

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ——

BODAI ZSOLT

**Gyógyszermaradványok  
meghatározása szennyvíziszapból  
QuEChERS-LC-MS/MS technikával**

Témavezetők: Eke Zsuzsanna, PhD  
Varga Renáta

Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratórium  
Analitikai Kémia Tanszék



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ——  
——— Természettudományi Kar ——  
— Budapest, 2010 —

# Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék .....	3
Bevezetés, célkitűzés .....	4
Irodalmi áttekintés .....	5
A szennyvíziszap .....	5
Szennyvíziszapok égetése .....	5
Szennyvíziszapok mezőgazdasági felhasználása .....	6
Gyógyszerek a szennyvíziszapban .....	7
QuEChERS .....	7
A QuEChERS lépéseiről .....	8
Kísérleti rész .....	12
Felhasznált anyagok .....	12
Kromatográfiás körülmények .....	12
QuEChERS módszer kidolgozása .....	14
QuEChERS metodika .....	14
Valós minták mérése .....	15
Eredmények .....	16
QuEChERS tapasztalatok .....	16
Valós minták kiértékelése .....	21
Összefoglalás .....	22
Köszönetnyilvánítás .....	23
Irodalomjegyzék .....	24

## Rövidítésjegyzék

DSPE	<b>D</b> iszperzív <b>S</b> PE
ECD	<b>E</b> lectron <b>C</b> apture <b>D</b> etector - Elektron befogásos detektor
GCB	<b>G</b> raphitized <b>C</b> arbon <b>B</b> lack
GPC	<b>G</b> el <b>P</b> ermeation <b>C</b> hromatography - Gélpermeációs kromatográfia
KOI	<b>K</b> émiai <b>O</b> xigén <b>I</b> gény
LC	<b>L</b> iquid <b>C</b> hormatoraphy – Folyadék kromatográfia
MAE	<b>M</b> icrowave <b>A</b> ssisted <b>E</b> xtraction - mikrohullámmal támogatott extrakció
MRM	<b>M</b> ultiple <b>R</b> eaction <b>M</b> onitoring
MS	<b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry – Tömegspektrometria
NPD	<b>N</b> itrogen <b>P</b> hosphorus <b>D</b> etector - Nitrogén-foszfor detektor
PAH	<b>P</b> olycyclic <b>A</b> romatic <b>H</b> ydrocarbon - Policiklusos aromás szénhidrogének
PCB	<b>P</b> oly <b>C</b> hlorinated <b>B</b> iphenyls - Polklórozott bifenilek
PLE	<b>P</b> ressurized <b>L</b> iquid <b>E</b> xtraction
PSA	<b>P</b> rimér és <b>S</b> zekunder <b>A</b> min
PS-DVB	<b>P</b> oli <b>S</b> ztírol- <b>D</b> i <b>V</b> inil <b>B</b> enzol
QuEChERS	<b>Q</b> uick <b>E</b> asy <b>C</b> heap <b>E</b> ffective <b>R</b> ugged <b>S</b> afe - Gyors egyszerű olcsó hatékony robusztus biztonságos
SPE	<b>S</b> olid <b>P</b> hase <b>E</b> xtraction - Szilárd fázisú extrakció
USE	<b>U</b> ltrasonic <b>S</b> olvent <b>E</b> xtraction - Ultrahangos oldószeres extrakció

## Bevezetés, célkitűzés

A népességnövekedés egyik velejárója, hogy a keletkező szennyvíz, valamint annak kezelése során termelődő iszap mennyisége is rohamosan növekszik. A szennyvíziszaptól való biztonságos megszabadulás a környezetvédelem egyik sarkalatos pontja. A magas szervesanyag, nitrogén, foszfor és egyéb a talajminőségét javító anyag-tartalom miatt előtérbe került az iszap mezőgazdasági felhasználása. A szennyvíziszap mezőgazdasági felhasználásáról szóló kormányrendelet [1] bár számos szerves anyagra kiterjed gyógyyszerhatóanyagokra azonban nem.

A lakosság gyógyszerfogyasztása rohamosan növekszik, az emberiség teljesen „gyógyszerfüggővé” válik. Az alkalmazott gyógyszereket a szervezet nem használja fel teljes mértékben, így azok, valamint a metabolitjaik a vizelettel, vagy széklettel ürülnek, ami után bekerülnek a szennyvízbe és a szennyvíziszapba. A nem megfelelő tisztítási lépések miatt a gyógyszermaradványok kikerülhetnek a környezetbe. Ha a szennyvíziszap tartalmazott ilyen vegyületeket, és azt felhasználják például mezőgazdasági célokra, akkor az könnyedén bekerülhet, sőt feldúsulhat növényekben, továbbá az azokat fogyasztó állatokban, később pedig az emberekben. Épp ezért érthető, hogy folyamatos nyomon követésük szükséges.

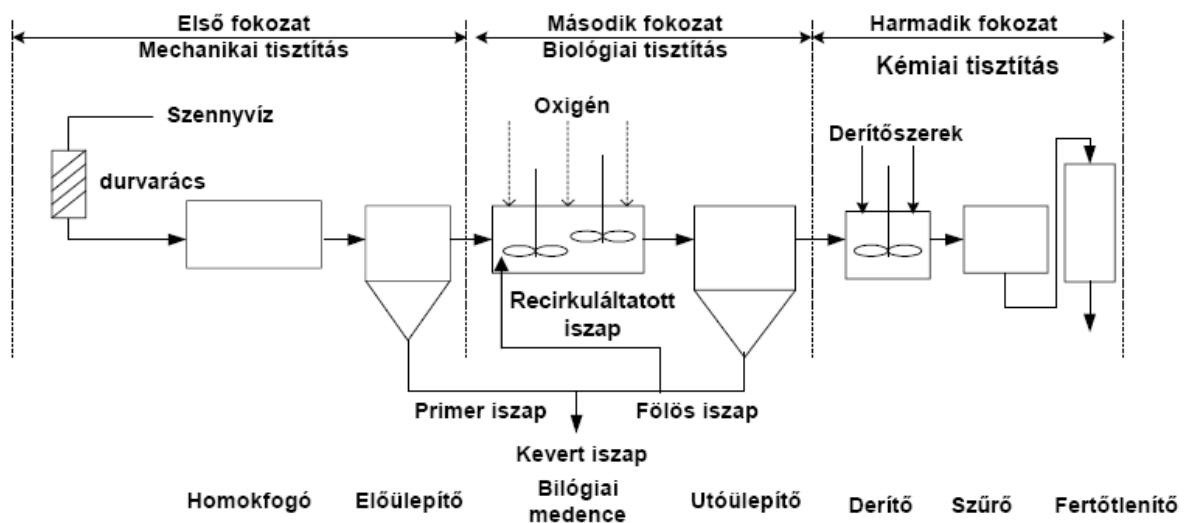
Szennyvíziszapból gyógyszermaradványokat eddig még nem sokan mértek, ami talán annak tudható be, hogy az általában ilyenkor alkalmazott minta-előkészítéshez szükséges eszközök (például PLE) drágák.

Célom az volt, hogy egy egyszerű, olcsó, hatékony minta-előkészítési módszert találjak, ami megfelelő rendszerrel csatolva (LC-MS/MS), alkalmas lehet a szennyvíziszapban alacsony koncentrációban jelenlevő gyógyszermaradványok kimutatására. E célból a QuEChERS nevű eljárással foglalkoztam, ami egy gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) módszer, melyet eredetileg peszticidek meghatározására fejlesztettek ki zöldségekből, gyümölcsökből [2].

