

***Szerves mikroszennyezők gázkromatográfiás-(tandem)
tömegspektrometriás meghatározása
környezeti vízmintákban***

Doktori értekezés tézisei

Helenkár András

Témavezető: Zsigrainé Dr. Vasanits Anikó

Egyetemi adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék



Környezettudományi Doktori Iskola

Vezető: Dr. Kiss Ádám

Környezetkémia program

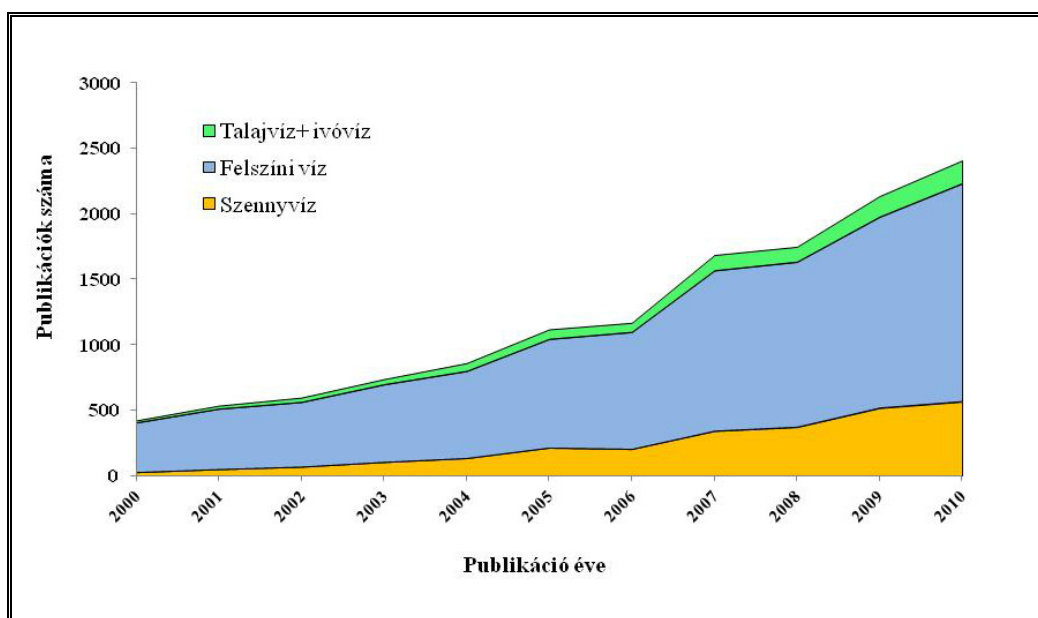
Vezető: Dr. Turányi Tamás

Budapest

2011

1. Bevezetés

Az 1990-es évek második felétől egyre több tanulmány hívja fel a figyelmet a vizeinket veszélyeztető természetes és mesterségesen előállított kémiai anyagokra, amelyek a vízi élővilág minden-egyed alkotójára hatást gyakorolhatnak, a mikroorganizmusoktól kezdve az emberekig. Így válhatott a környezetvédelmi analitika aktívan kutatott területévé a gyógyszerek (antibiotikumok, gyulladásgátlók, fájdalomcsillapítók, antiepileptikumok, koleszterin- és lipidszint szabályozók, stb.), kozmetikumok és a háztartásban használt egyéb vegyszerek, illetve higiénias termékek (Pharmaceutical and Personal Care Products, PPCPs) környezeti jelenlétének vizsgálata (1. ábra).



1. Ábra „Gyógyszermaradványok” vizsgálatával foglalkozó publikációk száma az elmúlt évtizedben-, különböző környezeti mátrixokban (talaj- + ivóvizek; felszíni vizek és szennyvizek)

(forrás: Science Direct; keresett kifejezések: gyógyszerek/ előfordulás/ szennyvíz, felszíni víz, talaj- és ivóvíz [pharmaceuticals/ occurrence/ wastewater, surface water, groundwater, drinking water])

2. Célkitűzés

PhD dolgozatom elsődleges célja az volt, hogy különböző szerves mikroszennyezők meghatározására egyszerű és megbízható gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) eljárást dolgozzak ki. Vizsgálataimat a négy leggyakrabban használt nem-szteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító gyógyszerrel (NSAID) kezdtem (ibuprofen, naproxen, ketoprofen és diklofenak), mivel ezen anyagok - forgalmazott éves mennyiségüket tekintve, előzetes kalkulációk szerint - mérhető koncentrációban vannak jelen, nemcsak a szennyvízben, de a Duna vizében is, potenciálisan pedig akár az ivóvízben is.

