramétereinek (detektor beállítás és injektálás) kockázat csökkentéséhez ellenőriznünk kell, hogy a készülék milyen mértékben képes ezen paramétereket beállítani és megtartani, mekkora ingadozások fordulhatnak elő. Ezeket a paramétereket a készülék kvalifikálásnál különös tekintettel ellenőrizni kell. Ugyancsak figyelemmel kell kísérni a kromatográfiás módszernél kritikusnak ítélt, de készülékkel összefüggő paramétereket, pl. kolonna hőmérséklet.

Mintaelőkészítés során magas kockázatú paraméter a mátrix hatás. Fejlesztés alatt az elérhető legtöbb féle mátrix anyagra, feltételezhető mátrix komponensre tesztelni kell a módszert szelektivitás és specifikusság miatt.

Munkaerő kockázatelemzése során magas kockázatúnak értékelt paraméter: csúcsazonosítás, ezért a kontroll stratégiában ki kell dolgozni a megbízható és egyértelmű csúcsazonosításhoz is egy ellenőrzési pontot.

Az optimálisnak talált paraméterekkel leírt és beállított módszerre végezzünk majd robusztusság vizsgálatot. Ezzel meghatározzuk milyen apró változtatásokat bír el az analitikai rendszer a mérési eredmény szignifikáns változtatása nélkül. A robusztusság eredményeit figyelembe véve dolgozzuk ki a végső rendszeralkalmassági stratégiát. Ha minden kitűzött analitikai célt teljesít a fejlesztett módszer, készítsünk validálási tervet és validáljuk a módszerünket. Amennyiben a validálási tervben leírt követelményeknek megfelel, használjuk rutin mérésre.

Folyamatosan monitorozzuk és rendszeres időnként vizsgáljuk felül a vizsgálati módszert, figyelembe véve, hogy időközben milyen új szakirodalomban leírt lehetőségek, applikációk, technikai fejlesztések állnak rendelkezésre.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A jelenleg használt analitikai eljárások jelentős része technikai, hatékonysági vagy környezeti aggályokkal jár, ezért folyamatos felülvizsgálatuk, fejlesztésük szükséges. Ennek eredményeként új trendek fejlődtek ki az analitikában: a tervezett minőség (AQbD) és a zöld analitikai kémia (GAC) koncepciók. Céljuk, hogy növeljék az analitikai módszerek hatékonyságát, teljesítőképességét, robusztusságát és fenntarthatóságát. Az AQbD átfogó módszerfejlesztést biztosít; tervezett, folyamatszempléletű és hatékony. A módszerfejlesztés szisztematikus megközelítése növeli az analitikai biztonságot és elmélyíti az analitikai módszerek megértését. Robusztus, alacsony kockázatú analitikai módszerek fejleszthetők. Hatékonyság jellemzi a felderítés, az optimalizálás és a robusztusságvizsgálat minden egyes fázisában. Az eredmények értékelése statisztikai módszerekkel objektivitást biztosít. A vegyészek világszerte kompromisszumot keresnek az alkalmas, érzékeny és szelektív analitikai eljárások kidolgozása és az ökológiai- és energiahatékony vizsgálati módszerek között. Mivel megbízható, robusztus és fenntartható analitikai eljárásokra van szükség, a minőségtervezés és a környezettudatosság fontos szempontok a módszerfejlesztésben. Miközben garantáljuk az eredményeket, minimalizáljuk a környezetterhelő hatásokat.

A nitrózaminok jelenléte a környezetben és különösen a magas nitrit- és amintartalmú élelmiszerekben potenciális veszélyt jelent az emberre, ezért szükséges lenne átfogó vizsgálatuk. Rákkeltő hatásuk miatt a cél az élelmiszerek nitrózamin szintjének minél alacsonyabbra szorítása. Ennek dokumentált igazolásához szükséges a nitrózaminok megfelelően kis koncentrációban való kimutathatósága és vizsgálata élelmiszerekből. Jelenleg nincs hatósági előírás vizsgálatukra, tudományos kutatásokban foglalkoznak mérési lehetőségeivel élelmiszerekben. A gyógyszeriparban már bevezetett követelmény a nitrózaminok vizsgálata annak ellenére, hogy a napi bevitel lényegesen kevesebb az egyes gyógyszerekből, mint a nitrózamin tartalomra kockázatos élelmiszerekből (pl. feldolgozott húskészítmények). További analitikai módszerfejlesztések lesznek szükségesek ahhoz, hogy a nitrózaminok egészségre már veszélyes, de nagyon alacsony kimutatási koncentrációban a humán élelmiszerekből rutinszerűen mérhetőek legyenek. Ma már elérhetőek olyan analitikai műszerek, amelyekkel a feladat - ha aktuális lesz - kivitelezhető. Rendelkezésre állnak szoftverek, amelyek segítségével a módszerfejlesztés gyors, akkurátus és hatékony. A mintaelőkészítési technikák is rohamosan fejlődnek párhuzamosan a műszerezettséggel. Célszerű a modern, előre gyártott kit-ekkel történő, standardizálható eljárásokat előnyben részesíteni a megbízható eredmények érdekében.

Analitikai fejlesztésben is használjuk a technológiában már bevezetett tervezett minőség (QbD) technikát. Ennek lépéseit ültessük át az analitikai fejlesztési munkánkba. Tehát a hozzáférhető ismeretek összegyűjtése után, a pontos analitikai cél megfogalmazásával kezdjük a módszerfejlesztést. Majd válasszuk ki a feladathoz alkalmas analitikai technikát, eszközt, mérjük fel a felhasználói igényeket. A választott technika ismeretében határozzuk meg a módszer kritikus paramétereit, azokat a módszer jellemzőket, amelyek kockázatosak lehetnek az eredménymegadás szempontjából. Végezzünk kockázatbecslést, és rangsoroljuk a felismert kockázatokat. Fejlesztési munka során törekedjünk a magas kockázatú paramétereket kézben tartani, és olyan módszereket kidolgozni, hogy alacsony kockázatúvá váljanak, ne veszélyeztessék az eredménymegadást, ezáltal az élelmiszerbiztonságot. Analitikai fejlesztésekben is használjuk ki a kísérlettervezési technika lehetőségeit, az eredmények gyorsabb és objektív feldolgozásához. Miután a magas kockázatú paramétereket kézben tudjuk tartani, kezdjük finomhangolni a felülvizsgálatok során a módszerünket az alacsonyabb kockázatú paraméterek optimalásával, így tökéletesítve azt. Figyeljük a készülék és mintaelőkészítéshez szükséges anyagok gyártóinak applikációit, és kihasználva a technikai vívmányokat tudatosan fejlesszük analitikai módszereinket, figyelve környezetünk megóvására is. A végső módszerre végezzünk robusztusság vizsgálatot, hogy meghatározzuk milyen apró változtatásokat bír az analitikai rendszer az eredmény torzítása nélkül. Ehhez mindig ellenőrizzük az analitikai mérő berendezések műszaki állapotát, kvalifikációs státuszát. A kockázatosnak ítélt mintaelőkészítési és analitikai paraméterekre dolgozzunk ki rendszeralkalmassági stratégiát, amit folyamatosan vizsgálunk felül.

