

Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

**Egyszerű kérdésre összetett válasz: Citrom felületi fungicid szennyezésének
csökkentése különböző mosási eljárásokkal**

OTDK DOLGOZAT

Korpics Evelin

2. Évfolyam (2015)

Konzulensek: Dr. Dernovics Mihály – Habilitált egyetemi docens
Vass Andrea - PhD hallgató

Dátum: Budapest, 2014. 01. 03.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	4
2	Irodalmi áttekintés	5
2.1	<i>Xenobiotikumok általános jellemzése.....</i>	5
2.2	<i>A xenobiotikumok metabolizmusa</i>	6
2.3	<i>A xenobiotikumok besorolása/osztályozása.....</i>	7
2.4	<i>Post-harvest (betakarítás utáni) peszticidek</i>	9
2.5	<i>Gyakorlatban alkalmazott kezelések citrusfélék felületén</i>	11
2.6	<i>Imazalil (formálás, kijuttatás, kezelés mikéntje)</i>	13
2.7	<i>„Szürke” irodalomban fellelhető mosási eljárások citrusfélék fogyaszthatóvá tételére..</i>	14
3	Célkitűzések.....	16
4	Anyagok és módszerek	17
4.1	<i>Felhasznált vegyszerek és reagensek.....</i>	17
4.2	<i>Minták és mintaelőkészítés.....</i>	17
4.2.1	<i>AOAC hivatalos módszer alapján elvégzett mintaelőkészítés leírása</i>	18
4.2.2	<i>MSZ EN 15662 szabvány módszer alapján végzett mintaelőkészítés leírása.....</i>	18
4.2.3	<i>Különböző citrom mosási technikák alkalmazása az imazalil eltávolítására</i>	19
4.3	<i>Felhasznált statisztikai módszerek</i>	19
4.4	<i>Standard addíció kalibrációs oldatainak összeállítása mennyiségi mérésekhez</i>	19
4.5	<i>HPLC-ESI-Q³-MS</i>	20
5	Eredmények.....	23
5.1	<i>Mintakiválasztás.....</i>	23
5.2	<i>AOAC (2007) és MSZ EN 15662 (2009) szabványmódszerek összehasonlítása</i>	25
5.3	<i>Különböző mosási eljárások hatékonyságának vizsgálata.....</i>	33
6	Összefoglalás	37
7	Köszönetnyilvánítás.....	38
8	Irodalomjegyzék	39

Rövidítések jegyzéke

AOAC	American Organization of Analytical Chemists	Analitikai kémikusok amerikai szervezete
ANOVA	Analysis Of Variance	Varianciaanalízis
CE	Collision energy	Ütközési energia
CEP	Collision cell entrance potential	Ütközési cella belépő feszültség
CXP	Collision cell exit potential	Ütközési cella kilépő feszültség
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane	Dikloro-difenil-triklóretán
DP	Declustering potential	Klasztermentesítő feszültség
EP	Entrance potential	Belépő feszültség
ESI	Electrospray ionization	Elektrospray ionizáció
HPLC	High performance liquid chromatography	Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
IPA	Isopropyl alcohol	Izopropanol
LD ₅₀	Lethal dose	Letális dózis
MRL	Maximum residue level	Maximális szermaradvány koncentráció
MRM	Multiple reaction monitoring	Többszörös átmenetpásztázás
MS	Mass spectrometry	Tömegspektrometria
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Tandem tömegspektrometria
MSZ EN	Magyar szabvány European Standard	Európai szabvány alapján készült magyar szabvány
PSA	Primary secondary amine	Primer szekunder amin; tisztító szorbens
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Poli-tetrafluoroetilén (teflon)
QqQ	Triple quadrupole (MS)	Hármas kvadrupól (MS)
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	Gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos
R ²	Coefficient of determination of a linear regression	Determinációs együttható
RSD	Relative standard deviation	Relatív szórás
TPP	Triphenyl phosphate	Trifenil-foszfát

1 Bevezetés

Napjainkban bevett gyakorlatként alkalmaznak különböző betakarítás utáni növényvédő szereket a citrusfélék gombás fertőzésének megelőzése érdekében. Ez a felületi kezelés kulcsfontosságú a nagy távolság miatt, amíg a gyümölcsök eljutnak a közép európai piacokig, hiszen a forgalmazók érdeke azt diktálja, hogy a gyümölcs minél tovább megőrizze friss küllemét. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy a citromot, narancsot vagy növényvédőszerrel és bemeztetéses módszerrel kezelik, vagy permetezéssel juttatják a felületére a növényvédőszert.

Magyarországon és más közép európai országok háztartásai ezeket a gyümölcsöket vásárolják meg és használják fel ételeik elkészítésére, ízesítésére. Ez azt jelenti, hogy nem csak a gyümölcs hús, hanem a citrom és a narancs héja is felhasználásra és fogyasztásra kerül. A háztartásokban élők többsége tisztában van a veszéllyel és annak kivédése érdekében az interneten található információkból próbál mosási eljárásokat alkalmazni, hogy megszabaduljon az ártalmas növényvédőszerektől. A világhálón számtalan felülettisztítási javaslat olvasható. Ez a munka célzottan azért készült, hogy tudományos igényességgel fellebbentse a fátylat a laikusok számára elérhető irodalomban leírt tévhitekről.

Vizsgálandó mintának a citromot választottuk, hiszen ez az a citrusféle, amely héjának felhasználásával leggyakrabban találkozhatunk a szakácskönyvekben és az interneten található receptekben (citromos álom, meggyeletes, túróssütemények, citromos muffin). Indikátor fungicidként az imazalilt választottuk, mert ez egyike a leggyakrabban használt növényvédő szereknek citrusfélék felületén, emellett aránylag nagy a megengedett határértéke (5 µg/g). Meglepő módon ez az érték csak a növény egészére vonatkozik, és a citromhéjra nincs külön megállapítva. Munkánk során továbbá két különböző módon puffert QuEChERS módszert hasonlítottunk össze, amely szabványmódszerek szerint elkészített mintákból kimutatható az imazalil, 90% feletti visszanyeréssel.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 *Xenobiotikumok általános jellemzése*

A bürök és sok más mérgező vegyületet termelő növény már az ókori görögöknek is ismertek voltak és tanulmányozták is azokat. Paracelsus (1493 – 1541) szerint „a dózis határozza meg a mérget”; tudományos munkáinak alapja, hogy minden anyag mérge, ezzel szemben a toxicitás és a gyógy mód a megfelelő dózistól függ. A legtöbb toxikológus az exogén vegyületekkel vagy azok összetevőivel foglalkozik, amelyek nem részei a természetes szervezetek metabolizmusának: ide tartoznak többek közt a xenobiotikumok (Omaye, 2004).

A xenobiotikumok (görög eredetű szó, jelentése: „élőtől idegen anyag”) olyan kémiai vegyületek, melyek az élőlények biológiai anyagszere-folyamatához nem szükségesek, abban nem vesznek részt, a természetes ökoszisztémától idegenek. Gyakran tartalmaznak olyan alkotórészeket, amelyek ebben a formában a természetes anyagokban nem vagy csak nagyon ritkán fordulnak elő. A természetben fellelhető xenobiotikumok leggyakrabban ember által szintetizált vegyi anyagok. Ide tartoznak a mesterséges növényvédő szerek, mint például a halogénezett szénhidrogének is. Ezen vegyületek között léteznek olyanok, amelyek biológiailag csak nagyon nehezen vagy egyáltalán nem bomlanak le, illetve olyanok, melyek bomlási útvonala a mai napig nem ismert. Ez részben annak köszönhető, hogy a természetben igen ritkán előforduló funkcionális csoportokkal rendelkeznek, például aromás nitro- vagy szulfonsav-csoportokkal (4-amino-naftalin-1-szulfonsav; 4-hidroxi-naftalin-1-szulfonsav). A xenobiotikumok lehetnek pozitív, semleges vagy káros hatással a környezetre és az ott élő organizmusokra. Mérgező hatást csak abban az esetben fejtenek ki, ha eljutnak és megfelelő (toxikus) koncentrációt érnek el a célszervekben. A toxikus hatás nemcsak az anyagfelvételtől függ (oldhatóság zsírban vagy vízben), hanem a biológiai lebonthatóságtól is. A legtöbb vízoldható xenobiotikum lipofil, így nem dúsul fel az élő szervezetben, hanem kiválasztódik. A biotranszformáció a transzport folyamatokkal együtt a testidegen anyagok eliminálását eredményezi, amely egyfajta védelmet jelent a szervezet számára (Handschin et al., 2003).

Számos xenobiotikumokkal kapcsolatos tanulmány lelhető fel az irodalomban, melyek közül néhány példát ki is emelnék a teljesség igénye nélkül. Ilyen például Erica Donner és mtsi. által végzett kutatás, mely a xenobiotikumok forrásait és felhasználási módjait vizsgálja a városi környezetben. Az értekezés általános áttekintést nyújt a káros anyagok forrásainak témájában, kiemelve a legfontosabb eltéréseket a xenobiotikumok különböző eredetéről (pl.: folyamatok vagy áruk; természetes vagy antropogén származás) és felhasználásukról (pl.: aktív vagy passzív; diszpergáló vagy nem diszpergáló) (Erica Donner et al., 2010). Kästner és mtsi. a xenobiotikumokból visszamaradt, nem-extrahálható maradványok (NER) osztályozását és

modellezését tűzték ki célul (Kästner et al., 2014). Laue és mtsi. tanulmányában az édesvízben élő cianobaktériumok (kékmoszatok) és algák növekedésének természetes xenobiotikumokkal való gátlásáról olvashatunk. A vizsgálat célja az volt, hogy különböző hipotézisekkel leírják a komplex kölcsönhatásokat a fototróf eukarióták, prokarióták és a természetes xenobiotikumok között (Laue et al. 2014). A felsorolt példák láttán nem szükséges hangsúlyozni a xenobiotikumok jelentőségét és kutatásának fontosságát, hiszen jelen vannak mindennapi életünkben és a legalacsonyabb fejlettségi szinten álló élőlényekre is befolyást gyakorolnak, amit számos tudományágban felismertek és górcső alá vettek. Mindezek mellett megjegyzendő, hogy napjainkban a mikotoxinokat nagyobb veszélyforrásként tartják számon, mint xenobiotikumokat (Turconi et. al., 2003).

2.2 A xenobiotikumok metabolizmusa

A testidegen anyagok metabolizmusa két fázisra osztható: a fázis I. és fázis II. folyamatokra. A xenobiotikumok metabolizmusában (biotranszformációjában) elsősorban a monooxygenázok csoportjába tartozó CYP enzimek vesznek részt (Nelson et al., 1996; Nebert et al., 2002). Az egyes CYP enzimek aspecifikusak, több különböző szerkezetű szubsztrát átalakítását is végzik. Nagyrészt oxidálják a vegyületeket: aromás és alifás hidroxilezés, *N*-, *O*-, *S*-deazalkilezés, gyűrűzárás és gyűrűhasítás fordulhat elő. Az oxidáción kívül azonban nagyrítván redukció is kimutatható. Ezeket az imént említett átalakításokat nevezzük a metabolizmus I. fázisának, melyben a CYP enzimeken kívül részt vesznek még az epoxid hidrolázok, észterázok, alkohol és aldehid dehidrogenázok és a flavinmonooxygenázok. A metabolizmus II. fázisa során a xenobiotikumok, valamint a fent említett reakciók során képződött metabolitok különböző endogén vegyületekkel konjugálódnak. A konjugációs folyamatok során keletkezett vegyületek polaritása és vízben való oldékonysága szintén növekszik, ami segíti kiürülését az élő szervezetekből. A legfontosabb konjugációs enzimek az UDP-glükuroniltranszferázok, glutation-transzferázok, szulfotranszferázok, metiltranszferázok és az *N*-acetiltranszferázok. Ugyan a metabolizmus során többnyire méregtelenítés, a bekerülő testidegen anyagok inaktiválása történik, de reaktív intermedierek és oxigén gyökök is képződhetnek, melyek makromolekulákhoz kötődhetnek, DNS, fehérje károsodást okozhatnak és fokozott citotoxicitást mutagenitást/karcinogenitást idézhetnek elő. A karcinogén és mutagén folyamatokban, illetve a prekarcinogének aktiválásában a CYP enzimeknek szintén jelentős szerepük van (Nebert et al., 1987), ezért a fokozott CYP kifejeződés is problémát jelenthet. Az elimináció befejezését a transzportfolyamatok jelentik, amelyet a transzporterek végeznek. A transzportereket transzmembrán fehérjék alkotják és kémiai szerkezetüktől függően különböző anyagok (például lipidek, szteroid típusú vegyületek, polipeptidek, ionok, gyógyszerek,

metabolitok) szállítását végzik az extra- és intracelluláris membránokon keresztül (Stieger et al., 1998; Muller et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Bohan et al., 2002).

2.3 A xenobiotikumok besorolása/osztályozása

A fent említett xenobiotikumok közé tartoznak a különféle növényvédő szerek, más néven a peszticidek. Ezek olyan kártevőirtó szerek, amelyek elpusztítják a nemkívánatos élőlényeket a növénytermesztés során. Károsíthatják az élő szervezeteket, mellékhatásokkal rendelkezhetnek. Akut, szubakut és krónikus mérgezést okozhatnak, késői toxikus hatásuk több esetben bizonyított. A növényvédő szereket toxikus hatásuk alapján az 1. Táblázat mutatja be.

