

Szteroid vegyületek gázkromatográfiás-
tömegspektrometriás elemzése, trimetilszilil-(oxim)-
éter/észter származékokként, szenny- és Duna-vízminták
oldott és szuszpendált fázisaiban

Doktori értekezés

Dr. Andrásiné Nóra

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Perlné Dr. Molnár Ibolya, egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Ludányi Krisztina, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Mörtl Mária, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Takácsné Dr. Novák Krisztina,
egyetemi tanár, D.Sc.
Csörgeiné Dr. Kurin Krisztina,
egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2012

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi háttér.....	8
2.1. A szteroid vegyületek általános jellemzése, biológiai jelentőségük.....	8
2.2. A szteroid vegyületek meghatározásának felhasználási területei.....	9
2.2.1. Metabolikus folyamatok klinikai kutatása.....	9
2.2.2. Tiltott teljesítményfokozó szerek ellenőrzése.....	9
2.2.3. Élelmiszerbiztonság.....	9
2.2.4. Környezeti vízminták vizsgálata – a szteroid vegyületek sorsa a vízi környezetben, az élővilágra gyakorolt hatásuk.....	10
2.3. A szteroid vegyületek kromatográfiás meghatározásának lehetőségei.....	11
2.4. A szteroidok elemzésének gázkromatográfiás módszerei.....	13
2.4.1. A mért szteroidok száma és típusaik.....	13
2.4.2. Az extrakciós eljárások.....	21
2.4.3. A származékkészítés.....	22
2.4.4. Az adatgyűjtési módszerek.....	25
3. Célkitűzések.....	29
4. Módszerek.....	30
4.1. Kémszerek.....	30
4.2. Vizsgált minták.....	30
4.2.1. Szennyvízminták.....	30
4.2.2. Duna-vízminták.....	30
4.3. Eszközök.....	30
4.3.1. A mintaelőkészítés során használt eszközök.....	30
4.3.2. Az alkalmazott gázkromatográfiás körülmények.....	32
4.3.3. Az tömegspektrométer működésének főbb jellemzői.....	32
4.4. Eljárások.....	33
4.4.1. A reagens oldatok.....	33
4.4.2. A modell oldatok.....	33
4.4.3. A származékká alakítás.....	33
4.4.3.1. Trimetilszilil-származékok.....	33
4.4.3.2. Trimetilszilil-(oxim)-származékok.....	34
4.4.4. A mintaelőkészítés.....	34
4.4.4.1. Az oldott szteroidok vizsgálata - szilárd fázisú extrakció.....	34
4.4.4.2. A szuszpendált szilárd lebegőanyaghoz kötött szteroidok vizsgálata - Ultrahanggal segített extrakció.....	36
4.4.4.3. A minták származékká alakítása és mérése.....	37
5. Eredmények.....	37
5.1. A vizsgált vegyületek kiválasztása.....	37
5.2. A szteroid vegyületek származékkészítési tanulmánya.....	41
5.2.1. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek elúciós profilja és válaszjele.....	41
5.2.2. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek fragmentációs viselkedése.....	44
5.2.3. A leggyakrabban használt szililezőszerek összehasonlítása.....	49
5.2.4. Az alkalmazott reakcióidő és hőfok hatásának vizsgálata a származékkészítés mindkét lépésének esetében.....	50
5.2.5. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek válaszjelének reprodukál-hatósága az injektált mennyiségek függvényében.....	51

5.3.	Két magyar szennyvíztisztító telep mintáinak elemzése	55
5.4.	A különböző adatgyűjtési módszerek összehasonlítása a szteroidok és a kólsavak GC-MS(/MS) meghatározásában	58
5.4.1.	A többszörös ion monitorozó (MIM) és a többszörös reakció monitorozó (MRM) technikák kidolgozása	58
5.4.2.	A három alkalmazott adatgyűjtési módszer (FS, MIM, MRM) teljesítményének összevetése modelloldatok elemzésével.....	65
5.4.3.	A három alkalmazott adatgyűjtési módszer (FS, MIM, MRM) teljesítményének összevetése szennyvízminták elemzésével.....	67
5.4.4.	Az SPE extrakció hatékonyságának és az extraktumok stabilitásának vizsgálata	71
5.5.	A szteroid vegyületek és kólsavak elemzése Duna- és szennyvízminták oldott és szuszpendált fázisaiban	73
5.5.1.	Az ultrahanggal segített extrakció hatékonyságának vizsgálata.....	73
5.5.2.	A szennyvízmintákban szuszpendált szteroidok elemzése.....	75
5.5.3.	A Duna-víz minták oldott, és szuszpendált szilárd fázisaiban mért szteroidok	77
5.5.4.	Szenny- és Duna-vízmintákban meghatározott szteroidok megoszlása az oldott és szuszpendált fázisok között.....	78
6.	Megbeszélés.....	81
7.	Következtetések.....	83
8.	Összefoglalás	86
9.	Summary.....	87
10.	Irodalomjegyzék	88
11.	Saját publikációk	101
12.	Köszönetnyilvánítás	102

Rövidítések jegyzéke

ACN	acetonitril
BSA	<i>N,O</i> -bisz(trimetilszilil)-acetamid
BSTFA	<i>N,O</i> -bisz(trimetilszilil)-trifluoracetamid
C₁₈	18 szénatomú polimer
CID	ütközéssel indukált disszociáció (collision-induced dissociation)
DHPM	dihidroxipolimetakrilát
DMF	dimetilformamid
GC	gázkromatográfia (gas chromatography)
GC-C-IRMS	gázkromatográfia-izotóparány-tömegspektrometria (gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry)
GC-NCI-MS	gázkromatográfia-negatív kémiai ionizáció tömegspektrometria (gas chromatography negative chemical ionisation mass spectrometry)
GC-MS	gázkromatográfia-tömegspektrometria (gas chromatography mass spectrometry)
GC-MS/MS	gázkromatográfia-tandem tömegspektrometria (gas chromatography tandem mass spectrometry)
DCM	diklórometán (dichloromethane)
DMESI	dimetil-etilszilil-imidazol (dimethyl ethylsilyl imidazole)
DMIPSI	dimetil-izopropil-imidazol (dimethyl isopropyl imidazole)
DTE	ditiotritol
ESI	elektronspray ionizáció (electrospray ionization)
ET	etántiol
EtAc	etil-acetát
EtOH	etanol
FID	lángionizációs detektor (flame ionization detector)
FS	pásztázó üzemmód (full scan)
HFBA	heptafluorovájsav (heptafluorobutyric acid)
HLB	hidrofil-lipofil egyensúly (hydrophilic-lipophilic balance)
HMDS	hexametildiszilazán (hexamethyldisilazane)
HOA-HCl	hidroxilamin-hidroklorid

HPLC	nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia (high-performance liquid chromatography)
HTGC-MS	magas hőfokú gázkromatográfia-tömegspektrometria (high temperature gas chromatography mass spectrometry)
IE	integrátor egység
LC	folyadék kromatográfia (liquid chromatography)
LC-MS	folyadék kromatográfia-tömegspektrometria (liquid chromatography mass spectrometry)
LC-MS/MS	folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometria (liquid chromatography tandem mass spectrometry)
LLE	folyadék-folyadék extrakció (liquid-liquid extraction)
LOD	kimutatási határ (limit of detection)
MAE	mikrohullámmal segített extrakció (microwave assisted extraction)
MeOH	metanol
MEPS	mikroextrakció fecskendőbe töltött szorbenssel (micro extraction by packed sorbent)
MIM	többszörös ion monitorozás (multiple ion monitoring)
MOA	<i>O</i> -metil-hidroxilamin
MOA-HCl	<i>O</i> -metil-hidroxilamin hidroklorid
MOX	metoxiamin-hidroklorid
MRM	többszörös reakció monitorozás (multiple reaction monitoring)
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilszilil-trifluoracetamid
MTBSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> - <i>terc.</i> -butildimetilszilil-trifluoracetamid
PA	poliakrilát
PC-HFME	polimerrel bevont, üreges üvegszállal végzett mikroextrakció (polymer-coated hollow fiber membrane micro extraction)
PDMS	poli-dimetil-sziloxán
PIR	piridin
PFBOCl	pentafluorbenzil-klorid
PLE	nagynyomású folyadék extrakció (pressurized liquid extraction)
PS-DVB	polimerizált sztírol-divinil-benzol
SFI	szelektív fragmens ion

SIM	szelektív ion monitorozás (selective ion monitoring)
SPE	szilárd fázisú extrakció (solid phase extraction)
SPME	szilárd fázisú mikroextrakció (solid-phase microextraction)
SRM	szelektív reakció monitorozás (selective reaction monitoring)
TBDME	<i>terc.</i> butil-dimetil-éter
TBDMCS	<i>terc.</i> butil-dimetil-klórszilán
TEA	trietyl-amin
TFA	trifluor-ecetsav (trifluoroacetic acid)
TIC	teljes ionáram kromatogram (total ion chromatogram)
TMSI	<i>N</i> -trimetilszilil-imidazol
TMCS	trimetil-klórszilán (trimethylchlorosilane)
TMIS	trimetil-jódszilán (trimethyliodosilane)
TOC	összes szerves széntartalom (total organic carbon)
UPLC	ultra nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia (ultra performance liquid chromatography)

1. Bevezetés

Több mint 35 éve ismert a gyógyszervegyületek jelenléte a természetes vizekben [1,2]. A gyógyszermaradványok vízi környezetbeli sorsának kutatása mégis az eltelt másfél évtizedben kapott egyre növekvő figyelmet.

A különböző hatóanyagok alkalmazásukat követően, az emberi szervezetet változatlan vagy metabolit formában elhagyva, kerülnek a szennyvízbe. A legtöbb szennyvíztisztító telep általános tisztító eljárásai, célzottan, a kis mennyiségű (ng/L) gyógyszervegyületek eltávolítására nem alkalmasak. Az egyik első, 1998-ban megjelent tanulmány szerint, a németországi szennyvíztisztító telepek átlagosan 60%-kal csökkentik az egyes gyógyszervegyületek koncentrációját a belépő és a kifolyó szennyvíz között, de a tisztítás határfoka egyes esetekben olyan kicsi is lehet, mint 7% (karbamazepin), vagy olyan nagy, mint 99% (szalicilsav) [3]. Ugyanennek a német kutatócsoportnak sikerült elsőként szteroid hormonokat, ösztrogéneket meghatározni a folyóvízben [4]. A szennyvíztisztítás során felhasznált baktériumtörzsek a konjugált metabolitokat is elbonthatják, így az eredeti anyag ismét megjelenhet a tisztított, elfolyó vízben [5,6]. Több, az Európai Unió támogatásával is végzett nemzetközi tanulmány készült a szennyvíztisztítás hatékonyságának felmérésére. Ezek tanulsága szerint a kifolyó, tisztított szennyvízzel általában 100-3500 ng/L koncentrációban kerülnek a folyóvizekbe a különböző gyógyszervegyületek és egyéb vegyi anyagok, majd a környezeti vizekben 2-400 ng/L-re hígulnak [3,5,7-9]. Az ilyen anyagok, de különösen a természetes és mesterséges szteroid hormonok környezetkárosító hatása, több ízben, bizonyított [10-16]. Annak érdekében, hogy ezek sorsa a vízi környezetben nyomon követhető legyen, és lehetővé váljon hatékonyabb tisztító eljárások kidolgozása, olyan analitikai módszerek szükségesek, amelyekkel a vegyületek különböző eredetű vízmintákból, néhány ng/L mennyiségben is meghatározhatóak.

Munkám célja az volt, hogy az általam vizsgált szteroid vegyületeket, egy sok összetevőjű analitikai eljárásba illesszem, amely a lehető legtöbb szerves mikroszennyező meghatározását teszi lehetővé: egy mintaelőkészítéssel, egy oldatból, egy felvétellel, trimetilszilil-(oxim)-éter/észter származékokként, GC-MS módszerrel. Az így elemezhető vegyületek száma tanulmányaim kezdetén 63 volt, majd a szteroid vegyületek sikeres beillesztését követően 81-re bővült [17-22].

2. Irodalmi háttér

2.1. A szteroid vegyületek általános jellemzése, biológiai jelentőségük

A szteroidok szteránvázis, változatos szerkezetű vegyületek, melyek kiemelkedő biológiai jelentőségűek.

Elsőként megismert tagjuk a koleszterin volt, melyet Poulletier izolált epekövekből 1769-ben, a nevét mégis csak 1815-ben kapta Michel Eugène Chevreultól a *khole* (epe) és a *szterosz* (szilárd) görög szavak összevonásából. A koleszterin minden állati sejt membránjának nélkülözhetetlen alkotóeleme, emellett kiindulási anyaga olyan fontos vegyületcsoportok bioszintézisének, mint a szteroid hormonok vagy az epesavak.

A szteroidok talán legismertebb tagjai, amelyek a gerincesek, így az ember endokrin funkcióit is meghatározzák: a szteroid hormonok. Ebbe a csoportba tartoznak: a gonádokban termelődő, és a nemi jellegek kialakulásáért, a nemi funkciók fenntartásáért felelős androgének, ösztrogének és progesztogének; valamint az anyagcsere általános szabályozását ellátó, kortikoszteroidok, melyek, -ahogy nevük is mutatja- a mellékvesekéregben termelődnek.

Jelentős biológiai aktivitásuk miatt a természetes szteroid hormonok számos gyógyszervegyület-csoport fejlesztéséhez szolgáltak alapul. Ide tartoznak a fogamzásgátló készítményekben, nők milliói által naponta szedett mesterséges ösztrogének és progesztogének, gyógyszerkincsünk legerősebb gyulladásgátló hatóanyagai, valamint a –sokszor illegálisan használt- anabolikus szteroidok is.

A különböző hormonok csupán a koleszterin anyagcseretermékeinek töredékeit képviselik, a legnagyobb mennyiségben keletkező metabolitok az epesavak, melyek a zsírok felszívódásában nélkülözhetetlenek. A májból az epével, az epesavak mellett, változatlan formában, koleszterin is ürül: ezt a vastagbélben élő bélbaktériumok egy nem felszívódó szterollá, koprosztanollá oxidálják, ami szintén a széklettel hagyja el a szervezetet.

A növényvilágban fellelhető, a koleszterinhez hasonló szerkezetű anyagok a fitoszterolok, mint a sztigmaszterol és a β -szitoszterol. Utóbbinak gyógyászati felhasználása is ismert: a szerkezeti hasonlóság miatt gátolja a koleszterin bélcsatornai felszívódását, így hiperkoleszterinémia esetén táplálék kiegészítőként alkalmazzák.

2.2. A szteroid vegyületek meghatározásának felhasználási területei

A vegyületcsoport változatosságának és biológiai jelentőségének köszönhetően, a szteroidok gázkromatográfiás meghatározását biológiai mátrixokból [23-50] és vízmintákból [4,51-79] széleskörűen alkalmazzák.

2.2.1. Metabolikus folyamatok klinikai kutatása

Az emberi szervezetben betöltött összetett szabályozó szerepük miatt, a szteroid hormonok gázkromatográfiás meghatározását humán szérumból anyagcserezavarok diagnosztikájában [32,33,37,48-50], metabolikus rendellenességek (szteroid profil, „szteroid-aláírás”) [34,40], különböző anyagcsere utak [29,47] és autoimmun folyamatok feltérképezésében [28] alkalmazzák.

Ezeket a módszereket a humán vizsgálatok mellett, fiziológiai folyamatok állatkísérletes kutatása [24,25], valamint ritka állatfajok hormonrendszerének megismerése során is hasznosítják [42].

2.2.2. Tiltott teljesítményfokozó szerek ellenőrzése

Az anabolikus szteroidok erőteljes teljesítményfokozók, melyek használata tiltott a hivatásos sportolók számára. Az ismert anabolikumok vizeletből történő kimutatása [23,35] mellett, az új, eddig nem leírt változatok észlelésében [36] is fontos szerep jut a GC-MS módszereknek.

2.2.3. Élelmiszerbiztonság

A haszonállatok izomtömege anabolikus szteroidok használatával jelentős mértékben növelhető. A feldolgozott húst fogyasztó emberek egészségének védelme érdekében a vegyületcsoport ilyen jellegű alkalmazása az Európai Unió országaiban tiltott. A rendelkezés betartásának ellenőrzéséhez elengedhetetlenek a megfelelő analitikai módszerek, amelyekkel az illegális szerek meghatározhatóak vágás előtt az állatok vizeletéből [30,31], hosszabb távú alkalmazás is felmérhető szőrmintákból [43,44], és legfőképp a már feldolgozott húsipari termékek biztonságossága garantálható [26,38,41,45,46].

2.2.4. Környezeti vízminták vizsgálata – a szteroid vegyületek sorsa a vízi környezetben, az élővilágra gyakorolt hatásuk

Az ismertetett alkalmazási területek mellett, a változatos szteroid vegyületek nyomnyi mennyiségi elemzésének legfontosabb területe napjainkban a környezeti vízminták vizsgálata [4,51-79].

A természetes és a mesterséges, gyógyszerként alkalmazott hormonok változatlan, vagy konjugált formában hagyják el az emberi szervezetet és kerülnek a városi szennyvízbe [80]. Mivel az általánosan alkalmazott szennyvíztisztító eljárások a nyomnyi mennyiségben jelen lévő hormonokat nem bontják le maradéktalanul, azok a tisztított szennyvízzel elérik a természetes vizeket [4].

A hormonhatású természetes és mesterséges vegyületek vízi élővilágra gyakorolt, káros hatását számos tanulmány tárgyalja [10-16]. A halpopulációk elnőiesedése világszerte ismert jelenség [10], korábbi tanulmányok ezeket a változásokat más, honos fajok nemi arányainak eltolódásával is összefüggésbe hozták [11]. A kedvezőtlen változások elsődleges okai az erős biológiai aktivitással rendelkező, ösztrogén hatású szteroidok [10]. Különösen veszélyesek a mesterséges vegyületek, mivel ezek tervezésüknél fogva nehezebben bomlanak le az élővilágban, így hosszabb ideig fejtik ki hatásukat. A főként fogamzásgátló tablettákban alkalmazott szereket nők milliói fogyasztják, napi rendszerességgel. A legtöbb antikoncepciens készítményben 20-30 µg-os mennyiségben alkalmazott ösztrogén, az etinilösztadiol, már néhány ng/L koncentrációban megváltoztatja a halak ivararányát, nemzőképességét, udvarlási szokásait, ezzel veszélybe sodorva populációikat [12,13]. Májkárosító hatása miatt is fenyeget egyes ritka halfajokat [14].

In vitro tesztek tanulsága szerint a kevésbé vizsgált androgének is mutatnak kisebb mértékű ösztrogénszerű biológiai aktivitást, és ez fordítva is igaz [80]. A női ivarú halak maszkulinizációját is megfigyelték nagyobb androgén-koncentrációjú folyóvízben [15].

A növényekben széles körben és nagy mennyiségben előforduló fitoszterolok, mint a sztigmatsetrol vagy a β -szitoszterol –a koleszterinéhez hasonló szteroid szerkezetük miatt- megzavarhatják a vadon élő állatok endokrin működéseit. A β -szitoszterol esetében bizonyított, hogy az érintett halfajok több generációjára is kifejti hormonrendszert károsító hatását [16]. Ezek az anyagok természetes módon is

megtalálhatóak a felszíni vizekben, főleg papírmalmok kifolyó vizével szennyezett folyókban, a szokásosnál jóval nagyobb koncentrációt érhetnek el. A hasonló szteroid-szerkezet miatt a vízben élő mikroorganizmusok a fitoszterolokat androgénekké és progeszteronná alakítják, így a növényi szterolok mellett ezek is feldúsulnak az érintett vizekben [15].

A koleszterin és a bomlásával keletkező egyéb fekális szterolok főleg városi szennyvízzel kerülnek a vízi környezetbe, így jelzővegyületként használhatóak a természetes vizek szennyezettségének felméréséhez. Az egyes szterol-koncentrációk arányából a szennyezés forrása azonosítható [81].

A szteroid vegyületek rossz vízoldhatóságuk miatt a szenny- és környezeti vizek szerves részét képező szilárd anyagokban, így folyami [82] és tengeri üledékben [83] is kimutathatóak. In vitro és in vivo tesztek igazolják, hogy az üledékhez kötött ösztrol, β -ösztadiol és ösztrol hozzájárulnak a vízminták ösztrogén-aktivitásához, a vízi ökoszisztéma számára biológiailag elérhetőek [82-84].

Érdekes ötvözet a környezeti- és biológiai minták szteroid analízisének, amikor a tengerben élő, a tengervíz folyamatosan átszűrő, kagylók szövetkivonatának elemzéséből, az adott partszakasz szennyvízzel való érintettségére következtetnek [27,39,51,52].

A vízi élővilág védelme mellett, lehetetlen túlbecsülni ivóvízbázisaink megőrzésének fontosságát. Szükséges olyan analitikai eljárások fejlesztése, amelyekkel a szennyvíztisztítás hatékonysága és a vízi környezet szteroid-szennyezettsége nyomon követhető.

2.3. A szteroid vegyületek kromatográfiás meghatározásának lehetőségei

A változatos szteroid vegyületek elválasztástechnikája a gáz- (GC) és a folyadék kromatográfia (LC) módszereivel történhet. A megfelelő, kicsi kimutatási határ (LOD) elérése érdekében mindkét technikát, a legtöbb esetben, tömegspektrometriás detektorral kapcsolják. A két módszer összehasonlítását a 2007 és 2012 között megjelent hét összefoglaló közlemény alapján részletezem [85-91].

A műszeres mérések előkészítéseként, különösen a környezeti vízmintáknál, dúsító lépés szükséges. A legelterjedtebb módszer a szilárd fázisú extrakció (SPE),

szerepel még az irodalomban szilárd fázisú mikroextrakció (SPME) és folyadék-folyadék extrakció (LLE) is [86].

A nagy molekulatömegű, alapvetően apoláros tulajdonságú, de poláros funkciós csoportokkal is rendelkező szteroid vegyületek GC mérése előtt szükséges még egy további előkészítő lépés, melynek során hőstabilabb, illékonyabb származékokká alakíthatóak. Erre a legelterjedtebbek a különböző szililezőszerek, mivel a trimetilszilil-származékok tömegspektrometriás viselkedése a legkedvezőbb [87].

Az LC módszerek előnyei közé tartozik, hogy nincs szükség származékképző lépésre. Ez a jövőben lehetőséget adhat az online SPE-vel összekapcsolásra is, és így ez a módszer kevésbé idő- és munkaigényes. Az eljárás további előnye, hogy lehetővé teszi a szabad és konjugált formában jelen lévő szteroidok egyidejű analízisét is. Az LC-vel kapcsolt tömegspektrometriás adatgyűjtést -főleg elektronspray ionizáció (ESI)-alkalmazásakor, különösen összetett környezeti minták, pl. szennyvíz esetében megnehezíti az ionelnyomás jelensége. Ennek elkerüléséhez szelektívebb dúsítási eljárások szükségesek, így az elsődleges SPE extraktum további SPE tölteten, kolonnán vagy szilikagélen tisztítása a befejező lépés [86,89].

A környezeti vizek elemzésében igen kis, akár 1 ng/L alatti LOD szükséges. Ez a korábbi LC-MS módszerekkel nem volt elérhető [85,87]. Az első beszámoló, mely hírt adott európai folyóvizekben előforduló ösztrogénekről, GC-MS mérésen alapult [4]. Az utóbbi években az LC-MS technikák gyors és nagymértékű fejlődése figyelhető meg, így napjainkban a kívánt érzékenység már LC módszerekkel is megvalósítható [89], néhány ultra nagyhatékonyságú kromatográfiás (UPLC) módszer is ismert [91].

A folyadék kromatográfia-tömegspektrometria (LC-MS) módszerek előretörése mellett, a gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS) megőrizte jelentőségét a szteroid vegyületek klinikai és környezeti analitikájában [90]. Klinikai területen még mindig a GC-vel kapcsolt MS módszerek a legalkalmasabbak az új, eddig ismeretlen szerkezetű szteroid-metabolitok azonosításában: „a GC-MS a legkiemelkedőbb kutatási eszköz a klinikai szteroid-vizsgálatokban, még a folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) korában is”. Az LC-MS módszerek inkább kiegészítői, mintsem vetélytársai a GC-MS eljárásoknak ezen a területen [88].

A környezeti minták vizsgálatával kapcsolatban elmondható, hogy az LC ismertetett előnyei mellett, a kifejezettebb mátrixhatással terhelt minták, pl. üledék,

iszap, elemzésére a GC módszerek a gyakoribbak [85,91]. A GC mellett szól még a jelentős elválasztási kapacitás és a kis oldószerigény, ami kedvezőbb fenntartási költségeket eredményez.

Az újonnan felfedezett szennyezőanyagok elemzésével foglalkozó, legfrissebb összefoglaló szerint, olyan hidrofób vegyületek környezeti vízmintákban történő elemzésére, mint a szteroidok, a GC a választandó módszer. Világos irány mutatkozik a területen olyan sok összetevőt elemző rendszerek fejlesztése felé, melyekkel egy mérésel, párhuzamosan többféle csoportba tartozó mikroszennyezők is meghatározhatóak [91]. Erre a feladatra létezik már hatékony LC-MS módszer is [92], de nagy felbontóképessége miatt a GC az alkalmasabb.

2.4. A szteroidok elemzésének gázkromatográfiás módszerei

A különböző szteroid vegyületek gázkromatográfiás meghatározásának lehetőségeit biológiai mintákból huszonnyolc ([23-50], 1.a. táblázat), szenny- és környezeti vízmintákból harminc ([4,51-79], 1.b. táblázat), 1999 óta megjelent publikáció alapján foglalom össze.

2.4.1. A mért szteroidok száma és típusaik

Az egy mintaelőkészítéssel, egy oldatból, egy felvétellel meghatározott szteroid vegyületek száma, 2-28 között alakult a biológiai mátrixok, és 2-26 között a vízminták esetében. Öt kivételtől [27,54,55,74,78] eltekintve, a vizsgált anyagok között mindig voltak, változó arányban, ketoszteroidok.

A szteroid vegyületek öt csoportjából (ösztragének, androgének, progesztogének, fekális szterolok, fitoszterolok), a környezeti vízmintákat elemző eljárások közül tizenkilenc csak ösztragének mérésével foglalkozik [4,52-57,59,60,66-73,75,79]. További négy módszer egy-egy vegyületcsoport [63,65,74,78], hat eljárás két vagy három szteroidcsoport képviselőinek mérésére [51,58,61,62,64,76], végül, egyetlen ismert technika valamennyi típusú szteroid vegyület vizsgálatára alkalmas [77].

1.a. táblázat Szteroid vegyületek gázkromatográfiás meghatározásának lehetőségei biológiai mintákból

Mátrix	Szteroidok száma és típusa	Mintaelőkészítés		Adatgyűjtési módszer	Ref.
		Extrakció	Származékképzés		
Humán vizelet	4 {2}	Enzimatis hidrolízis, LLE: 5 mL TBDME, HPLC frakcionáció	100 µL PIR, 100 µL ecetsav-anhidrid, 60°C 60 perc	GC-C-IRMS	[23]
Patkány agy	6 {5}	SPE: AMPREP C ₁₈ 500 mg, E: 5 mL MeOH:víz (85:15, v/v)	20 µL HFBA, 200 µL acetone, szobahőm., 30 perc	GC-MS (SIM)	[24]
Patkány vér	15 {14}	SPE: Oasis HLB 3 mL, E: 2 mL 50% MeOH/víz, 1 mL EtOH	40 µL HFBA, 200 µL acetone, 60°C 60 perc	GC-MS (SIM)	[25]
Szarvasmarha vizelet	5 {4}	Enzimatis hidrolízis, majd SPME: Supelco 0,75mm poliakrilát, vagy MEPS: SGE C ₁₈ MEPS BIN, E: 2x90 µL MeOH:EtAc (30:70, v/v)	SPME: 20 µL BSTFA, 60°C 60 perc, MEPS: 20 µL MSTFA/ DTE/TMIS (1000:5:5, v/m/v), 60°C 50 perc	GC-MS (FS)	[26]
Kagyló szövet-kivonat	5	-	100 µL BSTFA/1% TMCS, 60°C 60 perc	GC-FID	[27]
Humán szérum és nyál	2 {2}	LLE: 1 mL 80% MeOH (szérum), 5 mL dietil-éter (nyál)	30 µL PIR, 10 µL BSTFA/1%TMCS, 65°C 45 perc	GC-MS (SIM)	[28]
Bioassay minta	15 {15}	LLE: 4 mL DCM	50 µL ACN, 50 µL BSTFA/10%TMCS, 56°C 10 perc	GC-MS (SIM)	[29]
Szarvasmarha vizelet	18 {11}	Enzimatis hidrolízis, SPE: C ₁₈ 6 mL (1000 mg), E: 5 mL 80:20 MeOH:víz, SPE: Oasis HLB 3 mL (60 mg), E: 3 mL acetone	30 µL MSTFA, 60°C 60 perc	GC-MS (SIM)	[30]
Szarvasmarha vizelet	2 {1}	Enzimatis hidrolízis, SPE: Sep-Pack Plus 3 mL (500 mg), E: 4 mL MeOH/víz (80:20, v/v), majd LLE: 3x2 mL ciklohexán	MSTFA	GC-MS (MIM)	[31]
Humán újszülött szérum	7 {7}	LLE: Extrelut NT1, 2x3 mL dietil-éter	40 µL MSTFA/DTE/TMIS (1000:4:10, v/m/v), 80°C 35 perc	GC-MS (FS)	[32]
Humán szérum	4 {2}	Enzimatis hidrolízis, LLE: 2x2 mL EtAc, SPE: 100 mg szilika, E: 2x2,5 mL EtAc	50 µL MSTFA/ NH ₄ I /DTE (500:4:2, v/m/m), 60°C 20 perc	HTGC-MS (FS)	[33]

Egér szívizom	232* {n.a.}	SPE: pH5,2 Oasis HLB 3 mL (60 mg) E: 2x1 mL MeOH	50 µL MSTFA/ NH ₄ I /DTE (500:4:2, v/m/m), 60°C 20 perc	HTGC-MS (FS)	[34]
Modell oldat	8 {8}	-	100 µL MSTFA/ NH ₄ I /ET (1000:2:3, v/m/v), 60°C 20 perc	GC-MS (FS)	[35]
Modell oldat	38 {10}	-	1. 50 µL MSTFA, 25 µL ACN, 80°C 30 perc, 2. 50 µL MSTFA/ NH ₄ I /PT, 80°C 30 perc	GC-MS (FS)	[36]
Humán vizelet	6 {6}	SPE: Sep-Pak C ₁₈ , E: 5 mL MeOH	50 µL MSTFA/NH ₄ I/ET (1000:2:3,v/m/v), 65°C 30 perc	GC-MS (SIM)	[37]
Szarvasmarha izom	11 {4}	Ultrahangos extrakció 50 mL MeOH, SPE: C ₁₈ 1g 6 mL, E: 4 mL MeOH, SPE: szilika 1g, 6 mL, E: 10 mL n-hexán:EtAc (25:75, v/v), SPE: NH ₂ 1g 6 mL, E: 4 mL EtAc:MeOH (80:20, v/v)	40 µL MSTFA/ NH ₄ I /DTE (500:4:2, v/m/m), 80°C 20 perc	GC-MS (SIM)	[38]
Kagyló szövet	8 {7}	MAE: MeOH/víz (55:45, v/v), SPE: EnviChrom-P (500 mg), E: 5x2 mL ciklohexán:dietil-éter (70:30, v/v), SPE: NH ₂ (500 mg), E: 1 mL EtAc:MeOH (80:20, v/v)	30 µL DCM + 30 µL MSTFA/merkaptotanol/ NH ₄ I (99,1/0,5/0,4%), 65°C 30 perc	GC-MS (SIM)	[39]
Humán vizelet	70* {34}	SPE: Oasis HLB 3 mL (60 mg), E: 2 mL MeOH, enzimatis hidrolízis, LLE: 2x2,5 mL EtAc:n-hexán (2:3, v/v)	40 µL MSTFA/ NH ₄ I /DTE (500:4:2, v/m/m), 60°C 20 perc	GC-MS (SIM)	[40]
Szarvasmarha vese zsír	8 {4}	LLE: 3x4 mL dietil-éter, SPE: C ₁₈ 6 mL (1g), E: 10 mL víz/ACN/AcH (35:65:0,5, v/v/v), LLE: 2x4 mL dietil-éter, SPE: Diol 3 mL, E: 7 mL ciklohexán/DCM/acetone (50:30:20, v/v/v), HPLC frakcionáció	A: 20 µL MSTFA/DTE/TMIS (1000:0,25:5, v/m/v), 60°C 30 perc B: 20 µL MSTFA/ NH ₄ I /DTE/ACN (1000:0,25:5:100, v/m/v/v), 60°C 30 perc C: 20 µL BSA+0,5 µL MSTFA/I2 (100:1, v/m), 60°C 30 perc	GC-MS (SIM)	[41]

Lamantin szérum	4 {4}	LLE: Extrelut NT3, 5 mL EtAc	MSTFA/DTE/TMIS, 60°C 30 perc	GC-MS/MS (n.a.)	[42]
Állati szőr	28 {18}	Ultrahangos extrakció MeOH, majd LLE: pH 5,2 2x5 mL dietil-éter, vagy SPE: 1g szilika, 0,5g aminopropil E: 20 mL n-hexán:EtAc (60:40, v/v)	15 µL MSTFA/DTE/TMIS (1000:5:5, v/v/w), 60°C 40 perc, vagy 20 µL MSTFA:I2 (1000:4, v/v), 60°C 40 perc, vagy 15 µL MSTFA 60°C 40 perc	GC-MS/MS (SRM)	[43]
Szarvas-marha szőr	10 {4}	NaOH hidrolízis, LLE: 4 mL EtAc, majd SPE: 1g szilika, 0,5g aminopropil, E:4 mL EtAc, majd SPE: 1g szilika, 0,5g aminopropil, E: 4,5 mL kloroform, 8 mL kloroform:EtAc (75:25, v/v)	20 µL MSTFA/DTE/TMIS (1000:5:5, v/v/w), 60°C 40 perc	GC-MS/MS (MRM)	[44]
Szarvasmarha vese zsír és izom	10 {5}	LLE: 10 mL MeOH, 25 mL n-hexán, 25 mL dietil-éter, SPE: Si/NH ₂ 5 mL kloroform:acetone (4:1, v/v)	25 µL MSTFA/ NH ₄ I/ET (1000/25/50, v/m/v), kevertetve és azonnal injektálva	GC-MS/MS (MRM)	[45]
Szarvasmarha vese zsír	25 {14}	LLE: 12,5 mL ACN, szappanosítás (NaOH, mgCl ₂), SPE: Isolute CN 3 mL (500 mg), E: 3,5 mL EtAc:n-hexán (90:10, v/v)	25 µL MSTFA/ NH ₄ I/ET (1000/25/50, v/m/v), 60°C 60 perc	GC-MS/MS (MRM)	[46]
Humán szérum	4 {4}	LLE: 2x3 mL izo-oktán:EtAc (1:1, v/v), SPE: Bond Elut C ₁₈ , E: 4 mL EtOH, SPE: Bond Elut SI, E: 4 mL n-hexán/izopropanol (1:1, v/v)	1. 100 µL MOA-HCl/PIR (10% m/v), 60°C 60 perc 2. 25 µL TMSI vagy DMESI vagy DMIPSI, 60°C 30 perc	GC-MS (SIM)	[47]
Humán újszülött vizelet	146* {97} 120* {108} 76* {65}	SPE: C ₁₈ Sep-Pack , E: 4 mL MeOH, enzimatis hidrolízis, SPE: C ₁₈ Sep-Pack , E: 4 mL MeOH	1. 125 µL 2% MOA-HCl/PIR 2. 85 µL TMSI 100°C, „egész éjjel”	GC-MS/MS (-)	[48] [49] [50]

Jelölések: a rövidítések jegyzékében, valamint {}-ben a vizsgált ketoszteroidok száma; (-)ben a mennyiségi meghatározáshoz használt adatgyűjtési módszer; E = elúció; n.a. = nincs adat; - = nem végeztek; * = szteroid profil vizsgálat, mennyiségi meghatározás nem történt.

1.b. táblázat Szteroid vegyületek meghatározásának gázkromatográfiás lehetőségei szenny- és környezeti vízmintákból.

Mátrix	Szteroidok száma és típusa					Mintaelőkészítés		Adatgyűjtési módszer	LOQ	Mért értékek	Ország	Ref.
	Ö	A	P	S	F	Extrakció	Származékképzés					
Hal szérum, folyóvíz.	5 {4}					SPME: 85 µm PA fiber, vagy SPE: Sep-Pak C ₁₈ , E: 15 mL dietil-éter	100 µL BSTFA, headspace, vagy 50 µL BSTFA, 45°C 60 perc	GC-MS (SIM)	0,032-1,261 (folyóvíz)	0,10-5,55 µg/L	Kína	[51]
	2	2	1	-	-							
Kagyló szövet, 1L tengervíz/ 250 mL szennyvíz.	3 {1}					SPE: pH4,5 C ₁₈ , E: 5 mL EtAc	250 µL PIR, 100 µL BSTFA/1%TMCS, 60°C 60 perc	GC-MS/MS (MRM)	-	0,0014-5,0 µg/L/ (tenger), 0,020-160 µg/L (szennyvíz)	Kanada	[52]
	3	-	-	-	-							
2,5L folyóvíz vagy kifolyó szennyvíz	4 {1}					SPE: SDB-XC korong, E: 2x5 mL MeOH/víz (4:1), 2x5 mL MeOH/ACN (1:1), vagy SPE: C ₁₈ ODS töltet, E: 20 mL MeOH, 20 mL MeOH/DCM (1:1)	75 µL ACN, 40 µL 5% TEA/ACN 25 µL PFBODCl, 80°C 180 perc	GC-NCI-MS (FS)	<0,2 ng/L (becsült)	0,2-17 ng/L	Egyesült Királyság	[53]
	4	-	-	-	-							
1,0L folyóvíz	2					SPE: Oasis HLB 6 mL (500 mg), E: 7 mL MeOH, 5 mL DCM	2 mL 1M NaHCO ₃ , 1 mL 1M NaOH, 2 mL n-hexán, 50 µL 10% PIR/toluol, 50 µL 2% PFBODCl/toluol, szobahőm., 30 perc	GC-NCI-MS (SIM)	0,5-1 ng/L	0,7-75 ng/L	Kína	[54]
	2	-	-	-	-							
500 mL felszíni víz	2					SPE: C ₁₈ 6 mL (1000 mg) vagy PS-DVB 3 mL (200 mg), E: 2x2,5 mL EtAc LLE: 2x100 mL EtAc	200 µL MTBSTFA, 75°C 180 perc	GC-MS (FS)	LOD*: 50-300 ng/L	-	Hollandia	[55]
	2	-	-	-	-							

10-25 mL modelloldat	3 {1}				PC-HFME: helyben szintetizált DHPM polimer, vagy SPME: PDMS, 100 µm	100 µL MTBSTFA, 60°C 30 perc	GC-MS (SIM)	0,3-2,3 ng/L	-	Szingapúr	[56]
	3	-	-	-							
2,5L szennyvíz és felszíni víz.	3 {1}				SPE: 90mm C ₁₈ korong, E: 2x30 mL MeOH/víz (85:15)	100 µL ACN, 100 µL/1% TBDMCS/MTBSTFA, ultrahangos fürdő, 2x1 perc + 2x15 perc szobahőm.	GC-MS/MS (MRM)	1 ng/L	<1-55 ng/L	Egyesült Királyság	[57]
	3	-	-	-							
500-1000 mL folyóvíz	7 {1}				SPE: pH7, Supelclean ENVI18 500 mg, E: 3x2 mL MeOH:EtAc (1:1, v/v)	MSTFA 70°C 120 perc	GC-MS (FS)	0,5-1 ng/L (becsült)	1-1242 ng/L	Kína	[58]
	6	-	-	1							
2L szennyvíz	5 {1}				SPE: Oasis HLB (60 mg), tisztítás szilika tölteten (500 mg), E: 10 mL EtAc	100 µL EtAc, 200 µL MSTFA, 85°C 100 perc	GC-MS/MS (MRM)	1-3 ng/L	2,9-62 ng/L	Spanyolország	[59]
	5	-	-	-							
2L folyóvíz	3 {1}				SPE: 50mm C ₁₈ XF korong, tisztítás NH ₂ és Si tölteteken	MSTFA/ NH ₄ I/ET, 60°C 60 perc	GC-MS (FS)	0,25 ng/L	0,37-10 ng/L	Belgium	[60]
	3	-	-	-							
1L szennyvíz vagy folyóvíz	6 {2}				SPE: pH3, 0,10g Lichrolut + 0,25g RP-C ₁₈ E: 4x1 mL acetone, tisztítás szilikagélen.	50 µL MSTFA/TMSI/DTE (1000:2:2, v/v/m), 60°C 30 perc	GC-MS/MS (MRM)	1-500 ng/L	1-70 ng/L	Németország, Kanada, Brazília	[4]
	6	-	-	-							
1L ismeretlen eredetű vízminta	26 {18}				SPE: Bakerbond C ₁₈ XF korong, E: acetone/MeOH, HPLC frakcionálás	MSTFA/ NH ₄ I/ET 60°C 60 perc	GC-MS/MS (MRM)	-	40 ng/L	Belgium	[61]
	2	18	6	-							
1L felszíni víz	4 {4}				SPE: Sep-Pak C ₁₈ , E: 2x3 mL MeOH/víz (95:5, v/v), tisztítás Florisil tölteten.	50 µL MSTFA/I ₂ (1000:1,4 v/m), 60°C 40 perc	GC-MS/MS (MRM)	0,5-1 ng/L	31-52 ng/L	USA	[62]
	-	3	1	-							
2L szennyvíz	7 {3}				LLE: 4x10 mL DCM:MeOH (2:1, v/v), 6% KOH hidrolízis	BSTFA	GC-MS (FS)	1-80 µg/kg	1-5200 µg/kg	Spanyolország	[63]
	-	-	-	7							

Elfolyó szennyvíz, folyóvíz.	9 {3}				SPE: Oasis HLB 6 mL (500 mg), E: 10 mL MeOH/dietil-éter (10:90, v/v)	50 µL BSTFA, 60°C 15 perc	GC-MS (FS)	0,5-1 ng/L	-	Franciaország	[64]
	4	1	-	4							
1L szennyvíz	2 {2}				LLE: 3x60 mL DCM	20 µL BSTFA, 60°C 30 perc	GC-MS (FS)	-	-	India	[65]
	-	2	-	-							
2L elfolyó szennyvíz és folyóvíz	3 {1}				SPE: Oasis HLB 6 mL (200 mg), E: 10 mL MeOH	50 µL PIR + 50 µL BSTFA 60-70°C, 30 perc	GC-MS (FS/MRM)	0,3-1,4 ng/L	0,1-7,2 ng/L	Egyesült Királyság	[66]
	3	-	-	-							
250 mL szennyvíz/3000 mL kútvíz	3 {1}				SPE: pH2, Oasis HLB (200 mg), E: 5 mL acetone	10/25 µL PIR + 25/25 µL BSTFA, 60°C, 30 perc	GC-MS (SIM)	LOD*: 1-1000 ng/L	1-80 ng/L	Mexikó	[67]
	3	-	-	-							
100 mL szennyvíz	3 {1}				SPE: pH8, Oasis HLB 6 mL (200 mg) E: 2x4 mL EtAc	50 µL PIR + 50 µL BSTFA 65°C, 25 perc	GC-MS (MRM/MIM)	4-27,5 ng/L	49,4-101,3 ng/L	Spanyolország	[68]
	3	-	-	-							
400 mL szennyvíz	4 {1}				SPE: pH2,5, Oasis HLB 6 mL (500 mg), E: 10 mL DCM/acetone (7:2, v/v) tisztítás: Sep-Pak szilika 6 mL (500 mg)	BSTFA +1% TMCS, 70°C, 30 perc, ultrahang	GC-MS (FS)	0,8-4 ng/L	6,9-459,1 ng/L	Kína	[69, 70]
	4	-	-	-							
1L felszíni víz	4 {2}				SPE: különböző töltetek, E: 10 mL EtAc	50 µL PIR, 50 µL BSTFA/1% TMCS, 60-70°C, 30 perc	GC-MS (SIM)	1,0-11,2 ng/L	5-17 ng/L	Egyesült Királyság	[71]
	4	-	-	-							
1L szennyvíz vagy folyóvíz.	4 {2}				SPE: Oasis HLB (200 mg), E: 10 mL EtAc	50 µL PIR + 50 µL BSTFA/1% TMCS, 60-70°C, 30 perc	GC-MS (SIM)	0,3-0,7 ng/L	2-41 ng/L	Egyesült Királyság	[72]
	4	-	-	-							
Szennyvíz	4 {2}				SPE: Oasis HLB, E: 15 mL EtAc	50 µL PIR + 50 µL BSTFA/1% TMCS, 60-70°C, 30 perc	GC-MS (SIM)	1,0-11,2 ng/L	16-51 ng/L	Egyesült Királyság	[73]
	4	-	-	-							

1L felszíni víz	5					SPE: különböző töltetek, E: 2x5 mL DCM	50 µL BSTFA/1% TMCS 300°C, pillanatszerűen az injektorban	GC-MS (SIM)	LOD*: 1,3-15 ng/L	8,0-277,6 ng/L	Szingapúr	[74]
	-	-	-	5	-							
500 mL szennyvíz	6 {1}					SPE: Strata-X 6 mL (200 mg), E: 3 mL metil- <i>terc.</i> -butil-éter, 3 mL MeOH, 6 mL víz	50 µL PIR + 50 µL BSTFA/1% TMCS, 60°C, 35 perc	GC-MS (FS/ MRM)	10 ng/L	6-24 ng/L	USA	[75]
	6	-	-	-	-							
500 mL szennyvíz, felszíni víz.	12 {7}					SPE: Oasis HLB 6 mL (500 mg), E: 2x5 mL MeOH	50 µL BSTFA/1% TMCS, 50 µL PIR, 50 µL ACN 60°C, 30 perc	GC-MS/MS (MRM)	0,8-15 ng/L	-	Ausztrália	[76]
	6	5	1	-	-							
500 mL szennyvíz	22 {7}					LLE: 3x50 mL DCM, tisztítás deaktivált Florisil oszlopon	50 µL BSTFA/10%TMCS, 90°C 180 perc	GC-MS (FS)	1,5-529 ng/L	1-230119 ng/L	Kanada	[77]
	6	2	3	6	5							
Folyóvíz szüredék	6					Soxhlet extrakció: 90 mL dietil-éter, 10%KOH/MeOH, 100°C, 120 perc 6M HCl savanyítás, LLE: 3x0,5 mL EtOH	50 µL MOA/PIR 60°C, 30 perc, 100 µL BSTFA/1% TMCS, 60°C, 30 perc	GC-MS (FS)	-	0,027-16,813 µg/L	Ausztrália	[78]
	-	-	-	6	-							
1L kifolyó szennyvíz, folyóvíz	5 {1}					SPE: C ₁₈ E: MeOH/víz (95:5, v/v)	MOA/PIR, BSTFA/10% TMCS	GC-MS/MS (MRM)	0,2-2 ng/L	0,1-75 ng/L	USA	[79]
	5	-	-	-	-							

Jelölések: a rövidítések jegyzékében és az 1.a. táblázatban, valamint: Ö = ösztrogének; A = androgének; P = progesztogének; S = fekális szterolok; F = fitoszterolok; LOD* = csak LOD adatot adtak meg.

2.4.2. Az extrakciós eljárások

A biológiai mátrixok (vér, vizelet, szérum, nyál, szövetminták) elemzéséhez többnyire összetett, több lépéses dúsítási eljárások szükségesek. A konjugált szteroidok mérhetőségének érdekében, enzimatis [26,30,31,48-50] vagy lúgos [44,46], hidrolízis előzheti meg a kivonási folyamatot. Az áttekintett tanulmányokban egyetlen SPE dúsításból és elúcióból álló extrakciót, 18 szénatomú polimerű (C_{18}) [24,37], valamint hidrofil-lipofil (HLB) töltetekkel [25,34] alkalmaztak; valamint különböző tölteteken, egymás után végzett SPE kivonást [30,38,48-50], egylépéses LLE dúsítást [28,29,32,42], egymást követő SPE és LLE műveletek sorozatából álló eljárásokat [31,40,43-47] is javasoltak. További elválasztásra mikrohullámmal segített extrakció (MAE) technikát [39], és nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia (HPLC) frakcionálást javasoltak [23,41]. A mikroextrakció fecskendőbe töltött szorbenssel (MEPS) és az SPME technikák hatékonyságát anabolikumok szarvasmarha vizeletbeli mérésére tanulmányozták [26]: a MEPS alkalmasnak bizonyult a feladatra.

A környezeti vízminták előkészítése során a legtöbb esetben egyetlen SPE extrakciót alkalmaztak [52,54,57,58,64,66-68,71-76,79], legtöbbször HLB, néhány esetben C_{18} töltettel; három esetben alkalmaztak LLE-t [63,77,65], melyet lúgos hidrolízis [63] vagy szilika oszlopon további tisztítás követett [77]. SPE extraktumok ismételt tisztítására szilika töltetet [4,59,60,62,69,70], C_{18} töltetet [53] és HPLC frakcionálást is [61] alkalmaztak. A mikroextrakciós technikák tekintetében végeztek összehasonlítást az SPME és SPE [51], valamint az SPME és a polimerrel bevont, üreges üvegszállal végzett mikroextrakció (PC-HFME) módszerek között [56]. A leírt SPME módszer egyenrangúnak bizonyult az SPE dúsítással, a PC-HFME hatékonyabbnak az SPME módszernél.

Fontos kiemelni, hogy a környezeti vizek analízisét szolgáló, 2012. szeptemberig publikált és itt összefoglalt módszerek, egy kivétellel [78], a különböző dúsításokat megelőzően, a vízminták szilárd lebegőanyag tartalmát, általában üvegszűrőpapíron való szűréssel, eltávolították, és csak az oldat részt vizsgálták. Ez a lépés azért szükséges, hogy megakadályozzák az SPE oszlopok gyors eltömődését.

Ahogy korábban jeleztem, a szteroid vegyületek a természetes vizek szilárd részecskéihez kötődhetnek: a vízi ökoszisztéma a kolloid rendszerrel szembesül [82-84]. Egy 2012-ben megjelent, a természetes vizek mintavételezésével foglalkozó

összefoglaló szerint, egyre nagyobb hangsúlyt kap a vizek lebegőanyagának mintavételezése [104]. Ez megfelel az Európai Unió Víz Keretiránytervének (EU Water Framework Directive), mely szerint 2015-ig „...az üledék alternatívájaként a szuszpendált szilárd lebegőanyag...” elemzése szükséges. [105]. Az irodalmi áttekintés során kiderült, hogy a szteroid szennyezők oldott és szilárd fázisok közötti megoszlását vizsgáló tanulmányok nem elérhetőek.

Természetes vizek szilárd lebegőanyagából szerves mikroszennyezőket LC-MS [106-108] , bioassay [109,110] és GC-MS [78] módszerekkel mérték. A szuszpendált anyag extrakciójához javasolt módszerek idő- és munkaigényesek: ezek a költséges nagynyomású folyadék extrakció (PLE), melyet illegális szerek [106] és egyes gyógyszervegyületek [108], vagy, az SPE tisztítással és a minták fagyasztva szárításával járó ultrahangos kivonás, melyet antidepresszánsok és gyulladásgátlók elemzésére alkalmaztak [107]. A fellelt módszerek közül az egyetlen, amely szteroidokkal foglalkozik, hat szterol elemzését írta le folyóvíz szüredékéből: Soxhlet-extrakciós eljárásról számol be, amit szappanosítás, etanolos kivonás, majd fagyasztva szárítás követett [78].

2.4.3. A származékkészítés

A szteroid vegyületek származékká alakításához legnépszerűbbek a különböző szililezőszerek, ugyanakkor acilezőszerrel, így heptafluoro-vajsav (HFBA) [24,25], pentafluorbenzil-klorid (PFBOCl) [53,54], vagy ecetsavanhidrid [23] reagenssel való átalakítást követően is meghatározhatóak.

Az irodalomban változatos szililezési eljárásokat írtak le. Trimetilszilil-étereket az *N,O*-bis(trimetilszilil)-trifluoracetamid (BSTFA) [26,51,58,63-68], a BSTFA + 1% trimetil-klórszilán (TMCS) [27,28,52,69-78], a BSTFA + 10% TMCS [29,77,79], az *N*-metil-*N*-trimetilszilil-trifluoracetamid (MSTFA) [26,30,31,37-46,58-62], az *N,O*-bis(trimetilszilil)-acetamid (BSA) [41], az *N*-trimetilszilil-imidazol (TMSI) [47-50], a dimetiletilszilil-imidazol (DMESI) és a dimetil-izopropil-imidazol (DMIPSI) [47] reagensekkel készítették. A *terc*.butil-dimetil-szilil-étereket az *N*-metil-*N-terc*.butildimetilszilil-trifluoracetamid (MTBSTFA) [55,56], vagy az MTBSTFA + 1% *terc*.butil-dimetil-klórszilán (TBDMCS) keverékkel [57] képezték. A reakcióhoz alkalmazott oldószer többnyire a szililezőszer, piridin (PIR) [28,52,66-68,71-

73,75,76,78,79], vagy acetonitril (ACN) [29,36,41,57] voltak. A szililezési reakcióhoz alkalmazott hőfok és reakcióidő szinte minden módszer esetében különbözött: 45°C 60 perc [51], 56°C 10 perc [29], 60°C 15 perc [64], 60°C 20 perc [34,35,40], 60°C 25 perc [68], 60°C 30 perc [4,41,42,47,56,65,67,76,78], 60°C 35 perc [75], 60°C 40 perc [43,44,62], 60°C 50 perc [26], 60°C 60 perc [26,27,30,46,47,52,60,61], 65°C 30 perc [37,39], 65°C 45 perc [28], 60-70°C 30 perc [66,71-73], 70°C 120 perc [58], 75°C 180 perc [55], 80°C 20 perc [38], 80°C 30 perc [36], 80°C 35 perc [32], 85°C 100 perc [59], 90°C 180 perc [77], 100°C 60 perc [78], 100°C „egész éjjel” [48-50], és alkalmaztak ultrahangos fürdőt [57,69,70] is. A származékokat fűtés és várakozás nélkül, headspace injektálással [51], és kevertetés után azonnal [45] is injektálták. A származékképző reakció pillanatszerűen, az injektorban is történhet [74].

A ketoszteroidok esetében, a ketocsoportnak a legtöbb tanulmányban nem szenteltek külön figyelmet, a vegyületeket változatlan formában, vagy a szililezési reakció során, katalizátor (TMCS, TMIS, NH₄I) jelenlétében részben keletkező enol-trimetilszilil-éterként határozták meg [4,26,28-32,34,37,38-46,51,52,56-65,67,69-74,77]; vagy előzetes redukciót követően, trimetilszilil-éterre alakított hidroxilcsoportként [35]. Csupán néhány esetben valósult meg a szteroid vegyületek minden funkciós csoportjának átalakítása, a ketocsoportok metil-oximálásával [47-50,79].

Készültek összehasonlító tanulmányok a különböző származékkészítő eljárásokról modelloldatokkal [93-103] és a gyakorlatban is alkalmazott módszerekhez kapcsolódóan is [29,41,59].

Egyszerűbb vizsgálatok esetében egyetlen szililezőszert (MSTFA [59], BSTFA [94]) használva optimalizálták a reakció körülményeit, így a reakcióidőt, a hőfokot, az alkalmazott reagens és a katalizátor mennyiségét.

A reakcióidő csökkentésének érdekében a hagyományos fűtési eljárásokat megpróbálták mikrohullámú kemencében melegítéssel helyettesíteni [95-97], vagy ultrahangos fürdővel hatékonyabbá tenni [96].

Összehasonlították az MTBSTFA és a BSTFA reaktivitását különböző helyzetű hidroxilcsoportot tartalmazó szteroidok esetében: az MTBSTFA nem lépett reakcióba szterikusán gátolt funkciós csoportokkal [95].

Több tanulmány is született, amelyekben a különböző reagenseket és az alkalmazott reakciókörülményeket, szteroid vegyületek esetében, átfogóan vizsgálták modelloldatokkal [96-98], és a gyakorlatban is alkalmazták az optimált módszert [59].

Az MTBSTFA, MSTFA, BSTFA és BSTFA/1%TMCS összehasonlításból kiderült, hogy –a korábbi tapasztalatokkal egybehangzóan [96]- az MTBSTFA nem alkalmas a szteroidok minden hidroxilcsoportjának szililezésére, a leghatékonyabbnak talált MSTFA mennyiségét, a reakció hőfokát, és idejét optimálták, majd a kidolgozott módszert szennyvízminták elemzéséhez alkalmazták [59].

Összehasonlították az MSTFA, BSTFA, BSA szililezőszereket 55°C, 70°C, 90°C hőfokokon, 15, 30, 45, 60 perc reakcióidővel. Az elegyhez dimetilformamid (DMF), PIR, ACN oldószereket, melegítésre mikrohullámú fűtést és ultrahangos fürdőt is [96] használtak. A mikrohullámú melegítés a hagyományos módszerekkel összemérhető hatásfokú, ezért a mikrohullámmal segített származékkészítést a legnépszerűbb származékképzőszerek, így az MSTFA, a BSTFA/TMCS, a metoxiamin-hidroklorid (MOX) + BSTFA/TMCS, a BSA, az MTBSTFA esetében optimálták: az MSTFA a legalkalmasabb a mikrohullámú melegítéshez [97].

Kutatták a szililezési reakcióhoz használt, különböző oldószerek (etil-acetát {EtAc}, ACN, diklórmétán {DCM}, PIR, DMF), szililezőszerek (MSTFA, BSTFA, MTBSTFA), és az alkalmazott hőfok hatását a kialakuló termékekre, kifejezetten az ösztron és az etinilöztradiol esetében [98]. Ugyanis több tanulmány is beszámolt arról, hogy a nem megfelelően végzett származékkészítés során az etinilöztradiol egy része az ösztronnak megfelelő származékká alakulhat, ezzel megbízhatatlanná téve az elemzés eredményeit [99-102]. Az MTBSTFA újra alkalmatlannak bizonyult, de bármelyik vizsgált trimetilszililezőszert, az oldószerek közül a PIR-t 60°C-on, vagy a DMF-t bármilyen vizsgált hőfokon alkalmazva, nem tapasztalták a kedvezőtlen átalakulást. Ez az eredmény egybehangzó más tanulmányokkal, amelyek a BSTFA-t javasolják a mellékreakció elkerülésére [100], vagy az oldószerválasztás kritikusságára hívják fel a figyelmet [101,102].

Kevés tanulmány foglalkozik a ketocsoportot is tartalmazó szteroidok származékkészítésével [29,41]. Egy, kifejezetten a ketoszteroidok származékkészítő módszereit áttekintő összefoglaló szerint, a szteroidok GC-MS nyomelemzésének a kulcsa éppen a ketocsoport megfelelő kezelésében rejlik. Az egyik elterjedt módszer az

enol-trimetilszilil-éterre történő átalakítás valamilyen trimetilszililezőszert (pl. MSTFA, BSA), katalizátort (TMCS, TMIS, NH_4I), és a keletkezett termék stabilitását szolgáló redukálószer (pl. ditioneitol {DTE}, etántiol {ET}) keverékével. A módszer előnye, hogy egy lépésben szolgáltathatja a teljes mértékben származékká alakított, injektálható mintát. Hátrányaiként említik, hogy a folyamat során többféle (akár három-négy) izomer keletkezhet, a különböző mellékreakciók egyéb termékekhez vezethetnek, így a készített oldat általában csak rövid ideig stabil. A másik, kétlépéses módszer során először oximmá alakítják a ketocsoportokat hidroxilamin-hidroklorid (HOA-HCl) vagy MOX/PIR oldatával, és ezt követi a trimetilszililezés. Az eljárás előnyeként emelik ki a keletkező termékek hosszabb ideig (akár egy hónapig) tartó stabilitását, hátrányként jelölik meg, hogy sokszor két (szin és anti) izomer keletkezik, és a módszer a két lépés miatt idő-, és munkaigényesebb. Az összefoglaló hangsúlyozza, hogy a ketocsoport származékká alakításának módszerei még nem kiforrottak, így -különösen a nyomnyi mennyiségű ketoszteroidok elemzéséhez- a származékkészítés átgondolt optimalizálása szükséges [103].

Jól mutatja a ketoszteroidok átalakítása körüli egyet nem értést, és az enol-trimetilszilil-éterre alakítás nehézségeit, hogy a két tanulmány közül, melyek a ketoszteroidok enolizálásával foglalkoznak, az egyikben több reagens keveréket hasonlítottak össze, de többféle melléktermék keletkezése miatt végül egy új keveréket dolgoztak ki a teljes mértékű enolizáció érdekében [41]. A másik tanulmányban éppen azt tűzték ki célul, hogy megakadályozzák a ketocsoportok enolizációját, így elkerülve a továbbiakban keletkező egyéb termékek kialakulását [29].

2.4.4. Az adatgyűjtési módszerek

A feldolgozott 58 irodalmi hivatkozásban leírt GC-MS módszerek, -közül az egyetlen, lángionizációs detektort (FID) alkalmazó [43], és az egyetlen, gázkromatográfia-izotóparány-tömegspektrometria (GC-C-IRMS) [14] módszer kivételével-, a tömegspektrometriás detektort alkalmazták, különböző adatgyűjtési technikákkal.

Ezek közül a legkisebb munkaigényű, és a legkevésbé szelektív a pásztázó üzemmód (FS). Ebben az üzemmódban a tömegspektrometriás detektor egy meghatározott m/z tartományon belül minden beütést rögzít, így teljes ionáram

kromatogram (TIC) készül. A kromatogram értékelése során szoftver segítségével extrahálják a TIC felvételből az egyes vegyületekhez tartozó szelektív fragmens ionok (SFI) beütésszámát.

A szelektív ion monitorozó technikák esetében a mérés során a detektor a meghatározandó vegyületek elúciós ablakához tartozó időintervallumban csupán az adott komponensre jellemző SFI-k beütésszámát rögzíti. Ezzel a technikával az értékeléskor csak akkor van szükség a rögzített kromatogram további extrakciójára, ha egy elúciós ablakban több összetevő is szerepel. Az ilyen módszer során a mennyiségi meghatározás vegyületenként egyetlen (szelektív ion monitorozás - SIM), vagy több SFI alapján (többszörös ion monitorozás - MIM) történhet.

A módszerkidolgozás tekintetében a legmunkaigényesebb technikák a tandem tömegspektrometriás (MS/MS), szelektív reakció monitorozó módszerek. Az eljárás fejlesztése során minden egyes vizsgált vegyület SFI-i közül ki kell választani a legalkalmasabbat, mint szülőiont, aminek a további munkafolyamatok során optimált körülmények közötti további fragmentációja újabb, szelektív, leányionokat szolgáltat. Az ilyen, MS/MS detektálás során az egyes vegyületekhez tartozó időszegmensben a detektor egy-egy, az adott anyagra jellemző SFI-t fragmentál, és a keletkező, szintén a kiindulási vegyületre szelektív leányion vagy –ionok beütésszámát méri. A csak egy ionátmenetet vizsgáló módszert szelektív reakció monitorozó (SRM), a több ionátmenetet, azaz több keletkező leányion mennyiségét rögzítő eljárásokat többszörös reakció monitorozó (MRM) módszernek nevezik.

A 26 áttekintett, biológiai mátrixokkal foglalkozó GC-MS módszer közül ötben FS [26,32-33,35-36], tízben SIM [24,25,28-30,37-39,41,47], egyben-egyben MIM [31], SRM [43], háromban MRM [44-46] technikát használtak, öt közül munka nem tartalmaz mennyiségi meghatározást [34,40,48-50], egy esetben nem írták le a pontos detektálási módszert [42].

A környezeti vízminták analízisével foglalkozó harminc publikáció közül tizenháromban FS [53,55,58,60,63-66,69,70,75,77,78], nyolcban SIM [51,54,56,67,71-74], egyben MIM [68], tizenegyben MRM [4,52,57,59,61,62,66,68,75,76,79] adatgyűjtési módszert használtak, és három tanulmányban a különböző módszerek összevetését írták le [66,68,75].

Az első összehasonlításban a három mért szteroidot (ösztрон, β -öszt радиол és etinilöszt радиол) egyrészt BSTFA-val szililezést követően, MIM technikával, másrészt származékkészítés nélkül, MRM módszerrel határozták meg, modelloldatokból és szennyvízmintákból. Mindkét módszer alkalmasnak bizonyult a vizsgált szennyvízminták elemzésére, hasonló reprodukálhatóság, LOD és linearitás értékekkel. A gázkromatográfia-tandem tömegspektrometria (GC-MS/MS), MRM módszert részesítették előnyben: származékkészítés nélkül gyorsabb volt, és megbízhatóbb azonosítást tett lehetővé a keletkező szelektív leányionoknak köszönhetően [68].

A következő összehasonlító tanulmányban öszt рон, β -öszt радиолt és etinilöszt радиолt elemezték folyó- és szennyvízmintákban, LC-MS módszerrel, származékkészítés nélkül, valamint BSTFA-val származékkészítést követően, GC-MS (FS) és GC-MS/MS (MRM) technikákkal. A három módszer teljesítményének összevetéséhez az LOD, és az éles mintákban mért értékek szerepelnek. Az LC-MS és a GC-MS módszerek LOD értékei összemérhetőeknek (0,4-1,4ng/L), a GC-MS/MS eljárásé kisebbnek (0,3ng/L) bizonyultak. A három módszer közül a GC-MS (FS) nem volt alkalmas a néhány ng/L mennyiségű szennyezők észlelésére, az LC-MS detektálást jobban terhelték a nagy szervesanyag-tartalmú mátrixok: a GC-MS/MS (MRM) módszer bizonyult a legelőnyösebbnek [66].

A harmadik összehasonlító elemzés során öszt рон, β -öszt радиолt, etinilöszt радиолt és öszt рон mértek talaj- és talajvízmintákban, BSTFA/1%TMCS reagenssel származékkészítést követően, GC-MS (FS) és GC-MS/MS (MRM) módszerekkel. Az MRM módszer kisebb LOD értékekkel, nagyobb pontosságú, a leányionoknak köszönhetően, a minőségi azonosítás is megbízhatóbb volt. Az FS analízissel több ízben nem sikerült a minták öszt рон és öszt радиол tartalmát detektálni nagy TOC értékű mintákban, ugyanakkor a mért etinilöszt радиол mennyisége ezzel a módszerrel, egy hasonló SFI-vel jellemezhető ismeretlen vegyület koelúciója miatt, nagyobb volt [75]: ez a pozitív hiba korábbi tapasztalatok megerősítése volt [4].

Az összesen 77, 1998-2012 szeptembere között megjelent, szteroid vegyületek kromatográfiás elemzésével foglalkozó publikáció [4,23-79,85-103] áttekintése alapján elmondható, hogy:

- a. az irodalomban nem szenteltek kellő figyelmet, a csak keto- vagy csak hidroxilcsoportot, és a mindkét funkciós csoportot tartalmazó szteroid vegyületek egymás melletti, egy kromatográfiás felvétellel történő meghatározásának. Csekély számú kivételtől eltekintve, a ketoszteroidok teljes származékká alakítása nem, vagy előzetes redukciót követően, hidroxilcsoportként valósult meg, ami az eredeti szerkezetre vonatkozó információ elvesztésével jár.
- b. A számos, korábban javasolt származékkészítő eljárás igen változatos reakciókörülményeket jelöl meg ideálisnak, úgy a felhasznált reagensek, mint a reakció hőfokát és idejét illetően. A különböző módszereket összehasonlító tanulmány során csak néhány szteroid vegyülettel végezték el a vizsgálatokat.
- c. A környezeti vízminták analízisével foglalkozó módszerek közül a legtöbb esetben csak a szteroidok egyetlen csoportjába tartozó hormonokat, leggyakrabban ösztrogéneket elemeztek. Kevés figyelem irányult a szintén hormonhatású és környezetkárosító androgénekre, progesztogénekre, (fito)szterolokra.
- d. Vízminták analíziséhez 30-ból 11 esetben használták a legszelektívebb, MRM adatgyűjtést, és csak 3 tanulmányban került sor több detektálási módszer összehasonlítására. A GC-MS mérésekben használható három adatgyűjtési módszer még nem került összehasonlításra azonos körülmények között.
- e. A korábban közölt eljárások szerint nem valósult meg a vízminták teljes elemzése, mivel a mintaelőkészítés során üvegszűrőpapíron kiszűrte, a vízminták szerves részét képező szilárd lebegőanyagot egyszerűen eldobták. Az egyetlen módszer, amely szerint szteroidokat (szterolokat) folyóvízminták lebegő szilárd fázisában elemeztek, nem kapcsolta össze az extrahált szuszpendált fázist a hozzá tartozó térfogatú folyóvízzel.

3. Célkitűzések

Az előzetes irodalmi áttekintésnek megfelelően, a munkám célja:

- a. a korábban kidolgozott, sok összetevőt elemző rendszer [17-20] kiterjesztése, egy sor, különböző típusú és eredetű szteroid vegülettel. Ennek érdekében:
- b. részletes származékkészítési- és fragmentációs tanulmány készítése.
 - A csak szililezett, vagy változatlan formában mért vegületek, és a teljes mértékben származékká alakított, trimetilszilil-oxim-éter származékok válaszelénekek összehasonlítása.
 - A legnépszerűbb szililezőszerek (BSTFA, MSTFA, MTBSTFA) és a hexametil-diszilazán (HMDS)/TFA hatékonyságának összevetése azonos körülmények között készült modelloldatok elemzésével, majd a kiválasztott reagens alkalmazásának optimalizálása a reakcióidő és a –hőfok tekintetében.
 - A vizsgált szteroidok tömegspektrometriás viselkedéséről részletes fragmentum-analitikai tanulmány készítése.
- c. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterekhez tartozó LOQ értékek, és a reprodukálhatóság meghatározása modelloldatokból.
- d. A javasolt eljárás gyakorlati jelentőségének bemutatása két magyar szennyvíztisztító telep be- és kifolyó mintáinak több hónapon át tartó elemzésével.
- e. Az érzékenység növelése céljából, a szteroidok, és a velük együtt eluálódó kólsavak mérésére alkalmas MIM és MRM adatgyűjtési eljárások fejlesztése.
- f. A kidolgozott három adatgyűjtési technika birtokában (FS, MIM, MRM) részletes összehasonlító tanulmány készítése modelloldatok és valós szennyvízminták elemzése alapján.
- g. Egyszerű és hatékony extrakciós eljárás kidolgozása, amely alkalmas a szenny- és folyóvízmintákból kiszűrt, szilárd lebegőanyagok elemzésére. A vizsgált szteroid vegületek megoszlásának bemutatása az elemzett Duna- és szennyvíz-minták oldott- és szuszpendált szilárd fázisai között.

4. Módszerek

4.1. Kémszerek

Minden felhasznált anyag és reagens analitikai tisztaságú volt. A PIR és a HOA-HCl a Reanal ZRt. (Budapest, Magyarország), a hexán, a metanol (MeOH), az EtAc, a HMDS, az MSTFA, a BSTFA, az MTBSTFA, a TFA, és a 2. táblázatban felsorolt standard vegyületek a Sigma (St. Louis, MO, USA) termékei voltak.

4.2. Vizsgált minták

4.2.1. Szennyvízminták

A szennyvízminták egyrészt a Fővárosi Csatornázási Művek ZRt. Dél-pesti Szennyvíztisztító Telepéről, másrészt az Organica ZRt. Telkiben működő, kísérleti szennyvíztisztító telepéről, mindkét esetben 24 órás mintavételezésből származtak.

4.2.2. Duna-vízminták

A Duna-vízminták mintavételezésére az ELTE-TTK Északi Tömb előtti folyószakaszon került sor.

A szenny- és Duna-vízminták egyaránt, 5 literes, sötétített, csiszolatos dugóval ellátott üvegekben, közvetlenül a mintavételt követően érkeztek a laboratóriumba, ahol a feldolgozásuk azonnal megkezdődött.

4.3. Eszközök

4.3.1. A mintaelőkészítés során használt eszközök

A minták szűrésénél 125 mm átmérőjű, 1,6 µm pórusméretű GF/A üvegszűrőpapírt (Whatman Maidstone, UK), a szilárd fázisú extrakcióhoz 12 mintafeltétes vákuumkádat (Supelco, Bellefonte, PA, USA) és Oasis HLB 200 mg/6 mL szorbenst tartalmazó oszlopokat használtam (Waters, Milford, MA, USA). A minták oldószer-mentesítését Büchi Rotavapor R-200 (Flawil, Svájc) készüléken, Büchi vákuumpumpa V-700 segítségével végeztem.

A származékká alakítás termosztálható, a kémcsövekkel egyező méretű fémbetéttel ellátott kályhákban (Kutesz, Magyarország) történt.

2. táblázat A vizsgált vegyületek magyar és szabványos IUPAC nevei

	Vegyület	IUPAC név
1.	Androszteron	5 α -androsztán-3 α -ol-17-on
2.	β -Ösztradiol	ösztra-1,3,5(10)-trién-3,17 β -diol
3.	Transzdehidroandroszteron	androszt-5-én-3 β -ol-17-on
4.	Transzandroszteron	5 α -androsztán-3 β -ol-17-on
5.	Mesztranol	3-metoxi-19-nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-trién-20-in-17-ol
6.	Dihidrotesztoszteron	5 α -androsztán-3-on-17 β -ol
7.	Etinilösztadiol	19-nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-trién-20-in-3,17-diol
8.	Tesztoszteron	androszt-4-én-3-on-17 β -ol
9.	Noretiszteron	19-nor-17 α -pregna-4-én-20-in-3-on-17 β -ol
10.	Ösztriol	ösztra-1,3,5(10)-trién-3,16,17-triol
11.	4-Androszten-3,17-dion	androszt-4-en-3,17-dion
12.	Gesztoden	18 α -homo-19-nor-17 α -pregna-4,15-dién-20-in-3-on-17 β -ol
13.	Levonorgesztrél	18 α -homo-19-nor-17 α -pregna-4-én-20-in-3-on-17 β -ol
14.	Etonorgesztrél	11,18 α -dihomo-19-nor-17 α -pregna-4,11a-dién-20-in-3-on-17 β -ol
15.	Koprosztanol	5 β -kolesztán-3 β -ol
16.	Progeszteron	pregn-4-én-3,20-dion
17.	Koleszterin	koleszt-5-én-3 β -ol
18.	Medroxiprogészteron-acetát	(6 α -homo-pregn-4-én-17 α -ol-3-on)-acetát
19.	Sztigmaszterol	sztigmaszt-5,22-dién-3 β -ol
20.	β -Sztitoszterol	sztigmaszt-5-én-3 β -ol
21.	Kólsav	3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -kolánsav
22.	Litokólsav	3 α -hidroxi-5 β -kolánsav
23.	Kenodeoxikólsav	3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -kolánsav
24.	Urzodeoxikólsav	3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -kolánsav
25.	3-hidroxi-7-ketokolánsav	3 α -hidroxi-5 β -kolánsav-7-on
26.	Dehidrokólsav	5 β -kolánsav-3,5,12-trion

4.3.2. Az alkalmazott gázkromatográfiás körülmények

A méréseket Varian 240 gyártmányú (Walnut Creek, CA, USA), automata mintaadagolóval és programozható injektorral (Varian CP-8400) felszerelt, tandem tömegspektrometriás detektorral ellátott gázkromatográfyon végeztem.

„On column” injektálást alkalmazva, az elválasztásokhoz SGE forte capillary (Victoria, Ausztrália) BPX5 jelzésű 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm filmvastagságú kromatográfiás oszlopot, vivőgázként konstans 1 mL/perc áramlási sebesség mellett 6.0 –ás tisztaságú (99.9999%) hélium gázt használtam.

A programozható injektor és a kolonnatér kétféle hőprogramját a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A mérések során használt hőfokprogramok

1. Program			2. Program		
Injektor					
Idő (perc)	°C	°C/perc	Idő (perc)	°C	°C/perc
0,5	100	0,0	0,5	100	0,0
1,5	300	200	1,5	300	200
3,0	300	0,0	3,0	300	0,0
Kolonnatér					
Idő (perc)	°C	°C/perc	Idő (perc)	°C	°C/perc
1,0	100	0,0	1,0	100	0,0
20	300	10	16	260	10
10	300	0,0	6	260	0,0
1,0	100	0,0	4	300	10
			7,5	300	0,0
Elemzési idő: 31 perc			Elemzési idő: 34,5 perc		

4.3.3. Az tömegspektrométer működésének főbb jellemzői

A Varian 240 GC-MS készülék ioncsapda tömegspektrometriás detektorának tömegtartománya 50-1000 amu. A tömegspektrométer külső és belső ionizációs módokban használható, elektronütköztetéses (EI), és kémiai ionizációval. A specifikációi közé tartozik, hogy a tömegpásztázási sebessége 5.000-10.000 amu/s, valamint a filament áramerőssége 10-100 µA között változtatható, 65.000 µs maximális ionizációs időtartam mellett.

A különböző MS módszerek használata során alkalmazott azonos jellemzők a következők voltak: az átvezető kapilláris, az ioncsapda és a manifold hőfoka, rendre 300°C, 210°C és 80°C; az ionizációs feszültség EI üzemmódban 70 eV volt. Az ioncsapda detektor optimális mérési paramétereit a készülék-szoftver (Varian MS Workstation software, version 6.9.) segítségével ellenőriztem és vezéltem.

4.4. Eljárások

4.4.1. A reagens oldatok

Az oximmá alakításhoz használt, HOA-HCl 2,5% (m/v) töménységű, PIR-nél készült oldatát 0,6250 g HOA-HCl 25 mL PIR-ben oldásával készítettem. Az elkészült oldatot, legfeljebb négy hétig, hűtőben tároltam.

A szilil-származékká alakításhoz a HMDS, MSTFA, BSTFA, MTBSTFA, TFA, analitikai tisztaságú reagenseket további tisztítás nélkül használtam. A vegyszereket a gyártó utasításainak megfelelően: a TFA-t szobahőfokon, az MSTFA-t, BSTFA-t, HMDS-t, hűtőben, az MTBSTFA-t mélyhűtőben tároltam.

4.4.2. A modell oldatok

A standard vegyületek 10-12 mg/10 mL töménységű törzsoldataikhoz, a szilárd anyagokat analitikai pontossággal mértem, majd etanolban oldottam. A húsz szteroid vegyület, majd a hat kólsav törzsoldataiból közös oldatot készítettem, ami az eredeti oldatok ötvenszeres hígításának felelt meg. Ebből etanollal készítettem további, a kis mennyiségek elemzéséhez szükséges tíz-ezerszeres hígításokat.

Az így készült oldatokból 20-1000 µL-t mértem 2 mL-es, teflonnal bélelt kupakkal záródó, a vákuumbepárló készülékhez csatlakoztatható, csavarmentes kémcsövekbe, és 40°C hőfokú vízfürdőből, rotációs vákuumlepárló készülékkel szárazra pároltam.

4.4.3. A származékká alakítás

4.4.3.1. Trimetilszilil-származékok

Az előző pontban ismertetett módon előkészített modelloldatok száraz maradékát 125 µL PIR-ben oldottam, majd 225 µL HMDS-t és 25 µL TFA-t adtam hozzá, és termosztálható, fémbetétes kályhában 70°C-on, 90 percig melegítettem.

4.4.3.2. Trimetilszilil-(oxim)-származékok

A leparólt modelloldatok száraz maradékát első lépésben 125 μL 2,5% (m/v) HOA-HCl-t tartalmazó PIR-ben oldottam, majd fémbetétes kályhában 50°C, 70°C, 90°C-on; 30, 60, 90 percig termosztáltam.

A szobahőfokra hűlt kémcsövekbe 225 μL HMDS-t és 25 μL TFA-t, vagy 250 μL BSTFA-t, vagy 250 μL MSTFA-t, vagy 250 μL MTBSTFA-t mértem.

A HMDS+TFA eleggyel készült oldatokat 50°C, 70°C, 90°C-on; 60, 90, 120 percig, a másik három szililezőszerrel készületeket 70°C-on 90 percig melegítettem.

Minden származékkészítési művelet során három párhuzamos, és egy azonos módon, de modelloldat nélkül összeállított „műveleti üres” minta készült.

Miután az oldatok szobahőfokra hűltek, 2,5-10-szeres, a megfelelő szililezőszerrel készített hígításokat készítettem, és ezekből injektáltam, három párhuzamos mérésben, 1-1 μL -t.

4.4.4. A mintaelőkészítés

A vízminták feldolgozásának folyamatát az 1. ábrán szemléltetem.

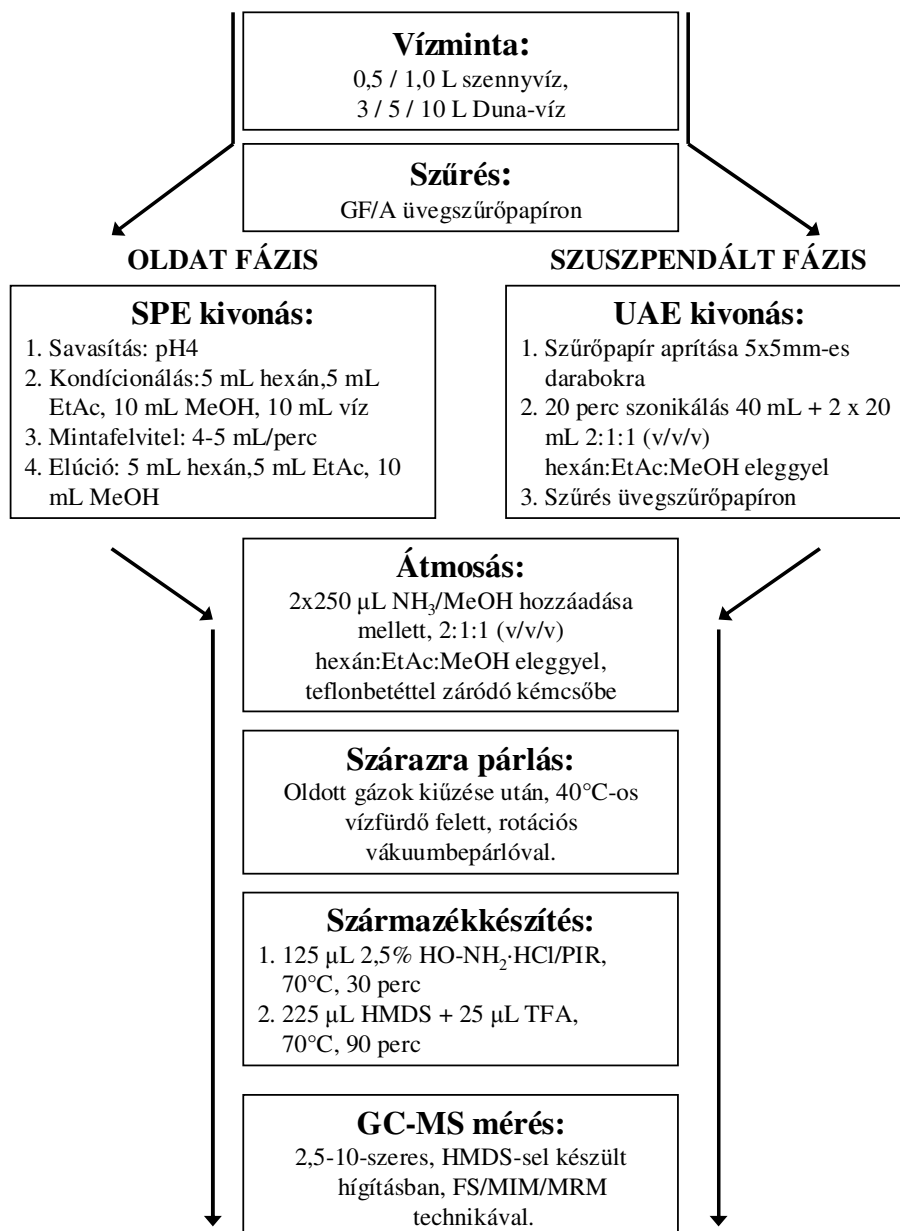
A szenny- és Duna-vízminták feldolgozása minden esetben még a mintavételezés napján megkezdődött. Az SPE oszlopok eltömődésének megelőzése céljából, a szobahőfokra melegedett vizeket alapos homogenizálást követően, GF/A 1,6 μm pórusátmérőjű üvegszűrőpapíron szűrtem, majd a szűrletet 30L térfogatú üvegballonban homogenizáltuk.

A szuszpendált lebegőanyagok vizsgálatához, a sorszámmal ellátott szűrőpapírok tömegét a szűrés előtt, valamint a szűrés és szobahőfokon, tömegállandóságig szárítás után, analitikai mérlegen mértem.

4.4.4.1. Az oldott szteroidok vizsgálata - szilárd fázisú extrakció

Az előzetesen szűrt és homogenizált vízmintákból három párhuzamos SPE extrakciót végeztem. A megfelelő térfogatú (szennyvíz esetén 0,5L vagy 1,0L; Duna-víznél 3L, 5L, 10L) minták pH értékét feljegyeztem, majd 1M HCl és 0,1M NaOH oldatokkal pH $4\pm 0,05$ -re változtattam.

Az extrakcióhoz alkalmazott Oasis HLB 6 mL (200 mg) SPE tölteteket előzetesen 5 mL hexán, 5 mL etil-acetát, 10 mL metanol és 10 mL desztillált víz felvitelével készítettem elő.



1. ábra A mintaelőkészítés folyamatának vázlata

A vízminták szteroid tartalmának dúsítását 12 mintafeltétes vákuumkád segítségével végeztem. A szükséges kis nyomást vízlégszivattyú segítségével biztosítottam. Az extrakció sebessége 4-5 mL/perc (1 csepp/másodperc), ez 3-5L mintatérfogat esetén akár 12 órát is jelenthetett.

A minták sikeres felvitele után az SPE tölteteket 60 percen át szárítottam vákuumpumpával, levegő átszívásával.

Az extraktumok elúciója az előkészítéshez használt oldószer eleggyel, tehát sorra 5 mL hexánnal, 5 mL EtAc-tal, 10 mL MeOH-lal, történt. A 25 mL-es üvegpoharakban egyesített oldathoz 250 µL ammóniás MeOH-t adtam, majd térfogatukat elszívófülke alatti bepárlással 0,5-1 mL-re csökkentettem. A kis térfogatú mintákat ezt követően, mennyiségileg, 4 mL-es, teflonnal bélelt kupakkal záródó, csavarmenetes kémcsövekbe mostam, hexán:EtAc:MeOH 1:1:2 (v/v/v) arányú eleggyel. A művelet során különös gondot fordítottam arra, hogy az üvegpoharak falát is alaposan leöblítsem. A 3,5-4 mL össztérfogatú mintákat, újabb 250 µL ammóniás MeOH hozzáadása után, maximális fokozatra kapcsolt vegyi fülke elszívó nyílása alá helyezve 1 mL térfogatra pároltam. Az oldószerek oldott gáz tartalmát ultrahangos fürdővel eltávolítottam, majd az extraktumokat rotációs vákuumbepárló készülékkel, 40°C-os vízfürdőben, tömegállandóságig, szárazra pároltam.

Minden SPE extrakció során vízmintánként 3-3 párhuzamos extrakció, és egy „SPE üres” minta is készült: az éles mintákkal azonos módon, valós vízminta felvitele nélkül.

4.4.4.2. A szuszpendált szilárd lebegőanyaghoz kötött szteroidok vizsgálata - Ultrahanggal segített extrakció

A szűréshez használt üvegszűrőpapírokat száradásuk után 5x5 mm-es darabokra vágtam és 150 mL-es üvegpoharakba tettem. Az extrakcióhoz az SPE kivonásnál is használt hexán:etil-acetát:metanol 1:1:2 (v/v/v) arányú eleggyet alkalmaztam. A szűrőpapírmintákat először 40 mL, majd 2x20 mL oldószerral, 20-20 percen keresztül szonikáltattam. Az oldószeres fázisokat minden ultrahangozás után üvegszűrőpapíron szűrtem, végül a három fázist egyesítettem.

Az egyesített extraktumokat az SPE kivonatokkal azonos módon (3.4.4.1. fejezet) kezeltem. Mint minden művelet során, a szűrőpapírok kivonásakor is készült „szűrőpapír üres” minta, a párhuzamos éles minták mellett.

4.4.4.3. A minták származékká alakítása és mérése

A modelloldatokhoz hasonlóan, először 125 μL 2,5% (m/v) HOA-HCl-t tartalmazó PIR-nel termosztáltam az egyes kémcsöveket 70°C-on 30 percig. Miután szobahőfokra hűltek, 225 μL HMDS+25 μL TFA hozzáadása után, 70°C-on 90 percig melegítettem a reakcióedényeket.

A származékkészítés befejezése után, a mintákból szükség szerint 2,5-10-szeres hígítást készítettem HMDS-sel, 400 μL összterfogatú, teflonnal bélelt kupakkal záródó, szűkítővel ellátott GC mintaadagoló edényekbe. A hígított minták 1 μL részletét injektáltam a Varian 8400 automata mintaadagoló készülékkel. A mérések, párhuzamosan, FS, MIM és MRM adatgyűjtési módszerrel is készültek.

Minden mérési sorozattal, azonos feltételek mellett készültek „műveleti üres”, „SPE üres”, és „szűrő üres” felvételek is. A kiértékelési folyamat az üres mintákban esetlegesen jelentkező szennyező csúcsok figyelembevételével történt.

5. Eredmények

5.1. A vizsgált vegyületek kiválasztása

A szteroidokat azzal a céllal választottam, hogy változatos csoportjaik számos tagját a korábban kidolgozott [17-20], sok összetevőjű elemző rendszer kromatogramjának utolsó harmadába illesszem. A vegyületek között ugyanúgy megtalálhatóak a természetes és mesterséges szteroid hormonok, mint fekális és növényi eredetű szterolok. A választott húsz vegyület közül kettő, a koleszterin és a β -ösztadiol már szerepelt a korábbi vizsgálatokban [19].

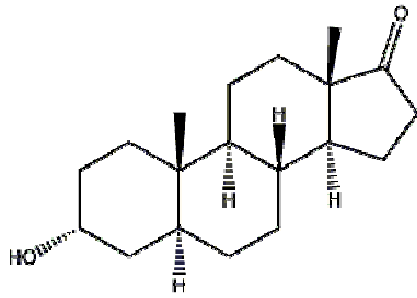
Az összetevők jellemző fizikai adatai és szerkezeti képletei megtalálhatóak a 4. táblázatban és a 2. ábrán.

4. táblázat A választott szteroid vegyületek típusai és fontosabb fizikai adatai

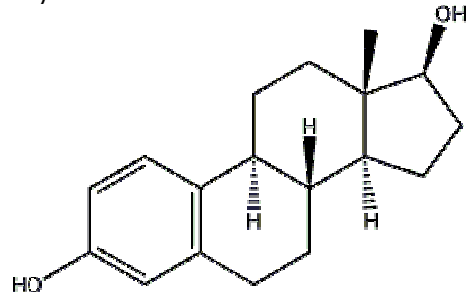
Vegyület	CAS szám	Mt	Oldhatóság (µg/L)	Szteroid típusa
1. Androszteron	53-41-8	290.44	12	természetes androgén
2. β -Ösztradiol	50-28-2	272.39	3.60	természetes ösztrogén
3. Transzdehidroandroszteron	53-43-0	288.42	64	természetes androgén
4. Transzandroszteron	481-29-8	290.22	20	
5. Mesztranol	72-33-3	310.43	3.77* ¹	mesterséges ösztrogén
6. Dihidrotesztoszteron	521-18-6	290.44	52500	természetes androgén
7. Etilöszttradiol	57-63-6	296.40	11	mesterséges ösztrogén
8. Tesztoszteron	58-22-0	288.42	23	természetes androgén
9. Noretiszteron	68-22-4	298.42	7.0	mesterséges progesztogén
10. Ösztriol	50-27-1	288.38	441* ²	természetes ösztrogén
11. 4-Androszten-3,17-dion	63-05-8	286.19	58	természetes androgén
12. Gesztoden	60282-87-3	310.43	-	mesterséges progesztogén
13. Levonorgesztrel	797-63-7	312.45	2.05	
14. Etonorgesztrel	54048-10-1	324.46	7.4	
15. Koprosztanol	57-83-0	314.47	8.81	fekális szterol
16. Progeszteron	360-68-9	388.67	4·10 ⁻⁴ * ³	természetes progesztogén
17. Koleszterin	57-88-5	386.6	95	fekális szterol
18. Medroxiprogesteron-acetát	71-58-9	386.52	2.95	mesterséges progesztogén
19. Sztigmaszterol	83-48-7	412.69	1.1·10 ⁻⁴ * ⁴	fitoszterol
20. β -Sztioszterol	83-46-5	414.72	0.32	

Jelölések: Mt = átlagos molekulatömeg, *^{1,2,3,4} = becült adatok [111]

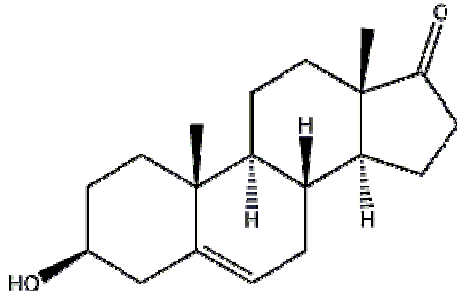
1. Androszteron



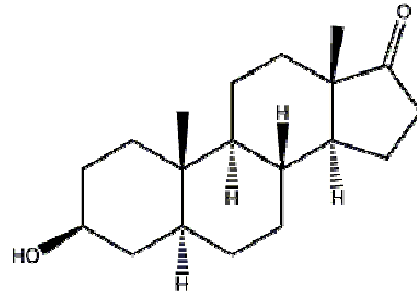
2. β -ösztadiol



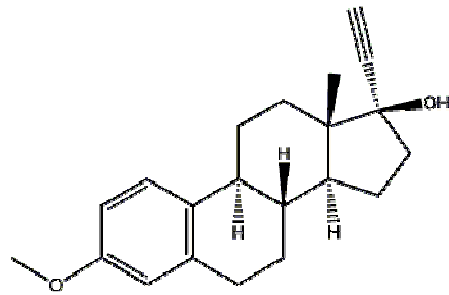
3. Transzdehidroandroszteron



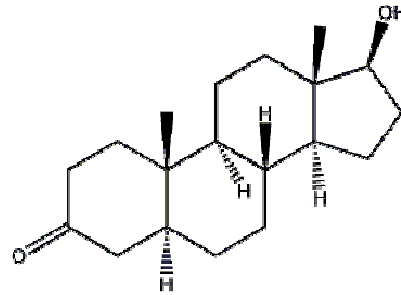
4. Transzandroszteron



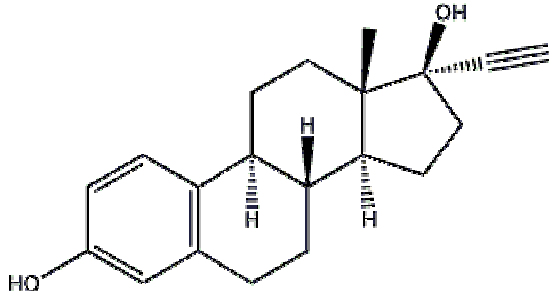
5. Mesztranol



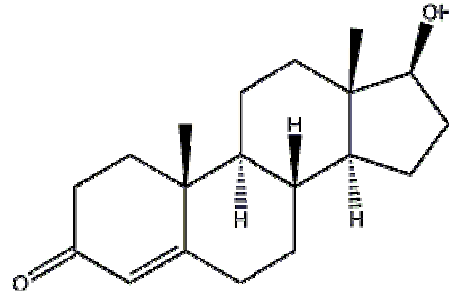
6. Dihidrotesztozteron



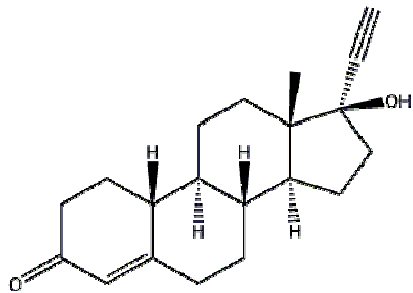
7. Etilösztadiol



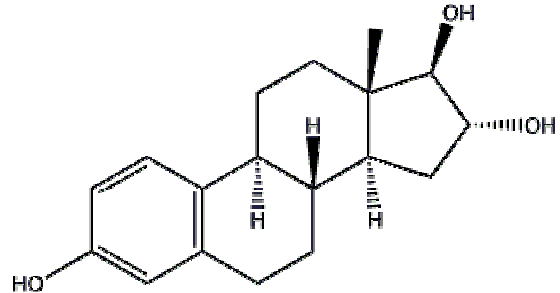
8. Tesztoszteron



9. Noretiszteron

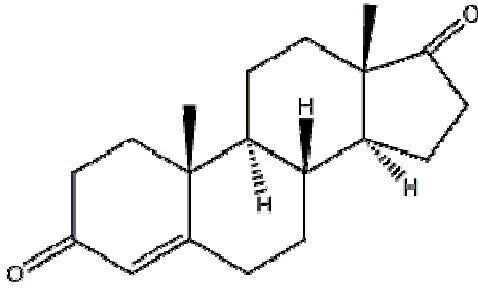


10. Ösztriol

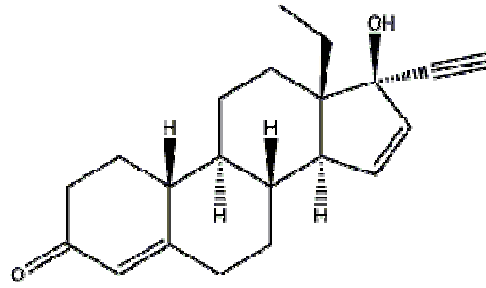


2. ábra A vizsgált szteroid vegyületek szerkezeti képletei

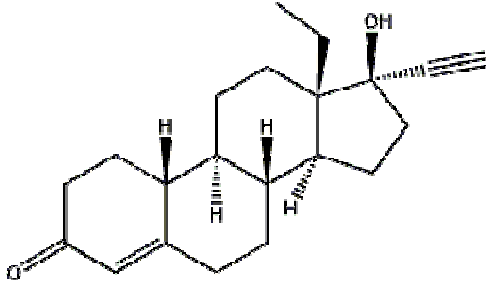
11. 4-Androszten-3,17-dion



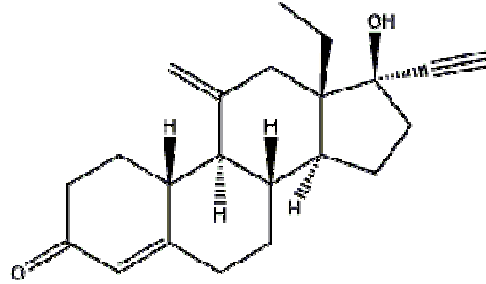
12. Gesztoden



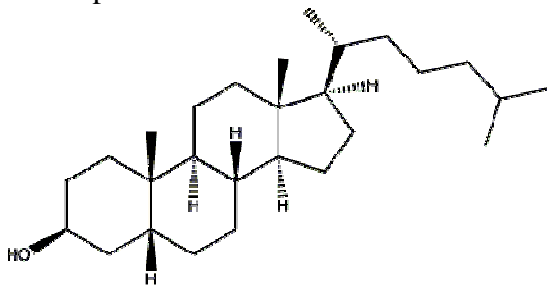
13. Levonorgesztrel



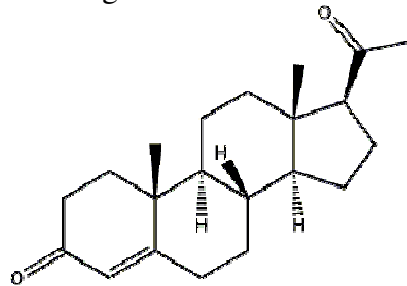
14. Etonogesztrel



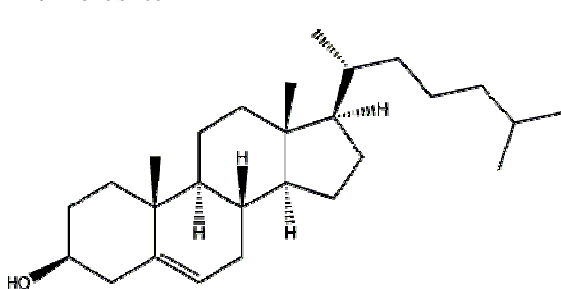
15. Koprosztanol



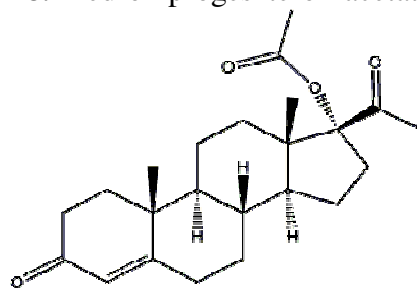
16. Progeszteron



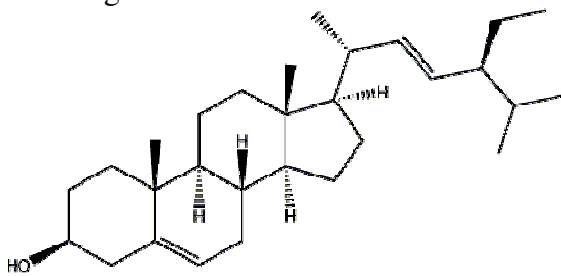
17. Koleszterin



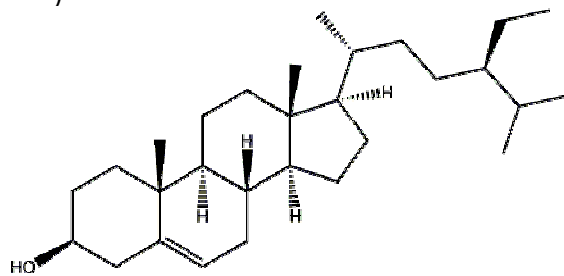
18. Medroxiprogesztéron-acetát



19. Sztigmaszterol



20. β -szitoszterol



2. ábra (folytatás)

5.2. A szteroid vegyületek származékkészítési tanulmánya

A 4.2.1-4.2.2. fejezetekben ismertetett, a vizsgált vegyületek válaszjelét, elúciós profilját és fragmentációs viselkedését bemutató tanulmányok az optimálisnak bizonyult, a hosszú ideje alkalmazott, kétlépéses származékkészítő eljárással készültek. Ugyanakkor, hogy az ismertetett szakirodalom [4,23-79,93-103] sokszínűségének fényében bizonyítsam a módszer alkalmazhatóságát a szteroidok esetében is, a különböző származékkészítő módszerek részletes összehasonlítása volt szükséges.

Elsőként a leggyakrabban használt szililezőszerek szigorúan azonos körülmények közötti (azonos mértékű reagens felesleg, reakcióidő- és hőfok) összehasonlítását végeztem (4.2.3. fejezet). Ezt követően az alkalmazott reakcióidő- és hőfokot optimalizáltam (4.2.4. fejezet).

Az megfelelő származékkészítési eljárás ismeretében, jellemeztem az egyes származékok válaszjelenek reprodukálhatóságát az injektált mennyiségek tükrében, valamint meghatároztam a módszer LOQ értékeit (4.2.5. fejezet).

A tanulmányozott szteroidok optimális származékkészítési körülmények között készült trimetilszilil-, valamint trimetilszilil-oxim-étereinek kromatográfiás és fragmentációs adatait a 6. táblázat tartalmazza. Az egyes vegyületeknek megfelelő trimetilszilil-(oxim)-éter származékok jellegzetes elúciós profilját, tömegspektrumát és molekulaszervezetét a jellemző fragmens ionokkal, a 3. és a 4.a.-g. ábrákon szemléltetem.

5.2.1. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek elúciós profilja és válaszjele

A ketocsoportot tartalmazó szteroidok esetében (6. táblázatban *-gal jelölt vegyületek), a kétlépéses származékkészítés (1. oximálás, 2. trimetilszililezés) kiemelkedően fontos: kivétel nélkül, valamennyi ketoszteroid trimetilszilil-oxim-éterré alakíthatónak bizonyult.

A ketoszteroid-oxim-éterek legtöbbször két csúcsban, mint szin és anti oximok, ritkábban egy csúcsban (androszteronok, tesztoszteron, medroxiprogesteron-acetát) eluálódnak. A szin és anti izomereknek megfelelő kromatográfiás csúcsok aránya (6. táblázat, 5. oszlop) 0,26 (progesteron) és 0,95 (dihidrotesztoszteron) között alakult, 5,7 RSD% átlagos reprodukálhatósággal. A korábbi tapasztalatok alapján [17] várható

6. táblázat Szteroid trimetilszilil-(oxim)-éter származékok elúciós és fragmentációs adatai

Vegyület	Szár- mazék	t _R (perc)		R*, szin/anti oximok	SFI-k, m/z			Válaszjel, IE/pg (RSD %)	R* ^{SFI}
					[M] ⁺	[M-15] ⁺	További ionok		
1. Androszteron*	A	18,87	-	-	449	434	360; 270; 213	57710 (5,9)	2.08
	B	17,88	-	-	362	347	272; 257	27749 (1,95)	
2. β -Ösztradiol	A/B	19,15	-	-	416	401	326; 285; 231	72059 (1,12)	-
3. Transzdehidro- androszteron*	A	19,41	-	-	447	432	358; 318; 268	21254 (6,3)	1.52
	B	18,44	-	-	360	345	270; 129	13983 (3,55)	
4. Transzandroszteron*	A	19,50	-	-	449	434	360; 270; 213	49787 (3,55)	2.17
	B	18,50	-	-	362	347	272	15419 (4,21)	
5. Mesztranol	A/B	19,62	-	-	382	367	227; 174	30815 (5,1)	-
6. Dihidro- tesztoszteron*	A&	19,68	19,86	0,95 (1,27)	449	434	344; 254; 211; 129	32266 (5,,1)	-
7. Etinilösztadiol	A/B	19,97	-	-	440	425	285; 231	34140 (3,47)	-
8. Tesztoszteron*	A	20,03	-	-	447	432	211; 358; 343	23993 (3,04)	1.66
	B	19,37	-	-	360	345	270; 226	14455 (3,38)	
9. Noretiszteron*	A	19,47	19,55	0,54 (9,9)	457	442	368; 317; 302; 209	28021 (6,9)	4.25
	B	18,83	-	-	370	355	303; 209; 167; 125	6597 (1,63)	
10. Ösztriol	A/B	19,49	-	-	504	489	414; 386; 324; 311; 296; 270	68864 (2,29)	-
11. 4-Androszten- 3,17-dion*	A	20,64	20,70	0,47 (1,47)	460	445	371; 211	24777 (8,6)	3.09
	C	19,16	-	-	286	271	201; 148; 124	8018 (6,5)	
12. Gesztoden*	A	20,91	21,01	0,45 (5,9)	469	454	440; 380	12012 (6,8)	1.40
	B	20,37	-	-	382	367	353; 338; 325	8580 (4,42)	
13. Levonorgesztrel*	A	21,13	21,24	0,49 (4,50)	471	456	442; 382; 331	16509 (8,0)	2.79
	B	20,62	-	-	384	369	356; 341; 317	5917 (5,2)	
14. Etonogesztrel*	A	21,46	20,57	0,36 (2,70)	483	468	454; 394; 343; 153	12828 (9,0)	1.79
	B	20,94	-	-	396	381	367; 329	7166 (4,23)	
15. Koprosztanol	A/B	21,77	-	-	460	445	370; 257; 215	2229 (2,05)	-
16. Progeszteron*	A	22,22	22,30	0,26 (14)	488	473	399; 344; 211; 145	20855 (8,9)	4.56
	C	20,74**	-	-	386	371	314; 272; 229**	4573 (1,47)	
17. Koleszterin	A/B	22,55	-	-	458	443	358; 353; 3,29	21719 (4,46)	-
18. Medroxi- progeszteron-ac.*	A	23,16	-	-	473	458	371; 280; 225; 209	1259 (7,9)	1,42
	C	21,63**	-	-	386		283; 301; 244**	850 (5,8)	
19. Sztigmaszterol	A/B	23,82	-	-	484	469	394; 379; 255; 129	14085 (2,48)	-
20. β -Sztoszterol	A/B	24,53	-	-	486	471	396; 381; 255; 129	3697 (5,8)	-

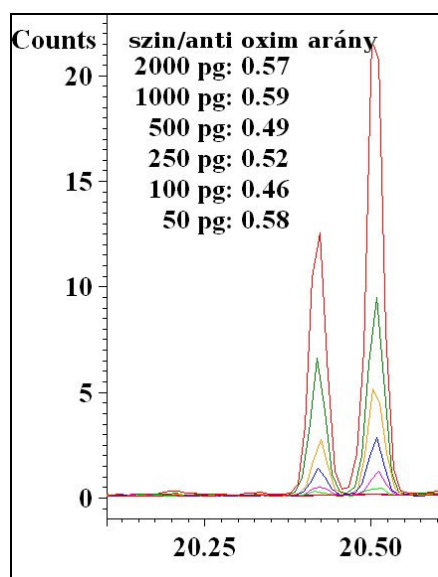
Jelölések a rövidítések jegyzékében, valamint: * = ketoszteroid; A = TMS-(oxim)-éter; B = TMS éter; C = változatlan forma; - = nincs adat; [M]⁺ = molekulaion; R*, szin/anti oximok = szin/anti oximok aránya; IE = integrátor egység; R*^{SFI} = a TMS-éterek és TMS-oxim-éterek válaszjelének aránya; & = TMS-étert nem detektáltam; () = RSD%.

volt, hogy ezek az arányok jellemzőek az egyes vegyületekre és függetlenek az injektált mennyiségeiktől.

Ennek megfelelően, az alapvonalon elváló dihirotesztoszteron szín és anti oxim izomerjeinek aránya, 5 és 2000 pg injektált mennyiségek között, SFI-k alapján értékelt csúcsterületeit figyelembe véve (a kromatogramokat nem tüntettem fel), 0,93 és 0,95 között változott, kiváló, 1,27 RSD%-os átlagos szórással. Még a noretiszteron-oximok aránya is elfogadható reprodukálhatóságot mutatott, annak ellenére, hogy az anti izomer koelúcióba lépett az ösztriollal: 0,46 és 0,59 között, 9,9 RSD% szórással változott (3. ábra.)

A származékok válaszjeleiről általában megállapítható, hogy széles tartományban változtak: 850 IE/pg (medroxiprogesztéron-acetát, változatlan formában) és 72059 IE/pg (β -ösztadiol) között. A mérések RSD%-kal (zárójelben) jellemzett reprodukálhatósága 1,12% (β -ösztadiol) és 9,0 RSD% (etonogesztrel) között alakult, 4,78%-os átlaggal.

A trimetilszilil-oxim-éterek válaszjelének arányát a csak trimetilszilil-éterekéhez, vagy a változatlan formában meghatározottakéhoz viszonyítva, a 6. táblázat utolsó oszlopában, az R^{*SFI} arányszámokkal jelöltem. Ez az arány minden ketocsoporttal rendelkező vegyület esetében >1 , azaz 1,46 (gesztoden) és 4,56 (progesztéron) között változott.

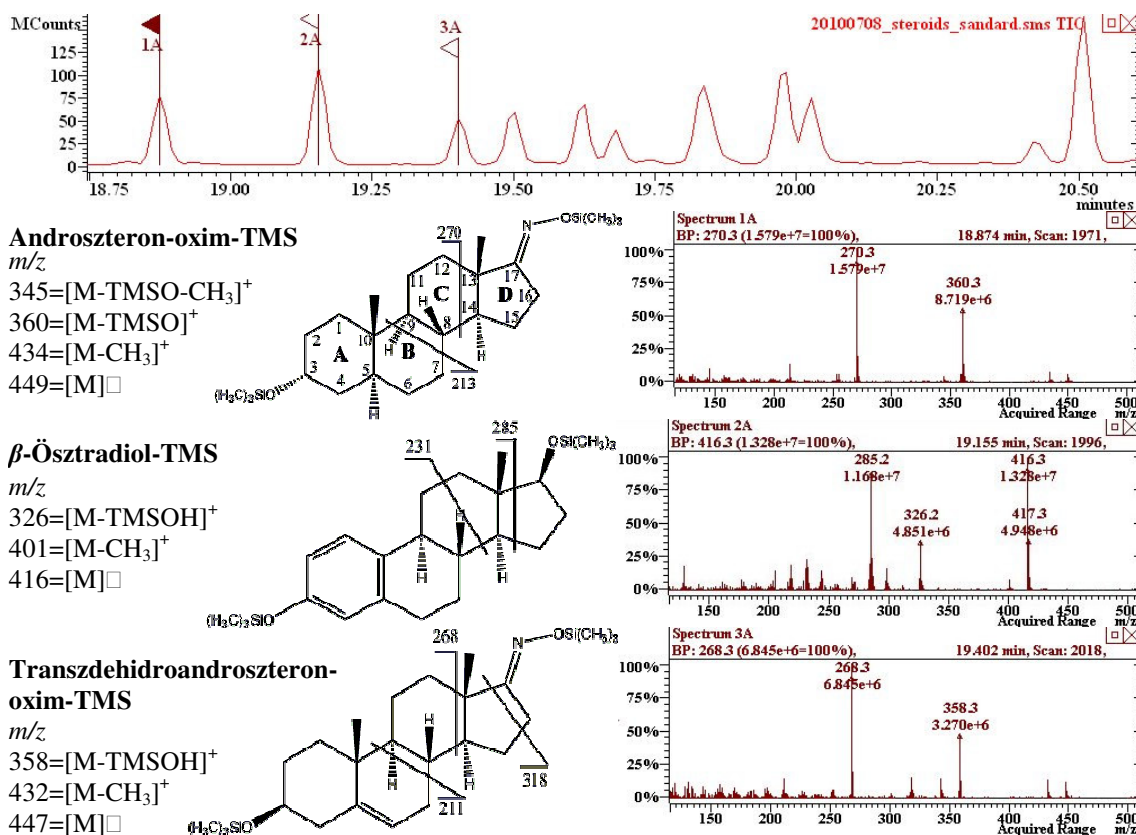


3. ábra. Noretiszteron-oxim-1,2: szín és anti oxim csúcsterületek aránya, 50-2000 pg injektált mennyiség esetében, SFI-k alapján, m/z értékeket lásd: 4.c. ábra és 6. táblázat.

5.2.2. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek fragmentációs viselkedése

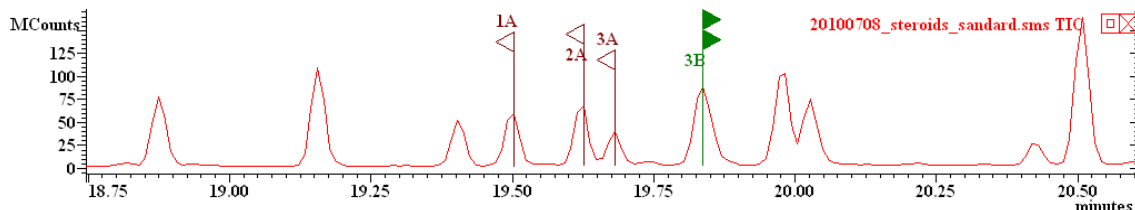
A szteroid származékok tömegspektrumainak értékelése közben világossá vált, hogy a szerkezetbeli rokonság hasonló fragmentációs viselkedéshez vezet. Valamennyi szteroid elúciós profilját és tömegspektrumát, az egyes származékok szerkezeti képletét -a fragmens ionoknak megfelelő molekularészletek megjelölésével-, egy standard oldatból rögzített kromatogram részletein mutatom be a 4.a.-g. ábrákon. A szteránváz gyűrűinek betűjeleit és a szénatomok számozását az androszteron-trimetilszilil-oxim példája szemlélteti (4.a. ábra).

Valamennyi szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éter tömegspektrumában megfigyelhetők a trimetilszilil-származékokra jellemző, egy metilcsoport elvesztésével, és a TMSO és a TMSOH csoportok leszakadásával keletkező SFI-k is. Annak alapján, hogy ezek az ionok milyen arányban vannak jelen a tömegspektrumban a szteránváz töredezéséből keletkező egyéb szelektív ionokhoz viszonyítva, a vizsgált szteroidok három csoportra oszthatóak: ezek a 17-ketoszteroidok, 3-ketoszteroidok és a csak hidroxilcsoporttal rendelkező szteroidok.



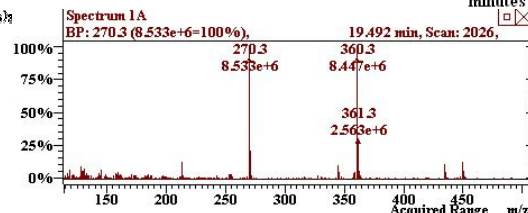
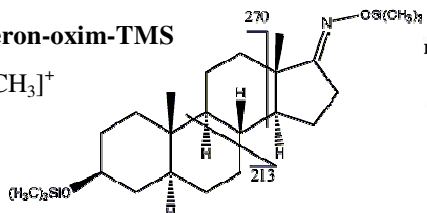
4.a.-4.g. ábrák. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek elúciós profiljai és tömegspektrumai modell oldatokból készítve.

4.a. ábra.



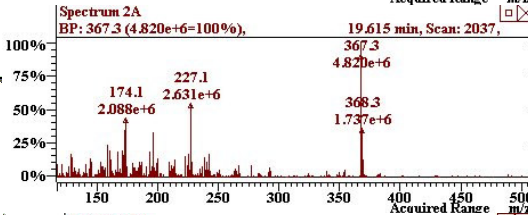
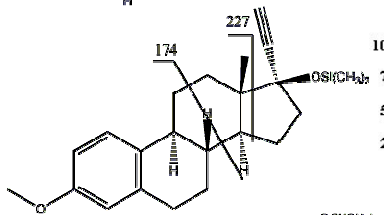
Transzandroszteron-oxim-TMS

- m/z
- 345=[M-TMSO-CH₃]⁺
- 360=[M-TMSO]⁺
- 434=[M-CH₃]⁺
- 449=[M]⁺



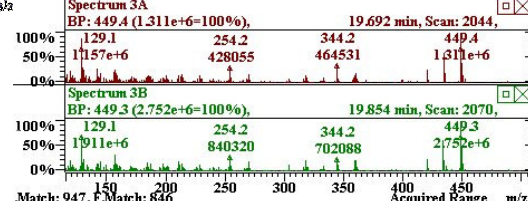
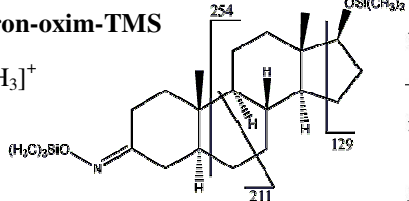
Mesztranol-TMS

- m/z
- 367=[M-CH₃]⁺
- 382=[M]⁺

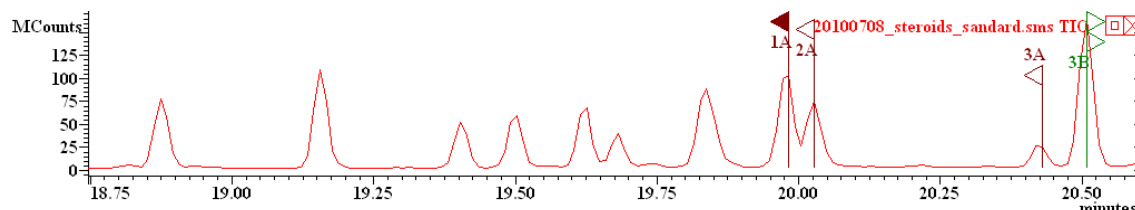


Dihidrotesztozteron-oxim-TMS

- m/z
- 344=[M-TMSO-CH₃]⁺
- 434=[M-CH₃]⁺
- 449=[M]⁺

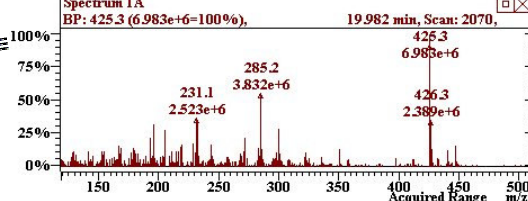
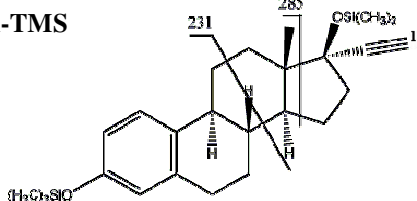


4.b. ábra.



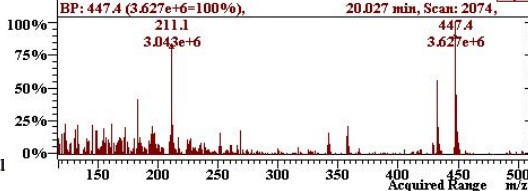
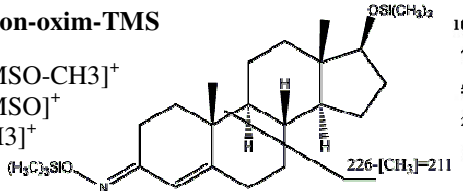
Etinilözstradiol-TMS

- m/z
- 425=[M-CH₃]⁺
- 440=[M]⁺



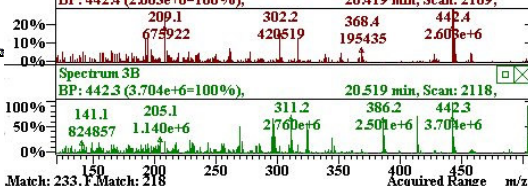
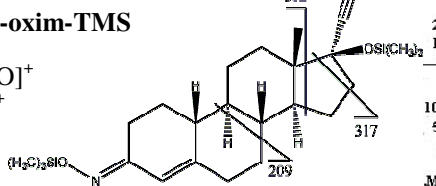
Tesztozteron-oxim-TMS

- m/z
- 343=[M-TMSO-CH₃]⁺
- 358=[M-TMSO]⁺
- 432=[M-CH₃]⁺
- 447=[M]⁺

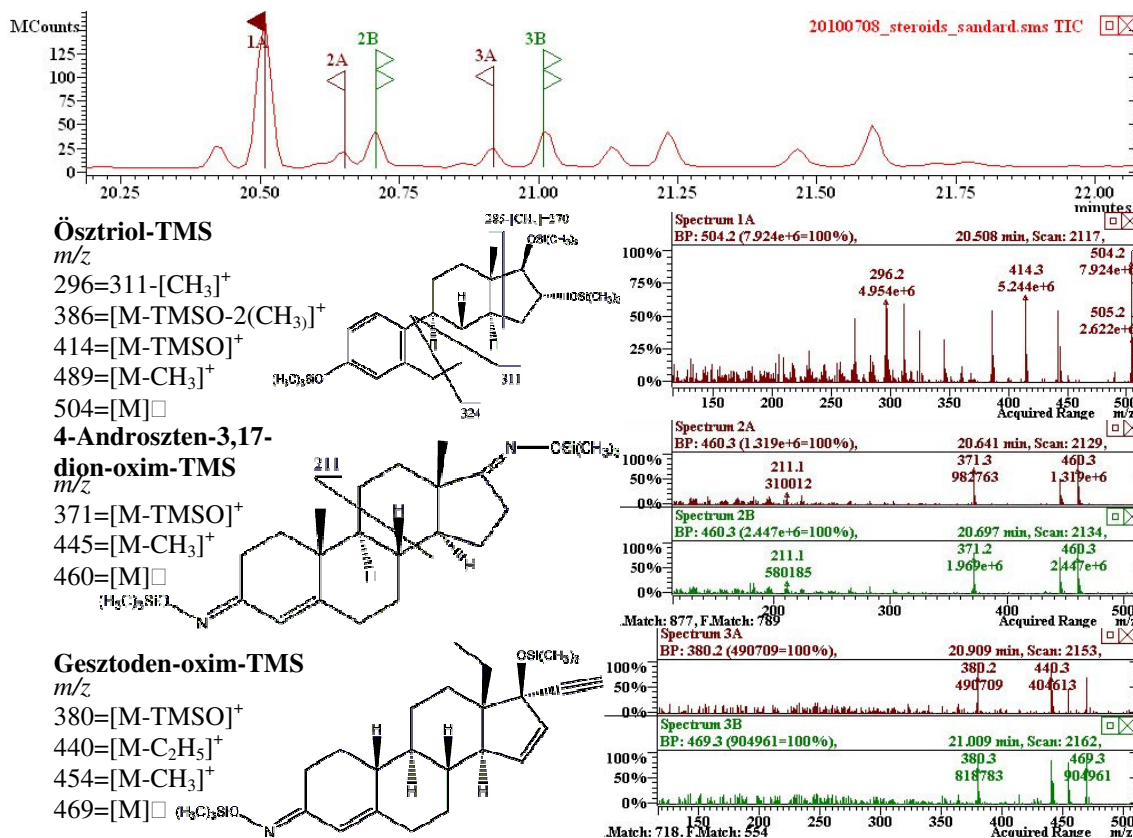


Noretiszteron-oxim-TMS

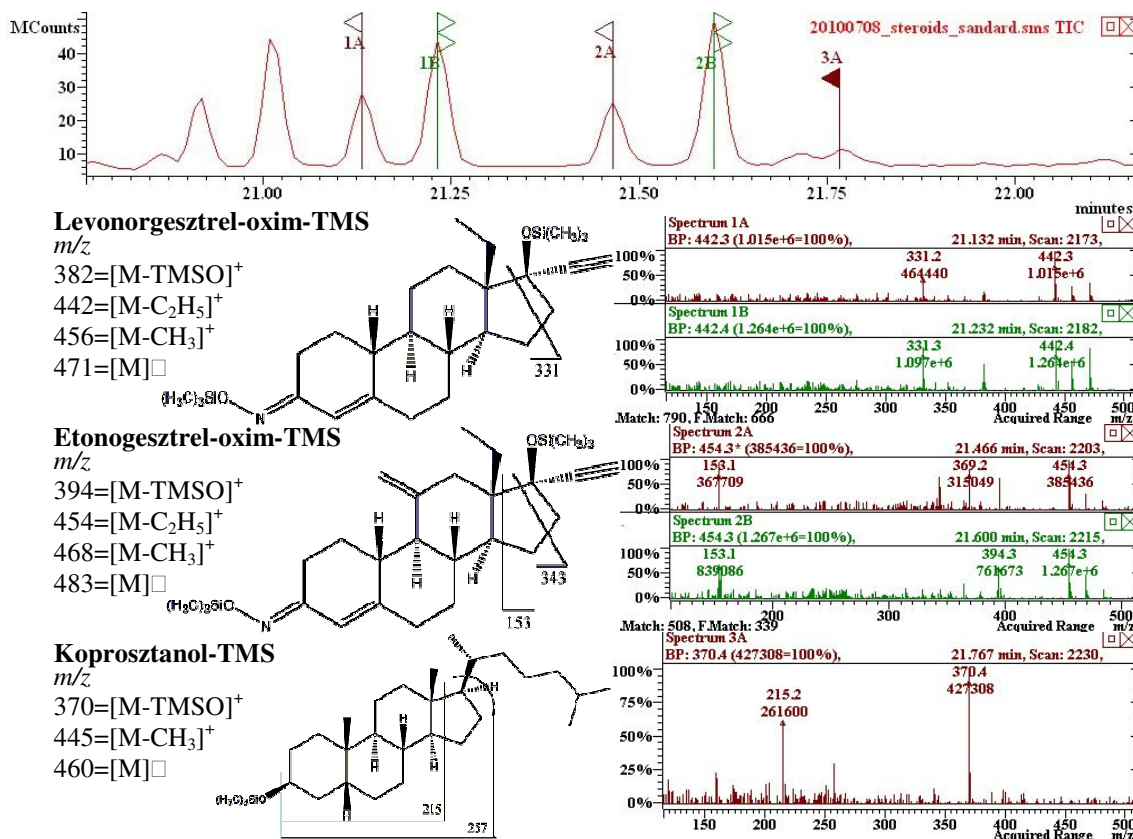
- m/z
- 368=[M-TMSO]⁺
- 442=[M-CH₃]⁺
- 457=[M]⁺



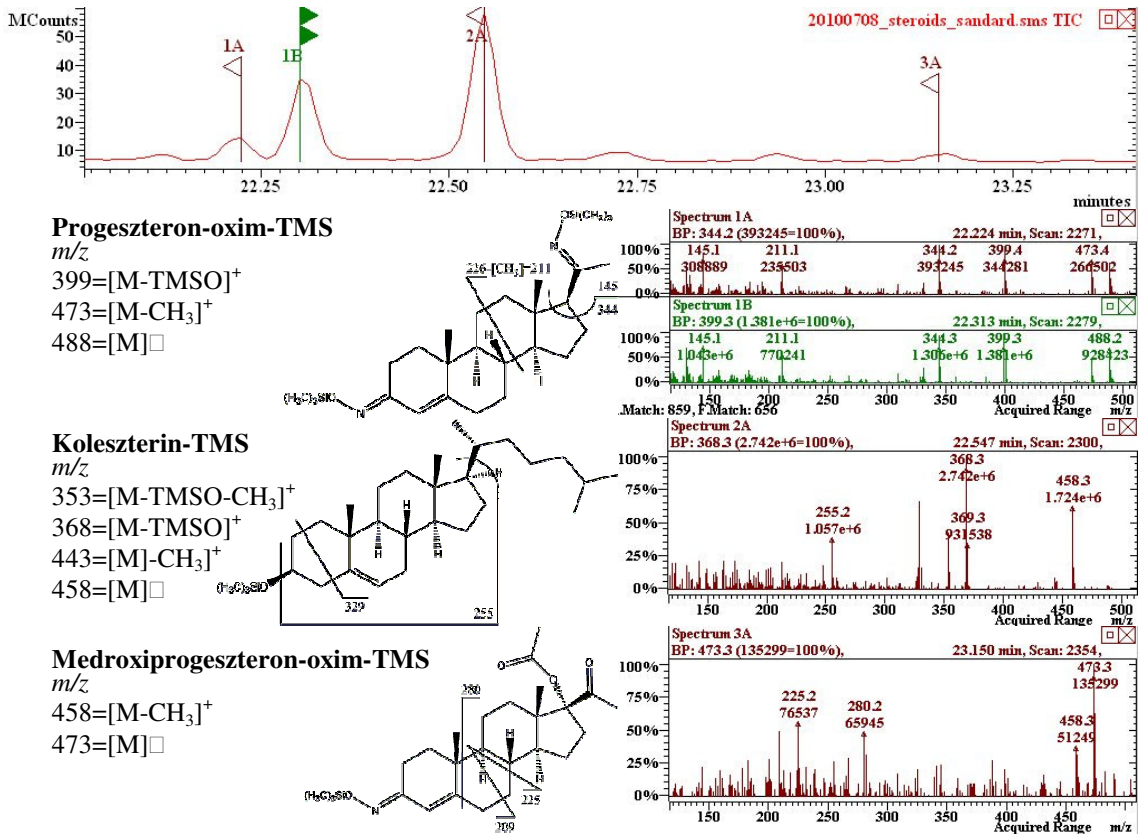
4.c. ábra.



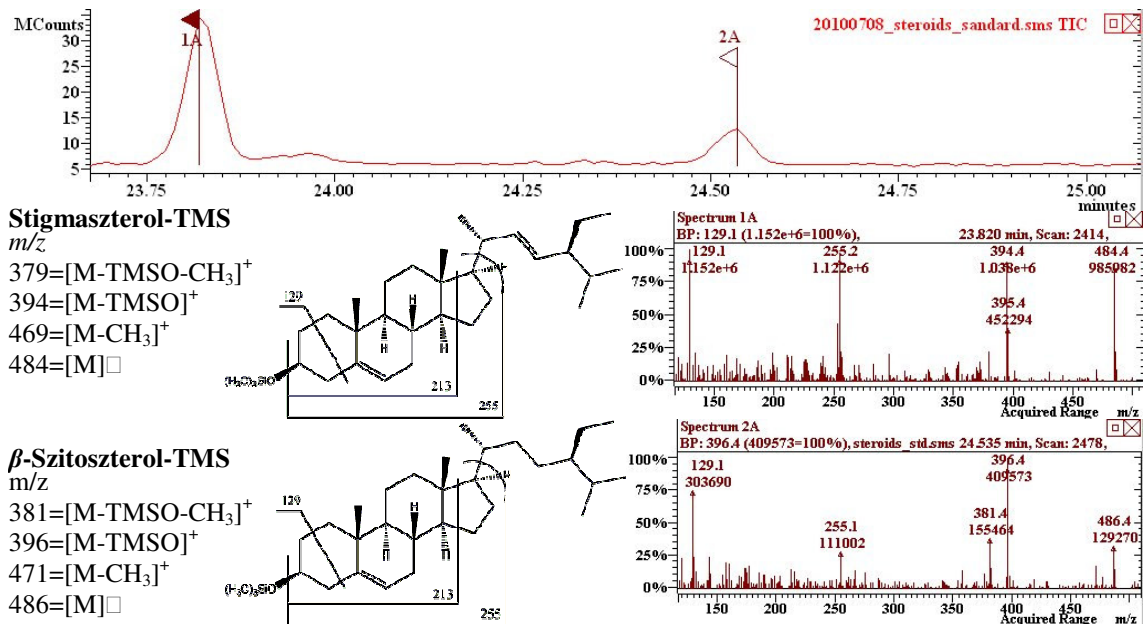
4.d. ábra.



4.e. ábra.



4.f. ábra.



4.g. ábra.

A 17-ketoszteroidok spektrumainak legjellemzőbb elemei a C₁₂ és a C₁₃, valamint a C₈ és a C₁₄ szénatomok közötti kötések felhasadását követően, a D-gyűrű leszakadásával keletkező ionok: m/z 270 (androszteron: 4.a. ábra, 1A spektrum; transzandroszteron, 4.b. ábra, 1A spektrum) és m/z 268 (transzdehidroandroszteron, 4.a. ábra, 3A spektrum). Ugyanakkor a 17-ketoszteroidokat jellemzik a C₇ és a C₈, valamint a C₉ és a C₁₀ szénatomjaik közötti kötések felhasadása, majd a C és a D gyűrűk együttes leszakadásával keletkező fragmensek: m/z 213 (androszteron, transzandroszteron) és m/z 211 (dehidrotesztoszteron, 4.b. ábra, 3A, 3B spektrumok), bár ezek az ionok csekély intenzitással jelentkeznek a spektrumban.

A 3-ketoszteroidok {4.b.-e. ábrák, (6,8,9,12,13) vegyületek} fragmentációs viselkedése, beleértve a 3,17-diketoszteroidokat is {4.d. és 4.f. ábrák, (11,16) vegyületek}, határozottan elkülöníthető a 17-ketoszteroidokétól {4.a.-b. és 4.d. ábrák, (1,3,4,11) vegyületek}. A legnagyobb intenzitással jelentkező ionjaik minden esetben a molekulaion ([M]⁺) és/vagy az egy metilcsoport elvesztésével keletkező fragmens ion ([M-15]⁺) voltak, így a dihidrotesztoszteron szin és anti oximok (4.b. ábra, 3A, 3B spektrumok), a tesztoszteron-oxim (4.c. ábra, 2A spektrum), a gesztoden (4.d. ábra, 3A, 3B spektrumok), a 4.e. ábrán bemutatott levonorgesztrél (1A, 1B spektrumok) és az etonorgesztrél (2A, 2B spektrumok), valamint a progeszteron (4.f. ábra 1A, 1B spektrumok) szin és anti oximok eseteiben.

A csak hidroxilcsoporttal rendelkező szteroidok TMS-étereinek spektrumai –a koprosztanol kivételével-, nagyfokú stabilitásról tanúskodnak: jellemző ionjaik a molekulaion és az egy metilcsoport elvesztésével keletkező fragmens ion (6. táblázat, 4.a.-g. ábrák). Ezek mellett a hidroxiszteroidok spektrumaira kivétel nélkül jellemzőek a C₁₃ és a C₁₇, valamint a C₁₄ és a C₁₅ szénatomok közötti kötések felhasadásának eredményeként, a D gyűrű leszakadásával keletkező ionok. A vegyületek egyéb szubsztituenseitől függően, az m/z 285 (β -ösztadiol: 4.a. ábra, 2A spektrum), az m/z 227 (mesztranol: 4.b. ábra, 2A spektrum), az m/z 285 (etinilösztadiol: 4.c. ábra, 1A spektrum:), az m/z 270 (ösztriol: 4.d. ábra, 1A spektrum), az m/z 215 (koprosztanol: 4.e. ábra, 3A spektrum), és az m/z 213 (4.g. ábra: sztigmatsterol, 1A spektrum; β -szitoszterol, 2A spektrum) ionok jelentkeznek nagy intenzitással.

5.2.3. A leggyakrabban használt szililezőszerek összehasonlítása

Az irodalomban leggyakrabban alkalmazott szililezőszereket (BSTFA, MSTFA, MTBSTFA) a korábban is alkalmazott HMDS+TFA reagenssel hasonlítottam össze, az oximképzést követően, a vizsgált szteroidok kiválasztott képviselőinek esetében. A kísérletek során a HMDS-sel képzett származékok stabilitását is vizsgáltam: a közvetlenül származékkészítés után és 12 órával később, valamint a különböző reagenssekkel képzett származékok válaszjeleit a 7. táblázatban összesítettem.

Az adatok azt mutatják, hogy a különböző szililezőszerekkel képzett szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek válaszjelei –a BSTFA-hoz kapcsolódó, valamivel kisebbek kivételével (7. táblázat, utolsó két oszlop)-, összemérhetőek.

7. táblázat Természetes és mesterséges szteroidok származékkészítési tanulmánya: szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek válaszjele az alkalmazott szililezőszer függvényében, 500pg vegyületnek megfelelő modelloldat GC-MS mérése és szelektív fragmentum ionjaik alapján történő kiértékelése szerint

Szililezés körülményei⇒ Vegyület ↓	Integrátor egység / injektált pg								
	HMDS+TFA					MSTFA		BSTFA	
	Átl ^a	RSD %	Átl ^b	RSD %	RSD% (Átl ^a + Átl ^b)	Av ^a	RSD %	Av ^a	RSD %
Androszteron	37603	4,58	35034	0,98	4,04	36235	8,5	19478	3,69
β-Ösztradiol	45204	3,31	46239	1,71	2,04	50131	3,42	45874	2,83
Mesztranol	19793	3,90	21280	0,37	4,94	21033	2,00	18803	4,17
Etinilösztadiol	22865	1,31	21437	0,93	1,94	23389	0,74	21868	1,96
Tesztoszteron	17229	1,85	15946	1,31	3,89	18857	3,35	13803	5,4
Ösztriol	66430	3,71	61005	0,31	4,40	69534	2,78	64454	2,65
Noretiszteron	11989	6,6	11590	0,18	2,03	13299	4,43	8316	5,5
Gesztoden	6769	7,2	6319	1,48	5,1	7121	6,4	4884	4,41
Levonorgesztrel	8985	1,35	9314	1,90	1,64	10439	5,9	6799	4,25
Etonogesztrel	8307	5,2	7957	4,53	5,2	9818	3,45	5768	4,12
Sztigmaszterol	9280	4,48	8929	0,39	1,50	9053	5,4	11265	2,94

Jelölések a rövidítések jegyzékében, valamint: Átl^a = közvetlenül hígítás után; Átl^b = 12 órával később mérve, Átl^a + Átl^b = a 12 óra különbséggel mért adatok RSD%-a.

Vizsgáltam a HMDS+TFA reagenssel készült származékok időbeli stabilitását (a többi reagenssel készütekhez hasonlóan –az adatok bemutatása nélkül): a közvetlenül hígítást követően és 12 órával később készült felvételek adatai a 7. táblázat első öt oszlopában szerepelnek. A 12 óra különbséggel mért válaszjelek szórása 1,50-5,2 RSD% között alakult. A hígított formában tárolt származékok stabilitásának vizsgálatára a GC-MS készülék automata mintaadagolójában, sokszor egész éjszakán át

tartó tárolás miatt volt szükség. A hígítatlanul, hűtőben tárolt származékok stabilitásáról a 4.2.5. fejezetben lesz szó.

Az MTBSTFA kizárólag a hidroxiszteroidokkal lépett reakcióba: a származékká alakítás nem volt teljes, és a keletkezett *terc.*butil-dimetilszilil-éterek válaszjele igen kicsi volt. A β -ösztradiol esetében a mono- és diszubsztituált TBDMS-származékok együttes válaszjele sem haladta meg a TMS-éterek válaszjelének felét. Az etinilösztadiolból egyetlen származék keletkezett, jóllehet ennek válaszjele sem haladta meg a TMS-éter válaszjelének felét.

Az ismertetett adatok alapján, a további vizsgálatokhoz a HMDS+TFA reagenst választottam, mivel ugyanolyan hatékonynak bizonyult, mint az MSTFA vagy BSTFA (7. táblázat); az MTBSTFA -a korábbi irodalmi tapasztalatokkal [61,98,99] egybehangzóan-, nem reagált a sztérikusan gátolt hidroxilcsoportokkal; továbbá, a vizsgált lehetőségek közül a HMDS/TFA volt a legköltséghatékonyabb megoldás.

5.2.4. Az alkalmazott reakcióidő és hőfok hatásának vizsgálata a származékkészítés mindkét lépésének esetében

A szteroidok választott képviselőinek kétlépéses (1. oximálás, 2. szililezés HMDS+TFA reagenssel) származékká alakítását a reakcióidő és a –hőfok függvényében mértem (8. táblázat). Az oximálás körülményeinek optimalizálása során a trimetilszililezés, míg a trimetilszililezés körülményeinek optimalizálása során az oximálás szigorúan azonos körülmények között történt.

A kölcsönösen változtatott körülmények vizsgálatával világossá vált, hogy az 50°C alkalmazásának kivételével (dőlt betűvel szedett adatok: androszteron trimetilszililezés és noretiszteron oximálás esetében), minden alkalmazott körülmény, a származékkészítés mindkét lépésének tekintetében kielégítő eredményekkel szolgált: a különböző feltételek között készült vegyületek válaszjelének szórása 1,27-6,9 RSD% között alakult.

Következésképpen, a korábbi tapasztalatok [17-20] figyelembe vételével, az optimális reakciókörülményeket az oximálás esetében 70°C, 30 perc és trimetilszililezés során 70°C 90 percen állapítottam meg.

8. táblázat Természetes és mesterséges szteroidok származékkészítési körülményeinek optimalizálása: az oximálás és a trimetilszililezés során, a reakcióidő és a -hőfok változtatásával nyert származékok válaszelei, modelloldataik GC-MS mérése és SFI-k értékelése szerint.

Szililezés körülményei ⇒ Vegyület ↓	IE / injektált pg									
	Oximálás *					Trimetilszililezés **				
	Reakcióhőfok, °C			Reakcióidő, perc		Reakcióhőfok, °C		Reakcióidő, perc		Átl.***
	50	70	90	60	90	50	90	60	120	
Androszteron	57925 (5,7)	58953 (10)	58235 (7,2)	58965 (6,0)	59477 (5,1)	52479 (7,5)	57306 (11)	56595 (5,7)	55594 (0,76)	57881 (1,79)
β-Ösztradiol	74401 (4,27)	71707 (6,2)	73341 (3,85)	73252 (1,90)	72380 (1,77)	72901 (6,1)	69000 (8,9)	72197 (4,2)	69890 (2,83)	72119 (1,77)
Mesztranol	30858 (2,19)	31752 (8,2)	30774 (0,13)	32637 (1,16)	31649 (2,40)	30858 (4,33)	30128 (8,5)	30638 (0,22)	29894 (0,23)	31021 (2,13)
Etinilösztadiol	32536 (4,13)	34892 (6,8)	34694 (7,8)	36123 (1,16)	35311 (5,4)	34226 (8,2)	32053 (9,2)	34646 (6,1)	32338 (3,01)	34091 (3,48)
Tesztoszteron	23486 (11)	23650 (6,8)	24038 (1,82)	23586 (4,54)	22192 (1,48)	24299 (7,4)	24921 (10)	23082 (1,16)	14639 (3,15)	15071 (2,48)
Ösztriol	64602 (7,6)	66030 (6,0)	67578 (6,5)	65531 (1,67)	64876 (4,15)	67373 (5,1)	65275 (6,5)	65490 (1,23)	64902 (3,05)	64740 (1,27)
Noretiszteron	24979 (6,1)	27930 (6,7)	25761 (4,76)	29396 (2,99)	28589 (3,85)	26486 (1,17)	25422 (16)	25391 (10)	26175 (4,47)	26892 (4,87)
Gesztoden	11890 (6,1)	11790 (10)	10927 (6,4)	12450 (3,00)	12097 (6,9)	11896 (2,05)	10705 (8,0)	11796 (6,0)	10432 (1,05)	11554 (5,0)
Levonorgesztrél	16159 (4,52)	16310 (8,0)	15956 (0,83)	16318 (1,54)	15521 (1,90)	15570 (1,84)	14989 (11)	15374 (7,8)	15076 (0,32)	15696 (2,77)
Etonogesztrel	10649 (5,3)	10729 (7,2)	10007 (5,3)	11087 (3,85)	10143 (4,62)	9837 (8,4)	10003 (10)	9735 (6,1)	10027 (2,54)	10246 (3,74)
Sztigmaszterol	12601 (3,58)	11953 (4,62)	14049 (3,50)	12480 (7,0)	12367 (12)	14268 (2,19)	12369 (10)	12593 (8,0)	12987 (2,28)	12974 (5,0)
β-Szitoszterol	2622 (11)	2757 (10)	2971 (8,3)	2537 (6,8)	2938 (7,5)	2891 (3,1)	2364 (10)	2754 (3,23)	2552 (11)	2753 (4,97)

Jelölések a rövidítések jegyzékében, valamint: * = a trimetilszililezés egységesen, 70 °C-on, 90 percig történt; ** = az oximálás egységesen, 70 °C-on 30 percig történt; *dőlt szedésű adatok* = az átlagból elhanyagolva; Átl.*** = a különböző körülmények között készült származékok válaszeleik átlaga; () = zárójelben az RSD%.

5.2.5. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek válaszeleik reprodukálhatósága az injektált mennyiségek függvényében

A bemutatott származékkészítési tanulmányokat követően, a szteroid vegyületek nyolc, 1,88-750 ng/L közötti mennyiségnek megfelelő trimetilszilil-(oxim)-étereket határoztam meg két párhuzamosban készült modelloldatokból, oldatonként három injektálással. Az SPE kivonás hatásfokát 1-2 µg/L mennyiségű standard oldattal hozzáadott kifolyó szennyvízminták extrakciójával vizsgáltam.

Az összesített adatokat, az egyes vegyületekhez tartozó LOQ és SPE visszanyerés értékekkel, a 9. táblázat tartalmazza.

Az egyes származékok válaszjeleinek sajátosságai összefüggést mutattak az eredeti molekulaszervezettel. A hidroxiszteroidok (9. táblázat, 2., 5., 7., 10., 15., 17., 19., 20. vegyületek) válaszjelei kivétel nélkül kitűnő linearitást mutattak: reprodukálhatóságuk 1,73 RSD% (β -ösztadiol) és 5,4 RSD% (sztigmaszterol) között alakult. A ketoszteroidokat részben lineáris válaszjelük alapján (9. táblázat, 1., 3., 4., 8., 9., 12. vegyületek), részben kalibrációs görbe alapján (9. táblázat, 11., 13., 14., 16., 18. vegyületek) mértem. Az RSD% értékkel jellemzett reprodukálhatóság mindkét esetben elfogadható volt. A lineáris válaszjelet szolgáltató ketoszteroidok reprodukálhatósága 2,31 RSD% (gesztoden) és 5,8 RSD% között volt. A legkedvezőtlenebb reprodukálhatóság a medroxiprogesztéron-acetáté (legnagyobb válaszjel 1508 IE/pg, reprodukálhatóság 2,7-23 RSD% között), míg a legkedvezőbb a progeszteroné (legnagyobb válaszjel 30041 IE/pg, reprodukálhatóság 2,1-8,5 RSD%) volt.

A hűtőben tárolt, származékká alakított oldatok stabilitását 75 napon át követtem nyomon (9. táblázat, 6-8. oszlopok adatai). A vizsgált törzsoldatokból ez alatt az időszak alatt három ízben készítettem és mértem friss hígításokat: 2010. július 8 és 28., szeptember 16. Az így kapott válaszjelek -még a kalibrációs görbe alapján meghatározott vegyületek esetében is-, kitűnő, 0,13 RSD% és 5,9 RSD% közötti reprodukálhatóságot mutattak, 2,78 RSD% átlaggal.

A 375 μ L-es, származékká alakított törzsoldatok hígítás nélkül készült méréseinek esetében az LOQ értékek 1,88-37,6 ng/L közé estek. (A szennyvízminták mérésekor, az injektorbetét gyors eltömődésének elkerülése érdekében, a törzsoldatok 2,5-10-szeres hígítása volt szükséges.)

Az SPE extrakció visszanyerésének százalékos értékei a legtöbb szteroid esetében 79% (mesztranol) és 106% (etonogesztrel) között alakultak. A szteroidok: koprosztanol, koleszterin, sztigmaszterol és β -szitoszterol visszanyerése, valószínűleg csekély vízoldhatóságuk miatt, és a korábbi tapasztalatoknak megfelelően [19], átlagosan 34% volt (31% a koleszterin, 27% a sztigmaszterol, 40% a koprosztanol és 36% a β -szitoszterol visszanyerése).

9. táblázat Természetes és mesterséges szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek különböző injektált mennyiségeinek reprodukálhatósága modelloldatokból, GC-MS módszerrel, SFI-k alapján.

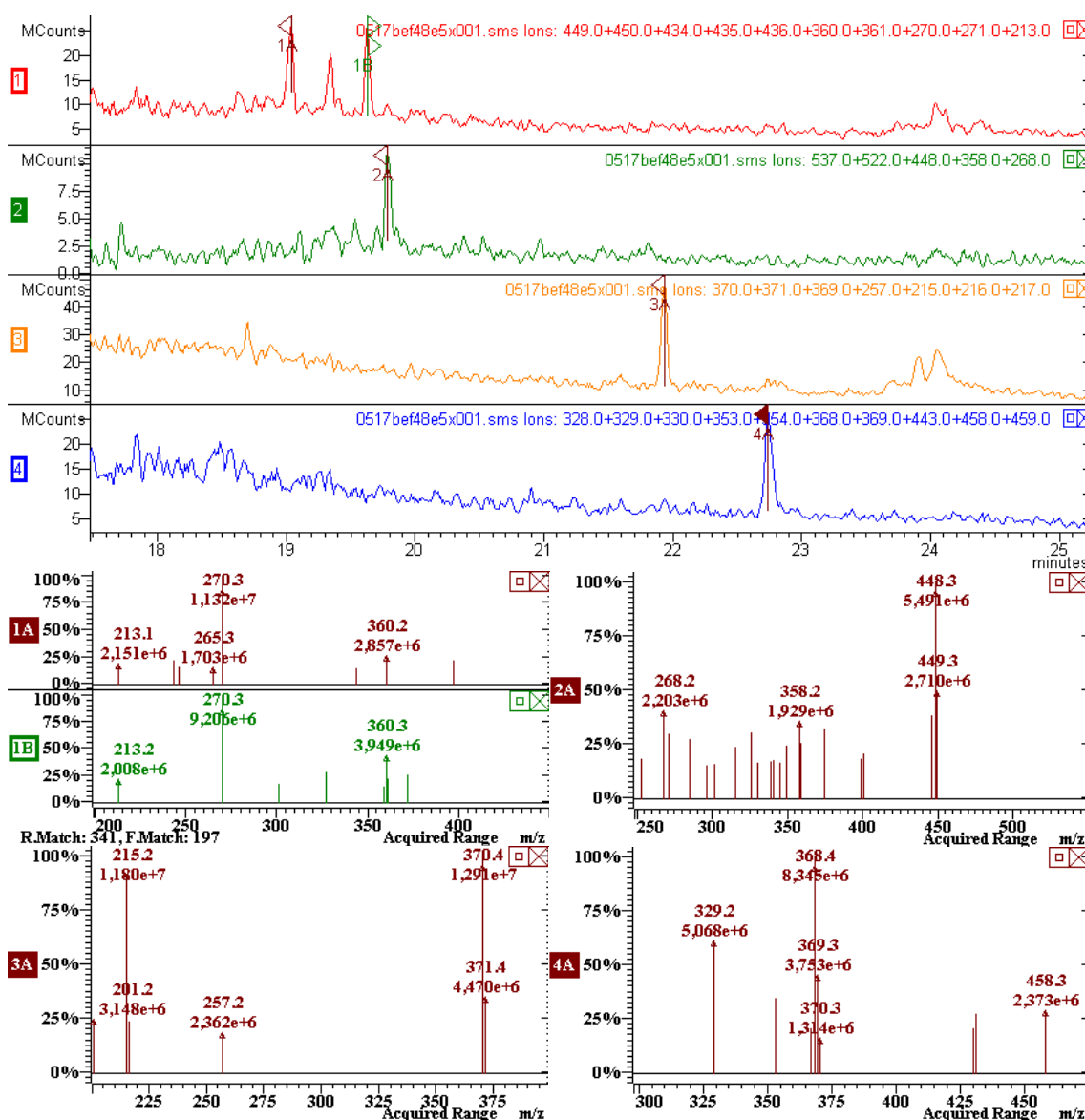
Szteroidok	Származékká alakítva: ng/L											LOQ ng/L	Injektált pg**	Rec%
	1,88	3,76	18,8	37,6	93,8			187,5	375,0	750,0	Átl.*			
					Júl. 08	Júl. 28	Szept. 16							
IE/pg														
1. Androszteron	<LOQ	10875 (3,71)	34062 (1,77)	44235 (2,29)	49550	49158 (1,66)	50742	57710 (4,30)	61074 (2,50)	61658 (2,96)	60147 (2,70)	3,76	10,0	101 (2,86)
2. β -Ösztradiol	72326 (0,83)	71555 (1,55)	71561 (1,84)	75445 (5,46)	71517	69237 (1,85)	71498	74627 (4,18)	72035 (30)	70789 (21)	72059 (1,73)	1,88	5,0	95 (1,85)
3. Transzdehidro-androszteron	<LOQ	<LOQ	9008 (5,78)	13 139 (15)	15971	16174 (2,22)	15487	19231 (4,26)	21292 (3,50)	23239 (4,26)	21254 (6,3)	18,8	50	107 (1,63)
4. Transz-androszteron	<LOQ	<LOQ	21177 (2,82)	34092 (5,7)	38820	40630 (3,67)	37798	44366 (4,71)	50977 (2,88)	54017 (2,23)	49787 (3,55)	18,8	50	96 (1,66)
5. Mesztranol	32443 (7,3)	34708 (5,1)	30714 (5,4)	34711 (4,43)	28726	29232 (1,30)	28499	29553 (3,30)	29582 (0,11)	29982 (2,71)	30815 (5,1)	1,88	5	79 (2,09)
6. Dihidro-tesztoszteron	<LOQ	<LOQ	22413 (3,51)	25272 (8,9)	29279	30439 (1,96)	28994	31798 (2,52)	33260 (1,12)	34545 (3,13)	31386 (5,8)	18,8	50	86 (3,31)
7. Etinilösztadiol	29550 (3,40)	33992 (1,58)	35473 (6,9)	34205 (0,67)	34484	35666 (1,86)	35573	34745 (2,55)	34974 (3,37)	35698 (2,14)	34140 (3,47)	1,88	5,0	90 (4,61)
8. Tesztoszteron	<LOQ	<LOQ	36705 (2,33)	33793 (8,5)	25470	23941 (4,0)	26998	23 993 (8,1)	24 178 (1,03)	24699 (1,62)	24838 (3,21)	18,8	50	89 (2,39)
9. Noretiszteron	<LOQ	11301 (4,30)	21235 (3,16)	24369 (1,04)	26000	25284 (1,84)	26720	28021 (4,07)	28707 (4,48)	30792 (0,98)	27587 (5,7)	3,76	10	100 (1,50)
10. Ösztriol	69015 (4,69)	65139 (4,26)	70267 (3,00)	70678 (2,00)	68532	65082 (5,1)	72072	70878 (2,02)	69791 (5,9)	66618 (3,54)	68864 (2,29)	1,88	5	99 (2,74)

11. 4-Androszten-3,17-dion	<LOQ	<LOQ	9585 (3,68)	9860 (2,80)	15609 (5,9)	16243	14439	21573 (2,10)	24967 (5,2)	27792 (7,8)	kalibr. görbe	18,8	50	92 (5,8)
12. Gesztoden	<LOQ	<LOQ	8045 (8,0)	8879 (4,37)	10115 (1,22)	10013	10259	12012 (1,05)	12032 (2,40)	12680 (2,35)	12241 (2,31)	18,8	50	91 (4,21)
13. Levonor-gesztrel	<LOQ	<LOQ	12423 (3,07)	13142 (9,6)	14853 (3,51)	14315	15357	16509 (6,0)	17433 (2,38)	19403 (1,34)	kalibr. görbe	18,8	50	101 (3,61)
14. Etonogesztrel	<LOQ	<LOQ	9625 (2,05)	9953 (6,0)	12100 (4,89)	11447	12624	12828 (1,66)	14247 (1,40)	15608 (4,06)	kalibr. görbe	18,8	50	106 (4,1)
15. Koprosztanol	<LOQ	<LOQ	2374 (15)	2245 (14)	2162 (0,17)	2155	2160	2659 (6,55)	2304 (4,35)	2204 (1,93)	2229 (2,05)	18,8	50	31 (1,79)
16. Progeszteron	10899 (8,5)	11381 (2,69)	9525 (5,7)	12407 (2,97)	15617 (3,67)	15874	14790	20855 (3,15)	25041 (6,5)	30041 (2,10)	kalibr. görbe	1,88	5	95 (3,20)
17. Koleszterin	<LOQ	<LOQ	22513 (4,41)	23381 (13)	20109 (0,13)	20058	20099	22158 (3,70)	20892 (2,68)	21249 (6,8)	21719 (4,46)	18,8	50	27 (10)
18. Medroxipro-gesztéron-acetát**	<LOQ	<LOQ	<LOQ	639 (23)	961 (5,6)	-	-	1259 (9,6)	1520 (6,6)	1508 (2,70)	kalibr. görbe.	37,6	100	102 (10)
19. Sztigmaszterol	<LOQ	<LOQ	14702 (5,8)	15854 (6,0)	13162 (2,62)	13611	12613	15237 (4,16)	13623 (1,21)	13398 (4,26)	14025 (5,4)	18,8	50	40 (5,3)
20. β -Sztitoszterol	<LOQ	<LOQ	3634 (5,3)	3910 (5,7)	3758 (5,2)	3932	3538	3730 (4,26)	3605 (3,77)	3544 (0,87)	3639 (2,77)	18,8	50	36 (1,42)

Jelölések: () = RSD%; Rec% = SPE visszanyerés %-a; Átl.* = két párhuzamos származékkészítés és 3-3 injektálás alapján, a *dőlten szedett adatok* elhanyagolásával; ** = figyelembe véve, hogy 1 μ L került injektálásra a 375 μ L-es törzsoldatból (ng/L = injektált pg * 375); LOQ = meghatározási határ, S/N \geq 10; kalibr. görbe = kalibrációs görbe.

5.3. Két magyar szennyvíztisztító telep mintáinak elemzése

A 2009 decemberétől 2010 szeptemberéig tartó, 10 hónapos időszak alatt két magyarországi szennyvíztisztító telep (Dél-Pest, Telki) be- és kifolyó szennyvízmintáinak összetételét vizsgáltam az ismertett módszerrel. A mért szteroid koncentrációkat a 10. táblázatban összesítettem. A Telki szennyvíztisztító telep 2010. májusi befolyó mintájában azonosított szteroidok kromatogramjai az egyes vegyületek tömegspektrumával az 5. ábrán láthatóak.



5. ábra. 2010. májusi, 0,5L telki befolyó szennyvízben azonosított szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek SFI alapján extrahált FS kromatogramjai: androszteron (1. kromatogram, 1A spektrum), transzandroszteron (1. kromatogram, 1B spektrum), androszten-3,11,diol-17-on (2. kromatogram, 2A spektrum), koprosztanol (3. kromatogram, 3A spektrum), koleszterin (4. kromatogram, 4A spektrum). (SFI-k a 6. táblázatban, és a 4.a.-g. ábrákon.)

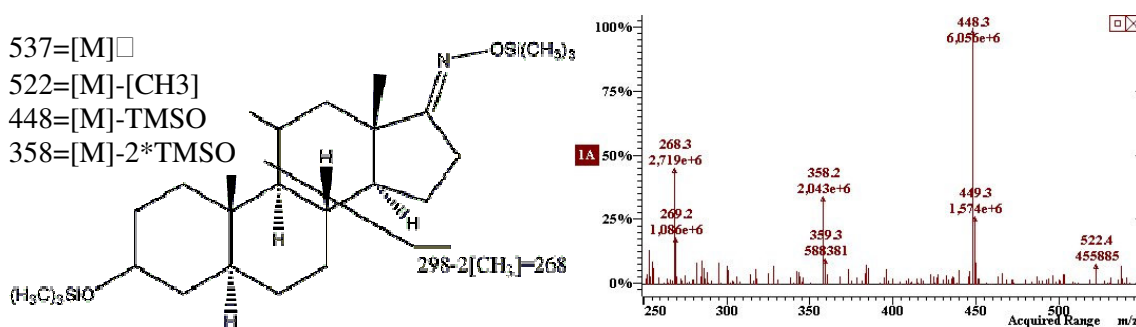
10. táblázat Be- (bef) és kifolyó (kif) szennyvízminták (0.5L) oldat fázisában GC-MS eljárással, trimetilszilil-(oxim)-éter származékként, SFI-k alapján meghatározott szteroidok

Szteroidok	Magyar szennyvíztisztító telepeken mért szteroidok: µg/L															
	Dél-Pest		Telki		Dél-Pest		Telki		Dél Pest		Telki		Telki			
	December 2009		Január 2010		Február 2010		Április 2010		Május 2010		Június 2010		Július 2010		Szeptember 2010	
	bef	kif	bef	kif	bef	kif	bef	kif	bef	kif	bef	kif	bef ^{0,5}	bef ^{1,0}	kif	bef
Androszteron	4,09 (5,1)	<LOQ	0,74 (0,05)	<LOQ	3,96 (10,0)	<LOQ	3,25 (1,48)	1,08 (6,2)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,17 (2,48)	2,21 (0,75)	<LOQ	4,28 (1,68)	<LOQ
Transz-androszteron	1,70 (4,23)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,78 (1,25)	<LOQ	0,138 (0,601)	1,87 (1,07)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4,00 (5,5)	3,53 (6,2)	<LOQ	2,91 (1,11)	<LOQ
Androszteron- 3,11- diol-17-on*	1,04 (10)	<LOQ	0,058 (7,2)	<LOQ	1,04 (1,05)	<LOQ	0,63 (0,056)	1,09 (1,00)	<LOQ	0,57 (2,44)	<LOQ	4,37 (4,13)	4,50 (3,96)	<LOQ	<LOQ	<LOQ
β-Ösztradiol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,100 (3,65)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ösztriol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,054 (15)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Koprosztanol	180 (3,26)	16,2 (8,3)	188 (3,24)	2,11 (4,75)	302 (1,37)	15,1 (1,93)	100 (0,737)	144 (3,51)	20,0 (5,4)	45,0 (6,2)	6,40 (4,34)	44,0 (1,96)	31 (0,21)	<LOQ	20,0 (2,72)	4,16 (5,5)
eltávolítva**	91%		99%		95%		-	86%		87%		100%		80%		
Koleszterin	21 (7,4)	0,308 (3,19)	10,0 (0,69)	0,437 (5,7)	37 (7,3)	1,39 (4,8)	13 (3,77)	8,50 (3,52)	0,96 (4,13)	6,70 (4,80)	0,369 (2,14)	41,0 (5,6)	25,0 (1,18)	0,79 (13)	15 (5,7)	2,88 (7,0)
eltávolítva **	99%		96%		96%		-	89%		94%		98% vagy 97%		80%		
Sztigmaszterol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8,40 (4,94)	1,21 (5,6)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
eltávolítva **	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86%		-	-	-	-	-
β-Szitoszterol	<LOQ	<LOQ	10,0 (0,85)	1,12 (2,81)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	7,00 (5,6)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11 (7,6)	4,38 (12)
eltávolítva **	-	-	89%		-	-	-	-	-	100%		-	-	-	60%	

Jelölések a rövidítések jegyzékében, valamint: * = SFI alapján azonosítva; () =RSD%; bef^{0,5} és bef^{1,0} = 0,5 L és 1,0 L szennyvízmintából, 2-2 párhuzamosban mérve; ** = a szennyvízkezelés során eltávolítva, a befolyó szennyvízben mért mennyiség százalékában.

Várakozásaimnak megfelelően, a ritkán vizsgált természetes androgének közül többet is sikerült nagy, több $\mu\text{g/L}$ -es mennyiségben azonosítanom: androszteront és androszteron-3,11-diol-17-ont a nyolc mintavételből hét, transzandroszteront hat befolyó mintában. Az androgének koncentrációi $0,74\text{-}4,28 \mu\text{g/L}$ (androszteron), $0,138\text{-}4,00 \mu\text{g/L}$ (transzandroszteron) és $0,058\text{-}4,50 \mu\text{g/L}$ (androszteron-3,11-diol-17-on) között változtak a befolyó szennyvízmintákban, míg a kifolyó szennyvízmintákban nem voltak kimutathatóak.

A táblázatban feltüntetett androszteron-3,11-diol-17-ont előzetes fragmentum-analitikai tapasztalataim alapján (4.2.2. fejezet), kettős trimetilszilil-oxim-éter származék formájában azonosítottam. A vizsgálatok idején a megfelelő vegyület analitikai tisztaságú standardja nem volt elérhető kereskedelmi forgalomban, így a mennyiségi meghatározáshoz az ismeretlen összetevőhöz legközelebb eluálódó természetes androgén, a transzandroszteron válaszjelét használtam. Az androszteron-3,11-diol-17-onként azonosított összetevő 2010. júliusi telki befolyó szennyvízmintából rögzített spektrumát, és a vegyület di-TMS származékának szerkezeti képletét, az egyes fragmens ionoknak megfelelően megjelölt molekulatöredékek megjelölésével, a **6.** ábrán mutatom be.



6. ábra. Androszteron-3,11-diol-17-onként azonosított összetevő 2010. júliusi, Telki szennyvízmintából rögzített spektruma, és a feltételezett di-TMS származék szerkezeti képlete a spektrumban észlelt fragmens ionoknak megfelelően megjelölt molekulatöredékekkel.

A sokat kutatott ösztrogének közül a β -ösztradiolt és az ösztriolt egyetlen befolyó mintában sikerült azonosítanom, $0,100 \mu\text{g/L}$ és $0,054 \mu\text{g/L}$ mennyiségben (10. táblázat, Dél-Pest, 2010. április).

Ahogy szennyvízminták elemzése során várható, nagy koprosztanol ($20,0\text{-}302 \mu\text{g/L}$) és koleszterin ($6,7\text{-}47,3 \mu\text{g/L}$) tartalmat mértem. Ez számottevően csökkent a

szennyvíztisztítás során: a tisztítási hatásfok 80% és 100% között alakult, 90%-os átlaggal.

A sztigmaszterol és β -szitoszterol koncentrációi, rossz vízoldhatóságuknak és gyengébb válaszjelüknek köszönhetően, a vízminták többségében az LOQ alatt maradtak.

A 4.3. fejezetben, a 10. táblázatban, az 5. és a 6. ábrákon bemutatott valamennyi mérés a 3.3.2. fejezet, 3. táblázatban ismertetett 1. kolonnaprogrammal és a pásztázó üzemmódban készült. A kis, néhány ng/L mennyiségben előforduló összetevők megbízható azonosítása érdekében, a kutatást a szelektívebb detektálási módszerek fejlesztése céljával folytattam.

5.4. A különböző adatgyűjtési módszerek összehasonlítása a szteroidok és a kólsavak GC-MS(/MS) meghatározásában

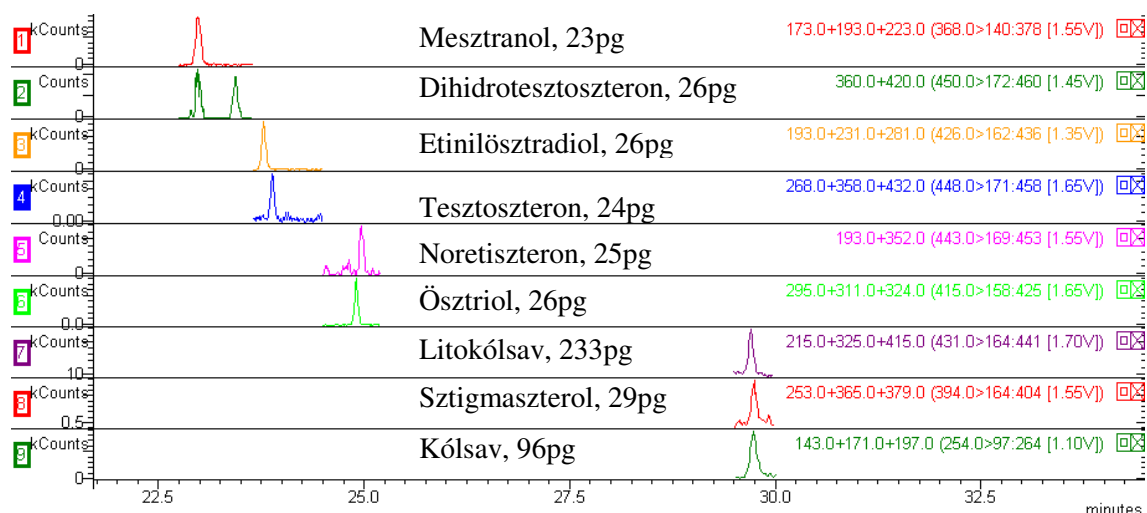
5.4.1. A többszörös ion monitorozó (MIM) és a többszörös reakció monitorozó (MRM) technikák kidolgozása

Célkitűzéseimnek megfelelően (2. fejezet), a vizsgált 20 szteroid vegyület meghatározásával a korábban kidolgozott sok összetevőt elemző rendszert [17-20] igyekeztem kiegészíteni. Mivel a korábban már vizsgált [18,19] kólsavak, részben, a szteroidokkal közös szakaszon, a kromatogram utolsó harmadában eluálódnak, az új adatgyűjtési technikák kidolgozását ezekre a vegyületekre is kiterjesztettem. Ezzel a jelen tanulmányban elemzett vegyületek száma 26-ra nőtt.

Az előzetes vizsgálatok során kiderült, hogy a 26 vizsgált vegyületből 9 detektálása közös elúciós ablakban lehetséges. Az együtt eluálódó vegyületepárok, a vonatkozó MRM kromatogramokkal a 7. ábrán láthatóak.

Annak érdekében, hogy a lehető legtöbb vegyületet külön-külön, önálló időablakban vizsgálhassam, a továbbiakban egy izoterm szakasz betoldásával módosított kolonna hőprogrammal dolgoztam (3.3.2. fejezet, 3. táblázat).

Az 26 vegyület optimált MIM és MRM paramétereit a 11.a. és 11.b. táblázatok tartalmazzák. Az MRM paraméterek optimalizálására minden egyes vegyület esetében külön-külön, a GC-MS készüléket vezérlő szoftver automata módszerfejlesztő programjának (AMD) segítségével került sor. A folyamat során a lehető legnagyobb jelintenzitás elérése érdekében, elsőként –több jelölt előzetes kipróbálásával- a szülőiont



7. ábra Közös időablakokban, modelloldatból, GC-MS/MS (MRM) módszerrel mért szteroid- és kólsav-trimetilszilil-(oxim)-éterek/észterek elúciós profiljai: mesztranol és dihidrotesztoszteron-oxim (1.-2. kromatogramok), etinilösztadiol és tesztoszteron-oxim (3.-4. kromatogramok), noretiszteron-oxim és ösztriol (5.-6. kromatogramok), valamint a litokólsav, sztigmaszterol, kólsav hármas (7.-9. kromatogramok).

11.a. táblázat Szteroid- és kólsav-trimetilszilil-(oxim)-éter/észterek optimalizált MIM adatgyűjtési paraméterei

Vegyület	t _R , perc	[M] ⁺ m/z	SFI, m/z MIM adatgyűjtéshez
1. Androszteron*	20,71	449	449; 434; 360; 270; 213
2. β-Ösztadiol	21,41	416	416; 401; 326; 285; 231
3. Transzdehidroandroszteron*	21,91	447	447; 432; 358; 318; 268
4. Transzandroszteron*	22,18	449	449; 434; 360; 270; 213
5. Mesztranol	22,67	382	367; 227; 174
6. Dihidrotesztoszteron*	22,68 23,16	449	449; 434; 344
7. Etililösztadiol	23,52	440	425; 285; 231
8. Tesztoszteron*	23,51 23,62	447	447; 432; 211
9. Noretiszteron*	24,60 24,75	457	442; 209
10. Ösztriol	24,67	504	504; 414; 386; 296
11. 4-Androszten-3,17-dion*	25,10 25,20	460	460; 445; 371
12. Gesztoden*	25,61 25,76	469	469; 454; 440; 380
13. Levonorgesztrel*	25,99 26,14	471	471; 456; 442; 382; 331
14. Etonorgesztrel*	26,51 26,70	483	483; 468; 454; 394; 343; 153
15. Koprosztanol	26,86	460	370; 257; 215
16. Progeszteron*	27,60 27,69	488	488; 473; 399; 344; 211; 145
17. Koleszterin	27,95	458	458; 443; 369; 353; 329; 255
18. Medroxi-progeszteron-acetát*	29,00	473	473; 458; 371; 280; 225; 209
19. Litokólsav	29,56	430	430; 257
20. Sztigmaszterol	29,63	484	484; 394
21. Kólsav	29,59	696	426; 343
22. Kenodeoxikólsav	30,03	608	593; 518; 428; 255
23. β-Szitoszterol	30,56	486	486; 471; 396; 381; 129
24. Urzodeoxikólsav	30,69	608	428; 413; 255; 518
25. 3-Hidroxi-7-ketokolánsav*	31,16	621	621; 606; 490; 449
26. Dehidrokólsav*	32,77 33,09	735	720; 646; 556

Jelölések: Rövidítések jegyzékében, valamint: * = oximképző vegyületek.

11.b. táblázat Szteroid- és kólsav-trimetilszilil-(oxim)-éter/észterek optimalizált MRM adatgyűjtési paramétereit

Vegyület	Szülőion, <i>m/z</i>	Gerjesztés fárolási szintje, <i>m/z</i>	CID (V)	Leányionok**, <i>m/z</i> MRM adatgyűjtéshez (relatív beütésszám, %)
1. Androszteron*	271	103,3	0,85	213 (100); 253 (70); 197 (44)
2. β -Ösztradiol	417	158,9	1,40	285 (100); 326 (88) [PI-TMSOH] ⁺
3. Transzdehidro- androszteron*	268	102,5	1,05	211 (100); 251 (36)
4. Transzandroszteron*	271	103,3	0,85	213 (100); 253 (36); 197 (25)
5. Mesztranol	368	140,2	1,55	193 (100); 223 (58); 173 (52)
6. Dihidro- tesztoszteron*	450	171,5	1,45	420 (100) [PI-2CH ₃] ⁺ ; 360 (80) [PI-TMSOH] ⁺
7. Etinilösztadiol	426	161,9	1,35	193 (100), 231 (93)
8. Tesztoszteron*	448	170,7	1,65	432 (100) [PI-CH ₃] ⁺ ; 358 (55) [PI-TMSOH] ⁺ ; 268 (47)
9. Noretiszteron*	443	168,8	1,55	352 (100) [PI-TMSOH] ⁺ ; 193 (40)
10. Ösztriol	415	158,1	1,65	324 (100); 296 (57); 311 (32)
11. 4-Androszen-3,17- dion*	461	175,7	0,90	371 (100) [PI-TMSOH] ⁺ ; 445 (66) [PI-CH ₃] ⁺
12. Gesztoden*	381	145,2	1,65	290 (100); 352 (60)
13. Levonorgesztrel*	331	126,1	1,40	316 (100); 242 (62) [PI-TMSO] ⁺ ; 302 (47)
14. Etonorgesztrel*	394	150,1	1,50	304 (100); 378 (27) [PI-CH ₃] ⁺
15. Koprosztanol	371	141,4	1,30	215 (100); 355 (60) [PI-CH ₃]; 257 (38)
16. Progeszteron*	345	131,5	1,55	328 (100) [PI-CH ₄] ⁺
17. Koleszterin	369	125,0	0,65	339 (100); 353 (84) [PI-CH ₄] ⁺ ; 255 (76)
18. Medroxi- progeszteron-acetát*	474	141,0	1,15	458 (100) [PI-CH ₃] ⁺ ; 370 (89); 280 (44)
19. Litokólsav	431	163,9	1,70	215 (100); 325 (59); 415 (58) [PI-CH ₃] ⁺
20. Sztigmaszterol	394	163,9	1,55	379 (100) [PI-CH ₃] ⁺ ; 365 (97) [PI-C ₂ H ₅] ⁺ ; 255 (85)
21. Kólsav	254	96,8	1,10	143 (100); 171 (40); 197 (35)
22. Kenodeoxi-kólsav	255	97,2	1,35	173 (100); 159 (39)
23. β -Sztioszterol	397	151,3	1,45	367 (100) [PI-CH ₂] ⁺ ; 381 (61) [PI-CH ₃] ⁺ ; 255 (42)
24. Urzodeoxikólsav	519	197,8	0,80	422 (100); 255 (36); 428 (34)
25. 3-Hidroxi-7- ketokolánsav*	449	171,1	1,20	358 (100); 268 (69)
26. Dehidrokólsav*	646	246,2	1,40	556 (100); 466 (39)

Jelölések: Rövidítések jegyzékében, valamint: * = oximképző vegyületek; **a szülő- és leányionok félkövér szedésűek, a mennyiségi meghatározás valamennyi keletkező ion felhasználásával történt: az egyes leányionok azonosítását vagy a 4.2.2. fejezetben részleteztem, vagy a *dőlt szedéssel jelöltek*, a szteránváz felhasadásával keletkezőek voltak (8. ábra).

választottam, majd, több lépésben, az optimális ütközéssel indukált disszociáció (CID) frekvenciát és a hozzá tartozó gerjesztés tárolási szintjét határoztam meg. További körülményeket, így az izolációs ablak és a cél összes beütésszám érték változtatásának hatását is vizsgáltam, de ezek elhanyagolhatónak bizonyultak. Az egyik legfontosabb lépés a megfelelő szülőion meghatározása. A kiválasztás szempontjai között szerepelt, hogy a szülőion minél nagyobb intenzitással jelentkezzen az érintett vegyület tömegspektrumában, minél nagyobb m/z értékkel rendelkezzen, és az előzetes vizsgálatok során, reprodukálható módon, minél kisebb számú és összességében nagy intenzitású leányion keletkezzen.

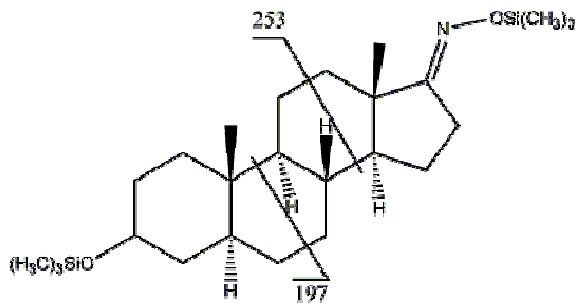
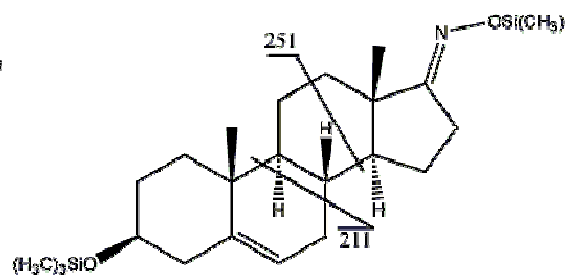
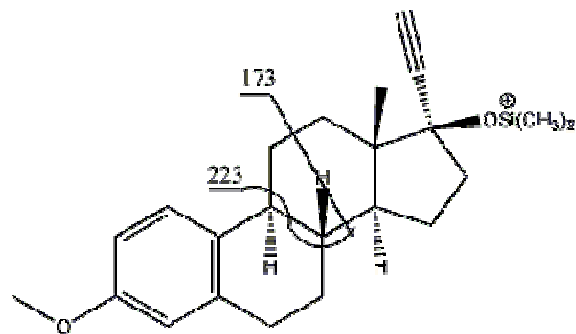
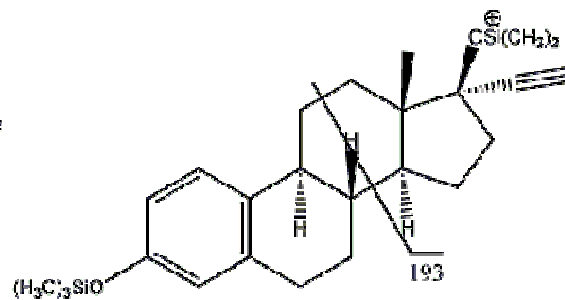
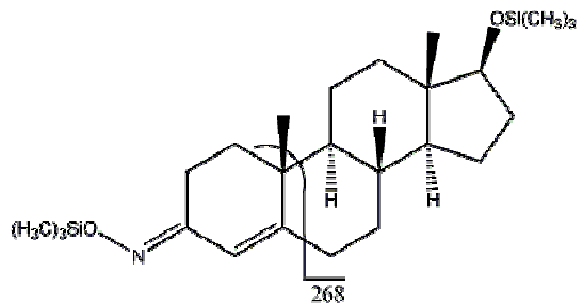
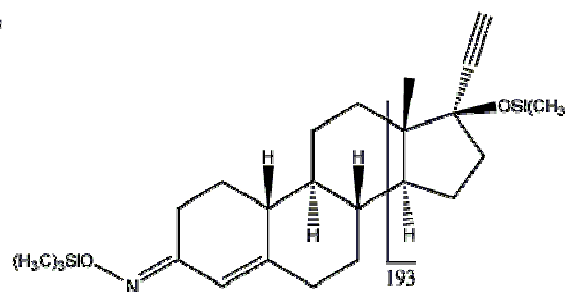
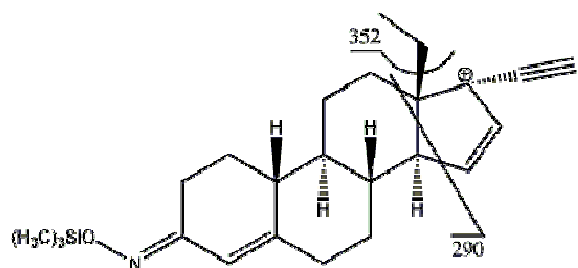
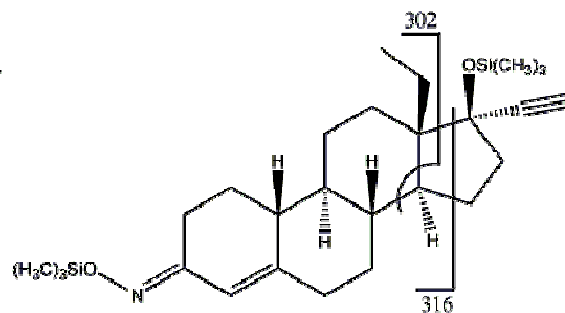
A molekulaionok, és az egy metilcsoport elvesztésével keletkező ionok 9 esetben bizonyultak alkalmasnak (11.b. táblázat, 2., 5.-9., 11., 18., 19. vegyületek). A szülőionként kiválasztott egyéb fragmensek szerkezetei a 4.2.2. fejezet 4.a.-g. ábráin láthatóak.

A szülőionok m/z értékei sok esetben egy egységgel nagyobbak az SFI-knál. Ez a jelenség az ioncsapa tömegspektrométerek működési sajátosságaival magyarázható: a kerekítési ponthoz (m/z 0,50) közel eső tömegek egy teljes tömegegységgel nagyobb fragmenst mutathatnak, valamint, a nagy savtartalmú reagens felesleg jelenlétében a protonált származékok kémiai ionizációja sem zárható ki [112].

A leányionoknak (11.b. táblázat, utolsó oszlop) megfelelő molekulatöredékek azonosítása egyrészt a korábbi fragmentációs tanulmányban megtörtént (4.2.2. fejezet, [18]), másrészt a szülőionból származtathatóak egy CH_3 , CH_4 , TMSO vagy TMSOH csoport elvesztésével (11.b. táblázat utolsó oszlopában []-ben jelölve), vagy a szteránváz eddig le nem írt módú felbomlásával keletkeztek és a 8. ábrán láthatóak.

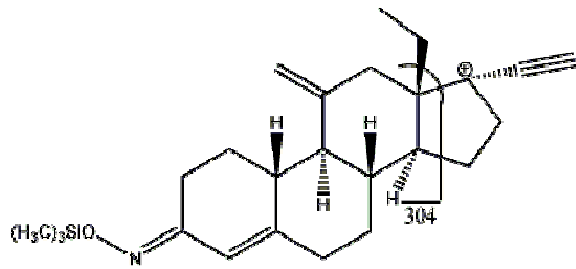
A legmegfelelőbb szülőionok kiválasztása után, a keletkező leányionok ismeretében, a CID ideális amplitúdóját többlépéses optimalizációval határoztam meg. A CID érték változtatásának összefüggését a keletkező szekunder ionok mennyiségével, az ösztriol és a progeszteron példáján, a 9.a.-b. ábrán mutatom be.

A CID amplitúdó növelésével a szekunder ionizáció fokozódik, így a szülőion jelintenzitása csökken, és megjelennek a leányionok. A keletkező fragmentumok mennyisége egy bizonyos fokig nő, de a CID amplitúdó további emelése még kisebb tömegű molekulatöredékek keletkezéséhez vezet. Az optimalizációs folyamat célja

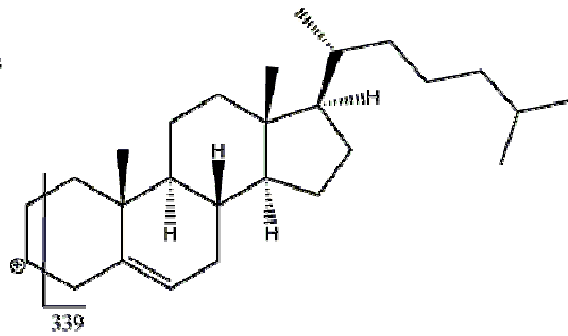
Androszteron-oxim (1)**Transzandroszteron-oxim (4)****Transzdehidroandroszteron-oxim (3)****Mesztranol (5)****Etinilözstradiol (7)****Tesztoszteron-oxim (8)****Noretiszteron-oxim (9)****Gesztoden-oxim (12)****Levonorgesztrel-oxim (13)**

8. ábra Szteroid- és kólsav-trimetilszilil-oxim-éter/észterek GC-MS/MS (MRM) meghatározásához használt SFI-k (11.b. táblázat).

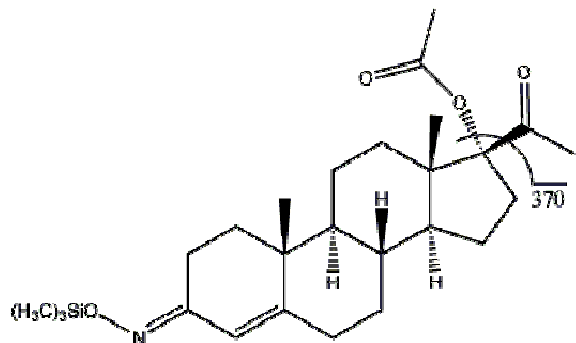
Etonogesztrel-oxim (14)



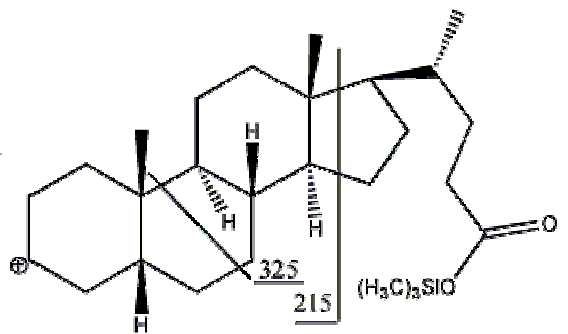
Koleszterin (17)



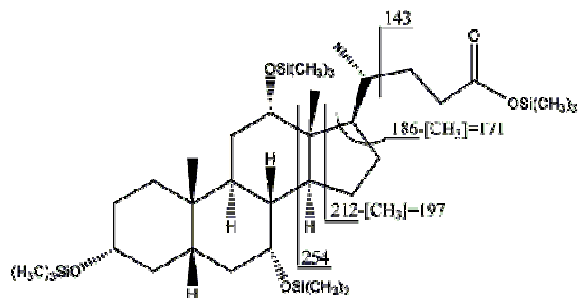
Medroxiprogesztéron-acetát-oxim (18)



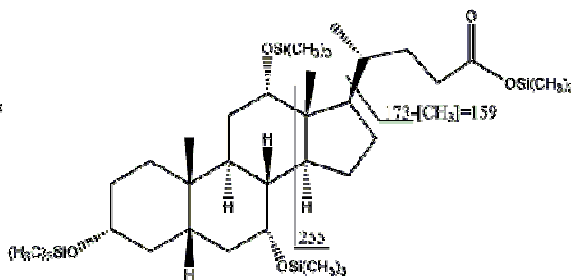
Litokólsav (19)



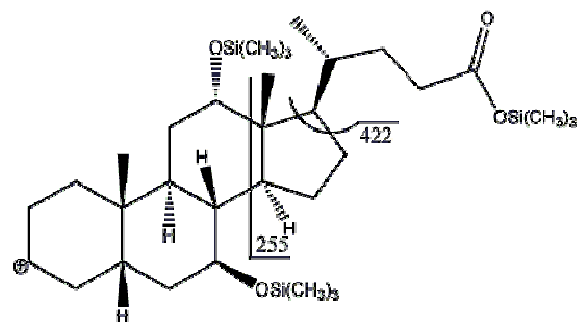
Kólsav (21)



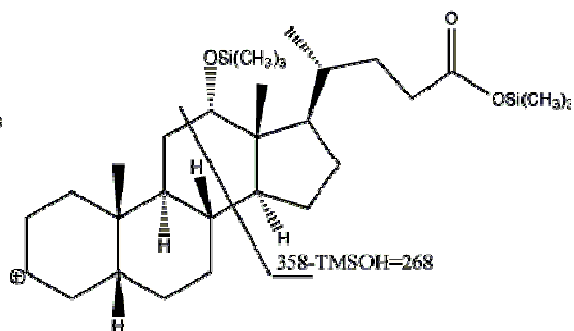
Kenodeoxikólsav (22)



Urzodeoxikólsav (24)



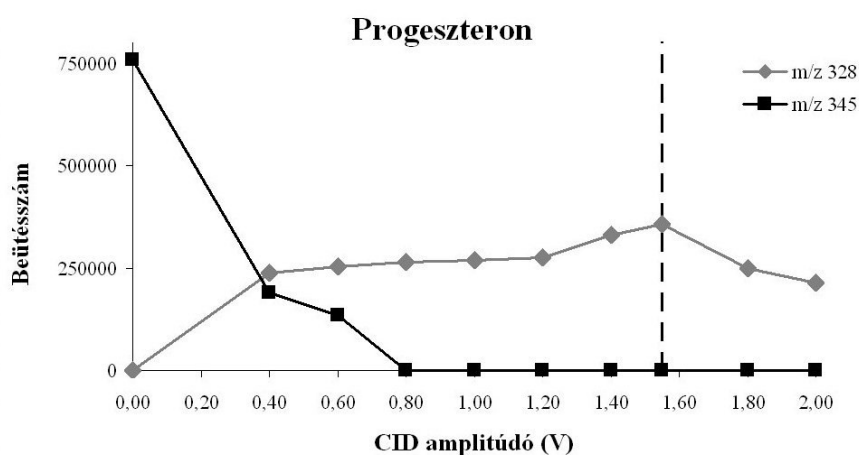
3-Hidroxi-7-ketokolánsav-oxim (25)



8. ábra (folytatás)

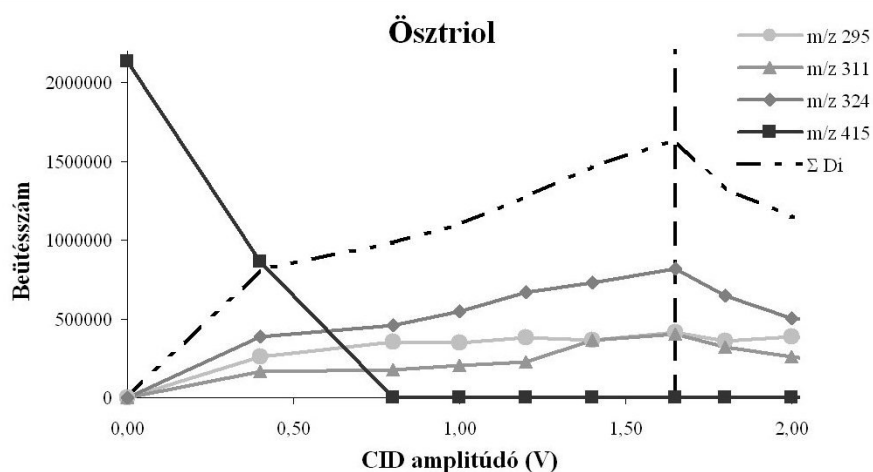
megtalálni azt a CID amplitúdó értéket, ahol a szülőion már kitisztult a tömegspektrumból, és a leányionok összesített beütésszáma a lehető legnagyobb.

A progeszteron bizonyult az egyetlennek a vizsgált 26 vegyület közül, amelynek esetében a hasított szülőionból egyetlen, a szekunder tömegspektrumot meghatározó termék keletkezik. Ebben az esetben a m/z 345 szülőionból egy metilcsoport elvesztésével keletkező m/z 328 leányion jelintenzitásának maximuma jelentette az optimális CID értéket (9.a. ábra).



9.a. ábra MRM fragmentáció optimalizálása progeszteron esetében: szülő- (m/z 345) és leányion (m/z 328) beütésszámának változása a CID amplitúdó függvényében.

A legtöbb szteroid esetében a kiválasztott szülőionból nem egy, hanem kettő vagy három leányion keletkezik. Ezekben az esetekben az optimumot a keletkező leányionok összesített beütésszámának maximuma jelentette, mint a bemutatott ösztriol esetében is (9.b. ábra).



9.b. ábra MRM fragmentáció optimalizálása ösztriol esetében: szülő- (m/z 415) és leányionok (m/z 295, 311, 324) beütésszámának, valamint a leányionok összesített jelintenzitásának (ΣDi) változása a CID amplitúdó függvényében.

5.4.2. A három alkalmazott adatgyűjtési módszer (FS, MIM, MRM) teljesítményének összevetése modelloldatok elemzésével

A három adatgyűjtési technika (FS, MIM, MRM) összehasonlítása, első ízben, mátrixmentes oldatok (12. táblázat), majd szennyvízminták (4.4.3. fejezet, 10.a.-c. ábrák, 13. táblázat), 2-2 párhuzamos származékkészítésből, 3-3 injektálással, készült felvételek alapján történt. A detektálási módszerek kritikai összevetése az analitikai teljesítményjellemzőik, így a hat pontos, külső kalibrációs görbe regressziója (R^2), a párhuzamos mérések relatív hibája (RSD%), a meghatározhatósági határ (LOQ), a műszeres meghatározhatósági határ (ILQ), és a legkisebb meghatározott mennyiséghez tartozó S/N értékek alapján történt (12. táblázat).

Az FS, MIM, MRM módszerek hat pontos kalibrációjának átlagolt adatai: a lineáris regressziós koeficiensek (R^2 : 0,9995, 0,9858, 0,9975), és az RSD%-ban kifejezett szórások, az alkalmazott adatgyűjtési technikától függetlenek. Azokban az esetekben, amikor a válaszjel nem volt arányos az injektált mennyiségekkel, kalibrációs görbe alkalmazására volt szükség.

A három összehasonlított módszer közötti különbségek az LOQ és az ILQ értékeknél jelentkeztek: átlaguk az FS, a MIM és az MRM módszerek sorrendjében 1,15; 0,49; és 0,19 ng/L a hidroxiszteroidok; 18,1; 10,1 és 2,77 ng/L a szteroidok; 13,8; 8,3; 4,95 ng/L a ketoszteroidok; végül 18,9; 14,4 és 14,4 ng/L volt a kólsavak esetében.

Az MRM módszer legkisebb ILQ és LOQ értékei mellett, a három módszerrel meghatározható legkisebb mennyiségek kromatográfiás csúcsainak jel/zaj viszonyai is (12. táblázat, utolsó kettő oszlop) az MRM módszert, mint a legszelektívebb adatgyűjtési technikát igazolták: az MRM módszerrel felvett csúcsok S/N értéke 1,08 (levonorgesztrell, etonorgesztrell) – 8,64-szer (etinilösztadiol) volt nagyobb a MIM módszerrel rögzítettekhez képest.

Modelloldatok mérésekor az FS és a MIM módszerek is a különböző vízminták elemzéséhez megfelelő szelektivitásúak (kis LOQ, megfelelő S/N), azonban a valós minták elemzésekor kiderül, hogy ezek a módszerek terheltebb mátrixok esetében nem biztosítják a megfelelő azonosítást (4.4.3. fejezet és 13. táblázat).

12. táblázat FS, MIM, MRM adatgyűjtési technikák analitikai jellemzői: szteroidok és kólsavak meghatározása modelloldatokból, TMS (oxim) éter/észter származékként, GC-MS eljárással

Analitikai jellemzők⇒ Vegyület ↓	R ²			RSD%			LOQ*, ng/L			ILQ**, pg			S/N értékek aránya***	
	FS	MIM	MRM	FS	MIM	MRM	FS	MIM	MRM	FS	MIM	MRM	MIM/FS	MRM/MIM
1. Androszteron	0,9995	0,9858	0,9795	6,8	11,5	13,2	3,79	3,79	1,91	10,1	10,1	5,1	1,36	2,41
2. β-Ösztradiol	0,9997	0,9987	0,9986	5,2	5,4	6,6	0,56	0,283	0,203	1,61	0,753	0,541	1,51	2,07
3. Transz-dehidroandroszteron	0,9983	0,9924	0,9966	6,5	8,9	9,9	21,8	18,0	9,0	58	48,0	23,9	6,8	2,62
4. Transz-androszteron	0,9987	0,9896	0,9829	10,8	12,3	13,2	18,0	9,0	9,0	24,0	24,0	24,0	10,4	2,08
5. Mesztranol	0,9997	0,9996	0,9998	5,9	5,0	7,3	1,725	0,521	0,173	4,62	1,39	0,462	10,7	3,07
6. Dihidrotesztoszteron	0,9997	0,9966	0,9935	4,85	3,84	6,7	19,9	9,9	1,99	53	26,3	5,3	4,42	2,05
7. Etinilösztadiol	0,9999	0,9991	0,9994	6,1	4,88	8,3	1,17	0,589	0,195	3,13	1,57	0,523	9,9	8,64
8. Tesztoszteron	0,9993	0,9978	0,9980	12,0	9,0	9,0	18,1	3,64	1,09	48,3	9,7	2,90	10,1	6,8
9. Noretiszteron	0,9996	0,9960	0,9849	10,7	7,8	8,2	3,75	3,75	1,88	10,0	10,0	5,0	1,66	3,54
10. Ösztriol	0,9994	0,9991	0,9995	5,3	6,6	7,3	1,15	0,573	0,191	3,07	1,53	0,513	2,01	1,33
11. 4-Androszten-3,17-dion	kalibrációs görbe						20,6	20,6	20,6	55	55	55	7,65	2,94
12. Gesztoden	0,9995	0,9952	0,9945	6,2	7,0	11,9	19,5	9,75	9,75	52	25,8	25,8	4,90	1,62
13. Levonorgesztrel	kalibrációs görbe						17,7	17,7	8,8	47,1	47,1	23,5	6,6	1,08
14. Etonorgesztrel	kalibrációs görbe						19,1	9,5	9,5	51	25,3	25,3	3,27	1,08
15. Koprosztanol	0,9966	0,9990	0,9979	6,8	4,41	5,3	18,6	9,3	1,86	49,5	24,7	4,95	7,5	2,95
16. Progeszteron	kalibrációs görbe						88	88	88	234	234	234	4,53	1,17
17. Koleszterol	0,9996	0,9954	0,9985	5,8	7,6	4,8	18,5	9,3	3,38	49,4	24,7	9,0	2,80	3,44
18. Medroxi-progeszteron-acetát	kalibrációs görbe						43,9	43,9	43,9	117	117	117	2,84	2,55
19. Litokólsav	0,9979	0,9994	0,9941	5,2	5,6	8,4	32,3	19,5	19,5	86	52	52	1,24	2,01
20. Sztigmaszterol	0,9974	0,9983	0,9998	10,3	4,05	8,0	21,8	10,9	4,50	58	29,0	12,1	1,15	1,98
21. Kólsav	0,9999	0,9950	0,9927	5,4	10,0	11,6	3,23	3,75	3,75	8,6	10,0	10,0	1,19	2,15
22. Kenodeoxikólsav	0,9998	0,9979	0,9947	4,9	9,6	11,5	31,5	19,9	19,9	84	53	53	3,76	5,03
23. β-Szitoszterol	0,9915	0,9973	0,9919	10,6	6,2	6,0	22,1	11,0	1,32	59	29,3	3,51	6,6	1,38
24. Urzodeoxikólsav	kalibrációs görbe						34,5	34,5	30,8	92	92	82	4,0	3,09
25. 3-Hidroxi-7-ketokolánsav	kalibrációs görbe						300	73,5	55	800	196	147	8,33	1,54
26. Dehidrokólsav	kalibrációs görbe						600	380	380	1600	1014	1014	4,29	1,55

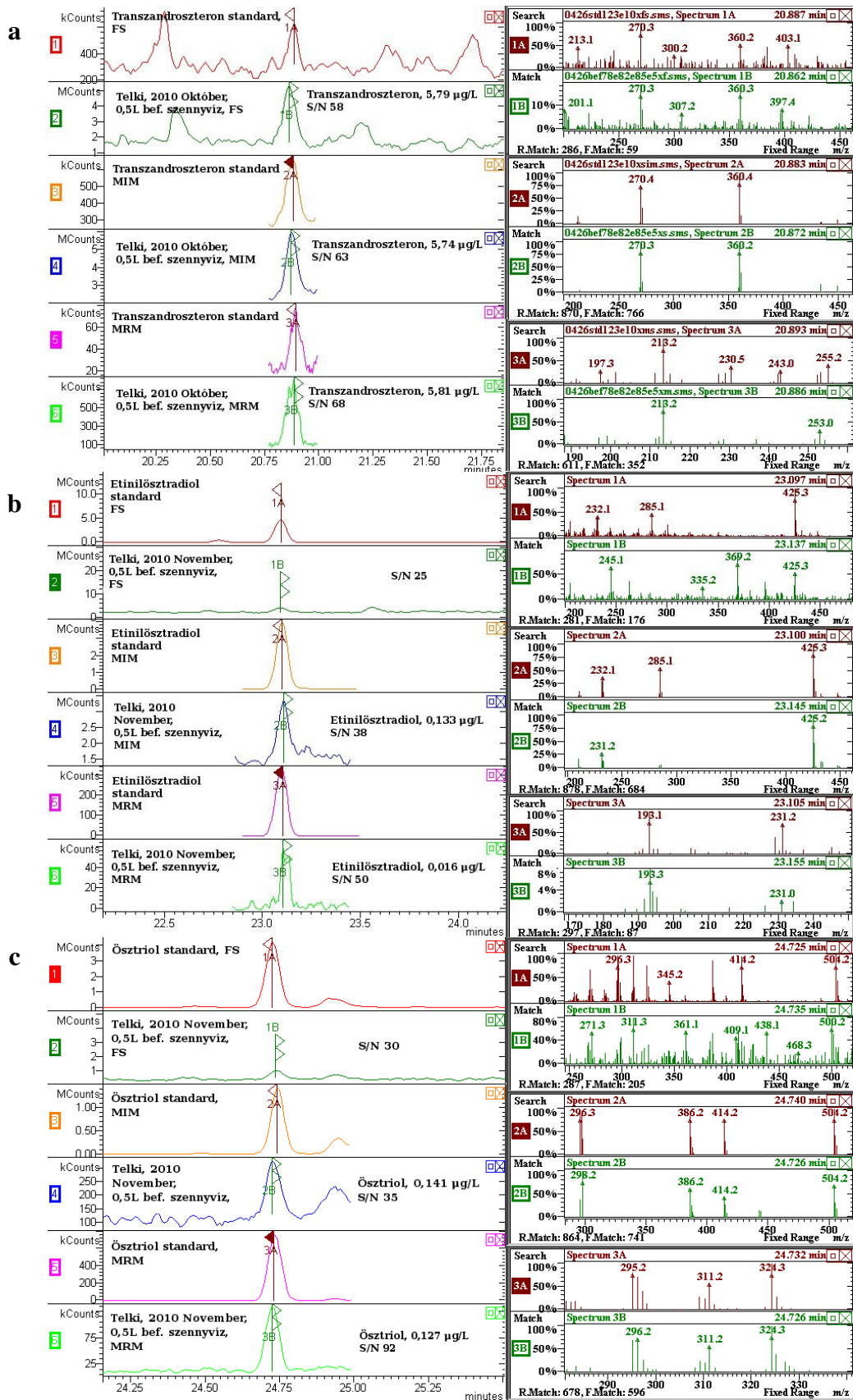
Jelölések: R² = a kalibrációs görbe lineáris tartománya alapján (0,188 ng/L - 2,81 ng/L); *LOQ = S/N ≥ 10; **ILQ = injektált pg/ μL, a származékok 375 μL törzsoldatából (LOQ ng/L = injektált pg × 375); *** S/N = jel/zaj viszony, módszerként hat injektálás átlagértéke.

5.4.3. A három alkalmazott adatgyűjtési módszer (FS, MIM, MRM) teljesítményének összevetése szennyvízminták elemzésével

A három vizsgált adatgyűjtési eljárás alkalmasságát öt összetartozó, be- és kifolyó szennyvízminta elemzésével hasonlítottam össze. A módszerek közötti különbségeket három szteroid detektálásnak jellegzetes példája mutatja (10.a.-c. ábrák). A szennyvízminták különböző módszerekkel mért koncentrációinak adatai a 13. táblázatban olvashatóak.

A 10.a.-c. ábrákon, a szennyvízextraktum-kromatogramokon nyomon követhető, hogy a valamennyi módszerrel (FS, MIM, MRM) nyert kromatográfiás csúcsok jel/zaj viszonya összefügg a hozzá tartozó tömegspektrummal és az azonosított szteroidok mért értékeivel. A $>5 \mu\text{g/L}$ koncentrációban jelen lévő transzandroszteron koncentrációi (10.a. ábra), enyhén növekvő S/N viszonyok mellett (FS: 58, MIM: 63, MRM: 68), az összetartozó tömegspektrumokkal (FS: 1A, 1B; MIM: 2A, 2B; MRM: 3A, 3B - valamennyi egyezik a standarddal), összemérhetőek (FS: $5,79 \mu\text{g/L}$, MIM: $5,74 \mu\text{g/L}$, MRM: $5,81 \mu\text{g/L}$), kitűnő, 0,47 RSD%-os szórással. Az etinilösztradiol és az ösztriol esetében, az FS adatgyűjtés tömegspektrumai nem tették lehetővé az azonosítást, és bár a MIM kromatogramok csúcsai is elfogadható S/N viszonyúak (10.b. ábra: FS: 25, MIM: 38, MRM: 50; 10.c. ábra: FS: 30, MIM: 35, MRM: 92), csak az MRM bizonyult a választandó módszernek. Az ösztradiol esetében, a spektrumok minősége és a számított értékek alapján (10.c. ábra: MIM: 2A, 2B spektrumok, $0,141 \mu\text{g/L}$; MRM: 3A, 3B spektrumok, $0,127 \mu\text{g/L}$), a MIM is elfogadható módszer, az etinilösztradiol esetében csak az MRM módszer megbízható (10.b. ábra: MIM: 2A, 2B spektrumok, $0,133 \mu\text{g/L}$; MRM: 3A, 3B spektrumok, $0,016 \mu\text{g/L}$): a MIM adatgyűjtéssel mért érték többszörös pozitív hibát mutatott.

Az összehasonlított adatok alapján (13. táblázat, 10.a.-c. ábrák) kijelenthető, hogy az MRM módszer használata az FS vagy MIM adatgyűjtéssel szemben jelentősen érzékenyebb, szelektívebb, és megbízhatóbb. Az MRM eljárás MIM-mel szembeni előnyeit a szennyvízminták β -ösztradiol és etinilösztradiol tartalmának túlbecslése mutatja. A kérdéses vegyületek MIM és MRM módszerrel mért koncentrációinak arányát összevetve, jelentős pozitív hibára derül fény: a β -ösztradiol esetében ez 156% és 1325% (13. táblázat, Telki, novemberi kifolyó és szeptemberi befolyó szennyvíz), az etinilösztradiolnál 582% és 831% között (13. táblázat, Telki, szeptemberi és novemberi



13. táblázat Szennyvízmintákban meghatározott szteroid tartalom összehasonlítása, az alkalmazott GC-MS adatgyűjtési módszer (FS, MIM, MRM) függvényében, trimetilszilil-(oxim)-éter/észter származékként.

13.a. táblázat 3 hónap adatai 2010-ből

Vegyület	Szennyvízben azonosított szteroidok, $\mu\text{g/L}$ (RSD%)*									
	Adatgyűjtés	Dél-Pest, június			Telki, július			Telki, szeptember		
		Bef.	Kif.		Bef.	Kif.		Bef.	Kif.	
Androszteron	FS			2,17 (2,48)			4,28 (1,68)			
	MIM	<LOQ	<LOQ	2,50 (1,56)		<LOQ	4,32 (3,70)		<LOQ	
	MRM			2,32 (1,99)	{4,86}		3,99 (1,81)	{3,26}		
β -Ösztra-diol	FS	<LOQ	<LOQ	<LOQ		<LOQ	<LOQ		<LOQ	
	MIM	0,324 (4,79)	0,306 (1,22)				0,159 (14)			
	MRM	0,027 (1,65)	<LOQ	0,016 (13)		0,0075 (21)	0,012 (9,5)			
Transz-androszteron	FS			4,00 (5,5)			2,91 (1,11)			
	MIM	<LOQ	<LOQ	3,21 (6,2)		<LOQ	2,59 (0,68)		<LOQ	
	MRM			4,00 (7,8)	{9,4}		2,57 (1,54)	{5,5}		
Etinil-öszttra-diol	FS			<LOQ		<LOQ	<LOQ		<LOQ	
	MIM	<LOQ	<LOQ				0,885 (4,93)			
	MRM						0,152 (13)			
Ösztriol	FS	<LOQ		<LOQ		<LOQ	<LOQ		<LOQ	
	MIM	0,102 (11,2)	{9,1}	<LOQ	0,510 (3,29)	{13}	0,508 (11,4)		<LOQ	
	MRM	0,085 (1,01)			0,388 (0,26)		0,449 (8,0)	{6,2}		
Kopro-sztanol	FS	45,0 (6,2)	{7,4}	6,40 (4,34)	{10}	44,0 (1,96)	<LOQ	{2,59}	20,5 (2,72)	4,16 (5,5)
	MIM	47,9 (1,88)		5,53 (1,22)		39,4 (1,08)	0,620 (5,6)		20,3 (3,59)	4,17 (2,63)
	MRM	39,1 (0,68)		4,69 (5,44)		36,6 (2,42)	0,653 (6,8)		19,3 (6,2)	4,06 (5,7)
Kole-szterin	FS	6,70 (4,80)	{5,2}	0,369(2,14)	{8,3}	41,0 (5,6)	0,790 (13)	{5,3}	15,0 (5,7)	2,88 (7,0)
	MIM	7,53 (1,75)		0,299(2,09)		40,4 (1,77)	0,743 (5,9)		15,1 (4,40)	2,47 (5,07)
	MRM	7,57 (3,06)		0,357(3,84)		43,0 (1,58)	0,678 (3,98)		15,1 (1,88)	2,70 (3,03)
Lito-kólsav	FS	33,2 (7,9)				108 (2,02)			33,4 (2,72)	
	MIM	22,5 (1,76)	{13}	<LOQ		88,2 (2,89)	<LOQ		24,9 (2,16)	<LOQ
	MRM	28,9 (4,61)				113 (2,72)			34,8 (2,53)	
Sztigma-szterol	FS	8,40 (4,94)	{4,73}	1,21 (5,6)	{5,6}	<LOQ	<LOQ		<LOQ	<LOQ
	MIM	8,32 (0,80)		1,04 (0,40)						
	MRM	7,50 (3,38)		1,10 (5,5)						
Kólsav	FS	61,1 (5,8)	{2,11}	7,62 (4,17)	{2,41}	74,5 (6,3)	0,782 (4,00)	{7,1}	73,8 (1,74)	3,56
	MIM	62,9 (9,8)		7,3 (2,68)		71,0 (0,66)	0,642 (16)		79,0 (2,60)	<LOQ
	MRM	59,1 (5,2)		7,8 (5,2)		64,4 (4,05)	0,695 (2,19)		72,2 (0,79)	
Keno-deoxi-kólsav	FS	43,3 (7,2)	{11,3}	10,3 (4,66)	{11}	39,0 (0,69)	0,610 (7,6)	{13}	23,0 (3,51)	
	MIM	36,0 (10,5)		7,8 (1,58)		48,6 (1,53)	0,490(2,04)		26,7 (5,9)	<LOQ
	MRM	31,8(0,50)		8,4 (8,8)		40,8 (2,16)	0,424 (4,86)		21,9 (1,15)	
β -Szito-szterol	FS	7,00 (5,6)	{3,16}	<LOQ	{11}	<LOQ	<LOQ		11,0 (7,6)	4,38 (12)
	MIM	6,50 (9,4)		0,455 (13)					10,3 (7,4)	3,52 (6,7)
	MRM	6,97 (1,17)		0,567 (7,4)					7,8 (5,1)	3,33 (5,5)
Urzo-deoxi-kólsav	FS	49,0 (11)	{8,8}	0,036 (7,7)	{1,37}	41,3 (4,36)	<LOQ		47,2 (1,34)	
	MIM	47,1 (27)		0,037 (21)		45,8 (12)	<LOQ		56,7 (1,98)	<LOQ
	MRM	39,1 (11)		<LOQ		45,7 (11)	0,318 (1,83)		56,1 (1,45)	
3-OH-7-ketoko-lánsav	FS								29,6 (2,72)	
	MIM	<LOQ	<LOQ	<LOQ		<LOQ	<LOQ		28,6 (0,27)	
	MRM								27,8 (5,0)	

Jelölések: a rövidítések jegyzékében, a 12. táblázatban, valamint * (RSD%) = két párhuzamos minta-előkészítés, egyenként három injektálásból; * {RSD%} = a különböző adatgyűjtések alapján.

13. táblázat Szennyvízmintákban meghatározott szteroid tartalom összehasonlítása, az alkalmazott GC-MS adatgyűjtési módszer (FS, MIM, MRM) függvényében, trimetilszilil-(oxim)-éter/észter származékokként.

13.b. táblázat 2 hónap adatai 2010-ből és az egyes módszerekkel mért csúcsok S/N arányai

Vegyület	Szennyvízben azonosított szteroidok, $\mu\text{g/L}$ (RSD%)*						S/N arány		
	Adatgyűjtés	Telki, október		Telki, november		MIM/FS	MRM/MIM		
		Bef.	Kif.						
Androszteron	FS	6,9 (0,452)	{7,2}	<LOQ	0,760 (3,19)	{2,58}	<LOQ	1,5	1,4
	MIM	8,2 (2,25)			0,727 (0,78)				
	MRM	7,2 (4,87)			0,708 (1,35)				
β -Ösztrodiol	FS	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	2,0	-	-
	MIM	<LOQ	<LOQ	0,077 (3,57)	0,0039 (2,72)				
	MRM	0,017 (12,8)	0,0062 (11)	0,018 (1,54)	0,0025 (4,05)				
Transz-androszteron	FS	5,79 (3,39)	{0,47}	<LOQ	0,689 (13)	{9,4}	<LOQ	1,2	1,5
	MIM	5,74 (2,59)			0,666 (8,4)				
	MRM	5,81 (4,63)			0,636 (9,3)				
Etinil-ösztrodiol	FS	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	2,0	-	-
	MIM			0,133 (1,54)					
	MRM			0,016 (6,8)					
Ösztriol	FS	<LOQ	{10}	<LOQ	<LOQ	{5,2}	<LOQ	-	2,6
	MIM	0,337 (13,6)			0,141				
	MRM	0,275 (12,5)			0,127				
Koprosztanol	FS	50,0 (0,68)	{3,29}	3,75 (0,95)	45,1 (2,90)	{4,53}	3,62 (2,74)	10,7	2,0
	MIM	49,8 (0,53)		3,20 (5,6)	42,2 (0,82)		3,61 (3,47)		
	MRM	46,3 (1,06)		4,01 (0,63)	39,4 (3,29)		3,43 (5,47)		
Koleszterin	FS	26,3 (0,54)	{2,08}	2,81 (2,87)	29,6 (0,72)	{2,48}	2,38 (2,13)	5,0	2,6
	MIM	26,2 (3,84)		2,42 (1,32)	28,8 (1,31)		2,22 (3,67)		
	MRM	27,5 (0,95)		2,65 (1,59)	27,6 (1,07)		1,88 (0,25)		
Lito-kólsav	FS	23,3 (9,4)	{10}	<LOQ	29,8 (0,73)	{9,3}	<LOQ	1,3	2,2
	MIM	18,9 (13)			24,2 (2,68)				
	MRM	24,9 (4,30)			30,4 (0,91)				
Sztigma-szterol	FS	6,28 (14)	{5,9}	<LOQ	4,46 (0,14)	{4,89}	<LOQ	2,4	1,7
	MIM	6,07 (4,72)			4,31 (0,26)		0,453 (5,8)		
	MRM	7,0 (3,71)			3,92 (0,13)		0,374 (10)		
Kólsav	FS	45,7 (0,47)	{2,60}	<LOQ	18,8 (3,83)	{2,94}	0,194 (15)	2,5	1,6
	MIM	44,9 (0,34)			20,4 (1,94)		0,146 (8,6)		
	MRM	42,7 (1,96)			19,8 (1,95)		0,173 (2,74)		
Keno-deoxi-kólsav	FS	16,8 (4,04)	{9,4}	<LOQ	6,9 (7,6)	{2,86}	<LOQ	2,1	1,1
	MIM	17,6 (2,91)			7,3 (0,02)				
	MRM	13,8 (11)			6,8 (2,83)				
β -Szitoszterol	FS	45,9 (7,3)	{3,52}	6,36 (20,0)	24,7 (3,98)	{9,5}	3,45 (4,67)	6,2	1,1
	MIM	44,9 (3,26)		4,74 (7,3)	24,9 (5,3)		2,85 (9,6)		
	MRM	41,9 (4,34)		4,62 (0,41)	19,8 (17)		2,62 (3,34)		
Urzo-deoxi-kólsav	FS	31,5 (2,43)	{4,12}	<LOQ	5,0 (7,2)	{2,66}	<LOQ	3,0	2,3
	MIM	29,0 (2,43)			5,3 (2,53)				
	MRM	28,5 (2,70)			4,99 (2,59)				
3-OH-7-ketokólsav	FS	21,6 (1,19)	{9,2}	<LOQ	3,64 (0,62)	{8,4}	<LOQ	3,7	2,7
	MIM	19,6 (16)			3,93 (0,11)				
	MRM	16,6 (5,2)			3,11 (1,14)				

Jelölések: a rövidítések jegyzékében, a 12. táblázatban, valamint * (RSD%) = két párhuzamos minta-előkészítés, egyenként három injektálásból; * {RSD%} = a különböző adatgyűjtések alapján.

befolyó szennyvíz) alakult. Az etinilösztadiol FS és MIM adatgyűjtési technikákkal meghatározott koncentrációjának, egy ismeretlen vegyület koelúciója miatt keletkező, pozitív hibája ismert jelenség [4,75].

A szennyvíztisztítás hatásfoka, a korábbi tapasztalatokhoz hasonlóan (4.4. fejezet), nagy volt: az elemzett szennyezők mennyisége teljes eltávolításra került vagy jelentősen csökkent.

A bemutatott példák, valamint a 13. táblázat adatai alapján egyértelmű, hogy az igen kicsi, néhány ng/L-es koncentrációban jelen lévő ösztrogének kivételével (β -ösztadiol, etinilösztadiol, ösztriol), a legtöbb szennyező meghatározása mindhárom detektálási eljárással lehetséges, de a megbízható azonosítás és mennyiségi meghatározás érdekében az MRM technika a legelőnyösebb.

5.4.4. Az SPE extrakció hatékonyságának és az extraktumok stabilitásának vizsgálata

AZ SPE extrakció megfelelő hatékonyságát a korábban elvégzett visszanyeréses vizsgálatokon kívül (4.2.5. fejezet) azonos szennyvízminták különböző térfogatainak elemzésével is igazoltam. A különböző térfogathoz, frissen, és 6 nappal később, mindhárom adatgyűjtési technikával felvett mérések eredményeit a 14. táblázatban összesítem.

Azért tartottam fontosnak az SPE extrakció ilyen jellegű vizsgálatát, mert álláspontom szerint a közvetlenül az extrakció előtt, törzsoldatokkal a mintákhoz adott szteroid vegyületek nem alakíthatnak ki a mintákban eredetileg is megtalálható anyagokkal azonos jellegű és mértékű kölcsönhatásokat. Úgy gondoltam, az SPE dúsítás hatékonyságát akkor bizonyítottam kellőképpen, ha a rutinszerűen alkalmazott mintatérfogatnál kisebb mennyiségből is sikerült reprodukálható módon, azonos szennyező-koncentrációkat meghatároznom. A Telkiben működő kísérleti szennyvíztisztító telep 2010 novemberében feldolgozott befolyó mintájának 250 mL és 500 mL térfogatú részleteit is elemeztem, közvetlenül az extrakció és a származékkészítés után, valamint a hűtőben tárolt, származékká alakított, 500 mL-es minták törzsoldatainak mérését 6 nap elteltével, frissen készített hígításokból ismételttem. Ezekkel a mérésekkel nemcsak a dúsítás hatékonyságát, hanem a származékká alakított és hűtőben tárolt extraktumok stabilitását is igazoltam.

14. táblázat. A 2010. novemberi Telki befolyó szennyvíz különböző térfogataiból (250 mL, 500 mL) meghatározott szteroidok és kólsavak, mintaelőkészítés után közvetlenül, és hat nappal később mérve: TMS (oxim) éter/észter származékaikként, eltérő adatgyűjtési technikákkal (FS, MIM, MRM)

Vegyület	Telki, November, befolyó szennyvíz, $\mu\text{g/L}$ (RSD%)					
	mL*	FS	MIM	MRM		
Androszteron	250	0,782(1,73)	0,642 (2,15)	0,669 (3,46)	{2,99}	{10,5}
	500	0,760 (3,19)	0,727 (0,78)	0,708 (1,35)		
	+6 nap	0,824 (1,62)	0,860 (0,72)	0,806 (5,6)		
β -Ösztradiol	250	<LOQ	0,089 (6,0)	0,017 (8,4)	-	{6,9}
	500	<LOQ	0,077 (3,57)	0,018 (1,54)		
	+6 nap	<LOQ	0,076 (5,80)	0,011 (14)		
Transzandroszteron	250	0,691 (15)	0,512 (0,68)	0,694 (1,43)	{2,22}	{12,2}
	500	0,689 (13)	0,666 (8,4)	0,636 (9,3)		
	+6 nap	0,725 (5,1)	0,702 (2,10)	0,612 (6,8)		
Etinil- β -ösztradiol	250	<LOQ	0,143 (0,41)	0,017 (22)	-	{2,92}
	500	<LOQ	0,133 (1,54)	0,016 (6,8)		
	+6 nap	<LOQ	0,135 (14)	0,017 (1,44)		
Ösztriol	250	<LOQ	0,186 (6,1)	0,128 (10,0)	-	{10,8}
	500	<LOQ	0,141 (11,3)	0,127 (0,076)		
	+6 nap	<LOQ	0,178 (2,23)	0,148 (5,2)		
Koprosztanol	250	50,6 (0,17)	48,8 (2,21)	43,7 (3,03)	{3,97}	{6,2}
	500	45,1 (2,90)	42,2 (0,82)	39,4 (3,29)		
	+6 nap	47,5 (0,91)	48,8 (0,15)	43,6 (4,27)		
Koleszterin	250	33,8 (0,68)	47,2 (0,46)	42,8 (7,16)	{4,61}	{6,9}
	500	29,6 (0,72)	28,8 (1,31)	27,6 (1,07)		
	+6 nap	32,0 (1,23)	38,9 (1,43)	34,0 (1,44)		
Litokólsav	250	34,3 (1,32)	30,0 (1,24)	33,8 (0,052)	{5,8}	{13,4}
	500	29,8 (0,73)	24,2 (2,68)	30,4 (0,91)		
	+6 nap	30,6 (1,33)	20,7 (6,8)	28,0 (7,8)		
Sztigmaszterol	250	4,67 (4,02)	5,26 (4,32)	3,92 (11,7)	{2,31}	{10,8}
	500	4,46 (0,14)	4,31 (0,26)	3,92 (0,13)		
	+6 nap	4,71 (5,4)	4,00 (0,100)	4,14 (6,2)		
Kólsav	250	18,2 (0,090)	20,0 (1,00)	21,6 (0,77)	{2,36}	{4,88}
	500	18,8 (3,83)	20,4 (1,94)	19,8 (1,95)		
	+6 nap	19,5 (4,42)	22,5 (4,42)	21,4 (0,187)		
Kenodeoxi-kólsav	250	6,9 (6,1)	7,5 (0,18)	6,5 (0,078)	{0,643}	{5,8}
	500	6,9 (7,6)	7,3 (0,021)	6,8 (2,83)		
	+6 nap	7,0 (1,81)	8,4 (1,32)	7,8 (2,78)		
β -Szitoszterol	250	34,1 (2,27)	3,35 (0,25)	3,40 (1,45)	{16,3}	{8,5}
	500	24,7 (3,98)	2,85 (9,6)	2,62 (3,34)		
	+6 nap	23,4 (0,28)	2,72 (1,71)	2,75 (0,15)		
Úrzodeoxi-kólsav	250	4,60 (8,8)	4,88 (6,2)	4,59 (5,4)	{2,87}	{4,71}
	500	5,0 (7,2)	5,3 (2,53)	4,99 (2,59)		
	+6 nap	4,82 (3,39)	4,67 (1,20)	3,79 (1,42)		
3-Hidroxi-7-keto-kolánsav	250	4,8 (0,17)	3,50 (11,4)	2,89 (0,020)	{17,5}	{8,9}
	500	3,64 (0,62)	3,93 (0,11)	3,11 (1,14)		
	+6 nap	2,97 (3,53)	4,51 (9,7)	4,37 (13,6)		

Jelölések: * = 250 mL, 500 mL szennyvíz és az 500 mL-es minták 6 nappal később, friss hígításból megismételt elemzésének adatai; az 500 mL-hez tartozó adatok azonosak a 13. táblázatban szereplőkkel.

A 4.4.3. fejezetben leírtnak megfelelően, a néhány ng/L mennyiségben azonosított ösztrogének esetében (β -ösztradiol, etinilösztadiol) megfigyelhető, hogy FS adatgyűjtéssel a meghatározásuk sikertelen, a MIM-mel mért érték pedig jelentősen nagyobb az MRM módszerrel meghatározotthoz képest. A korábban leírt és jellemzett SPE extrakciós módszer (3.4.4.1. és 4.2.5. fejezetek) hatékonysága, és a hűtőben tárolt törzsoldatok eltarthatósága megfelelő volt: a 250 mL és 500 mL mintatérfogatokból, származékkészítés után közvetlenül elemzett, valamint az 500 mL-ből, 6 nappal később ismételt mérések átlagos relatív hibája 2,22 RSD% (transzandroszteron, FS) és 18 RSD% (β -ösztadiol, MRM) között változott.

5.5. A szteroid vegyületek és kólsavak elemzése Duna- és szennyvízminták oldott és szuszpendált fázisaiban

Miután sikerrel beillesztettem a természetes és mesterséges szteroid vegyületek változatos képviselőit a korábban kidolgozott, sok összetevőt elemző rendszerbe [17-20], és a szelektív detektálási módszerek fejlesztése lehetővé tette a néhány ng/L-es mennyiségű összetevők azonosítását is, céloom a Duna-víz szteroid tartalmának elemzése volt.

A sorozatos vízminta-elemzések során felvetődött, hogy a rossz vízoldhatóságú szteroidok (4. táblázat) megoszlanak a vízminták oldott és szuszpendált fázisai között. Ebben az esetben a korábban alkalmazott, és a szakirodalomban általános (1.4.2. fejezet), gyakorlat szerint, a vízminták előkészítésekor szűrővel elkülönített, szilárd anyagok szteroid tartalma nem került elemzésre.

A további szenny- és Duna-vízminták elemzése mellett, célul tűztem ki egy egyszerű, kis munka- és költségigényű extrakciós módszer kidolgozását, amely lehetővé teszi a vizsgált vízminták lebegőanyagaihoz kötődött szteroidok meghatározását is.

5.5.1. Az ultrahanggal segített extrakció hatékonyságának vizsgálata

Abban a néhány tanulmányban, amelyek a vízminták szuszpendált szilárd anyagait is elemezték, az alkalmazott dúsítási eljárás validálása vagy elmaradt [107,108], vagy az elkülönített szilárd fázishoz hozzáadott, a mintákban megtalálható koncentrációknál jóval nagyobb mennyiségű standard anyagok hozzáadásával történt [78,106]. Ha figyelembe vesszük a megoszlás kialakulásához rendelkezésre álló, jóval

rövidebb időt, az oldott és szilárd fázisok megváltozott arányait, az egyéb oldott anyagok és a természetes vizekben élő mikroorganizmusok lehetséges szerepét, stb., akkor az elkülönített és kiszáritott szuszpendált fázishoz, közvetlenül az extrakciót megelőzően hozzáadott standard anyagok kialakított kölcsönhatásai nem jellemezhetik megfelelően a vízmintákban természetes módon jelen lévő szennyezőkét.

Az ismertett okok miatt, az ultrahanggal segített extrakció hatékonyságát, a megszokott standard addíciós módszer helyett, több ízben: egy befolyó szennyvízminta szűrőpapírjának kivonása során, az egymást követő oldószer-részletek elemzésével (15. táblázat), valamint azonos szenny- és Duna-víz minták különböző térfogataiból kiszűrt szilárd anyagok extrakciójával (4.5.2. és 4.5.3. fejezetek, 16. és 17. táblázatok) igazoltam.

A 2010 júniusában mintavételezett, dél-pesti 0,5L befolyó szennyvíz szűréséhez felhasznált szűrőpapír, a 3.4.4.2. fejezetben leírtak szerinti extrakciója során, összegyűjtött oldószerfrakciók szteroid tartalma a 15. táblázatban található.

15. táblázat 0,5L befolyó szennyvíz (Dél-Pest, 2010. június) szuszpendált fázisának extrakciója során elkülönített oldószerfrakciókban mért szteroid-koncentrációk.

↓ Szteroidok Oldószeranyag* frakciók →	Egymást követő oldószer frakciókban meghatározott szteroidok (µg/L)			
	1. +40 mL	2. +20 mL	2. +20 mL	Össz.
β-Ösztradiol	0,0322 (1,13) {100}	<LOQ	<LOQ	0,0322 (1,13)
Koprosztanol	454 (1,33) {93}	312 (0,421) {6,5}	0,458 (3,15) {0,094}	488 (1,30)
Koleszterin	137 (3,13) {92}	9,1 (2,40) {6,9}	1,32 (5,9) {0,898}	147 (1,06)
Sztigmaszterol	44,1 (2,99) {91}	3,73 (7,3) {7,7}	0,717 (7,3) {1,48}	48,5 (3,69)
β-Szitoszterol	69,2 (5,2) {91}	5,78 (7,5) {7,6}	1,19 (2,07) {1,56}	76,0 (1,00)

Jelölések: () = 2 párhuzamos mintaelőkészítésből, 3-3 injektálás RSD%-a; * = hexán:etil-acetát:metanol 1:1:2, azonos az SPE extrakcióhoz használt eleggyel; {} = az egyes frakciókban meghatározott szteroidok mennyisége a teljes szteroid tartalom százalékában.

Az első, 40 mL-es oldószer-részlet a teljes szteroid tartalom 91-100%-át; a második, 20 mL az egyes vegyületek 6,5-7,7%-át, míg a végső, 20 mL oldószer az egyes szteroidok teljes mennyiségének csupán 0,898-1,56%-át tartalmazta.

A 2010. júliusi, telki befolyó szennyvíz elemzésekor a 0,5 L és 1,0 L mintatérfogatból elkülönített lebegőanyagot is elemeztem. A különböző mennyiségű vízmintákból mért szteroidok koncentrációja 1,59 (koprosztanol) -5,8 (sztigmaszterol) RSD% szórást mutatott (16. táblázat). Hasonlóan, a 2011. augusztusi 3L és 5L, és a 2012. januári 5L és 10L térfogatú Duna-vízminták részleteiből kiszűrt, szilárd lebegőanyagokat is extraháltam (17. táblázat). A folyóvízminták eltérő térfogatú részleteinek lebegőanyagából meghatározott szteroidok mennyiségei 0,92 RSD% (β -szitoszterol, 2012. január) - 6,0 RSD% (koleszterin, 2011. augusztus) eltérést mutattak.

A különböző eredetű vízminták szuszpendált szilárd lebegőanyagából, két párhuzamos extrakcióval, mintánként 3-3 injektálással meghatározott szteroidok koncentrációjának reprodukálhatósága szennyvízminták esetében (16. táblázat) 1,00 RSD% (β -szitoszterol) és 12,0 RSD% (koleszterin), Duna-vízminták esetében pedig (17. táblázat) 0,87 RSD% (koleszterin) és 18 RSD% (koprosztanol) között változott.

A 2012. januári Duna-vízminták extraktumait közvetlenül származékkészítés után (17. táblázat), és egy héttel később (a részletes adatokat nem tüntettem fel), GC-MS/MS (MRM) módszerrel mértem. A meghatározott szteroidok: β -ösztadiol, etinilösztadiol, koprosztanol, koleszterin, sztigmaszterol, β -szitoszterol, mért koncentrációinak eltérése, a felsorolás sorrendjében: 4,61 RSD%; 2,31 RSD%, 7,8 RSD%, 0,621 RSD%, 12,5 RSD%; 19 RSD% és 3,60 RSD% volt.

A bemutatott adatok szerint a kidolgozott, egyszerű, kis munka- és költségigényű, extrakciós eljárás alkalmas a szennyvízminták üvegszűrőpapírral elkülönített szilárd fázisában található szteroid vegyületek kvantitatív kivonására.

5.5.2. A szennyvízmintákban szuszpendált szteroidok elemzése

Öt hónap alatt három be- és kifolyó szennyvízminta szilárd lebegőanyagát elemeztem: a mért szteroid tartalmak a 16. táblázatban olvashatóak.

Már a minták beérkezésekor szembetűnő volt, hogy a szennyvíztisztítás során jelentősen csökkent a szennyvíz szilárd lebegőanyag tartalma: (16. táblázat első sorának adatai): a kifolyó szennyvízből kiszűrt szilárd anyagok tömege a befolyó szennyvízből elkülöníthető mennyiségnél 96-99%-kal kevesebb volt.

A szennyvízben található természetes hormonokat (androszteronok, ösztriol), a vizekben talált nagy androszteron-koncentráció (2,32-7,2 $\mu\text{g/L}$ androszteron, 4,00-5,81 $\mu\text{g/L}$ transzandroszteron) mellett is, csak a minták oldat részéből sikerült mérni, az androszteronok szteroidok közötti jobb vízoldhatóságának megfelelően (4. táblázat).

16. táblázat Be- (Bef.) és kifolyó (Kif.) szennyvízminták (0,5L) oldott (Old.) és szuszpendált szilárd (Szuszp.) fázisaiban meghatározott szteroidok és kólsavak, trimetilszilil-(oxim)-éter/észter származékként, GC-MS/MS (MRM) méréssel

Vegyület	Szennyvízmintákban mért szteroidok és kólsavak: $\mu\text{g/L}$														
	Dél-Pest, 2010. június				Telki, 2010. július					Telki, 2010. október					
	Bef.		Kif.		Bef.			Kif.		Bef.		Kif.			
	Old.	Szuszp.	Old.	Szuszp.	Old.	Szuszp.**			Old.	Szuszp.	Old.	Szuszp.	Old.	Szuszp.	
					0,5L	1,0L	Átl.								
Szuszp. (mg/L)*	91 (1,56)		2,98 (6,5)		229 {3,70}					2,15 (1,87)		242 (4,75)		9,6 (7,4)	
Androszteron	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,32 (1,99)	<LOQ			<LOQ	<LOQ	7,2 (4,87)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
β -Ösztadiol	0,0273 (1,65)	0,0322 (1,13)	<LOQ	<LOQ	0,0164 (13)	0,0089 (6,2)	0,0081 (3,16)	0,0085 {4,71}	0,0075 (21)	0,0204 (1,05)	0,017 (12,8)	0,0066 (6,5)	0,0062 (11)	0,0049 (3,21)	
Transz-androszteron	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4,00 (7,8)	<LOQ			<LOQ	<LOQ	5,81 (4,63)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Ösztriol	0,085 (1,01)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,388 (0,26)	<LOQ			<LOQ	<LOQ	0,275 (12,5)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Koprosztanol	39,1 (0,68)	488 (1,30)	4,69 (5,44)	9,3 (3,36)	36,6 (2,42)	22,4 (0,43)	21,7 (1,58)	22,1 {1,59}	0,653 (6,8)	36,2 (1,73)	46,3 (1,06)	28,3 (4,49)	4,01 (0,63)	18,6 (2,96)	
Koleszterin	7,6 (3,06)	147 (1,06)	0,357 (3,84)	0,791 (3,54)	43,0 (1,58)	412 (2,98)	442 (4,62)	427 {3,51}	0,678 (3,98)	22,4 (4,72)	27,5 (0,95)	95 (12,0)	2,65 (1,59)	10,3 (1,93)	
Litokólsav	28,9 (4,61)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	113 (2,72)	<LOQ			<LOQ	<LOQ	24,9 (4,30)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Sztigma-szterol	7,50 (3,38)	48,5 (3,69)	1,10 (5,5)	0,173 (11)	<LOQ	11,5 (5,5)	12,9 (3,27)	12,2 {5,8}	<LOQ	8,80 (1,54)	7,00 (3,71)	39,5 (5,6)	<LOQ	2,62 (0,83)	
Kólsav	59,1 (5,2)	<LOQ	7,8 (5,2)	<LOQ	64,4 (4,05)	<LOQ			0,695 (2,19)	<LOQ	42,7 (1,96)	LOQ	<LOQ	<LOQ	
Kenodeoxi-kólsav	31,8 (0,50)	<LOQ	8,4 (8,8)	<LOQ	40,8 (2,16)	<LOQ			0,424 (4,86)	<LOQ	13,8 (11)	LOQ	<LOQ	<LOQ	
β -Sztoszterol	7,0 (1,17)	76,0 (1,00)	0,567 (7,4)	0,415 (3,63)	LOQ	<LOQ			LOQ	<LOQ	41,9 (4,34)	130 (1,14)	4,62 (0,41)	9,2 (3,59)	
Urzodeoxi-kólsav	39,1 (11)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	45,7 (11)	<LOQ			0,318 (1,83)	<LOQ	28,5 (2,70)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
3-hidroxi-7-ketokolánsav	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ			<LOQ	<LOQ	16,6 (5,2)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	

Jelölések: Szuszp.* = összes szuszpendált szilárd lebegőanyag; () = 2x3 injektálás RSD%-a; {} = 0,5L és 1,0L mintatérfigatból végzett mérések RSD%-a; Szuszp.**: 0,5L; 1,0L; Átl.: azonos minta 0,5L és 1,0L térfogatának szilárd lebegőanyagából meghatározott koncentrációk és átlaguk; Megjegyzés: a mérések a 375 μL származékká alakított törzsoldat 2-10-szeres hígításaiból készültek.

A kólsavakat (litokólsav, kólsav, kenodeoxikólsav, urzodeoxikólsav, 3-hidroxi-7-ketokolánsav) csak a szennyvízminták oldott fázisában mértem. Viselkedésük savas karakterükkel magyarázható: a vízminták semleges-enyhén lúgos kémhatásúak (pH 7-8)

voltak, míg a kólsavak enyhén savas karakterű vegyületek: $pK_a < 6$ [18], disszociációjuk fokozza oldhatóságukat.

A szennyvízmintákból kiszűrt szilárd lebegőanyagok elemzése felülmúlta korábbi feltételezésimet: a szuszpendált szilárd anyagokból meghatározott szteroidok mennyisége sok esetben meghaladta a hozzájuk tartozó vízmintákban mérhető koncentrációkat (16. táblázat): még a kifolyó szennyvizek kiszűrt anyagai is széles koncentrációtartományban tartalmaztak különböző szteroidokat. A természetes ösztrogén β -ösztradiol kisebb 0,0049-0,0322 $\mu\text{g/L}$, míg a fekális- és fitoszterolok jóval nagyobb mennyiségűek voltak (koprosztanol 9,3-488 $\mu\text{g/L}$, koleszterin 0,79-427 $\mu\text{g/L}$, sztigmaszterol 0,173-48,5 $\mu\text{g/L}$, β -szitoszterol 0,415-130 $\mu\text{g/L}$).

5.5.3. A Duna-víz minták oldott, és szuszpendált szilárd fázisaiban mért szteroidok

A Duna-víz szteroid tartalmának elemzéséhez egy év, azaz 12 hónap alatt 4 mintavétel történt. A vizsgálatok összesített eredményeit a 17. táblázatban foglaltam össze.

A Duna vízében a szuszpendált lebegőanyag-tartalom a kifolyó szennyvizével azonos nagyságrendű volt: 5,7-25,6 mg/L között változott.

A vízminták oldott fázisában koprosztanolt, koleszterint, β -szitoszterolt minden esetben, β -ösztradiolt és kólsavat két, sztigmaszterolt egyetlen alkalommal sikerült mérni. Koncentrációik 0,330-0,449 $\mu\text{g/L}$ (β -ösztradiol), 1,14-1,16 $\mu\text{g/L}$ (etinilösztadiol), 18,6-42,1 $\mu\text{g/L}$ (koprosztanol), 88-170 $\mu\text{g/L}$ (koleszterin), 23,3 $\mu\text{g/L}$ (sztigmaszterol), 8,1-128 $\mu\text{g/L}$ (kólsav) és 128-379 $\mu\text{g/L}$ (β -szitoszterol) voltak.

A Duna vízében azonosított szteroidok mennyiségei nemzetközi összehasonlításban azonos nagyságrendűek a más európai országok természetes vizeiben mért szteroid-koncentrációkkal, és jóval a délkelet-ázsiai területeken mértek alatt maradnak (1.4. fejezet, 1.b. táblázat).

A szilárd lebegőanyagok kivonataiban koprosztanolt, koleszterint és β -szitoszterolt valamennyi esetben, etinilösztadiolt és sztigmaszterolt négy esetből háromban mértem. A szilárd anyagokban mért koncentrációk a legtöbbször összemérhetőek, vagy nagyobbak voltak az oldott fázisban mértekkel: 0,352-0,461 $\mu\text{g/L}$

(etinilösztadiol), 218-263 µg/L (koprosztanol); 14,5-525 µg/L (koleszterin); 18,3-179 µg/L (sztigmaszterol) és 22,3-1780 µg/L (β-szitoszterol).

17. táblázat Duna-vízminták oldott (Old.) és szuszpendált szilárd (Szuszp.) fázisaiban meghatározott szteroidok és kólsavak, trimetilszilil-(oxim)-éter/észter származékokként, GC-MS/MS (MRM) méréssel

Vegyület	Duna-vízmintákban meghatározott szteroidok és kólsavak (ng/L)											
	2011. február		2011. március		2011. augusztus				2012. január			
	Old. 3L	Szuszp. 3L	Old. 3L	Szuszp. 3L	Old. 3L	Szuszp.**			Old. 3L	Szuszp.**		
					3L	5L	Átl.		5L	10L	Átl.	
Szuszp. (mg/L)*	5,7 (1,63)		8,6 (0,65)		10,6 {5,7}				25,6 {2,15}			
β-Ösztadiol	0,449 (7,3)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,728 (5,2)	<LOQ			0,330 (6,4)	<LOQ		
Etinilösztadiol	1,16 (12)	0,352 (2,08)	<LOQ	0,461 (5,3)	<LO Q	<LOQ			1,14 (6,3)	0,390 (6,5)	0,409 (9,6)	0,399 {2,28}
Koprosztanol	42,1 (8,4)	218 (18)	28,8 (13,4)	254 (6,5)	36,1 (4,91)	101 (4,70)	99 (7,15)	100 {1,00}	18,6 (9,4)	260 (5,3)	266 (5,3)	263 {1,10}
Koleszterin	96 (9,2)	106 (0,87)	105 (9,0)	48,2 (11)	170 (4,50)	15,6 (7,5)	13,9 (7,3)	14,5 {6,0}	88 (8,7)	516 (5,31)	534 (4,70)	525 {1,72}
Sztigmaszterol	<LOQ	18,3 (9,5)	<LOQ	45,1 (8,2)	<LOQ	<LOQ			23,3 (7,1)	171 (2,32)	188 (1,69)	179 {4,65}
Kólsav	19,2 (16,4)	<LOQ	128 (13,7)	<LOQ	<LOQ	<LOQ			8,1 (8,5)	<LOQ		
β-Szitoszterol	317 (10)	255 (3,75)	379 (4,22)	463 (13)	128 (9,0)	23,1 (6,23)	21,5 (7,3)	22,3 {3,59}	260 (2,00)	1796 (12)	1764 (5,3)	1780 {0,92}

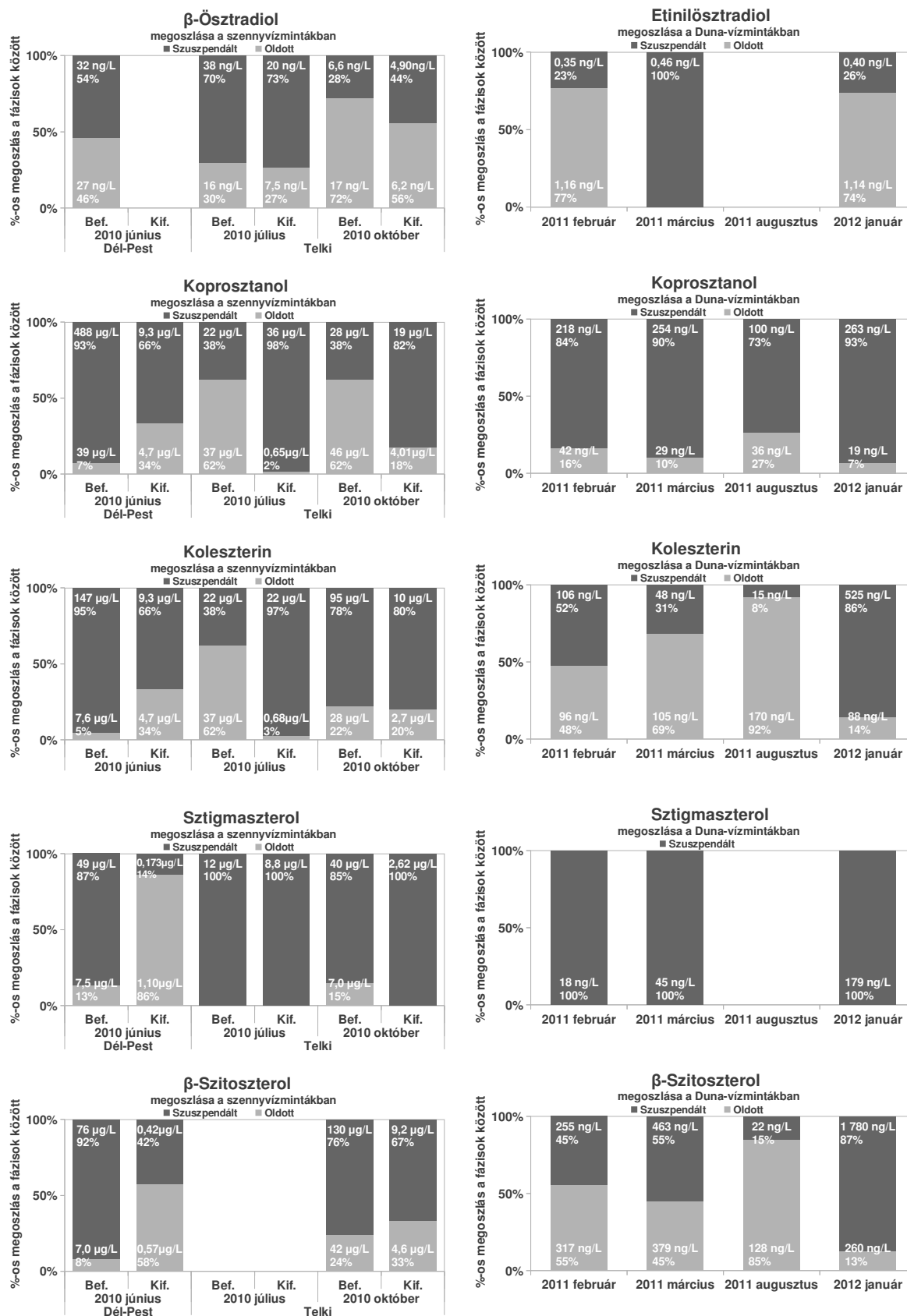
Jelölések: Szuszp.* = összes szuszpendált szilárd lebegőanyag; () = 2x3 injektálás RSD%-a; Szuszp.**: 3L, 5L, 10L; Átl.: azonos minta 3L és 5L, valamint 5L és 10L térfogatának szilárd lebegőanyagából meghatározott koncentrációk és átlaguk; Megjegyzés: a mérések a 375 µL származékká alakított törzsoldat 2-5-szörös hígításaiból készültek.

5.5.4. Szenny- és Duna-vízmintákban meghatározott szteroidok megoszlása az oldott és szuszpendált fázisok között

A szűréssel elkülönített szilárd lebegőanyagokból meghatározott szteroidok, a mintákban mért teljes mennyiséghez viszonyított százalékos arányát, a 11. ábra oszlopdigramjain szemléltetem.

A szteroidok százalékos megoszlása az oldott és szuszpendált szilárd fázisok között nagy változatosságot mutatott, és nem volt jellemző a minta típusára (befolyó-, kifolyó szennyvíz, Duna-víz). Kevés kivételtől eltekintve, általában a vizsgált vízminták szilárd lebegőanyaga tartalmazta az egyes szteroidokat nagyobb mennyiségben.

A szteroidok teljes mennyiségének százalékos megoszlása a vízminták szuszpendált szilárd lebegőanyagában, szennyvízminták esetében 28-54%



11. ábra Természetes és mesterséges szteroidok megoszlása szenny- és Duna-vízminták oldott és szuszpendált fázisai között: a mért koncentrációk µg/L vagy ng/L egységben feltüntetve (részletes adatok az egyes diagramokon, és a 16.-17. táblázatokban), a hasábkon jelzett %-os értékek az adott minták egyes fázisaiban mért koncentrációk arányát a teljes meghatározott mennyiségek %-ában mutatják.

(β -ösztadiol), 38-98% (koprosztanol), 69-95% (koleszterin), 85-100% sztigmaszterol, 42-92% (sztigmaszterol), és 42-92% (β -szitoszterol) között, míg a Duna-vízmintákban 23-100% (etinilösztadiol), 73-93% (koprosztanol), 8-86% (koleszterin), 88-100% (sztigmaszterol), 15-87% (β -szitoszterol) között változott.

A teljes szteroid mennyiség túlnyomó része (71% a szennyvízminták, és 64% a Duna-vízminták esetében), a jelen tanulmány szerint a szuszpendált szilárd anyagokban volt. Az egyes megoszlási adatok nagyfokú változatosságának okai lehetnek, korábbi tapasztalatok szerint, a szuszpendált szilárd szemcsék változatos mérete és összetétele, az egyes vízminták pillanatnyi tulajdonságai, más jelenlévő anyagok szorpciós folyamatai, stb. [108].

A tanulmány eredményeinek ismeretében bizonyos, hogy az olyan csekély vízdoldhatóságú vegyületek, mint a szteroidok, nyomnyi mennyiségeinek, vízmintákból végzett elemzése során, nem lehet figyelmen kívül hagyni (eldobni) a mintaelőkészítés során szűréssel elkülönített szilárd anyagokat, mert ezzel a teljes víz minta szteroid tartalmának jelentős része figyelmen kívül marad.

6. Megbeszélés

A növekvő gyógyszerfelhasználás következtében hatóanyagok széles spektruma kerül változatlan, vagy metabolit formában a városi szennyvízbe. Az általánosan elterjedt szennyvízkezelő eljárások nem alkalmasak a gyógyszervegyületek maradéktalan lebontására, így azok a felszíni vizekbe is bekerülnek. Ezen anyagok vízi környezetre gyakorolt, káros hatását tanulmányok sora igazolja, különösen igaz ez a szintetikus szteroidvegyületekre. A vízi ökoszisztéma és a természetes vizek, mint ivóvízbázisok védelme érdekében, szükséges olyan analitikai eljárások kidolgozása, melyek lehetővé teszik egy sor gyógyszerhatóanyag meghatározását különböző eredetű vízmintákból.

Célkitűzéseimnek megfelelően, a korábban kidolgozott, sok összetevőjű elemző rendszert, a szteroid vegyületek változatos csoportjainak számos képviselőjével bővítettem. Ezek a természetes androgének (androszteron, transzdehidroandroszteron, transzandroszteron, dihidrotesztoszteron, tesztoszteron, 4-androszten-3,17-dion), természetes ösztrogének (β -ösztradiol, ösztriol), mesterséges ösztrogének (mesztranol, etinilösztradiol), mesterséges progesztogének (noretiszteron, gesztoden, levonorgesztrel, etonorgesztrel, medroxiprogeszteron-acetát), a természetes progesztogén (progeszteron), fekális szterolok (koprosztanol, koleszterin), és fitoszterolok (sztigmaszterol, β -szitoszterol), voltak. A vizsgált vegyületek között szerepeltek ketocsoportú szteroid vegyületek is.

Az irodalom szerint, a ketoszteroidok ng/L nagyságrendben meghatározása a ketocsoport megfelelő származékkészítésével lehetséges. A vegyületek megfelelő elválasztása és meghatározása érdekében, a származékkészítés lépéseinek, így az alkalmazott reagensek (oximálás, különböző szililezőszerek) és a reakciókörülmények (idő, hőfok), az egyes összetevők válaszjelére gyakorolt hatását vizsgáltam.

A származékkészítési tanulmányhoz kapcsolódóan, a szteroid-trimetilszilil-oxim származékok tömegspektrometriás viselkedéséről fragmentumanalitikai tanulmányt készítettem. A molekulaszervezet és a keletkező SFI-k közötti összefüggéseket kutattam, hogy tapasztalataimat a vízminták ismeretlen összetevőinek azonosítása, és a szelektívebb, tandem tömegspektrometriás adatgyűjtési eljárások fejlesztésekor hasznosítsam.

Meghatároztam az egyes szteroidokhoz tartozó LOQ értékeket, és az SPE dúsítás hatásfokát standard oldattal hozzáadott kifolyó szennyvízminták extrakciójával vizsgáltam. A kidolgozott módszerrel, a 2009 decemberétől 2010 szeptemberéig tartó 10 hónapos időszakban két magyarországi szennyvíztisztító telep be- és kifolyó mintáit elemeztem.

A módszer szelektivitásának növelése érdekében, javaslatot tettem a vizsgált 20 szteroid és a velük egy szakaszon eluálódó kólsavak MIM és MRM adatgyűjtésére. A három vizsgált adatgyűjtési eljárás alkalmasságát öt összetartozó, be- és kifolyó szennyvízminta, párhuzamosan, mindhárom adatgyűjtési technikával (FS, MIM, MRM), elemzése alapján hasonlítottam össze.

Terveim között szerepelt a Duna vízének, és a vízminták lebegő szilárd anyag tartalmának vizsgálata is. Erre a célra javasoltam egy egyszerű, kis munka- és költségigényű, ultrahanggal segített extrakciós módszert, amely lehetővé teszi a vizsgált vízminták lebegőanyagaihoz kötődő szteroidok meghatározását is. Az ultrahanggal segített extrakció hatékonyságát, több ízben: egy befolyó szennyvízminta szűrőpapírjának kivonása során, az egymást követő oldószer-részletek elemzésével, valamint azonos szenny- és Duna-víz minták különböző térfogataiból kiszűrt szilárd anyagok extrakciójával vizsgáltam. Ezzel az eljárással meghatároztam a vízminták élővilággal kapcsolatba kerülő teljes (oldott és szuszpendált) szteroid mennyiségét.

7. Következtetések

A ketocsoportot tartalmazó szteroidok megfelelő azonosítása és meghatározása érdekében, a kétlépéses származékkészítés (1. oximálás, 2. trimetilszililezés) elengedhetetlen. A vizsgált szteroidok kivétel nélkül oximokat képeznek, és a trimetilszilil-oxim-étereik válaszeljének aránya a csak trimetilszilil-étereikéhez, vagy a változatlan formában meghatározottakéhoz viszonyítva, minden ketocsoporttal rendelkező vegyület esetében >1.

Az egyes szteroid vegyületek fragmentációs viselkedése összefüggést mutat az eredeti molekulaszervezettel: a 3-ketoszteroidok és a hidroxiszteroidok jellemző ionjai a molekulaion és az egy metilcsoport elvesztésével keletkező ion; míg a 17-ketoszteroidok tömegspektrumát a szteránváz feltöredezésével keletkező fragmens ionok jellemzik.

Az irodalomban leggyakrabban alkalmazott szililezőszerek (BSTFA, MSTFA, MTBSTFA), a korábban is alkalmazott HMDS+TFA reagenssel összehasonlítása alapján, a különböző szililezőszerekkel képzett szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek válaszeljelei összemérhetőek. Az alkalmazott reakcióhőfok és -idő tekintetében, az oximálás és szililezés esetében is, kölcsönösen változtatott körülmények vizsgálata alapján elmondható, hogy minden alkalmazott körülmény (50°C, 70°C, 90°C, 30, 60, 90 perc), a származékkészítés mindkét lépésének tekintetében kielégítő eredményekkel szolgált. Következésképpen, és a korábbi tapasztalatok figyelembe vételével, a további vizsgálatokhoz a HMDS+TFA reagenst választottam. Az optimális reakciókörülményeket az oximálás esetében 70°C, 30 perc és trimetilszililezés során 70°C 90 percben állapítottam meg.

A nyolc, 1,88-750 ng/L közötti mennyiségű szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éter tartalmú modelloldatok mérésével meghatározott LOQ értékek 1,88-37,6 ng/L között alakultak. Az SPE kivonás visszanyerésének százalékos értékei a legtöbb szteroid esetében 79% (mesztranol) és 106% (etonogesztrel) között alakultak. A szteroidok: koprosztanol, koleszterin, sztigmaszterol és β -szitoszterol visszanyerése, valószínűleg csekély vízoldhatóságuk miatt, átlagosan 34% volt.

A 2009 decemberétől 2010 szeptemberéig tartó, 10 hónapos időszak alatt két magyarországi szennyvíztisztító telep (Dél-Pest, Telki) be- és kifolyó szennyvízmintáinak összetételét vizsgáltam az ismertetett módszerrel. A hús kutatott

szteroidból kilencet sikerült azonosítanom a szennyvízmintákban: az androgének közül androszteront, transzandroszteront és androszteron-3,11-diol-17-ont, az ösztrogének közül β -ösztradiolt és ösztriolt, koleszterin, koprosztanol, sztigmaszterol és β -szitoszterol szterolokat mértem. Az androszteron-3,11-diol-17-ont előzetes fragmentum-analitikai tapasztalataim alapján, kettős trimetilszilil-oxim-éter származék formájában azonosítottam.

A három detektálási módszer (FS, MIM, MRM), analitikai teljesítményjellemzőik szerinti, kritikai összevetése alapján, elmondható, hogy az FS, MIM, MRM módszerek modelloldatokkal mért, hat pontos kalibrációjának átlagolt adatai: a lineáris regressziós koeficiensek, és az RSD%-ban kifejezett szórások, az adatgyűjtési technikától függetlenek. A technikák közötti különbségek az LOQ és az ILQ értékeknél jelentkeztek: átlaguk az FS, a MIM és az MRM módszerek sorrendjében, valamennyi vizsgált vegyületcsoport esetében, csökkennek. Az MRM módszer legkisebb ILQ és LOQ értékei mellett, a különböző módszerekkel meghatározható legkisebb mennyiségek kromatográfiás csúcsainak jel/zaj viszonyai is az MRM módszert, mint a legszelektívebb adatgyűjtési technikát igazolták.

A szennyvízminták mindhárom adatgyűjtési eljárással, egyidejű elemzése alapján elmondható, hogy Az MRM módszer használata az FS vagy MIM adatgyűjtéssel szemben jelentősen érzékenyebb, szelektívebb, és megbízhatóbb: az FS technika nem volt alkalmas a ng/L nagyságrendű β -ösztradiol, etinilösztradiol és ösztriol meghatározására. Az MRM eljárás MIM-mel szembeni előnyeit a szennyvízminták β -ösztradiol és etinilösztradiol tartalmának túlbecslése mutatta.

A szennyvízminták szuszpendált szilárd anyagaiból meghatározott szteroidok mennyisége, sok esetben meghaladta a hozzájuk tartozó vízmintákban mérhető koncentrációkat: a természetes ösztrogén β -ösztradiol kisebb, míg a fekális- és fitoszterolok jóval nagyobb mennyiségűek voltak.

A Duna-vízminták oldott fázisában koprosztanolt, koleszterint, β -szitoszterolt minden esetben, β -ösztradiolt és kólsavat két, sztigmaszterolt egyetlen alkalommal sikerült mérni. A Duna-víz szilárd lebegőanyainak kivonataiban koprosztanolt, koleszterint és β -szitoszterolt valamennyi esetben, etinilösztradiolt és sztigmaszterolt négy esetből háromban mértem. A szilárd anyagokban mért koncentrációk a legtöbbször összemérhetőek, vagy nagyobbak voltak az oldott fázisban mértekkel.

A jelen tanulmányban mért teljes szteroid mennyiség túlnyomó része (71% a szennyvízminták, és 64% a Duna-vízminták esetében), a vizsgált vízminták szuszpendált szilárd anyagaiban volt.

8. Összefoglalás

A szteroid vegyületek változatos csoportjaiba tartozó 18 új vegyülettel bővítettem a korábban kidolgozott sok összetevőt elemző rendszert, amely így összesen 81 szerves mikroszennyező meghatározására alkalmas egy oldatból, egy felvétellel, GC-MS(/MS) módszerrel.

Alapkutatásként részletes származékkészítési tanulmányokat készítettem, melynek tanulságai, hogy:

- a keto- és/vagy hidroxilcsoportú szteroidok megbízható azonosítása érdekében a kétlépéses származékképzés (1. oximálás, 2. szililezés) nélkülözhetetlen.
- A származékkészítés körülményeinek tekintetében, a különböző alkalmazott szililezőszerek, és reakcióidő és –hőfok értékek mellett kapott válaszjelek összemérhetőek, a hosszú ideje alkalmazott HMDS+TFA elegy alkalmas a feladatra.

Az egyes szteroid vegyületek fragmentációs viselkedése összefüggést mutat az eredeti molekulaszervezettel: a 3-ketoszteroidok és a hidroxiszteroidok trimetilszilil-oxim-éter származékai stabilak, jellemző ionjaik a molekulaion és az egy metilcsoport elvesztésével keletkező ion; míg a 17-ketoszteroidok tömegspektrumát a szteránváz feltöredésével keletkező fragmens ionok jellemzik.

Javaslatot tettem a vizsgált 20 szteroid és a velük egy szakaszon eluálódó kólsavak MIM és MRM adatgyűjtési módszereire. A három adatgyűjtési technikát, az FS, a MIM, és az MRM módszereket, elsőként hasonlítottam össze modelloldatok és szennyvízminták mindhárom eljárással, egyidejűleg készített analízisével. A vizsgálatok eredményei alapján, az MRM módszer nagyfokú szelektivitását igazoltam, a MIM módszerrel szemben is:

- a szennyvízminták β -ösztadiol, etinilösztadiol, ösztriol tartalmának meghatározása csak az MRM technikával volt sikeres.
- Az etinilösztadiol koncentráció túlbecslésének elkerüléséhez az MRM technika nélkülözhetetlen.

Az ultrahanggal segített extrakció módszerrel elemeztem szenny- és Duna-vízminták szuszpendált lebegőanyagának szteroid tartalmát. Eredményeim szerint a vizsgált szteroid vegyületek túlnyomó része –a vonatkozó irodalom szerint a mintaelőkészítés során figyelmen kívül hagyott- szuszpendált szilárd lebegőanyagokhoz kötődve található. Ezzel a vízi élővilág számára elérhető, biológiailag aktív szteroidok teljes mennyisége meghatározásra került a vizsgált vízmintákban.

9. Summary

The previously developed multiresidue analysis procedure has been extended with 18 natural and synthetic steroids, permitting the identification and quantification, in total of 81 pollutants from one solution, by a single injection, as their (TMS)-oxime ether/ester derivatives, by GC–MS(/MS).

At the basic research level, detailed derivatization optimization studies were performed. Results confirmed, that:

- in order of reliable identification of the hydroxy- and ketosteroids, the two-step derivatization protocol (1. oximation, 2. trimethylsilylation) is obligatory.
- Regarding the derivatization conditions, response values, gained by varying the silylating agents, reaction time and –temperature, proved to be commensurable. The suitability of HMDS+TFA reagent has been verified.

Fragmentation characteristics of steroid derivatives showed correlation with the original steroid structure. The TMS-(oxime)-ether derivatives of hydroxy- and 3-ketosteroids proved to be stable, providing molecular ions and fragment ions formed by the loss of one methyl group as abundant ions; while the 17 ketosteroids' mass spectra are characterized by fragment ions originating from the cleavage of the steroid skeleton.

MIM and MRM tandem mass spectrometric acquisition protocols have been optimized, for the determination of 20 steroids, along with the cholic acids sharing the same time window, for the first time. As novelty to the field, the FS, MIM and MRM techniques have been compared, by applying all three acquisition methods, in parallel, for the analysis of matrix free solutions and wastewater samples. Results confirmed the high selectivity of the MRM acquisition method, even in comparison to the MIM one:

- determination of the β -estradiol, ethinylestradiol and estriol contents of wastewaters proved to be reliable, applying the MRM acquisition protocol, only.
- The MRM technique is essential in avoiding the overestimation of wastewater samples' ethinylestradiol content.

The steroid content of Danube and wastewater samples' suspended phases, applying the ultrasound assisted extraction method, has been analyzed with their dissolved counterparts, simultaneously. Results confirmed that the overwhelming part of the water samples' steroid content is present in the suspended phase, isolated by filtration as part of the sample preparation, and usually discarded. Thus, the total amounts of steroids that the ecosystem is liable to, were defined.

10. Irodalomjegyzék

- [1] Garrison AW, Pope JD, Allen FR. GC-MS Analysis of domestic compounds in domestic wastewaters. In: Keith LH (szerk.), Identification and analysis of organic pollutants in water. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, 1976: 517-556.
- [2] Hignite C, Azarnoff DL. (1977) Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci*, 20: 337-341.
- [3] Ternes TA. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res*, 32: 3245-3260.
- [4] Ternes TA, Stumpf M, Mieller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. (1999) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ*, 225: 81-90.
- [5] Ternes TA. (2001) Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC-Trend Anal Chem*, 20: 419-434.
- [6] Sorensen BH, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhof HC, Jorgensen SE. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*, 36: 357-393.
- [7] Ternes TA, Janex-Habibi ML, Knacker T, Kreuzinger N, Siegrist H. (2004) POSEIDON final report, <http://poseidon.bafg.de>, letöltés: 2012.10.10.
- [8] Beausse J. (2004) Selected drugs in solid matrices: A review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC-Trend Anal Chem*, 23: 753-761.
- [9] Öllers S, Singer HP, Fässler P, Müller SR. (2001) Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *J Chromatogr A*, 911: 225–234.
- [10] Sumpter JP, Johnson AC. (2005) Lessons from Endocrine Disruption and Their Application to Other Issues Concerning Trace Organics in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol*, 39: 4321-4332.
- [11] Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brightly G, Sumpter JP. (1998) Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environ Sci Technol*, 32: 2498-2506.

- [12] Schlenk D. (2008) Are steroids really the cause for fish feminization? A mini-review of in vitro and in vivo guided TIEs. *Mar Pollut Bull*, 57: 250-254.
- [13] Colman JR, Baldwin D, Johnson LL, Scholz NL. (2009) Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*, 91: 346-354.
- [14] Vega-López A, Ramón-Gallegos E, Galar-Martínez M, Jiménez-Orozco FA, García-Latorre E, Domínguez-López ML. (2007) Estrogenic, anti-estrogenic and cytotoxic effects elicited by water from the type localities of the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*. *Comp Biochem Phys C*, 145: 394-403.
- [15] Jenkins RL, Wilson EM, Angus RA, Howell WM, Kirk M. (2003) Androstenedione and Progesterone in the Sediment of a River Receiving Paper Mill Effluent. *Toxicol Sci*, 73: 53-59.
- [16] Nakari T, Erkomaa K. (2003) Effects of phytosterols on zebrafish reproduction in multigeneration test. *Environ Pollut*, 123: 267-273.
- [17] Sebők Á, Vasánits-Zsigrai A, Záráy Gy, Molnár-Perl I. (2008) Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry. *Talanta*, 76: 642-650.
- [18] Sebők Á, Sezer K, Vasánits-Zsigrai A, Helenkár A, Záráy Gy, Molnár-Perl I. (2008) Gas chromatography–mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: Their presence in the aquatic environment. *J Chromatogr A*, 1211: 104-112.
- [19] Sebők Á, Vasánits-Zsigrai A, Helenkár A, Záráy Gy, Molnár-Perl I. (2009) Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216: 2288-2301.
- [20] Helenkár A, Sebők Á, Záráy Gy, Molnár-Perl I, Vasánits-Zsigrai A. (2010) The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography - mass spectrometry. *Talanta*, 82: 600-607.
- [21] Andrási N, Helenkár A, Záráy Gy, Vasánits A, Molnár-Perl I. (2011) The role of the acquisition methods in the analysis of natural and synthetic steroids and

- cholic acids by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218: 8264-8272.
- [22] Andrási N, Helenkár A, Zárny Gy, Vasánits A, Molnár-Perl I. (2011) 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 *J Chromatogr A*, 1218: 1878–1890.
- [23] Kioussi MK, Angelis YS, Cawley AT, Koupparis M, Kazlauskas R, Brenna JT, Georgakopoulos CG. (2011) External calibration in Gas Chromatography–Combustion–Isotope Ratio Mass Spectrometry measurements of endogenous androgenic anabolic steroids in sports doping control. *J Chromatogr A*, 1218: 5675-5682.
- [24] Liere P, Akwa Y, Engerer SW, Eychenne B, Pianos A, Robel P, Sjövall J, Schumacher M, Baulieu EE. (2000) Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 739: 301-312.
- [25] Chen J, Liang Q, Hua H, Wang Y, Luo G, Hu M, Na Y. (2009) Simultaneous determination of 15 steroids in rat blood via gas chromatography–mass spectrometry to evaluate the impact of emasculation on adrenal. *Talanta*, 80: 826-832
- [26] Anizan S, Bichon E, Monteau F, Cesbron N, Antignac JP, Bizec BL. (2010) A new reliable sample preparation for high throughput focused steroid profiling by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1217: 6652-6660.
- [27] Truong TT, Marriott PJ, Porter NA, Leeming R. (2003) Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography to the quantification of overlapping faecal sterols. *J Chromatogr A*, 1019: 197-210.
- [28] Hill M, Lapcik O, Havlíková H, Morfin R, Hampl R. (2001) 7-Hydroxydehydroepiandrosterone epimers in human serum and saliva: Comparison of gas chromatography–mass spectrometry and radioimmunoassay. *J Chromatogr A*, 935: 297-307.
- [29] Song J, Wadhwa L, Bejjani BA, O'Brien WE. (2003) Determination of 3-keto-4-ene steroids and their hydroxylated metabolites catalyzed by recombinant

- human cytochrome P450 1B1 enzyme using gas chromatography–mass spectrometry with trimethylsilyl derivatization. *J Chromatogr B*, 791: 127-135.
- [30] Kootstra PR, Zoontjes PW, van Tricht EF, Sterk SS. (2007) Multi-residue screening of a minimum package of anabolic steroids in urine with GC–MS. *Anal Chim Acta*, 586: 82-92.
- [31] Arroyo D, Ortiz MC, Sarabia LA. (2007) Multiresponse optimization and parallel factor analysis, useful tools in the determination of estrogens by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1157: 358-368.
- [32] Magnisali P, Dracopoulou M, Mataragas M, Voutetakis AD, Moutsatsou P. (2008) Routine method for the simultaneous quantification of 17 α -hydroxyprogesterone, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, cortisol, and pregnenolone in human serum of neonates using gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1206: 166-177.
- [33] Jung HJ, Lee WY, Chung BC, Choi MH. (2009) Mass spectrometric profiling of saturated fatty acid esters of steroids separated by high-temperature gas chromatography. *J Chromatogr A*, 1216: 1463-1468.
- [34] Jung HJ, Lee WY, Yoo YS, Chung BC, Choi MH. (2010) Database-dependent metabolite profiling focused on steroid and fatty acid derivatives using high-temperature gas chromatography–mass spectrometry. *Clin Chim Acta*, 411: 818-824.
- [35] Parr MK, Zapp J, Becker M, Opfermann G, Bartz U, Schanzer W. Steroidal isomers with uniform mass spectra of their per-TMS derivatives: Synthesis of 17-hydroxyandrostane-3-ones, androst-1-, and -4-ene-3,17-diols. *Steroids*, 72: 545-551.
- [36] Fragkaki AG, Angelis YS, Kakoulidou AT, Koupparis M, Georgakopoulos C. (2009) *Int. J Mass Spectrom*, 285: 58-69.
- [37] Ahmadkhaniha R, Shafiee A, Rastkari N, Khoshayand MR, Kobarfard F. (2010) Quantification of endogenous steroids in human urine by gas chromatography mass spectrometry using a surrogate analyte approach. *J Chromatogr B*, 878: 845-852.
- [38] Seo J, Kim HY, Chung BC, Hong J. (2005) Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration,

- solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1067: 303-309.
- [39] Dévier MH, Labadie P, Togola A, Budzinski H. (2010) Simple methodology coupling microwave-assisted extraction to SPE/GC/MS for the analysis of natural steroids in biological tissues: Application to the monitoring of endogenous steroids in marine mussels *Mytilus* sp. *Anal Chim Acta*, 657: 28-35.
- [40] Moon JY, Jung HJ, Moon MH, Chung BC, Choi MH. (2009) Heat-Map Visualization of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Based Quantitative Signatures on Steroid Metabolism. *Amer Soc Mass Spectrom*, 20: 1626-1637.
- [41] Meunier-Solère V, Maume D, André F, Bizec BL. (2005) Pitfalls in trimethylsilylation of anabolic steroids: New derivatisation approach for residue at ultra-trace level. *J Chromatogr B*, 816: 281-288.
- [42] Tripp KM, Dubois M, Delahaut P, Verstegen JP. (2009) Detection and identification of plasma progesterone metabolites in the female Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) using GC/MS/MS. *Theriogenology*, 72: 365-371.
- [43] Rambaud L, Monteau F, Deceuninck Y, Bichon E, André F, Bizec BL. (2007) Development and validation of a multi-residue method for the detection of a wide range of hormonal anabolic compounds in hair using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 586: 93-104.
- [44] Rambaud L, Bichon E, Cesbron N, André F, Bizec BLE. (2005) Study of 17 β -estradiol-3-benzoate, 17 α -methyltestosterone and medroxyprogesterone acetate fixation in bovine hair. *Anal Chim Acta*, 532: 165-176.
- [45] Impens S, Wasch KD, Cornelis M, De Brabander HF. (2002) Analysis on residues of estrogens, gestagens and androgens in kidney fat and meat with gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 970: 235-247.
- [46] Impens S, Courtheyn D, Wasch KD, Brabander HFD. (2003) Faster analysis of anabolic steroids in kidney fat by downscaling the sample size and using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 483: 269-280.
- [47] Matsuzaki Y, Yoshida S, Honda A, Miyazaki T, Tanaka N, Takagiwa A, Fujimoto Y, Miyazaki H. (2004) Simultaneous determination of dehydro-

- epiandrosterone and its 7-oxygenated metabolites in human serum by high-resolution gas chromatography–mass spectrometry. *Steroids*, 69: 817-824.
- [48] Christakoudi S, Cowan DA, Taylor NF. (2010) Steroids excreted in urine by neonates with 21-hydroxylase deficiency: Characterization, using GC–MS and GC–MS/MS, of the D-ring and side chain structure of pregnanes and pregnenes. *Steroids*, 75: 34-52.
- [49] Christakoudi S, Cowan DA, Taylor NF. (2012) Steroids excreted in urine by neonates with 21-hydroxylase deficiency. 2. Characterization, using GC–MS and GC–MS/MS, of pregnanes and pregnenes with an oxo- group on the A- or B-ring. *Steroids*, 77: 382-393.
- [50] Christakoudi S, Cowan DA, Taylor NF. (2012) Steroids excreted in urine by neonates with 21-hydroxylase deficiency. 3. Characterization, using GC–MS and GC–MS/MS, of androstanes and androstenes. *Steroids*, 77: 1487-1501.
- [51] Yang L, Luan T, Lan C. (2006) Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1104: 23-32.
- [52] Saravanabhavan G, Helleur R, Hellou J. (2009) GC–MS/MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall. *Chemosphere*, 76: 1156-1162.
- [53] Xiao XY, McCalley DV, McEvoy J. (2001) Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *J Chromatogr A*, 923: 195-204.
- [54] Zhao JL, Ying GG, Wang L, Yang JF, Yang XB, Hua LH, Li X. (2009) Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry. *Sci Total Environ*, 407: 962-974.
- [55] Mol HGJ, Sunarto S, Steijger OM. (2000) Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-

- butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, 879: 97-112.
- [56] Basheer C, Jayaraman A, Kee MK, Valiyaveetil S, Lee HK. (2005) Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1100: 137-143.
- [57] Kelly C. (2000) Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 872: 309-314.
- [58] Peng X, Yu Y, Tang C, Tan J, Huang Q, Wang Z. (2008) Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Sci Total Environ*, 397: 158-166.
- [59] Quintana JB, Carpinteiro J, Rodríguez I, Lorenzo RA, Carro AM, Cela R. (2004) Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, 1024: 177-185.
- [60] Noppe H, Verslycke T, Wulf ED, Verheyden K, Monteyne E, Caeter PV, Janssen CR, De Brabander HF. (2007) Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey. *Ecotox Environ Safe*, 66: 1-8.
- [61] Noppe H, Verheyden K, Gillis W, Courtheyn D, Vanthemsche P, De Brabander HF. (2007) Multi-analyte approach for the determination of ng L⁻¹ levels of steroid hormones in unidentified aqueous samples. *Anal Chim Acta*, 586: 22-29.
- [62] Parker JA, Webster JP, Kover SC, Kolodziej EP. (2012) Analysis of trenbolone acetate metabolites and melengestrol in environmental matrices using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 99: 238-246.
- [63] Chaler R, Simoneit BRT, Grimalt JO. Bile acids and sterols in urban sewage treatment plants. *J Chromatogr A*,: 927 155-160.
- [64] Jeannot R, Sabik H, Sauvard E, Dagnac T, Dohrendorf K. (2002) Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples

- using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 974: 143-159.
- [65] Kumar V, Chakraborty A, Viswanath G, Roy P. Androgenic endocrine disruptors in wastewater treatment plant effluents in India: Their influence on reproductive processes and systemic toxicity in male rats. *Tox Appl Pharm*, 226: 60-73.
- [66] Grover DP, Zhang ZL, Readman JW, Zhou JL. (2009) A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. *Talanta*, 78: 1204-1210.
- [67] Gibson R, Bravo EB, Castro VS, Jiménez B. (2007) Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1169: 31-39.
- [68] Hernando MD, Mezcua M, Gómez MJ, Malato O, Agüera A, Fernández-Alba AR. (2004) Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *J Chromatogr A*, 1047: 129-135.
- [69] Nie Y, Qiang Z, Zhang H, Adams C. (2009) Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216: 7071-7080.
- [70] Nie Y, Qiang Z, Zhang H, Ben W. (2012) Fate and seasonal variation of endocrine-disrupting chemicals in a sewage treatment plant with A/A/O process. *Sep Purif Technol*, 84: 9-15.
- [71] Liu R, Zhou JL, Wilding A. (2004) Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1022: 179-189.
- [72] Zhang ZL, Hibberd A, Zhou JL. (2006) Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 577: 52-61.

- [73] Zhang Y, Zhou JL. (2008) Occurrence and removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater. *Chemosphere*, 73: 848-853.
- [74] Wu J, Hu R, Yue J, Yang Z, Zhang L. (2009) Determination of fecal sterols by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. *J Chromatogr A*, 1216: 1053-1058.
- [75] Stanford BD, Weinberg HS. (2007) Isotope dilution for quantitation of steroid estrogens and nonylphenols by gas chromatography with tandem mass spectrometry in septic, soil, and groundwater matrices. *J Chromatogr A*, 1176: 26-36.
- [76] Trinh T, Harden NB, Coleman HM, Kahn SJ. (2011) Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218: 1668-1676.
- [77] Fernandez MP, Ikonomou MG, Buchanan I. (2007) An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci Total Environ*, 373: 250-269.
- [78] Shah VKG, Dunstan H, Taylor W. (2006) An efficient diethyl ether-based soxhlet protocol to quantify faecal sterols from catchment waters. *J Chromatogr A*, 1108: 111-115.
- [79] Vajda AM, Barber LB, Gray JL, Lopez EM, Bolden AM, Schoenfuss HL, Norris DO. (2011) Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. *Aquat Toxicol*, 103: 213-221.
- [80] Liu Z, Kanjo Y, Mizutani S. (2009) Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: A review. *Sci Total Environ*, 407: 4975-4985.
- [81] Furtula V, Osachoff H, Derksen G, Juahir H, Colodey A, Chambers P. Inorganic nitrogen, sterols and bacterial source tracking as tools to characterize water quality and possible contamination sources in surface water. *Water Res.*, 46: 1079-1092.
- [82] Viganò L, Benfenati E, Van Cauwenberge A, Eidem JK, Erratico C, Goksøyr A, Kloas W, Maggioni S, Mandich A, Urbatzka R. (2008) Estrogenicity profile

- and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. *Chemosphere*, 73: 1078-1089.
- [83] Rempel MA, Wang Y, Armstrong J, Schlenk D. (2008) Uptake of estradiol from sediment by hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) and effects on oxidative DNA damage in male gonads. *Mar Environ Res*, 66: 111-112.
- [84] Dagnino S, Gomez E, Picot B, Cavallès V, Casellas C, Balaguer P, Fenet H. (2010) Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*, 408: 2608-2615.
- [85] Gabet V, Miège C, Bados P, Coquery M. (2007) Analysis of estrogens in environmental matrices. *TrAC-Trend Anal Chem*, 26: 1113-1131.
- [86] Chang HS, Choo KH, Lee B, Choi SJ. (2009) The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J Hazard Mater*, 172: 1-12.
- [87] Streck G. (2009) Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *TrAC-Trend Anal Chem*, 28: 635-651.
- [88] Krone N, Hughes BA, Lavery GG, Stewart PM, Arlt W, Shackleton CHL. (2010) Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Steroid Biochem*, 121: 496-504.
- [89] Görög S. (2011) Advances in the analysis of steroid hormone drugs in pharmaceuticals and environmental samples (2004–2010). *J Pharmaceut Biomed*, 55: 728-743.
- [90] Tomšíková H, Aufartová J, Solich P, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ, Nováková L. (2012) High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *TrAC-Trend Anal Chem*, 34: 35-58.
- [91] Wille K, De Brabander HF, De Wulf E, Van Caeter P, Janssen CR, Vanhaecke L. (2012) Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC-Trend Anal Chem*, 35: 87-108.

- [92] Liu S, Ying GG, Zhao JL, Chen F, Yang B, Zhou LJ, Lai H. (2011) Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218: 1367-1378.
- [93] Zuo Y, Zhang K, Lin Y. Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic–mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids. *J Chromatogr A*, 1148: 211-218.
- [94] Bin H, Xue-Jun P, Jing-Liang L, Kai F, Yu W, Jian-Pei G. (2009) Hydroxyl group derivatization of steroid environmental endocrine disrupting chemicals. *Chinese J Anal Chem*, 37: 1651-1656.
- [95] Schummer C, Delhomme O, Appenzeller BMR, Wenning R, Millet M. (2009) Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, 77: 1473-1482.
- [96] Bowden JA, Colosi DM, Mora-Montero DC, Garrett TJ, Yost RA. (2009) Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J Chromatogr B*, 877: 3237-3242.
- [97] Bowden JA, Colosi DM, Stutts WL, Mora-Montero DC, Garrett TJ, Yost RA. (2009) Enhanced Analysis of Steroids by Gas Chromatography/Mass Spectrometry using Microwave-Accelerated Derivatization. *Anal Chem*, 81: 6725-6734.
- [98] Shareef A, Angove ML, Wells JD. (2006) Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1108: 121-128.
- [99] Shareef A, Parnis CJ, Angove MJ, Wells JD, Johnson BB. Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1026: 295-300.

- [100] Zhang K, Zuo Y. (2005) Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *Anal Chim Acta*, 554: 190-196.
- [101] Zuo Y, Lin Y. (2007) “Solvent effects on the silylation-gas chromatography–mass spectrometric determination of natural and synthetic estrogenic steroid hormones” Comment on “Formation of chlorinated estrones via hypochlorous disinfection of wastewater effluent containing estrone” by Hideyuki Nakamura, Ryoko Kuruto-Niwa, Mitsuo Uchida and Yoshiyasu Terao [*Chemosphere* 66 (2007) 1441–1448]. *Chemosphere*, 69: 1175-1176.
- [102] Zhou Y, Wang Z, Jia N. (2007) Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 α -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination. *J Environ Sci*, 19: 879-884.
- [103] Fang K, Pan XJ, Huang B, Liu JL, Wang Y, Gao JP. (2010) Progress on Keto Groups Derivatization of Steroid Hormones in Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *Chinese J Anal Chem*, 38: 743-751.
- [104] Schubert B, Heininger P, Keller M, Ricking M, Claus E. (2012) Monitoring of contaminants in suspended particulate matter as an alternative to sediments. *TrAC-Trend Anal Chem*, 36: 58-70.
- [105] European Commission, Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC, 2008.
- [106] Baker DR, Kasprzyk-Hordern B. (2011) Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218: 7901-7913.
- [107] Lahti M, Oikari A. (2011) Pharmaceuticals in settleable particulate material in urban and non-urban waters. *Chemosphere*, 85: 826-831.

- [108] Ferreira da Silva B, Jelic A, López-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, Barceló D. (2011) Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*, 85: 1331-1339.
- [109] Dagnino S, Gomez E, Picot B, Cavaillès V, Casellas C, Balaguer P, Fenet H. (2010) Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*, 408: 2608-2615.
- [110] Lee J, Cho J, Kim SH, Kim SD. (2011) Influence of 17 β -estradiol binding by dissolved organic matter isolated from wastewater effluent on estrogenic activity. *Ecotox Environ Safe*, 74: 1280-1287.
- [111] Phys. Prop. Database, <http://www.syrres.com>, letöltés: 2010.02.07.
- [112] Molnár-Perl I, Horváth K, Bartha R. (1998) GC-MS quantitation of benzoic and aralkyl carboxylic acids as their trimethylsilyl derivatives: In model solution I. *Chromatographia*, 48: 101-110.

11. Saját publikációk

1. András N, Helenkár A, Záray Gy, Vasánits A, Molnár-Perl I. (2011)
The role of the acquisition methods in the analysis of natural and synthetic steroids and cholic acids by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218: 8264-8272.
2. András N, Helenkár A, Záray Gy, Vasánits A, Molnár-Perl I. (2011)
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 *J Chromatogr A*, 1218: 1878–1890.
3. Perlné Molnár Ibolya, Zsigrainé Vasánits Anikó, Sebők Ágnes, Helenkár András, András Nóra, Faludi Tamás, Molnár Borbála, Záray Gyula (2012):
Környezeti vizek szerves szennyezőinek azonosítása és mérése, trimetilszilil (oxim) éter/észter származékokként, a gázkromatográfia tömegspektrometria felhasználásával
Magyar Kémiai Folyóirat, 2-4: 55-64.
4. András N., Molnár B., Vasánits-Zsigrai A., Záray Gy., Molnár-Perl I. (2013):
Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry
Talanta, 115: 367–373.

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni azoknak, akik nélkül a bemutatott munkám nem valósulhatott volna meg:

Perlné Dr. Molnár Ibolya egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, szeretném megköszönni a közös munkával eltöltött időt, ami alatt rengeteget fejlődhettem -szakmai és emberi értelemben egyaránt-, a megszámlálhatatlan jó tanácsot és az állandó támogatást, amiben részesültem.

Dr. Záray Gyula és **Dr. Láng Győző** egyetemi tanároknak, az Analitikai Kémiai Tanszék vezetőinek, hogy kutatómunkámat lehetővé tették és támogatták.

Zsigrainé Dr. Vasanits Anikó egyetemi adjunktusnak, hogy a kutatás kísérleti részeivel és a közleményekkel kapcsolatos kérdéseimmel bármikor hozzá fordulhattam.

Dr. Helenkár Andrásnak, doktorandusz kollégámnak, a közösen végzett mintaelőkészítések, a mérések és kiértékelésük során végzett munkájáért, hogy műszeres problémáimmal kapcsolatban mindig számíthattam a segítségére.

Dr. Sebők Ágnes, **Faludi Tamás** és **dr. Molnár Borbála** egykori és jelenlegi doktorandusz hallgatóknak a kísérleti feladatok során nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetemet fejezem ki a Fővárosi Csatornázási Műveknek és az Organica Környezettechnológiák Zrt.-nek a vizsgált szennyvízmintákért, az NKTH és TÉT intézményeknek, valamint a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolának, a Magyar Kémikusok Egyesületének és a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak a munkámhoz és a konferencia részvételekhez nyújtott támogatásukért.