A kitűzött analitikai feladatra alkalmasnak ítélt módszert validáljuk. Majd a rutin mérések során folyamatosan monitorozzuk és rendszeres időnként vizsgáljuk felül, figyelembe véve a köztes időszak technikai és elméleti vívmányait. Módszer felülvizsgálatnál szempont a teljesítőképesség, hatékonyság, környezet terhelés. Szükség esetén fejlesszük tovább vagy újra a vizsgálati módszereket. Abban az esetben, amikor változás történik a működésében vagy a vizsgálati módszerben ismételt validálással kell bizonyítani, hogy a laboratórium képes az adott analitikai feladat megbízható elvégzésére.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Anastas, P. T. és Warner, J. C. (1998); *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford,
- Armenta, S. Garrigues, M. (2008); *Trends in Analytical Chemistry*; Volume 27, Issue 6, , Pages 497-511
- Barta, K.; Csékei, M.; Csihony, S.; Mehdi, H.; Horváth, I. T.; Pusztai, Z.; Vlád, G. (2000); *A zöld kémia tizenkét alapelve*, Magyar Kémikusok Lapja, 55, 173.
- Berényi L.; (2011); *Minőségügy alapjai*; Miskolci Egyetem, Vezetéstudományi Intézet; <http://www.szervez.uni-miskolc.hu/blaci/minmen/index.html>.
- Chang, S. H., Chang, C. C., Wang, L. J., Chen, W. C., Fan, S. Y., Zang, C. Z., Hsu, Y. H., Lin, M. C., Tseng, S. H., & Wang, D. Y. (2020); *A multi-analyte lc-ms/ms method for screening and quantification of nitrosamines in sartans*. Journal of Food and Drug Analysis, 28(2), 292–301.;<https://doi.org/10.38212/2224-6614.1063>
- Demeter K.; (2016); *Termelés, szolgáltatás, logisztika; 12. fejezet: Minőségmenedzsment*; Wolters Kluwer Kft.; <https://mersz.hu/kiadvany/88/info/>.
- Demeter K., Gelei A., Matyusz Zs., Nagy J.; (2022); *Tevékenység-menedzsment*; Akadémiai Kiadó; <https://mersz.hu/kiadvany/934/info/>.
- DryLab (2023). <https://molnar-institute.com/drylab/>.
- EFSA Journal (2008) 689., 1. o. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/689.pdf>
- EFSA Journal (2010); 8(12):1935.doi:10.2903/j.efsa.2010.1935. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1935.pdf>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel), (2023); *Risk assessment of N-nitrosamines in food*; <https://doi.org/10.2903%2Fj.efsa.2023.7884>
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food) , 2017. *Scientific Opinion on the re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives*. EFSA Journal 15(6):4786, 157 pp. 10.2903/j.efsa.2017.4786
- Görög S., Horváth I. T. (2002), Magyar Tudomány, Kémia 1585. o.
- Gray JI, Irvine DM and Kakuda Y, (1979.) *Nitrates and N-Nitrosamines in Cheese*. Journal of Food Protection, 42, 263–272.
- Green Analytical Chemistry | Journal | ScienceDirect.com by Elsevier (N.a.). <https://www.sciencedirect.com/journal/green-analytical-chemistry>.

- Gülsüm Deveci, Nilüfer Acar Tek; (2023); *N-Nitrosamines: a potential hazard in processed meat products* Journal of the Science of Food and Agriculture;
- Herrmann SS, Duedahl-Olesen L and Granby K, (2014). *Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation*. Journal of Chromatography A, 1330, 20–29.
- Hitanshi Darji, Zarna Dedania; (2023) *Simultaneous estimation of Azelnidipine and Metoprolol succinate with greenness assessment using HPLC and UV-spectrophotometric methods*, Green Analytical Chemistry, Volume 7,
- Horváth G. (2020): *Élelmész-egészség-tan I.* Budapest, Akadémiai Kiadó, 4.1.2 fejezet
- ICH HARMONISED GUIDELINE, Q14; (2022); *Analytical procedure development*
- Jong-eun Park, Jung-eun Seo, Jee-yeon Lee & Hoonjeong Kwon (2015): *Distribution of Seven N-Nitrosamines in Food*, Toxicological Research volume 31, pages 279–288, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4609975/>
- J. M. Juran; (1992); *Juran on Quality by Design: The New Steps for Planning Quality into Goods and Services*,
- D. Kocak, M.Z. Ozel, F. Gogus, J.F. Hamilton, A.C. Lewis (2012) *Determination of volatile nitrosamines in grilled lamb and vegetables using comprehensive gas chromatography – Nitrogen chemiluminescence detection*, Food Chemistry, Volume 135, Issue 4, 15, Pages 2215-2220
- Kovács Z.; (2017); *A Termelő és szolgáltató rendszerek fejlesztésének főbb irányai*; Akadémiai Kiadó; <https://mersz.hu/kiadvany/256/info/>.
- Kubacki SJ, Havery DC and Fazio T, (1989). *Volatile N-nitrosamines in Polish malt and beer*. Food Additives and Contaminants, 6, 29–33.
- Lehotay, Sapozhnikova, Han, Johnston (2015): *Analysis of Nitrosamines in Cooked Bacon by QuEChERS Sample Preparation and Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with Backflushing*, J. Agric. Food Chem. 63, 47, 10341–10351
- Lloyd R. Snyder Joseph J. Kirkland Joseph L. Glajch; (1988), *Practical HPLC Method Development*;
- Michel Y. Faresa, Maha A. Hegazyb, Ghada M. El-Sayed, Maha M. Abdelrahman, Nada S. Abdelwahab (2022); *Quality by design approach for green HPLC method development for simultaneous analysis of two thalassemia drugs in biological fluid with pharmacokinetic study*, Royal society of Chemistry, 13896-13916