# Irodalmi áttekintés

## A szennyvíziszap

A szennyvíziszap a szennyvízkezelés során keletkezett nagy mennyiségű hulladék. A szennyvíztisztítás leegyszerűsítve tekinthető egy sűrítési folyamatnak, mely során tisztított víz és sűrített formában leválasztott szennyezőanyagok, szennyvíziszap termelődik. A szennyvíztisztításnak három fő lépése van: mechanikai, biológiai, és kémiai tisztítás (1. ábra). Mindhárom lépés szükséges a teljes víztisztításhoz.



1. ábra - Háromfokozatú szennyvíztisztítás [3]

A szennyvíztisztítás során keletkező iszap tulajdonságai, valamint a környezetvédelmi és a közegészségügyi problémák határozzák meg az iszap kezelésének mikéntjét. A kezelés fő célja a nedvességtartalom csökkentése (azaz a térfogatredukció), továbbá a szagártalom és a fertőzőképesség megszüntetése. Az iszapot a felhasználástól függően sűrítik, stabilizálják, kondicionálják, víztelenítik, komposztálják, szárítják vagy égetik [4].

A szennyvíziszap felszíni vizekbe való juttatása, illetve annak a lerakása helyett, ártalommentes felhasználásra kell törekedni. A kezelt szennyvíziszapot a magas szervesanyag tartalma miatt mezőgazdasági felhasználásra vagy égetésre szánhatják.

## Szennyvíziszapok égetése

A hulladékégetés műszaki követelményeiről, működési feltételeiről, valamint a kibocsátható szennyezőanyagok, káros anyagok határértékeiről a 3/2002 (II.22.) KöM rendeletben található felvilágosítást [5].

A kommunális szennyvíziszapok szárazanyag-tartalmának 50-80%-a szerves anyag, így aránylag magas égéshővel rendelkeznek. Az égetés fő előnye, hogy az iszapban található összes szerves komponens megsemmisül, így a toxikusak is. Hátránya azonban, hogy ha az iszap nem tartalmazott toxikus szerves anyagokat, akkor potenciális talajjavító szertől szabadultunk meg.

Az elégetett iszap térfogata lényegesen kisebb, ami azzal jár, hogy az el nem égett mérgező anyagok, vagyis a szerves, nem illó vegyületek koncentrációja megnő.

Az égetés energiamérlegét az iszap fűtőértéke határozza meg. A fűtőérték rothasztott iszapok esetén lényegesen alacsonyabb a kinyert biogáz miatt [4].

### **Szennyvíziszapok mezőgazdasági felhasználása**

A szennyvíziszapok mezőgazdasági felhasználásának és kezelésének szabályait az 50/2001. (IV. 3) Kormányrendelet tartalmazza [1], mely összeegyeztethető az Európai Unió Tanácsának 86/268/EGK irányelvével [6].

Az iszap talajjavító hatása főleg az alacsony szervesanyag-tartalmú, rossz vízháztartású, gyenge biológiai aktivitású talajokon érvényesül. Csak kezelt és ellenőrzött szennyvíziszap használható fel mezőgazdasági célokra, megfelelő feltételek mellett. Például tilos talajjal érintkező gyümölcsök és zöldségek esetén a termesztés évében, valamint az azt megelőző évben, továbbá magas törzsű gyümölcsfák esetén a betakarítás előtti hat hétben szennyvíziszapot használni. A szennyvíziszap mezőgazdasági felhasználása legfeljebb ötéves időtartalmú lehet az adott területen. Az iszapnak számos ellenőrzésen kell átmennie, illetve számos követelménynek kell megfelelnie. Méri például az iszap nitrogén-, foszfor-, valamint különböző fémtartalmát, pH-ját, kémiai oxigén igényét (KOI), szárazanyag-tartalmát, sőt különböző baktériumok mennyiségét is, mint a fekális coli és a fekális streptococcus. Tilos felhasználni az iszapot, ha a talaj minősége nem megfelelő, vagy ha az iszap mérgezőanyag tartalma meghaladja a rendelet 4-5 számú mellékletében közölt határértékeket. [1,6] Bár e mellékletekben szerepelnek szerves vegyületek (pl. PAH-ok és PCB-k) a rendelet mégse terjed ki mindenre. A szennyvíziszap számos egyéb szerves anyagot tartalmazhat (pl. gyógyszermaradványokat), amik kikerülve a környezetbe a növényekben, állatokban felgyülemlhetnek, majd azok elfogyasztásával bekerülhetnek az emberi szervezetbe.

## ***Gyógyszerek a szennyvíziszapban***

A gyógyszereknek köszönhetően a természetes gyógymódok egyre jobban háttérbe szorulnak. A legtöbb gyógyszer gyorsan, és hatékonyan működik. A gyógyszerek meghosszabbítják az életet, továbbá megoldást jelentenek a helytelen életmód miatt kialakuló népbetegségekre, épp ezért nem csoda, hogy a lakosság gyógyszerfogyasztása jelentősen megnövekedett. Nagy mennyiségben szedett gyógyszerek az antibiotikumok, a nem szteroid alapú gyulladáscsökkentők, a fogamzásgátlók, a szív- és az érrendszeri betegségek kezelésére alkalmasak, valamint a gyomorsav túltengést gátló szerek. Dolgozatomban ezek közül én az utóbbi két nagy csoporttal, a szív- és érrendszeri panaszokra szedett, illetve a gyomorsav túltengést gátló hatóanyagokkal foglalkoztam.

A jelentős gyógyszerfogyasztás velejárója, hogy a szervezetben le nem bontott gyógyszerek bekerülnek a szennyvízbe. Számos tanulmány foglalkozik gyógyszermaradványok mérésével különböző vizekből [7-13] (felszíni vizek, szennyvizek, stb.) azonban kevesen vannak, akik bonyolultabb mátrixokat is vizsgálnak, például szennyvíziszapot. Ilyen mátrixok esetén komolyabb minta-előkészítésre van szükség.

Szennyvíziszap mintáknál általános eljárás, hogy az előkezelt minta egy extrakciós lépésen megy keresztül. Erre a célra PLE-t, MAE-t, USE-t, szoktak használni [14-19]. Ezt követően általában egy tisztítási lépés következik, ami a legtöbb esetben SPE-t [16-18], nagyon ritkán GPC-t [19] jelent. Az itt felsorolt kombinációk idő- és pénzigényesek lehetnek. Ezekre a gondokra jelenthet megoldást a QuEChERS technika alkalmazása.

## ***QuEChERS***

A QuEChERS-t 2003-ban fejlesztették ki Anastassiades és *munkatársai* peszticidek mérésére gyümölcsökből, valamint zöldségekből [2]. A QuEChERS peszticidek meghatározása során a hagyományos minta-előkészítési módszerekhez képest számos előnnyel rendelkezik. Ezen előnyökből adódik a neve is: „quick, easy, cheap, effective, rugged and safe” azaz gyors, egyszerű, olcsó, hatékony, robusztus és biztonságos.

Bár a QuEChERS-t alapvetően peszticidek mérésére fejlesztették ki, a módszer számos egyéb mérés mintájául szolgált. Használták pl. antibiotikumok meghatározására csirkék izomszövetéből [20], peszticidek mérésére bébiételekből [21], tojásokból [22], vér- [23], tej [24-25], valamint talajminták esetén is [26].

A módszer két nagyobb részből áll: egy folyadék-folyadék extrakcióból, majd egy azt követő diszperzív SPE-ből.

## A QuEChERS lépéseiről

### A minta előkészítése

A minta-előkészítés legelső lépése a minta homogenizálása, valamint aprítása. Az aprítással növelhetjük pl. az extrakció hatásfokát, javíthatjuk a reprodukálhatóságot. Az aprítás eredményessége bizonyos mátrixok esetén (pl. zöldséges, gyümölcsök) a minta előzetes fagyasztásával fokozható.

