

**Dipiron metabolitok koncentrációjának vizsgálata kommunális
szennyvíztisztítási technológiák alkalmazásánál**

Doktori értekezés

Gyenge Zsuzsa

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Záray Gyula, DSc
Konzulens: Dr. Szoboszlai Norbert, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Takács Erzsébet, DSc
Dr. Gergely András, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Zelkó Romána, DSc
Szigorlati bizottság tagjai: Takácsné Dr. Novák Krisztina, DSc
Dr. Török Ilona, DSc

**Budapest
2014**

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. Bevezetés.....	7
2.2. Gyógyszermechanizmus és metabolizáció.....	10
2.3. Nem szteroid gyulladáscsökkentők.....	11
2.3.1. Szalicilátok.....	11
2.3.2. Arilpropionsav származékok.....	12
2.3.3. Ecetsav származékok.....	12
2.3.4. Anilin származékok.....	12
2.3.5. Enolsavak.....	13
2.3.5.1. Oxicam származékok.....	13
2.3.5.2. Pirazonon származékok.....	13
2.3.6. Antranilsav származékok (Fenamátok).....	13
2.3.7. Alkanon származékok.....	14
2.3.8. Egyéb nem-szteroid gyulladásgátlók.....	14
2.3.9. Metamizol-nátrium.....	14
2.4. Metamizol metabolitok bomlása a környezetben.....	20
2.5. Szennyvíztisztító telepek és szennyvíztisztítási technológiák.....	22
2.5.1. Az Észak-pesti szennyvíztisztító telep.....	22
2.5.1.1. A telep története.....	22
2.5.1.2. A telep jellemzői.....	22
2.5.2. A Dél-pesti szennyvíztisztító telep.....	25
2.5.2.1. A telep története.....	25
2.5.2.2. A telep jellemzői.....	26

2.5.3. Telki szennyvíztisztító.....	28
2.5.3.1. A telep története.....	28
2.5.3.2. A telep jellemzői.....	29
2.6. Szennyvizekben levő gyógyszervegyületek és metabolitok meghatározására alkalmas analitikai kémiai mérés technikák.....	31
2.6.1. Gázkromatográfias módszerek.....	32
2.6.2. Folyadék kromatográfias módszerek	35
2.6.2.1. Diódasoros UV-detektálás	35
2.6.2.2. GC-MS- és HPLC-MS-technikák összehasonlítása.....	36
2.6.2.3. Tömegspektrometriás detektálási lehetőségek	37
2.6.2.4. Minta előkészítés.....	37
2.7. Metamizol-nátrium metabolitjainak speciációjára alkalmas analitikai módszerek.....	44
3. Célkitűzések.....	54
3.1. Metamizol metabolitjainak meghatározása két budapesti és egy külvárosi szennyvíztisztító telep szennyvizében HPLC-MS-technikával.....	54
3.2. Különböző szennyvíztisztítási technológiák összehasonlítása.....	54
3.3. Szennyvíztisztító telepek monitorozása.....	54
4. Anyagok és módszerek.....	56
4.1. Szennyvízminták	56
4.1.1. Mintavételi időpontok és helyek	56
4.1.2. Minta előkészítéshez és tároláshoz felhasznált anyagok és módszerek	58
4.1.2.1. Reagensok.....	58
4.1.2.2. Felhasznált eszközök és módszerek	58
4.2. Referencia anyagok előállításához és tisztításához használt anyagok és módszerek.....	59

4.2.1. Reagensek és módszerek	59
4.3. Szennyvízminták metabolittartalmának meghatározásához használt anyagok és módszerek	60
4.3.1. Reagensek	60
4.3.2. Az analitikai mérőgörbék felvételéhez használt oldatok.....	61
4.3.2.1. SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszer.....	61
4.3.2.2. SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszer.....	61
4.3.3. A kimutatási és mennyiségi meghatározási határértékek megállapítása	61
4.3.4. Műszerek.....	61
4.3.4.1. SPE-HPLC-ESI-Q-MS.....	61
4.3.4.2. SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS	63
5. Eredmények.....	65
5.1. SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszer	65
5.1.1. A mintaelőkészítés optimalizálása	65
5.1.2. Kromatográfias módszerfejlesztés referencia anyagok segítségével	67
5.1.3. Analitikai mérőgörbék felvétele az SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszerrel ...	70
5.1.4. Kimutatási és mennyiségi meghatározási határok megállapítása	71
5.1.5. Eredmények	71
5.2. SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszer.....	75
5.2.1. Kromatográfias módszerfejlesztés referencia anyagok segítségével	75
5.2.2. Analitikai mérőgörbék felvétele.....	76
5.2.3. Kimutatási és mennyiségi meghatározási határok megállapítása	78
5.2.4. Eredmények	79
5.3. Tisztítási technológiák összevetése.....	84
5.4. Dipiron metabolitok napi koncentrációjának ingadozása.....	88
5.5. Dipiron metabolitok koncentrációjának évszakos változása az Észak-pesti szennyvíztelep befolyó szennyvizében	89

5.6. <i>A klórozás hatása a metabolitok eltávolítására</i>	91
6. Megbeszélés	92
6.1. <i>Analitikai mérés technikák összevetése</i>	92
6.2. <i>Szennyvíztisztítási technológiák összehasonlítása</i>	93
6.3. <i>Dipiron metabolitok napi koncentráció ingadozása</i>	94
6.4. <i>Dipiron metabolitok koncentrációjának évszakos változása</i>	95
6.5. <i>A klórozás hatása a metabolitok eltávolítására</i>	95
7. Következtetések	96
7.1. <i>Módszerkidolgozás dipiron metabolitok meghatározására szennyvíz mintákban</i>	96
7.2. <i>Különböző mérési és tisztítási technológiák összehasonlítása</i>	97
7.3. <i>Szennyvíztisztító telepek monitorozása, a metabolitok napi és évszakos koncentráció ingadozásának vizsgálata</i>	97
7.4. <i>Klórozás hatása a metabolitok eltávolítására</i>	98
8. Összefoglalás	99
9. Summary	100
10. Irodalomjegyzék	101
11. Saját publikációk jegyzéke	110
11.1. <i>Disszertációhoz kapcsolódó publikációk</i>	110
11.2. <i>Disszertációtól független publikáció</i>	110
12. Köszönetnyilvánítás	111

1. Rövidítések jegyzéke

4-AA	4-amino-antipirin
4-AAA	4-acetil-amino-antipirin
4-FAA	4-formil-amino-antipirin
4-MAA	4-metil-amino-antipirin
AOPs	<i>advanced oxidation processes</i> - nagyhatékonyságú oxidációs eljárások
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> - kémiai ionizáció atmoszférikus nyomáson
COX	ciklooxygenáz enzim
DHC	7-dehidrokoleszterol
ESI	<i>electrospray ionization</i> - elektropray ionizáció
FS	<i>full scan</i> - teljes pásztázás
FT-IR	Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia
GC-MS	<i>gas chromatography mass spectrometry</i> - gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria
HMDS	hexametil-diszilazán
HPLC-DAD	<i>high performance liquid chromatography diode array detection</i> - nagyhatékonyságú folyadék kromatográfiával kapcsolt diódasoros detektálás
HPLC-MS	<i>high performance liquid chromatography mass spectrometry</i> - nagyhatékonyságú folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
KOI	kémiai oxigén igény
LOD	<i>limit of detection</i> - kimutatási határ
LOQ	<i>limit of quantification</i> - meghatározási határ
LPME	<i>liquid phase microextraction</i> - folyadék fázisú mikroextrakció
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i> - többszörös pásztázás

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> - mágneses magrezonancia
NSAID	<i>non steroid anti-inflammatory drugs</i> - nem-szteroid gyulladáscsökkentők
ppm	<i>parts per million</i> – milliomodrész
ppb	<i>parts per billion</i> - milliárdod rész
ppt	<i>parts per trillion</i> – billiomod rész
SIM	<i>selective ion monitoring</i> - szelektív ion monitorozás
SPE	<i>solid phase extraction</i> - szilárd fázisú extrakció
SPME	<i>solid phase microextraction</i> - szilárd fázisú mikroextrakció
TFAA	<i>trifluoroacetic acid</i> - trifluorecetsav
TMAH	<i>tetramethyl ammonium hydroxide</i> - tetrametil-ammónium-hidroxid
TMSH	<i>trimethyl sulfonyl hydroxide</i> - trimetil-szulfonil-hidroxid
TOF	<i>time of flight</i> - repülési idő
t_{1/2}	<i>half lifetime</i> - felezési idő
UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i> - ultra nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia
VRK	vékonyréteg kromatográfia
WWTP	<i>wastewater treatment plant</i> - szennyvíztisztító telep

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Bevezetés

Napjainkban nap, mint nap mindannyian ki vagyunk téve a xenobiotikumok (görögül: xenos = idegen; bios = élet), azaz testünk, illetve az élő szervezetek számára idegen anyagok hatásainak. A xenobiotikumok a szervezetben fellelhető olyan anyagok, melyek normális körülmények között nem termelődnek, szervezetünkben nincsenek alapvetően jelen. Nem minden xenobiotikum mérgező és számos, a szervezet anyagcseréjében szerepet játszó anyag a szervezetben megemelkedő koncentrációja révén mérgezővé válhat.

A legfontosabb kémiai xenobiotikumok: az élelmiszer-adalékok, a gyógyszerek, a levegőben, vízben és élelmiszerekben előforduló, ipari vagy mezőgazdasági tevékenységből származó vegyi anyagok például növényvédőszer, tisztító- és fertőtlenítőszer, kozmetikai anyagok stb.

A kémiai xenobiotikumokon túl az élő szervezetek fizikai (kozmosz vagy földi sugárzások), sőt biológiai (vírusok, baktériumok, paraziták) xenobiotikumok hatásainak is ki vannak téve.

A xenobiotikumok káros hatásait eredetüktől függetlenül mennyiségük, gyakoriságuk és hatékonyságuk határozza meg. A szervezetbe kerülő testidegen anyagoknak a szervezetből ki kell ürülniük. Ezért a szervezet átalakítja a bekerülő xenobiotikumokat, melynek során kevésbé ártalmas vegyületek keletkeznek, vagy éppen ezen átalakítások révén válnak aktív vegyületekké. Ez természetesen előnyös is lehet például egyes gyógyszereknél, melyek az első átalakulás után válnak hatásos vegyületekké (prodrugok). Egyes xenobiotikumok veszélyeztetik az emberi egészséget, ha a szervezet nem alakítja át, és nem üríti ki őket. Egyes növényvédő szerek és gyógyszerek azonnal kialakuló tüneteket okozhatnak, de vannak olyanok is, melyek hosszú távon fejtik ki negatív hatásukat, végül a legkülönbözőbb megbetegedéseket okozva. A xenobiotikumok által előidézett leggyakoribb tünetek: allergiás reakciók, érzékenység egyes környezetben előforduló anyagokra, például kemikáliákra, parfümökre és műszálas ruhaanyagokra, fejfájás, kimerültség, illetve nyálkahártya problémák.

Szervezetünk vagy biotranszformáció által szabadul meg a xenobiotikumoktól, vagy változatlan formában eliminálja őket. Az átalakítás célja a molekulák vízdékonyabbá tétele különböző módon, mint például oxidáció, redukció, glukuronidáció, szulfatáció stb. Az így keletkező polárisabb vegyületek a vesén keresztül a vizelettel könnyebben távoznak. Ezt a folyamatot gyakran – tévesen – xenobiotikum-anyagcserének nevezik. Általános szabály, hogy a biotranszformáció során a xenobiotikumok vízdékony metabolitokká alakulnak, melyek hatékonyan eltávolíthatók.

Ma már világszerte széleskörű vizsgálatok folynak a szervezetből kikerülő xenobiotikumok sorsának nyomon követéséről, hiszen különös veszélyt jelentenek azok az anyagok, melyek nem csak nagy mennyiségben fordulnak elő a környezetben, de a biotranszformációjuk során olyan anyagok keletkeznek, melyek a környezetben perzisztens módon, folyamatosan jelen vannak, ezzel veszélyeztetve többek között vizeink tisztaságát. Az eddig kevés figyelmet kapott gyógyszermaradványok, háztartási vegyszerek - ide sorolhatók az orvostudományban használatos diagnosztikai anyagok is – ma már a figyelem középpontjába kerültek. Ezek a vegyületek, és biológiaiilag aktív/inaktív metabolitjaik a felszíni vizekbe elsősorban kezeletlen vagy kezelt szennyvízzel jutnak be. A természetes vizek kémiai szennyezése a vízi ökológiai rendszer egyensúlyának megőrzése miatt is lényeges szempont, mivel a szennyezők hatására a vízben levő mikroorganizmusok, szervezetek életciklusukat nem tudják zavartalanul folytatni, védtelen állapotba kerülnek. A nem kimutatható hatások e mikroorganizmusok számára különösen aggasztóak, mert a hatások akkumulálódhatnak. Ennek következtében a legfőbb változások észrevehetetlenek maradnak, amíg a hatások kumulatív szintjei végül egy kaszkádot alkotnak és visszafordíthatatlan változást idéznek elő természetes alkalmazkodásban, kiválogatódásban.

Napjaink egyik legnagyobb környezetvédelmi problémáját a szennyvizekbe, természetes vizekbe és akár az ivóvízbe kerülő gyógyszermaradványok jelentik. Nemcsak az elfogyasztott gyógyszerek mennyisége nő fokozatosan, hanem sok esetben a biológiai lebontást végző szennyvíztisztító telepeken nem állnak a rendelkezésre megfelelő mikroorganizmusok a gyógyszermaradványok biodegradációjához, hiszen a meglévők elsősorban a nagy mennyiségben jelen levő természetes eredetű anyagcsere végtermékeket fogyasztják, míg a számukra kis mennyiségben jelen levő, és idegen

(xenofor) csoportokat tartalmazó gyógyszermolekulák felhasználása a háttérbe szorul. A tisztítási hatékonyság növelésének érdekében különböző oxidációs eljárások vagy membránszűrők telepítése lehet a megoldás, ehhez azonban szükség van arra, hogy tisztában legyünk azzal, hogy, mi az, amit el szeretnénk távolítani a szennyvizekből. Ennek egy részeként PhD-munkám során gyógyszermaradványok koncentrációjának nyomon követését végeztem szennyvíztisztító telepek szennyvizeiben.

Az új évezredben különösen nagy problémát jelent az európai átlagot is jelentősen meghaladó hazai gyógyszerfogyasztás, legyen szó a vény nélkül kapható fájdalomcsillapítókról, vagy a hazánkban nagy számban előforduló szív- és érrendszeri megbetegedések gyógyítására szolgáló receptköteles szerekről. Hatóanyagok szempontjából ide tartoznak a népszerű nem-szteroid gyulladáscsökkentők, mint a paracetamol, ibuprofen, ketoprofen, diklofenák, naproxen, acetilszalicilsav. A magas vérnyomásra, és magas koleszterinszintre ható szerek közül megemlítendő a metoprolol, atenolol, bisoprolol, amlodipin, verapamil, fenofibrát, bezafibrát, gemfibrozil, atorvasztatin, simvasztatin stb. Kiemelkedők még, a jelentős környezeti problémát okozó antibiotikumok is. Ilyenek a penicillin származékok, szulfonamidok, hiszen ezek állandó jelenléte, illetve a környezetben történő esetleges hatékony formává történő visszaalakulásuk különböző baktérium törzsek antibiotikum rezisztenciájához vezethet.

Európa és az Amerikai Egyesült Államok számos városában széleskörű vizsgálatokat kezdeményeztek annak tisztázása érdekében, hogy milyen mértékű, és a vizek élővilágára, valamint az emberre mennyire veszélyes azoknak a vegyületeknek a környezetbe kerülése, amelyeket a gyógyszeres terápiák során alkalmaznak. A gyógyszerként felhasznált vegyületek egy része vízoldható formában ürül a vizelettel, mely esetben vagy nem metabolizálódik az emberi és állati szervezetben, vagy vízoldható molekulákkal (glükóz, szulfonsav, aminosavak) konjugálódik. Az anyagcsere végtermékekkel együtt ürülő gyógyszerek és metabolitjaik a szennyvizekbe kerülnek, ahol különféle változást szenvednek el. Egyes metabolitokból a szennyvíztisztítási eljárások során ismét felszabadulhat az eredeti gyógyszermolekula. Ugyanakkor a jelenleg ismert szennyvíztisztítási technológiák nem alkalmasak a gyógyszermaradványok teljes mértékű eltávolítására, így azok a szennyvíztisztító telepek kifolyójából továbbjuthatnak az élővizekbe.

A gyógyszermolekulákat úgy tervezik, hogy specifikus célpontjaik legyenek a szervezetben, azonban az élő szervezetekből kikerült maradványaiknak ártalmas hatásai lehetnek a környezetben. Ezek a gyógyászati termékek és bomlástermékeik, melyeket a szennyvíztisztító telepek kifolyóinál ki lehet mutatni, az emberi tevékenység által okozott vízszennyezés indikátorai lehetnek, mely gyógyszermaradványok számottevő része a városi kórházakból ered. Gyógyszermolekulák vagy metabolitjaikat már ivóvízben is több fejlett országban detektálásra kerültek, bár a farmakológiai hatás kifejtéséhez szükséges koncentrációktól több nagyságrenddel kisebb mértékben. Ez azt mutatja, hogy még a legmodernebb tisztítási technológiák sem képesek arra, hogy maradéktalanul eltávolítsák a gyógyszermaradványokat az ivóvízből. Ezek a vegyületek olyan anyagok, amelyek képesek további bomlásra, vagy akár visszaalakulásra is, ezért ezek úgynevezett nem irányítható szennyezők, melyek a környezetben folyamatosan jelen vannak. Sok tanulmányt indítottak azzal a céllal, hogy felbecsüljék ezeknek a vegyületeknek a jelenlétét és sorsát a környezetben. Ha egy gyógyszerhatástanilag aktív vegyület csak kis mértékben alakul át, például a szervezetbeli metabolizáció útján glukuronsavas konjugáció révén hatástanilag inaktív, poláris vegyületté válik, mely formában a szervezetből a vizelettel ürül. A szennyvíztisztítás során ezek a konjugátumok könnyen széthasadhatnak, és így az eredeti gyógyszerhatással bíró vegyület szabadul fel az élővízben, így perzisztensé válva.

2.2. Gyógyszermechanizmus és metabolizáció

A gyógyszermolekuláknak nem elegendő a szervezetbe jutniuk, ahhoz, hogy hatásukat kifejtsék, fel kell szívódniuk, el kell jutniuk a megfelelő, úgynevezett kötőhelyre, és ott a hatáshoz szükséges koncentrációban fel kell dúsulniuk. Mivel a molekulák nagyon különbözőek, ebből adódóan nagyon sokfajta hatásmechanizmusról beszélhetünk. Ahhoz, hogy ezek a testidegen anyagok eliminálódni, azaz kiürülni tudjanak, metabolizálódniuk kell, mely a gyógyszerre nézve két fontos hatással jár: a gyógyszer hidrofilebbé válik, mely sietteti a vese útján való kiválasztást, illetve az esetek túlnyomó többségében a metabolizáció hatáscsökkenéssel, vagy hatásvesztéssel is jár. A gyógyszer-metabolizmus fő helye a máj, mely kétféle reakcióban játszik szerepet. Az úgynevezett I. fázisú reakciók a polárisabb molekulává alakításért felelősek, funkciós csoportok (pl. -OH, -NH₂, -SH) bevitele vagy szabaddá tétele révén.

Ide sorolható átalakulás azonban még az oxidáció, a redukció és a hidrolízis is. A II. fázisú reakciókban a még nem kellően poláris vegyületek endogén vegyületekkel konjugálódnak, és az így létrejövő konjugátumok szinte kivétel nélkül kevésbé hatékony és poláris molekulák, melyek azonnal kiválasztódnak a veséből [1].

2.3. Nem szteroid gyulladáscsökkentők

A leggyakrabban használt fájdalomcsillapítók a nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) csoportjába tartoznak (pl. acetilszalicilsav, diklofenák, ibuprofen, ketoprofen, naproxen), melyeknek három legfontosabb terápiás hatása a fájdalomcsillapítás, a gyulladásgátlás és a lázcsillapító hatás. A különböző kémiai szerkezettel rendelkező nem szteroid gyulladásgátló vegyületek hatásmódjukban megegyeznek, valamennyi gátolja a ciklooxygenáz (COX) enzimet, ezáltal megakadályozva a gyulladás vaszkuláris mediátorainak, a prosztaglandinoknak a keletkezését. A szövetekben a COX-enzim konstitutív izoformában (COX-1) található meg, de a gyulladás helyén a gyulladáskor keletkező citokinek az indukálható COX-2 izoforma mennyiségének növekedését okozzák. A vegyületek többsége gátolja mind a COX-1, mind a COX-2-enzimet. A COX-2-enzimnek a gátlása eredményezi a vegyületek gyulladásgátló, láz- és fájdalomcsillapító hatását, míg a COX-1 gátlása a felelős a vegyületek ulcerogén mellékhatásáért, mely a gyomor nyálkahártyában gasztrointesztinális károsodást okoz. Az egyes vegyületek különbözőképpen hatnak a COX-1, illetve a COX-2-enzimre, illetve az enzimgátlás lehet reverzibilis és irreverzibilis. A gyulladáscsökkentő hatásukban szerepet játszik szuperoxid-anionképződés gátló, valamint leukocita aggregáció gátló hatásuk. Kémiai szempontból szerkezetük alapján csoportosíthatjuk őket [1, 2].

2.3.1. Szalicilátok

A szalicilsav származékok fő képviselője az acetilszalicilsav, mely erősebben gátolja a COX-1 enzimet, mint a COX-2-t, ezért elsősorban enyhe, közepesen erős fájdalommal járó állapotokban (fejfájás, fogfájás, ízületi fájdalmak) hatékony. Hatásának időtartama kb. 4 óra. A vérben és a szövetekben levő észterázok a szalicilsavat aktív szaliciláttá és ecetsavvá hidrolizálják. A szalicilát biotranszformációja a májban megy végbe, a legnagyobb rész glicinnel konjugálódik

(75%), további metabolitjai észter és éter-glükuronidok (15%), egy rész pedig szabad szalicilsav formájában (10%) ürül. Terápiás dózisa elérheti akár a napi 1800 mg-ot is. Egy Aspirin® tabletta 500 mg acetilszalicilsavat tartalmaz, melyből akár napi 2-3 tabletta is bevehető, ezért is lehet jelentős a környezetbeli előfordulása [1].

2.3.2. Arilpropionsav származékok

Az arilpropionsav származékok közé tartozik többek között az ibuprofen, ketoprofen, és a naproxen, melyeket a betegek jobban tolerálják, mint a szalicilátokat, hiszen ezek COX-2 enzim gátló hatása már erősebb, ezért a mellékhatásprofil kedvezőbb. Ezek a vegyületek, úgy, mint a nem szteroid gyulladásgátlók többsége szintén elsősorban glukuronidáció útján eliminálódnak. Az egyik legerősebb és legkedveltebb fájdalomcsillapító, mely orvosi rendelvény nélkül kapható, az Algoflex forte® filmtabletta, ami 600 mg ibuprofent tartalmaz, de kapható 200 mg és 400 mg-os változatban is. Napi terápiás dózisa gyulladás esetén 2400-3200 mg is lehet, vagyis akár naponta 4-6 tabletta is bevehető, így érthető a szennyvizekben mérhető magas koncentrációja [1].

2.3.3. Ecetsav származékok

A diklofenák az ecetsav származékok legnépszerűbb képviselője, de ide tartozik még például az indometacin is. A diklofenák rendelkezik az NSAID-vegyületek klasszikus hármassal, de terápiás hatása hosszabb, mint az előbb említett vegyületeké, mivel képes akumulálódni az ízületi folyadékban. A COX-2-enzimet erősebben gátolja, mint a COX-1-et. Metabolitjai főleg a glukuronidképzés útján keletkeznek és eliminálódnak a szervezetből, de jelentős mennyiségben ürül az epével és a széklettel is. Terápiás dózisa napi 100-200 mg. A Voltaren Dolo® kapszula mindössze 75 mg diklofenákot tartalmaz, így annak még napi többszöri alkalmazásakor is kevesebb a kiürülő mennyiség, mint például az ibuprofen esetében [1].

2.3.4. Anilin származékok

A paracetamol az anilin származékok közé sorolható, a fenacetin aktív metabolitja, mely a májban keletkezik. Gyengén gátolja a COX-enzimet, a lázat és a fájdalmat csökkenti, azonban a gyulladásos folyamatokat nem befolyásolja, és köszvényellenes hatása sincs. Ebből kifolyólag gasztrointesztinális mellékhatásokat

nem okoz, és nem hat a vérlemezkék aggregációjára sem, azonban a maximális terápiás dózis két-háromszorosánál súlyos májkárosodás jelentkezik. Legnagyobb rész glükuronsavas (60 %) és szulfát konjugációval (35 %) inaktiválódik [2]. A paracetamol tartalmú készítmények általánosan legalább 500 mg hatóanyagot tartalmaznak, így háromszori napi szedés esetén ez is jelentős mennyiségben jut a szennyvizekbe.

2.3.5. Enolsavak

2.3.5.1. Oxicam származékok

Nagyon hatékony gyulladáscsökkentők, melyeknek felezési ideje ($t_{1/2}$) hosszú, így napi egyszeri bevételük elégséges. Ide sorolható vegyületek a piroxicam, a tenoxicam és a meloxicam is. Elsősorban gyulladás gátlóként alkalmazzák őket, főleg *rheumatoid arthritis*, *osteoarthritis* és *spondylitis* kezelésére, fájdalomcsillapítóként esetleg posztoperatív szakaszban. Napi dózisuk mindössze 20 mg.

2.3.5.2. Pirazonon származékok

Ide sorolható a fenilbutazon, az oxifenbutazon, a szulpirazon a fenazon, aminofenazon és mindközül a legismertebb, a metamizol-nátrium (dipiron) is. A fenilbutazon különösen hatékony gyulladáscsökkentő, de meglehetősen toxikus vegyület, ezért külsőleges alkalmazása (kenőcs formájában) is orvosi rendelvényhez kötött. Erős fájdalommal járó gyulladásos *arthritisek* például *spondylitis ankylopoetica* esetén kórházban alkalmazható. A metamizol-nátrium, más néven noraminofenazon a csecsemőkori láz és fájdalomcsillapítás alapgyógyszere, kúp formájában szükség esetén már újszülötteknek is adható 50 mg-os mennyiségben.

2.3.6. Antranilsav származékok (Fenamátok)

Az antranilsav származékok sem terápiásan, sem mellékhatás szempontjából nem térnek el az előző csoportoktól, azonban van egy érdekes hatásuk, miszerint a prosztaglandin szintézis gátlásán kívül a prosztaglandinok egyes hatásait is antagonizálják. Ide tartoznak a mefenaminsav, meklofenaminsav, flufenaminsav és a nifluminsav. Elsősorban analgetikumként alkalmazzák őket. Magyarországon a nifluminsav kapható kereskedelmi forgalomban, terápiásan ízületi és nem ízületi gyulladásos panaszok kezelésére használják. Napi dózisa maximum 3×250 mg [2].

2.3.7. Alkanon származékok

Az ebbe a csoportba tartozó nabumeton egy, a szervezetben hatékonyabb metabolittá alakuló *prodrug*, mely erősebben gátolja a COX-2-enzimet, mint a COX-1-et. Leginkább *rheumatoid arthritis* és *osteoarthritis* kezelésére használják, szokásos dózisa naponta 1×1000 mg.

2.3.8. Egyéb nem-szteroid gyulladásgátlók

Ide tartoznak a proguazon, a nimesulid, a celecoxib és a rofecoxib. A proguazon mivel nem savas karakterű vegyület, helyi károsító hatása enyhébb, így kevésbé okoz gyomornyálkahártya irritációt. Dózisa napi 600 mg, több részletre osztva, indokolt esetben ez 1200 mg-ra is növelhető. A nimesulid forgalomba hozatala után derült ki, hogy a COX-2-enzimet erősebben gátolja. Orálisan adva jól felszívódik, napi dózisa 2×100 mg. Csökkenti a szabad oxigényökök keletkezését, és gátolja a foszfolipáz-A₂-enzimet. A celecoxib és a rofecoxib szelektív COX-2 gátló vegyületek, melyek gasztrointesztinális mellékhatásokat nem okoznak, azonban súlyos, szívelégtelenséget okozó mellékhatásuk miatt az orálisan alkalmazható készítményeket kivonták a forgalomból [2].

2.3.9. Metamizol-nátrium

A nem opioid fájdalomcsillapítók közül az egyik legerősebb, a nem szteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapítók csoportján belül a pirazon származékok közé sorolható a dipiron, mely Magyarországon különböző gyógyszerügyi specialitások formájában kerül forgalomba: Algopyrin tabletta®, Algopyrin injekció®, Algopyrin complex tabletta®, Algozone tabletta®, Metapyrin tabletta®, Panalgorin tabletta®, Optalgin tabletta®, Quarelin tabletta®, *Suppositorium noraminophenazoni* végbélkúp®. Világszerte előfordul noraminophenazon, dipiron vagy novamidazophen néven. A metamizol-nátrium hazánkban közkedvelt, erős láz- és fájdalomcsillapító szer, melyet az Európai Unió országaiban is széleskörűen alkalmaznak, például Németországban, Spanyolországban, Romániában. Népszerűsége annak is köszönhető, hogy nem túl drága, nem opioid típusú fájdalomcsillapító, ennek következtében nem okoz függőséget, illetve sok országban orvosi előírás nélkül is kapható.

Ez a gyógyszer nemcsak hatásos fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő, hanem nagyon erős lázcsillapító hatással is rendelkezik, továbbá enyhe simaizom görcsoldó tulajdonságú. Nagyon ritka, de egyes esetekben halálos kimenetelű mellékhatása, az *agranulocitózis* (akut állapot, amely a fehérvérsejtek számának komoly és veszélyes redukciójával jár, ami megfelelő orvosi kezelés nélkül akár még halálozáshoz is vezethet) veszélye miatt néhány országban jelenleg nincs forgalomban. Így például az Amerikai Egyesült Államokban, Svédországban, és az Egyesült Királyságban is tiltott a használata. Ellenőrzött körülmények között azonban a metamizol tartalmú gyógyszerek használata biztonságosnak tekinthető, így Magyarországon is. Hazánkban kivonták a vény nélkül kapható készítmények köréből, de ez nem változtatott azon a tényen, hogy máig az egyik legnépszerűbb fájdalom- és lázcsillapításban alkalmazott vegyület. Szokásos napi dózisa 3×500 mg, de az a mennyiség szükség esetén 4×500 mg-ra is emelhető.

Az élő környezetre vonatkoztatva a metamizol-nátrium nem jelent közvetlenül semmilyen veszélyt, hiszen mind orális, mind intravénás és *intramusculáris* alkalmazása során pillanatszerű hidrolitikus lehasadás következtében az anyavegyület a biológiailag aktív első metabolittá, 4-metil-amino-antipirinné (4-MAA) alakul [3], melyből a májban történő enzimatis demetilációs reakciók következtében a szintén hatásos 4-amino-antipirin (4-AA) keletkezik. Ez a vegyület a szervezetből főleg a vesén keresztül választódik ki, ahol a polimorf N-acetil-transzferáz enzim segítségével az inaktív 4-acetil-amino-antipirinné (4-AAA) alakul [4]. Egy másik fontos metabolit, a 4-formil-amino-antipirin (4-FAA) is keletkezik az N-metil csoport egy mindezidáig nem tisztázott reakciómechanizmusú oxidációja révén [5,6]. Egyelőre nagyon keveset tudunk ezeknek a metabolitoknak a természetben való jelenlétéről és viselkedéséről. Az **1. ábra** a dipiron metabolizmusának lépéseit mutatja.

A Semmelweis Egyetem Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézete által szolgáltatott eladási adatok szerint Magyarországon a metamizol-nátrium tartalmú gyógyszerekre számolt hatóanyag tartalom 2008-ban 73140 kg, 2009-ben 71697 kg, 2010-ben 67801 kg, 2011-ben 66566 kg, 2012-ben 65021 kg 2013-ban pedig 65244 kg volt éves szinten. Az 1. táblázatban szerepelnek az eladott dobozszámok közforgalomban és kórházi gyógyszertárakban egyaránt.