- Most W. Wojciech W. - Science profile - *Bridge of Knowledge*. - Your Knowledge Portal.  
<https://mostwiedzy.pl/AGREE>
- MSZ EN ISO 22000:2018; *Élelmiszer-biztonsági irányítási rendszerek szabvány*
- MSZ EN ISO/IEC 17025:2018; *Vizsgáló- és kalibrálólaboratóriumok felkészültségének általános követelményei*
- Nitrozo-vegyületek (nitrózaminok) | kockazatos.hu (no date).  
<https://kockazatos.hu/anyag/nitrozo-veg%C3%BCletek-nitr%C3%B3zaminok>.
- Park JE, Seo JE, Lee JY and Kwon H, (2015). Distribution of seven N-nitrosamines in food. *Toxicology Research*, 31, 9–288
- Pedersen E and Meyland I, (1981). Nitrate, nitrite, and volatile nitrosamines in pickled fish prepared with addition of nitrate. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* 173, 359–361.
- Rikker T.; (2013); *Kontrol kártyák használata a laboratóriumi gyakorlatban*; Wessling Közhasznú Nonprofit Kft.; <https://docplayer.hu/3319947-Kontrol-kartyak-hasznalata-a-laboratoriumi-gyakorlatban.html>
- Ripollés, C., Pitarch, E., Sancho, J. V., López, F. J., & Hernández, F. (2011) *Determination of eight nitrosamines in water at the ngL-1 levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 702(1), 62–71.
- Seema S., Priya S., Vinod J., and Rajeshwari R.; (2018) *Green Analytical Chemistry and Quality by Design: A Combined approach towards Robust and Sustainable Modern Analysis*, *Current Analytical Chemistry*, Volume 14, Issue 4,
- Szabó-Ecsedi A., Tonka-Nagy P., Horváth L.; (2017); *Az analitikai QbD alkalmazása a módszerfejlesztésben*. *Kromatográfus*;
- Szigeti T. (2010) *Nitrát- és nitrit-vegyületek jelentősége az élelmiszerekben* *Élelmiszervizsgáló Közlemények*, 56, 2010/4
- Tölgyesi, Á. Gyakorlati példák a folyadékkromatográfiával kapcsolt hármass kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometria élelmiszer-, bio- és textilanalitikai alkalmazására; 2021.
- Tupe, D., R., Suryawanshi, N., R., Kelkar, J., Rasam, P. & Shimadzu Analytical (India) Pvt. Ltd. (2018). *Quantitation of 8 Nitrosamines in 12 different solvents by LC-MS/MS system*. In Application News.;  
[https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim\\_document\\_file/applications/application\\_note/22015/an\\_06-Saip-081-LC-040-en.pdf](https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/22015/an_06-Saip-081-LC-040-en.pdf)

U.S. Department of Agriculture (2009), Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, *Analysis of Nitrosamines using Supercritical Fluid Extraction* CLG-NTR3.01

U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmaceutical Quality/ Manufacturing Standards/Current Good Manufacturing Practice (CGMP) (2021), *Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs Guidance for Industry*

# TÁBLÁZATOK, ÁBRÁK JEGYZÉKE

## Táblázatok:

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. táblázat: Néhány zöldségféle nitrát-tartalma .....                             | 11 |
| 2. táblázat: Detektor típusok detektálási alsó határa és specifikusságuk .....    | 19 |
| 3. táblázat: Fordított fázisú HPLC módszerfejlesztés kiindulási paraméterei ..... | 24 |
| 4. táblázat: Folyadékkromatográfiás technikák .....                               | 34 |
| 5. táblázat: Leggyakoribb állófázis töltet típusok .....                          | 38 |
| 6. táblázat: Kromatográfiás paraméterek hatása a felbontásra.....                 | 45 |
| 7. táblázat: Kísérleti terv példa robusztusság vizsgálathoz (példa) .....         | 47 |
| 8. táblázat: ANOVA táblázat (példa robusztusság értékeléshez) .....               | 48 |
| 9. táblázat: Kiindulási kromatográfiás paraméterek nitrózamin vizsgálathoz .....  | 51 |
| 10. táblázat: Kísérletterv nitrózamin vizsgálathoz .....                          | 51 |

## Ábrák:

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. ábra: Analitikai módszerfejlesztés QbD szerint.....                                                                                                      | 5  |
| 2. ábra: Nitrózaminok általános képlete.....                                                                                                                | 10 |
| 3. ábra: Nitrózaminok keletkezése .....                                                                                                                     | 10 |
| 4. ábra A zöld analitikai kémia (GAC) elveinek és a tervezett analitikai minőség (AQbD) lépéseinek integrálása a fenntartható analitikai módszerekhez. .... | 13 |
| 5. ábra Detektor válaszjel a koncentráció függvényében.....                                                                                                 | 18 |
| 6. ábra Folyadékkromatográfiás elválasztás sémája .....                                                                                                     | 23 |
| 7. ábra Kísérletterv értékelése kromatográfiás fejlesztő/optimalizáló szoftverrel .....                                                                     | 25 |
| 8. ábra Döntés a validált státuszról .....                                                                                                                  | 29 |
| 9. ábra Kontroll kártya .....                                                                                                                               | 30 |
| 10. ábra Ishikawa diagramm HPLC módszerfejlesztés kezdeti kockázatbecsléshez (példa) .                                                                      | 37 |
| 11. ábra Állófázis változtatás hatása a retenciós időre.....                                                                                                | 39 |
| 12. ábra pH hatása a retenciós időre.....                                                                                                                   | 41 |
| 13. ábra Szerves oldószer váltás az eluensben hatása az elválasztásra .....                                                                                 | 43 |
| 14. ábra Szerves módosító hatása az elválasztásra – kezdeti koncentráció változtatás .....                                                                  | 43 |
| 15. ábra Szerves módosító hatása az elválasztásra – gradiens idő változtatás.....                                                                           | 43 |
| 16. ábra Hőmérséklet hatása az elválasztásra.....                                                                                                           | 44 |
| 17. ábra Robusztusság vizsgálat eredménye Pareto-diagramon ábrázolva (példa).....                                                                           | 47 |
| 18. ábra Változó hatások ábrázolása Gaus hálón ábrázolva (példa) .....                                                                                      | 48 |

# MELLÉKLETEK

## 1. melléklet

Korábbi nitrózamin tartalom mérési eredmények különféle élelmiszerekben:

- *Sör nitrózamin tartalma*

A sörben az NDMA jelenléte két féle amin (hordenin és dimetil-amin) csírázott árpában való előfordulásának köszönhető (Kubacki, 1989). A malátázási folyamat során ez a két prekursor reakcióba léphet és NDMA-t képez. A víz is az NDMA potenciális forrása lehet a sörben és más italokban. Mérhető mennyisége: 0,1-0,3 µg/l.

- *Tejtermékek*

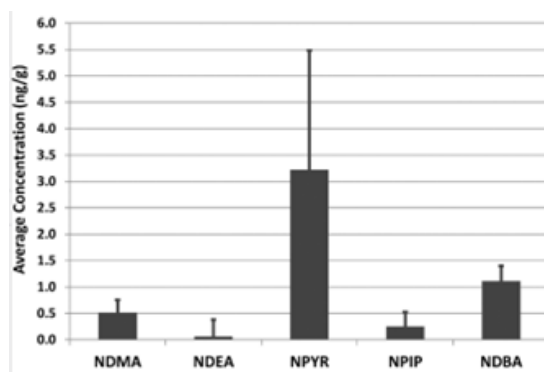
Alifás nitrózaminok (NDMA, NDEA, NDPA és NDBA) főként sajtokban és tejből származó termékekben találhatók (Gray, 1979). A nitrátalapú adalékanyagokat a jelenlegi európai jogszabályok engedélyezik a sajtgyártásban, legfeljebb 150 mg/kg koncentrációban a kemény, félkemény és félpuhára érlelt sajtban és rokon savósajtban, az érlelés közbeni puffadás megelőzése érdekében. Mivel ezekben a termékekben, különösen az érlelt sajtokban nagy mennyiségben állnak rendelkezésre másodlagos és terciér aminok, lehetséges nitrózaminok képződése, különösen, ha nátrium- vagy kálium-nitrátot adnak a tejhez.