1. Táblázat: A peszticidek felosztása veszélyességük alapján (LD₅₀, patkány)

Osztály	Szájon keresztül		Bőrön keresztül	
	<i>Szilárd</i>	<i>Folyadék</i>	<i>Szilárd</i>	<i>Folyadék</i>
I. a Rendkívül veszélyes	5 vagy kevesebb	20 vagy kevesebb	10 vagy kevesebb	40 vagy kevesebb
I. b Nagyon veszélyes	5-50	20-200	10-100	40-400
II. Mérsékelten veszélyes	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III. Kismértékben veszélyes	500 felett	2000 felett	1000 felett	4000 felett
IV. Gyakorlatilag nem jelentenek akut veszélyt	-	-	-	-

A növényvédő szermaradékok négy típusa a következő:

- *Felületi maradék:* a növény felületén tapad meg. Egyszerű csapvizes vagy híg ecetsavas mosással, illetve hámozással távolítható el.
- *Kutikuláris maradék:* a növény felületi viaszrétegében oldódik. Ezt csak detergens oldattal, a viaszréteggel együtt lehet eltávolítani.
- *Mélyhatású szer:* maradékai a növénybe néhány mm, esetleg cm mélységig hatolnak be, de a termés más részeibe nem jut el. Nem mosható le, bomlását külső körülmények (pl.: hő, fény) befolyásolhatják.
- *Szisztémás szer:* a növény teljes nedvkeringésébe bekerül. Metabolizációját az élő szervezet enzimrendszere szabályozza. Fizikai módszerekkel nem távolítható el.

Ahhoz, hogy egy növényvédő szer felhasználható legyen az iparban, több kritériumnak is meg kell felelnie. Ilyen feltétel például, hogy a peszticid hatóanyag bomlása, az adott *várakozási*

*időn** belül, minél tökéletesebb legyen. Emellett előírás, hogy a kezelt termények ehető részeiben lévő szermaradékok (hatóanyag + aktív metabolitok + bomlástermékek) mennyisége a lehető legkisebb legyen. Fontos szempont még a szelektivitás, illetve hogy a szervezetbe jutó szermaradékok tartós bevitel esetén se legyenek egészségkárosító hatásúak.

A növényvédő szerek veszélyét nagyban növeli perzisztens hatóanyag tartalmuk, amelyek a természetbe jutva lassan inaktiválódnak, emiatt tartósan szennyezik a környezetet, emellett bizonyos körülmények között akkumulálódni is képesek. A peszticidek egészségkárosító hatása miatt meghatározták az ezekre vonatkozó maximálisan megengedett maradvány szintet (MRL: Maximum Residue Level), amely leírja a növényvédőszer-maradékok legnagyobb megengedett mennyiségét az élelmiszerekben és takarmányokban vagy azok felületén.

A peszticideket felhasználhatóságuk alapján különböző csoportokba sorolhatjuk. Az állati kártevők ellen ható szerek a zoocidek (pl.: levéltetű elleni, rovarölő/inszekticidek, atkaölő, lárváölő, fonalféregölő, puhatestűek elleni, rágcsálók elleni szerek). Az inszekticidek közé soroljuk a klórozott szénhidrogén típusú szereket, melyek széles hatásspektrummal rendelkeznek, perzisztens hatóanyagokat tartalmaznak, kumulatív, biomagnifikációra hajlamos vegyületek és a központi idegrendszeret károsítják. Az 1960-as évektől korlátozták, majd betiltották felhasználásukat hazánkban. Ilyen típusú szer a DDT (diklór-difenil-triklór-etán), melyet a malária és a tífusz ellen a mai napig használnak egyes fejlődő országokban. Nem szelektív vegyület, perzisztens hatóanyagokat tartalmaz, a felezési ideje hozzávetőleg 17-25 év. Felhalmozódik a zsírszövetben és kiválasztódik az anyatejjel, így súlyos magzatkárosító hatása van. A felsorolt és egyéb káros hatások miatt betiltották a DDT gyártását és felhasználását.

A növényvédőszerek beszüntetésére vonatkozó szabályozás a 6/2001. (I.16.) FVM rendeletben található, mely a növényvédő szerek forgalomba hozatalának és felhasználásának engedélyezéséről, valamint a növényvédő szerek csomagolásáról, tárolásáról és szállításáról szól. Az I. számú Mellékletében szereplő növényvédőszerek közül Magyarországon jelenleg az aldrin, DDT, dieldrin, endrin, heptaklór, hexaklór-benzol, klórdán és toxafén felhasználását tiltják. A fenti tiltás nem vonatkozik a laboratóriumi célú felhasználásokra (Internet_1).

A gombaölő szereket, más néven fungicideket, viselkedésük alapján a kontakt** vagy a szisztémikus szerekhez*** sorolják. A fungicideken belül alkalmazásuktól függően megkülönböztetünk csávázószereket, szervetlen fungicideket és szerves fungicideket. A

* *Élelmezés-egészségügyi várakozási idő*: ezalatt az adott hatóanyag előírás szerű felhasználás esetén a határérték alatti szintre csökken az adott növényi kultúrában

** *Kontaktszerek*: a kezelt növény felületén megragadnak és közvetlen érintkezés folytán (esetleg gőz alakban) jutnak a kórokozó szervezetébe

*** *Szisztémikus szerek*: felszívódnak a gyökérbe vagy a levélzetbe és a növényen keresztül kerülnek érintkezésbe a kórokozóval

csávázószerek többnyire a vetőmag felületére tapadnak és a mag belsejében lévő kórokozókat pusztítják el. A csávázott vetőmag táplálkozási vagy takarmányozási célokra már nem használható fel. Szerves fungicidek többek közt a ditiokarbamátok és a ftálimidek.

A fungicidek egy másik gyakori felhasználási módja egyes gyümölcsök illetve zöldségek betakarítás utáni kezelése, mely során a növényi részek felületén bevonatot képeznek ezen vegyületekkel, megvédve azokat a romlást okozó gombáktól, penészekről.

A növényvédő szerek másik nagy csoportját a gyomirtó szerek (herbicidek) teszik ki. Ezek a kultúrnövényeket szelektív módon megvédik a gyomosodástól. Többségük közvetlenül alig vagy egyáltalán nem mérgező. A szervezetből általában változás nélkül ürülnek ki, de hatásuk kumulálódhat. Használatuk közben hátrányukként mondható el, hogy a termények átvehetik a herbicidek kellemetlen szagát és ízét. A gyomirtó szereket hatásuk kifejtésének helye alapján levélherbicidnek és talajherbicidnek nevezik. Alkalmazási idejük szerint megkülönböztetünk vetés előtti (PP=preplant), kelés előtti (PRE=preemergens) és kelés utáni (POST=postemergens) szereket.

2.4 Post-harvest (betakarítás utáni) peszticidek

Ahhoz, hogy a kiemelkedő minőségű növények termelése optimális hozamot adjon, a mezőgazdasági termelőknek megfelelő növekedési feltételeket kell biztosítaniuk a termények számára a meglévő környezeti körülmények mellett. Ezen kívül védelmet kell nyújtaniuk a növényi kártevők ellen, beleértve a gyomokat, rovarokat és a patogén mikroorganizmusokat. A szintetikus műtrágya és a peszticidek használata már szerves részévé vált a modern mezőgazdaságnak és egyik fő okozója a termelékenység drámai növekedésének.

Mielőtt a növényi megbetegedéseket kiváltó kórokozókat ismerték volna, a földművelők felfedeztek olyan művelési technikákat, melyek elejét vették a járványoknak. A tizenegyedik században a hármas vetésforgó volt a növénytermesztés legelterjedtebb formája Európában, amely csökkentette a növények azonos termőföldben való termesztése miatti betegségek kialakulását.

Ma a legnagyobb betakarítás utáni veszteségek zöldségből és gyümölcsből a patogén penészgombával való befertőződés miatt keletkeznek. A legtöbb kórokozó az alábbi nemzetségekhez tartozik: *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloeosporium* és *Mucor*. A veszteségekhez nagymértékben hozzájárulnak a fiziológiai rendellenességek és a sérülések is (Mari et. al., 2014).

A post-harvest kezelések közül az egyszerűbbek közé tartozik a hűtve tárolás (<5°C) és a szellőztetés (ventillátorral), melyet átmeneti megoldásként alkalmaznak. A levegő páratartalmának csökkentésével kisebb a valószínűsége a fertőzéseknek, hiszen a mikroorganizmusok számára nélkülözhetetlen a víz. A növények tárolása során az oxigén kizárása (<0,5%) nitrogén felhasználásával segít egyes kórokozók távoltartásában. A dió, mogyoró, valamint a szárított

gyümölcsök és zöldségek esetén alkalmazott post-harvest kezelések közé tartozik, a fent említettek mellett, a fagyasztás és hőkezelés.

Egyes növényi anyagokat hasznos természetes növényvédőszerekként ismernek, ilyen például a manióka levele, melynek ciántartalma védelmet nyújt a rovarok ellen (Aiyer, 1978). A *Lantana spp* és az *Ochroma logopur* leveleinek hamuját por formájában hatékonyan alkalmazzák a burgonyát támadó levéltetvek ellen (Internet_9). A trópusi éghajlaton élő *Azadirachta Indica* magjait, peszticid tulajdonságai miatt, egyre több országban ismerik és alkalmazzák. Az Indiában őshonos fát erős rovarirtó szerként használják az élelmezésre szánt növényeken, ugyanis nem ártalmas a humán szervezetre, sem az emlősökre vagy hasznos rovarokra.

A betakarított növényeket gyakran kémiai kezelésekkal védik a kórokozóktól. A klóros vizes mosás megakadályozhatja a baktériumok, penészek, élesztők okozta rothadást. A kalcium-hipoklorit (por formában) és a nátrium-hipoklorit olcsó és széles körben elérhető szerek. A kezelés hatékonysága akkor csökkenhet, ha szerves anyag kerül a mosóvízbe. A kloridion reakcióképessége pH=8-11 között a legnagyobb, ennél kisebb pH-n instabillá válik. A gyümölcsöket és zöldségeket 25 µg/g töménységű klór-oldattal lehet mosni 2 percen át, ezután öblítés következik. Egy alternatív módszer szerint 50-70 ppm klórtartalmú hipoklorit oldatba mártják a terményeket, majd csapvíz alatt öblítik (Kitinoja és Kader, 2003).

Kénes kezelést a banánokon alkalmaznak pasztaként (0,1%-os hatóanyag-tartalom) gombás fertőzések megelőzésére. Szőlőfajták esetén a *Botrytis*, *Rhizopus* és *Aspergillus* gombák ellen SO₂-ot használnak füstölőszerként. A nátrium- vagy kálium-hidrogén-szulfitot (biszulfit) általában a műanyagból vagy papírból készült védőcsomagolásban helyezik el, hogy a szőlőt szállítása során megvédje a penészesedéstől.

A betakarítás utáni rothadás megelőzésére hidrogén-karbonát sókat használnak a friss paprika, dinnye, burgonya, sárgarépa és citrusfélék felületi kezelésére. Ezek a sók megfizethetőek, biztonságosak és könnyen elérhetőek. A bikarbonát sók közé tartozik még a szódadikarbóna (NaHCO₃) és a kálium-bikarbonát (KHCO₃) (Kitinoja és Kader, 2003).

A káposztafélék bakteriális lágyrothadása a többek közt mészsóval vagy 15%-os timsó-oldattal (15 g alumínium-kálium-szulfát, 100 ml víz) kontrollálható. A káposztafélék kezelését követően 20-30 percnél hosszabb időre van szükség a csomagolást megelőzően (Kitinoja és Kader, 2003).

Az első fungicid kezeléseket olyan szerves vegyületekkel végezték, mint például a sós víz, melyet már a 17. században is használtak a gabona védelme érdekében, ezt követte a rothadás elleni meszezés. Később felfedezték a porként, mely a lisztharmat és más gombák ellen nyújtott védelmet a növényeknek, majd a híres bordeaux-i keveréket (réz-szulfát és hidratált mészsó elegye), amely a szőlő peronoszpóra és egyéb kórokozók ellen hatásos. 1940 és 1970 között a szerves

gombaölőszerek széles spektrumát fejlesztette ki az újonnan kialakuló növényvédő ipar. A legtöbb ilyen fungicid többoldalú gátlószer volt, mint például a kaptán és a folpet (ftálimid származékok). Az új generációs gombaölőszereket az 1960-as években fejlesztették ki, kezdve a benzimidazolokkal, melyek specifikus hatásmechanizmusuk révén a patogén gomba célfehérjéjét támadják meg. A legtöbb ilyen hely-specifikus fungicid szisztémás, azaz át tudnak hatolni a kutikula rétegen és eloszlanak a növényben, ami növeli az aktivitásukat. Mind a mai napig specifikus hatásmechanizmussal rendelkező fungicidek egyre több fajtáját bocsájtják ki mezőgazdasági felhasználásra (Hahn, 2004)

2.5 Gyakorlatban alkalmazott kezelések citrusfélék felületén

A citrusféléket támadó patogén mikroorganizmusok közül nagyon sok a termésen lévő sérüléseken keresztül fertőzi meg a gyümölcsöt. Így a termés beszennyeződhet a gyümölcsöskertben, illetve a feldolgozó üzemben, az elosztás során vagy az értékesítés alatt. Citrusféléknél a gazdasági szempontból legjelentősebb betakarítás utáni betegségek okozóiként a *Penicillium digitatum*-ot és a *Penicillium italicum*-ot tartják, melyek a zöld és kék penész (1- 2. ábra) kialakulásáért felelősek (Palou et. al., 2008).



