

***Gyógyszermaradványok analitikai meghatározása
szilárd mintákból (Duna-üledék és
szennyvíziszap) gázkromatográfiás-
tömegspektrometriás csatolt technikával***

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Dobor József

Témavezető: Oltiné Dr. Varga Margit

egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék



Környezettudományi Doktori Iskola

Vezető: Dr. Kiss Ádám

Környezetkémiai program

Vezető: Dr. Turányi Tamás

Budapest, 2011

1. Bevezetés

1974-ben a világ népessége 4,0 milliárd fő volt, a 2011-es év végére pedig a becslések szerint meghaladja majd a 7,0 milliárdot. Minden másodpercben 5 ember születik és 2 hal meg. Ezek hihetetlenül nagy számok. Ez az embertömeg rengeteg vizet használ fel nap, mint nap, ami azt eredményezi, hogy a Föld hatalmas terheket cipel. Bolygónk képessége arra, hogy tolerálja a népességnövekedés következtében kialakuló környezeti terheket, egyre korlátozottabb.

A világ népessége által felhasznált gyógyszer mennyiség egy része a szennyvíztisztító rendszeren keresztül, más része pedig direkt módon a felszíni vizekbe kerül. A gyógyszer molekulák és a lebomlásukból származó termékek (metabolitok) egy része igen perzisztens, vagyis a környezetben való lebomlása lassú, vagy nem megy végbe. A vízkezelés során alkalmazott reakciópartnerekkel nehezen vihetők reakcióba, vagy a folyamat során még toxikusabb metabolitok keletkeznek. Miután felszíni vizeink egy része vízfelhasználási forrás is egyben, ezért a gyógyszerek és a metabolitok visszajuthatnak a fogyasztókhöz az ivóvízen keresztül. Tehát a nehezen lebomló molekulák egy része visszakerül a körforgás elejére. Ezeknek a vegyületeknek a kémiai, biokémiai hatása hosszabb időn keresztül káros lehet nemcsak a vízi élőlényekre, hanem fejlettebb szervezetekre és az emberre is.

Európában a környezettudatos magatartás egyre nagyobb teret hódít. Ma már előfordul, hogy maga a gyártó szervezi meg annak lehetőségét, hogy termékeinek útját nyomon követhessék a kutatók. Ezt a helyzetet segíti, hogy fejlődnek a csatolt kromatográfiás analitikai mérési módszerek, minek következtében a kimutathatósági határok jelentős mértékben csökkentek.

Az ELTE Kémiai Intézetének Analitikai Kémiai Tanszékén kb. öt évvel ezelőtt kutatások indultak a különösen nagymennyiségben felhasznált, vízoldható és perzisztens gyógyszerek és testápoló szerek analitikai meghatározására vizekben és szilárd mintákban. Ebbe a kutatómunkába öt évvel ezelőtt kapcsolódtam be. Doktori értekezésem témája négy tudatosan kiválasztott savas karakterű gyógyszer molekula analitikai vizsgálata szilárd környezeti mintákban GC-MS technikával. Munkámmal e problémakör megoldásához szeretnék hozzájárulni.

2. Célkitűzés

Célkitűzéseim az alábbiak voltak:

- a)** Minta-előkészítési módszer kidolgozása a vizsgált vegyületcsaládra (ibuprofen, naproxen, ketoprofen, diklofenak) szilárd minták (szennyvíziszap, Duna-üledék) hatóanyagtartalmának analitikai meghatározáshoz mikrohullámmal segített extrakciót követően, úgy hogy a minta-előkészítés eredményeként kapott extraktum felhasználható legyen – a kutatócsoport más tagjai által – a vizes fázisra kidolgozott GC-MS, és GC-MS-MS mérési technikákhoz.
- b)** A minta-előkészítési módszer validálása. Visszanyerés, relatív standard deviáció (RSD), kimutathatósági határ (LOQ) megállapítása.
- c)** A szennyvíztisztítás végtermékeként képződő kevert és eleven iszap (mindkettő aerob lebontási termék) szennyezettségének megállapítása a további felhasználás, és a kezelés megítélése céljából.
- d)** A Duna üledékminták szennyezettségének hosszú távú (egy éves monitoring) ellenőrzése a parti szűrésű kutak vízminőségének biztosítása céljából. Lehetséges összefüggések felderítése az időjárási tényezők és a szennyezettség mértékének változása között.
- e)** A természetes vizekben (pl. Duna) végbemenő fizikai-kémiai folyamatok (szorpció-deszorpció) modellezése a kiválasztott vegyületcsaládon a természeteshez közel álló feltételek között a szorpciót befolyásoló legfontosabb tényezők megállapítása céljából.