- *Bacon szalonna*

Lehotay és munkatársai 48 bacon szalonna mintában mértek nitrózaminokat. Szisztematikusan kisebb értékeket mértek a mikrohullámú sütőben sült, mint a serpenyőben pirított szalonnák vizsgálatakor. Nitrozo-pirrolidint (NPYR) detektáltak legnagyobb mennyiségben (lásd 1.melléklet/1. ábra).

2.melléklet/1. ábra: Nitrózaminok mennyisége bacon szalonnában

(forrás: Lehotay, 2015)



- *Feldolgozott halkészítmények*

A halak bővelkednek másodlagos és harmadlagos aminokban, és nitrit/nitrát lehet jelen a pácolás során használt sóban (Pedersen, 1981). Ezek a tényezők a lehetséges mikrobiális szennyeződéssel együtt nitrózaminok (főként NDMA) képződéséhez vezethetnek akár 388 µg/kg szinten.

- *Sonka készítmények*

NÉBIH honlapján elérhető nitrózamin eredmények különféle sonkakészítményekben (minden vizsgált sonkaféleségben, mindhárom vizsgált nitrózaminra (NDEA, NDMA, NPYR) kisebb, mint 10 µg/kg érték. Feltehetőleg a vizsgálati módszer kimutatási határa 10 µg/kg, ezért nem írnak le pontosabb mennyiséget ezekről a készítményekről. NAH nyilvántartott módszerének nitrózamin vizsgálatokra állati eredetű élelmiszerekben, pl. sonkakészítményekben (OÉVI V.M. RTN/28/1995) az USDA CLG-NTR3.01 jelű módszerét találtam, amely egy GC-MS analitikai módszer, szuperkritikus extrakciós mintaelőkészítéssel. Detektálási határa (LOD): 0,3 µg/kg, illetve mennyiségi kimutatási határa (LOQ): 1,0 µg/kg. Az analitikai módszerek dinamikusan fejlődnek, a kimutatási határokat minden műszergyártó igyekszik minél kisebb értékre redukálni. Várhatóan a jövőben megjelennek olyan szabványokban is előírható módszerek, amelyekkel alacsonyabb detektálási határral tudunk mérni nitrózaminokat.

### **Rövidítések:**

|        |                                                              |
|--------|--------------------------------------------------------------|
| NDMA:  | nitrozo-dimetil-amin                                         |
| NDEA:  | nitrozo-dimetil-amin                                         |
| NDIPA: | nitrozo-diizopropil-amin                                     |
| NDBA:  | nitrozo-dibutil-amin                                         |
| NPYR:  | nitrozo-pirrolidin                                           |
| NPIP:  | nitrozo-piperidin                                            |
| LOD:   | Limit of detection, detektálási határ                        |
| LOQ:   | Limit of quantitation, legkisebb mennyiség kimutatási határa |

## 2. melléklet

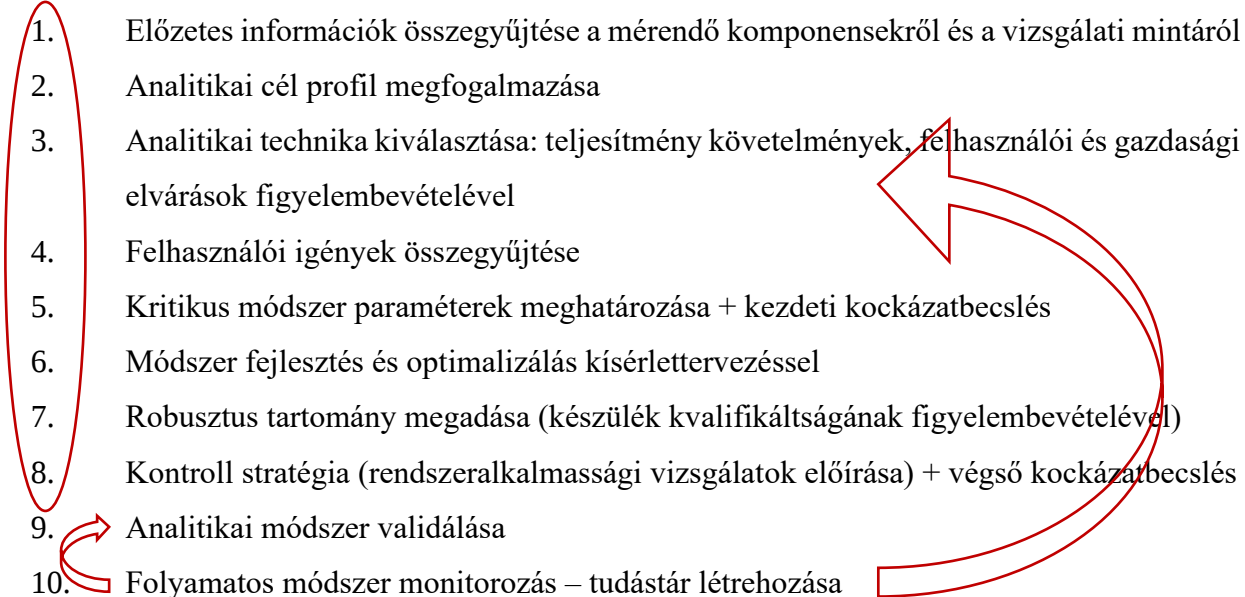
A „zöld kémia” 12 pontja:

1. Jobb megelőzni a hulladék keletkezését, mint keletkezése után kezelni.
2. Folyamatok tervezésénél törekedni kell a kiindulási anyagok maximális felhasználására (nagyobb hatékonyságra).
3. Lehetőség szerint már a folyamatok tervezésénél olyan módszereket célszerű választani, melyekben az alkalmazott és a keletkező anyagok nem mérgező hatásúak és a környezetre nem, vagy kevésbé ártalmasak.
4. A kémiai folyamatok tervezésénél törekedni kell arra, hogy a reális elvárások teljesítése mellett mérgező hatásuk minél kisebb mértékű legyen.
5. A segédanyagok használatát minimalizálni kell, s amennyiben szükséges, ezek "zöldek" legyenek.
6. Az energiafelhasználás csökkentésére kell törekedni.
7. Megújuló nyersanyagokból válasszunk alapanyagokat.
8. A felesleges lépéseket kerülni kell a folyamatok során.
9. Újra hasznosítható anyagok, módszerek alkalmazását kell előtérbe helyezni.
10. A folyamatokat úgy kell megtervezni, hogy olyan anyagokat használjunk, amelyek nem maradnak a környezetben, és bomlásuk környezetre ártalmatlan termékek képződéséhez vezet.
11. Új és érzékeny analitikai módszereket kell használni a vegyipari folyamatok in situ ellenőrzésére, hogy a veszélyes anyagok keletkezését idejében észleljük.
12. A vegyipari folyamatokban olyan anyagokat kell használni, amelyek csökkentik a vegyipari balesetek valószínűségét.