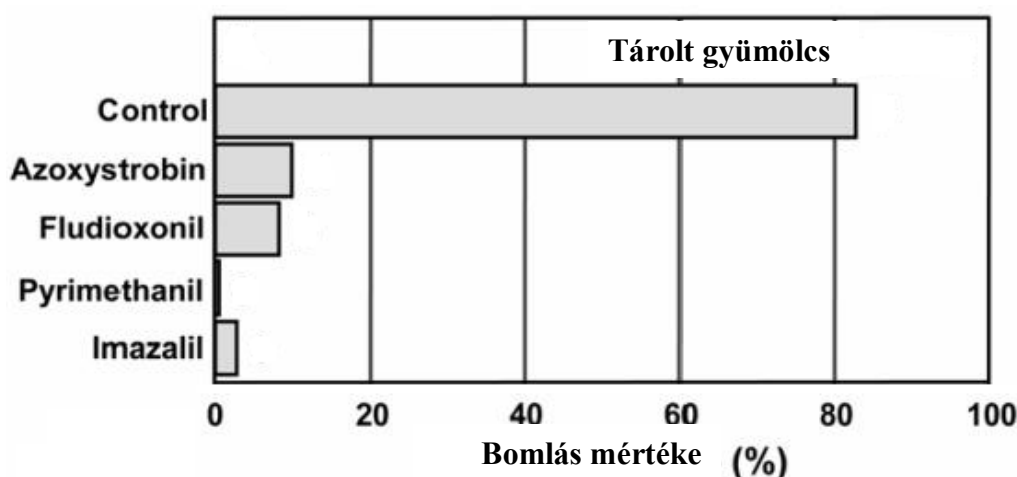
1. ábra: *Penicillium digitatum* (zöld penész) 2. ábra: *Penicillium italicum* (kék penész)

A citrus gyümölcsök savanyú rothadását a *Galactomyces citri-aurantii* patogén penészgomba okozza, mely betegség kialakulásával szintén nagy termésveszteségek alakulhatnak ki (McKay et. al., 2012). Ezen és egyéb penészgombák hatásából adódó tényleges veszteségek nagyon változóak, függenek a termelési területtől, a citrus fajtájától, a termőfa korától és állapotától, az időjárási viszonyoktól a terménynövekedés és betakarítás során, a gyümölcs fizikai sérülés veszélyének mértékétől a szüret és az azt követő kezelés alatt, a gombaölőszeres eljárás hatékonyságától és a betakarítás utáni környezeti körülményektől. A kórokozók gyorsan szaporodnak, spóráik jelen vannak a gyümölcs felületén, a légkörben és a légáramlatok által könnyen terjednek. Ezért a citrus ligetekben és a feldolgozó üzemekben a gombás fertőzés veszélye egész szezonban fennáll, így valószínűleg a gyárba érkezett citrus gyümölcsök legnagyobb része már érintkezésbe került valamilyen patogén kórokozóval (Palou et. al., 2008).

Az ismertett problémák miatt szinte minden esetben szükség van valamilyen felületi kezelésre, amely megakadályozza, vagy legalább lassítja a romlási folyamatokat. A zöldségek és gyümölcsök betegségeinek szabályozására, illetve megelőzésére a peszticidek egy nagy csoportját veszik igénybe a mezőgazdaságban. A citrusfélék kezelésére használt kémiai vegyszerek közül legtöbb esetben a fungicideket alkalmazzák. A citrusfélék befertőzését okozó patogén mikroorganizmusok elleni kezelések során legnagyobb mértékben felhasznált gombaölőszerek a tiabendazol, carbendazim, thiophanate-methyl, imazalil és prokloraz (Fernández et. al., 2001). Az ipari gyakorlat során leginkább mosással és permetezéssel juttatják a növényvédőszereket a termények felületére. A fogyasztók védelme érdekében mind az Európai Unió és az Egyesült Nemzetek Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete maximális szermaradvány határértékeket állítottak fel (MRLs) (FAO) (Dreassi et. al., 2010).

Thurman és mtsi. post-harvest fungicidek és azok metabolitjainak vizsgálatára végeztek kísérleteket narancshéjban és narancslében. Az elemzés során felhasznált gyümölcsök a citrusféléknél leggyakrabban alkalmazott imazalil és tiabendazol gombaölőszerekkel voltak kezelve (Thurman et. al., 2005).

Egy másik tudományos kutatás során Kanetis és mtsi. összehasonlító vizsgálatokat végeztek a citrom zöld penész elleni kezelésére használt három újonnan bevezetett fungicid (azoxistrobin, fludioxonil, pirimetanil) és a már forgalomban lévő gombaölőszerek (imazalil és tiabendazol) hatékonysága között. A kísérletek alatt a felsorolt vegyszereket alkalmazták különböző keverékként, illetve egyesével. A vizsgálatok során arra a következtetésekre jutottak, hogy mind közül a leghatékonyabb a pirimetanol, elegyként és önmagában egyaránt (3. ábra). A fludioxonil és azoxistrobin pedig a legkevésbé hatékony fungicidek az ötből (Kanetis et. al., 2007).

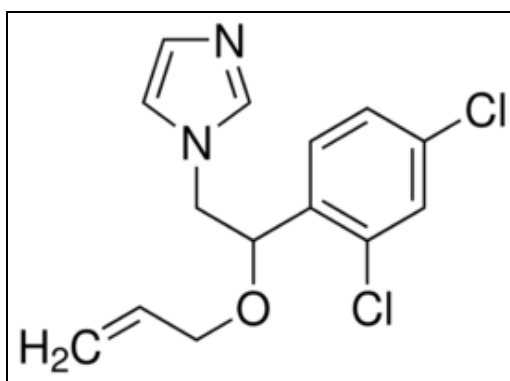


3. ábra: Különböző fungicidek hatékonysága zöld penész ellen citromon alkalmazva (1,200 mg/liter azoxistrobin és fludioxonil; 1,000 mg/liter imazalil és pirimetanil). A gyümölcsök *Penicillium digitatum*-mal voltak beoltva (20 µl-t adtak a 106 konídium/ml koncentrációjú kultúrából) (Kanetis et. al., 2007)

2.6 Imazalil (formálás, kijuttatás, kezelés mikéntje)

Az imazalil egyike azon leggyakrabban használt fungicideknek, amelyet a növények gombás megbetegedései ellen gyümölcsökön, zöldségeken és dísnövényeken, például a tökféléket, rózsákat és dísnövényeket támadó lisztharmat ellen, illetve alma, citrusfélék, banán és vetőburgonya felületén kialakuló tárolási fertőzések ellen (elsősorban *Penicillium*, *Gloeosporium*, *Phomopsis*, *Phoma spp.*) alkalmaznak. Emellett csávázószerként alkalmazzák a gabonaféléket támadó *Fusarium* és *Helminthosporium spp* okozta kórok elkerülésére. Hatásmechanizmusa szerint gátolja az ergoszterol bioszintézisét a penészgombák sejtjeiben, ezáltal azok pusztulásához vezet (Waard et. al., 1982; Schepers, 1983). Az imazalil különösen hatásos a növénypatogén gombák benzimidazol-rezisztens törzsei ellen. Tipikus felhasználási arányok: csávázószer 4-5 g/100kg mag; dísnövények és zöldségek 5-30 g/hl; post-harvest kezelés 2-4 g/t gyümölcs (Internet_2).

Az imazalil kémiai neve (IUPAC azonosító): Allil-1-(2,4-diklórfenil)-2-imidazol-1-etil-éter vagy 1-(2-(2,4-Diklórfenil)-2-(2-propeniloxi) etil)-1H-imidazol. Molekula tömege: 297,2 g/mol, összegképlete: $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$. A pH értéke 6,5 és 7,5 közötti, olvadáspontja 52,7 °C, forráspontja >340 °C, sűrűsége pedig 1,06-1,07 g/cm³. Oldhatósága vízben: 180 mg/l (Internet_11).



4. ábra: Imazalil szerkezeti képlete

Az imazalil éghető vegyület, emellett szerves oldószert tartalmazó folyékony formulációi gyúlékonyak lehetnek. Tűzben irritáló, mérgező füstök és gázok (nitrogén-oxid, klorid) keletkeznek belőle. Fizikai megjelenése szerint világossárga-barna kristályos anyag, mely valójában megszilárdított olaj.

Hazánkban az imazalilt csak csávázószerként használják, tiszta formában kizárólag növényorvos írhatja fel. Egyik magyarországi forgalmazója a Makhteshim-Agan Hungary Zrt., mely ORIUS 5 FS termékneven adja el a piacon. A készítmény imazalilt és tebukonazolt is tartalmaz (Internet_11).

2.7 „Szürke” irodalomban fellelhető mosási eljárások citrusfélék fogyaszthatóvá tételére

A citrusfélék, különösképpen a citrom, közkedvelt hozzávalója ételeknek (halak, húsok), süteményeknek (muffin, túróssütemények), italoknak (limonádé, koktélok). A citrusfélék felületi kezeléséről szóló hírek, „rémhírek” szinte már mindenhol eljutottak a világon. Így megjelentek a növényvédőszer eltávolítására javasolt mosási eljárások is.

Ezek közül az egyik például a www.receptindex.com című oldalon található tisztítási mód: „A gyümölcsöt olyan forró folyó víz alá tartjuk, amelyet csak elbír a kezünk, és konyhai célokra használt, tiszta kefével alaposan, gondosan megsikáljuk. Szárazra törölgetjük” (Internet_3).

Egy másik weboldalon talált mosási eljárás ezt írja: „A boltban vásárolt, vegyszerrel kezelt citrusok héjáról 50-75%-ban eltávolítható a vegyszer és a viasz a következő módszerrel: a gyümölcsöket almaecetes hideg vízbe kell áztatni 10-15 percre, majd ezt követően folyó víz alatt dörzsölés szivaccsal vagy kefével lemosni. A gyümölcsök csomagolását semmiféleképpen ne használjuk fel újra, hanem dobjuk ki, és alaposan mossunk kezét” (Internet_4).

A következő felülettisztítási tanács: „Ha fél kiló túróba reszelünk egy kis citromhéjat, akkor az annyira felhígul, hogy valószínűleg mosás nélkül sem lesz bajunk tőle, mert az ember szervezete bizonyos mértékig minden szermaradványt tolerál. Egy tíz évvel ezelőtt készült alapos hazai vizsgálatból az is kiderült, hogy alapos mosással a méreganyagok kilencven százalékát el lehet távolítani a narancsról és a citromról” (Internet_5).

Egy újabb mosási javaslat szerint: „**Mossuk meg jó alaposan!** Ez a tanács nem csak akkor áll, ha a héjat is el akarjuk fogyasztani, hiszen a hámozásnál könnyen a kezünkre, vagy a gyümölcs húsára kerülhetnek a szermaradványok. Akár citrusról, akár banánról legyen tehát szó, bármilyen furán hangzik is, evés előtt mossuk meg jó alaposan a gyümölcsöt, majd a kezünket is!” (Internet_6)

További felülettisztítási módszer leírása: „Mosd meg a citromot hideg vízzel és töröld szárazra egy tiszta ronggyal” (Internet_7).

A következő mosási javaslat leírása: „Mosd meg a citromot hámozás előtt, amihez használj szappant és vizet, hogy eltávolítsd a peszticideket, a viaszt és a színezékeket. Hagyd megszáradni mielőtt meghámozol” (Internet_8).

Egy kutatás során Kruve és mtsi. azt tűzték ki célként, hogy a narancs héján lévő peszticideket kimutassák és olyan mosási módszert fejlesszenek ki, mellyel hatékonyan eltávolíthatóak a növényvédőszer maradványok. A narancsban két fungicid maradvány volt jelen, a tiabendazol és az imazalil. A peszticid maradványokat legnagyobb koncentrációban a héjban tudták kimutatni, kis mennyiségű imazalil pedig a gyümölcsbélben is detektáltak. A meleg vizes és a mosogatószeres mosás eltávolította a tiabendazolt, de az alkalmazott módszerek közül egyikkel sem sikerült eltávolítani teljesen az imazalilt. Ennek oka, hogy a poláris imazalil diffundál a héjba és a héjon keresztül a narancsba is. Így a fogyasztók nem lehetnek benne biztosak, hogy csupán mosással eltávolíthatóak

a post-harvest fungicidek. Egyes növényvédőszer maradványok jelen lesznek a gyümölcsben hámozás után is (Kruve et. al., 2007).

A felsorolt felülettisztítási javaslatok közül még számtalan megtalálható a „szürke” irodalomban, a legtöbb szerint a citromon megtalálható peszticidek vizes mosással és súrolással eltávolíthatóak. A fent leírtak közül kísérleteink során választottunk ki öt különböző mosási eljárást, hogy megállapíthassuk, valóban hatékonyak-e.

3 Célkitűzések

1. Célunk volt, hogy monitorozzuk a Magyarországon beszerezhető citromok fungicid terhelését és képet kapjunk azok összetételéről.
2. Imazalil tartalmú citromminták analitikai vizsgálata két különböző szabvány mintaelőkészítési módszer alapján (MSZ EN 15662 (2009) és AOAC 2007.1 (2007)).
3. Tárolási kísérlet elvégzése az imazalil stabilitásának meghatározására.
4. Citromminták mosási eljárásának összehasonlítása az imazalil eltávolíthatóságának szempontjából.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált vegyszerek és reagensek

A méréseink során alkalmazott nagytisztaságú (99,8%) imazalil vegyületet (és 126 egyéb) referencia növényvédőszer standard, kristályos formában a Sigma-Aldrich cégcsoporttól (Schnelldorf, Németország) rendeltük. A nagy tisztaságú acetonitrillel hígított törzsoldatok töménysége 1000-3000 µg/ml közé esett, melyeket az előállítás dátumával ellátva, -20 °C-on mélyhűtőben tároltunk (felhasználhatóság: 1 év). Később a kalibrációs törzsoldatok elkészítéséhez ezeket a standard oldatokat használtuk fel.

A mintaelőkészítések és a mérések során felhasznált HPLC-tisztaságú acetonitrilt és az n-propanolt a VWR szállította (VWR, Debrecen, Magyarország). Az extrakcióhoz felhasznált sók közül a vízmentes magnézium-szulfát és a nátrium hidrogén-citrát gyártója és szállítója az Alfa Aesar (Karlsruhe, Németország), a nátrium-klorid forgalmazója a Spektrum-3D (Debrecen), a trinátrium-citrátot a VWR szállította (Leuven, Belgium), a vízmentes nátrium-acetát Sigma-Aldrich gyártmányú volt (Saint Louis, USA). A felhasznált PSA-t (primer-szekunder-amin) a Sigma-Aldrich forgalmazza (Saint Louis, USA), a belső standardként alkalmazott TPP-t (trifenil-foszfát) az Acros Organics-tól rendelte az laboratórium (New Jersey, USA), a kísérletek során alkalmazott ecetsav gyártója a Merck KGaA (Darmstadt, Németország), a hangyasavat pedig a Sigma-Aldrich-tól rendelték meg (Saint Louis, USA). A zsíros minták előkészítése során használt hexán forgalmazója J. T. Baker (Deventer, Hollandia).