### Extrakció

A vizes mintákhoz vízzel elegyedő szerves oldószert adnak, általában acetonitrilt, etil-acetátot vagy acetont. A szerves oldószer mennyiségét úgy érdemes megválasztani, hogy megegyezzen a minta víztartalmával. Ha a minta nem tartalmaz elegendő vizet, pl. talajminták esetén, akkor vizet adnak hozzá [26].

Anastassiades és *munkatársai* megvizsgálták a 2:1-hez minta:acetonitril arányt is, és azt tapasztalták, hogy a poláris komponensek kevésbé mennek át ilyenkor az acetonitriles fázisba [2].

A fázisok elkülönülésének érdekében sót adnak a keverékhez, ún. kisózást alkalmaznak. A kisózás hatással van a megoszlási hányadosra, befolyásolja a szerves oldószer polaritását, ezáltal a víz mennyiségét a szerves fázisban. QuEChERS-nél általában vízmentes  $MgSO_4$ -ot használnak kisózó szerként, de próbáltak  $MgCl_2$ -ot,  $NaNO_3$ -ot,  $Na_2SO_4$ -ot,  $LiCl$ -ot, sót frukózt is [2]. Ezek közül a  $MgSO_4$  bizonyult a leghatásosabbnak. A  $MgSO_4$  nagy mennyiségű vizet képes megkötni, ami által csökken a vizes fázis térfogata, ami elősegíti a komponensek szerves fázisba jutását.

Megjegyezendő, hogy a  $MgSO_4$  oldódása erősen exoterm, az oldat 40-45°C-ra is felmelegedhet. A hőmérséklet növekedése pozitív hatással lehet az extrakcióra, ugyanakkor, ha a vizsgálni kívánt komponens nem elég hőstabil, illetve nagyon illékony, akkor az extrakció során fellépő melegedés problémát jelenthet.

A  $MgSO_4$  szennyező anyagok forrása lehet, ezért gyakran ki szokták hevíteni (5 órán keresztül 500 °C-on ajánlott [27]). A hevítés hatására az esetleg megkötött víz szintén eltávozik.

$Na_2SO_4$ -ot használva is aránylag magas visszanyerések érhetőek el, bár kisebb az oldhatósága, ami csökkenti a felhasználási lehetőségét [2].



Az extrakció során használt sókat kombinálhatják is egymással. Gyakori kombinációs párosítás a  $\text{MgSO}_4$  és a  $\text{NaCl}$  keveréke, főleg acetonitriles extrakciónál. Anastassiades és munkatársai [2] azt tapasztalták, hogy acetonitrilt használva a poláris komponensekre a legjobb visszanyeréseket akkor kapták, ha a  $\text{MgSO}_4$ -ot magában használták. Ennek az a magyarázata, hogy  $\text{NaCl}$ -ot használva hatékonyabb a fázisszétválás, így kevesebb víz marad a szerves fázisban, tehát a szerves fázis kevésbé lesz poláris, így a poláris komponensek mennyisége csökken a szerves fázisban. Mivel a  $\text{NaCl}$  befolyásolja a fázisok polaritását, a hozzáadott só mennyiségével a polaritási tartomány, tehát a szelektivitás befolyásolható. Peszticidek esetén kis mennyiségű  $\text{NaCl}$ -ot felhasználva nem romlottak számottevően a visszanyerések. Tisztább, a mátrix komponenseit kevésbé tartalmazó, extraktumot kaptak. Acetonitrilt használva kiváló extrakciós hatásfok érhető el poláris, közepesen poláris és nem-poláris komponensekre is. További előnye az acetonitrilnek, hogy más nem poláris oldószerrel (pl. hexánnal), elegyítve, szintén fázisszétválás tapasztalható. Ez azért jó, mert lehetőség van még egy tisztítási lépésre, így eltávolíthatóak a nagyon apoláris komponensek (pl.: lipofil komponensek) [2].

Az acetonitril alacsony viszkozitásának és megfelelő polaritásának köszönhetően kompatibilis fordított fázisú folyadékkromatográfias rendszerekkel. Hátránya az acetonhoz vagy etil-acetáthoz képest akkor jelentkezik, ha gázkromatográfias rendszert használunk. A fő probléma, hogy nagy az expanziós térfogata, valamint ha NPD vagy ECD detektorokat használunk, akkor azokat zavarhatja, károsíthatja. Ilyenkor oldószercserét szoktak alkalmazni (egy, az illékony komponensekre is alkalmazható módszerről számolt be S.J. Lehotay 2005-ös cikkében [28]), vagy olyan injektort használnak, mely az injektálás során lefűvátja az oldószert [2]. Folyadékkromatográfias szempontból megjegyezendő hátrány, hogy kevésbé illékony, így a bepárlás tovább tarthat.

Az etil-acetát is megfelelő oldószer lehet, mivel részlegesen oldódik vízben. Hátránya, hogy túl sok mindent kiold pl. a lipideket és a viaszokat. A nagyfokú extrakció miatt sokszor egy gélkromatográfias tisztítás is szükségessé válik, mely jelentős időbeli és költségbeli növekedéssel járhat. További hátránya, hogy az erősen poláris komponensekre alacsony visszanyerés tapasztalható. A visszanyerés növelhető, ha nagy mennyiségű  $\text{NaSO}_4$ -ot vagy poláris oldószert adunk az oldathoz (pl.: metanol vagy etanol) [2]. Az etil-acetát hátránya még az, hogy állás közben megnő benne az ecetsav mennyisége, továbbá észter lévén sav vagy lúg hatására is hidrolizál.

Az extrakció során a pH-t is figyelemmel kell kísérni, mert a minta és a mátrix komponenseinek tulajdonságai (minta-oldószer stabilitás, vízdoldhatóság) függhetnek tőle.

A szerves oldószer, valamint a só hozzáadása után a keveréket összerázzák, majd centrifugálják. A felülúszóból pár ml-t lepipettáznak és azzal dolgoznak tovább.

## **Diszperzív-SPE**

A hagyományos SPE módszernél egy 5-10 cm hosszú, általában előre gyártott fecskendőbe kromatográfiás állófázist töltenek. Az adszorbenságy kondicionálása után megtörténik a mintafelvitel. Ezt követően egy mosási, majd egy elúciós lépés következik. Az áramlási sebességet sokszor csökkentett nyomással növelik. SPE-t használnak dúsításra, tisztításra vagy akár oldószercserére is [29].

Nagyon fontos, hogy DSPE esetén a szorbens feladata nem a vizsgálni kívánt, hanem a mátrix komponenseinek megkötése.

A hagyományos SPE módszer a DSPE-hez képest sok lépésből álló, sok oldószert felhasználó, összetett, időigényes munka, melynek helyes elvégzéséhez kellő tudás, ügyesség, azon kívül figyelmesség is szükséges. A DSPE nagy előnye, hogy a szorbensek mennyisége és összetétele szabadabban permutálható a hagyományos SPE szorbensekhez képest.

A DSPE egy egyszerű, kevesebb oldószert és figyelmet igénylő módszer, mely során a minta kis részletét átpipettázzák egy olyan edénybe, amely kis mennyiségű szorbenst valamint esetemben vízmentes  $MgSO_4$ -ot is tartalmaz. A mintát ezután összerázzák, homogenizálják. Az extraktumtól a szorbenst általában centrifuga segítségével különítik el, de a szeparáció szűréssel is megoldható. A centrifugálást követően a felülúszóból könnyedén kipipettázható a kívánt mennyiség. Fordított fázisú folyadékkromatográfiás rendszernél az oldatot sokszor bepárolják, majd visszaoldják az eluensnél gyengébb oldószemben. A bepárlási lépés elkerülhető az oldat hígításával vagy egyéb kromatográfiás megoldásokkal (pl.: HILIC oszlop használatával bizonyos komponensek esetén [30]).