Ezen szempontokat igyekezzünk figyelembe venni a laboratóriumi működés fenntartása és módszerek felülvizsgálata, fejlesztése során. Az analitikusok többsége olyan újszerű, környezetbarát és zöld analitikai eljárásokat igyekezzen fejleszteni, amelyekben biztonságosabb oldószerekkel helyettesítik a veszélyes és mérgező oldószereket, minimalizálják az előkezelési lépéseket, a minták előkészítését, az energia- és oldószerfelhasználást. Ezenkívül a műszerezettség olyan irányú változásai előnyösek, amelyek segítségével online vagy in situ elemzés végezhető az offline mérések helyett, és lehetőleg kerüljék a veszélyes vegyszerekkel történő származékképzéseket. (Görög, 2005)

### 3. melléklet

A tervezett minőség az analitikában (AQbD) 10 lépéses folyamata az ICH Q14 alapján:

1. Előzetes információk összegyűjtése a mérendő komponensekről és a vizsgálati mintáról
  2. Analitikai cél profil megfogalmazása
  3. Analitikai technika kiválasztása: teljesítmény követelmények, felhasználói és gazdasági elvárások figyelembevételével
  4. Felhasználói igények összegyűjtése
  5. Kritikus módszer paraméterek meghatározása + kezdeti kockázatbecslés
  6. Módszer fejlesztés és optimalizálás kísérlettervezéssel
  7. Robusztus tartomány megadása (készülék kvalifikáltságának figyelembevételével)
  8. Kontroll stratégia (rendszeralkalmassági vizsgálatok előírása) + végső kockázatbecslés
  9. Analitikai módszer validálása
  10. Folyamatos módszer monitorozás – tudástár létrehozása
- 

Az 1-8. lépés a gyakorlati módszerfejlesztés, amit a validálás folyamata követ. Csak valid módszerrel lehet megbízható analitikai eredményeket megadni az élelmi anyagok vizsgálati során.

Az életciklus szemlélet megköveteli a már validált módszerek folyamatos monitorozását. A fejlesztési fázisban kidolgozott kontroll stratégiával figyelemmel kísérjük és rendszeresen felülvizsgáljuk a vizsgálati módszereket. Szükség esetén fejlesszük tovább vagy újra a vizsgálati módszereket. Abban az esetben, amikor változás történik a működésében vagy a vizsgálati módszerben ismételt validálással kell bizonyítani, hogy a laboratórium képes az adott analitikai feladat megbízható elvégzésére.

## 4. melléklet

Hasznos kérdések az Ishikawa-diagram elkészítéséhez:

### *Anyagok, eszközök*

- A felhasznált vegyszer, referenciaanyag, eszköz megfelelően volt ellenőrizve?
- Helyettesíthető az adott vegyszer, referenciaanyag?
- A beszállító folyamatai megfelelően kontrollálva vannak és átláthatóak?
- Megfelelő az eszköz, vegyszer az adott feladat elvégzésére?
- Szennyezett a felhasznált vegyszer, referenciaanyag?
- Megfelelően van kezelve a referencia anyag? (tárolva, használva és ártalmatlanítva)
- Megfelelően van kezelve a kolonna? (tárolva, használva és ekvilibrálni)

### *Kromatográfiás módszer*

- Minden szükséges információ elérhető és pontos?
- A vizsgálandó komponensek besorolása kromatográfiás szempontból megtörtént?
- Szükséges pH kontroll?
- Használható a vizsgálandó komponens szerkezete alapján fordított fázisú rendszer?
- Alkalmas lesz a feladatra a rendelkezésre álló készülék?
- Van lehetőség környezetre kevésbé ártalmas oldószerek, vegyszerek használatára?
- Lehetségesek költséghatékony megoldások, oldószerváltással, mintaszám redukálással, kisebb mintatérfogatok készítésével?
- Hőmérsékletre érzékeny a vizsgálandó anyag vagy a mátrix?
- Mintaelőkészítés során többféle oldószert teszteltek?

### *Készülék (folyadékkromatográf- HPLC)*

- Megfelelő a használt készülék/eszköz/kolonna a feladat elvégzéséhez?
- Az adott készüléket megfelelően karbantartják?
- Az adott készüléket mikor tartották karban?
- Frissíteni kell a hardvert vagy szoftvert?
- A készülék megfelelően van programozva?
- Biztonságos az adott eszköz?
- Az adott eszköz kapacitása ki lesz használva?
- Megfelelően van kvalifikálva a mérőeszköz?

- Volt már korábban vizsgálva a mérőeszköz teljesítménye?
- Eltérnek a mérések a mérést végző dolgozók között?
- Okoz nehézséget az mérést végzőknek a készülék használata?
- Befolyásolja a környezet a mérési folyamatot?

#### *Mintaelőkészítés*

- A folyamatutasítások világosan vannak leírva?
- Megfelelő volt a mintavétel?
- Pontosán vannak megadva mintaelőkészítéshez szükséges utasítások?
- Felül lettek vizsgálva a munkavégzési előírások?
- A mintaelőkészítéshez szükséges eszközök megfelelően vannak kialakítva és kalibrálva (pl. mérleg, pH mérő)?
- Volt változtatás a folyamatban?
- A folyamat biztonságot tekintve a kritikus elemek érthetőek a dolgozóknak?
- Eltérnek a mérések a mintaelőkészítést végző dolgozók között?

#### *Munkaerő*

- Megfelelő a munkaerő kompetenciája?
- Részesült a feladat elvégzéséhez szükséges képzésben az adott munkaerő?
- Sok döntést kell meghozni a feladat elvégzése során?
- Van valamilyen segédlet a döntések meghozatalához?
- A környezete befolyásolja az adott munkaerő cselekvését?
- Vannak zavaró tényezők a munkahelyen?
- A fáradtság közrejátszó tényező a teljesítményben?
- Megfelelő teljesítményt nyújt a munkaerő?
- Megbízható a munkaerő?
- Képzett a munkaerő?
- Mekkora tapasztalattal rendelkezik a munkaerő az adott feladat elvégzésében?
- Véghez tudja vinni a műveleteket hiba nélkül?
- A szükséges információ eljutott minden érintetthez?

## 5. melléklet

Validálás során ellenőrizendő teljesítményjellemzők:

### *Szelektivitás/specifikusság*

A szelektivitás a módszer azon jellemzője, amely azt mutatja meg, hogy milyen mértékben képes az egyes komponensek egymástól való elválasztására. A specifikusság a módszer azon képessége, hogy a kérdéses komponens egyértelműen értékelhető jelet ad az esetlegesen előforduló egyéb komponensek mellett (ezek lehetnek szennyezések, bomlástermékek, mátrix, stb.) Specifikus a módszer, ami csak az adott komponenst méri. Alkalmas a vizsgált anyag koncentrációjának (mennyiségének) más anyagok jelenlétében történő szelektív meghatározására. A zavaró anyagok lehetnek mátrixból eredő komponensek, szennyeződések, bomlástermékek vagy ismeretlen anyagok.