A citrom mosási eljárások során felhasznált almaecet biológiai eljárással almaborból készült ecet. A termék gyártója a BUSZESZ Ecet Zrt, mely Budapesten található, ecetsavtartalma pedig 5 g / 100 ml. A mosogatószeres mosáshoz Cif Extra Strong Lemon kézi mosogatószeret használtam, aminek forgalmazója az Unilever Magyarország Kft., Budapest.

A hígításoknál és a kromatográfiás elválasztásnál eluensként alkalmazott ionmentes vizet egy Millipore Milli-Q rendszer (Merck-Millipore, Darmstadt, Németország) segítségével állítottuk elő. Az alkalmazott eszközök közül a PP centrifugacsöveket (50 ml, 15 ml), a 0,45 µm átmérőjű PTFE-szűrőket és a felhasznált üvegedényeket (vial) a VWR szállította, a 2 ml-es fecskendők gyártója a Norm-Jecht (Németország).

4.2 Minták és mintaelőkészítés

A kísérletekhez felhasznált citrom mintákat öt különböző kereskedésben szereztük be, a gyümölcsöket a rakodóterekben válogattuk össze, így nem érintkezett más termékekkel, illetve humán eredetű szennyeződésekkel.

A beszerzett citromokból 1-1 kg-ot mértünk ki. Ebből 1 kg-ot egészben, 1 kg citromot pedig meghámozva turmixoltunk le, majd a lehámozott citromhéjat daráltuk le.

A minták előkészítése két, egymástól részben eltérő QuEChERS módszer alapján történt. A nemzetközileg is elfogadott szabvány mintaelőkészítések egyike az AOAC hivatalos módszere, amely 2007-ben lépett hatályba (AOAC; 2007,1). A másik módszer egy újabb, továbbfejlesztett változata az előbbinek. Az MSZ EN 15662 szabványt a Magyar Szabványügyi Testület 2009 márciusa óta magyar nemzeti szabvánnyá nyilvánította (MSZ EN 15662; 2009). Mindkét mintaelőkészítés növényi eredetű peszticid szermaradékok jelenlétének vizsgálatára alkalmas, acetonitriles extrakciót és diszperziós SPE tisztítást követően, LC-MS/MS-rel.

A megfelelő minta kiválasztása után következett a két módszer alapján kapott eredmények közötti különbségek statisztikai elemzése kétmintás t-próbával (n=5).

Az előkészített mintaoldatok imazalil tartalmát (az első mérést is beleszámolva) egy hónapon keresztül heti rendszerességgel visszamértük, hogy megállapíthassuk a célkomponens bomlásának mértékét. A mérésekig a mintákat fagyasztoóban tároltuk -20 °C-on.

4.2.1 AOAC hivatalos módszer alapján elvégzett mintaelőkészítés leírása

A turmixolt citrommintákból (egész citrom, citrombél) 15,0-15,0 g-ot kellett bemérnünk 50 ml-es, kúpos aljú centrifugacsövekbe. A citromhéjból 3,75 g-ot daráltunk le, melyet desztillált vízzel 15 g-ig egészítettünk ki. Mindhárom mintából öt párhuzamos készült. Ezt követően 15,0 ml acetonitrilt (1% ecetsavval), 100 µl TPP-t (50 µl/ml koncentrációjú trifenil-foszfát), 6,0 g vízmentes MgSO₄-ot és 1,5 g vízmentes nátrium-acetátot kellett a bemért mintákhoz adagolni, majd kézzel 1 percen át erőteljesen rázni. Ezután 1 perces centrifugálás következett (>1500 g). A felülúszóból 5 ml-t pipettáztunk 15 ml-es centrifugacsövekbe, amelyek már tartalmaztak 750 mg vízmentes MgSO₄-ot és 250 mg PSA-t. A centrifugacsöveket 30 másodpercig kézzel erőteljesen ráztuk, majd 1 percre centrifugába helyeztük (> 1500 g). A felülúszót (kb. 4 ml) hígítottuk (x5 hígítás = 400 µl mintához 1600 µl Milli-Q vizet adtunk), majd 0,45 µm átmérőjű PTFE szűrőn átszűrtük. A citromhéj és egész minta esetén 5- helyett 50-szeres hígítást alkalmaztunk (x50 hígítás = 40 µl mintához 360 µl ACN-t és 1600 µl Milli-Q vizet adtunk), az így kapott oldatokat standard addícióval kalibrálva mértük.

4.2.2 MSZ EN 15662 szabvány módszer alapján végzett mintaelőkészítés leírása

A turmixolt citrombélből és egész citromból 50 ml-es PP centrifugacsöbe 10,0-10,0 g-ot, a darált citromhéjból pedig 2,5 g-ot mértünk be. A citromhéjat Milli-Q vízzel 10 g-ra egészítettük ki. Minden mintából öt párhuzamost készítettünk. A bemért darálmányokhoz 10,0 ml acetonitrilt és 100 µl TPP-oldatot adtunk, majd kézzel erőteljesen ráztuk 1 percen keresztül. Ezután történt a

sókeverék (4 g vízmentes MgSO_4 , 1 g nátrium-klorid, 1 g trinátrium-citrát, 0,5 g dinátrium hidrogén-citrát) hozzáadása az oldatokhoz. A savas közeg miatt 600 μl nátrium-hidroxiddal korrigáltuk a minták pH-ját. Ezt követte a centrifugacsövek erőteljes rázása kézzel 1 percen át, majd 5 perces centrifugálás ($> 3000 \text{ g}$). A felülúszó 15 ml-es centrifugacsövekbe került, amelyeket egy éjszakára mélyhűtőbe helyeztünk a zsír és a viasz kifagyasztásához. Másnap az acetonitriles extraktumokból 6 ml-t pipettáztuk 15 ml-es PP centrifugacsövekbe, melyek már tartalmaztak 150 mg PSA-t és 900 mg MgSO_4 -ot. Ezután 1 perces erőteljes rázás következett kézzel, majd 5 perces centrifugálás ($> 3000 \text{ g}$). A tisztított extraktumokból 4 ml-t csavaros fedelű üvegcsékbe töltöttünk át, amelyhez 40 μl acetonitrilt adagoltunk, amely 5% hangyasavat tartalmazott. A bélzet minta esetén 5x, a héj és egész gyümölcs minta esetén 50x hígítást követően 0,45 μm átmérőjű PTFE szűrőn átszűrt oldatokat használtuk fel a műszeres analízishez.

4.2.3 Különböző citrom mosási technikák alkalmazása az imazalil eltávolítására

Egy további kísérlet során a citromhéjban lévő imazalil eltávolíthatóságának mértékét vizsgáltuk ötféle lemosási eljárás után. A kereskedelembe vásárolt citromokból 0,8 kg-ot mértünk ki (8 db). Az első 0,8 kilót mosás nélkül hámoztuk meg, ez volt a kontroll minta. A következő 0,8 kg citromot egyesével hideg víz alatt 20 másodpercen keresztül tisztítottunk kézzel. A harmadik adagot dörzsi szivaccsal súroltuk hideg folyóvíz alatt, minden egyes darabot 20 másodpercig. A negyedik 0,8 kg minta 5%-os almaecetben ázott 10 percig, majd folyó hideg víz alatt dörzsi szivaccsal minden darabot 20 másodpercig súroltunk. Az utolsó 0,8 kg citrusminta minden darabját mosószeres szivaccsal dörzsöltük folyó hideg víz alatt 20 másodpercen át. Az előkezelt minták héját hámozás után MSZ EN 15662 számú módszer (2009) alapján készítettük elő a fent leírtak alapján ($n=5$).

4.3 Felhasznált statisztikai módszerek

A két szabványmódszer (MSZ EN 15662 (2009) és AOAC (2007)) összehasonlításához a különbözőképpen előkészített citromhéj minták, egész citrom minták és citrom bélzet minták mért értékeit kétmintás párosítatlan t-próbával hasonlítottuk össze.

A mosások összehasonlításához egy utas ANOVA-t használtunk, melynek kiegészítő próbája a Welch-teszt. Ez arra szolgál, hogy megállapítsuk, hogy a vizsgált csoportok szórásai szignifikánsan nem térnek el egymástól. Tucky vagy Fisher tesztel vizsgáltunk meg a páronkénti szignifikáns differenciát.

4.4 Standard addíció kalibrációs adatainak összeállítása mennyiségi mérésekhez

A standard sort 10,0 ml-es mérőlombikokban készítettük el. A rendelkezésre álló 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú imazalil törzsoldatból 0 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml koncentrációjú

standard oldatokat készítünk úgy, hogy az oldószer összetétel 20:80 V/V arányban tartalmazzon acetonitrilt és Milli-Q vizet. Az összetevők közül először a megfelelő mennyiségű acetonitrilt, majd a törzsoldatot pipettázuk a mérőlombikba, amelyet ezután vízzel jelre töltünk. Az oldatok összeállítását az alábbi táblázat mutatja.

2. Táblázat: Imazalil munkaoldatok elkészítéséhez szükséges összetevők és mennyiségük

Imazalil munkaoldat (ng/ml)	Acetonitril (μl)	Milli-Q víz (μl)	Imazalil törzsoldat (μl)
0	2000	~ 8000	0
250	1750	~ 8000	250
500	1500	~ 8000	500
750	1250	~ 8000	750

A hígított, szűrt, áttetsző, zavarosságtól mentes citrommintákból standard addícióval kalibrációs sort készítettünk a fenti táblázat (2. táblázat) alapján összeállított imazalil munkaoldatok segítségével. 2 ml-es autosampler edényekbe 300 μl mintát mértünk ki, ezekhez 75 μl-t pipettázunk a megfelelő koncentrációjú kalibrációs munkaoldatokból (0 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml. Így 0 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml és 150 ng/ml töménységű standard addíciós pontokat kaptunk.

4.5 HPLC-ESI-Q³-MS

A különböző mintaelőkészítéseket követte a célkomponens (imazalil) kvantitatív meghatározása, melyeket egy Agilent 1100-as típusú (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) nagyhatékonyságú folyadékkromatográf (HPLC) rendszerhez kapcsolt hibrid lineáris ioncsapdás hármaskvadrupól elrendezésű MS/MS készülék segítségével hajtottuk végre (Applied Biosystems 3200 QTRAP LC/MS/MS system). A tandem tömegspektrométerhez tartozott egy TurboV IonSpray ESI ionforrás, melyet pozitív ionizációs módban használtunk. Az ionforrásban, illetve az ütközési cellában inert nitrogén gázt alkalmaztam. A kapcsolt rendszer irányítása, a mérési adatok rögzítése és feldolgozása az Analyst szoftver 1.4.2. verziójának segítségével történt.



5. ábra: Applied Biosystem 3200 QTRAP MS/MS műszer

A HPLC rendszer gáztalanító egységből, bináris gradiens pumpából, szabályozható oszlop termosztátból, és automata mintaadagolóval felszerelt injektor egységből állt. A mintaoldatok elválasztásához felhasznált oszlop paraméterei: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8; 4,6 x 150 mm, 5 μ m, melyhez tartozott egy azonos töltetű előtét oszlop. A fűthető oszlop 30 °C-ra volt temperálva a mérések során. Az alkalmazott eluensek összetételük szerint az „A” eluens 99,9%-ban tartalmazott nagytisztaságú Milli-Q vizet + 0,1% (v/v) LC-MS tisztaságú hangyasavat, míg a „B” eluens 100% nagytisztaságú (gradiens fokozatú) acetonitrilből állt. Az injektált mintaoldatokban minden esetben 20%-os volt az ACN aránya. Az oszlopra injektált mintamennyiség 10 μ l volt.

3. Táblázat: Gradiens elúciós program

Idő (perc)	Áramlási sebesség (μ l/perc)	„A” eluens (%)	„B” eluens (%)
0	600	80	20
3	600	80	20
33	600	0	100
36	600	0	100
36,1	600	80	20
45	600	80	20

A HPLC-ESI-Q³-MS-t MRM módban használtunk az imazalil peszticid azonosítására, ami úgy történik, hogy az első kvadrupolban (Q1) kiválasztott molekulaionból (ami az általunk alkalmazott pozitív ion módban leggyakrabban $[M+H]^+$) a második kvadrupolban (Q2) a megfelelő feszültség és nitrogéngázzal való ütköztetés után fragmens ionok keletkeznek, melyekből a harmadik kvadrupol (Q3) tömegszűrője csak a kiválasztott iont engedi a detektorba. A célkomponens (imazalil) és a belső standardként alkalmazott TPP mért anyaionjai, valamint azok fragmensei, illetve a műszer optimált paraméterei a 4. Táblázat-ban láthatóak.

4. Táblázat: A célkomponens és a belső standard anya-, leányion átmenetei és a készülék optimált paraméterei

Hatóanyag	M	[M+H] ⁺	fragmens	DP	EP	CEP	CE	CXP	R _t , (min)
Imazalil	297,2	297	201,0	46	4	14	23	4	13,6
Imazalil			159,0				31	4	
TPP	326,0	327,2	152,2	61	12	17	43	4	26,7
TPP			215,0				33	4	

A HPLC-ESI-Q³-MS kapcsolt rendszer megfelelő működtetéséhez szükséges egyéb tényezőit és azok pontos értékeit a 5. Táblázat szemlélteti.