Későbbiekben a vizsgált célmolekulák köre jelentősen bővült számos gyógyszerható- anyaggal, PPCP-kel, EDC -kel (Endocrine Disrupting Chemicals, hormonháztartást befolyásoló vegyületek), hormonokkal és epesavakkal. Bár a szennyvízminták esetén jól alkalmazható volt ez a módszer, kutatásaink során világossá vált, hogy a folyó- és ivóvízminták szerves szennyezőinek ng/L -es koncentrációinak megbízható mérésének érdekében szükséges a tömegspektrometria kínálta összes lehetőséget kipróbálni és alkalmazni. Így a doktori munkám céljai a következők voltak:

- a) a négy leggyakoribb, nem-szteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító vizsgálata trimetil-szilil (oxim) éter/észter származékokként - szelektív ion monitoring (SIM) tömegspektrometriás módszerrel - a Duna vizében és az ivóvízben;
- b) ezen négy trimetil-szilil (oxim) éter/észter származék tandem tömegspektrometriás (MS/MS) analízis rendszerének kidolgozása;
- c) a módszer szisztematikus összehasonlítása a szelektív ion monitoring és a pásztázó üzemmóddal (FS);
- d) a négy nem-szteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító tandem tömegspektrometriás elemzése a Duna vizében és ivóvízben;
- e) az MS/MS módszer továbbfejlesztése egyéb gyógyszermaradványok és más szerves szennyezők elemzésére trimetil-szilil (oxim) éter/észter származékokként, illetve eredeti formáikban (összesen 42 vegyület egyidejű meghatározására);
- f) a környezeti vízminták szerves mikroszennyezőinek minőségi-mennyiségi meghatározása az elemző MS/MS módszer segítségével.

3. Kísérleti rész

3.1. A minták

Munkám során a Duna vízmintákat a parttól számított maximálisan 2 m távolságban és 25 cm-es mélységben, a Petőfi-híd budai hídfőjénél az ELTE-TTK épülete előtt (1646. folyamkilométer), valamint a Duna 1642. és 1635. folyamkilométerénél vételeztem. Az ivóvízmintákat az ELTE Lágymányosi campusának-, valamint Dunaharaszti városának ivóvízhálózatából gyűjtöttem.

3.2. A modell oldatok és a reagens oldatok készítése

Az analitikai tisztaságú standard vegyületek 10-25 mg/100 mL bemérése analitikai pontossággal, feloldása etanolban, desztillált vízben, vagy desztillált víz:etanol = 1:1 (V/V) arányú elegyében történt. A ftalátok feloldásához diklór-metánt használtam.

Az egyedi törzsoldatok mellett, a 42 modell vegyületből két közös törzsoldatot is készítettem, a bemérések a várható Duna vízminta-koncentrációk figyelembevételével készültek. A közös törzsoldatok 50-szeres hígításának 10-500 µL-ét, vákuumleparló készülékhez csatlakoztatható, teflonnal fedett, csavarmenettel ellátott reakciósövekbe (szükség szerint 2 és 4 mL térfogatúak) mértem és 35 °C hőfokú vízfürdőn, vákuumleparló készüléken szárazra pároltam. A benzoésav típusú, illékony komponensek megfelelő visszanyerését, 250 µL telített ammóniás metanol adagolása biztosította, sóképzés útján.