Diszperzív SPE szorbensnek bármely kromatográfiás állófázis alkalmazható. QuEChERS-nél általában PSA-t (primer és szekunder aminokat), C18-at és GCB-t használnak, de különböző alumínák (savas, semleges, bázikus), polimerek pl. PS-DVB vagy akár egyszerű szilika is alkalmazható.

A PSA egy gyenge anioncserélő (módosított szilika, etilén-diamin csoportokkal), ami a savas, valamint bizonyos poláris mátrix komponenseket képes visszatartani. Főleg akkor használják, ha a mátrix zsírsavakat, pigmenteket vagy cukrokat tartalmaz [31].

A GCB-nek hármasszerű hatása van: egyrészt anioncserélő, másrészt hidrofób kölcsönhatás alakulhat ki a grafit felülete és az aromás rendszerek között. Ezen kívül hidrogén kötés is kialakulhat a GCB karbonil csoportjai és a minta (protonált) funkcionális csoportjai között. A GCB-

hez szívesen kötődnek a planáris szerkezetű komponensek, így ezen komponensekre általában alacsonyabb a visszanyerés [31]. Más szorbenssel, gyakran PSA-val kombinálva, kiváló tisztító hatás érhető el. A tisztítás az alkalmazott mennyiség, illetve a szorbensek arányának változtatásával kellően szelektívvé tehető [32]. A GCB-nek hátránya, hogy drága.

A C18-as szorbens a minta apoláris komponenseinek visszatartására alkalmas. Használatakor számolni kell itt is azzal, mint a folyadékkromatográfiás állófázisok esetén, hogy nem az összes szilanolcsoport lett módosítva. A szabad szilanol csoportok egy része deprotonálódhat a megfelelő pH-n, és így hozzájuk kötődhetnek a pozitív töltéssel rendelkező komponensek.

Egy érdekes jelenséget is számításba kell vennünk, ha negatív töltéssel rendelkező szorbenst használunk. A nitrogénatomon parciális pozitív töltés jelenhet meg, ha a közelében halogén (illetve oxigén) található, mivel azoknak nagy az elektronegativitásuk [31]. Ez azért fontos, mert az általam vizsgált komponensek esetén is felléphet ez a jelenség.

A fentiek alapján a pH hatása nem elhanyagolható, befolyásolásával a szelektivitás változtatható.

## **Kísérleti rész**

### ***Felhasznált anyagok***

A következő nagytisztaságú (>95%) standardokat használtam: acebutolol, atenolol, betaxolol, karvedilol, esmolol, metoprolol, oxprenolol, propranolol, sotalol, cimetidin, nifedipin és nizatidin (Sigma-Aldrich), ranitidin\*HCl, ramipril, szimvasztatin, lovasztatin, famotidin, pantoprazol-Na, atorvasztatin-Ca és lizinopril\*2H<sub>2</sub>O (Wessling Hungary Kft.), nimodipin és omeprazol (Calbiochem), fluvasztatin-Na (USP), amlodipin-bezilát és enalapril-maleát (Richter Gedeon Nyrt), lanzoprazol (LGC Standards).

Oldószerként acetont (Merck, SupraSolv), acetonitrilt, etil-acetátot, és metanolt (Merck, LiChrosolv, Reag. Ph Eur) használtam. A nagytisztaságú vizet Milli-Q készülékkel állítottam elő (Millipore). A pH beállítására 25 %-os NH<sub>3</sub>-oldatot (Merck, pro analysi), ammónium-acetátot (Merck, pro analysi) és ecetsavat (100%-os, Merck, Suprapur) alkalmaztam.

A minta-előkészítés során továbbá még a következő anyagokat használtam: C18 és endcappelt C18 (továbbiakban C18 e) MSPD szorbensek (International Sorbent Technology Ltd), bázikus valamint semleges alumínium-oxid (továbbiakban B és N alumina) (Merck), PSA (Sigma-Aldrich), vízmentes MgSO<sub>4</sub>, NaCl (Merck, ensure).

### ***Kromatográfiai körülmények***

Az előkészített mintákat Agilent 1200-as folyadékkromatográfiai rendszer segítségével mértem, mely tartalmazott egy vákuum gáztalanítót (ún. vákuum degassert), egy bináris pumpát, egy termosztálható oszlopteret valamint egy mintaadagolót. A komponensek elválasztását Zorbax Eclipse Plus-C18 (2,1 mm \* 100 mm \* 1,8µm) oszlopon, 50 °C-on végeztem. Az oszlop előtt egy 0,2 µm átmérőjű szűrőt, ún. inlet filtert alkalmaztam. Az előkészített mintákból 5 µl-t injektáltam. Eluensnek egyrészt 10 mM ammónium-acetát vizes puffert használtam (A), melynek a pH-ját ecetsavval állítottam 5-re, másrészt 0,15 V/V %-os ecetsavas acetonitrilt (B). Az áramlási sebesség 0,25 ml/perc volt. A gradiens 10 % (B)-ről indult, amit 4 perc alatt 80 % (B)-re, majd további 4 perc alatt 100%-ra emeltem. Ezután 4 percig 100% (B) volt az eluens összetétele. Az ekvilibrálás további 8 percet vett igénybe, így a teljes analízisidő 20 perc összesen. A kromatográfiai körülményeket az alábbi publikáció alapján állítottam be [33].

Detektornak egy Agilent 6460 QQQ tömegspektrométert használtam Jetstream-ESI ionforrással. Az ionforrás paraméterei a következők voltak: szárítógáz hőmérséklete 300 °C,

áramlási sebessége 10 l/perc, a porlasztás nyomása 45 psi. A „sheath” gáz hőmérséklete 250 °C, az áramlási sebessége 11 l/perc volt. A kapilláris 3500 V, a „nozzle” feszültség 500 V volt.

SCAN üzemmódban pozitív ionizációt használtam. Az ionokat 0,1 Da-onként 100-tól 1000 Da-ig követte nyomon a kvadrupól. A fragmentorfeszültség 100 V volt.

MRM átmenetek vizsgálatakor is pozitív üzemmódban működött az ionforrás. A mérések során két időablakot használtam. Az első időablakban a „dwell time” 50 ms másodikban 25 ms volt. A két időablakot vastag vonallal választottam el egymástól az 1. táblázatban, amely táblázat tartalmazza az MRM átmenetek adatait. Az MRM üzemmód paraméterei a [33] publikációból származnak.

Komponens neve	Anyaiion / m/z	Leányion 1 / m/z	Ütközési energia 1 /V	Leányion 2 /m/z	Ütközési energia 2 / V	Fragmentor feszültség / V
sotalol	273,1	255	5	133	30	100
ranitidin	315,2	176,1	15	130,1	25	90
nizatidin	332,1	155	15	58,1	30	100
lizinopril	406,3	246,2	20	84,1	30	110
famotidin	338,1	189	15	155	30	60
cimetidin	253,1	159	10	95	30	90
atenolol	267,1	190	20	144,9	25	130
szimvasztatin	419,3	285,2	5	199,2	5	80
ramipril	417,3	234,2	20	130,1	30	120
propranolol	260,1	183,2	15	116,2	15	90
pantoprazol	384,2	200,1	10	138,1	30	110
oxprenolol	266,1	116,2	15	72,2	15	110
omeprazol	346,1	198	10	136,1	30	100
nimodipin	419,2	343,1	5	301,1	25	70
nifedipin	347,1	315,1	0	254,1	15	70
metoprolol	268,2	116,1	15	74,1	20	140
lovasztatin	405,3	285,1	5	199,1	10	50
lanzoprazol	370,1	252,1	10	119,1	15	80
fluvasztatin	412,2	266,1	15	224	30	130
esmolol	296,1	254,1	15	219	15	100
enalapril	377,2	303,2	15	234,2	15	140
carvedilol	407,1	283	20	224,1	25	150
betaxolol	308,1	161	20	116,1	20	70
atorvasztatin	559,4	466,2	15	440,3	20	120
amlodipin	409,1	294,1	10	238	10	100
acebutolol	337,1	218	25	116	25	70

1. táblázat - MRM átmenetek paraméterei

### ***QuEChERS módszer kidolgozása***

A QuEChERS módszer kidolgozása során számos paraméter változtatható és mindegyik függ a másiktól. A minta-előkészítés során a Pilisvörösvári Vízművek Kft.-től származó szennyvíziszapot használtam, melynek 15 ml-jéhez 20 µl 10 µg/ml koncentrációjú standard oldatot adtam. Bár már az extrakció során is fellép mátrixhatás, mégis a DSPE rész a kritikus. A szorbens feladata a mátrix komponenseinek visszatartása, úgy hogy a lehető legintenzívebb jeleket kapjuk a meghatározni kívánt anyagunkra. Ilyen szempontból vizes minták adalékolása nem lett volna célravezető.