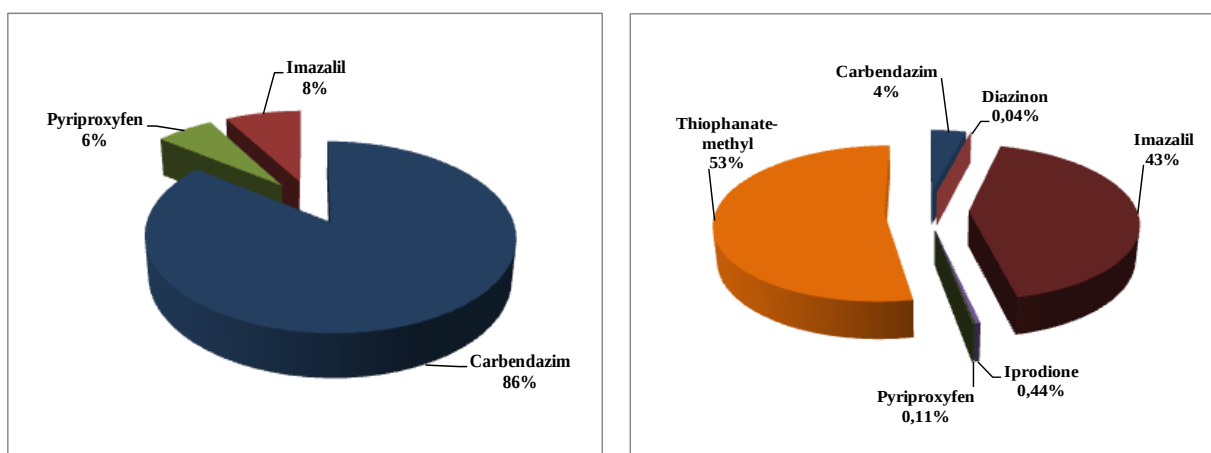
5. Táblázat: HPLC-ESI-Q³-MS egyéb paraméterei

Paraméter	Érték
Ionizációs mód	pozitív
Függöny gáz nyomása	10 psi
Ütközési gáz nyomása	5 psi
Ionforrás feszültség	5500V
Hőmérséklet (ionforrás)	450°C
Ionforrás porlasztó nyomása Gáz-1	50 psi
Ionforrás porlasztó nyomása Gáz-2	50 psi

5 Eredmények

5.1 Mintakiválasztás

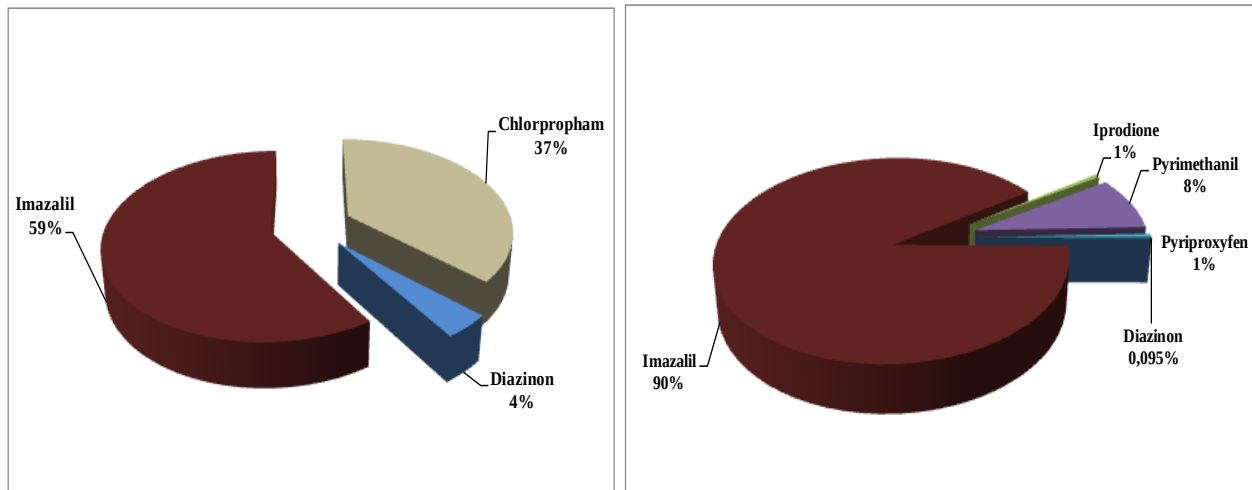
A növényvédőszer-maradványok meghatározására kidolgozott szabvány mintaelőkészítések (AOAC, 2007; MSZ EN 15662, 2009) összehasonlításához kiválasztottuk a megfelelő citrommintát. Öt különböző kereskedelmi egységben kapható gyümölcsmintát szereztünk be, melyek a forgalmazó tájékoztató címkéje szerint imazalillal voltak kezelve. Az előkészített mintaoldatoknak megmértük az összes peszticid (növényvédőszer-maradék) tartalmát. 100%-nak a különböző helyről származó mintákból mért összes fungicid koncentrációjának összegét tekintettük. Az alábbi kördiagramok a peszticidek csupán százalékos megoszlását mutatják az egyes citrommintákban. Noha a kimutatott növényvédőszerek különböző toxicitással bírnak, ezáltal eltérő MRL értékek taroznak hozzájuk, az alábbi ábrákon ez nem kapott kitüntetett figyelmet.



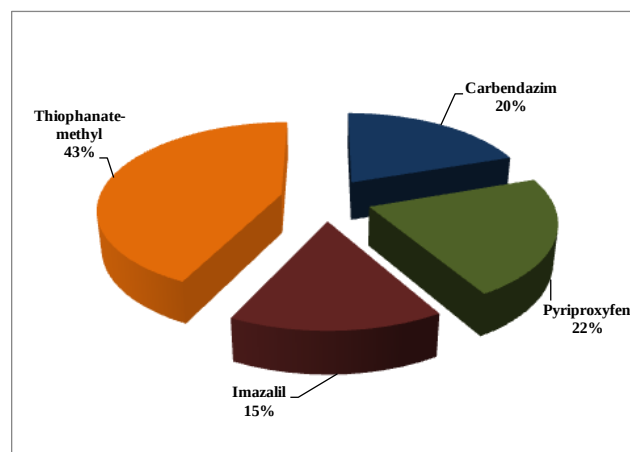
6-7. ábra: 1. és 2. számú kereskedelmi egységből származó citrommintából mért peszticidek előfordulási aránya

Az ábrákon megfigyelhető, hogy a citrommintákban jelen voltak az imazaliltól különböző peszticidek is, holott a csomagoláson kívül egyéb növényvédőszer nem volt feltüntetve felhasznált gombaölőszerként. A 6. ábrán az is látszik, hogy a carbendazimhoz képest csak elhanyagolható mennyiségben tartalmazta az 1. számú kereskedésben vásárolt citromminta a keresett célfungicidet (8%). A 2. számú üzletben vásárolt gyümölcsmintában már jelentősebb volt a kimutatott imazalil koncentráció (43 %) az összesen mérhető peszticid terhelésből, de ebben a mintában sem a célkomponens volt a jellemző növényvédőszer, hanem a thiophanate-methyl (53%), amely szintén nem volt feltüntetve a hálós csomagolóanyagon. A 3. számú kereskedelmi egységből származó minta kördiagramján (8. ábra) egyértelműen látszik, hogy a minta peszticid terhelésének 59%-át a célpeszticid adta, bár jelentős volt a csomagoláson nem jelzett chlorpropham aránya is (37%). A 4. számú forgalmazótól sikerült olyan citrommintákat beszerezni, amelyek mért össz-peszticid tartalmának 90%-át a vizsgálandó imazalil adta. Ugyan ebben a mintában is fellelhetőek voltak

egyéb peszticidek, de csak elhanyagolható mennyiségben. Az 5. számú kereskedésből származó mintában mért növényvédőszer legnagyobbat részét (43%-át) a thiophanate-methyl tette ki, emellett jelentős volt a carbendazim (20%) és pyriproxyfen (22%) tartalma is. A keresett célkomponens csupán 15%-át adta az ebben a mintában kimutatott fungicideknek.



8-9. ábra: 3. és 4. számú kereskedelmi egységekből származó citrommintából mért peszticidek aránya

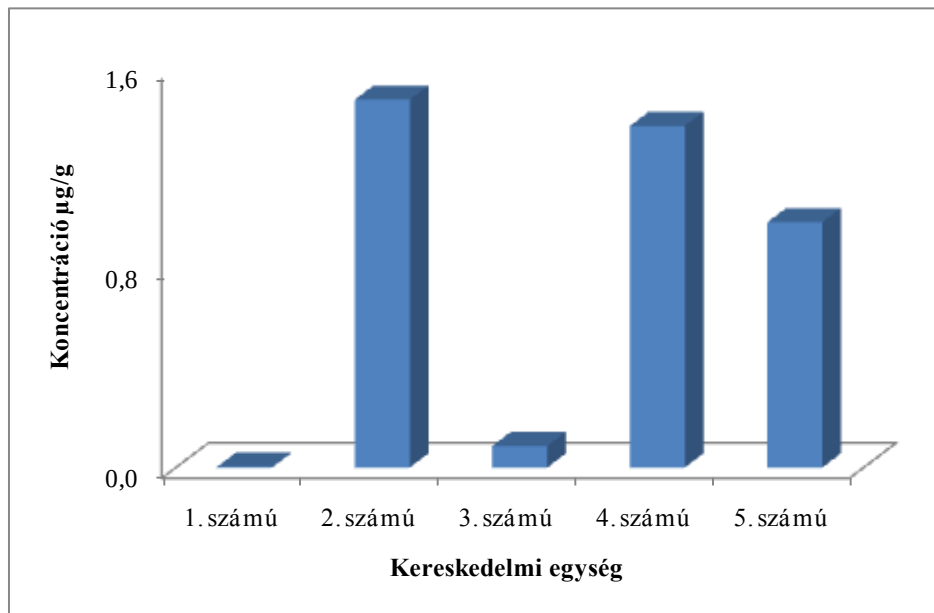


10. ábra: 5. számú kereskedelmi egységből származó citrommintából mért peszticidek aránya

A fenti kördiagramok segítségével viszonylag átfogó képet kaptunk a beszerzett minták peszticid tartalmáról és arról, hogy melyik minta lesz számunkra a megfelelő a további kísérletek során. Ezek után meghatároztuk az öt különböző forgalmazótól származó gyümölcsök pontos imazalil koncentráció értékeit (11. ábra).

A két szabványmódszer összehasonlításához szükséges kísérletekhez azt a mintát választottuk ki, amelynek imazalil tartalma a legnagyobb. A 2. és 3. számú kereskedelmi egységből származó citromminták között nem volt nagy eltérés az imazalil koncentrációk nagyságát illetően, így mind a kettő megfelelő lenne a későbbi mérésekhez. Azonban, ahogy azt a 11. ábra is szemlélteti, az öt eredmény közül a 3. számúból mért koncentrációérték emelkedett ki a legnagyobb

mértékben, így ezt választottuk a további vizsgálatokhoz alapanyagként. A fent leírtak alapján elmondható, hogy noha a magyar előírás szerint a forgalmazók kötelezve vannak arra, hogy feltüntessék az alkalmazott kezelés paramétereit (Internet_10), ezt gyakran elmulasztják vagy tévesen teszik, így félrevezetve a fogyasztót. A kördiagramokon feltüntetett peszticidek közül post-harvest szerként az imazalilt, carbendazim, thiophanate-methyl, pyrimathanilt tartják számon.

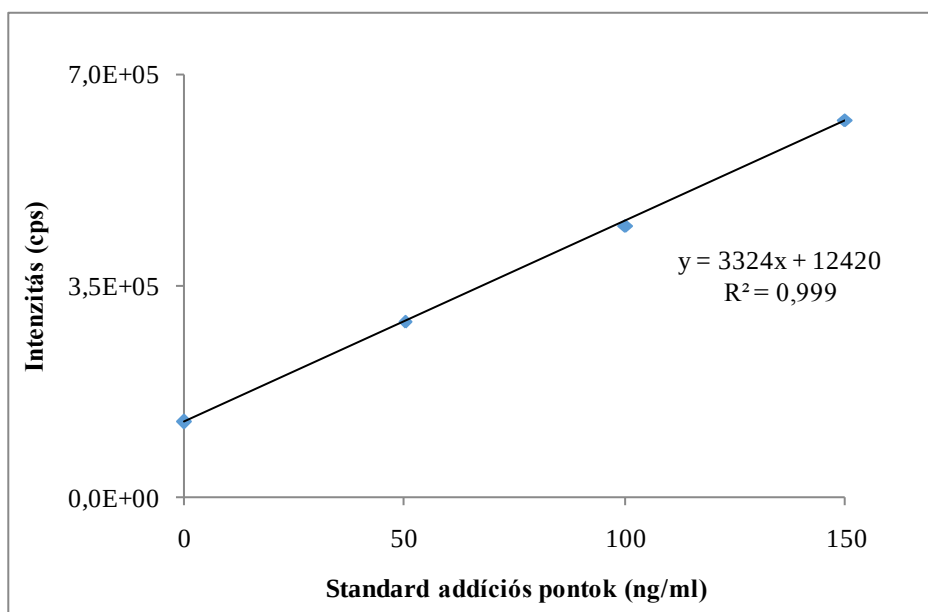


11. ábra: Különböző kereskedelmi egységekből származó citromminták imazalil tartalma

Megjegyzendő, hogy a különböző helyről származó citromminták mért imazalil tartalma nem haladta meg a célkomponensre vonatkozó MRL határértéket, mely a jelenlegi szabályozás szerint 5 µg/g.