### *Precizitás*

A véletlenszerű hibák nagyságával összefüggő teljesítménytényező. Becsült tapasztalati szórással (SD) vagy a százalékos szórással (RSD%) fejezzük ki. Három részből tevődik össze:

#### ➤ *Rendszerprecizitás*

A rendszerprecizitás vizsgálatokor csak a mérőrendszer által szolgáltatott jel ingadozását figyeljük. A rendszerprecizitás során állandó körülmények között (azonos laboratórium, analitikus, készülék, oszlop, oldószerek stb.) vizsgáljuk a rendszer szórását (csúcsterület és retenció idő).

#### ➤ *Ismételhetőség (módszer pontosság)*

Az analitikai módszer precizitását jelzi adott laboratóriumon belül, egy rövid időintervallumban ugyanazon készülék és mérést végző személy esetén. A mérés során ugyanazt a homogén mintát, rövid időintervallumon belül állandó körülmények között (azonos laboratórium, analitikus, készülék, oszlop, oldószerek stb.) vizsgáljuk a módszer ismételhetőségét, beleértve a mintaelőkészítést is (független bemérések).

#### ➤ *Kiterjesztett ismételhetőség*

A véletlenszerű hatásokat jelzi, melyek befolyásolják a mérés pontosságát. Ezen belül:

- Laboratóriumon belüli precizitás: ugyanazon homogén mintát más körülmények, de ugyanabban a laboratóriumban vizsgálva, a véletlenszerű hatásokat jelzi, melyek befolyásolják a mérés pontosságát. A tanulmányozandó, kockázatot jelentő tipikus változtatások: különböző nap, analitikus, mérőműszer, kolonna. Nem szükséges e hatások egyenkénti tanulmányozása (kísérlettervezés javasolt eljárás).

- Reprodukálhatóság (Laboratóriumok közötti precizitás: ugyanazon homogén mintát, de más-más laboratóriumban vizsgálva analizáljuk az eredmények eltérését és ezeket statisztikailag jellemezzük. A teljesítményjellemző mérése egyúttal a módszer transzfer is.

#### *Torzítatlanság/visszanyerés*

A torzítatlanság (visszanyerés) a módszer azon jellemzője, amely a valódi érték (elméleti érték) és a módszer alkalmazásával kapott érték (mért érték) egyezésének mértékét mutatja. A módszer annál helyesebb, minél kisebb a torzítás, minél kisebb a mért érték és valódi érték különbsége, minél inkább vissza tudjuk nyerni a várt értéket a mérés során. Mivel a valódi értéket nem ismerjük, ezt többnyire ismert referencia anyag mérési adata helyettesíti

#### *Linearitás*

A módszer azon jellemzője, amely megmutatja, hogy a vizsgálandó komponens által szolgáltatott jel és vizsgálandó komponens koncentrációja között valóban lineáris összefüggés áll fenn a teljes méréstartományban. Vizsgáljuk a módszer lineáris tartományát, ahol a mért jel a vizsgált anyag koncentrációjával egyenes arányban áll.

#### *Detektálási határ (DL: detection limit vagy LoD: limit of detection)*

A mérendő anyagnak a mintában található azon mennyisége, amely már kimutatható a megadott kísérleti körülmények között, de még nem a megfelelő precizitás (szórás) mellett.

#### *Mennyiségi meghatározás határa (QL: quantitation limit vagy LoQ: limit of quantitation)*

A mérendő anyag azon legkisebb mennyisége a mintában, amely elfogadható precizitással és torzítatlansággal határozható meg adott mérési körülmények között.

#### *Tartomány*

A vizsgált anyag koncentráció intervalluma, melyen belül az adott anyag mennyiségét a validálás eredményei által dokumentált precizitással, torzítatlansággal és linearitással tudjuk megállapítani.

#### *Oldatstabilitás*

A módszerben használt oldatok (standard és minta oldatok) felhasználhatóságának idejét vizsgálja jól definiált körülmények mellett, a mérés körülményein.

- Meg kell határozni, hogy a kromatográfiás készülék mintaterében, beállított hőmérsékleten az oldatok mennyi ideig tárolhatók és mérhetők, anélkül, hogy jelentős változás következne be a tartalom értékekben, ami a mérés jóságát befolyásolhatná.
- Standard oldat eltarthatósága: A megállapítható eltarthatósági idő azokra a tárolási körülményekre, amelyeken a standard oldatokat tárolhatjuk. (tárolóedény anyaga és színe, a környezet hőmérséklete, fénytől való védettség)

## 6. melléklet

*FMEA (Failure Mode Effects Analysis; hibamód- és -hatás elemzés)*

Az alábbi példatáblázatokban az Ishikawa diagram alapján meghatározott kockázati tényezők és paraméterek hatásainak FMEA elemzését és CNX osztályba sorolását mutatom be a tervezett nitrózamin folyadékkromatográfiás vizsgálati módszer fejlesztéséhez.

Azonosított kockázati tényezők:

- anyagok és eszközök
- HPLC mérési módszer
- HPLC készülék
- mintaelőkészítés
- munkaerő.

Kockázati osztályok a példa táblázatokban a következőképpen alakulnak:

- Alacsony (elfogadható)  $0 \leq RPN \leq 6$
- Közepes (mérlegelendő)  $7 \leq RPN \leq 18$
- Magas (nem elfogadható)  $19 \leq RPN \leq 64$

**6. melléklet/1. táblázat:** FMEA-CN X besorolás anyagok eszközök tényezőre  
(forrás: saját táblázat)

| Paraméter         | CMA           | Eltérés oka                     | Eltérés hatása                                        | S | E | D | RPN | Javasolt intézkedés                                                          | CNX |
|-------------------|---------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|---|---|---|-----|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Anyagok, eszközök |               |                                 |                                                       |   |   |   |     |                                                                              |     |
| Referencia anyag  | visszanyerés  | Szennyezett, bomlott.           | Kiugró eredmények                                     | 2 | 1 | 3 | 6   | Referencia anyag specifikáció és felbontás utáni kezelés egyértelmű megadása | C   |
| Eluens szűrő      | specifikusság | Szűrőből származó szennyező.    | A komponensek a mérendő komponens helyén jelennek meg | 2 | 3 | 2 | 12  | Több beszállítótól szűrő beszerzése, rendszeres vak ellenőrzése              | N   |
| Pipetták          | specifikusság | Pipettából származó szennyezők. | A komponensek a mérendő komponens helyén jelennek meg | 2 | 3 | 2 | 12  | Vak oldatok vizsgálata, mosogatást utasításban előírni                       | N   |
| Mérő-lombik       | specifikusság | Lombikból származó szennyezők.  | A komponensek a mérendő komponens helyén jelennek meg | 2 | 3 | 2 | 12  | Vak oldatok vizsgálata, mosogatási utasításban előírni                       | N   |
| Vial              | specifikusság | Vialból kioldódó szennyezők     | A komponensek a mérendő komponens helyén jelennek meg | 2 | 3 | 2 | 12  | Több beszállítótól vial vak vizsgálata.                                      | N   |
| Vegyszer          | specifikusság | Vegyszer szennyező komponensei. | A komponensek a mérendő komponens helyén jelennek meg | 1 | 3 | 3 | 9   | Vak oldatok vizsgálata, különböző beszállítótól vegyszerekből.               | N   |
| Oszlop            | specifikusság | Eltérő szelektivitású oszlop    | Együtt eluálódás.                                     | 3 | 2 | 3 | 18  | Kolonna nyilvántartás vezetése                                               | C   |