1. táblázat Fogyási adatok, illetve a számolt hatóanyag tartalom a metamizol-nátriumra vonatkoztatva 2008-2013 között

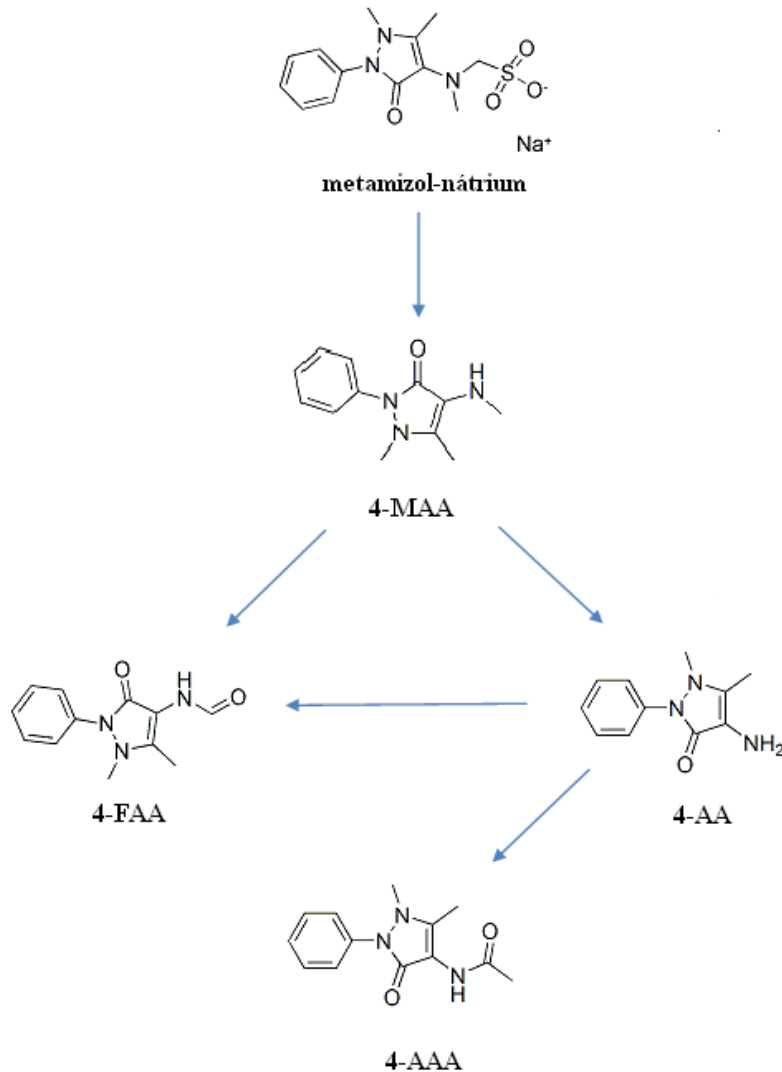
Gyógyszer	Dobozszám 2008	Metamizol kg/2008	Dobozszám 2009	Metamizol kg/2009	Dobozszám 2010	Metamizol kg/2010	Dobozszám 2011	Metamizol kg/2011	Dobozszám 2012	Metamizol kg/2012	Dobozszám 2013	Metamizol kg/2013
Gyógyszertár	8 654 457		8 431 233		8 004 505		8 318 133		8 505 901		8 866 716	
METAMIZOLE SODIUM	8 654 457		8 431 233		8 004 505		8 318 133		8 505 901		8 866 716	
ALGOPYRIN	6 971 578		7 012 966		6 779 091		6 852 456		6 969 106		7 107 488	
ALGOPYRIN TABS 500 MG 10	2 714 829	13574,15	2 907 311	14536,56	3 170 578	15 852,89	3 341 599	16 708,00	4 074 740	20 373,70	4 615 215	23076,08
ALGOPYRIN TABS 500 MG 20	4 051 226	40512,26	3 905 760	39057,60	3 415 313	34 153,13	3 311 019	33 110,19	2 699 469	26 994,69	2 298 547	22985,47
ALGOPYRIN AMP. 1 G 5 2 ML	194 902	974,51	188 497	942,49	181 527	907,64	187 390	936,95	184 432	922,16	183 329	916,65
ALGOPYRIN AMP. 1 G /2ML 25 2 ML	10 621	265,53	11 398	284,95	11 673	291,83	12 448	311,20	10 465	261,63	10 397	259,93
PANALGORIN	521 313		414 378		399 204		389 557		388 296		388 057	
PANALGORIN TABS 500 MG 20	444 449	4444,49	355 174	3551,74	346 878	3 468,78	343 058	3 430,58	347 243	3 472,43	349 127	3491,27
PANALGORIN TABS 500 MG 10	75 701	378,51	58 282	291,41	51 275	256,38	44 954	224,77	38 772	193,86	37 170	185,85
PANALGORIN TABS 500 MG 400	371	74,20	222	44,40	293	58,60	801	160,20	1 000	200,00	969	193,80
PANALGORIN TABS 500 MG 100	792	39,60	700	35,00	758	37,90	709	35,45	916	45,80	733	36,65
PANALGORIN AMP. 500 MG /ML 5 2 ML	0	0	0	0	0	0	35	0,18	365	1,83	50	0,25
PANALGORIN AMP. 500 MG /ML 25 2 ML	0	0		0	0	0	0	0	0	0	8	0,20
QUARELIN	911 540		685 019		501 105		349 380		365 993		337 954	
QUARELIN TABS 20	137 057	1370,57	280 704	2807,04	416 419	3 331,35	349 380	2 795,04	365 993	2 927,94	337 954	2703,63
QUARELIN TABS 10	774 483	3872,42	404 315	2021,58	84 686	338,74	0	0	0	0	0	0
OPTALGIN	0		0		0		0		74 503		286 508	
OPTALGIN TABS 500 MG 10	0	0	0	0	0	0	0	0	47 615	238,08	223 721	1118,61
OPTALGIN TABS 500 MG 20	0	0	0	0	0	0	0	0	26 888	268,88	62 787	627,87
ALGOZONE	250 026	0	281 670		236 837		240 764		232 578		252 575	
ALGOZONE TABS 500 MG 20	229 397	2293,97	266 608	2666,08	232 201	2 322,01	234 747	2 347,47	226 503	2 265,03	246 015	2460,15
ALGOZONE TABS 500 MG 10	20 332	101,66	14 541	72,71	3 840	19,20	5 705	28,53	5 721	28,61	6 042	30,21
ALGOZONE TABS 500 MG 500	297	74,25	521	130,25	796	199,00	312	78,00	354	88,50	518	129,50
TABLETTA ANALG.NAT	0		0		12 017		123 875		126 086		142 204	
TABLETTA ANALG.NAT FONOVII 10	0	0	0	0	12 017	54,08	123 875	557,43	126 086	567,39	142 204	639,92
TABLETTA ANALG.PAR	0		0		10 983		124 954		101 414		86 800	
TABLETTA ANALG.PAR FONOVII 10	0	0	0	0	10 983	49,42	124 954	562,29	101 414	456,36	86 800	390,60
SUPP.NORAMINOP.PAR	0		0		9 439		80 294		70 378		56 522	

Gyógyszer	Dobozszám 2008	Metamizol kg/2008	Dobozszám 2009	Metamizol kg/2009	Dobozszám 2010	Metamizol kg/2010	Dobozszám 2011	Metamizol kg/2011	Dobozszám 2012	Metamizol kg/2012	Dobozszám 2013	Metamizol kg/2013
SUPP.NORAMINOP.PAR FONOVII 200 MG	0	0	0	0	5 737	6,88	47 168	56,60	41 250	49,50	31 331	37,59
SUPP.NORAMINOP.PAR FONOVII 100 MG	0	0	0	0	3 702	2,22	33 126	19,88	29 128	17,48	25 191	15,11
SUPP.ANAL.FORT PAR	0		0		5 946		63 716		61 569		53 224	
SUPP.ANAL.FORT PAR FONOVII 6	0	0	0	0	5 946	32,11	63 716	344,07	61 569	332,47	53 224	287,41
SUPP.ANAL.FORT NAT	0		0		4 298		45 852		45 402		49 109	
SUPP.ANAL.FORT NAT FONOVII 6	0	0	0	0	4 298	23,21	45 852	247,60	45 402	245,17	49 109	265,19
METAPYRIN	0		0		0		0		0		39 635	
METAPYRIN FILM TABS 500 MG 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21 545	215,45
METAPYRIN FILM TABS 500 MG 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13 577	67,89
METAPYRIN FILM TABS 500 MG 30 BUBC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4 513	67,69
SUPP.NORAMINOP.NAT	0		0		3 590		22 827		27 866		37 641	
SUPP.NORAMINOP.NAT FONOVII 200 MG	0	0	0	0	3 014	3,62	17 468	20,96	20 063	24,08	27 302	32,76
SUPP.NORAMINOP.NAT FONOVII 100 MG	0	0	0	0	576	0,35	5 359	3,22	7 803	4,68	10 339	6,20
SUPP.ANALGETIC.NAT	0		0		907		8 930		8 939		10 305	
SUPP.ANALGETIC.NAT FONOVII 6	0	0	0	0	907	2,72	8 930	26,79	8 939	26,82	10 305	30,92
ALGOPYRIN COMPLEX	0		37 200		40 117		3 957		22 409		9 410	
ALGOPYRIN COMPLEX TABS 20	0	0	18 533	185,33	23 696	189,57	1 399	11,19	22 409	179,27	9 410	75,28
ALGOPYRIN COMPLEX TABS 10	0	0	17 918	89,59	13 894	55,58	1 746	6,98	0	0	0	
ALGOPYRIN COMPLEX TABS 30	0	0	749	11,24	2 527	30,32	812	9,74	0	0	0	
SUPP.ANALGET.PARMA	0		0		971		11 571		11 362		9 284	
SUPP.ANALGET.PARMA FONOVII 6	0	0	0	0	971	2,91	11 571	34,71	11 362	34,09	9 284	27,85
Összesen		67976,10		66727,95		61 690,44		62 068,01		60 220,45		60 375,98
Kórház	270 004		253 688		262 171		222 411		230 730		234 556	
METAMIZOLE SODIUM	270 004		253 688		262 171		222 411		230 730		234 556	
ALGOPYRIN	203 211		205 899		222 610		169 044		161 487		164 954	
ALGOPYRIN AMP. 1 G /2ML 25 2 ML	117 033	2925,83	114 303	2857,58	120 515	3 012,88	113 801	2 845,03	116 149	2 903,73	122 282	3057,05
ALGOPYRIN TABS 500 MG 20	63 450	634,50	71 532	715,32	85 972	859,72	51 991	519,91	43 054	430,54	38 884	388,84
ALGOPYRIN AMP. 1 G 5 2 ML	6 379	31,90	7 401	37,01	6 298	31,49	2 224	11,12	1 459	7,30	2 157	10,79
ALGOPYRIN TABS 500 MG 10	16 349	81,75	12 663	63,32	9 825	49,13	1 028	5,14	825	4,13	1 631	8,16
OPTALGIN	0		0		0		0		1 935		39 369	
OPTALGIN TABS 500 MG 20	0	0	0	0	0	0	0	0	1 775	17,75	39 277	392,77

Gyógyszer	Dobozszám 2008	Metamizol kg/2008	Dobozszám 2009	Metamizol kg/2009	Dobozszám 2010	Metamizol kg/2010	Dobozszám 2011	Metamizol kg/2011	Dobozszám 2012	Metamizol kg/2012	Dobozszám 2013	Metamizol kg/2013
OPTALGIN TABS 500 MG 10	0	0	0	0	0	0	0	0	160	0,80	92	0,46
PANALGORIN	35 701		22 574		19 003		36 590		49 017		16 066	
PANALGORIN TABS 500 MG 20	28 662	286,62	16 350	163,50	13 471	134,71	10 004	100,04	15 920	159,20	9 133	91,33
PANALGORIN TABS 500 MG 400	2 804	560,80	2 960	592,00	2 862	572,40	3 175	635,00	4 376	875,20	3 488	697,60
PANALGORIN TABS 500 MG 100	2 880	144,00	2 949	147,45	2 468	123,40	2 344	117,20	1 378	68,90	1 173	58,65
PANALGORIN TABS 500 MG 10	1 355	6,78	315	1,58	202	1,01	7 276	36,38	5 882	29,41	1 012	5,06
PANALGORIN AMP. 500 MG /ML 25 2 ML	0	0	0	0	0	0	0	0	1 230	30,75	749	18,73
PANALGORIN AMP. 500 MG /ML 5 2 ML	0	0	0	0	0	0	13 791	68,96	20 231	101,16	511	2,56
PANALGORIN TABS 500 MG 500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QUARELIN	25 992		18 783		13 995		6 015		6 660		6 159	
QUARELIN TABS 20	1 785	17,85	3 389	33,89	10 496	83,97	6 015	48,12	6 660	53,28	6 159	49,27
QUARELIN TABS 10	24 207	121,04	15 394	76,97	3 499	13,99	0	0	0	0	0	0
TABLETTA ANALG.NAT	0		0		400		3 132		2 737		3 241	
TABLETTA ANALG.NAT FONOVII 10	0	0	0	0	400	1,80	3 132	14,09	2 737	12,32	3 241	14,58
ALGOZONE	5 100		2 215		5 201		3 932		5 044		1 750	
ALGOZONE TABS 500 MG 20	3 686	36,86	1 164	11,64	4 037	40,37	2 855	28,55	4 213	42,13	1 530	15,30
ALGOZONE TABS 500 MG 500	1 262	315,50	986	246,50	1 114	278,50	196	49,00	168	42,00	172	43,00
ALGOZONE TABS 500 MG 10	152	0,76	65	0,33	50	0,25	881	4,41	663	3,32	48	0,24
SUPP.ANAL.FORT NAT	0		0		246		2 248		1 535		1 161	
SUPP.ANAL.FORT NAT FONOVII 6	0	0	0	0	246	1,33	2 248	12,14	1 535	8,29	1 161	6,27
SUPP.NORAMINOP.NAT	0		0		43		526		379		519	
SUPP.NORAMINOP.NAT FONOVII 200 MG	0	0	0	0	30	0,04	333	0,39	249	0,29	325	0,39
SUPP.NORAMINOP.NAT FONOVII 100 MG	0	0	0	0	13	0,01	193	0,12	130	0,08	194	0,12
SUPP.ANALGETIC.NAT	0		0		88		339		304		508	
SUPP.ANALGETIC.NAT FONOVII 6	0	0	0	0	88	0,26	339	1,02	304	0,91	508	1,52
METAPYRIN	0		0		0		0		0		235	
METAPYRIN FILM TABS 500 MG 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	199	1,99
METAPYRIN FILM TABS 500 MG 30 BUBC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0,50
METAPYRIN FILM TABS 500 MG 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,02
ALGOPYRIN COMPLEX	0		4 217		532		102		1 067		172	
ALGOPYRIN COMPLEX TABS 20	0	0	113	1,13	124	0,99	3	0,02	1 067	8,54	172	1,38

Gyógyszer	Dobozszám 2008	Metamizol kg/2008	Dobozszám 2009	Metamizol kg/2009	Dobozszám 2010	Metamizol kg/2010	Dobozszám 2011	Metamizol kg/2011	Dobozszám 2012	Metamizol kg/2012	Dobozszám 2013	Metamizol kg/2013
ALGOPYRIN COMPLEX TABS 10	0	0	4 093	20,47	372	1,49	88	0,35	0	0	0	0
ALGOPYRIN COMPLEX TABS 30	0	0	11	0,17	36	0,43	11	0,13	0	0	0	0
TABLETTA ANALG.PAR	0		0		2		18		22		161	
TABLETTA ANALG.PAR FONOVII 10	0	0	0	0	2	0,01	18	0,08	22	0,10	161	0,72
SUPP.ANAL.FORT PAR	0		0		5		131		81		135	
SUPP.ANAL.FORT PAR FONOVII 6	0	0	0	0	5	0,03	131	0,71	81	0,44	135	0,73
SUPP.NORAMINOP.PAR	0		0		46		235		312		106	
SUPP.NORAMINOP.PAR FONOVII 100 MG	0	0	0	0	5	0,003	92	0,06	132	0,08	55	0,03
SUPP.NORAMINOP.PAR FONOVII 200 MG	0	0	0	0	41	0,05	143	0,17	180	0,22	51	0,06
SUPP.ANALGET.PARMA	0		0		0		99		150		20	
SUPP.ANALGET.PARMA FONOVII 6	0	0	0	0	0	0	99	0,30	150	0,45	20	0,06
Összesen		5164,17		4968,83		5 208,26		4 498,44		4 801,31		4 868,17
Gyógyszertár+Kórház összesen		73140,27		71696,77		66 898,70		66 566,44		65 021,75		65 244,15

Ezek az adatok is demonstrálják a hatóanyag népszerűségét hazánkban, és igazolják e tanulmány fontosságát. Az elmúlt öt év eladásaiban mutatkozó csökkenés annak a ténynek köszönhető, hogy 2009 februárja óta a metamizol-nátrium tartalmú gyógyszerek csak orvosi vényre kaphatóak Magyarországon.



1. ábra Metamizol-nátrium metabolizációja

2.4. Metamizol metabolitok bomlása a környezetben

Kimutatták, hogy a 4-AAA degradációja aerob körülmények között megy végbe [7,8]. A 4-AAA, 4-FAA, és 4-MAA vegyületek fotokémiai viselkedését szimulált napfény besugárzás tanulmányozásával megfigyelték, hogy a 4-MAA a legjobban

lebontható dipironmetabolit, melynek $t_{1/2}$ értéke 0,12 és 0,58 óra között van, attól függően, hogy milyenek a besugárzás körülményei, illetve milyen a vizek sótartalma. Ezzel ellentétben a 4-FAA $t_{1/2}$ értéke 24 óra, míg a 4-AAA metabolité 28 óra is lehet. Mindemellett *Daphnia magna* (nagy vízibolha) segítségével akut toxicitás növekedést mutattak ki a fotolitikus folyamat lejátszódása alatt [6].

A nagyhatékonyságú oxidációs eljárások (AOPs) (mint például H_2O_2/UV , O_3/UV , γ -radiolízis, TiO_2 fotokatalízis, foto-katalizált Fenton és elektro-Fenton, nanostrukturált CeO_2/C gáz diffúziós elektród) hidroxil gyököket ($OH\bullet$) eredményeznek. Ezek képesek az ivóvizekben és szennyvizekben jelenlevő szerves szennyezőket lebontani [9,10]. Ezen oxidációs folyamatok vagy teljesen lebontják a szerves vegyületeket [11], vagy számos vegyület koncentrációját nagyon kis koncentráció-szintre csökkentik [12,13], miközben a környezetre már egyáltalán nem, vagy csak kevésbé ártalmas melléktermékek keletkeznek [14,15]. Egy, a 4-MAA metabolit lebomlását vizsgáló, kis vas(II) koncentráció (2 mg/l) mellett végzett foto-Fenton-kezelés eredménye értelmében, a toxicitás nem növekedett a keletkező bomlástermékek jelenléte ellenére sem [16].

Bár az UV-sugárzás és az ózon erős fertőtlenítő hatással bír a gyakorlatban, mégis a különböző klórozó szereket (ilyen például a nátrium-hipoklorit, a klóramin, a klórgáz, és a klór-dioxid) alkalmazzák a legszélesebb körben. Míg a klórgáz reaktívabb oxidációs reakciókban, és kettős kötést tartalmazó vegyületek esetén, addig a nátrium-hipoklorit az elektrofil aromás szubsztitúciókban vesz részt nagyobb reaktivitással [17].

Míg az emberi szervezetben a dipiron fő metabolikus útvonalai ismertek, addig a mikroorganizmusok által kiváltott biodegradációs folyamatokról és azok termékeiről kevés információval rendelkezünk. Egy, nemrég közétett tanulmányban *Pieper* és kutatócsoportja kimutatta, hogy a folyamatos áramú, természetes biofilm reaktorokban a 4-MAA mikrobiálisan könnyen bomlik különböző metabolitokra, a 4-MAA-ból a metil-csoportok és aminok bontásán keresztül főképp 4-FAA- és 4-AA-metabolit keletkezik [18].

2.5. Szennyvíztisztító telepek és szennyvíztisztítási technológiák

2.5.1. Az Észak-pesti szennyvíztisztító telep

2.5.1.1. A telep története

Budapesten az Észak-pesti szennyvíztisztító telep 1980-ban kezdte meg működését. Eleinte az összegyűjtött szennyvizekből csak a mechanikai szennyeződések távolították el, 1986-tól azonban a szennyvíz biológiai tisztítása is megtörténik. 1998-ban a telepet felújították, aminek eredményeként az angyalföldi vízgyűjtő területeket nyomócsövek segítségével csatlakoztatták a telephez. Az 1999 és 2002 közötti időszakban kapacitásbővítés történt, melynek köszönhetően a telep napi 200 ezer m³ szennyvíz tisztítására vált képessé. 2002-ben üzembe helyezték az I. bővítési ütemben megépített létesítményt, melyet kizárólag a szerves anyagok lebontására terveztek, valamint ugyanebben az évben szaghatások kiküszöbölése érdekében megtörtént a mechanikai tisztítóberendezések lefedése is. 2007-ben a békásmegyeri és a római-parti szennyvíz egy részét is átvezették erre a telepre. Ez további, napi 15 ezer m³ szennyvíz tisztítását jelentette.

2007 óta egy környezetvédelmi és bioenergetikai beruházásnak köszönhetően energiatakarékos és környezetbarát megoldás született a szennyvíziszap kezelésére a telepen. A szennyvíziszapból biogázt állítanak elő. Ez a próbaüzem 2008-ban indult, és 2009 elejétől teljes kapacitással működik.

2009-ben új sűrítőasztalt és beépített recirkulációs szivattyúkat telepítettek, melyek energiaigénye is kevesebb, és ennek eredményeként a költséghatékonyságot is sikerült növelni.

2010-ben befejeződött az Észak-pesti szennyvíztisztító telep bővítésének második üteme is, melynek célja a szennyvízben levő tápanyagok (nitrogén és foszfor) eltávolítása volt. Az egyéves próbaüzemet követően a létesítményt 2011 tavaszán adták át [19].

2.5.1.2. A telep jellemzői

Az Észak-pesti szennyvíztisztító telep a IV., XV., XVI., XVII. kerület, valamint a X., XIII., és XIV. kerület, illetve az ide tartozó agglomerációs területek szennyvizét, sőt 2007 nyarától a Duna-meder alatti átvezetés kialakítása után már az óbudai

szennyvizek nagy részét is tisztítja. A tisztítótelep szennyvíztisztító kapacitása napi 200 ezer m³.

A Fővárosi Önkormányzat beruházásában és a Világbank, valamint a külföldi tulajdonosok támogatásával megvalósult létesítménynek köszönhetően a Dunába vezetett tisztított víz minősége jelentősen javult. A szennyvíztisztítás egyik mellékterméke a víztelenített szennyvíziszap, melynek éves mennyisége a telepen 60 ezer m³. 2008-tól az iszapból keletkező biogáz elektromos és hőenergia előállítására szolgál. A szennyvíz tisztítása során keletkezett szerves hulladék mennyisége évente 1600 m³. A szennyvíztisztító telepen környezetbarát, komplex tisztítási és hulladékfeldolgozási, valamint hasznosítási technológia működik.

A telep fogadja és kezeli a budapesti csatornahálózatról érkező csatornaiszap egy részét. Lehetővé teszi a szennyvíztisztítás során keletkezett melléktermékek, az iszap és a mechanikai szennyeződések környezetbarát kezelését, és a tárolásra, illetve újrahasznosításra történő előkészítését. Beszállított élelmiszeripari és vágott zöld hulladékokat fogad a biogáz mennyiség növelése érdekében, a felhasznált elektromos és hőenergia jelentős részét előállítja, tisztítja a technológiai folyamatok során képződő bűzös levegőt (2 millió m³/nap), valamint záporvíz-szivattyúkkal segíti a csapadékvíz elvezetését (15 m³/sec) [19].

Elfolyó vízminőségi adatokat a 2. táblázat tartalmazza. A mintát 2014. január 14-15-én gyűjtötték a tisztított vízből, a telepi utolsó aknánál.

2. táblázat A kezelt szennyvíz minőségét jellemző adatok az Észak-pesti szennyvíztisztító telepen [19]

Vízminőségi paraméter	Határértékek (mg/l)	Az elfolyó víz mért értékei (mg/l)
Dikromátos oxigénfogyasztás	125	32
Ötnapos biokémiai oxigénigény	25	<10
pH	6,5 - 9,0	7,8
Szerves oldószer kivonat*	5	< 2
Összes lebegőanyag	35	6
Összes nitrogén	35	11,3
Ammónia-ammónium-nitrogén	10	3,98
Összes foszfor	5	1,10
Fenolindex	0,1	< 0,05

* állati és növényi zsiradék esetén a határérték háromszoros

Modern technológiával és berendezésekkel alakították ki az iszapstabilizáló rendszert, mely szennyvíziszapból biogázt, abból pedig, elektromos és hőenergiát termel. A telepen termelt biogáz újrahasznosítása környezetkímélő és energiatakarékos.

A Fővárosi Csatornázási Művek Zrt. különösen nagy gondot fordít a szaghatások megelőzésére. Több légtisztító rendszer is üzemel a telepen. A zárt terek nagy részéből elszívják a levegőt és bioszűrőn áramoltatják át. A bioszűrők segítségével naponta 2 millió m³ levegőt tisztítanak meg. A bioszűrők kulcsszerepet töltenek be a teljes észak-pesti régió, különösen a IV. kerület levegőminőségének védelmében. 2010-re a telep fejlesztésének második üteme, a tápanyag-eltávolítási fokozat kiépítése is befejeződött, mely megvalósuló létesítménynek köszönhetően a Dunába vezetett tisztított víz minősége jelentősen javult. A bővítés során a meglévő levegőtető medencék

átalakításával, illetve új műtárgyak építésével előzetes denitrifikációs rendszer épült ki [19].

2.5.2. A Dél-pesti szennyvíztisztító telep

2.5.2.1. A telep története

Magyarország első szennyvíztisztítójának helyét az Országos Tervhivatal jelölte ki 1952. december 23-án. A Pesterzsébet (XX. kerület), Kispest (XIX. kerület) és Pestlőrinc (XVIII. kerület) szennyvizeinek tisztítására tervezett telep folyamatosan épült, és 1966. szeptember 14-étől működik üzemszerűen. 1967-re az iszapkezelés is megvalósult.

A telep bővítése a múlt század 80-as éveiben folytatódott és mára hazánk egyik legkorszerűbb szennyvíztisztítójává vált.

1983-ban a tisztítómű hidraulikai kapacitása a beüzemelt újabb két párhuzamos biológiai tisztítósorral bővült, az évtized közepén megkezdődött az anaerob mezofil rothasztókban kezelt iszap gépi víztelenítése. 1986-tól a szükséges levegőbevitel a felületi levegőztetés helyett, a nagyobb hatékonyságú, finombuborékos légbefúvással történik. 1989-től megkezdődött a biogáz hasznosítása; a gázmotorok által előállított energia biztosítja az eleveniszapos rendszer légfúvóinak működését. 1990-ben építették ki a levegőztető egység átalakításával a többletfoszfor- eltávolítására. A hidraulikai kapacitás 1992-ben tovább bővült, amikor a szennyvíz zsír- és homoktartalmának eltávolítását is biztosító, új elő mechanikai egység megépült. A Fővárosi Csatornázási Művek Zrt.-ben 1997-ben megújult és kiegészült a szennyvíztisztítási és az iszapkezelési technológia. 1999-ben a víztisztító bővítésével és korszerűsítésével a telep alkalmassá vált a 80 ezer m³/nap szennyvíz teljes biológiai tisztítására, beleértve a kétlépcsős nitrogén- és foszforeltávolítást is. 2001-ben megújult és kibővült az iszapkezelési folyamat: megépült egy új, fedett, szagtalanító berendezéssel ellátott gravitációs sűrítő, üzembe álltak az iszap gépi sűrítésére és víztelenítésére szolgáló centrifugák, beüzemelték a képződő biogázból villamos energiát előállító gázmotort, és a szilárd töltetű biogáz-kéntelenítőt. 2005-ben átadták a magas szervesanyag-tartalmú hulladékfogadó, és-feldolgozó állomást, és megkezdte működését hazánk legnagyobb kapacitású, magas hőfokú, termofil iszaprothasztója, valamint egy új, nagyobb kapacitású gázmotor is. 2007-ben az eleveniszapos medencék levegő beviteli elemeinek

a kapacitásbővítése történt meg, új légfűvő egység kezdte meg működését, és megépült a víztelenített szennyvíziszap átmeneti tárolására szolgáló iszapsiló. 2009-ben szálanyag-leválasztó berendezés, új hőcserélő gépház kezdte meg a működését, átadták egy félüzemi ipari rothasztót. 2012-re elkészült a beérkező szennyvizet fogadó műtárgy lefedése. A szaghatások megfékezése érdekében bioszűrők működnek, melyek óránként 100 ezer m³ szagos levegőt közömbösítenek.

Szintén 2012-ben adták át a szennyvíztisztításban reformnak számító Organica Környezettechnológiák rendszert. 2012-ben a telepről távozó tisztított víz fertőtlenítésére szolgáló, korábbi klórozásos megoldást felváltotta a jóval biztonságosabb és környezetkímélőbb UV-fertőtlenítés [19].

2.5.2.2. A telep jellemzői

A Dél-pesti szennyvíztisztító telep a legkorszerűbb és a legkörnyezetkímélőbb technológiával működik. Pestszentlőrinc, Kispest, Pesterzsébet és Soroksár (XXIII. kerület) kb. 300 ezer lakosának, valamint az ott működő vállalkozásoknak a szennyvizét fogadja és tisztítja folyamatosan.

A tisztítótelep szennyvíztisztító kapacitása napi 80 ezer, évi 22 millió m³. Naponta átlagosan 53 ezer m³ szennyvíz érkezik a négy dél-pesti kerületből.

A szennyvíztisztítás egyik mellékterméke a víztelenített szennyvíziszap, aminek éves mennyisége a telepen 27,5 ezer tonna. Az iszapból évente keletkező 5,9 millió m³ biogázból elektromos és hőenergiát állítanak elő, ami a telep csaknem teljes energiaszükségletét fedezi. A szennyvíz tisztítása során keletkezett szerves hulladék mennyisége évente 700 m³. A telep 17 hektáron terül el.

A telep a többlépcsős mechanikai és biológiai, továbbá élőgépes technológiával kombinált szennyvíztisztítás eredményeként az EU-szabályozásnál jobb paraméterekkel rendelkező vizet juttat a Ráckevei-Soroksári Duna-ágba. Biztosítja a szennyvíztisztítás során keletkezett melléktermékek, az iszap és a mechanikai szennyeződések környezetbarát kezelését, és a tárolásra, illetve újrahasznosításra történő előkészítését.

Feldolgozza és zöldenergiává alakítja a beszállított szervesanyag-tartalmú hulladékot. Gyakorlatilag önellátó, hiszen szennyvíziszapból és szerves hulladékból megtermeli elektromos energiaigényének közel 90%-át, hőenergia-szükségletének pedig 100%-át. Tisztítja a technológiai folyamatok során képződő szagos levegőt.

Ez a szennyvíztisztító telep nemcsak a hagyományos kétfokozatú bioszűrést alkalmazza, hanem egy magyar fejlesztésnek, az Organica Környezettechnológiák Zrt. élőgépes rendszernek köszönhetően, élő növényzet és mesterséges gyökérrendszeren kialakult biofilm segítségével növelte a tisztítás hatásfokát és az európai szabványoknál jobb paraméterekkel rendelkező tisztított vizet enged a befogadó, Ráckevei-Soroksári Duna-ágba. Mára a telep a legkorszerűbb külföldi és a hazai szennyvíztisztítási tudást ötvözi és technológiájában, műszerezettségében és tisztítási összetettségében az európai élvonalba tartozik [19].

Elfolyó vízminőségi adatokat az 3. táblázat tartalmazza. A mintát 2014. január 14-15-én gyűjtötték a tisztított vízből, a Népjóléti ároknál.

3. táblázat A kezelt szennyvíz minőségét jellemző adatok a Dél-pesti szennyvíztisztító telepen [19]

Vízminőségi paraméter	Határértékek (mg/l)	Az elfolyó víz mért értékei (mg/l)
Dikromátos oxigénfogyasztás	80	28
Ötnapos biokémiai oxigénigény	25	< 10
pH	6,5 - 9,0	7,4
Szerves oldószer extrakt*	5	< 2
Összes lebegőanyag	35	3
Összes nitrogén V.1. - XI.15.	15	9,3
Összes nitrogén XI.16. - IV.30.	20	9,3
Ammónia-ammónium-nitrogén V.1. - XI.15.	2	3,17
Ammónia-ammónium-nitrogén XI.16.-V.30.	4	3,17
Összes foszfor	1,8	0,47
Fenolindex	0,1	< 0,05

* állati és növényi zsiradék esetén a határérték háromszoros

2.5.3. Telki szennyvíztisztító

2.5.3.1. A telep története

A 2004-ben épült telki tisztító 800 m³ vizet tisztít meg naponta átlagos működés mellett. Bár kevesebb, mint négyezren lakják, a Magyarország leggazdagabb településének számító Telki ötezer átlagos fogyasztónak megfelelő mennyiségű vizet használ el. A jelenleg működő tisztító kapacitása azonban akár nyolcezer fő szennyvizével is elbírna. A lakosság számához képest a nagy mennyiségű

vízfelhasználás elsősorban a városban található magánkórháznak köszönhető, mely nagymértékben befolyásolja mind a keletkező szennyvíz mennyiségét, mind összetételét.

A szennyvíztisztító telep üzemeltetését az Organica Környezettechnológiák Zrt. végzi, fix ágyas biofilmes, úgynevezett élőgépes technológiával, ami egy mesterséges ökoszisztéma, mely a felhasznált vizet még helyben megtisztítja, és újra használhatóvá teszi, miközben botanikus kert benyomását kelti.

2.5.3.2. A telep jellemzői

Az 1998 óta fejlesztett élőgépes rendszer tulajdonképpen a hagyományos biológiai víztisztítás továbbfejlesztése egy tápláléklánc felépítésével. Szennyvízzel, szerves anyagokkal, tápanyagokkal terhelt élővizek tisztántartására, szennyezett felszíni vagy felszín alatti vizek remediálására vagy szennyvíztisztításra kifejlesztett, intenzív biodegradáló aktivitással és stabilitással rendelkező, széles fajspektrumú, minden trófikus szint élőlényeit tartalmazó, mesterségesen kialakított közösség és élőhely.

A szennyvízből először kiszűrjük a szilárd szennyeződések, majd a klasszikus, eleveniszapos technológiához hasonlóan baktériumokkal végzik el a szerves anyagok bontását. A különbség abból ered, hogy a lebontás után az elhalt baktériumokból nem rögtön biomasszát képeznek (mint az iszapos megoldásnál), hanem bekapcsolják őket egy táplálékláncba. Az egyik baktériumfaj például szénhidrátokat bont le a vízben, majd ezekből egy másik élőlény táplálkozik, amelyet egy újabb fogyaszt el, míg egy negyedik baktérium a foszfátokban gazdag tisztítószerek anyagait használja fel, majd őt fogyasztja el egy újabb élőlény. A tápláléklánc tetején kisebb állatok és különböző növények állnak - ezekből áll össze aztán a látható botanikus kertszerű képződmény. A rendszer összességében jóval kevesebb iszap keletkezésével jár, ami komoly anyagi megtakarítást jelent. Az iszapot ugyanis nagy költségekkel lehet csak elszállítani, és viszonylag költséges megoldás abból biogázt fejleszteni. Eközben az élőlények nagy hatékonysággal kinyernek szinte minden szennyező anyagot a vízből. A megtisztított vizet vissza lehet engedni a természetbe, vagy - modern, városi felhasználási módszerrel - vissza lehet forgatni a háztartásokba, hűtőrendszerekbe vagy ipari felhasználásra.

Az élőgépes rendszer több, egymással sorba kapcsolt tartályból áll, melyeken keresztül folyamatosan áramlik a szennyvíz (2. ábra). A tartályok tetején rács van,

melyekre a tisztítási szakasznak megfelelő növényi együtteseket telepítenek. E növények gyökerei akár egy-másfél méter mélyre is benyúlnak a vízbe. A növényi gyökérzet helyett mesterséges műszálas alapú (például poliészter, polipropilén) biofilm hordozókat is alkalmaznak. Ez a természetes vagy mesterséges gyökérrendszer a tisztításban résztvevő mikroorganizmusok élettere, illetve menedékhelye.



2. ábra Az élőgépes rendszer folyamatábrázolása [20]

A szennyvíz összetételétől és a tisztítási igényétől függően a technológiai sor anaerob előtisztítóval, anoxikus zónával, illetve utótisztítóként fluidágyas ökoreaktorral egészül ki. Miközben a szennyvíz keresztülömlik a különböző tartályokon aerob körülmények között, élő mikroorganizmusok vonják ki belőle a szerves szennyezőket, és táplálékként használják fel őket. E mikroorganizmusok önszerveződő, illetve napenergia-hasznosító képessége a garancia a szennyezőanyagok lehető leghatékonyabb mértékű biológiai lebontására.

A bakteriális biomasszából álló lebegőanyagot egy ülepítőben tárolják el, míg egy ökológiai fluid ágy szolgál a kolloid méretű részecskék szeparálására.

Az élőgépes rendszerben keletkező biofilmek olyan baktérium populációk, melyeket valamely természetes mátrix köt össze egymással és kapcsol valamely felülethez. A vizsgálatok eredményei szerint a biofilm tulajdonságai jelentősen különbözhetnek a benne élő baktérium populációk tulajdonságaitól. Mind a természetes, mind a szintetikus vegyületek lebontása ezeknek a biofilmeknek a felületi rétegeiben történik.

A biofilm másodlagos kötőerőkkel megköti a vizekben rendelkezésre álló szerves és szervetlen anyagokat, majd a mikroorganizmusok enzimeket bocsátanak ki, és az emésztést extracelluláris szinten végzik el. Ez jelentős védelmet nyújt a mikrobák

számára, mert így a szervezetükbe csak a már lebontott és tápanyagként számításba jövő vegyületek kerülnek, továbbá a különböző populációk enzimeikkel kiegészíthetik egymást.

A biofilmek kialakulása és működése rendkívül hasznos a biológiai szennyvíztisztítás során (nehézfémek megkötése, szerves szennyezőanyagok lebontása), de ugyanakkor lehetővé teszi kórokozó baktériumtörzsek túlélését és alkalmazkodását a megváltozott környezeti feltételekhez. A biofilmben élő populációk esetén megfigyelték, hogy rendkívül gyors az adaptáció és ez antibiotikumok (és egyéb mutagén anyagok) jelenlétében elősegítheti a kórokozó baktériumok rezisztenciájának gyors kialakulását is.

2.6. Szennyvizekben levő gyógyszervegyületek és metabolitok meghatározására alkalmas analitikai kémiai mérés technikák

A környezetkémia és ezen belül a környezetanalitika napjainkban növekvő jelentőséggel bír, mivel a klasszikusnak vett szennyező anyagok mellett új keresztszennyező kategóriák jelentek meg a természetben, melyek a gyógyszermaradványokat is magukba foglalják. Az említett jelenség feltárásához nagyban hozzájárultak az új analitikai mérés technikák is, melyek lehetővé teszik e vegyületek meghatározását még a ng/l (ppt) koncentrációban is.

Világszerte a gyógyszermaradványokat sokfajta biológiai mátrixban vizsgálják (vizek, primer és tisztított szennyvizek, folyóvizek, tavak, üledékek és iszapok). Az, hogy ezek a vegyületek a vízfázisban maradnak, vagy szilárd részecskéken adszorbeálódnak, az a vegyületek hidrofilitásától függ. A vizsgált szennyezőanyagok legfontosabb forrásai a háztartások, kórházak, ipari egységek, és az állatfarmok [21]. Eddig egyetlenegy fontos negatív hatást figyeltek meg, nevezetesen azt, hogy a folyamatos szubletális dózisnak való kitettség baktérium törzseknél antibiotikum rezisztenciához vezetett vízi környezetben [22]. A gyógyszermaradványok jelenlétét szennyvíztisztító telepek kifolyó vizében számos irodalomban leírták már [23-28]. A legáltalánosabban használt mérés technikák a GC-MS, HPLC-MS, HPLC-DAD, HPLC-fluorimetria.

2.6.1. Gázkromatográfias módszerek

Azokat a gyógyszervegyületeket, illetve metabolitjaikat, melyek könnyen gázfázisba vihetők, előszeretettel határozzák meg GC-MS-technikával, hiszen a gázkromatográfia nemcsak gyorsabb a folyadékkromatográfiánál, hanem sok esetben a felhasznált anyagok és vegyszerek mennyisége, így a mérések költsége is kisebb. Az irodalomban számtalan cikk található gyógyszermaradványok meghatározásával kapcsolatban különböző mátrixokban, most azonban csak a szennyvízben történő meghatározásokra térek ki. A vizsgálatok egyik meghatározó lépése a mintaelőkészítés, ezért a szakirodalomban megjelent közlemények többnyire a különböző extrakciós technikák összehasonlítására, illetve a különböző származékképzési eljárások kifejlesztésére irányultak.

Magyarországon is számos vizsgálatot végeznek az ELTE munkatársai, trimetil-szilil származékok formájában határoztak meg egyszerre akár 81 különböző szennyezőt, köztük 18 természetes és mesterségesen előállított szteroidot szennyvizekben. A befolyó szennyvizekben többek között magas androszteron, koleszterol, és β -szitoszerol szintet mértek [29].

Szintén az ELTE-n **Sebők** és munkatársai hasonló vizsgálatokat végeztek SPE-GC-MS méréstechnikával, amikor is egyidejűleg 63 vízoldható szennyező származékát határozták meg hat hónapon keresztül mintázott szennyvizekben, és kéthavi mintavétellel a Duna vizében. Többek között karbamazepint, epesavakat, benzoésavat, egyéb szerves savakat, telített és telítetlen zsírsavakat és ftalátokat vizsgáltak. Igazolták, hogy a mintaelőkészítés során is legfőképp ftalátok és zsírsavak kerülhetnek bele az analitikai rendszerbe, mind a felhasznált vegyszerekből, mind az SPE-oszlopkokról, tehát minden esetben szükségesek a minták készítése és azok elemzése [30].

Sebők és munkatársai nem-szteroid gyulladáscsökkentőket is vizsgáltak szennyvizekben. Meghatározták az ibuprofen, ketoprofen, naproxen és diklofenák koncentrációját ugyancsak trimetil-szilil származékként. Négyfajta származékképző szert alkalmazva választották ki a méréshez legalkalmasabb HMDS+TFA kombinációt. Mind a kifolyó, mind pedig a befolyó vizekben mérték ezeknek a vegyületeknek a koncentrációját [31].

Ez a kutatócsoport vizsgálta a leggyakrabban előforduló hat epesav jelenlétét a szennyvizekben. A mintaelőkészítés során a vegyületek oximálását és szililezését

végezték. A szennyvízben összepesav tartalmat adtak meg. Megfelelő pH-n végzett Oasis HLB SPE-oszlopon történt dúsítást követően végezték az analízist. A vizsgált vegyületeket a Duna vizében is sikerült módszerükkel kimutatni [32].

Andrási és munkatársai szintén szintetikus és természetes szteroidokat, valamint epesavakat határoztak meg szennyvizekben, azonban munkájuk célja három különböző analitikai technika összehasonlítása, így a mintákat vizsgálták tömegspektrometriás detektálással, FS-, SIM- és MRM-módban. Azt kapták, hogy MRM módban a legpontosabb a vegyületek meghatározása, hiszen elkerülhető a vegyületek túlbecslése, vagyis az ál pozitív eredmények számításba vétele [33].

Weigel és munkatársai savas, semleges és bázikus gyógyszereket, mint például koffein, ibuprofen, klofibrát, és diklofenák, valamint ösztrogént egyaránt vizsgáltak felszíni vizekben 7 különböző SPE-szorbenst alkalmazva. Oasis HLB oszlopon 70-100 % közötti visszanyerést kaptak a vegyületek felszíni vizekből történő GC-MS analízisekor. A kimutatási határ ng/l nagyságrendű koncentráció értéknek adódott minden esetben, a detektált mennyiségek pedig 0,1-0,001 µg/l között voltak [34].

Lin és kutatócsoportja számos gyógyszer-molekulát (köztük karbamazepint, klofibrátot, ibuprofent, naproxent, ketoprofent, diklofenákot) határozott meg szennyvizekben. A minta-előkészítés során azt kapták, hogy az Oasis HLB a leghatásosabb a SPE-GC-MS optimalizációjakor, 50-108 %-os visszanyerést kaptak csapvízben, 1-10 %-os szóráshatárral. Kifolyó szennyvízben 0,030-0,42 µg/l koncentráció értékeket találtak [35].

Möder és munkatársai különböző SPME-rostokat (poliakrilát, C18, és Carbowax-DVB) próbálták ki gyógyszer-maradványok meghatározására. Vizsgálták az ibuprofen, a paracetamol, a fenazon, a karbamazepin, és többféle xenoösztrogén jelenlétét folyóvizekben. Az eredmények azt mutatták, hogy a Carbowax és a poliakrilát a leghatékonyabbak a minta-előkészítés során, az optimális extrakciós idő pedig 30 perc. A kimutatási határok az egyes vegyületek esetén 0,2-50 µg/l-nek adódtak [36].

Lee és munkatársai anion-cserélő csoportokat tartalmazó töltetet használtak, melyet savas gyógyszer-molekulák (például ibuprofen, szalicilsav, paracetamol, fenazon, karbamazepin, és különböző fenolok) szennyvízből történő meghatározására alkalmaztak. Ez az általuk vizsgált vegyületekre jobb szelektivitást biztosított, mint a C18-csoportok. Ennek az alkalmazását korlátozza azonban, hogy kizárólag savas

vegyületek esetén használható. Kifolyó és befolyó szennyvizek vizsgálatokor elsőként igazolták fenolok jelenlétét a befolyó szennyvízben [37].

Tauxe-Würsch és munkatársai mefenaminsav, ibuprofen, ketoprofen, diklofenák, klofibrát meghatározásához ENVI-18 fordított fázist használtak az SPE extrakcióhoz szennyvízmintáknál, melyet trietilamin származékolással, GC-MS-technikával mértek. Több (4-7) napon keresztül vizsgálták az általuk választott szennyvíztisztító hatékonyságát a vegyületek eltávolítására. Azt kapták eredményül, hogy az ibuprofen esetén a hosszantartó esőzés rontja az eltávolítási hatásfokot [38].

Jux és munkatársai 27 folyó vizének, valamint ivóvizek gemfibrozil, klofibrát, diklofenák, ibuprofen, ketoprofen, indometacin, és fenoprofen tartalmát is vizsgálták. Kutatásaik szerint a kimutatási határ kisebb, ha a származékképzést trimetil-szulfonil-hidroxiiddal (TMSH) végezték, mint ha azt tetrametil-ammónium-hidroxiiddal (TMAH) végezték volna SPE-GC-MS-technikát alkalmazva. TMSH-t használva kismolekulájú melléktermék nem voltak detektálhatóak, azok az oldószercsúcsban maradnak. TMAH-t használva melléktermékként anilin keletkezett, ami hasonló retenciós idővel interferálhat a meghatározandó vegyülettel. A diklofenák 10 mintában is előfordult maximum 0,015 µg/l koncentrációban, a vizsgált 8 ivóvízben azonban semelyik vegyületet nem tudták kimutatni [39].

Huggett és mtsai az USA-ban Mississippi, Texas és New York állam területén néhány β-blokkolót (metoprolol, nadolol, propranolol) határoztak meg szennyvízből SPE-GC-MS-technikával. A származékképzést N-metil-N-trimetilszilil-trifluoroacetamiddal végezték. A visszanyerés 85-94 % között volt, a szórás 8-10 %-osnak adódott. Minden vizsgált kifolyó víz mintában sikerült propranololt kimutatniuk, igaz minden esetben maximum 1,9 µg/l koncentrációban. Metoprololt és nadololt a minták 71 %-ában találtak maximum 1,2 µg/l illetve maximum 0,36 µg/l mennyiségben [40].

Rodriguez és kutatócsoportja öt savas karakterű nem-szteroid gyulladáscsökkentő vegyületet vizsgáltak (ibuprofen, ketoprofen, naproxen, tolfénaminsav, diklofenák) szennyvizekben. Kutatásaik szerint butil-dimetilszililációval nagy stabil származékokat lehet képezni. Oasis HLB oszlopon történt SPE után az analízist GC-MS-sel végezték. Visszanyerés vizsgálataik során 90-115 %-os értékeket kaptak. A kimutatási határ 0,02-0,05 µg/l-nek adódott a vegyületek esetén. A kifolyó és a befolyó vízben egyaránt ibuprofent és naproxent is ki tudtak mutatni [41].

Verenitch és mtsai SPE-GC-MS/MS módszert optimalizáltak savas karakterű gyógyszermolekulák (például acetilszalicilsav, ibuprofen, gemfibrozil, fenoprofen, naproxen, ketoprofen, diklofenák,) és koffein szennyvízből és felszíni vizekből történő meghatározására. A származékképzést metilezéssel végezték, kivéve a koffein esetén, amelyet közvetlenül mértek. A kimutatási határok 0,5-20 µg/l között voltak [42].

Bound és munkatársai GC-MS-technikával vizsgáltak gyógyszermolekulákat Anglia dél-keleti részén levő szennyvíztisztítók vizében és felszíni vizekben. A meghatározott vegyületek között volt az ibuprofen, paracetamol és a salbutamol is. A mintaelőkészítést SPE-vel végezték, a származékképzéshez N-metil-N-trimetilszilil-trifluoroacetamidot alkalmaztak. Az elemzett vegyületekre a kimutatási határok 0,002-0,004 µg/l között voltak. Minden vizsgált mintában sikerült a három vegyület mennyiségileg meghatározni, és a legnagyobb koncentrációban az ibuprofent találták, maximum 3 µg/l mennyiségben. Az általuk kapott eredmények jó egyezést mutattak a már az Egyesült Királyságban és Európában közölt adatokkal [43].

2.6.2. Folyadékkromatográfiai módszerek

Sok esetben a már fent említett gyógyszermaradványok nem vihetők gázfázisba, illetve még származékképzéses eljárással is bonyolult volna meghatározni őket, ezért tehettek nagy népszerűsége szert a folyadékkromatográfiai módszerek. A poláris, jól oldódó vegyületek meghatározására a fordított fázisú HPLC-s eljárások a leggyakrabban alkalmazott mérés technikává léptek elő. Ezt bizonyítja az irodalomban felelhető közlemények nagy száma.

2.6.2.1. Diódasoros UV-detektálás

Gonzalez-Barreiro és munkatársai savas és semleges gyógyszervegyületek szennyvízben történő egyidejű meghatározását hajtották végre HPLC-fluorimetriás módszerrel 90-115 % visszanyeréssel. 6 vegyületet határoztak meg SPE-HPLC-DAD-rendszerrel, valamint on-line kapcsolt FD-vel ibuprofen és naproxen esetében [44].

Babic és mtsai SPE-HPLC-UV módszerrel határozott meg állatgyógyászatban is sokszor használt antibiotikumokat, úgymint tetraciklint, penicillin-származékokat, enrofloxacint, és szulfonamidokat szennyvízben, 6,38-97,9 %-os visszanyeréssel,

kivéve a szulfaguanidint, melyre mindössze 11,3 %-os eredményt kaptak. A kimutatási határok 1,5-100 µg/l között alakultak gyógyszermolekuláktól függően [45].

2.6.2.2. GC-MS- és HPLC-MS-technikák összehasonlítása

A bonyolultabb felépítésű mérés technikák (GC-MS, HPLC-MS) környezetanalitikában való alkalmazása lehetővé teszi a vegyületek szélesebb koncentráció határok közötti meghatározását, beleértve a gyógyszermolekulákat is, így biztosítva a környezeti szennyezők széleskörű értékelését. Mind a GC-MS/MS, mind a HPLC-MS/MS a legáltalánosabban használt módszerekké léptek elő a gyógyszeranalízisben, nagy érzékenységük és szelektivitásuk miatt. Lehetővé teszik az elválasztást olyan vegyületek esetén is, melyek molekulatömege megegyezik, de mérés során különböző ion keletkezik belőlük.

Ahogyan *Petrovic* és munkatársai említik, mind a GC-MS-, mind az HPLC-MS-technikáknak vannak hátrányai. Például GC-MS-analízis során a poláris gyógyszermolekulákat gázfázisúvá kell alakítani, mialatt nagy toxicitású és karcinogén diazometán vagy kevésbé veszélyes savanhidridek, benzil-halogenidek és alkilformiátok keletkeznek. Az alkalmazott HPLC-MS-technika érzékenysége azonban valamivel kisebb [46].

Ternes közvetlenül hasonlította össze a GC-MS-technikát az HPLC-ESI-MS/MS-technikával, és mutatott rá arra, hogy egyedül az HPLC-MS/MS-technika teszi lehetővé rendkívül poláris vegyületek elemzését (például β-blokkolók, mint atenolol, sotalol), mivel ezek funkciós csoportjainak gázfázisúvá alakítása nem teljes. Abban az esetben, amikor a szennyvízhez hasonló erősen szennyezett mintákat analizálunk, akkor az ESI hatásfoka jelentősen csökkenhet. Így ahhoz, hogy garantálni lehessen a mérések reprodukálhatóságát, illetve a pontosságát, nemcsak hatékony tisztítási lépést kell beiktatni a mintaelőkészítésbe, hanem a megfelelő standardon is el kell végezni a mintaelőkészítés lépéseit [47].

Farré és munkatársai néhány savas és nagyon poláros analgetikus vegyület (szalicilsav, ketoprofen, naproxen, diclofenák, ibuprofen, gemfibrozil) monitorozására párban használt GC-MS- és HPLC-MS-technikát felszíni és szennyvizekben. Az eredmények jó korrelációt mutattak a módszerek között, kivéve a gemfibrozil esetében, melynek a származékképzése nem volt teljes néhány mintában. Az általuk mért

vegyületekre elmondható, hogy a kimutatási határ HPLC-MS/MS esetén kicsit rosszabb, mint GC-MS-technikánál, bár az HPLC-MS-nél megemlíthető előnyként hogy gyors, többféle vegyület mérhető, illetve, hogy a mintaelőkészítés sokkal egyszerűbb, mint a GC-MS-technikánál [23]. Ahhoz, hogy növelni tudjuk a szelektivitást és elkerüljük az ál pozitív eredményeket, az egyik lehetőség a TOF-MS használata [48].

2.6.2.3. Tömegspektrometriás detektálási lehetőségek

Összehasonlítva a TOF-MS és a tripla-kvadrupol-MS analitikai teljesítőképességét gyógyszervegyületek szennyvizekben történő analízisének, **Benotti** és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy az HPLC-TOF-MS érzékenysége SIM-módban gyakran megközelíti azt az értéket, amit tripla-kvadrupol-MS esetén SRM módban kapunk. Azonban az egyik legfontosabb hátránya az HPLC-TOF-MS kvantitatív méréseknél történő alkalmazásának az, hogy szignifikánsan kisebb a linearitás tartománya a kvadrupol műszerekhez képest. Az azonosítani kívánt vegyület azonosságának igazolására bonyolult mátrixban azonban a kvadrupol-TOF-MS-technika a legalkalmasabb, hiszen ez a módszer képes megadni mind a szülő, mind a lányvegyületek pontos tömegét, valamint teljes spektrum felvehető a keletkező ionokról [49].

Stolker és munkatársai tripla-kvadrupol-MS és Q-TOF-MS-technikát alkalmazva bizonyították különböző gyógyszermaradványok, úgymint chloramphenicol, erytromycin és szulfametoxazol jelenlétét felszíni vizekben, ivóvízben és talajvizekben. Méréseik alapján mindkét módszer alkalmas erre a célra, és megfelelő eredményt nyújtanak, bár a tripla-kvadrupol-MS kimutatási határai fél nagyságrenddel jobbak [50].

Míg a legtöbb szerző az ESI módban történő mérést részesíti előnyben, mivel ez a módszer kiváló mind poláros, mind nem poláros és termolabilis vegyületek vizsgálatára, **Pfeifer** és munkatársai, valamint **Horimoto** és kutatócsoportja APCI-módot alkalmazott, amely hőre könnyen bomló vegyületeknél használható [51-53].

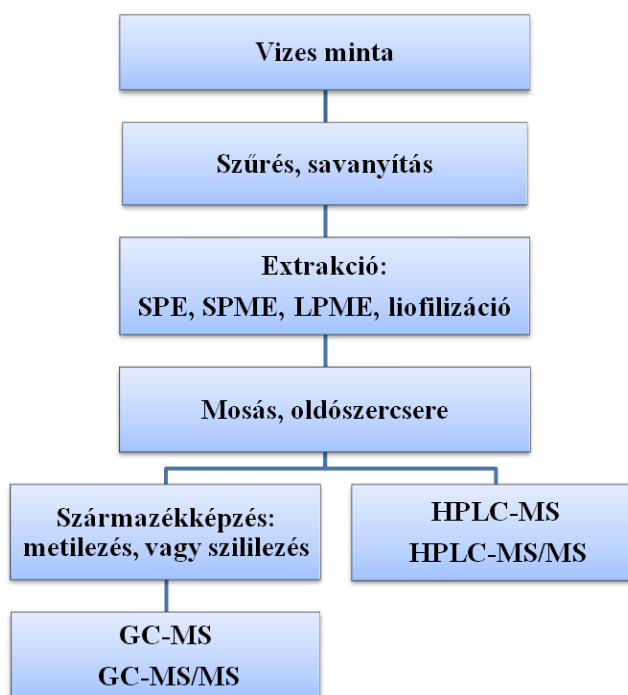
2.6.2.4. Mintaelőkészítés

A megfelelő módszer kiválasztása mellett a mintaelőkészítés nagyon fontos lépés az analízis során. Különböző módszereket fejlesztettek ki és optimalizáltak, de a legelterjedtebb az SPE. Emellett SPME-t és LPME-t, sőt liofilizációt is alkalmaznak

[47,54,55]. Leginkább Oasis HLB, Strata-X, Lichrolut C18 SPE-szorbenseket választanak a dúsítására és a vízminták tisztítására [29-34]. Azért alkalmazzák ezeket, mert sokkal jobb visszanyerési eredményeket mutatnak mind poláris, mind nem poláris vegyületeknél, és a kapacitásuk is sokkal nagyobb, mint az alkil-láncokkal módosított szilikátoknak.

Abban az esetben, ha egy gyógyszermolekula savas csoportot tartalmaz, és semleges pH-n leginkább ionos formában van jelen, akkor a vizes minta savanyítása a savi disszociáció visszaszorítása miatt szükséges [56]. A környezeti mintában levő mátrix vegyületek jelenléte csökkenti a kinyerés hatékonyságát. Ezért általában a vizes mintákat 0,45 µm vagy 0,2 µm pórusátmérőjű üvegyapot szűrőn szűrik át.

A 3. ábra a gyógyszermaradványok vizes mátrixban történő meghatározására alkalmas analitikai kémiai munkafolyamatot szemlélteti.



3. ábra Analitikai kémiai munkafolyamat gyógyszermaradványok vizes mátrixban történő meghatározására

Gyógyszermolekulák szennyvízben történő meghatározása általában magába foglalja az on-line SPE-módszert kis pH-n [57]. A megfelelő szilárd fázis kiválasztása nehéz feladat, mert a kapott visszanyerési érték néhány vegyület esetében nagyon alacsony lehet. A 4. táblázatban találhatóak összefoglalva az irodalomban található analitikai technikák és a mért vegyületek.

4. táblázat Gyógyszerek meghatározására alkalmazott analitikai módszerek főbb jellemzői

Gyógyszermolekula	Mintaelőkészítés	Származékképzés	Oldószer	Analitikai mérés-technika	LOD (µg/l)	Hivatkozás
víz mintákban						
Diklofenák, Ketoprofen, Naproxen, Ibuprofen, Indometacin, Klofibrát, Bezafibrát, Gemfibrozil, Fenofibrát, Carbamazepin, Pentoxifillin, Diazepam	SPE (RP-C18)	Pentafluoro-benzil-bromid	Aceton	GC-MS	0,003-0,010	[41]
Fenazon, Metoprolol, Propranolol, Atenolol, Sotalol, Bisoprolol, Salbutamol, Klenbuterol, Terbutalin, Izofoszfamid, Simvasztatin	SPE (PPL-Bond Elut)	-	Metanol	HPLC-MS/MS	0,002-0,013	[41]
Szulfametoxazol, Szulfadimidin, Metronidazol, Trimetoprim	SPE (Isolute ENV+)	-	Acetonitril-víz	HPLC-MS/MS	0,001-0,003	[41]
Dapson	SPE (Isolute ENV+)	-	Acetonitril-víz	HPLC-MS/MS	0,001-0,003	[41]
Kloramfenikol, Erytromicin, Roxitromicin, Claritromicin, Spiramicin,	SPE (Isolute ENV+)	-	Acetonitril-víz	HPLC-MS/MS	0,002-0,005	[41]
Amoxicillin, Penicillin, Oxacillin, Kloxacillin, Nafcillin	SPE (Isolute ENV+)	-	Acetonitril-víz	HPLC-MS/MS	0,004-0,007	[41]
Gemfibrozil, Klofibrát, Etofibrát, Diklofenák, Ibuprofen, Ketoprofen, Indometacin	SPE (LiChrolut-EN)	TMSH TMAH Diazometán	Metanol, etil-acetát	GC-MS	0,003-0,012	[38]
Ibuprofen, Klofibrát, Diklofenák	SPE (Oasis HLB, LiChlorut-EN)	Metil-klórmetanoát	Aceton, etil-acetát, hexán	GC-MS	0,05-0,38	[34]
Ibuprofen	SPME	-	Aceton, hexán	GC-MS	2-50	[36]

Gyógyszermolekula	Mintaelőkészítés	Származékképzés	Oldószer	Analitikai méréstechnika	LOD (µg/l)	Hivatkozás
víz mintákban						
Paracetamol, Fenazon, Carbamazepin	SPME	-	Aceton, hexán	GC-MS	0,200-50	[36]
Ibuprofen, Paracetamol, Fenazon, Carbamazepin	SPE (LiChrolut-EN)	BSTFA	Hexán, aceton	GC-MS	-	[37]
Piroxikám, Ketorolak, Klofibrát, Naproxen Bezafibrát, Fenofibrát Ibuprofen, Diklofenák	LPME	-	Metanol, oktanol	HPLC-MS/MS	0,005-0,042	[65]
szennyvíz mintákban						
Ibuprofen, Diklofenák, Ketoprofen, Naproxen	SPE Oasis HLB	N-metil-N-trifluoro-acetamid	Metanol, etil-acetát	GC-MS	0,020-0,050	[41]
Főképp szintetikus és természetes szteroidok, összesen 81 vegyület	SPE Oasis HLB	TMS	Metanol	GC-MS	0,006-0,013	[29]
Paracetamol, Karbamazepin, benzoésav, karboxi-savak, telített és telítetlen zsírsavak, összesen 63 vegyület	SPE Oasis HLB	TMS	Metanol	GC-MS	0,003-0,180	[30]
Ibuprofen, Ketoprofen, Naproxen, Diklofenák	SPE Oasis HLB	HMDS+TFA	Metanol	GC-MS	0,001-5,75	[31]
Kólsav, Litokólsav, Kenodezoxikólsav, Urodezoxikólsav, 3-hidroxi-7-ketokólsav, Dehidrokólsav	SPE Oasis HLB	HMDS+TFA	Metanol	GC-MS/MS		[32]
Tesztoszteron, Androszteron, β-szitoszterol, Etinil-ösztadiol, Mestranol, Levonorgestrel, Kólsav, Litokólsav, összesen 26 vegyület	SPE Oasis HLB	TMS	Metanol	GC-MS/MS		[33]

Gyógyszermolekula	Mintaelőkészítés	Származékképzés	Oldószer	Analitikai mérés technika	LOD (µg/l)	Hivatkozás
Klofibrát, Bezafibrát, Gemfibrozil, Fenofibárt, Atenolol, Metoprolol Sotalol, Betaxolol	SPE Isolute C18	-	Acetonitril, metanol	HPLC-MS	0,017-1,25	[60]
Claritromycin, Eritromycin, Ofloxacin, Szulfametoxazol, Ibuprofen, Atenolol, Diazepam Carbamazepin, Omeprazol	SPE Oasis MCX és LiChrolut En	-	Aceton, metanol acetonitril	HPLC-MS	0,1-5,2	[61]
Carbamazepin, Indometacin, Ibuprofen, Naproxen, Diklofenák, Acetaminofen, Propranolol, Atenolol, Eritromycin	SPE Oasis HLB	-	Etil-acetát, acetonitril, metanol	HPLC-MS	0,004-0,047	[62]
Szulfaguanidin, Szulfasalazin, Szulfacetamid, Szulfametoxazol, Szulfadiazin, Szulfapiridin	SPME és Carbowax	-	Acetonitril metanol	HPLC-MS	0,009-0,055	[64]
víz- és szennyvíz mintákban						
Klaritromycin, Eritromycin, Szulfametoxazol, Trimetoprim, Penicillin, Klóramfenikol, Oxytetraciklin	Liofilizáció	-	Etanol, metanol	HPLC-MS	0,020	[55] [59]
Penicillin, Ciprofloxacín, Ofloxacin, Szulfametoxazol, Tamoxifen	SPE Oasis HLB	-	Metanol	HPLC-MS	0,010-0,020	[63]
Acetilszalícilsav, Ibuprofen, Gemfibrozil, Naproxen, Ketoprofen, Diklofenák	SPE LC-18	BF ₃ /metanol	Metanol	GC-MS	0,001-0,01	[42]
Paracetamol, Ibuprofen, Salbutamol, Propranolol	SPE (LiChrolut ENV+)	N-metil-N-trimetilszilil-trifluoroacetamid	Metanol, hexán	GC-MS	0,002-0,004	[43]

LOD=kimutatósi határ

Liofilizálást alig használnak SPE helyett [22,53,54], de Ternes 54-108 %-os visszanyerésről számolt be antibiotikumok esetében, míg SPE-t alkalmazva, 15-120 %-ról [47]. A minta betöményítését HPLC-s, vagy GC-s elválasztás és detektálás követte. A választáshoz segítséget nyújt, hogy míg a GC jobb kimutatási határral rendelkezik, sok esetben a gyógyszermolekulákat egy újabb lépésben először illékonyvá kell alakítani. A gyógyszervegyületek egy csoportja termolabilis, így elbomlik a GC-analízis alatt. Ilyen például a karbamazepin [57].

Sacher és munkatársai 6 különböző módszert írtak le SPE-GC-MS- (savas vegyületeknél származékképzést alkalmazva) és HPLC-ESI-MS/MS-technikát használva víz- és szennyvíz-mintákon. Savas és semleges gyógyszermolekulákat extraháltak és határoztak meg a fent említett két módszerrel. A visszanyerés 60 % körüli, kivéve a gemfibrozil (46 %), klofibrát (33 %), szulfametoxazol (40 %), norfloxacin és ciprofloxacín (34-35 %) esetében [58].

Hirsch és munkatársai számos antibiotikumot határoztak meg kifolyókból, folyóvizekből, dúsítást, liofilizálást és HPLC-MS-t alkalmazva [59].

Hernando és munkatársai SPE-HPLC-MS/MS-t használtak szennyvizek vizsgálatára. A visszanyerés több mint 60 % körül adódott. Az alacsonyabb visszanyerés feltehetőleg a mátrix hatásának tudható be (például betaxolol esetében) [60].

Castiglioni és kutatócsoportja kifejlesztettek egy kétlépéses extrakciós módszert SPE-HPLC-MS/MS gyógyszermaradványok szennyvizekben lévő koncentrációjának meghatározásához több mint 70 %-os visszanyeréssel, kivéve amoxicillin (36 %), eritromicin (50 %), spiramicin (56 %), ciprofolxacin (30 %) esetében [61].

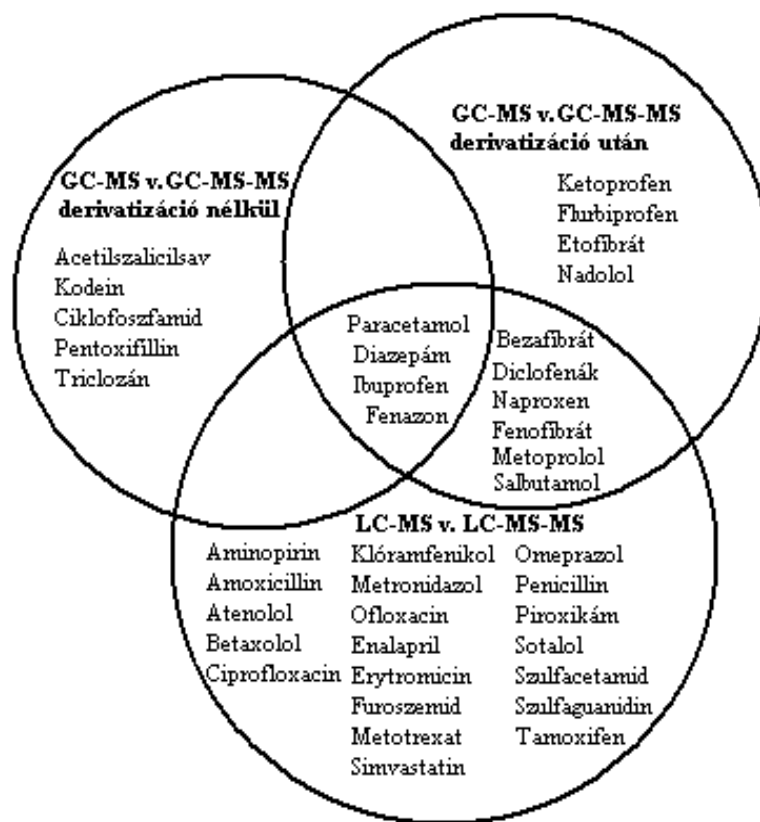
Gomez és munkatársai kidolgoztak egy olyan analitikai módszert, melyben a szilárd fázisú extrakciót pH=7-en végzik, és a kórházi kifolyó vizet HPLC-MS módszerrel elemezték több mint 75 %-os visszanyeréssel [62].

Brown és munkatársai antibiotikumokat határoztak meg kórházi kifolyó szennyvízből, városi szennyvízből és felszíni vizekből SPE-HPLC-MS-t alkalmazva [63].

Balakrishnan és munkatársai szulfonamid antibiotikumokat vizsgáltak szennyvizekben SPE-HPLC-MS-technikával 59-111 %-os visszanyeréssel. Ez annak köszönhető, hogy az SPE alkalmazása csökkenti a mátrixhatást [64].

A 4. ábrán a legáltalánosabb gyógyszervegyületek meghatározására alkalmas analitikai módszereket foglalja össze.

Mára számos analitikai módszert fejlesztettek ki és optimalizáltak víz és szennyvíz mátrixra, megcélözva a nagyobb precizitást és szelektivitást, azzal a céllal, hogy a vízi környezetben jelenlevő gyógyszermaradványok kis koncentrációi kvantifikálhatók legyenek. Különböző alternatív módszereket és extrakciós anyagokat, származékolást, és tisztítást vizsgáltak, hogy a mátrix hatását minimalizálják a mintaelőkészítést követő GC-MS, HPLC-MS analízis alatt.



4. ábra A legáltalánosabb gyógyszervegyületek meghatározására alkalmas analitikai technikák [47]

Egyidejűleg minimalizálták a mintaelőkészítés idejét és költségét, illetve a felhasznált toxikus reagensek mennyiségét. Manapság az SPE a legnépszerűbb, legjobban kialakított mintaelőkészítési eljárás, amihez a legnagyobb szelektivitás társul. Az alternatív technikákat, mint SPME, LPME napjainkban többször használják, köszönhetően számos előnyüknek úgy, mint a sebesség, a könnyű mintakezelés, a

minimális oldószerhasználat. Azonban ezekhez a technikákhoz használatos eszközök, illetve az alkalmazott szálak fejlesztése és a technika automatizálása még folyamatban van, de jelenleg is alternatívát kínálnak az SPE-elválasztás mellett [65].

Annak ellenére, hogy ma már elérhetők olyan műszerek, melyekkel gyorsan, pontosan és szimultán, nagyszámú gyógyszervegyület meghatározható komplex környezeti mátrixokban, kihívást jelent a kutatóknak nemcsak a vegyületek kémiai tulajdonságainak sokfélesége, hanem az kis koncentráció, ami általában ppt, ppb nagyságrendet jelent, és a mátrixok komplexitása is, ami szintén megnehezíti a mérést. Növekvő számú és intenzív kutatások szükségesek ahhoz, hogy felbecsüljük a gyógyszerek hatását, illetve hogy határt szabjunk a szennyvízben való jelenlétüknek, hogy ne kerülhessenek a felszíni vizekbe és végül az ivóvízbe.

2.7. Metamizol-nátrium metabolitjainak speciációjára alkalmas analitikai módszerek

A metamizol-nátrium és a hozzá hasonló poláris és közepesen poláris vegyületek meghatározását általában HPLC-MS-technikával végzik [66]. A környezetben, kis koncentrációban való jelenlétüknek köszönhetően, kritikus lépés a minták dúsítása, amit általában SPE-vel oldanak meg [66]. Különböző ellenőrző vizsgálatokkal kimutatták a dipiron metabolitok jelenlétét kommunális szennyvíztisztító telepek szennyvizeiben [66, 67,]. Sőt, e metabolitok jelenlétét már a kifolyó szennyvizekben és felszíni vizekben is igazolták [68, 69].

Feldmann és kutatócsoportja a metamizol előfordulásának és sorsának vizsgálatát végezte el egy berlini katonai kórház befolyó szennyvizében, továbbá a városi szennyvizet befogadó szennyvíztisztító telepeken. Naponta vettek mintát a befolyó és kifolyó vízből 2008 áprilisában, augusztusában és februárjában. A kifolyóból és a befolyóból származó mintákat akkora időeltolódással gyűjtötték, ami megfelelt a tisztító műre jellemző átfolyási időnek. Az SPE-t követően a metanolos oldatot 4°C-on két hétig is tárolható volt. A mintaelőkészítést egy, korábban közölt módszer szerint végezték [70], majd a mérést HPLC-MS-rendszerrel pozitív ionizációs módban végezték. A mintákat először 0,45 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrték, hogy elkerüljék az SPE-oszlopok elzáródását. A mennyiségi meghatározáshoz 250 ml szennyvízmintához 25 µl 0,001 µg/l koncentrációjú dehidrokoleszterol (DHC) belső standardot adtak. Az SPE-elválasztást RP-C18-as oszlopon végezték, és a végső oldat

800 µl-ét használták a HPLC-MS-vizsgálathoz. A HPLC-elválasztáshoz RP8-as oszlopot alkalmaztak, az áramló fázis 15 % acetonitrilt, 38 % metanolt és 47 % vizet tartalmazott. A mért koncentráció értékeket összegezve adták meg a három vegyületre a három vizsgált időpontra vonatkozóan [71]. A kapott koncentráció értékeket az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat 4-AAA-ra és 4-AA-ra kapott összegzett koncentrációértékek öt különböző mintavételi helyen, három időpontban, kommunális szennyvíztisztítók vizében Berlinben [71]

Mintavétel helye	I. mintavétel (04/09–04/15) Átlagérték (középérték) (µg/l)	II. mintavétel (01/29–02/04) Átlagérték (középérték) (µg/l)	III. mintavétel (08/05–08/11) Átlagérték (középérték) (µg/l)
Scharnhorst utca	-	1,55 (1,14)	0,98 (0,74)
Boyen utca	70,6 (78,3)	57,1 (57,2)	77,4 (81,5)
SPS	7,62 (7,52)	8,37 (8,24)	11,56 (11,60)
Befolyó Ruhleben	4,68 (4,80)	6,11 (6,00)	7,44 (7,44)
Kifolyó Ruhleben	3,99 (4,26)	4,87 (4,92)	4,48 (4,66)

Zuehlke és munkatársai egyszerű és gyors módszert közöltek tíz poláris gyógyszermolekula meghatározására csapvízben, felszíni vizekben és szennyvízben egészen 0,01 µg/l koncentráció határig. SPE-HPLC-MS-módszerrel dolgoztak, melynek során a mennyiségi meghatározásához belső standardot alkalmaztak. A mért vegyületek között szerepel a 4-AAA, 4-MAA, és 4-FAA is. A mintákat üvegedényekbe gyűjtötték és 24 órán belül analizálták, vagy maximum két napig 4 °C-on tárolták. A mintákat a berlini szennyvíztisztító befolyó, illetve kifolyó részéről vették. A felszíni vízmintákat szintén felszíni víztisztító telepekről szerezték be, ahol foszfáteliminációt végeztek. Így ezekről a területekről is mind befolyó, mind kifolyó részről vettek mintát. Standardoldatok segítségével kalibrációt készítettek 0,02-10 µg/l tartományban. A mérésekhez 250 ml mennyiségű mintát használtak fel minden esetben. Az SPE-hez RP-C18 oszlopokat használtak, melyeket 2×10 ml metanollal, 2×10 ml 4 g/l kálium-karbonát pufferrel és 10 ml pH=5,4-jú desztillált vízzel kondicionáltak. Az extrakciót 10 ml/perc

áramlási sebesség mellett végezték. Az eluáláshoz 1,6 ml metanolt alkalmaztak, majd az MS-készülékbe 10 µl oldatot injektáltak. A méréseknél DHC belső standardot alkalmaztak [70]. A 6. táblázat az MS-rendszer működési paramétereit, a 7. táblázat a kapott eredményeket tartalmazza.

6. táblázat A meghatározáshoz használt MS-módszer MRM beállításai, és az egyes vegyületekre kapott retenciós idők [70]

Metabolit	retenciós idő (perc)	prekurzor ion (m/z)	kónusz feszültség	ütközési energia (V)	vizsgált ion (m/z)
4-MAA	2,30	232,1	27	12	113,0
4-AAA	2,56	246,1	30	15	228,1
4-FAA	2,56	232,1	30	12	214,2

7. táblázat A vizsgálat során kapott értékek a Ruhleben szennyvíztisztító telep vizéből Berlinben (2002. június 4 és július 14 között) [70]

Metabolit	LOQ	befolyó		kifolyó	
		maximum	középérték	maximum	középérték
(µg/l)					
4-MAA	0,02	-	-	-	-
4-AAA	0,02	8,80	6,65	7,00	5,30
4-FAA	0,02	1,90	1,30	2,00	1,40

LOQ=meghatározási határ

Bueno és munkatársai szennyvizekben megtalálható 56 szerves szennyezőanyag meghatározását írták le, melyből 38 gyógyszermolekula és 10 a választott vegyületek metabolitja. A tapasztalatoknak megfelelően a dipiron és annak metabolitjai nagy mennyiségben azonosították. A szennyvízmintákat Spanyolország különböző pontjain vették, Barcelonában, Madridban, és Almeriában (Dél-Spanyolország). Nyers, ülepített, és biológiailag kezelt mintákat egyaránt vizsgáltak. A mintákat először a tároláshoz 0,7 µm pórusméretű üvegszűrőn szűrték, majd két napon belül feldolgozták. A szilárd

fázisú extrakcióhoz Oasis HLB 200 mg/6 ml oszlopokat alkalmaztak, az optimalizálást három különböző pH-n végezték (pH=5, 7 és 8), melyek közül a pH=8 bizonyult a legmegfelelőbbnek, így a továbbiakban ezt alkalmazták. Az oszlopok kondicionálásához 6 ml metanolt és 5 ml ionmentes vizet használtak, melynek pH-ját ammóniával állították be. Ezután 200 ml mintát vittek fel az oszlopra, 10 ml/min átfolyási sebességgel. Ezt követően 5 ml ionmentes vízzel mosták az oszlopot, majd leoldáshoz 2×4 ml metanolt használtak. Ezután a mintákat rotációs vákuumbepárló készülékben bepárolták, majd újra felvették 1 ml metanol: víz 1:9 (V/V) elegyében. A HPLC-elválasztáshoz RP-C18-as oszlopot használtak, mobil fázisként acetonitril (A) és 0,1% hangyasavat tartalmazó desztillált vizet (B) használtak 0,2 ml/min áramlási sebességet alkalmazva [24]. A kezdeti 10% „A” és 90 % „B” oldószer koncentrációról indulva 40 perc alatt az „A” oldat koncentrációját 100 %-ra növelték, majd a következő 10 percben az „A” eluens koncentrációját 100 %-os szinten tartották. A „B” eluens koncentrációját 0,1 perc alatt 90 %-ra növelve 15 percig ezen a szinten tartották. A metamizol metabolitjait HPLC-ESI-TOF-MS pozitív ionizációs módjában határozták meg. A kapott eredményeket a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat Az egyes metabolitokra a meghatározás során kapott eredmények és retenciós idők [24]

Metabolit	retenciós idő (perc)	koncentráció tartomány (µg/l)	átlag (µg/l)
4-FAA	17,6	0,040-10,114	3,386
4-AAA	17,4	2,109-25,030	7,260
4-AA	10,8	0,131-9,286	2,098
4-MAA	9,7	0,009-9,253	1,051

Gracia-Lor és csoportja cikkében 20 leggyakrabban alkalmazott gyógyszermolekula szennyvízmintákból történő egyidejű meghatározását írja le UHPLC-MS-módszerrel. A módszer újdonsága, hogy egyetlen injektálással savas, semleges és bázikus jellegű, különböző terápiás csoportba tartozó vegyületről kaptak információt. A mintákat SPE-módszerrel dúsították, melyhez Oasis HLB oszlopokat

alkalmaztak. A mátrixhatás kiküszöbölése céljából izotóppal jelölt belső standardot adtak a mintákhoz. Az SPE-módszer optimalizálását négy különböző pH-n végezték, melynek során arra jutottak, hogy a 4-amino-antipirin visszanyerése pH=8,5-nél optimális. A kondicionálást 3 ml metanollal és 3 ml desztillált vízzel végezték, majd 100 ml, belső standardot is tartalmazó mintát engedtek át az oszlopokon, végül a leoldást 5 ml metanollal végezték. Ezután a mintákat bepárolták, majd 1 ml metanol : víz 1 : 9 v/v elegyében vették fel újra. Az injektáláshoz 20 µl oldatot használtak fel. A kromatográfiás elválasztás optimalizációja során különböző mobil fázisokat (metanol, acetonitril) próbáltak ki különböző adalékanyagokkal, mint például hangyasav és ammónium-acetát. Hatásos elválasztási módszert dolgoztak ki 20 vegyületre 7 percen belüli időigény mellett. A pozitív ionizációs módban mért vegyületek esetén mind a vizes, mind a metanolos mobil fázis ammónium-acetátot tartalmazott [72]. A 9. táblázat a 4-AA metabolitra kapott eredményeket tünteti fel.

9. táblázat A mérés során kapott retenciós idő, valamint a maximum koncentráció értékek [72]

Metabolit	retenciós idő (perc)	befolyó maximum mennyiség (µg/l)	kifolyó maximum mennyiség (µg/l)
4-AA	2,76	6,45	1,68

Rosal és munkatársai kutatásuk során szisztematikus felmérést végeztek szennyvíztisztító telepeken több mint 70 szennyező vegyületre vonatkozóan. Főként gyógyszermolekulákat, háztartási vegyszereket és ezek metabolitjait vizsgálták HPLC-QTRAP-MS és GC-MS-technikával. Nemcsak előfordulásukat, hanem ózonkezelés során bekövetkező bomlásukat is vizsgálták. A minták dúsításához SPE-t alkalmaztak, amelyhez Oasis HLB 200 mg/6ml oszlopot használtak. A kondicionálást metanollal és pH=8-as desztillált vízzel végezték. A kifolyó vízből 200 ml mintát, míg a kezelt szennyvízből 400 ml-t engedtek át az SPE-oszlopokon. A leoldást 2×4ml metanollal végezték. Ezután a mintát bepárolták, és 1: 9 v/v arányú metanol : víz elegyben vették fel. Az elválasztáshoz C18-as oszlopot alkalmaztak, a mobil fázis acetonitril (A) és desztillált víz + 0,1 % hangyasav (B) volt 0,2 ml/min áramlási sebességet alkalmazva. A

gradiens módszert az előzőekben leírtak szerint végezték [24, 25]. Az összes metamizol metabolitot vizsgálták, melyekre kapott eredményeket a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat A metamizol metabolitjaira kapott értékek, illetve az eltávolítási hatások a kifolyó és a befolyó szennyvízben [25]

Vegyület	befolyó			kifolyó			eltávolítási hatások
	max. (µg/l)	min. (µg/l)	átlag (µg/l)	max. (µg/l)	min. (µg/l)	átlag (µg/l)	
4-AA	3,325	0,262	1,517	2,253	0,127	0,676	55,4%
4-MAA	1,894	0,314	0,880	1,098	0,034	0,291	66,9%
antipirin	0,072	-	0,040	0,058	-	0,027	32,8%
4-AAA	22,20	1,760	8,333	6,745	-	4,489	46,1%
4-FAA	71,00	1,005	17,579	27,444	-	5,593	68,2%

Guedes Alonso és kutatócsoportja 13 különböző gyógyszervegyületet határozott meg két különböző elven működő szennyvíztisztító telep elfolyó szennyvizéből SPE-HPLC-MS/MS- és SPE-UHPLC-MS/MS-technikával. Többek között vizsgáltak gyulladáscsökkentő fájdalomcsillapítókat, köztük metamizolt, antibiotikumokat, antikonvulzív és antidepresszáns szereket is. A gyógyszervegyületeket három csoportba osztották, és különböző mintaelőkészítés és mérési eljárás segítségével vizsgálták a kifolyó vizek metabolittartalmát. Céljuk volt összehasonlítani két különböző elven működő szennyvíztisztító telep hatékonyságát, a Kanári-szigeteken található eleveniszapos technológiát alkalmazó és egy úgynevezett membrán bioreaktor rendszerű szennyvíztisztítót. Mivel a befolyó szennyvizet nem vizsgálták, így a vegyületek lebontásáról nem kaptak információt. Mindkét szennyvíztisztító telepen a napi átlagos átfolyó szennyvíz mennyisége 500-700 m³ körül volt, így a mért értékek jól összehasonlíthatóak. Mintákat gyűjtöttek 2011. január és 2011. december között kéthavi rendszerességgel, a mintákat legfeljebb 2 napig tárolták sötét üvegben 4 °C-on. A mintaelőkészítéshez és méréshez a vegyületeket három csoportba osztották, és különböző típusú SPE-oszlopokat és gradienseket alkalmaztak az egyes gyógyszer-molekulák meghatározásához. A metamizol esetében Oasis HLB fordított fázisú oszlopot alkalmaztak, a gradiens módszerhez pedig hangyasavas vizet tartalmazó

pH=2,6 5 mmol/l ammónium-formiát puffert és metanolt. A metamizolra a meghatározási határ 0,021 µg/l-nek, míg a kimutatási határ 0,0063 µg/l-nek adódott [73,74]. A különböző telepeken és hónapokban kapott eredményeket a 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat A metamizol koncentrációja két különböző szennyvíztisztítási technológia alkalmazását követően [73]

Szennyvíztisztító telepen alkalmazott technológia	Mintavétel időpontja	Metamizol átlag koncentrációja (µg/l) ± SD
Eleveniszapos technológia	2011. január	3,450 ± 2,33
	2011. március	0,41 ± 0,15
	2011. május	n.d.
	2011. július	0,80 ± 0,01
	2011. szeptember	1,65 ± 0,21
	2011. november	0,25 ± 0,08
Membrán bioreaktor rendszer	2011. január	n.d.
	2011. március	1,19 ± 1,06
	2011. május	8,25 ± 0,19
	2011. július	0,24 ± 0,02
	2011. szeptember	0,62 ± 0,14
	2011. november	0,25 ± 0,08

n.d.=nem kimutatható; SD=szórás

Ibáñez és munkatársai a metamizolt választották célvegyületként vizsgálataikban, melynek során az MS szelektivitásának fontosságáról és a koelúcióból adódó al pozitív eredmények elkerülésének lehetőségeiről számoltak be szennyvizek vizsgálata esetén. A mérések elvégzéséhez az egyik leggyakrabban alkalmazott HPLC-MS és HPLC-MS/MS tripla-kvadrupol analizátort alkalmaztak. UHPLC-Q-TOF-MS-rendszer esetén

C18-as UPLC-oszlopon történt az elválasztás 0,01 % hangyasavat tartalmazó vizet, illetve 0,01 % hangyasavat tartalmazó metanolt használva mozgófázisként, 18 perces időigényű gradiens módszert dolgoztak ki. A kiindulási pillanatban 10 % metanolt tartalmazó eluent 90 % metanol tartalomig növelték 14 perc alatt. Az UPLC-MS/MS mérések esetén szintén metanol-víz elegyet alkalmaztak, azonban itt az elválasztás időigénye már 10 perc volt. 5 % metanol tartalomból kiindulva 6 perc alatt 90 %-ra növelték a metanol koncentrációját, ezzel csökkentve az analízis idejét. A metamizol három metabolitját, a 4-AA, 4-FAA és 4-AAA vegyületeket vizsgálták [75]. A mintaelőkészítést Oasis HLB SPE oszlopon végezték [76]. A 24 órán keresztül gyűjtött kifolyóvíz extraktumát vizsgálták előbb tripla-kvadrupol, majd ugyanazt a mintát Q-TOF-rendszerben. Meghatározták a fragmensek pontos tömegét, így biztosítva, hogy a megfelelő metabolitot vizsgálják az adott retenciós időnél a fellépő koelúció miatt. A kromatográfiás elválasztás fontosságát, illetve a Q-TOF-MS-technika alkalmazhatóságát hangsúlyozzák munkájukban. A 12. táblázat az általuk vizsgált metabolitok pontos tömegét és a vizsgált fragmens iont tartalmazza.

12. táblázat Ibáñez és munkatársai által közölt iontömegek [75]

Metabolit	Prekurzor ion m/z	Fragmens ion m/z
4-AA	204,4	56,1
		83,1
4-FAA	232,4	56,1
		214,3
4-AAA	246,4	228,3

Ahogy az az irodalmi összefoglalóból is kiderül, kevés kutatómunka foglalkozik a metamizol-nátrium egyedüli meghatározásával szennyvizekben, sok esetben egyéb vegyületekkel egyidejűleg mérik e gyógyszerből keletkező metabolitok koncentrációját. Továbbá a módszerkidolgozás sem a négy fő metabolit elválasztására összpontosul. Németországban és Spanyolországban, ahol ez a gyógyszer molekula szintén nagy népszerűségnek örvend, széleskörű vizsgálatok folynak az ország több pontján található

szennyvíztisztító telep befolyó és kifolyó vizeinek vizsgálatára. A kutatások túlnyomó részében nem törekedtek a metamizolból keletkező összes metabolit meghatározására, sok esetben csak a legnagyobb koncentrációban jelenlevő 4-AAA és 4-FAA mennyiségét adják meg, illetve bizonyos esetekben az egyes metabolitokra kapott koncentráció értékeket összegezve metamizolként tüntetik fel. Szennyvíztisztító telepek monitorozását Spanyolországban egy esetben végezték, két szennyvíztisztító telep esetén, a mintákat kéthavonta gyűjtötték, illetve összehasonlították az eleveniszapos technológia és a membrán bioreaktor rendszer hatékonyságát ezekre a vegyületekre. Az irodalomban található koncentráció értékeket a 13. táblázat tartalmazza.

13. táblázat Metamizol és metabolitjainak mért koncentráció értékei különböző országok szennyvíztisztítói esetében

mintavételi hely	metabolit	koncentráció tartomány (µg/l)	irodalom
befolyó szennyvíz Ruhleben	4-AAA	4,68 – 7,44	[71]
kifolyó szennyvíz Ruhleben	4-AAA	3,99 – 4,87	
befolyó szennyvíz Ruhleben	4-AAA	6,65 – 8,8	[70]
	4-FAA	1,3 – 1,9	
kifolyó szennyvíz Ruhleben	4-AAA	5,3 – 7,0	
	4-FAA	1,4 – 2,0	
Észak-spanyolországi (Cantabria és Barcelona), közép-spanyolországi (Madrid), és dél- spanyolországi (Almería) szennyvíztisztítók befolyó és kifolyó vizei	4-FAA	0,04 – 10,11	[24]
	4-AAA	2,11 – 25,03	
	4-AA	0,13 – 9,28	
	4-MAA	0,01 – 9,25	
befolyó kommunális szennyvíz (Castellón)	4-AA	6,45	[72]
kifolyó kommunális szennyvíz (Castellón)	4-AA	1,68	
befolyó szennyvíz (Alcalá)	4-AA	0,26 – 3,32	[25]
	4-MAA	0,31 – 1,89	
	4-FAA	1,0 – 71,0	
	4-AAA	1,76 – 22,2	
	4-AA	0,12 – 2,25	
kifolyó szennyvíz (Alcalá)	4-MAA	0,034 – 1,09	[25]
	4-FAA	n.d. – 27,44	
	4-AAA	n.d. – 6,74	
Kanári szigetek elfolyó szennyvizek	metamizol	0,25 – 3,45	[73]
Földközi-tengeri terület	4-AA	n.d.	[75]
	4-AAA		
	4-FAA		

n.d.=nem kimutatható

3. Célkitűzések

3.1. Metamizol metabolitjainak meghatározása két budapesti és egy külvárosi szennyvíztisztító telep szennyvizében HPLC-MS-technikával

Hazánkban a metamizol-nátrium az egyik legnagyobb dobozszámmal értékesített fájdalomcsillapító. Ezen gyógyszer metabolitjainak koncentrációját nyers és kommunális szennyvizekben még nem vizsgálták Magyarországon, ezért célul tűztük ki egy HPLC-MS-módszer kidolgozását, mely alkalmas a kérdéses metabolitok koncentrációjának kvantitatív analitikai kémiai meghatározására és lehetővé teszi metabolitok nyomkövetését a szennyvizektől a felszíni vizekig. E gyógyszerhatóanyag szerkezetből ürülő fő metabolitjai a 4-amino-antipirin (4-AA), 4-acetil-amino-antipirin (4-AAA), 4-formil-amino-antipirin (4-FAA) és 4-metil-amino-antipirin. Ezeknek a vegyületeknek a környezetre gyakorolt hatásáról keveset tudunk, de mindegyik metabolit esetén akut toxicitást mutattak ki vízi élőlényeken [6], ezért vizsgálatuk a vízi környezetben kifejezetten fontos.

3.2. Különböző szennyvíztisztítási technológiák összehasonlítása

A fenti módszer birtokában választ kerestünk arra, hogy két különböző elven működő szennyvíztisztító telep hatékonysága hogyan alakul ezekre a molekulákra nézve. Erre a célra az eleveniszapos technológiát alkalmazó Észak-pesti és a Dél-pesti szennyvíztisztító telepeket, illetve az Organica Környezettechnológiák Zrt. által Telkiben működtetett úgynevezett fixfilmes szennyvízkezelő rendszert választottuk, mely utóbbinál vízi növények gyökerein és/vagy műszálas hordozókon kialakult biofilmekben levő mikroorganizmusok végzik a tisztítási műveletsort.

3.3. Szennyvíztisztító telepek monitorozása

Továbbá célul tűztük ki a metamizol metabolitok monitorozását az általunk kiválasztott szennyvíztisztító telepeken. Mind a szennyvíz előülepítését követően nyert nyersvíz, mind a biológiailag tisztított szennyvíz vonatkozásában fel kívántuk tájni, hogy az évszakok váltakozásának van-e hatása az általunk kiválasztott gyógyszer metabolitok koncentrációjának változására, vizsgálva ezzel az a metamizol metabolitok eltávolítási hatásfokának esetleges szezonális jelenségeit.

További feladatként jelentkezett a metamizol metabolitok napszakonkénti koncentráció változásának követése. Ugyancsak választ kerestünk arra, hogy a biológiai úton tisztított szennyvíz fertőtlenítési célú klórozása befolyásolja-e a ráckevei üdülőövezeti Duna ágba jutó metamizol metabolitok koncentrációját.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Szennyvízminták

4.1.1 Mintavételi időpontok és helyek

A mérések első részének elvégzéséhez kommunális szennyvíztisztító telepek előülepített (befolyó), és biológiai úton tisztított (elfolyó) vizeiből vettünk mintákat 2011 februárjában. A Fővárosi Csatornázási Művek Zrt. a Budapesten keletkező szennyvíz mintegy 50 %-át kezeli az eleveniszapos technológiát alkalmazó Észak- és a Dél-pesti szennyvíztisztító telepeken. Három párhuzamos mintát gyűjtöttünk mindkét szennyvíztisztító telep befolyó és a kifolyó vízből egyaránt. A mintákat minden esetben reggel hat órakor vettük sötét üvegekbe. 2010 decemberében szintén három-három párhuzamos mintát vettünk a Budapest környékén található Telki település szennyvizéből is, mind a nyers, mind a tisztított vízből.

A mérések második felében a szennyvíztisztító telepek monitorozását végeztük a metamizol metabolitjaira nézve, ezért szennyvízmintákat gyűjtöttünk 2011. július és 2012 márciusa között havi rendszerességgel az eleveniszapos technológiát alkalmazó Észak- és a Dél-pesti szennyvíztisztító telepekről, illetve az Organica Környezettechnológiák Zrt. által Telkiben működtetett félüzemi, „élőgépes” szennyvízkezelő rendszerből, folytatva a korábban megkezdett vizsgálatainkat. Mintákat vettünk a szennyvíz előülepítése előtt (nyersvíz) és a tisztított vízből. Ezen felül a Dél-pesti szennyvíztisztító telep esetén 2011. július és 2011. szeptember között a biológiai úton már tisztított szennyvízből klórozás előtt és után is vettünk mintát, hogy vizsgálni tudjuk a klórozás hatását a metabolitok koncentrációjára. A dipiron metabolitok napi koncentráció ingadozását is meghatároztuk a Dél-pesti szennyvíztisztító telep esetén egyszeri, 6 óránkénti mintavételezéssel 24 órán keresztül 2011 májusában.

A mintavételi időpontokat a 14/a. és 14/b. táblázat tartalmazza.

14/a. táblázat Mintavételi időpontok az SPE-HPLC-ESI-Q-MS mérésekhez

Mintavétel dátuma	Minta típusa	
	befolyó	kifolyó
Észak- és Dél-pesti szennyvíztisztító		
2011. február 9.	+	+
Telki		
2010. december 9.	+	+

14/b. táblázat Mintavételi időpontok az SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-mérésekhez

Mintavétel dátuma	Minta típusa			
	befolyó	kifolyó	klórozás előtt	klórozás után
Dél-pesti szennyvíztisztító				
2011. május 10. (6:00)	+	+		
2011. május 10. (12:00)	+	+		
2011. május 10. (19:00)	+	+		
2011. május 10. (23:00)	+	+		
2011. május 11. (6:00)	+	+		
2011. július 13.	+		+	-
2011. augusztus 31.	-		+	+
2011. szeptember 9.	+		+	+
2011. október 11.	+		+	+
2011. november 18.	+		-	+
Észak-pesti szennyvíztisztító				
2011. július 13.	+	+		
2011. augusztus 31.	+	+		
2011. szeptember 9.	+	+		
2011. október 11.	+	+		
2011. november 18.	+	+		
2012. január 27.	+	+		
2012. február 27.	+	+		
2012. március 30.	+	+		

Mintavétel időpontja	Minta típusa		
	Telki	nyers	tisztított
2011. szeptember 11.	+	+	+
2011. október 21.	+	+	+
2012. január 18.	+	+	+
2012. február 27.	+	+	+
2012. március 30.	+	+	+

4.1.2. Mintaelőkészítéshez és tároláshoz felhasznált anyagok és módszerek

4.1.2.1. Reagensek

Az SPE-módszerhez HPLC gradiens tisztaságú metanolt és hangyasavat (LGC Standards GmbH, Luckenwalde, Németország), míg a pH-beállításához nagytisztaságú ammónium-acetátot (Merck, Budapest, Magyarország, és Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) használtunk. Minden felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt, a vizes oldatokat friss, kétszer desztillált vízzel készítettük ($18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$).

4.1.2.2. Felhasznált eszközök és módszerek

A kapott szennyvízmintákat először 125 mm átmérőjű GF/A mikro szálás üvegszűrőn (Whatman, Maidstone, UK) szűrtük. Ezután az egyenként 500 ml térfogatú mintákat SPE segítségével tisztítottuk és dúsítottuk. A módszer optimalizálását a kondicionáláshoz és leoldáshoz használt oldószerek, illetve ezen oldatok pH-jának megválasztásával végeztük 12 férőhelyes Visiprep DL Vacuum Manifold SPE-kádon (Supelco, Bellefonte, PA, USA), Phenomenex Strata X 33μ 200 mg/3 ml C18-as oszlopon.

Az optimális módszer az oszlopról történő 95 %-ot meghaladó visszanyerés alapján a következő volt: első lépésben az SPE oszlopokat kétszer 3 ml metanollal kondicionáltuk, majd 3 ml pH=8 ammónium-acetát oldattal mostuk [41]. Ezután a befolyó víz esetén 120-250 ml, kifolyó víz esetén 500 ml mintát az SPE oszlopon szűrtük, majd kétszer 3 ml 5 v/v % metanolt tartalmazó pH=8 ammónium-acetát-oldattal mostuk. A leoldáshoz kétszer 3 ml 0,1 v/v % hangyasavat tartalmazó metanolt használtunk.

Mindegyik esetben az SPE-oszlopról metanollal leoldott mintákat 4 °C-on, hűtőszekrényben tároltuk a mérések elvégzéséig, de legfeljebb két hétig.

Desztillált vízzel, csapvízzel és mind befolyó, mind kifolyó szennyvízzel visszanyerés vizsgálatokat végeztünk, amikor is ezeket az oldatokat 1 µg/l koncentrációjú, 4-AA referencia anyagot tartalmazó standard-oldattal addíciónáltuk.

A Pécsi Tudományegyetem Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében végzett mérések esetén szükség volt a minták további betöményítésére, ezért 1-1 ml-t a leoldott mintákból rotációs vákuumbepárló készüléken 50 µl-re bepároltunk, majd desztillált vízzel 100 µl-re kiegészítettük. Ezt követően 0,22 µm pórusátmérőjű Nalgene membrán szűrőn átszűrtük. Az így kapott oldatokat injektáltuk a HPLC-MS-rendszerbe.

4.2. Referencia anyagok előállításához és tisztításához használt anyagok és módszerek

4.2.1. Reagensek és módszerek

A metabolitok előállításához és tisztításához a Sigma-Aldrich és a Fluka Chemical által forgalmazott reagenseket és oldószereket használtuk. A vegyületek azonosságát és tisztaságát több módszerrel is alátámasztottuk, úgymint vékonyréteg kromatográfia (VRK), mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR), Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR), illetve olvadáspontmérésekkel. Három vegyületet a Pécsi Tudományegyetem Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében állítottuk elő, míg a kereskedelmi forgalomban beszerezhető 4-AA metabolitot toluolból történő átkristályosítással tisztítottuk. A VRK-vizsgálatokat 60 F254 (Merck Millipore, Darmstadt, Németország) típusú szilika gél üveglapokon végeztük. Az olvadáspontot Boetius készülékkel (Carl Zeiss Jena, Németország) határoztuk meg. A ¹H- és ¹³C-NMR spektrumokat CDCl₃, illetve DMSO-d₆ oldatokban szobahőmérsékleten vettük fel Varian Unity Inova 400 WB (Varian, Palo Alto, CA) készülék segítségével 399,9 MHz-en (¹H), illetve 100,5 MHz-en (¹³C), belső standardként az oldószer csúcsot alkalmazva, az oldószer deutérium jelére vonatkoztatva. Kémiai eltolódás értékeket (δ) ppm-ben adtuk meg. A FT-IR-spektrumokat Nicolet Impact 400 spektrofotométer (Thermo Electron, USA) segítségével vettük fel KBr pasztillában.

A tisztított 4-AA-t olvadáspontméréssel azonosítottuk, mely az irodalmi adatokkal megegyezően 106 - 110 °C-nak adódott. Egyéb mérési eredményeink: FT-IR

(ν/cm^{-1}): 3432, 3326 (NH), 1680, 1649 (amid I); (DMSO- d_6) $^1\text{H-NMR}$ δ = 2.09 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 3.83 (s, 2 H), 7.23 (t, J = 7.0 Hz, 1 H), 7.44 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 9.8, 38.2, 120.0, 121.7, 125.0, 128.8, 135.4, 135.5, 161.3.

A 4-AAA-t ecetsavanhidrides acetilációval állítottuk elő az irodalomban *Kravchenya* által leírt módon [77]. A keletkezett anyag fizikai tulajdonságai megegyeztek az irodalomban talált adatokkal: olvadáspont 203 – 204 °C, FT-IR (ν/cm^{-1}): 3258, 3197 (NH), 1678, 1657, 1633 (amid I); (CDCl_3) $^1\text{H-NMR}$ δ = 2.07 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 3.10 (s, 3 H), 7.34 (m, 3H), 7.46 (m, 2H), 9.19 (s, 1 H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 12.1, 22.9, 35.7, 108.4, 124.9, 127.4, 129.3, 134.2, 149.9, 161.6, 170.2.

A 4-FAA-t a 4-AA toluolban végzett formilezésével állítottuk elő, a következőképpen: 1,5 g 4-AA-hoz (7,38 mmol) 0,5 ml hangyasavat (13,0 mmol) adtunk, és feloldottuk 50 ml toluolban. Az elegyet 8 órán át visszafolyós hűtő alatt forraltuk Dean-Stark berendezésben, miközben a hangyasavat kétszer pótoltuk. A reakcióelegyet bepároltuk, a szilárd maradékot toluollal mostuk és metanolból átkristályosítottuk. A keletkezett termék 1,50 g (88%), olvadáspontja 191 – 192 °C, FT-IR (ν/cm^{-1}): 2827, 2807 (CHO), 1689, 1644 (amide I); (DMSO- d_6) $^1\text{H-NMR}$ δ = 2.19 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 7.33 (m, 3H), 7.50 (m, 2H), 8.17 (s, 1H), 9.20 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 10.8, 35.9, 106.9, 123.6, 126.3, 129.0, 134.8, 150.7, 160.7, 163.0, ami az irodalmi adatoknak megfelel [78].

A 4-MAA-t a dipiron KOH-dal katalizált bomlásával állítottuk elő [46]. A termék tisztaságvizsgálatát NMR spektroszkópiás méréssel végeztük. Az anyagot hidroklorid só formájában izoláltuk, az olvadáspontja megegyezett az irodalomban leírtakkal [79]. A vizsgálatok eredményei a következők: FT-IR (ν/cm^{-1}): 3009 ($\text{N}^+\text{-CH}_3$), 2717, 2331 (NH_2^+), 1647 (amid I); (CDCl_3) $^1\text{H-NMR}$ δ = 2.25 (s, 3H), 2.82 (s, 3H), 2.86 (s, 3H), 2.95 (b, 1H), 7.23 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.44 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ = 10.9, 35.0, 37.7, 122.8, 122.9, 125.9, 129.0, 135.3, 139.6, 162.3.

4.3. Szennyvízminták metabolittartalmának meghatározásához használt anyagok és módszerek

4.3.1. Reagensek

A HPLC-mérésekhez gradiens tisztaságú metanolt és acetonitrilt használtunk (LGC Standards GmbH, Luckenwalde, Németország). A pH-beállításhoz

nagytisztaságú ammónium-acetátot, hangyasavat és ecetsavat alkalmaztunk (Merck, Budapest, Magyarország, és Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország). A vizes oldatokat friss, kétszer desztillált vízzel ($18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$) készítettük.

4.3.2. Az analitikai mérőgörbék felvételéhez használt oldatok

4.3.2.1. SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszer

A szintetizált szilárd vegyületek ioncserélt vízben ($18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$) történő oldásával egyenként 100 mg/l koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk. Ezután egy mind a négy komponenst tartalmazó oldatot készítettünk, az előző oldatok egyenkénti $500 \mu\text{l}$ -ének elegyítésével, melyet egy Falcon® PP centrifuga csőben végeztünk. A napi mérésekhez használt oldatokat ebből az oldatból frissen hígítottuk a tízszeresére. A kalibráló oldatok koncentrációja $75 \mu\text{g/l}$ és $1500 \mu\text{g/l}$ között volt. Az analitikai mérőgörbék lineárisak a vizsgált tartományban az összes vegyületre nézve. Minden esetben $r^2 > 0,98$ értéket kaptunk.

4.3.2.2. SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszer

Az előállított és tisztított vegyületekből 3 mg/l koncentrációjú vizes törzsoldatokat készítettünk. Az előző mérésekhez hasonlóan itt is multikomponens oldatokat készítettünk a további hígítások során. A mérés napján az oldatokból két hígítási lépcsőben $1,5 \mu\text{g/l}$ és $300 \mu\text{g/l}$ koncentrációjú oldatokat készítettünk.

4.3.3. A kimutatási és mennyiségi meghatározási határértékek megállapítása

A kimutatási és mennyiségi meghatározási határértékeket referencia oldatok segítségével határoztuk meg minden esetben, számításuk a jel/zaj viszony 3, illetve 10-szeres értéke alapján történt.

4.3.4. Műszerek

4.3.4.1. SPE-HPLC-ESI-Q-MS

A referencia-anyagokkal előkészítő kromatográfias vizsgálatokat végeztünk GBC LC 1445 rendszeren, ami GBC LC 1150 típusú pumpával, Rheodyne 8125 $20 \mu\text{l}$ -es mintahurokkal rendelkező injektorral, valamint GBC LC 5200 DAD-UV-detektorral felszerelt készülék, és működtetését EZChrome Elite szoftver (GBC Scientific

Equipment Pty Ltd., Dandenong, Victoria, Australia) biztosította. Ezen a rendszeren módszert dolgoztunk ki a 4 metabolit elválasztására, illetve visszanyerés vizsgálatokat végeztünk. Az UV-spektrumok alapján megállapítottuk, hogy a vegyületek elnyelési maximuma 254 nm-en van, így a további méréseknél ezt alkalmaztuk.

A 2011 februárjában gyűjtött szennyvízminták metabolit tartalmának méréséhez az SPE-módszerrel történő tisztítás és a dúsítási lépések után a Pécsi Tudományegyetem Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében üzemeltetett HPLC-MS-rendszeren dolgoztunk ki módszert, melynek HPLC-egységét Dionex P680 pumpa, Rheodyne 8125 injektor és Dionex 340S UV diódasoros detektor (Gynkotek, Germering, Germany) alkotta. A készülék vezérlését és az adatok kiértékelését Chromeleon szoftver segítségével végeztük (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). A HPLC elválasztáshoz Synergy-Hydro-RP 80A C18 oszlopot (150 × 2,0 mm × 4,0 μm) és AQ C18 Security Guard (40 × 2,0 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) típusú előtét oszlopot alkalmaztunk. A vizsgálatokat szobahőmérsékleten végeztük.

A metabolitokat a következő többlépcsős gradiens módszer segítségével választottuk el: „A” eluensként 2,5 v/v % metanolt tartalmazó, 10 mmol/l-es ammónium-acetát puffert (pH=5,6) alkalmaztunk (a pH beállítását ecetsavval végeztük), míg „B” eluensként 70 v/v % metanolt tartalmazó 10 mmol/l-es ammónium-acetát puffert (pH=5,6) használtunk.

A kezdeti 100 % „A” oldószer koncentrációról indulva 1 perc alatt a „B” eluens koncentrációját 30 %-ra növeltük, majd a következő 15 percben a „B” eluens koncentrációját 80 %-ig emeltük, amit 1 percig ezen a szinten tartottunk, majd a „B” eluens koncentrációját 100%-ra növelve 6 percig ezen a szinten tartottuk. A gradiens befejező lépéseként az „A” eluens koncentrációját 10 perc alatt 100 %-ra növeltük, és további 1 percig itt tartottuk. Az áramlási sebesség 0,3 ml/min volt.

A tömegspektrometriás mérések elvégzését Finnigan AQA (Thermoquest, San José, USA) típusú MS-készüléken ESI-módban végeztük. A készülék vezérléséhez Finnigan Xcalibur szoftver (Ver. XCALI-97006) állt rendelkezésre. A méréseket pozitív ionizáció üzemmódban végeztük. Porlasztó és deszolvatációs gázként nagy tisztaságú nitrogént használtunk (600l/h). Az ütközési gáz 99,998 % tisztaságú argon volt. 350 °C-on 2,5 kV ionizációs energiát alkalmaztunk. A spektrumokat 100 és 300 m/z értékek

között vettük fel 2 scan/s időközönként. Az ütközési energia +15eV volt. A kvadrupól analizátor 10 és 15 V között pásztázott.

A mérések során a metabolitok pozitív töltésű molekulaionjait mértük.

4.3.4.2. SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

A folyadékkromatográfiás elválasztást ebben az esetben is az előzőekben alkalmazott HPLC-oszlopon és a hozzá tartozó előtéten végeztük (Synergy-Hydro RP C18 és AC C18 Security Cartridge, Phenomenex, Torrance, CA, USA) az Egis Gyógyszergyár Nyrt. Hatóanyag Analitikai Fejlesztési Laboratóriumában. Az eddigiektől eltérően lehetőségünk volt azonban az oszlop termosztálására, így a méréseket 40 °C-on végeztük. A HPLC-készülék Waters Acquity Binary Solvent Manager pumpából, Waters Acquity Sampler Manager injektorból (10 µl-es mintahurokkal) és Waters Acquity Column Manager kolonnatérből áll (Waters Corp., Milford, MA, USA). A műszer vezérlését MassLynx szoftverrel (Vers. 4.0, Waters Corp., Milford, MA, USA) végeztük.

Többlépcsős gradiens módszer segítségével végeztük a metabolitok elválasztását. „A” eluensként 5 v/v % acetonitrilt és 0,05 v/v % hangyasavat tartalmazó vizet, „B” eluensként metanolt használtunk. Az áramlási sebesség 0,4 ml/min volt.

Az áramló fázis kiindulási összetétele 95 % „A” és 5 % „B” eluens volt. A „B” eluens koncentrációját 1,5 perc alatt 90 %-ra növeltük, és ezen a szinten tartottuk további 1,5 percig. Ezután a gradiens program végén az „A” eluens koncentrációját a kiindulási 95 %-ra vittük vissza 0,1 perc alatt. Az injektált minta mennyisége 2,0 µl volt.

A metabolitok tömegspektrometriás detektálását Waters Micromass Q-TOF-Premier tömegspektrométeren (Waters MS Technologies, Manchester, UK) végeztük ESI-módban. Az adatok kiértékeléséhez és a készülék beállításához szintén a MassLynx szoftvert használtunk. A metabolitokat és a belőlük keletkező fragmenseket pozitív ionizációs üzemmódban detektáltuk. A kromatogramokat 150 és 400 m/z értékek között vettük fel. Porlasztó és deszolvációs gázként nagy tisztaságú nitrogént alkalmaztunk. Ütközési gázként 99,9998 % tisztaságú argont használtunk. Az optimális beállítások az MS-rendszer esetén a következők voltak: deszolvatációs gáz áramlási sebessége 600l/h, hőmérséklet 350°C, kónusz gáz 50l/h, kapilláris feszültség 3,5 kV, kónusz

feszültség 18,0 V. Viszonyítási m/z értéknek a leucin-enkefalin fragmensét használtuk, melynek pontos értéke 397,1876. A fragmensekre az érzékenységet a maximumra állítottuk, a adatokat FS módban 0-tól 3 percig vettük fel 11 eV ütközési energia értéknél a prekursor ion esetén, és 15 eV ütközési energia értékeknél a keletkező fragmens ionok esetén. A molekulatömegek pontos meghatározását a tömegspektrométer szoftvere segítségével végeztük.

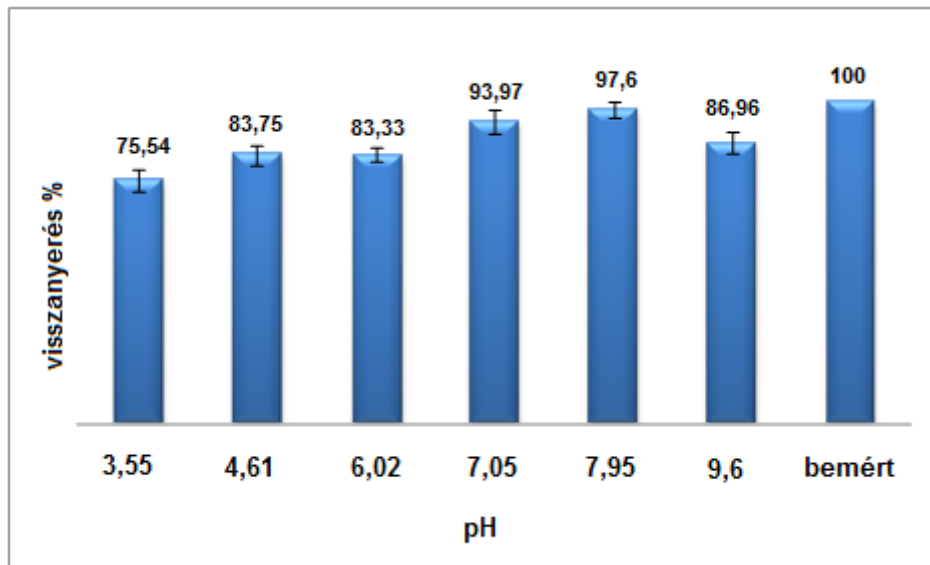
5. Eredmények

5.1. SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszer

Módszert dolgoztunk ki a metamizol metabolitjainak meghatározására szennyvizekben. Egyszeri mintavétel esetén mennyiségileg meghatároztunk a három, kiválasztott szennyvíztisztító telep befolyó és kifolyó vizében a metamizol mind a négy fő metabolitját.

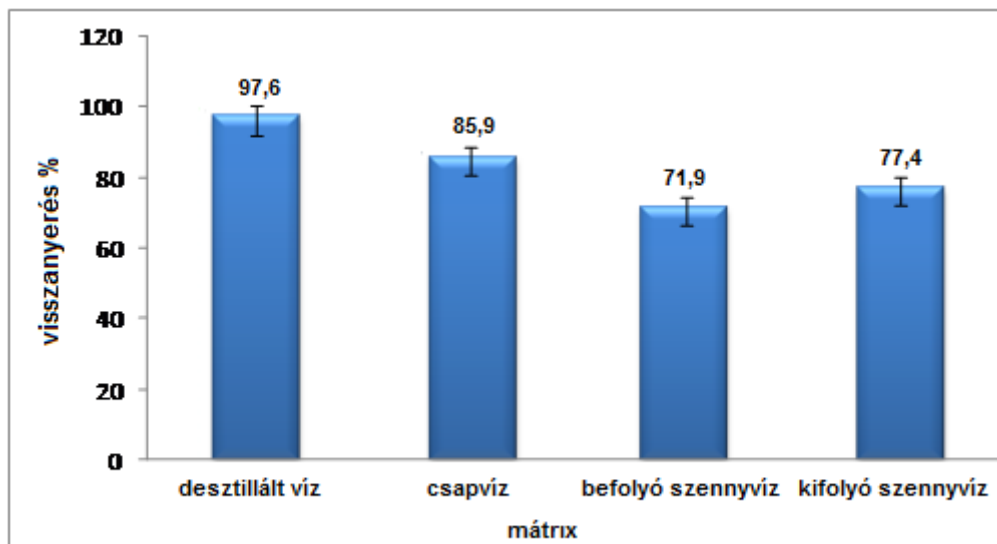
5.1.1. A mintaelőkészítés optimalizálása

A szennyvízminták összetett mátrixa, illetve a metabolitok kis koncentrációja miatt tisztítási és dúsítási lépések voltak szükségesek. Ennek elvégzését a 4.1.2. fejezetben leírtak szerint végeztük. Első lépésben az SPE-módszert optimalizáltuk, melyhez linearitás és visszanyerés vizsgálatokat végeztünk referencia oldatok segítségével. E mérések igazolták, hogy az általunk mérni kívánt $\mu\text{g/l}$ -es koncentráció-tartományban az SPE-módszer megfelelő, illetve az optimális pH beállítások megválasztásával biztosítani tudjuk a minták teljes metabolit tartalmának mérését. Különböző pH értékeken (pH=3,5-9,6 között), különböző metabolit koncentrációjú oldatokat (75-1500 $\mu\text{g/l}$ -ig) vizsgáltunk, és megállapítottuk, hogy az analitikai mérőgörbék lineárisak ebben a koncentráció tartományban. Az optimális pH-értéknek a pH=8 bizonyult, mely értéken a visszanyerés több mint 97 % volt. Ezen pH=8 mellett, különböző koncentráció-értékeknél vizsgáltuk a visszanyerést desztillált vízben, csapvízben, és befolyó és kifolyó szennyvízben egyaránt. A visszanyerés 68,5 % - 97,6 % között adódott. A különböző pH-értékekhez tartozó visszanyerést az 5. ábra tartalmazza.



5. ábra A visszanyerés pH függése 4-AA metabolit referencia oldatai esetén desztillált vízben

A pH=8 értéknél a különböző mátrixokból nyert 4-AA-nel addíciónált minták segítségével vizsgáltuk a visszanyerést. A kapott visszanyerés értékeket a metabolitokra nézve 100 µg/l-es koncentrációjú oldatok esetén a hozzájuk tartozó szórással a 6. ábra mutatja.



6. ábra A visszanyerés 4-AA metabolitra különböző mátrixokból

Vizsgáltuk a desztillált vizes mátrixból az SPE-oszlopon megkötött metabolit leoldásához használt oldószer (acetonitril, metanol) változtatásának hatását is a

visszanyerésre. Megállapítottuk, hogy 100 % metanol alkalmazása az optimális a leoldáshoz, amikor minden esetben 90 % feletti visszanyerés értéket kaptunk, ami jó egyezést mutat az irodalomban leírtakkal, akárcsak a mintafelvitelhez és leoldáshoz használt pH-értékek esetén [24].

5.1.2. Kromatográfiai módszerfejlesztés referencia anyagok segítségével

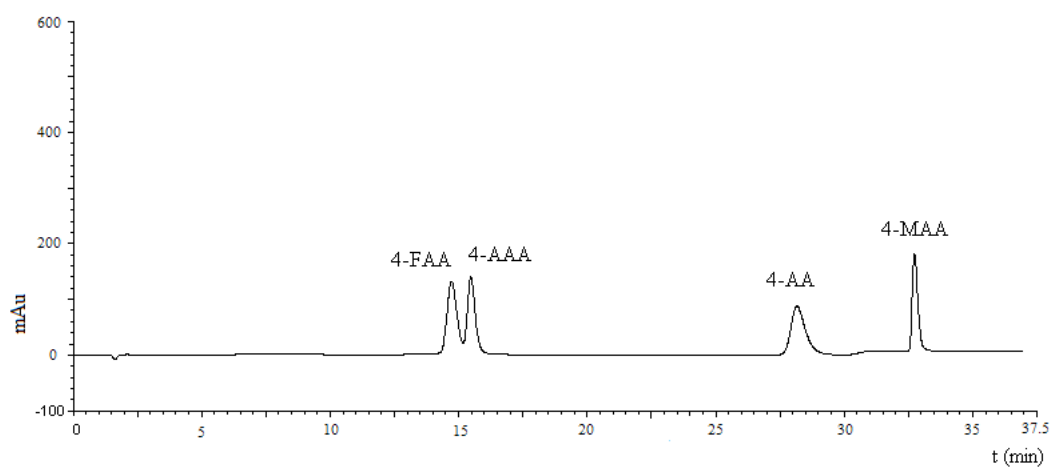
Az előkészítő HPLC-vizsgálatok során a lehető legjobb elválasztás reményében két különböző típusú HPLC-oszlopot próbáltunk ki, mégpedig a Synergy Hydro-RP 80A és a Synergy 4u Fusion-RP 80A oszlopokat. A Synergy Hydro-RP oszlop polárisan lezárt C18-as fázis, amely rendkívül hidrofób, és enyhe poláris szelektivitással rendelkezik. Ezzel szemben a Synergy Fusion-RP oszlop felületén egy poláris beágyazott C18-as fázis található, amely közel egyformán rendelkezik poláris és hidrofób szelektivitással. A mérések elvégzése során azonban mégis azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált vegyületekre közel egyforma hatékonyságú elválasztást eredményeztek, így a választásunk az előtét-oszloppal rendelkező Synergy Hydro-RP oszlopra esett, mely előtéttel az oszlop élettartamát a várt nagy mintaszám, illetve a minták mátrixa miatt jelentősen meg tudtuk növelni.

A bevezető vizsgálatok során arra törekedtünk, hogy a választott négy metabolit tökéletes kromatográfiai elválasztását megoldjuk. Ez azonban két metabolit, a 4-FAA és a 4-AAA esetén nehézségekbe ütközött, mivel a két vegyület szerkezetében csak minimális, mindössze egy $-CH_2-$ csoport eltérés található, ezért a kémiai tulajdonságaik is gyakorlatilag megegyeznek. Az alábbiakban leírt gradiens módszerrel majdnem tökéletes elválasztást tudtunk elérni, azonban az analízis ideje nagymértékben megnövekedett. A 15. táblázat a gradiens programot tartalmazza, míg a 7. ábra az általunk elért legjobb elválasztás során kapott kromatogramot tünteti fel. Mivel a detektálást a későbbiekben MS detektorral oldottuk meg, így a 4.3.4.1. fejezetben leírt módszernél maradhattunk. Az eluensek összetétele is megegyezik az előzőekben leírtakkal. A 16. táblázatban az általunk a mérésekhez használt gradiens módszer, míg a 8. ábrán pedig a négy metabolitnak az általunk használt módszerrel nyert kromatogramja látható.

15. táblázat A 7. ábrán látható elválasztást eredményező gradiens módszer

t (perc)	„A” eluens %	„B” eluens %
0.	100	0
0-1.	80	20
1-34.	0	100
34-35.	0	100
36-36,1.	100	0
36,1-45.	100	0

„A” eluens=2,5 v/v % metanolt tartalmazó 10 mmol/l-es ammónium-acetát puffer (pH=5,6); „B” eluens=70 v/v % metanolt tartalmazó 10 mmol/l-es ammónium-acetát puffer (pH=5,6)

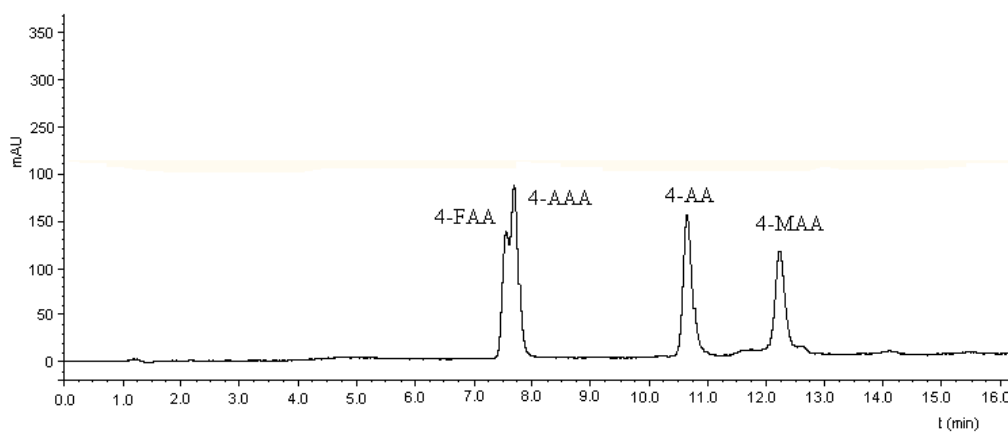


7. ábra A metamizol metabolitjaira általunk elért legjobb elválasztás során UV-detektálással kapott HPLC kromatogram

16. táblázat Az SPE-HPLC-ESI-Q-MS mérésekhez alkalmazott gradiens program

t (perc)	„A” eluens %	„B” eluens %
0.	100	0
0-1.	70	30
1-15.	20	80
15-16.	20	80
16-22.	0	100
22-32.	100	0
32-33.	100	0

„A” eluens=2,5 v/v % metanolt tartalmazó 10 mmol/l-es ammónium-acetát puffer (pH=5,6); „B” eluens=70 v/v% metanolt tartalmazó 10 mmol/l-es ammónium-acetát puffer (pH=5,6)

**8. ábra Az SPE-HPLC-ESI-Q-MS-mérésekhez alkalmazott gradiens módszerrel a metamizol metabolitjaira kapott HPLC kromatogram**

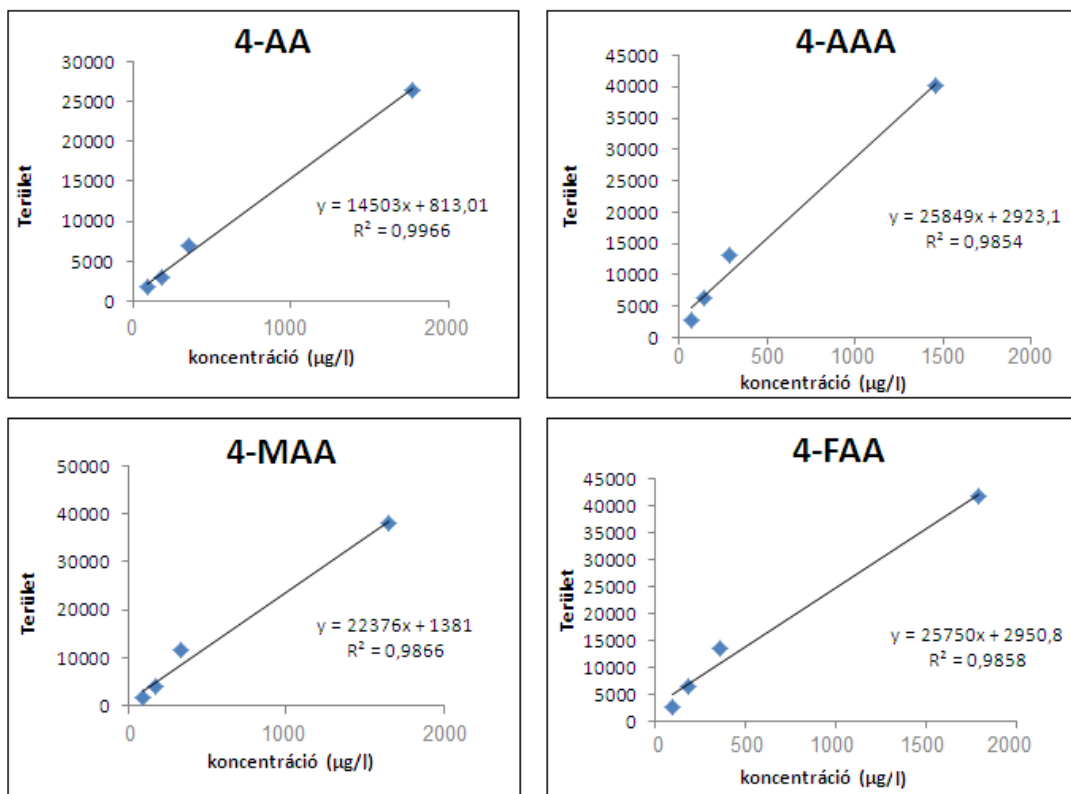
A jellemző kromatogram alapján kapott retenciós időket a 17. táblázat tartalmazza.

17. táblázat Az SPE-HPLC-ESI-Q-MS-mérések során az egyes metabolitokhoz tartozó retenció idők

Metabolit	t_r (perc)
4-FAA	7,6
4-AAA	7,8
4-AA	10,5
4-MAA	12,1

5.1.3. Analitikai mérőgörbék felvétele az SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszerrel

A szennyvízminták metabolit tartalmának meghatározásához kalibrációs oldatokat készítettünk, melyek segítségével a kapott eredményeinket kiértékeljük. A különböző metabolitokra egyenként meghatároztuk 75 $\mu\text{g/l}$ és 1500 $\mu\text{g/l}$ koncentráció értékek között az egyenes egyenletét, valamint az r^2 értékét. A 9. ábra az analitikai mérőgörbékét, a 18. táblázat pedig a vizsgált metabolitok egyes fizikai jellemzőit, valamint az analitikai mérőgörbék paramétereit tartalmazza.



9. ábra Az egyes metabolitok SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszerrel felvett analitikai mérőgörbéi

18. táblázat A metabolitok és analitikai mérőgörbéik jellemző paraméterei

Metamizol metabolit	Molekula tömeg (g/mol)	m/z [M + H ⁺]	r ²	meredekség
4-AA	203,24	204	0,9966	14503
4-AAA	245,28	246	0,9854	25849
4-FAA	231,25	232	0,9858	25750
4-MAA	217,27	218	0,9866	22375

5.1.4. Kimutatási és mennyiségi meghatározási határok megállapítása

A referencia-oldatok segítségével meghatároztuk a kimutatási és meghatározási határokat a 4.3.3. fejezetben leírtak alapján. A mérések során a 19. táblázatban található értékeket kaptuk.

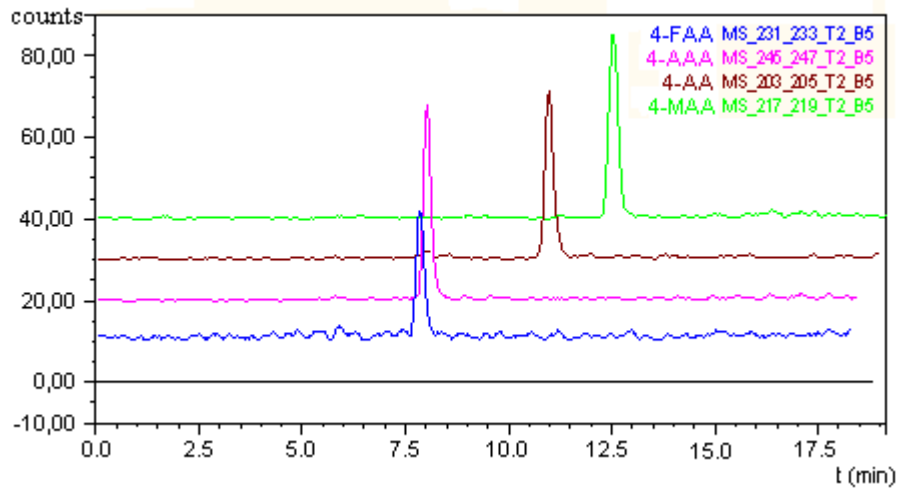
19. táblázat Az SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszerrel nyert kimutatási és meghatározási határok

Metabolit	LOD	LOQ
	(µg/l)	
4-AA	0,066	0,324
4-AAA	0,024	0,084
4-FAA	0,024	0,084
4-MAA	0,036	0,12

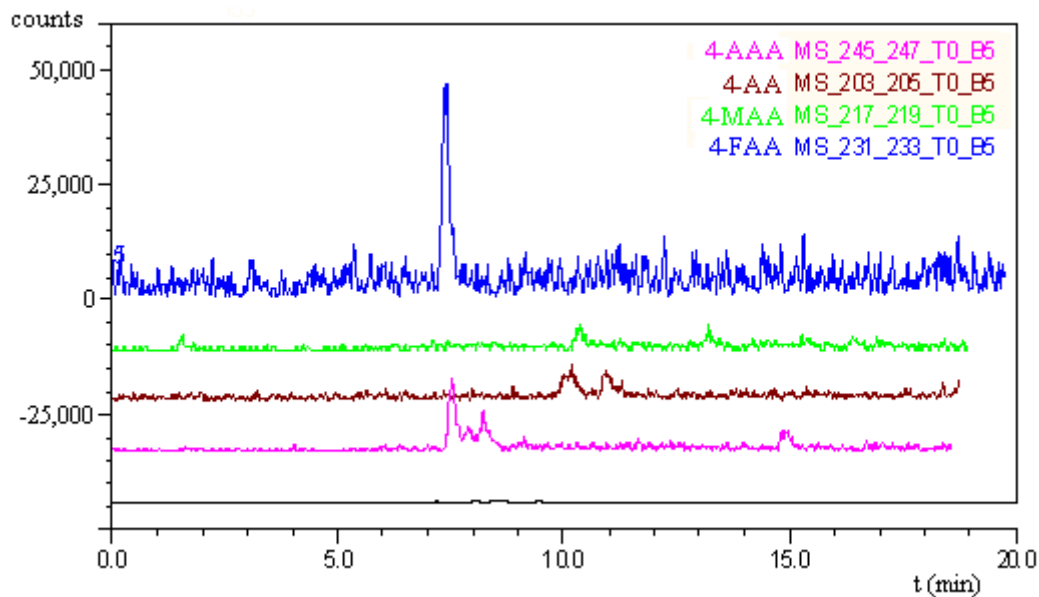
5.1.5. Eredmények

A kidolgozott SPE-HPLC-ESI-Q-MS-technikával a metamizol metabolitok mérését valósítottuk meg három különböző szennyvíztisztító telep befolyó és kifolyó szennyvizében. A referencia-anyagok segítségével optimalizáltuk az tömegspektrometriás módszert, mely alapján a 10. ábrán látható kromatogramot kaptuk.

Az 11. ábrán egy az Észak-pesti szennyvíztisztító telep kifolyó vizére jellemző kromatogramot látunk.



10. ábra SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszerben optimalizált, referencia anyagokkal felvett kromatogram



11. ábra Észak-pesti szennyvíztisztító telep kifolyó vizének SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszerben felvett kromatogramja

A 2011 februárjában az Észak- és Dél-pesti, valamint a Telkiben működő szennyvíztisztító telepen vett vízmintákban három párhuzamos méréssel határoztuk meg az egyes szennyvizek metabolit tartalmát. Ahogy az várható volt, minden metabolit

koncentrációja nagyobb volt a befolyó vízben, mint a már tisztított, kifolyó vízben. A 4-MAA metabolitot néhány esetben nem sikerült kimutatni a befolyó vízben sem. Az általunk kapott eredmények jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal [24,25,70-74]. A Dél-pesti szennyvíztisztító telepről gyűjtött minták esetén a vizsgált metabolitok nagyobb koncentrációban voltak mérhetőek, mint az Észak-pesti szennyvíztisztító telep vizeiben, ami köszönhető nagy valószínűséggel annak, hogy Magyarország lakosságának mintegy 20 %-a él a fővárosban, ami nagyban hozzájárul a kapott magas értékekhez, hiszen itt a gyógyszerfelhasználás is az országos átlag felett van.

Figyelembe véve, hogy a regisztrált összes befolyó szennyvíz a mintavétel időpontjában az Észak-és a Dél-pesti szennyvíztisztító telep esetén 140587 m³ és 57582 m³ volt, illetve, hogy az egyes vízgyűjtő területeken 300 ezer, illetve 400 ezerre tehető a lakosság száma, az egy lakosra jutó átlagos dipiron-fogyasztás számolható. Az Észak-pesti szennyvíztisztító telep esetén 0,07-0,13 g/lakos és a Dél-pesti szennyvíztisztító telep esetén 0,05-0,10 g/lakos összes dipiron-metabolit koncentráció értékeket kaptunk, azaz gyakorlatilag nincs eltérés az eredményekben. A vizsgált metabolitok közül a befolyó vizekben a 4-AAA koncentrációja volt a legnagyobb, ami szintén megegyezik a más országokban leírtakkal.

A kifolyó vizekben azonban már a 4-FAA metabolit volt jelen a legnagyobb mértékben, vagyis ez a vegyület távolítható el legkevésbé a rendszerből. Azt tapasztaltuk, hogy míg a 4-AA, 4-MAA, és 4-AAA metabolitok akár 95 %-os hatásfokkal eltávolíthatók a szennyvizekből, addig a 4-FAA esetén ez az érték alig éri el a 60 %-os szintet.

Az általunk mért átlagkoncentráció értékeket az egyes befolyó és kifolyó vizekben a hozzájuk tartozó szórással, valamint az egyes metabolitokra kapott bontási hatásfok értékeket a 20. táblázat tartalmazza.

20. táblázat A vizsgált metabolitok átlag koncentráció értékei és a bontási hatásfoka

Mintavétel helye és ideje	Metabolit	Átlagkoncentráció ($\mu\text{g/l}$) \pm SD		Bontási hatásfok %
		befolyó	kifolyó	
Észak-pesti szennyvíztisztító telep (2011. február)	4-AA	1,33 \pm 0,26	0,59 \pm 0,12	55,6
	4-AAA	2,48 \pm 0,08	0,69 \pm 0,14	72,2
	4-FAA	1,68 \pm 0,04	1,90 \pm 0,32	-
	4-MAA	n.d.	0,20 \pm 0,02	-
Dél-pesti szennyvíztisztító telep (2011. február)	4-AA	2,36 \pm 0,16	4,20 \pm 0,13	-
	4-AAA	4,67 \pm 1,06	1,28 \pm 0,04	72,6
	4-FAA	3,48 \pm 0,50	1,36 \pm 0,01	60,9
	4-MAA	3,38 \pm 0,06	n.d.	~100
Telki (2010. december)	4-AA	1,43 \pm 0,44	0,07 \pm 0,04	95,1
	4-AAA	4,03 \pm 0,73	0,35 \pm 0,11	91,3
	4-FAA	1,98 \pm 0,31	1,06 \pm 0,13	46,5
	4-MAA	2,61 \pm 0,34	n.d.	~100

SD= szórás; n.d.=nem kimutatható

A fenti táblázatból is jól látszik, hogy az eredmények megbízhatósága néhány esetben kérdéseket vet fel, hiszen a kifolyó vizekben kiugró értékeket tapasztaltunk. Mivel a 4-AA és a 4-MAA metabolitok koncentrációja kicsi, a hozzájuk tartozó szórás viszont nagy, és néhány esetben a 4-MAA koncentrációja a Q-MS alkalmazásának korlátja miatt a detektálási határ alatt volt, így szükségszerű volt egy új módszer kidolgozása a kisebb kimutatási határok és a pontosabb koncentráció értékek elérése céljából. Ezért a további mérések elvégzéséhez áttértünk az érzékenyebb és szelektívebb Q-TOF-MS/MS-rendszerre.

5.2. SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszer

A vizsgálatok e szakaszában a három szennyvíztisztító telep monitorozását végeztük az általunk mérni kívánt vegyületek tekintetében. 2011 júliusa és 2012 áprilisa között havi rendszerességgel három-három párhuzamos mintát gyűjtöttünk. A mintákat ebben az esetben is 24 órán belül feldolgoztuk, és legfeljebb 2 napig 4 °C-on tároltuk a mérések elvégzéséig.

2011 májusában egyszeri, 24 órán keresztüli hat óránkénti mintavételezéssel vizsgáltuk a Dél-pesti szennyvíztisztító telep befolyó szennyvizének metamizol metabolit tartalmát a napi ingadozás mérése céljából. A mintavételt reggel hat óra és másnap reggel hat óra között végeztük.

2011. július és szeptember között három hónapon keresztül vizsgáltuk a klórozás hatását a már tisztított szennyvízre. Klórozást csak a nyári hónapokban, a Soroksár közelében levő üdülőövezet miatt végeznek.

Összesen 43 mintát gyűjtöttünk, melyekből három-három párhuzamos analízist végeztünk.

5.2.1. Kromatográfias módszerfejlesztés referencia anyagok segítségével

A módszerfejlesztés során az előzőekben használt kromatográfias módszert használtuk kiindulási pontként [80]. A mintaelőkészítés lépésein, és az elválasztáshoz használt oszlopon nem változtattunk. Mindemellet mivel a detektálási módot változtattuk, a módszerfejlesztés során átgondoltuk a kromatográfias elválasztás egyes paramétereit úgy, mint injektálási térfogat, oszlop-hőmérséklet, eluens összetétel és gradiens program. Mindezen paraméterek újragondolására a nagy mintaszám, és a mérések elvégzésére rendelkezésre álló idő rövidege miatt volt többek között szükség. A rendszer érzékenységének köszönhetően az injektált térfogatot 2 µl-re tudtuk csökkenteni, ami a minta összetett mátrixa miatt volt fontos szempont, hogy a kromatográfias oszlopot meg tudjuk óvni a nagyobb mennyiségű szennyeződéstől, ezzel is növelve az élettartamát. Optimális eluensnek a mérések során az 0,5 v/v % hangyasavat és 5 v/v % acetonitrilt tartalmazó víz („A”) és 100 % metanol („B”) eluens bizonyult, a gradiens programot a 21. táblázat tartalmazza. Az előző gradiens módszerhez képest az elválasztási idő nagyjából a felére csökkent, habár az egyes metabolitokat nem választottuk el teljesen egymástól, de erre a Q-TOF-MS-detektor

miatt nem is volt feltétlenül szükség, hiszen így egyértelműen azonosíthatók a metabolitok [81]. Az elválasztás során kapott egyes metabolitokhoz tartozó retenciós időket a 22. táblázat tartalmazza.

21. táblázat Gradiens módszer az SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszerben

t (perc)	„A” eluens %	„B” eluens %
0.	95	5
0-0,5.	95	5
0,5-1,5.	10	90
1,5-3,0.	10	90
3,0-3,1.	95	5

„A” eluens=0,5 v/v % hangyasavat és 5 v/v % acetonitrilt tartalmazó víz; „B” eluens=100 % metanol

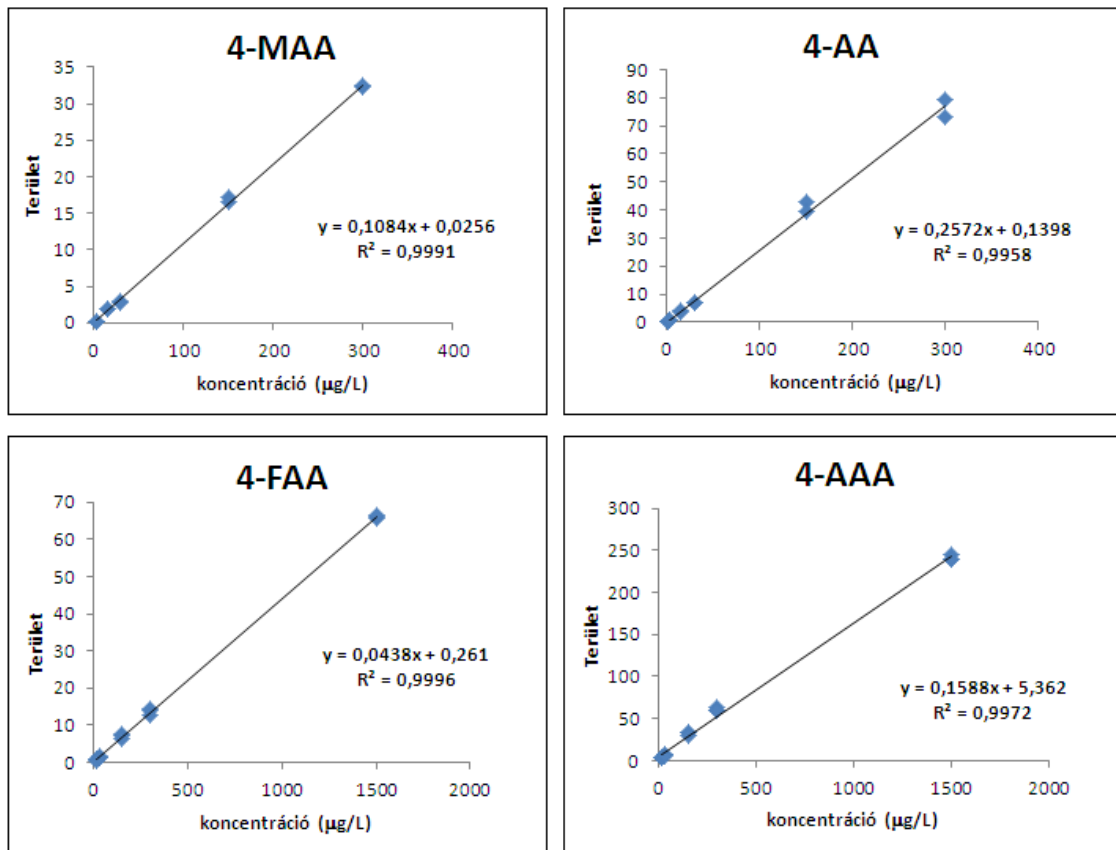
22. táblázat Az SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszerrel kapott retenciós idők

Metabolit	t_r (perc)
4-MAA	1,99
4-AA	2,06
4-AAA	2,35
4-FAA	2,37

5.2.2. Analitikai mérőgörbék felvétele

A kalibrációs oldatokból az analitikai mérőgörbét a 4-MAA és a 4-AA metabolitok esetén 1,5 µg/l és 300 µg/l között vettük fel, míg a 4-FAA és 4-AAA metabolitok esetén a várható nagyobb koncentrációk miatt 15 µg/l és 1500 µg/l között vettük fel. Ezekben a koncentráció tartományokban meghatároztuk az egyenesek egyenletét, valamint a r^2 értékét. A 12. ábra a kapott analitikai mérőgörbét, míg a 23. táblázat a görbékhez tartozó paramétereket tartalmazza. Minden egyes metabolit esetén

egy befolyó és egy kifolyó szennyvízmintához referencia-anyagot addíciónáltunk, így végezve visszanyerés vizsgálatokat egyenként a befolyó vízhez 75 µg/l, a kifolyó vízhez 15 µg/l hozzáadott koncentráció értékeknél. A metabolittól és a kifolyó illetve a befolyó víz mátrixától függően 71 % és 102 % közötti értékeket kaptunk az egyes metabolitokra, amit a 24. táblázat tartalmaz.



12. ábra Az egyes metabolitokra kapott analitikai mérőgörbék az SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszerben

23. táblázat Az analitikai mérőgöréből kapott adatok

Metamizol metabolit	Prekurzor tömeg [M+H⁺]	Fragmens ion m/z	r²	meredekség
4-AA	204	159,0930	0,9958	0,2572
4-FAA	232	214,0980	0,9996	0,0438
4-MAA	218	187,0871	0,9991	0,1084
4-AAA	246	228,1137	0,9972	0,1588

24. táblázat Visszanyerés az egyes metabolitokra

Metabolit	Visszanyerés (%)	
	befolyó	kifolyó
4-AA	80	81
4-AAA	71	74
4-FAA	92	82
4-MAA	73	70

5.2.3. Kimutatási és mennyiségi meghatározási határok megállapítása

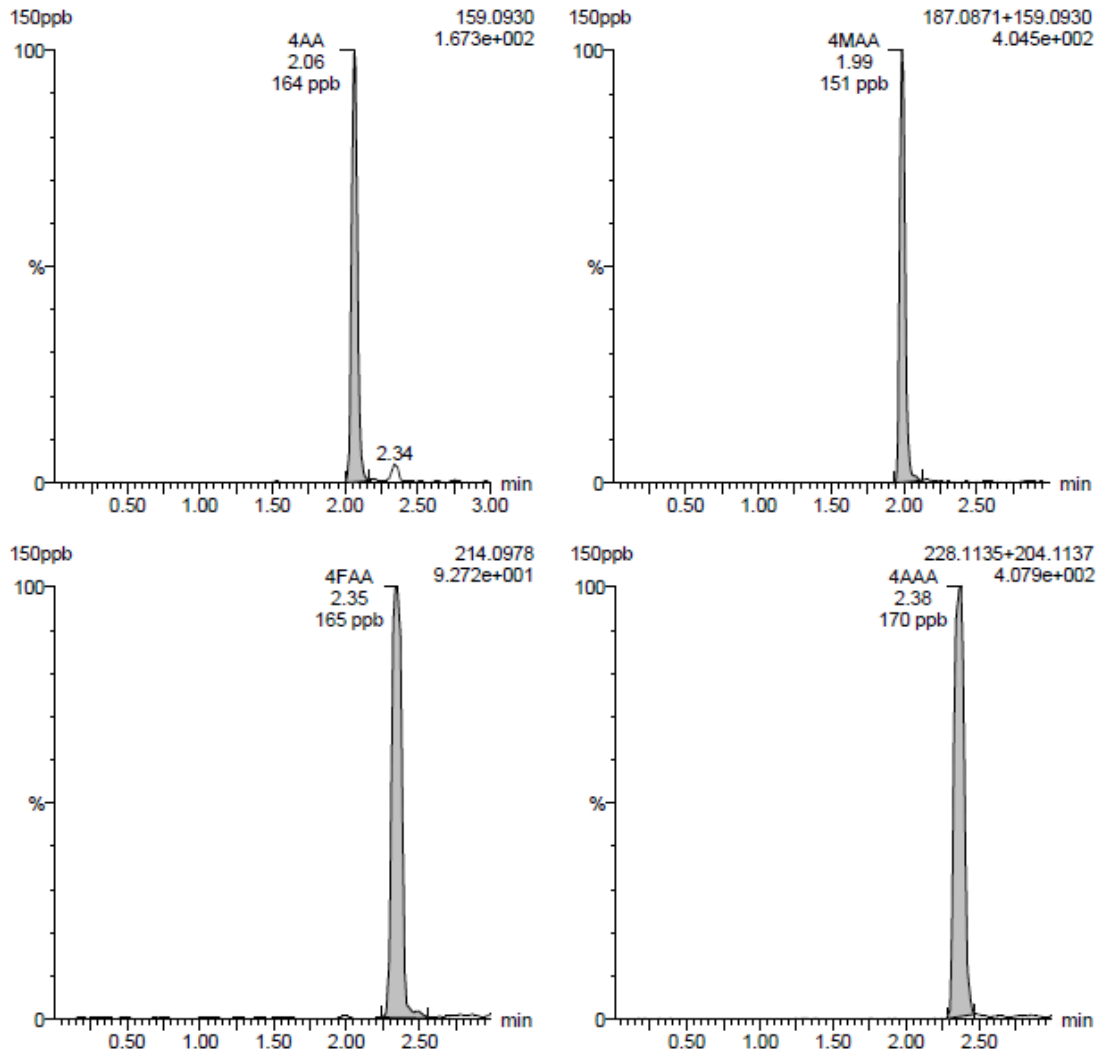
A referencia-oldatok segítségével meghatároztuk a kimutatási és mennyiségi meghatározási határokat a 4.3.3. fejezetben leírtak alapján. A mérések során a 25. táblázatban található értékeket kaptuk. Ha a két rendszer érzékenységét összehasonlítjuk, akkor megfigyelhetjük, hogy az ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszerben egy nagyságrenddel jobb kimutatási határokat sikerült elérni, mint az ESI-Q-MS-rendszerben. Ez annak köszönhető, hogy a fragmens-ionok detektálásával, a módszer sokkal szelektívebbé tehető, így kisebb koncentrációk is meghatározhatók.

25. táblázat Kimutatási és meghatározási határok az SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszerben

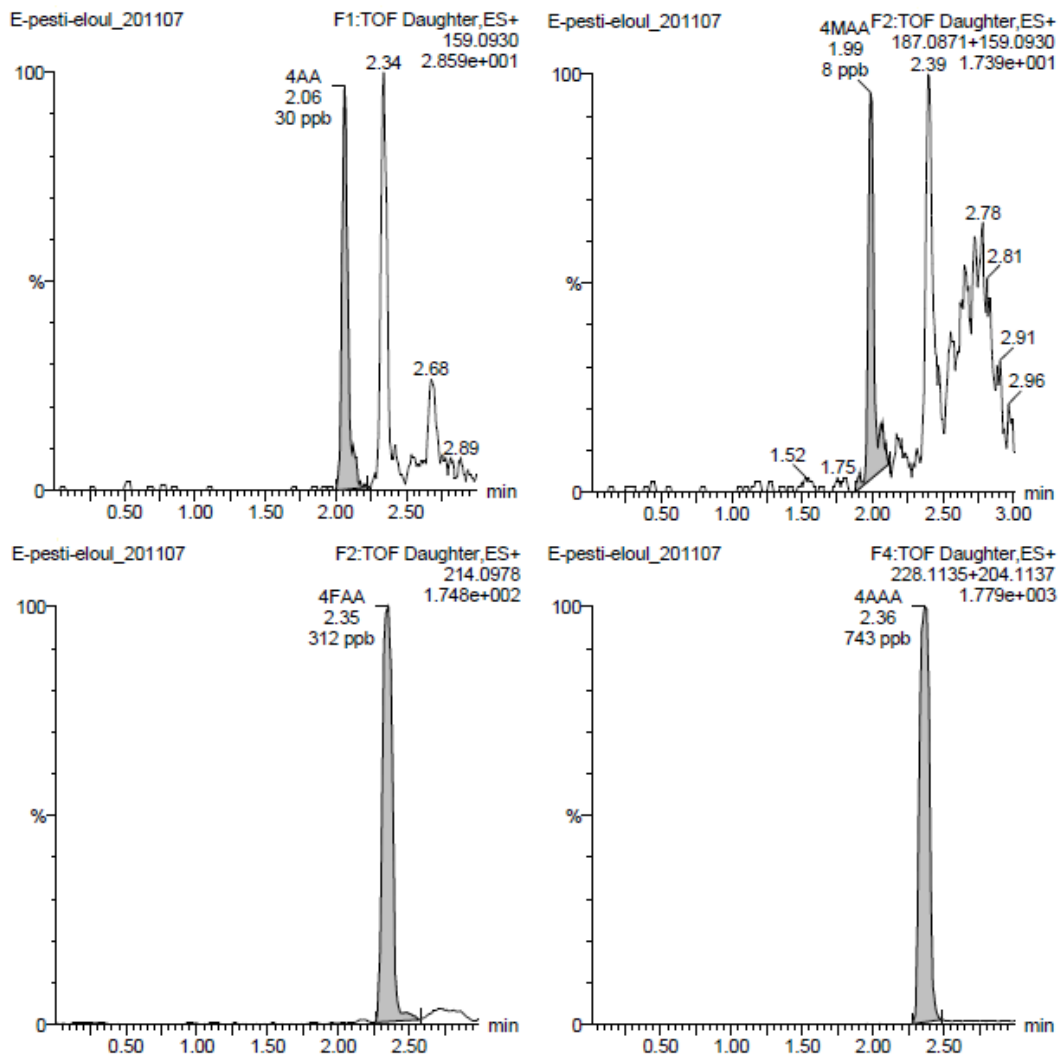
Metabolit	LOD	LOQ
	($\mu\text{g/l}$)	
4-AA	0,007	0,022
4-FAA	0,010	0,033
4-MAA	0,011	0,035
4-AAA	0,003	0,010

5.2.4. Eredmények

A mérések második felét SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszeren végeztük, amit lehetővé tette, hogy a tökéletes kromatográfias elválasztás megvalósítása nélkül kapjunk pontos eredményt a metabolitok egyes fragmenseit vizsgálva. A referencia-oldatok segítségével felvettük az egyes fragmensekre jellemző kromatogramokat, amelyek a 13. ábrán láthatóak. A szennyvizekre jellemző tipikus kromatogramok képét a 14. ábra mutatja.



13. ábra Az SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszerben optimalizált referencia anyagokból felvett kromatogramok



14. ábra Észak-pesti szennyvíztisztító telepről 2011 júliusában gyűjtött befolyó vízből az SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszerben felvett kromatogram

Az alábbi táblázatokban, az egyes hónapokban a különböző kifolyó és befolyó szennyvizekben mért koncentráció értékeket gyűjtöttem össze. Bizonyos hónapokban a szennyvíztisztító telepek nem bocsátottak rendelkezésre mintát vagy a berendezés meghibásodása miatt, vagy esetleges mintavételi problémák miatt.

Minden esetben a befolyó vízben nagyobb koncentráció értékeket mértünk, mint a kifolyó vízben, illetve az előző mérésekhez képest ebben a rendszerben a jobb kimutatási határoknak köszönhetően szinte minden esetben az összes metabolitot meg tudtuk határozni a $\mu\text{g/l}$ -es tartományban, hiszen több mint egy nagyságrenddel sikerült a kimutatási határokon javítani. Megállapíthatjuk, hogy az egyes metabolitok koncentrációja mind a befolyó, mind a kifolyó szennyvizekben nagyságrendileg minden

szennyvíztisztító esetén megegyezik, és ezek az értékek jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal.

A befolyó vizekben a 4-AAA koncentrációja volt a legnagyobb, míg a kifolyó vízben a 4-FAA-t mértük a legnagyobb koncentrációban, ami szintén jó egyezést mutat az előző méréseinkkel. Jóllehet a 4-FAA metabolitot tekintjük ezért a legkevésbé lebontható metabolitnak, nem szabad elfelejtenünk arról sem, hogy a baktériumok által végzett 4-MAA és 4-AA lebontás termékeként szintén keletkezhet a 4-FAA metabolit. A 26-29. táblázatok az egyes metabolitokra kapott havi átlagértékeket tartalmazzák a különböző szennyvíztisztítók esetén.

26. táblázat A 4-AA-ra kapott havi átlag koncentráció értékek a különböző szennyvíztisztítók esetén

4-AA	Észak-pesti szennyvíztisztító telep		Dél-pesti szennyvíztisztító telep			Telki	
	befolyó	kifolyó	befolyó	klórozó előtt	klórozó után	befolyó	kifolyó
	átlag koncentráció (µg/l) ± SD						
2011. júl.	0,056±0,004	0,033±0,001	0,035±0,005	0,069±0,008	-	-	-
2011. aug.	0,058±0,011	0,017±0,004	-	0,336±0,022	0,134±0,004	-	-
2011. szept.	0,091±0,008	0,073±0,002	0,026±0,005	0,084±0,001	0,126±0,007	0,131±0,010	0,093±0,006
2011. okt.	0,100±0,015	0,060±0,001	0,052±0,001	0,168±0,013	0,051±0,006	0,123±0,001	0,035±0,002
2011. nov.	0,151±0,018	0,084±0,001	0,026±0,007	-	0,267±0,029	-	-
2012. jan.	0,150±0,012	0,037±0,003	-	-	-	0,176±0,037	0,134±0,062
2012. febr.	0,149±0,004	0,045±0,011	-	-	-	0,303±0,001	0,327±0,005
2012. márc.	0,130±0,002	0,081±0,001	-	-	-	0,363±0,003	0,337±0,019

SD=szórás

27. táblázat A 4-AAA-ra kapott havi átlag koncentráció értékek a különböző szennyvíztisztítók esetén

4-AAA	Észak-pesti szennyvíztisztító telep		Dél-pesti szennyvíztisztító telep			Telki	
	befolyó	kifolyó	befolyó	klórozó előtt	klórozó után	befolyó	kifolyó
átlag koncentráció (µg/l) ± SD							
2011. júl.	1,675±0,049	0,256±0,005	2,197±0,064	0,402±0,038	-	-	-
2011. aug.	1,371±0,162	1,186±0,018	-	0,189±0,004	0,140±0,015	-	-
2011. szept.	2,317±0,235	0,801±0,033	1,702±0,071	0,389±0,007	0,315±0,008	2,818±0,527	0,171±0,002
2011. okt.	2,151±0,004	0,484±0,009	2,025±0,147	0,223±0,039	0,054±0,004	1,134±0,004	0,205±0,022
2011. nov.	2,264±0,051	0,220±0,017	2,220±0,085	-	0,295±0,012	-	-
2012. jan.	0,544±0,006	0,044±0,002	-	-	-	1,964±0,075	0,465±0,017
2012. febr.	2,341±0,053	0,038±0,025	-	-	-	3,428±0,069	2,083±0,046
2012. márc.	2,277±0,070	n.d.	-	-	-	5,390±0,352	0,528±0,014

n.d.=nem kimutatható, SD=szórás

28. táblázat A 4-FAA-ra kapott havi átlag koncentráció értékek a különböző szennyvíztisztítók esetén

4-FAA	Észak-pesti szennyvíztisztító telep		Dél-pesti szennyvíztisztító telep			Telki	
	befolyó	kifolyó	befolyó	klórozó előtt	klórozó után	befolyó	kifolyó
átlag koncentráció (µg/l) ± SD							
2011. júl.	0,775±0,017	0,438±0,023	1,154±0,162	1,199±0,077	-	-	-
2011. aug.	0,761±0,101	1,363±0,021	-	1,793±0,118	1,413±0,060	-	-
2011. szept.	1,146±0,109	1,108±0,005	0,830±0,057	1,733±0,013	1,593±0,039	1,432±0,337	1,399±0,084
2011. okt.	1,060±0,049	1,067±0,022	1,027±0,068	1,949±0,193	0,794±0,015	0,727±0,003	0,511±0,042
2011. nov.	1,143±0,029	0,964±0,014	1,460±0,013	-	1,817±0,145	-	-
2012. jan.	0,382±0,005	0,404±0,017	-	-	-	1,101±0,006	1,567±0,017
2012. febr.	1,212±0,044	0,964±0,034	-	-	-	1,755±0,002	1,695±0,054
2012. márc.	0,991±0,025	0,689±0,008	-	-	-	2,572±0,015	1,539±0,033

SD=szórás

29. táblázat A 4-MAA-ra kapott havi átlag koncentráció értékek a különböző szennyvíztisztítók esetén

4-MAA	Észak-pesti szennyvíztisztító telep		Dél-pesti szennyvíztisztító telep			Telki	
	befolyó	kifolyó	befolyó	klórozó előtt	klórozó után	befolyó	kifolyó
	átlag koncentráció (µg/l) ± SD						
2011. júl.	0,014±0,001	0,002±0,0005	0,012±0,001	0,004±0,0017	-	-	-
2011. aug.	0,089±0,002	0,009±0,0015	-	0,100±0,0012	0,042±0,0014	-	-
2011. szept.	0,049±0,003	0,004±0,0015	0,011±0,0015	0,002±0,0015	0,007±0,0006	0,025±0,008	0,004±0,00
2011. okt.	0,018±0,0005	0,002±0,0002	0,023±0,004	0,005±0,001	0,003±0,0013	0,183±0,055	0,002±0,0006
2011. nov.	0,012±0,0006	0,004±0,0013	0,011±0,0001	-	0,032±0,001	-	-
2012. jan.	0,032±0,0055	0,002±0,0009	-	-	-	0,064±0,024	0,014±0,014
2012. febr.	0,007±0,0007	0,006±0,0004	-	-	-	0,036±0,0004	0,019±0,003
2012. márc.	0,024±0,0003	0,005±0,0004	-	-	-	0,176±0,011	0,025±0,004

SD=szórás

5.3. Tisztítási technológiák összevetése

Szerettük volna a különböző elven működő szennyvíztisztító telepek hatékonyságát összehasonlítani az általunk választott metabolitok eltávolítására, és a mérések során a következő eredményeket kaptuk.

Ahogy az várható volt, a befolyó szennyvízben nagyobb volt a mért koncentráció az összes metabolit tekintetében, mint a már tisztított, kifolyó vízben. Általánosan mindegyik vizsgálni kívánt vegyület detektálható volt µg/l-es tartományban mindegyik szennyvíztisztító telepen, néhány esetben azonban a 4-MAA mind a befolyó, mind a kifolyó vízben a kimutatási határ alatt volt. A két mérési sorozatból kapott adatainkat a 30. táblázat tartalmazza.

30. táblázat Koncentráció értékek a befolyó és kifolyó szennyvizekben az két különböző technológiát alkalmazó szennyvíztisztító telepen

Mintavétel helye és ideje	Metabolit	Mért minimum – maximum koncentráció (µg/l)	
		Befolyó szennyvíz	Elfolyó szennyvíz
SPE-HPLC-ESI-Q-MS (2011. február)			
Budapest	4-AA	1,06–2,52	0,29–0,55
	4-AAA	2,42–5,72	0,55–1,30
	4-FAA	1,66–3,48	1,35–2,20
	4-MAA	n.d.–3,43	n.d.–0,20
Telki	4-AA	0,99–1,86	0,04–0,11
	4-AAA	3,30–4,75	0,27–0,43
	4-FAA	1,68–2,29	0,97–1,15
	4-MAA	2,27–2,95	n.d.
SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS (2011. július – 2012. március)			
Budapest	4-AA	0,03-0,15	0,02-0,34
	4-AAA	1,38-2,34	0,04-1,19
	4-FAA	0,77-1,46	0,44-1,95
	4-MAA	0,01-0,89	n.d.-0,1
Telki	4-AA	0,12-0,36	0,04-0,34
	4-AAA	1,13-5,39	0,17-1,08
	4-FAA	0,73-2,58	0,51-1,69
	4-MAA	0,03-0,18	n.d.-0,03

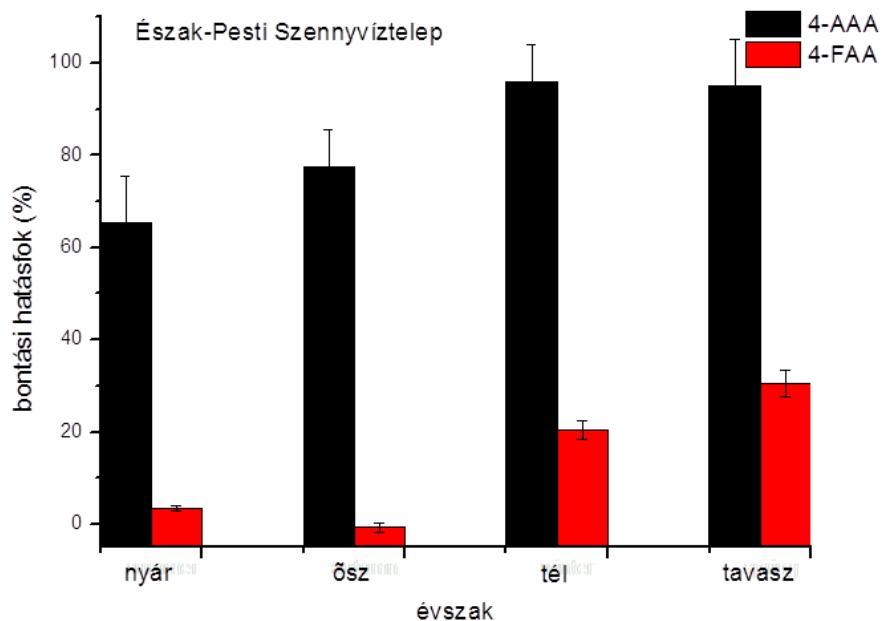
A tisztítási technológiák hatékonyságának jellemzésére a bontási hatásfokot használhatjuk mutatóként, mely százalékértékek a kifolyó vízben a befolyó vízhez képest mért mennyiségnek a százalékos arányát adjuk meg.

Az eleveniszapos technológiát alkalmazó Észak-pesti szennyvíztisztító telepen a bontási hatások nyáron 65 %-nak, ősszel 77 %-nak adódott a 4-AAA metabolit esetén, míg télen és kora tavasszal ez az érték elérte a 95 %-ot. Elsőre ellentmondásosnak tűnhet ez az eredmény, hiszen az a tapasztalatunk, hogy a téli hideg hónapokban nagyobb a lebontáshoz az oxigénigény, mint a tavaszi és nyári hónapokban. Az eleveniszapos technológiát alkalmazó Észak- és Dél-pesti szennyvíztisztító telepek vizeiben azonban a pszichrofil, vagyis a hidegkedvelő baktériumok vannak jelen nagyobb mennyiségben. Ezek a baktériumok $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ között képesek növekedésre és szaporodásra. A magyarországi Meteorológiai Adatbázis honlapján elérhető adatok szerint az átlag hőmérséklet 2011. július-augusztusban $+23\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2011. szeptember-októberben $+15,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2011. november-decemberben $+0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ és 2012. január-februárban $+9,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ volt [82]. A Fővárosi Csatornázási Művek Zrt. által részemre szolgáltatott biológiai tisztítási tározóban mért szennyvíz hőmérsékleti adatokat a 31. táblázat tartalmazza.

31. táblázat Elfolyó biológiai tisztítási tározó szennyvizeinek hőmérséklet adatai az Észak- és Dél-pesti szennyvíztisztító telepek esetén

		Észak-pesti szennyvíztisztító	Dél-pesti szennyvíztisztító
		Elfolyó biológiai tisztítási tározó [$^{\circ}\text{C}$]	
2011	május	19,5	18,4
	június	21,8	20,7
	július	22,5	22,1
	augusztus	23,3	24,1
	szeptember	22,7	22,9
	október	20,5	20,6
	november	19,3	19,1
	december	16,3	16,3
2012	január	15,1	15,7
	február	14,0	14,5
	március	15,9	16,1
	április	17,8	17,5

A metabolitok lebontását az adott szennyvíztisztító jellemző baktériumpopuláción túlmenően alapvetően befolyásolja a vízhőmérséklet és az oldott oxigén koncentrációja. Télen az alacsony hőmérséklet és az eleveniszapos technológia során nyitott medencékben végzett levegőztetés következtében az oldott oxigén koncentrációja nagyobb, ami kedvez pl. a pszichrofil baktériumok szaporodásának. Mindezek alapján, ahogy az várható volt, a 4-FAA bontási hatásfoka 5 % alatt volt a nyári, őszi hónapokban. Szerény növekedés (20-30 %) volt tapasztalható a 4-FAA tekintetében a téli, kora tavaszi hónapokban. A kapott adatokat a 15. ábra mutatja.

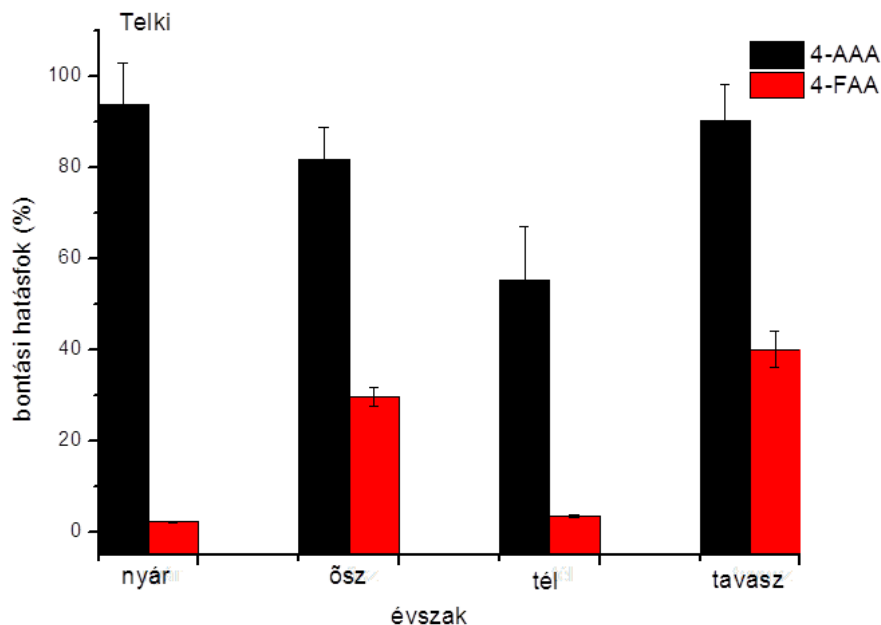


15. ábra A 4-AAA és a 4-FAA bontási hatásfokának évszakai változása az eleveniszapos technológiát alkalmazó Észak-pesti szennyvíztisztító esetén

A Telkiben működő fixfilmes reaktor rendszerből vett minták esetén - függetlenül a mintavétel időpontjától - azt tapasztaltuk, hogy a bontási hatásfok 80-94 % között volt a 4-AAA-metabolit esetén. Mivel ezekben az üvegházakban recirkulációs víz- és levegőztető rendszer működik, a fixfilmes reaktorokban a minimális és a maximális levegőhőmérséklet +8 °C és 30 °C között, míg a vízhőmérséklet +16 °C és +31 °C között változott a mintavételi időpontokban.

A 4-FAA metabolit esetén egy másik tendencia figyelhető meg a bontási hatásfok vonatkozásában. Míg a nyári és téli hónapokban 2-3 % az eltávolítás

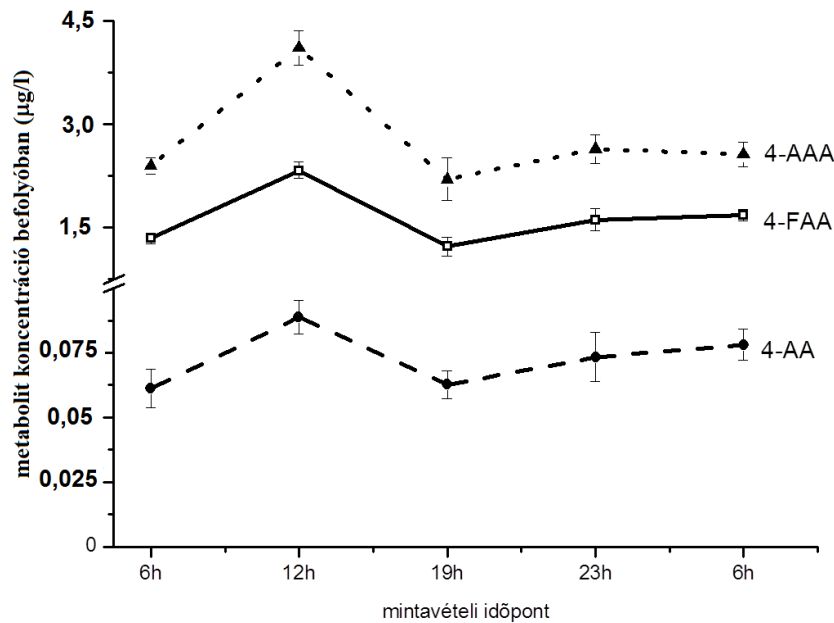
hatékonysága, addig 30-40 % az őszi és tavaszi hónapokban. A kapott eredményeket a 16. ábra mutatja.



16. ábra A 4-AAA és a 4-FAA bontási hatásfokának évszakos változása az élőgépes technológiát alkalmazó Telki szennyvíztisztító esetén

5.4. Dipiron metabolitok napi koncentrációjának ingadozása

2011 májusában hat óránkénti mintavétellel 24 órás koncentráció ingadozás vizsgálatot végeztünk a Dél-pesti szennyvíztisztító telep befolyó vizében. Megállapítottuk, hogy a hat óránként vett mintákban a 4-AA, 4-FAA és a 4-AAA metabolitok koncentrációja maximumértéket vett fel a 12 órakor gyűjtött mintákban. A reggel 6 órakor vett minta metabolit koncentráció értékeit tekintettük kiindulási pontnak az értékelés során. A 4-AA, 4-AAA és 4-FAA esetén rendre 46, 72, 73 %-os koncentrációnövekedést figyeltünk meg a délben gyűjtött mintákban a hat órával korábban vett mintákhoz képest. A 4-MAA esetén nem tudtunk hasonló következtetést levonni, mivel a mintákban található koncentrációja a meghatározási határ közelében volt, és a kapott értékek szórása túlságosan nagy volt ahhoz, hogy egyértelmű változásra következtethessünk. A 17. ábrán az egyes mintavételi időpontokhoz tartozó koncentráció értékek láthatóak az egyes metabolitok esetén.

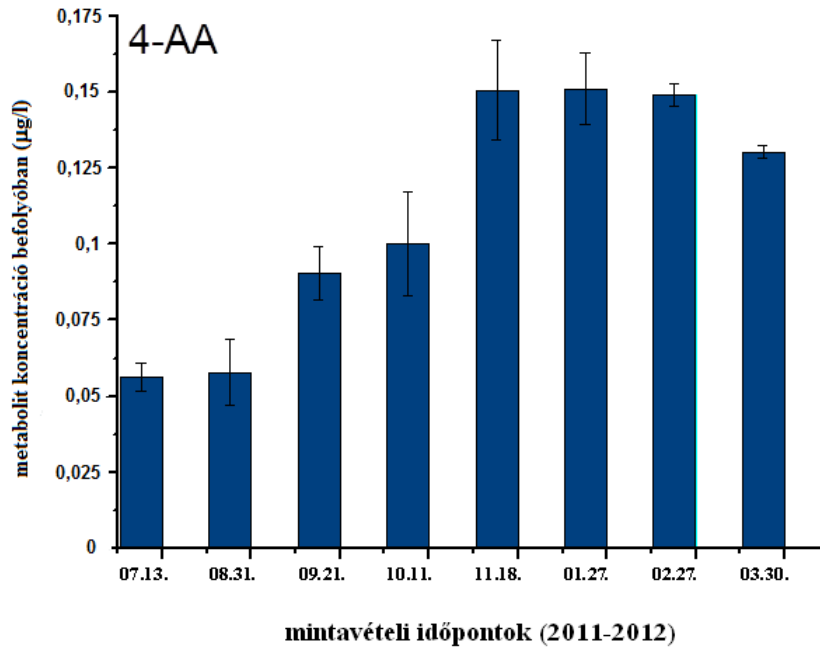


17. ábra Dipiron metabolitok koncentrációjának napi ingadozása a Dél-pesti szennyvíztisztító telep befolyó vizében

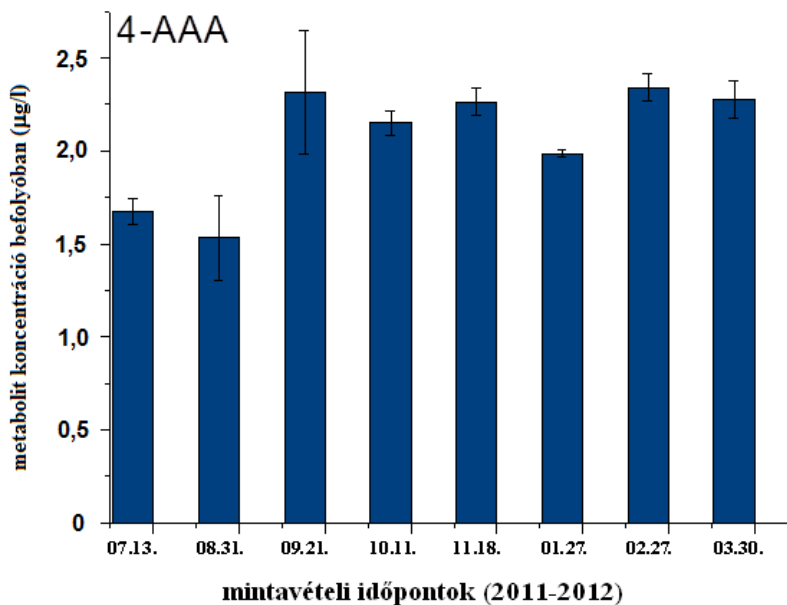
5.5. Dipiron metabolitok koncentrációjának évszakos változása az Észak-pesti szennyvíztelep befolyó szennyvizében

A 4-AAA, 4-AA és 4-FAA metabolitok koncentrációja az Észak-pesti szennyvíztisztító telep befolyó szennyvíz mintáiban, a téli időszakban (2011. november-2012. február) nagyobb volt, mint a nyári időszakban (2011. július-augusztus). Az átlag értékek 4-AA esetén 2,7-szer, 4-AAA esetén 1,4-szer, 4-FAA esetén pedig 1,6-szor nagyobb koncentrációt jeleztek. Hasonló tendencia volt megfigyelhető az őszi hónapok (2011. szeptember-október) esetén is, minden esetben növekedett a metabolitok koncentrációja a nyári időszakhoz képest. Ezek az adatok egyértelműen jelzik, hogy kapcsolat van a lakosság megnövekedett metamizol-nátrium tartalmú láz-és fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő gyógyszerek fogyasztása és a téli hónapok között. A kapott eredmények összhangban vannak azzal, hogy télen a fertőzéssel együtt járó gyulladásos betegségekre, illetve lázcsillapításra a háziorvosok előszeretettel írnak fel dipiron tartalmú gyulladáscsökkentőt. Továbbá megállapíthatjuk, hogy a 4-AA, 4-AAA és 4-FAA metabolitok koncentrációja a kora tavaszi szezonban majdnem ugyanazon az értéken marad, mint amekkora a téli szezonban mért érték volt. Az egyes

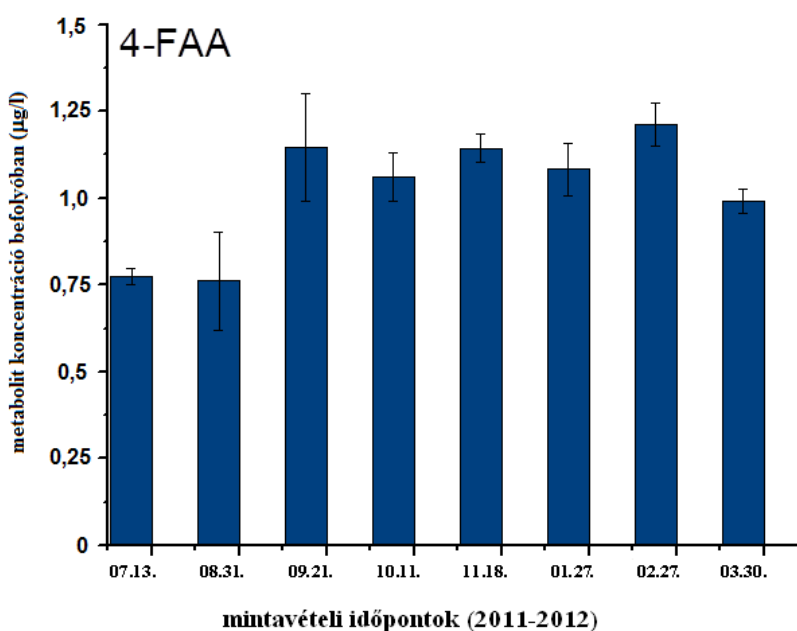
hónapokban a metabolitokra kapott átlagos koncentráció értékeket a hozzájuk tartozó szórásokkal a 18/a, 18/b és 18/c. ábrán láthatjuk.



18/a. ábra 4-AA koncentrációjának évszakos változása az Észak-pesti szennyvíztisztító befolyó vizében



18/b. ábra 4-AAA koncentrációjának évszakos változása az Észak-pesti szennyvíztisztító befolyó vizében



18/c. ábra 4-FAA koncentrációjának évszakos változása az Észak-pesti szennyvíztisztító befolyó vizében

5.6. A klórozás hatása a metabolitok eltávolítására

A klórozás hatását csak a Dél-pesti szennyvíztisztító telep esetén a tavasztól őszig gyűjtött minták esetén lehetett vizsgálni, hiszen csak itt alkalmaztak klórt (15mg/l) a biológiai úton tisztított víz további fertőtlenítése céljából a ráckevei üdülőövezet miatt.

Vizsgálataink szerint nem állapítható meg tendencia a klórozás hatásáról a metamizol metabolitok további degradációja szempontjából. Figyelembe véve mind a háromhavi mintavétel koncentráció értékeit a klórozás előtt, és a klórozás után vett szennyvízből, a számolt bontási határfok nagyon hasonlóan adódott a 4-AAA és 4-FAA metabolitok esetén, feltételezve, hogy az adott időszakban a szennyvíztisztító által befogadott víz mennyisége állandó volt. Az eltávolítás határfoka 4-AAA esetén 17 %, míg a 4-FAA esetén 15 % volt, vagyis csak csekély mértékben járul hozzá ezen metabolitok további degradációjához.

6. Megbeszélés

Az irodalomban fellelhetőek hasonló tanulmányok, melyeket különböző országokban végeztek, például Németországban és Spanyolországban üzemelő szennyvíztisztító telepek vizsgálatára, azonban ezekben a munkákban gyakran több vegyület egyidejű vizsgálatát végzik. Nem minden esetben törekednek egyetlen vegyület metabolitjainak meghatározására, inkább széleskörű tanulmányokat végeznek a gyógyszermolekulák egész skáláját átfogó mérésekkel. Ezért is fontos hangsúlyozni, hogy munkánk során mi egyetlen vegyület, mind a négy fő metabolitjának meghatározására koncentráltunk, illetve azt, hogy Magyarországon nem történt még meg ezeknek a molekuláknak a detektálása és monitorozása. Méréseink szempontjából az is egyedülállónak tekinthető, hogy különböző elven működő szennyvíztisztító telepek hatékonyságát hasonlítjuk össze ezeknek a molekuláknak a tekintetében, illetve, hogy két különböző teljesítményű HPLC-MS-rendszert alkalmaztunk vizsgálatok elvégzéséhez, így lehetőségünk volt ezeknek az analitikai mérés technikáknak az összehasonlítására is. Eredményeink összevetése az irodalomban található adatokkal nem könnyű, hiszen a metamizol-nátrium minden országban más-más gyógyszer specialitás formájában van forgalomban, illetve a gyógyszereszedési szokások is eltérnek az egyes országokban. Azt azonban meg lehet vizsgálni, hogy a más-más országokban alkalmazott, különböző szennyvíztisztítási technológiák milyen hatásfokkal távolítják el az általunk megfigyelt vegyületeket.

6.1. Analitikai mérés technikák összevetése

A mérések első felét egy egyszerűbb SPE-HPLC-ESI-Q-MS-rendszeren, míg a munkánk második részét egy nagyobb felbontású SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-rendszeren végeztük. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy természetesen mindkét analitikai mérési technika alkalmas a vegyületek detektálására a megfelelő mintaelőkészítést követően. A metabolitok szennyvizekben mérhető koncentrációja a $\mu\text{g/l}$ -es tartományban van, illetve a kifolyó vizek esetén a metabolitok lecsökkent koncentrációja a tized, illetve század $\mu\text{g/l}$ -es nagyságrendbe esik, így mindenképp indokolt az MS-detektor használata. Míg a Q-MS-rendszerrel végzett vizsgálatoknál a kifolyó vizekben legfőképp a 4-MAA metabolit detektálása nehézségekbe ütközött,

addig a Q-TOF-MS/MS-rendszerrel már az esetek döntő többségében sikerült ezt a vegyületet is kimutatni. Amellett, hogy ennek az analitikai mérés technikának a segítségével, egy nagyságrenddel jobb kimutatási határokat kaptunk (ng/l illetve tized ng/l), a metabolitok fragmenseinek detektálása révén a kapott értékek megbízhatósága is jelentősen nőtt, mivel az egyes tömegekhez tartozó ál pozitív eredmények előfordulása a módszer szelektivitása miatt nagymértékben lecsökkent. Ezt a bemutatott kromatogramok is jól szemléltetik.

Gyakorlati szempontból nem elhanyagolható az a tény sem, hogy mennyi időt vesz igénybe egy-egy minta mérése, hiszen minél rövidebb ideig tart az analízis, annál kevesebb vegyszert és üzemidőt használunk fel, ami a költségek csökkentését segíti elő. Mindamellett a minták nagy száma miatt a túl hosszú elemzési idő a mérések idejének nagymértékű növekedését okozhatja, ami a minták eltarthatóságának szempontjából lényeges kérdés. Ezért kedvezőbb a Q-TOF-MS/MS-rendszeren alkalmazott gradiens módszer, mely az analízis idejét az ötödére csökkenti, hiszen ebben az esetben nincs szükség a metabolitok tökéletes kromatográfias elválasztására.

6.2. Szennyvíztisztítási technológiák összehasonlítása

Mindegyik szennyvíztisztító telep vizsgálatakor kapott eredményről elmondható, hogy az általunk mért koncentráció értékek jó egyezést mutattak az irodalmi adatokkal. Valamennyi esetben a mért vegyületek közül a befolyó szennyvízben a 4-AAA fordult elő a legnagyobb koncentrációban, míg a tisztítást követően vett mintákban már a 4-FAA volt a domináns metabolit. Így kijelenthetjük, hogy ez a vegyület a legperzisztensebb metabolit mindközül. Ezek a megállapítások is megegyeznek a korábban más országokban közölt irodalmi adatokkal [24,25,67,70,71,73,75].

A két különböző típusú szennyvíztisztítási technológiával nyert vizsgálati eredmények összehasonlításával megállapítható, hogy a Telkiben, üvegházakban üzemelő integrált fixfilmes reaktorok jobb hatásfokkal távolítják el az általunk vizsgált metabolitokat, mint a Fővárosi Csatornázási Művek Zrt. szennyvíztisztító telepein és Európában is elsődlegesen alkalmazott eleveniszapos, nyitott medencékben üzemelő rendszerek. Feltételezve, hogy a bejövő szennyvíz mennyisége az egyes hónapokban állandó, a kifolyó és befolyó vizekben található metabolitok koncentrációjának arányából a bontási hatásfok meghatározható. Ezen a módon évszakos változás

figyelhető meg a 4-AAA és a 4-FAA koncentrációjában mind a hagyományos eleveniszapos technológiát alkalmazó, mind a fixfilmes reaktorokat alkalmazó szennyvíztisztító telep esetében.

A Telki szennyvíztisztító estén valamivel nagyobb eltávolítási hatékonyságot figyelhetünk meg az eleveniszapos technológiát alkalmazó Észak-pesti szennyvíztisztítóval szemben. Ez nem csak annak köszönhető, hogy a fixfilmes reaktorok esetén az egyenletes hőmérséklet, valamint a kedvező kevert (an)oxikus feltételek mellett fokozott a 4-AAA metabolit degradációja, hanem a biofilmekben jelenlevő baktérium közösségek miatt is, mint ahogy azt *Pieper* és munkatársai is leírták [18]. Eszerint azok a mikroorganizmusok, melyek a folyamatos működésű integrált fixfilmes reaktorokban nőnek, képesek a 4-MAA metabolitot 8 órán belül lebontani, és így a keletkező 4-FAA és 4-AA metabolitok megfigyelhetők. A kezdeti emelkedő 4-FAA koncentrációk állandóvá válnak. A 4-MAA metabolizációja az emberi szervezetbeli lebontással analóg módon történik, míg a 4-AA úgy tűnik, hogy csak 4-FAA metabolittá alakul. Az ő esetükben a 4-AAA nem volt detektálható vagy azért, mert nem keletkezett, vagy a túl gyors lebomlása miatt. A gyorsabb bomlási sebesség a 4-AAA esetén lehet, hogy összefügg azzal a ténnyel, hogy amidok és aromás észter szubsztituensek stimulálják a szerves vegyületek lebontását [83].

Legjobb tudomásunk szerint jelen vizsgálat az első, amely alternatív szennyvízkezelési technológiák összehasonlítására összpontosít dipiron metabolitok eltávolítására.

A kis koncentrációjuk és a koncentráció értékek nagyobb ingadozása miatt a 4-AA és 4-MAA metabolitok esetén nem tudunk hasonló szezonális értékelést végezni a különböző elven működő szennyvíztisztító telepek összehasonlítására.

6.3. Dipiron metabolitok napi koncentráció ingadozása

Az irodalomban nem találhatóak hasonló mérések a napi koncentráció ingadozás vizsgálatára, igaz az általunk végzett analízis is még megerősítésre szorul, hiszen csak egyszeri alkalommal sikerült megvizsgálni a befolyó vizek metabolit tartalmát 24 órán keresztül. A négy fő dipiron metabolit közül három (4-AA, 4-FAA, 4-AAA) esetében sikerült megfigyelni napszakhoz rendelhető koncentrációváltozást. Mivel a 4-MAA koncentrációja a legkisebb a befolyó vizekben, és ehhez képest a kapott koncentráció

értékek szórása nagynak adódott, így az értékelés során az erre a vegyületre kapott adatokat nem tüntettük fel. A másik három metabolit esetén azonban határozott koncentrációnövekedés volt megfigyelhető a déli órákban gyűjtött mintákban. Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy a gyulladással és lázzal járó megbetegedések esetén az éjszakára bevett fájdalom-és lázcsillapító gyógyszerek maradványai a reggeli vizelettel ürülnek ki a szervezetből, és a szennyvíztisztítóba kerülve, ott az előülepítő medencében töltött 4 óra elteltével, körülbelül 12 órakor jelennek meg a szennyvíztisztító rendszerben.

6.4. Dipiron metabolitok koncentrációjának évszakos változása

Az Észak-pesti szennyvíztisztító telep befolyó vizében a metabolitok koncentrációjának évszakos változását vizsgálva sikerült azt a feltételezésünket igazolni, miszerint az őszi-téli hónapokban, amikor az ilyen típusú gyógyszerek felhasználása megnövekszik, a szennyvizekben is kimutatható az általunk vizsgált vegyületek koncentrációjának növekedése. Ebben az esetben is biztosan három metabolit, a 4-AA, 4-FAA és 4-AAA esetén beszélhetünk egyértelmű változásról. Szeptembertől egészen márciusig megfigyelhető az emelkedett metabolit tartalom a befolyó szennyvízben.

6.5. A klórozás hatása a metabolitok eltávolítására

A Ráckevei-Soroksári Duna-ágba kerülő biológiailag tisztított szennyvíz fertőtlenítését klórozással végezték a nyári hónapokban a közelben levő üdülőövezet miatt. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a klórozás, mint oxidációs folyamat, alig járult hozzá a már tisztított szennyvíz vizsgált dipiron metabolitok koncentrációjának további csökkentéséhez. A várt további oxidáció esetleges elmaradása abból is adódhat, hogy az 50-es KOI érték mellett az adagolt 15 mg/l klórt az egyéb, könnyebben oxidálható szennyezők „elfogyasztják”.

2012-ben a telepről távozó tisztított víz fertőtlenítésére szolgáló, korábbi klórozásos megoldást felváltotta a környezetkímélőbb UV-fertőtlenítés, melynek a metabolitokra kifejtett hatása azonban újabb vizsgálatokat igényel.

7. Következtetések

7.1. Módszerkidolgozás dipiron metabolitok meghatározására szennyvíz mintákban

Kísérleti munkánk első lépéseként módszer dolgoztunk ki a metamizol-nátrium négy fő metabolitjának (4-AA, 4-AAA, 4-FAA, 4-MAA) meghatározására szennyvizekben SPE-HPLC-MS-módszerrel. A referencia anyagok előállítását követően optimalizáltuk mind a mintaelőkészítés, mind a kromatográfiás elválasztás lépéseit.

Egyszeri, három párhuzamos mintavétellel vizsgáltuk a szennyvíztisztító telepekre befolyó nyers, illetve a már mechanikai és biológiai úton tisztított kifolyó vizeket.

A szennyvízminták összetett mátrixa és a metabolitok kis koncentrációja miatt SPE felhasználásával töményítettük a vizsgált alkotókat, azok poláris jellegének köszönhetően HPLC-elválasztást végeztünk, és a detektáláshoz a várható kis koncentrációk miatt tömegspektrométert alkalmaztunk. A mérések értékeléséhez kalibrációs sorozatokat készítettünk, az egyes vegyületekre kapott jellemző analitikai mérőgörbe segítségével adtuk meg a koncentráció értékeket.

Meghatároztuk az általunk vizsgálni kívánt szennyvíztisztító telepeken mind a befolyó, mind a kifolyó vizekben a célvegyület metabolitjait, ami igazolja azt a tényt, hogy a metamizol-nátrium az egyik legnépszerűbb fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő hatóanyag hazánkban. Így a várakozásainknak megfelelően a vizelettel ürülő metabolitok jelenlétét $\mu\text{g/l}$ -es koncentrációban igazoltuk az általunk vizsgált fővárosi és elővárosi szennyvizekben. Eredményeink demonstrálják, hogy a budapesti lakosság nagymértékben hozzájárul a metabolitok szennyvizekbe kerülő koncentrációjának alakulásához.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a legnagyobb mennyiségben a 4-AAA metabolit fordul elő az előülepített vizekben, míg a legkevésbé lebontható vegyület a 4-FAA, ami a korábbiakban leírt irodalmi adatokkal összhangban van.

Kutatásaink alapján elengedhetetlen lenne olyan, a biológiai tisztítást követő utótisztítási lépcső (például AOP, membrán bioreaktorok stb.) bevezetése, amely javítja ennek, az egyre növekvő koncentrációban jelen levő szennyezőanyagnak az eltávolítási határfokát a vízi környezet és ökológiai rendszer védelme érdekében.

7.2. Különböző mérési és tisztítási technológiák összehasonlítása

Az eredmények fejezetben bemutatott SPE-HPLC-ESI-Q-MS- és SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-technikák alkalmasak az általunk választott gyógyszermolekula, a metamizol-nátrium metabolitjainak vizsgálatára. A szennyvízminták előkészítéséhez használt SPE-módszer, illetve az analitikai mérés technikák alkalmazhatóságát visszanyerés és linearitás vizsgálatokkal bizonyítottuk.

A kétfajta mérés technikával kapott eredményeket összevetve jó egyezést kapunk a mért koncentráció adatokban, ami igazolja a választott módszerek alkalmasságát a kitűzött célra.

Összehasonlítva az egyes szennyvíztisztító telepek hatékonyságát a metabolitok eltávolítása szempontjából azt tapasztaltuk, hogy a Telkiben működtetett integrált fixfilmes reaktorok egy kicsivel jobb hatásfokkal távolítják el ezeket a vegyületeket, az eleveniszapos, nyitott medencéket alkalmazó rendszerhez viszonyítva. Bár mindkét esetben jelentősen csökken a metabolitok koncentrációja, teljes eltávolításuk nem valósul meg egyik tisztítási technológia alkalmazása esetén sem.

Az összetett szennyvíztisztítási folyamatok miatt szükség lenne olyan biológiai és kémiai degradációs laboratóriumi méretű modellek létrehozására, melyek a lehető legjobban szimulálják a valódi körülményeket, és segítségükkel a lebontási folyamatok jobban megismerhetőek, így célzottan lehetne vegyületeket eltávolítani a szennyvízkezelő rendszerekből.

7.3. Szennyvíztisztító telepek monitorozása, a metabolitok napi és évszakos koncentráció ingadozásának vizsgálata

Előző vizsgálataink alapján elmondható, hogy a kezeletlen és kezelt szennyvízmintákban viszonylag jelentős koncentrációban jelenlevő metabolitok vizsgálata kiemelkedően fontos, hiszen eltávolítások a tisztítási eljárások során nem teljes, illetve a felszíni vizekbe kerülve további sorsuk, és a környezetre gyakorolt hatásuk ismeretlen. Ez a kérdés a felszíni vizek biodiverzitásának megőrzése miatt bír különös jelentőséggel. A kérdés kémiai oldalának feltárása érdekében a szennyvíztisztító telepek monitorozását havi mintavételezéssel végeztük, mind a nyers, mind a tisztított vizek vonatkozásában, illetve egy alkalommal 24 órás, 6 óránkénti mintavételen alapuló monitorozást valósítottunk meg. A metabolitok napi és évszakos

koncentráció értékek változásának meghatározása fontos annak érdekében is, hogy kockázat értékelést tudjunk végezni arról, hogy melyik időszakban mekkora mennyiségben kerülhetnek ezek a vegyületek a folyóvizekbe.

Az évszakos változások vizsgálatokor kapott eredmények megerősítették azt a tényt, hogy a lakosság körében mennyire népszerű ez a láz- és fájdalomcsillapító hatóanyag, hiszen a téli, megfázással és lázzal járó megbetegedések időszakában a 4-AA, 4-AAA és 4-FAA vegyületek koncentrációja a befolyó szennyvizek esetén jelentősen megnőtt.

A napi ingadozás vizsgálatokor azt tapasztaltuk, hogy három metabolit tekintetében (4-AA, 4-AAA, 4-FAA) a koncentrációjuk a déli órákban rendre 46%, 72%, 73%-kal nő a hat órával korábbi értékhez képest. Ez összefüggésben lehet azzal, hogy az éjszakára bevett láz és fájdalomcsillapítók metabolitjai a reggeli vizelettel ürülnek, és számításba véve, hogy a Dél-pesti szennyvíztisztító telepen a kezeletlen szennyvíz tartózkodási ideje az előülepítő tartályban kb. 4 óra, így azok 12 órákor érik el a legnagyobb koncentrációjukat a befolyó vízben.

7.4. Klórozás hatása a metabolitok eltávolítására

Eredményeinkkel igazoltuk, hogy az általunk vizsgált Dél-pesti szennyvíztisztító telepen, a nyári időszakban fertőtlenítés céljából alkalmazott klórozásos technológia a metamizol-nátrium metabolitjainak esetében nem növeli jelentősen tovább az eltávolítás hatásfokát.

A szennyvizek különböző tisztítási technológiákkal való kezelés, illetve a tanulmányozott szerves molekulákra gyakorolt hatásának feltárása még további kísérleteket igényel annak érdekében, hogy a tisztított szennyvizekből minél kevesebb szennyező juthasson a felszíni vizekbe. A 2012-től bevezetett UV-fertőtlenítés a klórozással szemben kétségtelenül környezetkímélőbbnek tűnik, de gyakorlatilag semmit sem tudunk az UV-fotonok által kiváltott fotokémiai folyamatokról, amelyek számos esetben a kiindulási anyagnál toxikusabb alkotók megjelenését eredményezhetik.

8. Összefoglalás

A disszertáció három részre tagolható. **Az első részben** SPE-HPLC-MS-módszert dolgoztunk ki a metamizol-nátrium négy fő metabolitjának (4-AA, 4-AAA, 4-FAA és 4-MAA) szennyvízmintákból történő kvantitatív meghatározásához. A mérések elvégzéséhez referencia anyagokat szintetizáltunk, melyek segítségével optimalizáltuk a mintaelőkészítést és az analitikai méréstechnikát. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a szennyvízminták komplex mátrixa miatt a szilárd fázisú extrakció ajánlott, és csak a tömegspektrometriás detektálás teszi lehetővé a kis koncentrációban jelenlévő metabolitok mérését. Sikertült mind a négy metabolitot meghatározni $\mu\text{g/l}$ -es koncentráció tartományban, három, különböző szennyvíztisztító telep nyers és az elfolyó vizeiben egyaránt. **A második részben** a Fővárosi Csatornázási Művek Zrt. által üzemeltetett, eleveniszapos technológiát alkalmazó Észak- és Dél-pesti szennyvíztisztító telep, illetve az Organica Környezettechnológiák Zrt. által Telkiben működtetett növényi gyökereken és mesterséges hordozókon keletkező fixfilmes technikát használó szennyvíztisztító telep hatékonyságát hasonlítottuk össze az általunk tanulmányozott vegyületek tekintetében. Várakozásainknak megfelelően azt kaptuk, hogy minden esetben a befolyó vízben nagyobb koncentrációban vannak jelen ezek a vegyületek, mint a kifolyó vízben. Továbbá az is elmondható, hogy a fix ágyas biofilmek valamivel hatékonyabban távolítják el ezeket a molekulákat, hiszen a 4-AAA esetében a bontási hatásfok Telkiben 80-94 % között alakult, míg az Észak-pesti szennyvíztisztító telep esetén 65-95 % közötti értékeket kaptunk. Munkánk **harmadik részében** a szennyvíztisztító telepek monitorozását végeztük 2011 júniusa és 2012 márciusa között. Évszakos és napi ingadozást figyeltünk meg az Észak-pesti szennyvíztisztító telep befolyó vizében. Havi rendszerességgel vizsgáltuk a szennyvizeket, mely eredmények szerint az őszi-téli hónapokban mintegy 1,4-2,7-szer nagyobb koncentráció értékeket kaptunk az egyes metabolitokra. 2011 májusában, egyszeri 24 órán keresztül tartó, 6 óránkénti mintavétel esetén a napi koncentráció értékek a déli 12 órakor vett mintákban maximum értéket vettek fel. Vizsgáltuk továbbá a Dél-pesti szennyvíztisztító telep esetén a fertőtlenítés céljából alkalmazott klórozás hatását a már kezelt szennyvizekben levő metabolitok további degradációja szempontjából. Megállapítottuk, hogy ez az oxidációs lépés gyakorlatilag nem befolyásolta a metabolitok koncentrációját.

9. Summary

The thesis can be divided into three parts. The **first part** is devoted to development of an SPE-HPLC-MS method for quantitative determination of four main metabolites of dipyrone (4-AA, 4-AAA, 4-FAA and 4-MAA) in communal wastewater. To perform the measurements, reference materials were synthesized, which allowed optimizing the sample preparation and analytical techniques. On basis of our experiments it can be stated that the solid phase extraction is recommended for sample preparation due to the complex matrix of the wastewater. Moreover the mass spectrometric detection is required because of the low concentration of the metabolites. By applying the developed method to real samples, all four investigated metabolites of the pro-drug could be identified in $\mu\text{g/l}$ concentration in the influent and in the effluent samples as well. In **the second part**, effectiveness of the conventional wastewater treatment plants (WWTPs) of the Budapest Sewage Works Ltd. (activated sewage sludge technology with or without disinfection) with fixed biofilm reactor system of Organica Water Co. Ltd. in Telki were compared concerning these metabolites. Both the untreated influent and the treated effluent water samples were analyzed. As expected, the concentration of all metabolites was higher in the influents than the effluents in case of all samples. Slightly higher removal efficiency obtained in the WWTP using fixed biofilm technology, as in the case of 4-AAA it was between 80 to 94 % in Telki, while 65 to 95 % for the North Pest Wastewater Treatment Plant. In **the third part** of our work, these WWTPs were monitored between June 2011 and March 2012. Seasonal and intraday fluctuations were observed in influent waters of the North Pest Wastewater Treatment Plant. The evaluation of seasonal changes in the concentration of dipyrone metabolites showed that their concentrations increased 1.4-2.7 times higher during the autumn and winter seasons. In the case of the influent wastewater samples, taken every six hours for 24 h in May 2011, a peak value in the concentrations of metabolites was registered in the samples collected at noon. Furthermore the effect of chlorination applied for disinfection of biologically treated wastewater on the degradation of dipyrone metabolites was studied in the South Pest WWTP. It was established that this oxidation procedure practically had not influence on the concentrations of metabolites.

10. Irodalomjegyzék

- [1] **Neal JM.** Nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID-ok). Székely G. (szerk.) *Rövid farmakológia.* B+V, Szentendre, 2000: 70-71.
- [2] **Gyires K.** Nem szteroid gyulladásgátlók, nem kábító fájdalomcsillapítók és köszvényellenes szerek. Fürst Zs. (szerk.), *Farmakológia.* Medicina, Budapest, 2006: 844-873.
- [3] **Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkrantz N.** (1995) Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. *Clinical Pharmacokinetics*, 28: 216-234.
- [4] **Ergün H, Fratarelli DAC, Aranda JV.** (2004) Characterization of the role of physiochemical factors on the hydrolysis of dipyron. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 479-487.
- [5] **Geisslinger G, Bocker R, Levy M.** (1996) High performance liquid chromatographic analysis of dipyron metabolites to study their formation in human liver microsomes. *Pharmaceutical Research*, 13: 1272-1275.
- [6] **Gómez MJ, Sirtori C, Mezcua M, Fernández-Alba AR, Agüera A.** (2008) Photodegradation study of three dipyron metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products. *Water Research*, 42: 2698-2706.
- [7] **Xiang O, Niu G, Wu X, Chen G.** (2007) Stability and determination of metamizole sodium by capillary electrophoresis analysis combined with infra-red spectroscopy. *Chemical Research in Chinese Universities*, 23: 654-658.
- [8] **Huntscha S, Singer HP, Mcardell CS, Frank CE, Hollender J.** (2012) Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1268: 74-83.
- [9] **Kosjek T, Heath E.** (2008) Application of mass spectrometry to identifying pharmaceutical transformation products in water treatment. *Trends in Analytical Chemistry*, 27: 807-819.
- [10] **Assumpção MHMT, Moraes A, De Souza RFB, Reis RM, Rocha RS, Gaubeur I, Calegari ML, Hammer P, Lanza MRV, Santos MC.** (2013) Determination of

dipyron via advanced oxidation processes using a cerium nanostructured electrocatalyst material. *Applied Catalysis A: General*, 462-463: 256-261.

[11] **Yalfani MS, Contreras S, Medina F, Sueiras J.** (2009) Phenol degradation by Fenton's process using catalytic in situ generated hydrogen peroxide. *Applied Catalysis B: Environmental*, 89: 519–526.

[12] **Lee C, Yoon J, Von Gunten U.** (2007) Oxidative degradation of N-nitrosodimethylamine by conventional ozonation and the advanced oxidation process ozone/hydrogen peroxide. *Water Research*, 41: 581–590.

[13] **Gozmen B, Kayan B, Gizir AM, Hesenov A.** (2009) Oxidative degradations of reactive blue 4 dye by different advanced oxidation methods. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 129–136.

[14] **Giomo M, Buso A, Fier P, Sandonà G, Boye B, Farnia G.** (2008) A small-scale pilot plant using an oxygen-reducing gas-diffusion electrode for hydrogen peroxide electrosynthesis. *Electrochimica Acta*, 54: 808–815.

[15] **Forti JC, Rocha RS, Lanza MRV, Bertazzoli R.** (2007) Electrochemical synthesis of hydrogen peroxide on oxygen-fed graphite/PTFE electrodes modified by 2-ethylanthraquinone. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 601: 63–67.

[16] **Pérez-Estrada LA, Malato S, Agüera A, Fernández-Alba AR.** (2007) Degradation of dipyrone and its main intermediates by solar AOPs. Identification of intermediate products and toxicity assessment. *Catalysis Today*, 129: 207-214.

[17] **Lebedev A.** (2007) Mass spectrometry in the study of mechanisms of aquatic chlorination of organic substrates. *European Journal of Mass Spectrometry*, 13: 51-56.

[18] **Pieper C, Risse D, Schmidt B, Braun B, Szewzyk U, Rotard W.** (2010) Investigation of the microbial degradation of phenazone-type drugs and their metabolites by natural biofilms derived from river water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Water Research*, 44: 4559-4569.

[19] http://www.fcsm.hu/ceginformacio/a_budapesti_csatornazas_tortenete/napjaink/

[20] <http://en.easen-group.com/node/222>

- [21] **Nikolaou A, Meric S, Fatta D.** (2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1225-1234.
- [22] **Kummerer K, Alexy R, Huttig J, Scholl A.** (2004) Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria. *Water Research*, 38: 2111-2116.
- [23] **Farré M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella L, Tirapu L, Vilanova M, Barcelo D.** (2001) Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A*, 938: 187-197.
- [24] **Bueno MJM, Agüera A, Gómez MJ, Hernando MD, García-Reyes JF, Fernández-Alba AR.** (2007) Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Analytical Chemistry*, 79: 9372-9384.
- [25] **Rosal R, Rodríguez A, Perdigón-Melón JA, Petre A, García-Calvo E, Gómez MJ, Agüera A, Fernández-Alba AR.** (2010) Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonization. *Water Research*, 44: 578-588.
- [26] **Ternes TA,** (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32: 3245-3260.
- [27] **Hilton MJ, Thomas KV.** (2003) Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015: 129-141.
- [28] **Ternes T, Bonerz M, Schmidt T.** (2001) Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938: 175–185.
- [29] **Andrási N, Helenkár A, Záray G, Vasanits 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. *Journal of Chromatography A*, 1218: 1878-1890.

[30] **Sebők Á, Vasánits-Zsigrai A, Helenkár A, Záray G, Molnár-Perl I.** (2009) Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 2288-2301.

[31] **Sebők Á, Vasánits-Zsigrai A, Palkó G, Záray G, 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.

[32] **Sebők Á, Sezer K, Vasánits-Zsigrai A, Helenkár A, Záray G, Molnár-Perl I.** (2008) Gas chromatography–mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: Their presence in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, 1211: 104-112.

[33] **Andrási N, Helenkár A, Vasánits-Zsigrai A, Záray G, 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. *Journal of Chromatography A*, 1218: 8264-8272.

[34] **Weigel S, Kallenborg R, Hühnerfuss H.** (2004) Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1023: 183-195.

[35] **Lin WC, Chen HC, Ding WH.** (2005) Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1065: 279-285.

[36] **Möder M, Schrader S, Winkler M, Popp P.** (2000) Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *Journal of Chromatography A*, 873: 95-106.

[37] **Lee HB, Peart Thomas E, Lewina SM.** (2005) Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1094: 122-129.

- [38] **Tauxe-Würsch A, de Alencastro LN, Grandjean D, Tarradellas J.** (2005) Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*, 39: 1761-1772.
- [39] **Jux U, Baginski R, Hans-Gunter A, Kronke M, Seng P.** (2002) Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205: 393-398.
- [40] **Huggett DB, Khan IA, Foran CM, Schlenk D.** (2003) Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent. *Environmental Pollution*, 121: 199-205.
- [41] **Rodriguez I, Quintana JB, Carpinteiro J, Carro AM, Lorenzo RA, Cela R.** (2003) Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 985: 265-284.
- [42] **Verenitch SS, Lowe CJ, Mazumder A.** (2006) Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1116: 193-203.
- [43] **Bound PJ, Vourvoulis N.** (2006) Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Research*, 40: 2885-2892.
- [44] **Gonzalez-Barreiro C, Lores M, Casais MC, Cela R.** (2003) Simultaneous determination of neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater by high-performance liquid chromatography-post-column photochemically induced fluorimetry. *Journal of Chromatography A*, 993: 29-37.
- [45] **Babic S, Asperger D, Mutavdzic D, Horvat AJM, Kastelan-Macan M.** (2006) Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta*, 70: 732-738.
- [46] **Petrovic M, Eljarrat E, López de Alda MJ, Barcelo D.** (2002) Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 974: 23-51.
- [47] **Ternes TA.** (2001) Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 20: 419-434.

- [48] **Diaz-Cruz MS, Barcelo D.** (2005) LC-MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 645-657.
- [49] **Benotti MJ, Ferguson PL, Rieger RA, Iden CR, Heine CE.** (2003) HPLC/TOF-MS: An alternative to LC/MS/MS for sensitive and selective determination of polar organic contaminants in the aquatic environment. *Liquid chromatography/mass spectrometry, MS/MS and time-of-flight MS. ACS Symposium*, 850: 109-127.
- [50] **Stolker AAM, Niesing W, Fuchs R, Vreeken RJ, Niessen WMA.** (2004) Liquid chromatography with triple-quadrupole and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for the determination of micro-constituents - a comparison. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 1754-1761.
- [51] **Pfeifer T, Tuerk J, Bester K, Spiteller M.** (2002) Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 16: 663-669.
- [52] **Horimoto S, Mayumi T, Aoe K, Nishimura N.** (2000) Identification of FC/TA-891 and its metabolite, FCE22101 by high performance liquid chromatography - Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using bromoform. *Chromatographia*, 52: 741-744.
- [53] **Horimoto S, Mayumi T, Aoe K, Nishimura N, Sato T.** (2002) Analysis of beta-lactam antibiotics by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using bromoform. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30: 1093-1102.
- [54] **Hirsch R, Ternes TA, Haberer K, Mehlich A, Ballwanz F, Kratz KI.** (1998) Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 815: 213-223.
- [55] **Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurmans EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT.** (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36: 1202-1211.
- [56] **Renew JE, Huang CH.** (2004) Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase

extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1042: 113-121.

[57] **Petrovic M, Gonzalez S, Barceló D.** (2003) Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 685-696.

[58] **Sacher F, Lange F, Brauch H, Blankenhorn I.** (2001) Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, 938: 199-210.

[59] **Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL.** (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225: 109-118.

[60] **Hernando MD, Petrovic M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D.** (2004) Analysis by liquid chromatography-electro spray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for beta-blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, 1046: 133-140.

[61] **Castiglioni S, Bagnati R, Calamari D, Fanelli R, Zuccato E.** (2005) A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1092: 206-215.

[62] **Gomez MJ, Pterovic M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D.** (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1114: 224-233.

[63] **Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB.** (2006) Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy, effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, 366: 772-783.

[64] **Balakrishnan VK, Terry KA, Toito J.** (2006) Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Journal of Chromatography A*, 1131: 1-10.

[65] **Quintana JB, Rodil R, Reemtsma T.** (2004) Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by

liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *Journal of Chromatography A*, 1061: 19-26.

[66] **Pérez S, Barcelo D.** (2007) Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 26: 494-514.

[67] **Kahle M, Buerge IJ, Müller MD, Poiger T.** (2009) Hydrophilic anthropogenic markers for quantification of wastewater contamination in ground- and surface water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 2528-2536.

[68] **Gómez MJ, Martínez Bueno MJ, Lacorte S, Fernández-Alba AR, Agüera A.** (2007) Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66: 993-1002.

[69] **Moldovan Z.** (2006) Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, 64: 1808-1817.

[70] **Zuehlke S, Duennbier U, Heberer T.** (2004) Determination of polar drug residues in sewage and surface water applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76: 6548-6554.

[71] **Feldmann DF, Zuehlke S, Heberer T.** (2008) Occurrence, fate and assessment of polar metamizol (dipyrone) residues in hospital and municipal wastewater. *Chemosphere*, 71: 1754-1764.

[72] **Gracia-Lor E, Sancho JV, Hernández F.** (2010) Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 622-632.

[73] **Guedes-Alonso R, Afonso-Olivares C, Montesdeoca-Esponda S, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ.** (2013) An assessment of the concentrations of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plants on the island of Gran Canaria (Spain). *SpringerPlus*, 2:24.

[74] **Afonso-Olivares C, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ.** (2012) Analysis of anti-inflammatory, analgesic, stimulant and antidepressant drugs in purified water from wastewater treatment plants using SPE-LC tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health A*, 47: 887-895.

- [75] **Ibáñez M, Gracia-Lor E, Sancho JV, Hernández F.** (2012) Importance of MS selectivity and chromatographic separation in HPLC-MS/MS-based methods when investigating pharmaceutical metabolites in water. Dipyrone as a case of study. *Journal of Mass spectrometry*, 47: 1040-1046.
- [76] **Garcia-Lor E, Sancho JV, Hernández F.** (2011) Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1218: 2264-2275.
- [77] **Kravchenya NA.** (1984) Preparation of antipyridamides. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 18: 1241-1242.
- [78] **Sun Ho J, Jin Hee A, Sang Kyu P, Joong-Kwon C.** (2002) *Bulletin of Korean Chemical Society*, 23: 149-150.
- [79] **Chiti W,** (1960) *Farmacologia*. Pavia 679-686.
- [80] **Szabó Z, Szoboszlai N, Jámbor É, Gulyás G, Lóránd T, Ochmacht R, Záray G, Mihucz VG.** (2013) Determination of four dipyrone metabolites in Hungarian municipal wastewater by liquid chromatography mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 107: 152-157.
- [81] **José-Gómez M, Malato O, Ferrer I, Agüera A, Fernández-Alba AR.** (2007) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *Journal of Environmental Monitoring*, 9: 719-729.
- [82] http://www.amsz.hu/eszleles/static_charts/
- [83] **Alexander M.** *Biodegradation and bioremediation*, Academic Press, San Diego (1999)

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. Szabó Z, Szoboszlai N, Jámber É, Gulyás G, Lóránd T, Ohmacht R, Záray G, Mihucz VG. (2013) Determination of four dipyrone metabolites in Hungarian municipal wastewater by liquid chromatography mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 107: 152-157.
IF: 2,850
2. Szabó Z, Szoboszlai N, Frigyes D, Záray G, Mihucz VG. (2014) Monitoring of four dipyrone metabolites in communal wastewater by solid phase extraction liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 90: 58-63.
IF: 2,853

11.2. Disszertációtól független publikáció

1. Szoboszlai N, Réti A, Budai B, Szabó Z, Kralovánszky J, Záray G. (2008) Direct elemental analysis of cancer cell lines by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63: 1480-1484.
IF: 3,047

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek **Prof. Dr. Záray Gyulának**, hogy munkámat irányította, annak feltételeit megteremtette és értékes tanácsokkal látott el a doktori disszertációm tartalmi és formai összeállításában.

Köszönöm a Gyógyszertudományok Doktori Iskola elnökének, **Dr. Szőke Évának** a lehetőséget, hogy a Ph.D. tanulmányaimat elvégezhettem.

Köszönöm konzulensemnek **Dr. Szoboszlai Norbert** adjunktusnak, hogy doktori munkám során mindig számíthattam rá a kísérletek megtervezésétől kezdve azok kiértékeléséig és értelmezéséig. **Dr. Mihucz Viktor Gábor** adjunktusnak köszönöm önzetlen segítségét és biztatását doktori munkám során. Köszönöm **Dr. Barkács Katalin ny. adjunktusnak**, hogy a minták rendelkezésemre bocsátását segítette, és munkám során felmerült szakmai kérdéseimre adott részletes válaszait.

Köszönettel tartozom **Dr. Ochmacht Róbertnek**, hogy a Pécsen végzett mérések elvégzésére lehetőséget kaptam, és **Jámbor Éva PhD hallgatónak** a méréseknél nyújtott segítségéért, és a baráti légkörért, amiben dolgozhattam. Köszönet illeti **Gulyás Gergelyt**, és **Dr. Lóránd Tamást**, a referencia-anyagok előállításában nyújtott segítségükért.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Clementis Györgynek**, az Egis Gyógyszergyár Nyrt. Analitikai Fejlesztési Főosztályának vezetőjének, hogy a HPLC-ESI-Q-TOF-MS mérések elvégzését engedélyezte, illetve köszönöm **Dr. Kapui Imrének**, a Hatóanyag Analitikai Fejlesztési Laboratórium vezetőjének, hogy ösztönzött, és támogatta Ph.D. tanulmányaimat a munkavégzés mellett. Valamint köszönöm **Dr. Frigyes Dávidnak**, hogy a mérések elvégzéséhez mindig szakított rám időt.

Köszönetmet fejezem ki **Dr. Hankó Baláznak**, amiért a metamizol-nátrium tartalmú gyógyszerek eladási adatait a rendelkezésemre bocsátotta.

Végül köszönöm Családomnak szeretetüket és támogatásukat, férjemnek, Tamásnak pedig kitartó türelmét és a mindennapi békés háttérét.