3.3. Minták előkészítése Duna- és ivóvízminták esetén

A vízminták (1,5L és 3L) szűréséhez GF/A 1,6 µm pórusátmérőjű üvegmikroszűrőt alkalmaztam. A mintákat a szűrés előtt és után alaposan homogenizáltam. Minden esetben 3 párhuzamos, valamint egy vak, úgynevezett „SPE üres” mintát készítettem. Az extrakciót Oasis HLB 200mg/6mL-es tölteteken végeztem. A töltetek kondicionálása 5 mL n-hexán, 5 mL etil-acetát, 10 mL metanol és 10 mL desztillált víz oldószerekkel történt. A minták kémhatását pH = 4,00 ±0,05 -ra állítottam 0,1 M sósav és 0,1 M nátrium-hidroxid oldattal, majd a mintákat 12 mintafeltétes vákuumkád használatával, 4 mL/perc átfolyási sebesség mellett felvittem a töltetekre. Végezetül a szorbenseket vákuum segítségével szárítottam. A megkötött vegyületeket 5 mL n-hexán, 5 mL etil-acetát és 10 mL metanol oldószerekkel oldottam le. Az eluátumokat 250 µL telített ammóniás metanol hozzáadása után lépcsőzetesen, vegyifülkében, majd az oldott levegő eltávolítása után rotációs vákuumbereendezésen 32 °C-on tömegállandóságig szárazra pároltam.

3.4. Szűrőpapírok feldolgozása a lebegőanyag-tartalom gázkromatográfiás méréséhez

A lemért szűrőpapírokat 10 mm²-es darabokra vágva, főzőpohárban extraháltam először 20, majd 3-szor 15 mL n-hexán:etil-acetát:metanol = 1:1:2 arányú oldószerkeleggyel, ultrahangos fürdőn. Az extrahált anyagot, az egyes extrakciók között, GF/A üvegszűrőn szűrtem és a szűrleteket az eljárás végén egyesítettem. Az előkészítés során egy vak mintát is készítettem („szűrőpapír üres”). Az eluátumokat 250 µL telített ammóniás metanol hozzáadása után lépcsőzetesen szárazra pároltam.

3.5. Származékká alakítás körülményei

A származékká alakítás során az előkészített és tömegállandóságig szárazra párolt modell oldatokat, illetve mintákat tartalmazó kémcsövekbe először 125 µL 2,5 vegyes%-os hidroxilamin-hidrokloridos piridint mértem, amelyet az oximálási reakciólépéshez 30 percig 70 °C -on tartottam. Lehűtve a mintákat a szililezés során 225 µL hexametil-diszilazánt, majd 25 µL trifluor-ecetsavat adtam hozzá. A szililezési reakció teljessé tételéhez ismételten 90 percig 70 °C -on termosztáltam az oldatokat. Az elemzések során külső kalibrációt alkalmazva, minden egyes méréssorozathoz három párhuzamos modell oldatot és egy „műveleti üres” mintát is készítettem, amely utóbbi a standardokkal azonosan készült.

3.6. Gázkromatográfiás és tömegspektrometriás körülmények

A minták mérését a Varian gyártmányú (Walnut Creek, CA, USA) gázkromatográf-tömegspektrométeren végeztem, belső ionizációs módban. A készülékegyüttes egy automata mintaadagolóval és programozható injektorral (Varian 1079) felszerelt Varian 3800-as gázkromatográfból és egy Varian 4000 GC-MS/MS típusú, ioncsapda analizátorral ellátott tömegspektrométerből állt.

„On column” injektálást alkalmazva, az elválasztásokhoz SGE forte capillary (Victoria, Ausztrália) BPX5 jelzésű 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm filmvastagságú kromatográfiás oszlopot, vivógázként konstans 1 ml/perc áramlási sebesség mellett héliumgázt alkalmaztam.

A különböző MS adatgyűjtési üzemmódok alkalmazása során az azonos paraméterek a következők voltak:

- a transfer line, az ioncsapda és a manifold hőfoka rendre 300 °C, 210 °C és 80 °C volt;
- ionizációs feszültségként EI üzemmódban 70 eV-t alkalmaztam;
- az ioncsapda detektor optimális mérési paramétereit a készülék-szoftver (Varian MS Workstation software, version 6.5.) segítségével ellenőriztem és vezéltem.

4. Eredmények, következtetések

4.1. A nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek tanulmányozásának összefoglalása

Az eredményeimet a következő pontokban foglaltam össze:

1. A négy leggyakoribb, nem-szteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító (NSAID): az ibuprofen, a naproxen, a ketoprofen és a diklofenak minőségi-mennyiségi meghatározását végeztem el trimetil-szilil (oxim) éter/észter származékokként - GC-MS-SIM módszerrel - a Duna vízében és ivóvizekben.
2. MS/MS módszert optimaltam és validáltam a négy származék esetén a mennyiségi meghatározás szelektivitásának javítása érdekében.
3. Összehasonlítottam a három MS adatgyűjtési üzemmódot az analitikai teljesítményjellemzők alapján, ugyanazon körülmények között (a készülék állapota és a minták előkészítése azonos volt).
4. A naproxen és a diklofenak meghatározása során a különböző MS-módszerek közel azonos eredményeket adtak, míg az ibuprofen és a ketoprofen esetében csak az MS/MS módszer szolgáltatott kellően megbízható eredményeket.
5. A validált MS/MS módszerrel öt havi Duna vízmintákat mértem (2008. január, szeptember, november és 2009. április, május).
6. Az ibuprofen (3,7-50 ng/L), a naproxen (5,7-62 ng/L) és a ketoprofen (<LOQ-77 ng/L) koncentráció értékei a javasolt Európai Unió határértékek alatt voltak (rendre: 200-, 100- és 100 ng/L).
7. A diklofenak koncentrációja két esetben meghaladta a 100 ng/L tervezett határértéket (224 és 931 ng/L) és a koncentrációja széles skálán változott az öt mérési hónap során (24-931 ng/L).
8. Ivóvízminták MS/MS elemzésekor, egyetlen minta esetén sem találtam kimutatható mennyiségű NSAID szennyezettséget.

4.2. Sok összetevő (multiresidue) vizsgálatára alkalmas rendszer eredményeinek összefoglalása

Korábbi vizsgálataink és az irodalom áttekintése alapján összesen 42 vegyületet választottam ki az MS/MS-módszer bővítésére.

Ezek közé tartoztak:

- a különféle gyógyszerek és metabolitjaik;
- az aromás karbonsav származékok;
- a műanyag- és kozmetikai adalékanyagok;
- a pszichostimuláns hatású koffein és a természetes antioxidáns ferulasav;
- a telített-, telítetlen zsírsavak és dikarbonsavak;
- az ösztrogének;
- a koleszterin és a kólsav.

A vegyületeket trimetil-szilil (oxim) éter/észter származékokként, illetve eredeti formáikban, mind az FS-, mind az MS/MS módszerrel vizsgáltam. A cél olyan GC-MS technika kidolgozása volt, amely alkalmas a 42 komponens egyidejű meghatározására.

1. GC-MS/MS módszert optimalám és validáltam 42 vegyület egyidejű meghatározására a minőségi-mennyiségi elemzések szelektivitásának fejlesztése érdekében.
2. Az FS és az MS/MS adatgyűjtési módszereket az analitikai teljesítményjellemzők alapján hasonlítottam össze. Az MS/MS-el elérhető meghatározási határok (LOQ) átlagosan 3,2-szeresére csökkentek az FS LOQ értékeihez képest - modell oldatok esetén -, illetve a számos koelúció miatt, csak az MS/MS módszer szolgáltatott kellően megbízható eredményeket a vízminták meghatározásakor.
3. A validált MS/MS módszerrel Duna vízmintákat elemeztem, összesen 8 alkalommal (2008. szeptember, november; 2009. április, május; 2010. március, április, valamint 2011. február, március).
4. A vizsgált szennyezők széles koncentrációtartományban változtak (0,54 ng/L-3640 ng/L).
5. A diklofenak kivételével egyetlen mikroszennyező koncentrációja sem haladta meg a javasolt-, illetve érvényben lévő, maximálisan a felszíni vizekre engedélyezett határértékeket.

6. A Duna folyó szennyezettsége számottevően csökkent az elmúlt két évben, főképp az új, Központi Szennyvíztisztító telep üzembe helyezésével.
7. A lebegőanyag-tartalom félkvantitatív meghatározása során benzoésavat és származékait (3- és 4-hidroxi-benzoésav), valamint nagyobb mennyiségben dioktil-ftalátot mértem.
8. A budapesti ivóvízminták elemzése során kimutatható mennyiségű gyógyszer-szennyezettséget nem találtam, amit elsősorban a legmodernebb technikával felszerelt Csepeli Ivóvízműnek köszönhető.

5. Az értekezésben foglalt új tudományos eredmények; Összefoglalás

- 1.1. GC-MS-SIM és GC-MS/MS módszereket dolgoztam ki a négy leggyakoribb, nem-szteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító: az ibuprofen, a naproxen, a ketoprofen és a diklofenak minőségi-mennyiségi elemzésére, trimetil-szilil (oxim) éter/észter származékokként.
- 1.2. Első ízben végeztem szisztematikus összehasonlítást e négy vegyület FS, SIM és MS/MS adatgyűjtési módban kapott eredményei között. A három módszer közel azonos értékeket szolgáltatott a linearitás és a visszanyerés tekintetében, míg az MS/MS módszerrel sikerült a legalacsonyabb meghatározási határokat elérni (2,62-5,67-szeres csökkenés az FS-hez képest).
2. Magyarországon elsőként mértem a négy nem-szteroid gyulladáscsökkentő vegyületet Duna- és ivóvízmintákban, az optimált MS/MS módszerrel. A naproxen és a diklofenak mennyiségi elemzése egyaránt megbízható és reprodukálható volt az alkalmazott MS technikától függetlenül, míg az ibuprofen és ketoprofen esetén az MS/MS módszer bizonyult a legszelektívebbnek.
- 3.1. Sok összetevő meghatározására alkalmas GC-MS/MS módszert dolgoztam ki. A módszer 42 szerves mikroszennyező egyidejű elemzésére alkalmas, trimetil-szilil (oxim) éter/észter származékokként, vagy származékképzés nélküli formáik mérésére. A módszer optimalása során megállapítottam, hogy a legkedvezőbb válaszjelek biztosítása érdekében az MRM során maximálisan négy vegyület értékelhető szegmensenként. A módszer teljes mértékben megfelelt a validálási paramétereknek.
- 3.2. Az eljárást sikeresen alkalmaztam nyolc havi Duna- és két különböző helyről származó ivóvízminta elemzésére. Az azonosított és mért vegyületek száma az MS/MS módszerrel átlagosan 30, míg az FS adatgyűjtéssel 21 volt. A két módszert összehasonlítva kijelenthető, hogy a koeluálódó vegyületek esetén sokkal szelektívebb és megbízhatóbb eredményeket szolgáltat az MS/MS adatgyűjtési üzemmód. Legnagyobb koncentrációban benzooesavat, fenil-ecetsavat és 2-fenil-propionsavat, valamint telített- és telítetlen zsírsavakat mértem a vizsgált vízmintákban. Ugyanakkor eredményeim azt mutatták, hogy a nyolc havi Duna vízvizelmzések során a diklofenak kivételével egyetlen mikroszennyező koncentrációja sem haladta meg a javasolt-, illetve a dioktil-ftalátra hatályosan érvényben lévő maximálisan engedélyezett határértékeket.
- 3.3. A 2011-es mérési eredmények tükrében megállapítható, hogy a szerves mikroszennyezők Duna vízben mért koncentráció értékeinek csökkenése a 2008-2010 -es időszakhoz képest, a 2010. év nyarán üzembe helyezett Budapesti Központi Szennyvíztisztító telepnek köszönhető. A beruházás eredményeként az eddigi közvetlen szennyvíz befolyások megszűntek, és így a budapesti szennyvíztisztítás mértéke 51%-ról 95%-ra nőtt.

6. Közlemények, szakmai előadások és poszterek

Az értekezés anyagából készült dolgozatok:

1. Multiresidue analysis of pollutants present in the aquatic environment
Á. Sebők, A. Helenkár, A. Vasánits-Zsigrai, K. Sezer, Gy. Záray, I. Molnár-Perl,
J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2288-2301, Impakt faktor: 4.101
2. The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography - mass spectrometry
A. Helenkár, Á. Sebők, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, A. Vasánits-Zsigrai,
Talanta 82 (2010) 600-607, Impakt faktor: 3.290
3. Nem-szteroid gyulladáscsökkentők meghatározása tandem tömegspektrometriával kapcsolt gázkromatográfiás elemzéssel a Duna folyóból és ivóvízből
Helenkár András, Zsigrainé Vasánits Anikó, Perlné Molnár Ibolya, Záray Gyula
IV. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia, Debrecen, 2008. márc. 28-29.
Z. Orosz, V. Szabó, G. Molnár, I. Fazekas, Abstract book (2008) 159-165.
ISBN: 978-963-06-4625-3

A témában megjelent egyéb közlemények:

4. Gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: Their presence in the aquatic environment
Á. Sebők, K. Sezer, A. Vasánits-Zsigrai, A. Helenkár, Gy. Záray, I. Molnár-Perl,
J. Chromatogr. A 1211 (2008) 104-112, Impakt faktor: 3.756
5. Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography-mass spectrometry
M. Varga, J. Dobor, A. Helenkár, L. Jurecska, J. Yao, Gy. Záray,
Microchem. J. 95 (2010) 353-358, Impakt faktor: 2.579
6. Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids, as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas chromatography mass spectrometry: analysis of dissolved steroids in wastewater samples
N. András, A. Helenkár, A. Vasánits-Zsigrai, Gy. Záray, I. Molnár-Perl,
J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1878-1890, Impakt faktor: 4.101

Szakmai előadások:

1. Nem-szteroid gyulladáscsökkentők meghatározása tandem tömegspektrometriával kapcsolt gázkromatográfiás elemzéssel a Duna folyóból és ivóvízből
Helenkár András, Zsigrainé Vasánits Anikó, Perlné Molnár Ibolya, Záray Gyula
IV. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia, Debrecen, 2008. március 28-29.
2. Determination of micro contamination in Danube River by gas chromatography-tandem mass spectrometry, as trimethylsilyl(oxime) derivatives
Helenkár András, Zsigrainé Vasánits Anikó, Perlné Molnár Ibolya, Záray Gyula
Kisfaludy Lajos Alapítvány előadóülés, Budapest, 2010. március 8.

Konferenciákon megjelent poszterek:

1. Determination of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs by GC-MS/MS in Danube River
András Helenkár, Anikó Vasánits-Zsigrai, Ibolya-Molnár Perl, Gyula Záray
7. Balaton Symposium, Siófok, 2007. szeptember 5-7.
Kutatók napja, Budapest, 2007. november 9.
IV. Szennyvízágazati Konferencia, Budapest, 2007. november 29-30.
2. Determination of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs by Gas-Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Danube River
András Helenkár, Anikó Vasánits-Zsigrai, Ibolya Molnár-Perl, Gyula Záray
XIII. Italian-Hungarian Symposium on spectrochemistry: environmental contamination and food safety, Bologna, 2008. április 20-24.
3. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography-tandem mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives
András Helenkár, Anikó Vasánits-Zsigrai, Ibolya Molnár-Perl, Gyula Záray
27th International Symposium on Chromatography, Münster, 2008. szeptember 21-25.
4. Mikroszennyezők meghatározása tandem tömegspektrometriával kapcsolt gázkromatográfiás elemzéssel a Duna folyóból
Helenkár András, Zsigrainé Vasánits Anikó, Perlné Molnár Ibolya, Záray Gyula
Elvlasztástudományi Vándorgyűlés, Sárvár, 2008. november 5-7.
5. The Role of Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Acquisition Method in the Analysis of Organic Micropollutants in Danube River
Helenkár A., Záray Gy., Molnár-Perl I., Vasánits-Zsigrai A.
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, 2009. szeptember 2-4.
6. Determination of Micropollutants by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry as Their Trimethylsilyl(oxime) Derivatives in Danube River
András Helenkár, Anikó Vasánits-Zsigrai, Ibolya Molnár-Perl, Gyula Záray
Colloquium Spectroscopium Internationale XXXVI, Budapest, 2009. augusztus 30-szeptember 3.
Euroanalysis 2009, Innsbruck, 2009. szeptember 6-10.