**6. melléklet/2. táblázat:** FMEA-CNX besorolás mérési módszer tényezőre  
(forrás: saját táblázat)

| Paraméter                             | CMA             | Eltérés oka                                      | Eltérés hatása                                        | S | E | D | RPN | Javaolt intézkedés                                                                                                                                       | CNX |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---|---|---|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Folyadékkromatográfiás mérési módszer |                 |                                                  |                                                       |   |   |   |     |                                                                                                                                                          |     |
| Kolonna                               | specifikusság   | A kolonna típusa nem megfelelő                   | Együtt eluálódás.                                     | 4 | 2 | 3 | 24  | Többféle kolonna kipróbálása.<br>Előzetes tervezés                                                                                                       | X   |
| Kolonna                               | DL, QL          | A kolonna típusa nem megfelelő                   | Nem elég alacsony DL, QL szintek                      | 4 | 2 | 2 | 16  | Többféle kolonna kipróbálása.<br>Előzetes tervezés                                                                                                       | X   |
| Eluens összetétel                     | specifikusság   | Eltérő szerves tartalmú mozgófázis               | Együtt eluálódás.                                     | 4 | 2 | 3 | 24  | kísérletterv (DoE)                                                                                                                                       | X   |
| Gradiens                              | specifikusság   | Komponensek elúciója változik.                   | Együtt eluálódás.                                     | 4 | 3 | 3 | 36  | kísérletterv (DoE)                                                                                                                                       | X   |
| Gradiens                              | robusztusság    | Gradiens idő csúszás miatt, kicsi az elválasztás | Már kis hatásra is összeecsúsznak a szennyező csúcsok | 4 | 1 | 3 | 12  | kísérletterv (DoE)                                                                                                                                       | X   |
| Hőmérséklet                           | specifikusság   | Komponensek elúciója változik.                   | Együtt eluálódás.                                     | 4 | 2 | 3 | 24  | kísérletterv (DoE)                                                                                                                                       | X   |
| Injektált térfogat                    | DL, QL          | Kis terület                                      | Nagy DL                                               | 4 | 1 | 1 | 4   | Többféle injektálási térfogat kipróbálása a megfelelő terület elérésig, ha nem növelhető tovább az injektált térfogat akkor a koncentrációt kell növelni | C   |
| Detektálhatóság                       | DL, QL          | Nem megfelelő ionizáció mátrixhatás miatt        | Kicsi jel, emiatt magas DL, QL                        | 4 | 1 | 1 | 4   | megfelelő ionforrás használatával a mátrixhatás csökkenthető                                                                                             | N   |
| Mérési idő                            | oldatstabilitás | Szórnak a területek                              | Nehezen ismételhetőek a mérések                       | 4 | 2 | 3 | 24  | Oldatstabilitás körülményeinek meghatározása külön kísérlettervben (DoE)                                                                                 | X   |

Folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer fejlesztése során magas kockázatúnak értékelt paraméterek: állófázis (kolonna) választás; mozgófázis (eluens) összetétel; mozgófázis szerves összetétele, vagyis a gradiens meredekség; kolonnatér hőmérséklete és mérési idő.

Célszerű a kísérlettervezésnél ezeket a paramétereket vizsgálni, ezekre optimalizálni a mérő módszert. A kifejlesztett módszer robusztusságát is ugyanezekre a paraméterekre kell majd vizsgálni. Ezáltal a magas kockázatok csökkenthetők lesznek.

**6. melléklet/3. táblázat** FMEA-CNX besorolás készülék (HPLC) tényezőre  
(forrás: saját táblázat)

| Paraméter                    | CMA                  | Eltérés oka                                  | Eltérés hatása                             | S | F | D | RPN | Javasolt intézkedés                                                                                 | CNX |
|------------------------------|----------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|---|---|---|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HPLC készülék                |                      |                                              |                                            |   |   |   |     |                                                                                                     |     |
| Alapvonal változások         | specifikusság        | Ghost peak (szellem-csúcs)                   | A ghost peak a mérendő komponenssel együtt | 1 | 3 | 2 | 6   | „ghost trap” (csapda)beépítése a készülékbe                                                         | N   |
| Detektor beállítás           | DL, QL               | Kicsi elnyelés az                            | Nagy DL, QL                                | 4 | 3 | 1 | 12  | Ionforrás optimalás, tuning ellenőrzése                                                             | C   |
| Detektor beállítás           | precizitás           | Ionizáció mértéke eltérő                     | Nehezen ismételhetőek a mérések            | 4 | 2 | 3 | 24  | Ionforrás optimalás, tuning ellenőrzése                                                             | C   |
| Hőmérséklet stabilan tartása | robusztusság         | Komponensek elúciója változik.               | Együtt eluálódás.                          | 4 | 1 | 3 | 12  | Készülék kvalifikáció                                                                               | C   |
| Gradiens                     | robusztusság         | Komponensek elúciója változik.               | Gradiens keverés nem megbízható            | 4 | 1 | 3 | 12  | Készülék kvalifikáció                                                                               | C   |
| Injektált térfogat           | precizitás           | Szórak terület a                             | Nem precíz a módszer                       | 4 | 2 | 3 | 24  | Készülék kvalifikáció                                                                               | C   |
| Injektált térfogat           | linearitás           | Szórak terület a                             | Nem lineáris a módszer                     | 4 | 2 | 3 | 24  | Készülék kvalifikáció                                                                               | C   |
| Detektálhatóság              | DL, QL               | Nem megfelelő az ionizáció mátrixhatás miatt | Kicsi jel, emiatt magas DL, QL             | 4 | 2 | 2 | 16  | Fejlesztés során optimalni kell az ionizációs módot. Készülék szoftverrel automatikusan elvégezhető | X   |
| Váltószelep beépítés         | felhasználói igények | Nem rendelkeznek váltószeleppel              | Módszerátadás nehéz                        | 4 | 2 | 1 | 8   | Megfelelő információ gyűjtés az átvevő labortól                                                     | N   |
| Injektálás módja             | felhasználói igények | Eltérő készülék konstrukciók                 | Módszerátadás nehéz                        | 4 | 2 | 2 | 16  | Tű anyag, hurok térfogat, készülék állapot specifikálás                                             | C   |

Folyadékkromatográfiás (HPLC) készülék kockázatelemzése során magas kockázatúnak értékelt paraméterek:

- detektor beállítás
- injektált térfogat

Kockázat csökkentéséhez ellenőriznünk kell, hogy a kromatográfiás készülék, amely rendelkezésre áll a későbbi validáláshoz és rutin mérésekhez, specifikációja szerint milyen mértékben képes ezen paramétereket beállítani és megtartani, mekkora ingadozások fordulhatnak elő. Ezeket a paramétereket a készülék kvalifikálásnál különös tekintettel ellenőrizni kell. Ugyancsak figyelemmel kell kísérni a módszernél kritikusnak ítélt, de készülékkel összefüggő paramétereket, pl. kolonna hőmérséklet.