Munkám során különböző oldószereket (acetonitril, aceton, metanol, etil-acetát), különböző szorbenseket (PSA, C18, C18e, bázikus- és semleges alumínát) próbáltam ki. Vizsgáltam azt is, hogy a pH-nak milyen hatása van a visszanyerésekre. 1 V/V%-ban ecetsavat vagy ammóniát tartalmaztak az oldatok, valamint készítettem olyanokat is, amelyeknek a pH-ját nem befolyásoltam. Kipróbáltam továbbá, hogy más sóknak (pl. NaCl) vagy az ultrahanggal támogatott extrakciónak milyen hatása van a kapott csúcsterületekre.

Első lépésként az ultrahang és a NaCl hatását vizsgáltam meg a különböző oldószerekkel bázikus pH-n, PSA és C18 e kombinációjával. A következtetések levonása után a paraméterek optimalizálását minden oldószerral külön-külön elvégeztem, mindhárom pH beállítással. Erre azért volt szükség, mert az oldószerek polaritása eltérő, illetve a komponensek stabilitása és oldhatósága is függhet a pH-tól (mind a mérendő, mind a mátrix komponensek esetén). Ilyenkor különböző fizikai-kémiai tulajdonságú és mennyiségű mátrix, illetve mérendő komponens kerül a DSPE esetén használt szorbensre, így különbözőképpen telíti azt. Az elkészített mintákat mind MRM mind SCAN módban megmértem, majd ezek alapján történt meg a kiértékelés. Ezután kipróbáltam bizonyos szorbens kombinációkat is, melyek eredményeit összevettem az egy szorbent alkalmazó kísérletek eredményeivel.

### ***QuEChERS metodika***

A módszerfejlesztési kísérleteim során minden esetben az alábbi eljárást alkalmaztam: 15 ml homogenizált szennyvíziszapot 50 ml-es centrifugacsőbe töltöttem. Az elegyhez 20 µl 10 µg/ml-es standard mix oldatot adtam, majd vortexeltem 15 másodpercen keresztül. Ezután 15 ml, a kísérletnek megfelelő oldószert adtam az elegyhez, azt is vortexeltem (15 s), majd hozzáadtam a sókat. Ez minden esetben legalább 4 g vízmentes MgSO<sub>4</sub>-ot tartalmazott (egy-egy kísérletknél NaCl-ból 1 g-ot adtam a MgSO<sub>4</sub> mellé), majd azonnal vortexeltem a mintát (45 s) annak érdekében, hogy ne tapadjon össze a MgSO<sub>4</sub>. A vortexelés után a mintákat

centrifugáltam 3500 rpm-es sebességgel 3 percen keresztül. A felülúszóból 5 ml-t lepipettáztam, majd 400 mg  $\text{MgSO}_4$ -ot és 400 mg szorbenst tartalmazó, 15 ml-es centrifugacsövekbe raktam. A  $\text{MgSO}_4$  miatt itt is azonnal, 45 másodpercen keresztül vortexeltem. A vortexet ismét egy centrifugálás követte 3500 rpm-en 3 percen keresztül. A felülúszóból 2-3 ml-t lepipettáztam (szorbenstől valamint oldószertől függ a levehető oldat mennyisége), majd  $\text{N}_2$  áramban szárazra pároltam. A száraz mintákat 400  $\mu\text{l}$  metanol-víz 1:9 arányú elegyében visszaoldottam, majd azokból 200  $\mu\text{l}$ -eket szűkítővel ellátott 2 ml-es edényekbe helyeztem, és azokból injektáltam.

### ***Valós minták mérése***

Valós minták vizsgálata során a Pilisvörösvári Vízművek Kft.-től származó szennyvíziszapot vizsgáltam. Az iszapot fénytől védve, szobahőmérsékleten tároltam. A mintavétel időpontja 2010. augusztus 12. volt. A véglegesnek tekintett módszerrel előkészítettem egy mintát és megvizsgáltam, hogy a rendelkezésemre álló szennyvíziszap tartalmazza-e kimutatható mennyiségben az általam vizsgálni kívánt komponenseket.

## Eredmények

### ***QuEChERS tapasztalatok***

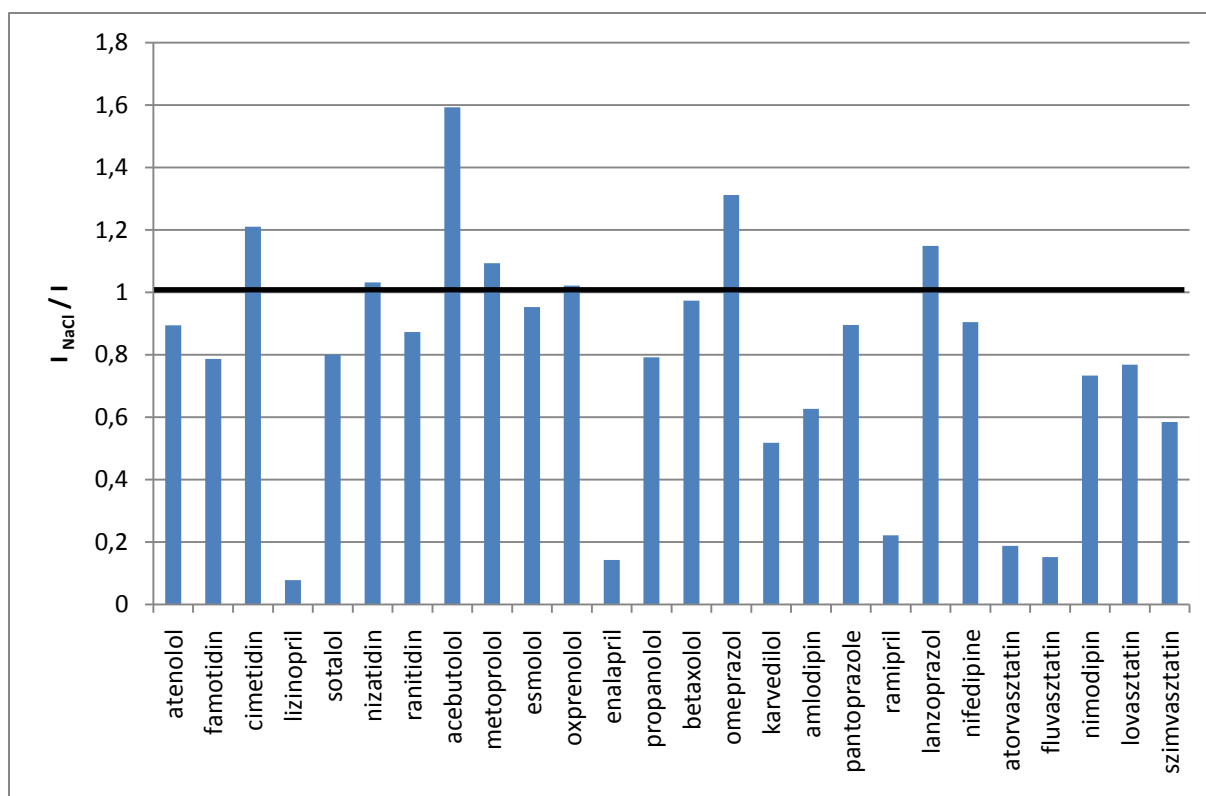
Az ultrahanggal támogatott extrakció nem növelte meg jelentősen a komponenseim visszanyerését. Mivel a folyamat idő- és munkaigényes úgy döntöttem, hogy nem használom a további mérésekhez.