3. Kísérleti rész

Kutatásaim során olyan módszerek kidolgozását tűztem ki célul, amelyek csökkentik a többszöri fázisváltást, illetve a minta-előkészítési lépések számát.

Mintavétel: a szennyvíziszap minták (Eleven iszap: a biológiai szennyvíztisztítás során keletkező, a mikrobiológiai lebontást végző baktériumban gazdag iszap. Kevert iszap: a primer -a mechanikai tisztítás során képződő- iszap és az eleveniszap feleslegének az aktuális technológiai paraméterektől függő keveréke.) a Fővárosi Csatornázás Művek Zrt. észak-pesti szennyvíztisztító telepéről származnak.

A mintavételt követően a mintákat homogenizáltam, majd 40 °C-on szárítottam vagy liofilizáltam. A szárítást követően a szennyvíziszap mintákat homogenizálásnak vettem alá (ezek a minták biofilm típusúak és szálas-térhálós szerkezetet mutatnak). A mintákat az előkészítési műveletig hűtőszekrényben tároltam 4°C-on. A Duna üledékminták vétele havi gyakorisággal történt három előre meghatározott ponton a Duna mentén a Kvassay zsilip és Tököl között. A Duna üledékmintákat hasonlóan kezeltem, mint a szennyvíziszap mintákat. Minden mintatípusból párhuzamosan készítettem addicionált mintát is a mérendő komponensek standard oldatainak felhasználásával. Az addicionált minták készítése úgy történt, hogy a standardok vizes-metanolos oldatát a szárított minta vizes szuszpenziójához adagoltam, és 30-60 percig intenzíven kevertetem.

A szilárd minták adott mennyiségeit (0,2 g - 1,0 g) mikrohullámú extrakciónak (Milestone START-MOD) vettem alá különböző hőmérsékleteken és más-más időtartamig. Oldószerként desztillált vizet alkalmaztam.

Az extraktumok szilárd lebegő anyagainak és apoláris szerves szennyezőanyagainak eltávolítása az általam kifejlesztett ún. DME-technikával (diszperzív mátrix extrakció) történt. Ennek az eljárásnak köszönhetően a sok zavaró komponenst tartalmazó összetett mátrix célzottabban, hosszabb ideig találkozik a szorbenssel (a töltet szemcseméretének csökkentésével nagyobb felület érhető el) a rendszerhez adagolt $KAl(SO_4)_2$ szerepe: elősegíti a kolloid fázis szétválását, eltávolítja a foszfáttartalmat, beállítja a pH-t 4 körüli értékre, ami optimális a további tisztításhoz. A szűrleteket SPE technikával tovább tisztítottam. Erre a célra Oasis-HLB oszlopokat használtam. A tisztítás alapja minden esetben az, hogy a töltet a hidrofób oldalláncot tartalmazó poláris vegyületeket megköti, amelyeket megfelelő oldószerek alkalmazásával szelektíven el lehet távolítani. A megkötődött amfoter tulajdonságú komponenseket hexános mosást követően etil-acetát, majd metanol

alkalmazásával oldottam le és bepároltam. A töltetek kondicionálása szintén hexán, etil-
acetát, metanol és víz felhasználásával történt.

Származékképzés, mérés, kiértékelés: a vizsgálat tárgyát képező vegyületek szililezett
származékait készítettem el, és a ketoprofen esetében a ketocsoport oximálására is sor került.
Az így előkészített mintákat GC-MS technikát alkalmazva mértem (Varian-4000
GC/MS/MS). A felvétel során a totálon kromatogramokat (TIC) vagy a szelektív ion
kromatogramokat (SIM) rögzítettük. A kiértékelés mindkét esetben a szelektív ionok alapján
történt a GC görbe alatti területek integrálásával. A visszanyerések számításakor minden
esetben külső standardot használtam (azt a standardot tekintetem 100 %-nak, amellyel -
minta-előkészítés nélkül - csak származékképzés, majd mérés történt).