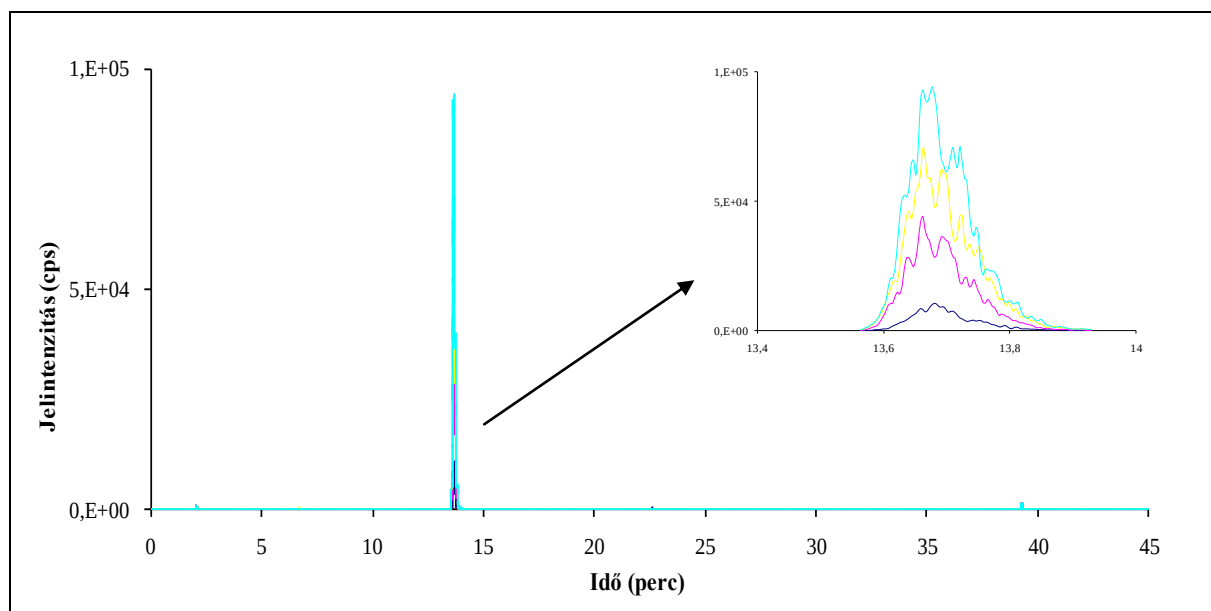
5.2 AOAC (2007) és MSZ EN 15662 (2009) szabványmódszerek összehasonlítása

A megfelelő imazalil koncentrációjú citrom kiválasztása és beszerzése után a két összehasonlítandó mintaelőkészítési szabvány módszer alapján elkészítettük a mérendő mintaoldatokat a különböző mintarészekre (egész gyümölcs, héj, bélzet), minden esetben öt párhuzamossal dolgozva. Standard addícióval állapítottuk meg a műszeres mérés érzékenységét a kapott értékekre illesztett kalibrációs egyenes alapján. Ezek közül az MSZ EN 15662 szabvány alapján citromhéjból előkészített mintákhoz tartozó kalibrációs görbét ábrázolja a 12. ábra.



12. ábra: MSZ EN 15662 módszer alapján előkészített citromháj imazalil addíciós értékeihez tartozó analitikai mérőgörbe

Az alábbi ábra (13. ábra) ugyanezen minta standard addíciós pontjain felvett csúcsait mutatja. Az imazalil retenciós ideje 13,5 - 14 perc közötti, ahogy az a kromatogramon is látszik. Kiemelve a 13,5-14 perc közötti intervallumot megfigyelhető, hogy a hozzáadott különböző koncentrációjú imazalil standardek addíciós pontokhoz (0 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml) tartozó csúcsok intenzitása jól elválik egymástól. Szemmel láthatóan megfelelő a készülék érzékenysége, ahogy a választott hígítás mértéke is, hiszen az összefüggés lineáris.



13. ábra: HPLC-ESI-QQQ-MS kromatogram az imazalil célkomponensre

Az összesített eredményeket, melyeket az első mérés (0. hét) során kaptunk, az alábbi táblázat foglalja össze (6. táblázat). Az elkészített analitikai mintákat a műszeres mérés előtt nem tároltuk fagyasztóban, hanem a mintaelőkészítést követően azonnal mértük HPLC-ESI-MS-rel.

A 6 táblázatban látható oszlopok közül az első a két összehasonlítandó módszert, a második a különböző mintarészek megnevezését tartalmazza, emellett látható adott az mintaegységből meghatározott imazalil koncentráció öt párhuzamosból mért átlaga $\mu\text{g/g}$ mértékegységben megadva. A célkomponens mennyiségi értékeinek összehasonlításához egyéb paraméterek is szükségesek, ezért megállapítottuk a belső standard RSD%-át. A belső standardet nem az értékek korrigálásához használtuk fel, hanem a mintaelőkészítés és a műszeres mérés jóságának monitorozásához. Az imazalil RSD%-nak kiszámítására azért volt szükség, hogy képet kapjunk az extrakciós stabilitás határfokáról. A meredekség adott mintamátrixra a jelintenzitás, koncentráció összefüggését mutatja meg, azaz a mérés érzékenységet. A determinációs együttható (R^2) a kalibrációs pontokra illesztett lineáris függvény pontosságát adja meg.

A fenti szempontok alapján megfigyelhető, hogy a citromhéj imazalil koncentrációjának átlaga volt a legnagyobb mindkét módszer esetén, a citrombélben ennek majdnem csak tizede volt detektálható. Ezen kívül megállapíthatjuk, hogy az egész citromban mért imazalil koncentráció közel ötöd annyi, mint a citromhéjban.

6. táblázat: A két összehasonlítandó szabvány alapján előkészített minták 0. héten mért adatai

Módszer	Minta	Imazalil átlag ($\mu\text{g/g}$)	TPP RSD%	Imazalil RSD%	Meredekség	R^2
AOAC (2007)	Citromhéj	7,46	1,98	4,69	3442	0,997
	Citrombél	0,10	1,47	4,22	3679	0,999
	Egész citrom	0,98	7,16	24,07	3694	0,990
MSZ EN (2009)	Citromhéj	9,32	2,27	4,41	3324	0,999
	Citrombél	0,12	3,84	2,91	3484	0,998
	Egész citrom	2,03	5,87	2,79	3161	0,996

Feltehetően a vizsgált módszerek alapvető különbségét az első extrakciós lépés során alkalmazott eltérő pufferek adják. Ez az AOAC (2007) szabvány esetén a nátrium-acetát, amelyet felhasználva a keletkezett kivonat pH értéke 4,5. A citrát-pufferelt QuEChERS mintaelőkészítéssel (MSZ EN 15662) a mintaoldat kémhatása $\text{pH} = 5,5$. Ezen kívül az új módszer előírja, hogy a savas minták esetén az első kisózásnál NaOH-dal lúgosítsuk az oldatot, illetve a végső extraktumot hangyasav hozzáadásával savanyítsuk. Többek közt a felsorolt eltérések miatt kaphattuk a táblázatban (6. táblázat) összefoglalt eltérő eredményeket, miszerint az MSZ EN (2009) mintaelőkészítést követő minták imazalil koncentrációja nagyobb, mint az AOAC (2007) módszer alapján előkészítetteké. Továbbá megemlítendő, hogy az AOAC módsszerrel mért egész

citromminták RSD% értéke 20%-nál nagyobb volt, ami a gyakorlatban azt jelenti, hogy az 5 párhuzamos mérése során a legkisebb mért koncentráció 0,64 µg/g, a legnagyobb pedig 1,24 µg/g volt, noha a belső standard (TPP) RSD%-a nem haladta meg a 10%-ot sem. Ezek alapján az AOAC módszerrel egész citromra végzett QuEChERS mintaelőkészítés nem szolgáltatott számunkra kellően reprodukálható kinyerési hatásfokot. A szakirodalomban talált tudományos értekezések közül Lehotary és mtsi. kutatómunkája a citrusfélék vizsgálatára irányul, mely szerint nem volt lényeges különbség a hozzáadott növényvédőszer tartalmazott minták két különbözőképpen puffertelt változata között (Lehotay et. al., 2010).

A kétféle mintaelőkészítés során egyéb eltérések is megfigyelhetők voltak, mint például az elkészített végső analitikai minták eltérő színe. Ahogy a 14-15. ábrák mutatják a régebbi AOAC (2007) szabvány módszer alapján citromhéjból és citrombélből elkészített mintaoldatok nem sárgás színűek. Érdekes, hogy azonos kiindulási alapanyagból, ugyanezt a módszert alkalmazva az egész citrom végső extraktumának egyik-másik párhuzamosa különböző mélységű sárga színű lett.



14. ábra: AOAC (2007) módszer alapján előkészített citromminták végső kivonatai

Ezzel szemben az MSZ EN 15662 módszerrel előkészített extraktumok közül csak a citromhéj minták voltak színtelenek. Ennek oka a pH stabilitása vagy éppen a különbözősége lehet.



15. ábra: MSZ EN 15662 módszer alapján előkészített citromminták végső kivonatai

A mintaoldatok elszíneződése mellett azt vettük még észre, hogy a régebbi módszer (AOAC (2007)) által előírt centrifugálások során, a kisebb fordulatszám és a rövid kezelési idő miatt, a felülúszó kevésbé vált el az extrakciókhoz felhasznált sóktól, mint az újabb módszer MSZ (2009) alapján centrifugált mintáknál, melyekre nagyobb fordulatszámú és hosszabb idejű eljárás volt előírva. Ez pedig azt eredményezte, hogy kevesebb felülúszó keletkezett a régi szabvány módszer szerint előkészített mintákból. Mindez azért okozott problémát, mert így nem lehettünk benne teljesen biztosak, hogy az általunk számolt térfogatok megegyeznek-e a tényleges térfogatokkal.

A mintaelőkészítési szabványos módszerek további összevetéséhez és jóságuk vizsgálatához anyagmérleget készítettünk. Ehhez arra volt szükség, hogy a mintaelőkészítés megkezdése előtt lemérjük a beszerzett 1 kg citrom pontos tömegét, valamint 1 kg citrom héjának és bélzetének konkrét mennyiségét. Ezután az ismert mintarész tömegeket megszoroztuk az azokból mért, majd kvantitatívan meghatározott imazalil koncentrációkkal. Ezután az egész mintára kapott összes imazalil mennyiséget hasonítottuk a bélzetre és héjra kapott imazalil mennyiségének összegével. A kapott eredményeket a 7. Táblázat mutatja. Az AOAC módszerrel előkészített minták esetén a héj és a bélzet mintarészekben található imazalil mennyisége összesen 2,342 mg volt. Ezzel ellentétben az egész gyümölcsre számolva 1,138 mg, ami kevesebb, mint a fele a vártnak. Az MSZ (2009) mintaelőkészítéssel pontosabb anyagmérleget kaptunk. A mintarészekben mért összes imazalil mennyiségének összege 2,919 mg lett, az egész citromra meghatározott mennyiség pedig 2,354 mg, ami azonosnak tekinthető, figyelembe véve a szórás mértékét és a tömegkorrekciónál használt szorzó számokat.

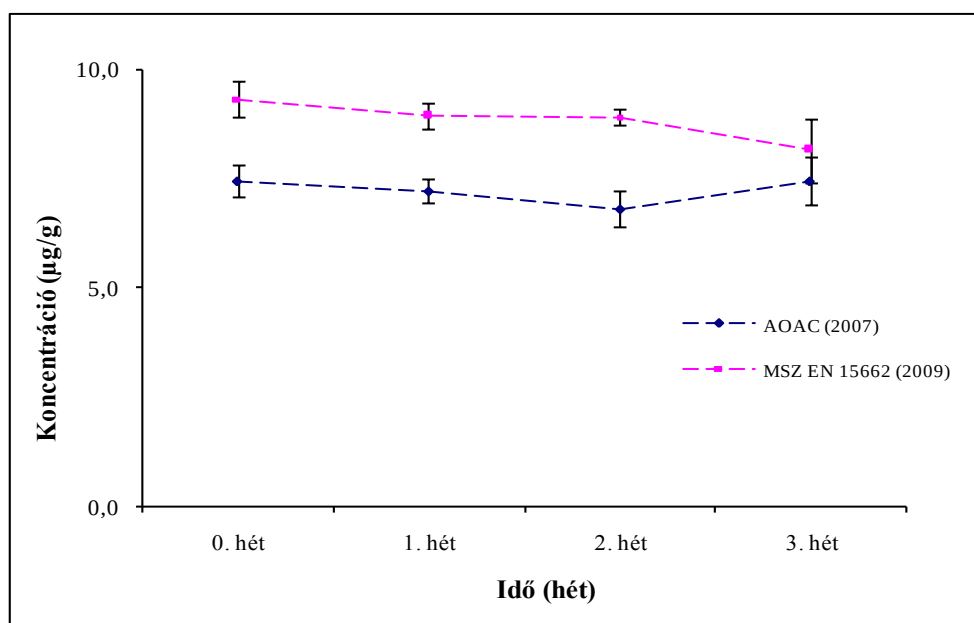
7. Táblázat: Két különböző módszerrel mért imazalil koncentráció alapján számított anyagmérleg a különböző mintarészekre

Mintarész megnevezése	Mintarész össztömege (mg)	mg imazalil/Mintarész AOAC (2007) szerint	mg imazalil/Mintarész MSZ (2009) szerint
Bélzet	855880	0,087	0,102
Héj	302200	2,256	2,818
Bélzet + Héj	1158080	2,342	2,920
Egész citrom	1158080	1,139	2,355

A módszerek összehasonlításának további szempontja alapján az elkészített, szüretlen végső mintaoldatokat fagyasztóban helyeztük el, majd (az első mérést is beleszámolva) egy hónapon keresztül hetente egyszer visszamértük az imazalil koncentrációt. Mind a citromhéj, az egész citrom és a citrombélzet imazalil koncentrációváltozását nyomon követtük az idő folyamán $n=5$. A 16. 17. és 18. ábrán jelölt hibasávok a mérések során elkészített öt párhuzamos ± 1 szórását mutatják. A 16.

ábrán a citromhéj imazalil-koncentrációjának változása látható az idő folyamán. A diagram alapján elmondható, hogy a négy hetes, fagyasztóban történő tárolás során az AOAC mintaelőkészítés alapján készült mintákban lévő célkomponens nem szenvedett jelentős bomlást (0,1%). Az ábrán megfigyelhető ugyan kisebb mértékű folyamatos koncentrációcsökkenés, de ezt okozhatta a szórás is. Az MSZ módszer szerinti mintaelőkészítés esetén a hűtés hatására nagyobb mértékben bomlott az imazalil (12,5%).

A két módszerrel a 0. héten mért imazalil koncentráció értékeit is kétmintás párosítatlan t-próbával hasonlítottuk össze, hogy megállapíthassuk van-e szignifikáns különbség az eredmények között. A P érték kisebb, mint 0,0001, azaz 95%-os konfidencia intervallum mellett az értékek között *szignifikáns eltérés* van.

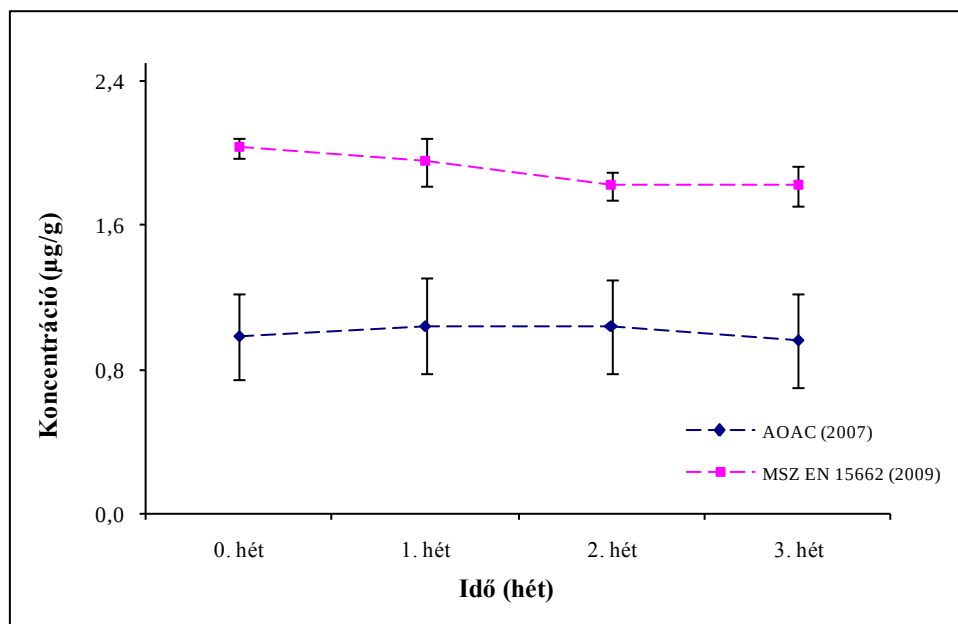


16. ábra: Imazalil-koncentráció változása citromhéjból készített növényi kivonatban 1 hónap alatt

A 17. ábra egész citromból előkészített minták koncentrációváltozását mutatja. Az AOAC módszer esetén a bomlás mértéke 2,3%. Ahogy az már az előző ábrán is látszott, itt sem volt észlelhető számottevő imazaliltartalom csökkenés. A kismértékű koncentráció-csökkenés a hetek elteltével valószínűleg szórás jellegű. Viszont az MSZ metód szerint készült minták imazalil-koncentráció csökkenése 10,3%, ami már jelentősebb mennyiségnek tűnik. Ezen a diagramon szembetűnő különbség a két módszer mintái közt, hogy az AOAC (2007) metód szerint elkészített minták szórása jóval, akár háromszor, négyszer nagyobb, mint az MSZ (2009) szabvány alapján készült oldatokhoz tartozó szórás. Ennek az eltérésnek több oka lehet, például a hibás mintaelőkészítés, illetve a pH befolyásoló hatása a mérések során. Mivel minden mintából öt párhuzamos készült, így nem valószínű, hogy hibás volt az összes minta előkészítése. Elképzelhető, hogy ezeket az eredményeket is a savas pH hatásának tulajdoníthatjuk. Megjegyzendő az is, hogy

az egész citrom mintaelőkészítése során kevesebb citromhéj kerül az mintaoldatokba, annak ellenére, hogy a citromokat igyekeztünk a lehető legjobban homogenizálni.

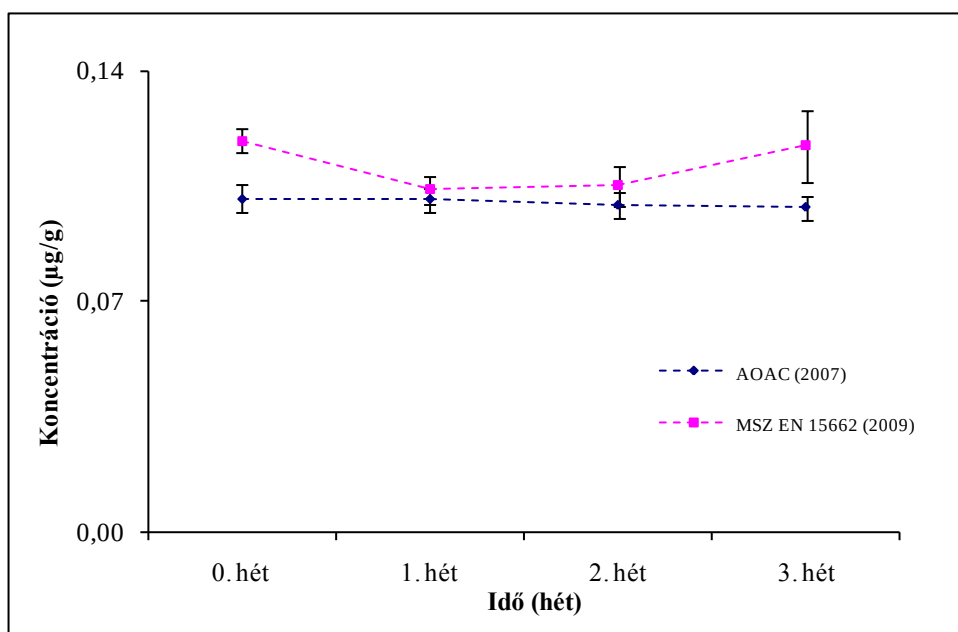
A felhasznált mintaelőkészítési módszerekkel a 0. héten mért értékek közül az MSZ EN 15662 szabvány alapján készült minták célkomponens tartalma nagyobb eredményeket adott, mint az AOAC szerint előkészített mintáké. Annak megállapítására, hogy a kapott értékek között van-e jelentős eltérés, kétmintás párosítatlan t-próbát használtunk. A számolt eredmények alapján ($P > 0,0001$) elmondható, hogy a mért koncentrációértékek között, 95%-os konfidencia intervallum mellett, *szignifikáns eltérés* van.



17. ábra: Imazalil-koncentráció változása egész citromból készült kivonatban 1 hónap alatt

A citrombélből készült mintákból mértük legkisebb mennyiségben a célkomponenst (18. ábra). A bélzetben csaknem század annyi imazalilt határoztunk meg, mint a citromhéjban. Ennek valószínűleg az az oka, hogy az imazalil felületkezelő post-harvest növényvédőszer, amely nehezen jut át a citrom vastag, viaszos héján (Oliveira et. al., 2000). Itt sem volt észlelhető számottevő imazalil-koncentráció csökkenés, ahogy azt az ábra is mutatja: az értékek változása szórás jellegű. A feltételezhető imazalil bomlás mértéke AOAC esetén 2,8%, míg az MSZ módszer alapján készült minták esetén 1,4%-ra tehető.

A két szabványmódszer összehasonlításához a citrombélből készült minták mért imazalil koncentráció értékeit is megvizsgáltuk kétmintás párosítatlan t-próbával. Ebben az esetben is azt az eredményt kaptuk, hogy 95%-os konfidencia intervallum mellett az értékek *szignifikánsan eltérnek* egymástól ($P > 0,0001$).



18. ábra: Imazalil-koncentráció változása citrombélből készített kivonatokban 1 hónap alatt

A két módszer összehasonlítása során, a kapott eredmények alapján elmondható, hogy az MSZ EN 15662 szabvány módszerrel előkészített citrommintákból tudtuk pontosabban kimutatni az imazalil koncentrációját. Éppen ezért a további kísérletek során az MSZ módszer szerint készítettük elő a mintákat.

A fentiekben megállapítottuk, hogy a tárolási kísérlet kezdeti és végpontjai közötti koncentráció csökkenés csupán szórás jellegű, ennek igazolása érdekében kétmintás párosítatlan t-próbát végeztünk a minden egyes mintarész esetén, alkalmazott módszerenként a 0. illetve a 3. héten mért adatokra. A kapott P értékeket az alábbi táblázatban foglaltuk össze.

8. táblázat: Kétmintás t-próbák P értékei a tárolási kísérlet kezdeti és végpontjaira kalkulálva

Mintarész	AOAC (2007) P érték	MSZ EN (2009) P érték
Citromhøj	0,9899	0,0146
Egész citrom	0,8875	0,0062
Citrombél	0,2082	0,8915

Ezek alapján igazolást nyert az állítás, miszerint az AOAC módszerrel mért mintarészekben lévő imazalil koncentráció a tárolás során szignifikánsan nem csökkent. Ugyanez mondható el az MSZ mintaelőkészítéssel előállított citrombél analitikai kivonat esetén is, ugyanakkor a citromhøj és egész citrom növényi kivonatai statisztikailag bizonyítható koncentráció csökkenést szenvedtek el 95%-os szignifikancia szinten.

5.3 Különböző mosási eljárások hatékonyságának vizsgálata

A „szürke” irodalomban talált különböző mosási módszerek (2.7 fejezet) megfelelőségének ellenőrzésére olyan citrommintát kellett beszerezni, melynek felülete nem érintkezett az adott kereskedelmi egység eladótérében semmilyen egyéb szennyeződéssel (vásárlók kezén lévő szennyeződés, zsír), továbbá biztosan egy mintatömegből származott, így közelítően homogén volt a felületen lévő növényvédőszer bevonat. Érdemes megjegyezni, hogy a forgalmazók közül csak egy helyen voltak hajlandók számunkra olyan gyümölcsmintát biztosítani, melyet közvetlenül a rakodótérből hozhattunk el.

Először is meg kellett vizsgálnunk, hogy az adott minta valóban imazalillal lett-e kezelve, hiszen a korábbi tapasztalatok alapján ebben nem lehettünk biztosak, annak ellenére, hogy a csomagoláson a célkomponens volt feltüntetve. Így meghatároztuk a mintában lévő összes peszticid mennyiséget. A mérések során azt az eredményt kaptuk, hogy a beszerzett citromminta imazaliltartalmának aránya a többi peszticidhez képest több mint 99%, emellett az imazalil koncentráció (3,79 µg/g) is a mennyiségileg megfelelően meghatározható tartományba esett. A kapott értékek alapján úgy döntöttünk, hogy a mért minta alkalmas lesz a további kísérletekhez.

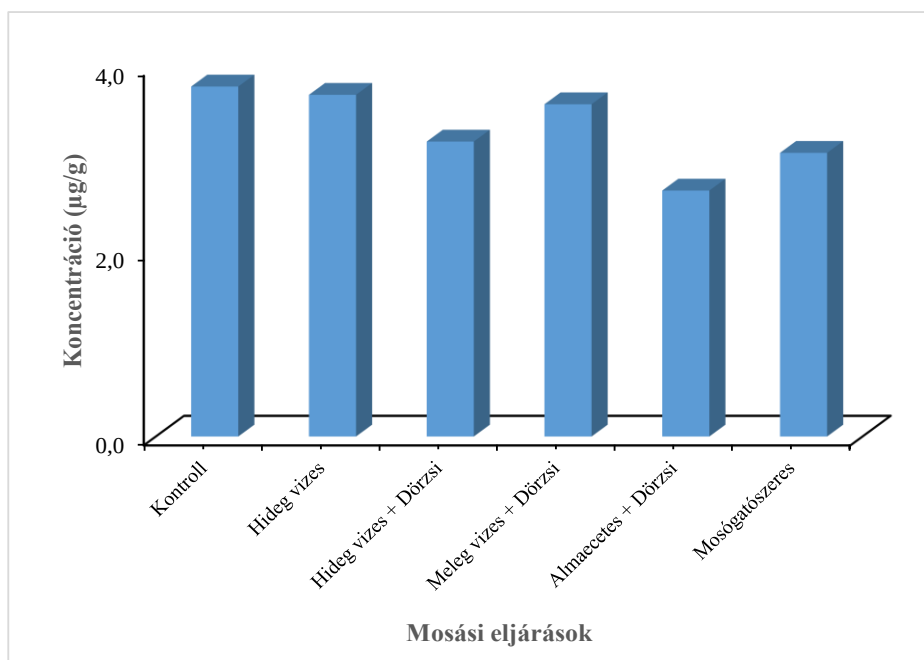
Ahogy azt az Anyagok és módszerek című részben (4. fejezet) részletesen leírtuk, hogy a mosási mintaegységek 8 db citromot tartalmaztak, amire azért volt szükség, hogy a felületi inhomogenitásbeli különbségeket kiküszöböljük. Ezután elvégeztük a különböző tisztítási technikákat a citromok felületén, majd visszamértük a célkomponens tartalmukat. A kapott eredményeket az alábbi táblázatban (9. táblázat) foglaltuk össze.

9. táblázat: A különböző mosási technikák alkalmazását követően mért imazalil értékek

Módszer	Mosási technika	Imazalil átlag (µg/g)	Imazalil RSD%	TPP RSD%	Meredekség	R ²
MSZ EN (2009)	Kontroll	3,79	5,36	7,90	3170	0,999
	Hideg vizes	3,70	5,43	5,35	3652	0,994
	Hideg vizes + Dörzsi	3,19	4,58	6,60	3264	0,996
	Meleg vizes + Dörzsi	3,60	4,60	4,75	3196	0,999
	Almaecetes + Dörzsi	2,66	5,51	10,11	3452	0,995
	Mosogatószeres	3,07	6,78	2,91	3004	0,972

Minden minta esetén öt párhuzamost készítettünk, a fenti táblázatban a kapott értékek átlaga látható. Az imazalil-koncentráció értékei alapján számolt RSD%-ok sehol nem érik el a 10%-ot, ami azt jelenti, hogy kellően reprodukálható kinyerési hatásfokot értünk el az analízis során. A belső standardhez (TPP) tartozó RSD% az almaecetes áztatással tisztított minták esetén ugyan meghaladja a 10%-ot (10,11%), de nem nagymértékben. Ennek a jelenségnek oka lehet, hogy az almaecettel bejutatott komponensek zavarták a belső standard kinyerését vagy az almaecet úgy változtatta meg a mátrixot, hogy az nagymértékű ion szupressziót okozott a kromatogram azon részén, ahol a TPP eluálódott.