NaCl használatakor alapvetően csökkent a komponensek intenzitása, sőt acetonitrilt használva egyeseké jelentősen (pl. liziopril, enalapril, ramipril, atorvasztatin, fluvasztatin). Azon komponensek esetén, amiknél területnövekedés volt tapasztalható (pl. cimetidin, acebutolol, omeprazol, lanzoprazol) NaCl nélkül is kellően intenzív jeleket kaptam. Acetonitrilt használva a NaCl hatására bekövetkező csúcsterületarány változását az 2. ábrán szemléltetem. A jobb átláthatóság végett a NaCl-ot nem tartalmazó extraktum esetén kapott jelekre normáltam az intenzitásokat, így  $I_{\text{NaCl}} / I_{\text{csak MgSO}_4}$ . (Tehát az egynél kisebb csúcsok esetén a NaCl-ot nem tartalmazónál volt intenzívebb a jel.)

Acetonitrilt használva az extrakcióhoz a NaCl hozzáadásának hatására a fázisok 1:1 arányban váltak szét, míg NaCl nélkül 1:2, azaz 10 ml vizes és 20 ml szerves fázis volt tapasztalható. Utóbbi esetben az acetonitril vizet tartalmazott (megnőtt a polaritása) ami a polárisabb komponensek acetonitriles fázisba jutásának kedvezett.

Hasonló tapasztalatokat kaptam minden oldószernél, így a továbbiakban NaCl-ot nem adtam a rendszerekhez az extrakció során.

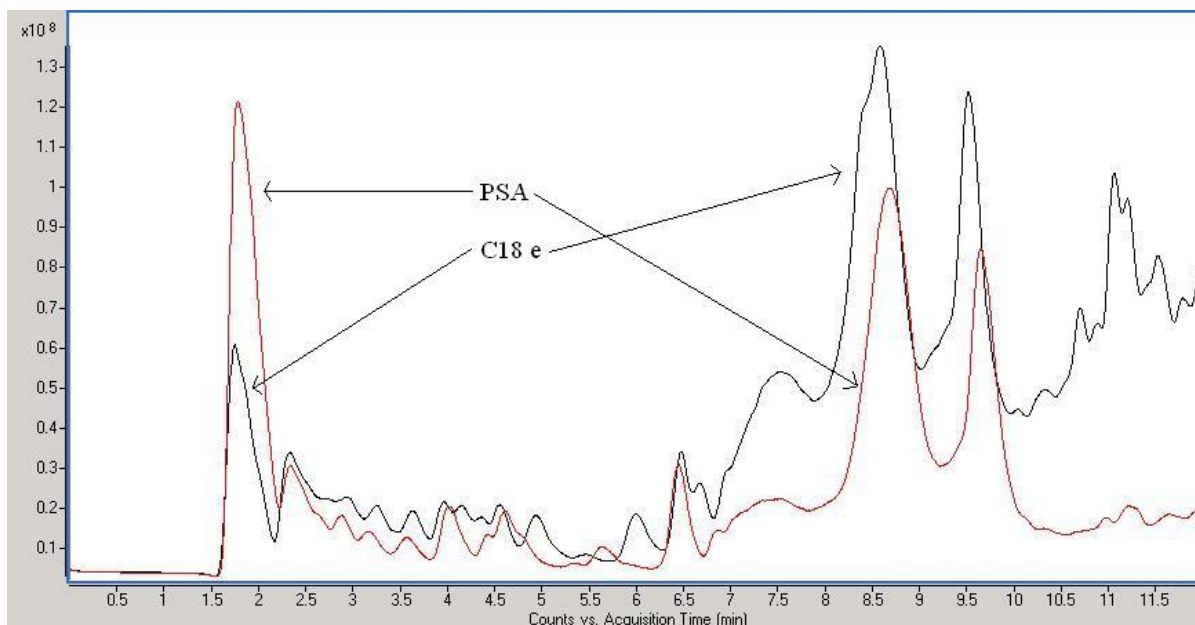




2. ábra - NaCl hatása a komponensek visszanyerésére acetonnitriles extrakciónál (csúcsterületek a NaCl-t nem tartalmazóra normáltam)

A NaCl, valamint az ultrahangos extrakció során kiderült, hogy a felhasznált négyféle oldószerből kettő könnyedén kizárható. Metanolt használva a hozzáadott sók hatására sem különültek el egymástól a fázisok, így az extrakció nem valósulhatott meg. Etil-acetátnál jól definiált fázisok keletkeztek, ám a lényegesen kisebb csúcsterületek, azon kívül a SCAN módban felvett magas háttér intenzitások miatt (a többi oldószerhez hasonlítva) ezt az oldószert is kizártam. A megmaradt két oldószerrel, az acetonnitrillel és az acetonnal, vizsgáltam meg a pH és a szorbensek változtatásának, valamint kombinációjának hatását. Acetonitrilt használva a DSPE után, a felülúszóból 2,5 ml, míg aceton esetén 2 ml oldószer volt az a mennyiség, ami még könnyedén, a szorbens felszívása nélkül, lepipettázhatóan bizonyult.

A kombinációk megválasztásakor nagy segítségemre volt a SCAN módban felvett totál ion kromatogram. C18 e-t alkalmazva a kromatogram elején, míg PSA-t alkalmazva a végén tapasztaltam kisebb intenzitásokat. (3. ábra) Mivel mindkét módszernél megfelelően intenzív jeleket kaptam eredményül MRM módban, így célszerűnek éreztem a két szorbens kombinációját is kipróbálni.



3. ábra - C18 e (fekete) és PSA (piros) szorbensnél felvett totál ion kromatogram acetonitriles, savas oldatban

Az alumínáknál, a SCAN üzemmódban felvett totál ion kromatogramok alapján, kellő és más fajta tisztítás érhető el, azonban a vizsgált komponensek esetén kapott jelek intenzitása csökken. A szorbens mennyiségének csökkentése helyett, megpróbáltam más szorbensekkel kombinálni az alumínákat. Acetonitrilt használva hármass kombinációt is megvizsgáltam. Az egyedi szorbensek után kipróbált kombinációkat az 2. táblázatban foglaltam össze.

oldószer	pH	szorbens
acetonitril	savas	200 mg PSA+200 mg C18 e
		250 mg PSA + 150 mg B alumina
		150 mg PSA + 150 mg C18 e + 100 mg B alumina
	bázikus	200 mg PSA+200 mg C18 e
	nem kontrollált	200 mg PSA+200 mg B alumina
		200 mg PSA+200 mg C18 e
150 mg PSA + 150 mg C18 e + 100 mg B alumina		
aceton	savas	200 mg PSA + 200 mg C18
		200 mg N alumina + 200 mg C18
	bázikus	200 mg C18 e + 200 mg B alumina
	nem kontrollált	200 mg C18 e + 200 mg B alumina

2. táblázat - Kipróbált szorbens kombinációk

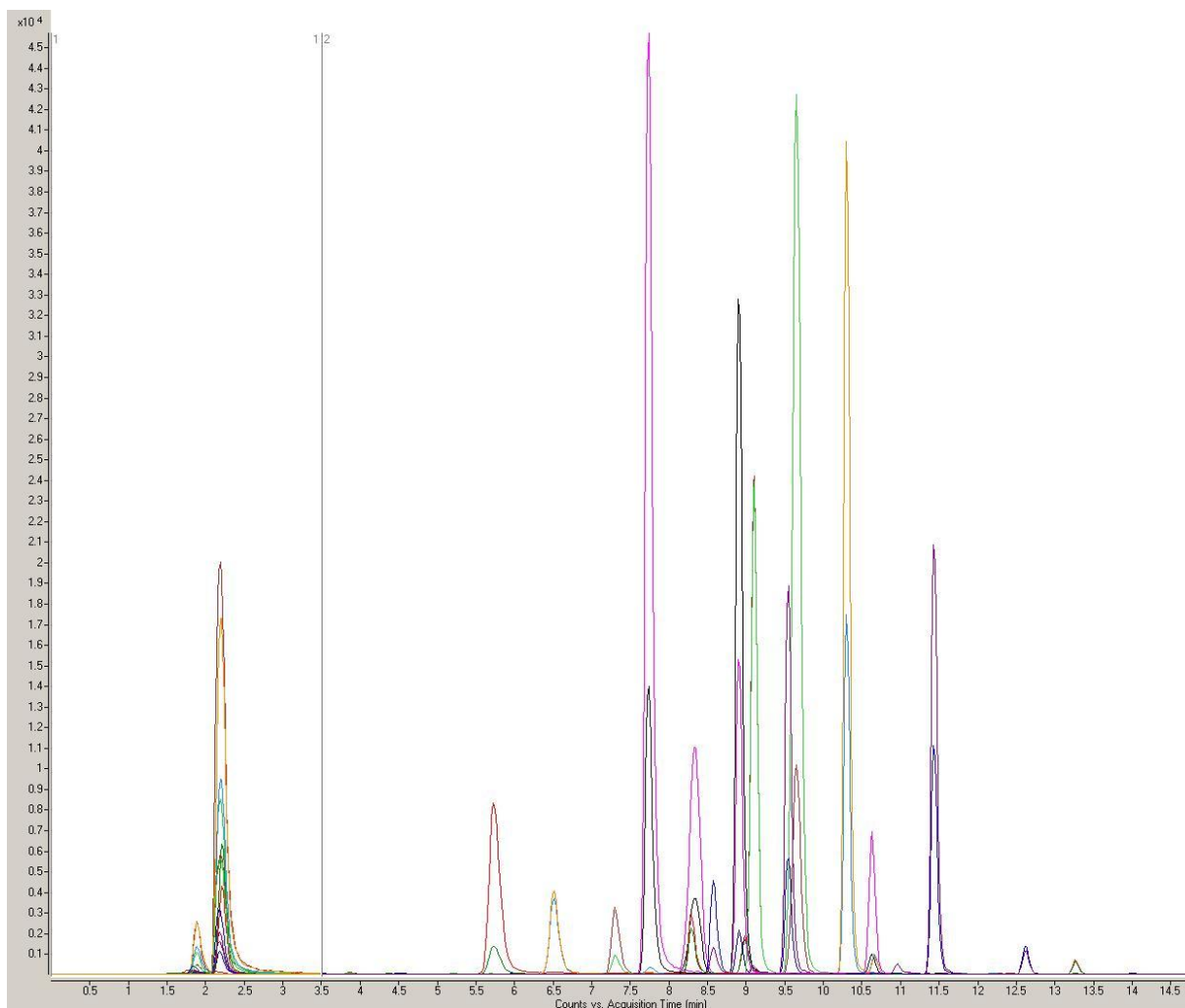
Végül az acetonitrillel, valamint az acetonnal kapott egyedi és kombinációs eredmények közül kiválasztottam a legjobbakat, és azokat összehasonlítottam egymással (3. táblázat).

oldószer	pH	szorbens
acetonitril	bázikus	400 mg C18
	nem kontrollált	200 mg C18 + 200 mg PSA
		200 mg C18 e + 200 mg PSA
aceton	bázikus	400 mg B alumina
	nem kontrollált	200 mg C18 e + 200 mg B alumina

3. táblázat - A végleges módszer meghatározása során előkészített minták

A végleges módszer meghatározása azért nem volt könnyű feladat, mivel bázikus pH beállítás, C18-as szorbens mellett, az acetonitriles módszer esetén, az amúgy gyenge jelet produkáló statitnokra relatív magas intenzitásokat tapasztaltam. Összességében azonban a pH kontroll nélküli, PSA + C18 e acetonitriles változat volt a legelőnyösebb, így ezt a módszert alkalmaztam a további vizsgálatokhoz.

A valós minták mérése során használt, végleges módszernél, az optimált paraméterek a következőképpen alakultak: oldószernek acetonitrilt használtam, a pH befolyásolása nélkül. A fázis szeparációhoz csak  $MgSO_4$ -ot használtam fel, az extrakciót nem támogattam ultrahanggal. A centrifugálást követően 5 ml mintát átpipettáztam a 400 mg  $MgSO_4$ -ot valamint, 200 mg PSA és 200 mg C18 e-t tartalmazó centrifugacsőbe. A 4. ábrán egy, a végleges módszerrel felvett, adalékolt szennyvíziszap minta kromatogramja látható.

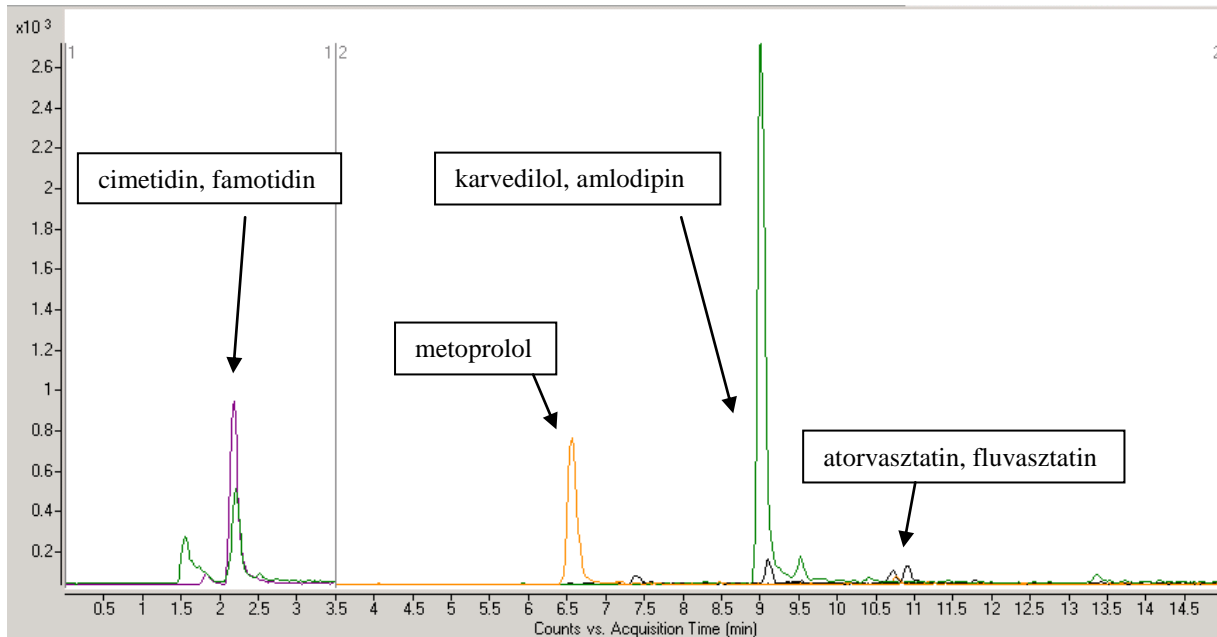


4. ábra – Adalékolt szennyvíziszap minta végleges módszerrel felvett kromatogramja

A 26 vizsgált komponens elúciós sorrendje és retenciós ideje (perc) a következő: atenolol (2,18), famotidin (2,18), cimetidin (2,19), lizinopril (1,78), nizatidin (2,19), ranitidin (2,20), sotalol (2,22), acebutolol (5,68), metoprolol (6,49), esmolol (7,31), oxprenolol (7,75), propranolol (8,31), enalapril (8,36), betaxolol (8,59), omeprazol (8,93), karvedilol (9,00), amlodipin (9,09), pantoprazol (9,12), lanzoprazol (9,56), ramipril (9,67), nifedipin (10,33), atorvasztatin (10,65), fluvasztatin (10,69), nimodipin (11,46), lovasztatin (12,66), szimvasztatin (13.30).

## Valós minták kiértékelése

Az adalékoltalan szennyvíziszap mintát a véglegesnek ítélt módszerrel előkészítettem, majd megmértem. A mintából sikerült kimutatni bizonyos gyógyszermaradványokat: cimetidin, famotidin, metoprolol, propranolol, karvedilol, amlodipin, atorvasztatin, fluvasztatin. A kapott kromatogram az 5. ábrán látható.



5. ábra - Valós minta esetén felvett kromatogram

A kimutatott gyógyszermaradványok esetén a jel/zaj arány mindig nagyobb volt, mint 3:1-hez, valamint a mennyiségi- és minőségi ionok aránya is megfelelőnek bizonyult.

## Összefoglalás

Tudományos diákköri munkám során egy igen összetett mátrixból-szennyvíziszapból-gyógyszermaradványok mérésére alkalmas minta-előkészítési módszer fejlesztésének első lépéseit tettem meg. A módszer 26 komponensre terjed ki, mely magába foglalja a leggyakoribb szív- és érrendszeri betegségek esetén használatos, valamint a gyomorsav túltengés gátló szereket. Az alkalmazott módszer, a QuEChERS, számos paraméter optimalása után alkalmasnak bizonyult a vizsgálni kívánt komponensek kimutatására adalékoltalan szennyvíziszap minta esetén, azonban a mennyiségi meghatározáshoz további vizsgálatok szükségesek.

Távlati célom a módszer további optimalása, későbbi validálása, pontos mennyiségek meghatározása és esetleges egyéb gyógyszerhatóanyagokkal való kiegészítése.

## **Köszönetnyilvánítás**

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Eke Zsuzsannának a pártfogását, aki javaslataival támogatta a munkámat.

Szeretném továbbá megköszönni Varga Renáta PhD hallgatónak, hasznos tanácsait és ötleteit mind a munkám mind a dolgozat megírása során, valamint azt, hogy segítségével megismertem az LC-MS/MS készülék használatát.

Köszönöm még az EKOL hallgatóinak és dolgozóinak, különösképpen Kramarics Áron és Lezsák Gábor PhD hallgatóknak a dolgozatomhoz nyújtott segítséget.

Édesanyámnak, és családomnak az ösztönzésért, az otthoni nyugodt légkör, valamint az anyagi háttér megteremtéséért.

Hálás vagyok barátnőmnek, Szita Veronikának a hasznos tanácsokért illetve, hogy elfogadta távollétem számos hétvégén és ünnepnapon.

A készülékek, valamint a szükséges anyagok és eszközök biztosításáért köszönöm még a Wessling Nonprofit Kft.-nek, a Merck Kft.-nek és a Kromat Kft.-nek a támogatását.

## Irodalomjegyzék

- [1] 50/2001. (IV.3.) Kormány Rendelet
- [2] M. Anastassiades, S.J. Lehotay *Journal of AOAC international*, 86, no.2 (2003) 412-431
- [3] ELTE 2009, Kémiai Technológia előadás jegyzet
- [4] K. Adrienn, K. Róbert, P. Zsolt, Sz. Beatrix, Z. Krisztina, *A szennyvíziszap-kezelés és hasznosítás jogi, gazdasági, műszaki, környezet-egészségügyi feltételrendszere*, 2003, Budapest
- [5] 3/2002 (II.22.) KöM rendelet
- [6] 86/268/EGK
- [7] J. M. Conley, S. J. Symes, S. A. Kindelberger, S. M. Richards, *J. Chromatogr. A*. 1185 (2008) 206-215
- [8] A. C. Alder, C. Schaffner, M. Majewsky, J. Klasmeier, K. Fenner., *Water Res.* 44 (2010) 936-948
- [9] J.-L. Zhao, G.-G. Ying, L. Wang, J.-F. Yang, X.-B. Yang, L.-H. Yang, X. Li, *Science of the Total Environment* 407 (2009) 962-974
- [10] A. L. Spongberg' J. D. Witter *Science of the Total Environment* 397 (2008) 148-157
- [11] J.L. Zhou, Z.L. Zhang, E. Banks, D. Grover, J.Q. Jiang *Journal of Hazardous Materials* 166 (2009) 655-661
- [12] M. Carballa, F. Omil' J, M. Lema, *Chemosph.* 72 (2008) 1118-1123
- [13] H.-B, Lee, K. Sarafin, T. E. Peart *J. of Chromatogr. A* 1148 (2007) 158-167
- [14] A. Nieto, F. Borrull, R. M. Marcé, E. Pocurull *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 125-131
- [15] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R. M. Marcé *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010), no 7
- [16] J. Dobor, M. Varga, J. Yao, H. Chen, Gy. Palkó, Gy. Záray *Microchemical Journal* 94 (2010) 36-41
- [17] C.-M. Tang, Q.-X. Huang, Y.-Y. YU, X.-Z. Peng *Chin J Anal Chem* vol 37 (2009) 1119-1124
- [18] J. Radjenović, A. Jelić, M. Petrović and D. Barceló *Anal Bioanal Chem* (2009) 393:1685-1695
- [19] L.I. Osemwengie, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 897
- [20] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska *Journal of Chromatography A*, 1087 (2005)
- [21] T. Cajka, J. Hajslova, O. Lacina, K. Mastovska' S. J. Lehotay *J of Chromatogr A*, 1186 (2008)



- [22] S.J. Lehotay, K. Mastovska. S. J. Yun *Journal of AOAC International* 88, no 2, (2005) 630-638
- [23] F. Plössl, M. Giera, F. Bracher *J. of Chromatogr. A*, 1135 (2006),
- [24] J. Keegan, M. Whelan, M. Danaher, S. Crooks, R. Sayers, A. Anastasio, C. Elliott, D. Brandon, A. Furey, R. O'Kennedy, *Analytica Chimica Acta* 654 (2009) 11-119
- [25] T. Dagnac, M. Garcia-Chao, P. Pulleiro, C. Garcia-Jares, M. Llompert *J. of Chromatogr. A* 1216 (2006)
- [26] C. G. Pinto, M. E. F. Laespada, S. H. Martín, A. M. C. Ferreira, J. L. P. Pavón, B. M. Cordero *Talanta* 81 (2010) 385-391
- [27] S.J. Lehotay, A. D. Kok, M. Hiemstra, P. V. Bodegraven *Journal of AOAC International* 88, no 2 (2005) 595-614
- [28] S.J. Lehotay, K. Mastovska, A. R. Lightfield *Journal of AOAC International*, 88, no 2, (2005) 615-629
- [29] Kremmer T., Torkos K., Szókán Gy.: *Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata*, 16-17. o., Egyetemi jegyzet 2005
- [30] L. Tölgyesi, P. Kele, K. Torkos *Chromatographia Supplement*, 71 (2010) 75-80
- [31] U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon *Analytica Chimica Acta* 626 (2008) 10-20
- [32] S. J. Lehotay, K. A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh N. Leepipatpiboon *J. of Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2548-2560
- [33] R. Varga, I. Somogyvári, Zs Eke, K. Torkos *Talanta* (2010) beküldve