4. Összefoglalás, tézisek

- 1.1. Új minta-előkészítési eljárást dolgoztam ki négy kiválasztott gyógyszervegyület (ibuprofen, naproxen, ketoprofen, diklofenak) kinyeréséhez kevert és eleven szennyvíziszapból. Oldószerként desztillált vizet alkalmaztam a gyógyszermolekulák extrakciójának céljából. A módszer lényege: mikrohullámmal segített extrakció, majd a vizes extraktumok előtisztítása az SPE technikához. Az előtisztítási módszert diszperzív mátrix extrakciónak (DME) neveztem el. Ennek lényege, hogy a víznél kevésbé poláris szorbenssel (timföld), diszperziós erők felhasználásával (rázatás), elektrolit (timsó) jelenlétében a mátrixhatás jelentős mértékű csökkenését lehetett elérni.
- 1.2. A teljes mintaelőkészítési munkafolyamatot validáltam. A módszer 20-2000 ng/g koncentrációtartományban 80-105%-os visszanyeréseket eredményezett 10-20%-os relatív szórással. Az LOQ értékek 10-20 ng/g-nak bizonyultak.
- 1.3. Meghatároztam szennyvíziszapokon a négy kiválasztott gyógyszervegyület koncentrációját, amelyek a következők: kevert szennyvíziszapon: ibuprofen 28 (± 16) ng/g; naproxen 47 (± 12) ng/g; ketoprofen 76 (± 18) ng/g; diklofenak 73 (± 12) ng/g; eleven szennyvíziszapon: ibuprofen 23 (± 16) ng/g; naproxen 47 (± 15) ng/g; ketoprofen 131 (± 21) ng/g; diklofenak 138 (± 14) ng/g.
- 2.1. A szennyvíziszapokra kidolgozott minta-előkészítési eljárást adaptáltam folyami üledék minták (Duna-üledék) feldolgozására. A teljes minta-előkészítési folyamatot validáltam. A módszer 2-2000 ng/g koncentrációtartományban 95-103%-os visszanyeréseket eredményezett 10-12%-os relatív szórással. Az LOQ értékek 2-6 ng/g-nak bizonyultak.
- 2.2. Meghatároztam Duna-vízben és -üledékben a négy kiválasztott vegyület koncentrációját egy évre kiterjedő monitorozással. A kapott koncentrációintervallumok: ibuprofen: <LOQ, naproxen: LOQ-20 ($\pm 9-12\%$) ng/g, ketoprofen: <LOQ, diklofenak: LOQ-38 ($\pm 9-12\%$) ng/g voltak.
- 2.3. Megvizsgáltam a vizsgált gyógyszervegyületek mért koncentrációadatainak függését a környezeti hatásoktól (vízhőmérséklet, vízszint, üledék TOC tartalom). Megállapítottam, hogy a Duna-üledék gyógyszer-tartalma növekszik a Duna-víz gyógyszer-koncentrációjának és az üledék TOC tartalmának növekedésével, és csökken a Duna-víz hőmérsékletével.
- 3.1. Meghatároztam a vizsgált vegyületek szorpciós sebességi együtthatóját üledékmintán. A szorpció folyamatát pszeudoelsőrendű modellel értelmeztem és a szorpciós sebességi együttható értékét 83 perc⁻¹-nek találtam mind a négy gyógyszermolekulára.

- 3.2.** Meghatároztam a szorpciós koefficienseket (K_d) a vizsgált négy vegyületre TOC=2-16 mg/g intervallumban úgy, hogy az üledékminták jellemző paraméterei (kémiai összetétel, részecskeméret) azonosak voltak és csak a TOC-tartalom változott korrelációban a TN-tartalommal. A K_d legnagyobb mért számértékei: $0,354\pm 0,013$; $0,710\pm 0,008$; $1,175\pm 0,009$; $1,432\pm 0,016$ az ibuprofen, naproxen, ketoprofen és diklofenak sorrendben.
- 3.3.** Megállapítottam, hogy a szorpció biofilm rétegen történik, amely egy bizonyos rétegvastagság fölött gátolja az alsóbb rétegekbe történő diffúziót a Duna-üledékeken.
- 3.4.** Megállapítottam, hogy a K_d és a TOC közötti összefüggés csak egy bizonyos TOC határig (7 mg/g) lineáris, e fölötti TOC-tartalomnál a K_d normalizálása a szerves széntartalommal nem szolgáltat összehasonlítható adatokat. A normalizációs eljárás helyett egy empirikus függvényt állapítottam meg, amely a teljes vizsgált TOC tartományban jól leírja a K_d és a TOC közötti összefüggést. Ennek az empirikus függvénynek a paramétereit kiszámítottam a vizsgált négy vegyületre. A kapott egyenletek:

ibuprofen: $K_d \cdot f_{oc} = 0,423 \cdot f_{oc} - 0,076$ (R^2 : 0,993; SD: 0,03);

naproxen: $K_d \cdot f_{oc} = 0,809 \cdot f_{oc} - 0,202$ (R^2 : 0,995; SD: 0,05);

ketoprofen: $K_d \cdot f_{oc} = 1,366 \cdot f_{oc} - 0,306$ (R^2 : 0,997; SD: 0,07);

diklofenak: $K_d \cdot f_{oc} = 1,645 \cdot f_{oc} - 0,339$ (R^2 : 0,998; SD: 0,07).

5. Következtetések

I. Az általam kidolgozott mintaelőkészítési módszer megfelelő reprodukálhatósággal és pontossággal rendelkezik (90–105±15%) mind szennyvíziszap, mind Duna üledékmintáknál. A módszer lényege, hogy a szilárd fázist vízzel, mint oldószerral 100°C-on mikrohullám alkalmazásával extraháltam, majd az extraktumot Al_2O_3 mint szorbens és $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ mint elektrolit felhasználásával tisztítottam a mátrixhatás csökkentése céljából. Az extraktum szennyezőanyagai és a szorbens érintkezését rázatással, elkülönítését pedig centrifugálással oldottam meg. A módszer újszerűsége abban áll, hogy vizet alkalmaz oldószerként, ami sokkal jobban modellezi a vízoldható komponensek viselkedését a természetes környezetben, mint a korábban alkalmazott szerves oldószeres extrahálási módszerek. Másrészt az elektrolit használata a kolloid részecskéket (zsírok és tenzidek) a szorbensre kicsapja, miáltal egy könnyen szűrhető, tiszta oldat keletkezik, ami már jól kezelhető a hagyományos technikákkal.

II. A kapott eredmények alapján megállapítottam, hogy mind a négy vegyület jelen van mindkét iszapmintában. A szennyvíztisztítás során tehát ezek a vegyületek nem távolíthatók el kvantitatív módon, sőt az eleven iszapon jelentősebb dúsítást tapasztaltam ketoprofenre és diklofenakra, mint a kevert iszapon.

III. A Duna minták egyéves monitorozásából levonható következtetések:

- Az általam vizsgált vegyületek koncentrációi Duna-vízben összefüggésbe hozhatók az időjárási tényezőkkel. Alacsony vízállás és vízhőmérséklet esetén nagyobb koncentrációértékeket kaptam.

- A Duna-üledékben talált koncentrációk függenek a Duna-vízben mért koncentrációtól és az iszap teljes szerves széntartalmától (TOC). A TOC értékétől függően 100-2000-szeres dúsítás is megfigyelhető volt. A dúsítás a TOC függvényében lineárisnak adódott a vizsgált intervallumban. Az üledékben mért értékek: diklofenakra a meghatározási határ (LOQ)-40 ng/g, naproxenre az LOQ-20 ng/g közötti koncentráció tartomány. Ibuprofen és ketoprofen nem volt kimutatható.

IV. A Duna mintákon végzett modellvizsgálatok során az alábbi eredmények születtek:

- A szorpció viszonylag gyorsan lejátszódó folyamat, egy órán belül beáll az egyensúly. A folyamatra kapott pszeudoelsőrendű sebességi együttható értéke $k=83 \text{ perc}^{-1}$. A mért és a számított telítési érték jó egyezést mutatott, amely bizonyítja a pszeudoelsőrendű modell alkalmasságát a folyamat leírására.

- A célvegyületek szorpciója függ a vizes közeg pH-jától, ez a függés szignifikánsan kisebb a diklofenak esetén. Szorpció akkor is történik, ha csak a teljesen protonátlan forma van jelen, ami valószínűsíti az ionos kölcsönhatások jelenlétét a szorpció során.
- A célvegyületek szorpciója függ az üledék TOC és teljes nitrogén (TN) tartalmától. A magas TOC és TN tartalom egy bizonyos határig elősegíti a dúsítást.
- A mikroorganizmusok kolonizációja következtében biofilm réteg képződik az üledék felszínén, ami a TOC- és TN-tartalom növekedésével jár. Ezen a biofilm rétegen történik a szorpció, amelyet szkennig elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálattal igazoltam.
- Megállapítottam, hogy a szorpciós együttható (K_d) a következő függvény szerint változik a TOC-vel (azoknál az üledékeknél, ahol a TOC és a TN tartalom között korreláció van):

$$K_d * f_{oc} = A + B * f_{oc}$$

Ez az összefüggés látszólag ellentmond a természetes mintákon kapott eredményeimnek, ahol lineáris kapcsolatot találtam, de amíg a természetes mintákon TOC=7 mg/g ($f_{oc}=0,7\%$) értékig végeztem a vizsgálatokat addig a laboratóriumi kísérletek TOC=16 mg/g ($f_{oc}=1,6\%$) határig terjedtek. A megadott TOC értékek esetén a lineáris összefüggéstől való eltérés legvalószínűbb magyarázata az, hogy a szennyezőanyagok szabad diffúzióját a mélyebb rétegekbe a biofilm egy bizonyos rétegvastagság fölött akadályozza.

A legfontosabb eltérés a természetes körülmények között lezajló és a laboratóriumi körülmények között végbemenő folyamatok között az, hogy a biofilm réteg a természetes vizekben folyamatosan növekszik és a szennyezett víz mindig frissen képződött biofilm réteggel érintkezik, míg a modellvizsgálatok élettelen biofilmmel készültek. Ezért természetes körülmények között mindig nagyobb mértékű dúsítás várható, mint a laboratóriumban kapott szorpciós vizsgálatok eredményeiből várható lenne.

6. A tézisek alapjául szolgáló publikációk, poszterek, előadások

Publikációk

- J. Dobor, M. Varga, J. Yao, H. Chen, Gy. Palkó, Gy. Záray: A new sample preparation method for determination of acidic drugs in sewage sludge applying microwave assisted solvent extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *Microchemical Journal* 94 (2010) 36–41 (Impakt faktor: 2,505)
- M. Varga, J. Dobor, A. Helenkár, L. Jurecska, J. Yao, Gy. Záray: Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Microchemical Journal* 95 (2010) 353–358 (Impakt faktor: 2,505)

Magyar nyelvű publikáció

- Dobor József, Varga Margit, Záray Gyula: Gyógyszermaradványok meghatározása szennyvíziszap mintákban mikrohullámú extrakciót követően GC-MS módszerrel, IV. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia, Debrecen, Konferencia kiadvány, 198-204 o., 2008. márc. 28-29., Z. Orosz, V. Szabó, G. Molnár, I. Fazekas, Abstract book (2008), ISBN: 978-963-06-4625-3

Közlésre beküldve

- J. Dobor, M. Varga, Gy. Záray: Comparative study of sorption of selected acidic drugs on river sediment using microwave assisted extraction and gas chromatography mass spectrometry

Előadás

- M. Varga, J. Dobor, A. Helenkár, Gy. Záray: Determination of acidic drugs in sewage sludge and in Danube sediment by microwave assisted solvent extraction using GC-MS, XXV. Sino-Hungarian symposium, 2009, Budapest

Poszterek

- Dobor József, Varga Margit, Helenkár András, Záray Gyula: Gyógyszermaradványok vizsgálata Duna víz és iszapmintákon mikrohullámú extrakciót követően GC-MS technikával (Magyar Természettudományi Múzeum 1083 Budapest, Ludovika tér 2-6. GeoExpo, 2010. október)
- Turcsán Edit, Dobor József, Szőke Péter, Jurecska Laura, Dr. Barkács Katalin: Adszorbeált szerves halogénvegyületek jelenlétének vizsgálata a Duna-vízben és az üledékben, Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Környezettudományi Kooperációs Kutató Központ (1117 Budapest, Pázmány P. sétány 1/A.), IX. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia Sopron, 2009. október 7-9.
- Dobor József, Varga Margit, Záray Gyula, Gyógyszermaradványok meghatározása szennyvíziszap mintákban mikrohullámú extrakciót követően GC-MS módszerrel, IV. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia, Debrecen, 2008. Konferencia kiadvány, 2008. 198-204 o.