Érdemes megemlíteni, hogy a különböző mosási eljárásnak alávetett azonos mintaegységek extraktumaira illesztett kalibrációs egyenesek meredekségei nem egyforma értéket adtak. Tehát a mérőrendszer különböző érzékenységgel bír az eltérő mintarészekre nézve. A legjobb érzékenységet a hideg vízzel mosott citromra kaptunk, még a legrosszabbat a mosószeres kezelésnél tapasztaltuk. Ebből arra következtethetünk, hogy a vizes mosásnak van a legjobb mátrixredukáló hatása, míg a mosószer igen nagy mátrix szupressziót eredményezett.



20. ábra: A citrom minták felületén elvégzett mosási eljárások után kapott imazalil-koncentráció citromhéjra mérve

A 20. ábrán láthatóak a különböző tisztítási eljárások hatására bekövetkezett imazalil-koncentráció változások, mely értékeket a kontroll mintából mért célkomponens mennyiségével hasonlítottunk össze (3,79 µg/g). Az oszlopdiaagram alapján elmondható, hogy a hideg vizes mosás (3,70 µg/g) és a meleg vizes mosás (3,60 µg/g), mely során dörzsi szivacsot is használtunk, nem vezetett imazaliltartalom csökkenéshez. A kapott értékek közti különbségek szórás jellegűek is lehetnek. Jelentősebb fungicid tartalom csökkenést a dörzsi szivacsos hideg vizes mosással

(3,19 µg/g) és a mosogatószeres tisztítással (3,07 µg/g) értünk el. A két utóbbi eljárást alkalmazva 16-19%-os imazaliltartalom csökkenés következett be. Az öt mosási technika közül a leghatékonyabbnak az almaecetes áztatás és az azt követő dörzsi szivacsos hideg vizes öblítés bizonyult, ebben az esetben a mért célkomponens-koncentráció 2,66 µg/g volt. Ez a kapott érték a kontroll minta eredményéhez képest 30%-kal kisebb, ami azt jelenti, hogy az almaecetes tisztítás az imazalil egyharmadát eltávolította a citrommintákból. A mintákból készült öt párhuzamos ellenére szükség van a mérés többszöri megismétlésére, hogy egészen megbizonyosodjunk a tisztítási eljárás jóságáról.

A mosáspróbákat egy utas ANOVA statisztikai módszerrel is értékeltük (Analysis Of Variance). A varianciaanalízis számos, egyező szórású, normál eloszlású csoport átlagának összevetésére alkalmas statisztikai módszer.

10. táblázat: Különböző csoportokon belüli szórásértékek között nincs szignifikáns különbség (Welch-próba)

Statisztika	F	Szabadsági fok: 1	Szabadsági fok: 2	P > F
Welch-próba	26,903	5,000	11,159	0,000

A Welch-teszt igazolta, hogy a csoportok közel azonos szórásúak. Az értékcsoportok eloszlását alapból normál eloszlásúnak tekintettük, lévén, hogy természeti mintáról van szó és normalitás próbát egyébként sem illik végezni 10-nél kevesebb elemből álló halmazra. Értelemszerűen a különböző mosásokat tekintettük különböző kezeléseknek. Minden csoportot 5 minta alkotott, hiszen a mérést 5 párhuzamossal hajtottuk végre. Így 6 csoportot különíthettünk el egymástól a kontrollal együtt. Az alábbi eredményt kaptuk.

11. táblázat: Egy utas ANOVA teszt eredményei a különböző mosási eljárásokra

Forrás	szabadsági fok	négyzetes összeg	variancia	F	P > F
Minták között	5	4,745	0,949	29,178	0,0001
Mintákon belül	24	0,781	0,033		
Összes	29	5,525			

A 0 hipotézis azt mondja ki, hogy a kezelések egyforma átlag értékekkel rendelkeznek, ez akkor teljesül, ha a P érték nagyobb, mint az F. Tehát mivel $P < 0,0001$, elmondható, hogy van legalább kettő kezelés, amelyik 95% konfidencia intervallum mellett szignifikánsan eltér egymástól. Ez a különbség olyan erős, hogy még 99,9% szignifikancia szinten is fennáll.

Páronkénti szignifikáns differenciák adják meg, hogy melyik melyiktől tér el. (Körmérközés). Amelyet Tucky vagy Fisher teszttel vizsgálhatunk meg. Mindkét teszt ugyanazt az eredményt adta és ugyanazokat a mintacsoportokat különítette el egymástól.

12. táblázat: **Tucky-teszt eredményei a különböző mosási eljárások összehasonlítására**

Különböző kezelések	LS átlagok	Csoportok
Almaecetes kezelés + dörzsi szivacs	2,662	A
Mosogatószer mosás + dörzsi szivacs	3,070	B
Hideg vizes mosás + dörzsi szivacs	3,192	B
Meleg vizes mosás + dörzsi szivacs	3,596	C
Hideg vizes mosás	3,698	C
Kontroll	3,788	C

Ez alapján a kezeléseket három csoportra különíthetjük el. Az „A” csoport (Almaecetes kezelés) szignifikánsan különbözik a többitől, azokkal nem egyenértékű, mint ahogyan azt a kvantitatív analízisből is láttuk, ez a leghatékonyabb kezelés. A „B” csoportba tartozó kezelések hatásfoka statisztikailag megegyezik, tehát a Mosogatószer + dörzsi szivacs és a Hideg vizes dörzsi szivacsos mosás hatékonyak az imazalil eltávolításában a citrom felületéről, de hatásfokuk nem éri el az Almaecetes kezelését. A Meleg vizes mosás + dörzsi szivacs, Hideg vizes mosás statisztikailag nem különbözik el a kontrolltól (C csoport elemei.), így kimondható, hogy ezek a kezelések 95 % szignifikancia szint mellett vizsgálva nem tekinthetők hatékonyak az imazalil növényvédőszer eltávolítására.

6 Összefoglalás

A két mintaelőkészítési szabvány módszer mérési eredményei alapján megállapítható, hogy az MSZ EN 15662 módszer alapján előállított mintaoldatokból nagyobb imazalil-koncentráció volt mérhető, mint az AOAC technikával elkészítettek esetén. A két mintás t-próba azonos szórásnégyzettel kapott eredmények alapján elmondható, hogy szignifikáns különbség van az összehasonlított két szabvány módszer értékei között, továbbá elmondható, hogy az AOAC módszerben leírtakkal ellentétben a centrifugálást szükséges $>3000g$ -n végrehajtani.

A bemutatott eredmények alapján az is elmondható, hogy AOAC mintaelőkészítés alapján készült imazalilt tartalmazó növényi extraktumokban háromheti fagyasztást követően sem bomlik le számottevően a növényvédőszer, így egy régebbi minta visszamérése is pontos mennyiségi meghatározást adhat. Az MSZ módszerrel előkészített mintarészek, a bélzet kivételével, 4 hetes tárolás alatt számottevő bomlást szenvedtek. Összességében elmondható, hogy az MSZ módszer szolgáltatja a pontosabb adatokat imazalilra nézve, viszont a mintát frissen kell mérni a fagyasztóban történő tárolást megelőzően.

A különböző mosási technikák után MSZ EN 15662 szabványmódszer szerint előkészített minták mért imazalil-koncentrációja alapján elmondható, hogy se a meleg vizes, se a hideg vizes dörzsi szivacsos tisztítás nem vezetett a jelenlévő gombaölőszer számottevő csökkenéséhez. Viszont az almaecetes áztatással, melyet dörzsi szivacsos hideg vizes öblítés követ, 30%-kal csökkenthetjük a célkomponens tartalmát a citrommintákban. Ez a csökkenés jelentős ugyan, de így is nagy mennyiségben marad jelen imazalil a citromban, ezért ilyen formában sem ajánlatos felhasználni ételkészítés-alapanyagként. Díszítéshez sem tanácsos alkalmazni, hiszen a citrom felületén lévő növényvédőszer maradványok átkerülhetnek a tálalt ételekre. Amennyiben a citromhéj direkt felhasználásra kerül ételkészítéskor, javasolt „bio” citromot, illetve szárított, kezeletlen citromhéjat alkalmazni.

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Vass Andreának a rengeteg hasznos tanácsot és a mérési munkálataimban való segédkezést.

Köszönettel tartozom Dr. Dernovics Mihálynak a munkám során nyújtott segítségért és útmutatásért, konzulensi munkáért.

További köszönet illeti Firisz Zsuzsannát és Bakonyvári Ildikót a mintaelőkészítő laboratóriumban végzett munkám segítéséért.

8 Irodalomjegyzék

- Aiyer R. S. (1978): No-cost method for preserving fresh cassava roots. *Cassava Newsletter* (4) 8-9. p.
- Donner E., Eriksson E., Holten-Lützhof H-C., Scholes L., Revitt M., Ledin A. (2010): Identifying and classifying the sources and uses of xenobiotics in urban environments. *Xenobiotics in the Urban Water Cycle*, (16) 27-50. p.
- Dreassi E., Zanfini A., Zizzari A. T., Rosa C., Botta M., Corbini G. (2010): LC/ESI/MS/MS determination of postharvest fungicide residues in citrus juices. *LWT- Food Science and Technology*, (43) 1301-1306. p.
- Fernández M., Rodríguez R., Picó Y., Manes J. (2001): Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of postharvest fungicides in citrus fruits. *Journal of Chromatography A*, (912) 301–310. p.
- Hahn M. (2014): The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, (7) 133-141. p.
- Handschin C., Meyer U. A. (2003): Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, (55) 649-673. p.
- Hong Y., Hu H.Y., Xie X., Sakoda A., Sagehashi M., Li F.M. (2009): Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium: *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*. 91 (3) 262–269. p.
- Internet_1: 6/2001. (I.16.) FVM rendelet
Elérhető: <http://faolex.fao.org/docs/html/hun27091.htm> (2014-10-11)
- Internet_2: Imazalil leírás
Elérhető: <http://www.essencechem.com/product/imazalil.html> (2014-10-21)
- Internet_3: Citrom felületi tisztítása
Elérhető: <http://www.receptindex.com> (2014-07-02)
- Internet_4: Citrom felületi tisztítása
Elérhető: <http://www.femcafe.hu> (2014-07-02)
- Internet_5: Citrom felületi tisztítása
Elérhető: <http://antalvali.com> (2014-07-02)
- Internet_6: Citrom felületi tisztítása
Elérhető: <http://tudatosvasarlo.hu/cikk/citrusok-heja-%E2%80%93-mielott-belereszelned-sutemenybe> (2014-07-03)
- Internet_7: Citrom felületi tisztítása
Elérhető: http://www.ehow.com/how_8246895_cook-lemon-zest-peel.html (2014-07-03)

Internet_8: Citrom felületi tisztítása

Elérhető: <http://www.wikihow.com/Zest-a-Lemon> (2014-07-07)

Internet_9: International Potato Center (CIP, 1982): Annual Report

Elérhető: <http://cipotato.org/> (2014-11-04)

Internet_10: 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről

Elérhető: http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A0400019.FVM (2014-11-04)

Internet_11: Imazalil készítmény biztonsági adatlapja, készült az 1907/2006/EK és a 453/2010/EK rendelet szerint

Elérhető: http://www.mahun.hu/uploads/files/biztonsagi_adatlapok/243_orius_5_fs_3hu.pdf (2014-11-04)

Kanetis L., Förster H., and Adaskaveg, J. E. (2007): Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold. *Plant Dis.* (91) 1502-1511. p.

Kitinoja L. és Kader A. A. (2003): Small-scale postharvest handling practices: a manual for horticultural crops (4th Edition). *Postharvest Horticulture Series No. 8E* 91-95. p.

Kästner M., Nowak K. M., Miltner A., Trapp S., Schäffer A. (2014): Classification and modelling of nonextractable residue (NER) formation of xenobiotics in soil - A synthesis (review). *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44 (19) 2107-2171. p.

Kruve A., Lamos A., Kirillova J., Herodes K. (2007): Pesticide residues in commercially available oranges and evaluation of potential washing methods/ Apelsinide pestitsiidijaakide analuus ja puuviljade pesemisviiside efektiivsuse hindamine. *Estonian Academy of Sciences: Chemistry*, 56 (3)

Laue P., Bährs H., Chakrabarti S., Steinberg C. E.W. (2014): Natural xenobiotics to prevent cyanobacterial and algal growth in freshwater: Contrasting efficacy of tannic acid, gallic acid, and gramine. *Chemosphere*, (104) 212-220. p.

Mari M., Francesco A., Bertolini P. (2014): Control of fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches. *Stewart Postharvest Review*

McKay A. H., Förster H., Adaskaveg J. E. (2012): Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. *Department of Plant Pathology and Microbiology*, (96) 235-242. p.

Meighani H., Ghasemnezhad M., Bakhshi D. (2014): Effect of different coatings on post-harvest quality and bioactive compounds of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits. *Journal of Food Science and Technology*

Nebert D. W. and Russell D. W. (2002): Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, (360) 1155-1162. p.

- Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W. (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession, numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, (6) 1-42. p.
- Oliveira J. J. do V.; Toledo M. C. de F. (2000): Residue levels of thiabendazole and imazalil in orange fruit [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra] after treatment by dipping in postharvest. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 22 (3) 339-344. p.
- Omaye S. T. (2004): Food and Nutritional Toxicology by *CRC Press LLC*, 336 (1) 17-18. p.
- Palou L., Smilanick J. L., Droby S. (2008): Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*
- Schepers H. T. A. M. (1983): Decreased sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 89 (4) 185-187. p.
- Thurman E. M., Ferrer I., Woodman M., Zweigenbaum J. (2005): Analysis of post-harvest fungicides and their metabolites in citrus fruits and juices by time of flight and ion trap LC/MS. (Application). *Food Safety*
- Waard M. A., Groeneweg H., Van Nistelrooy J. G. M. (1982): Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88 (3) 99-112. p.