**6. melléklet/4. táblázat:** FMEA-CNX besorolás mintaelőkészítés tényezőre  
(forrás: saját táblázat)

| Paraméter                      | CMA             | Eltérés oka                             | Eltérés hatása                 | S | F | D | RPN | Javasolt intézkedés                                               | CNX |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|--------------------------------|---|---|---|-----|-------------------------------------------------------------------|-----|
| Mintaelőkészítés               |                 |                                         |                                |   |   |   |     |                                                                   |     |
| Mérleg használat               | precizitás      | Pontatlan minta bemérés                 | Megbízhatatlan eredmény        | 4 | 1 | 2 | 8   | Mérleg használat oktatása                                         | C   |
| Koncentráció                   | DL, QL          | Érzékenység nem megfelelő               | Nem detektálható csúcsok       | 4 | 1 | 1 | 4   | Szabványban előírt követelményt teljesíteni kell                  | N   |
| Minta homogenitás              | precizitás      | Eltérő koncentrációjú párhuzamos minták | Megbízhatatlan eredmény        | 3 | 3 | 2 | 18  | Mintavétel szabályait és homogenizálás technikáját rögzíteni kell | C   |
| Oldatstabilitás                | oldatstabilitás | Eltérő koncentrációjú párhuzamos minták | Megbízhatatlan eredmény        | 3 | 3 | 2 | 18  | Fejlesztés előtt meghatározandó paraméter                         | C   |
| Minta oldatkészítés pontossága | torzítatlanság  | Agitáció eltérő ideig                   | Megbízhatatlan eredmény        | 4 | 1 | 2 | 8   | Gyakorlati oktatás                                                | C   |
| Kalibráció                     | torzítatlanság  | Oldatkészítés                           | Megbízhatatlan eredmény        | 4 | 1 | 2 | 8   | Ellenőrző kártyák használata                                      | C   |
| Oldószer                       | DL, QL          | Csúcsszélesedés                         | Kicsi jel, emiatt magas DL, QL | 4 | 1 | 1 | 4   | Fejlesztés során optimalizálandó                                  | X   |
| Mátrix                         | specifikusság   | Mátrixból származó zavaró komponens     | Kicsi jel, emiatt magas DL, QL | 4 | 3 | 3 | 36  | Fejlesztés során tesztelni kell többféle mátrixból                | x   |

Mintaelőkészítés kockázatelemzése során magas kockázatúnak értékelt paraméter: mátrix hatás.

A vizsgálandó élelmi anyagokra (pl, különféle szalámik, kolbászok, füstölt sajt stb.) ellenőrizni kell, hogy a fejlesztett módszer specifikus, vagyis nem zavarja az élelmiszer mátrix a nitrózamin tartalom meghatározását. Amennyiben a módszer rutin vizsgálatra kerül, minden alkalommal, amikor új típusú élelmiszerben (egészen eltérő mátrixban) kell nitrózamin tartalmat vizsgálni, a mátrix hatást, vagyis a módszer specifikusságát a jövőben ellenőrizni kell. Ezt a magas kockázatot másképp nem tudjuk redukálni.

**6. melléklet/5. táblázat:** FMEA-CNX besorolás munkaerő tényezőre  
(forrás: saját táblázat)

| Paraméter                  | CMA           | Eltérés oka                            | Eltérés hatása                                                          | S | F | D | RPN | Javasolt intézkedés                                                            | CNX |
|----------------------------|---------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---|---|---|-----|--------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Munkaerő                   |               |                                        |                                                                         |   |   |   |     |                                                                                |     |
| Bemérési technika          | specifikusság | Elkoszolás másik eszközzel.            | A komponensek kívülről behozva a mérendő komponens helyén jelennek meg. | 3 | 1 | 2 | 6   | Alap oktatás ellenőrzése.                                                      | C   |
| Bemérés pontossága         | precizitás    | Pontatlan bemérés                      | Kiugró eredmények                                                       | 3 | 2 | 3 | 18  | Gyakorlati tudás ellenőrzése                                                   | C   |
| Jelre töltés technika      | visszanyerés  | pontatlan koncentráció                 | Kiugró eredmények                                                       | 3 | 1 | 4 | 12  | Alap oktatás ellenőrzése.                                                      | C   |
| Eluens készítés pontossága | specifikusság | Eltérő pH-jú mozgófázis                | Összecsúszó csúcsok                                                     | 2 | 3 | 1 | 6   | Eszközhasználat oktatása                                                       | C   |
| Oszlop mosás, tárolás      | specifikusság | Oszlop felület tönkremegy, más elúció. | Együtt eluálódás.                                                       | 2 | 3 | 2 | 12  | Egyértelmű megadása az oszlop mosó, és tároló összetételnek.                   | C   |
| Ekvibrációs technika       | specifikusság | Nem áll be az oszlopon az egyensúly.   | Együtt eluálódás.                                                       | 1 | 3 | 2 | 6   | Egyensúlybeállításra idő egyértelmű megadása utasításban                       | C   |
| Csúcs-azonosítás           | specifikusság | Rosszul azonosított csúcsok            | Megbízhatatlan eredmények                                               | 3 | 2 | 4 | 24  | Szoftver oktatás ellenőrzése, kiemelten az azonosság vizsgálat kivitelezésére. | C   |
| Integrálási technika       | specifikusság | Rossz csúcsterület meghatározás.       | Megbízhatatlan eredmények                                               | 4 | 2 | 2 | 16  | Integrálási paraméterek rögzítése a módszerben                                 | C   |

Munkaerő kockázatelemzése során magas kockázatúnak értékelt paraméter: csúcsazonosítás, azaz a mérést végző személy megfelelően azonosítja-e a nitrózamin szennyezőt, és nem téveszti össze valamely mátrixból eredő egyéb csúccsal. A kockázat csökkentéshez a személyzet oktatását kell kiterjeszteni az értékelési szabályokra ennél a vizsgálatnál. A kontroll stratégiában ki kell dolgozni a megbízható és egyértelmű csúcsazonosításhoz egy ellenőrzési pontot.

## NYILATKOZAT

### a szakdolgozatnyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Horváth Anikó  
A Hallgató Neptun kódja: SGXGGK  
A dolgozat címe: Tervezett minőség az élelmiszeranalitikai vizsgálatokban  
A megjelenés éve: 2024  
A konzulens intézetének neve: Műszaki Intézet  
A konzulens tanszékének a neve: Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Gépek Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat 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 állítottnak 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 szellemi tulajdon-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 eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Gödöllő 2024. év aprilis hó 13. nap



Hallgató aláírása

## NYILATKOZAT

Horváth Anikó (hallgató Neptun azonosítója: SGXGGK) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem<sup>\*2</sup>

Kelt: 2024 év április hó 13. nap



belső konzulens

---

<sup>1</sup> A megfelelő aláhúzendó.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendó.