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

Doktori tézisek

Dr. Andrási Nóra Edina

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

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

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

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

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

Budapest
2012

1. Bevezetés

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

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

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

2. Célkitűzések

Az előzetes irodalmi áttekintésnek megfelelően, a munkám célja:

a. a korábban kidolgozott, sok összetevőt elemző rendszer kiterjesztése, egy sor, különböző típusú és eredetű szteroid vegyülettel. Ennek érdekében:

b. részletes származékkészítési- és fragmentációs tanulmány készítése.

- A csak szililezett, vagy változatlan formában mért vegyületek, és a teljes mértékben származékká alakított, trimetilszilil-oxim-éter származékok válaszjelének összehasonlítása.
- A legnépszerűbb szililezőszerek (BSTFA, MSTFA, MTBSTFA) és a hexametil-diszilazán (HMDS)/TFA hatékonyságának összevetése azonos körülmények között készült modelloldatok elemzésével, majd a kiválasztott reagens alkalmazásának optimalizálása a reakcióidő és a –hőfok tekintetében.
- A vizsgált szteroidok tömegspektrometriás viselkedéséről részletes fragmentum-analitikai tanulmány készítése.

c. A szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterekhez tartozó LOQ értékek, és a reprodukálhatóság meghatározása modelloldatokból.

d. A javasolt eljárás gyakorlati jelentőségének bemutatása két magyar szennyvíztisztító telep be- és kifolyó mintáinak több hónapon át tartó elemzésével.

e. Az érzékenység növelése céljából, a szteroidok, és a velük együtt eluálódó kólsavak mérésére alkalmas MIM és MRM adatgyűjtési eljárások fejlesztése.

f. A kidolgozott három adatgyűjtési technika birtokában (FS, MIM, MRM) részletes összehasonlító tanulmány készítése modelloldatok és valós szennyvízminták elemzése alapján.

g. Egyszerű és hatékony extrakciós eljárás kidolgozása, amely alkalmas a szenny- és folyóvízmintákból kiszűrt, szilárd lebegőanyagok elemzésére. A vizsgált szteroid vegyületek megoszlásának bemutatása az elemzett Duna- és szennyvíz-minták oldott- és szuszpendált szilárd fázisai között.

3. Kísérleti rész

3.1. Vizsgált minták

A szennyvízminták a Fővárosi Csatornázási Művek ZRt. Dél-pesti Szennyvíztisztító Telepéről, és az Organica ZRt. Telkiben működő, kísérleti szennyvíztisztító telepérő érkeztek. A Duna-vízminták mintavételezésére az ELTE-TTK Északi Tömb előtti folyószakaszon került sor.

3.2. Eszközök

3.2.1. A mintaelőkészítés során használt eszközök

A minták szűrésénél 125 mm átmérőjű, 1,6 μm pórusméretű GF/A üvegszűrőpapírt (Whatman Maidstone, UK), a szilárd fázisú extrakcióhoz 12 mintafeltétes vákuumkádat (Supelco, Bellefonte, PA, USA) és Oasis HLB 200 mg/6 mL szorbenst tartalmazó oszlopokat használtam (Waters, Milford, MA, USA).

3.2.2. Az alkalmazott gázkromatográfiás körülmények

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

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

3.2.3. Az tömegspektrométer működésének főbb jellemzői

A Varian 240 GC-MS készülék ioncsapda tömegspektrometriás detektorának tömegtartománya 50-1000 amu. A tömegspektrométer külső és belső ionizációs módokban használható, elektronütköztetéses (EI), és kémiai ionizációval.

A különböző MS módszerek használata során alkalmazott azonos jellemzők a következők voltak: az átvezető kapilláris, az ioncsapda és a manifold hőfoka, rendre 300°C, 210°C és 80°C; az ionizációs feszültség EI üzemmódban 70 eV volt.

3.3. Módszerek

3.3.1. A reagens oldatok

Az oximmá alakításhoz használt, hidroxilamin-hidroklorid 2,5% (m/v) töménységű, piridinnel készült oldatát 0,6250 g hidroxilamin-hidroklorid 25 mL piridinben oldásával készítettem. Az elkészült oldatot, legfeljebb négy hétig, hűtőben tároltam.

A szilil-származékká alakításhoz a HMDS+ TFA, MSTFA, BSTFA, MTBSTFA, analitikai tisztaságú reagenseket használtam.

3.3.2. A modell oldatok

A standard vegyületek 10-12 mg/10 mL töménységű törzsoldataihoz, a szilárd anyagokat analitikai pontossággal mértem, majd etanolban oldottam. Az így készült, és szükség szerint, etanollal hígított, oldatokból 20-1000 µL-t mértem 2 mL-es, teflonnal bélelt kupakkal záródó, a vákuumbepárló készülékhez csatlakoztatható, csavarmenetes kémcsövekbe, és 40°C hőfokú vízfürdőből, rotációs vákuumlepárló készülékkel szárazra pároltam.

3.3.3. A származékká alakítás

3.3.3.1. Trimetilszilil-származékok

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

3.3.3.2.Trimetilszilil-(oxim)-származékok

A lepárolt modelloldatok száraz maradékát első lépésben 125 µL 2,5% (m/v) hidroxilamin-hidrokloridot tartalmazó piridinben oldottam, majd fémbetétes kályhában 50°C, 70°C, 90°C-on; 30, 60, 90 percig termosztáltam.

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

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

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

3.3.4. A mintaelőkészítés

A szenny- és Duna-vízminták feldolgozása minden esetben még a mintavételezés napján megkezdődött. A szobahőmérsékletre melegedett vizeket alapos homogenizálást követően, GF/A 1,6 µm pórusátmérőjű üvegszűrőpapíron szűrtem, majd 30L térfogatú üvegballonban homogenizáltuk.

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

3.3.4.1. Az oldott szteroidok vizsgálata - szilárd fázisú extrakció

Az előzetesen szűrt és homogenizált, pH 4±0,05 kémhatásúra változtatott, vízmintákból három párhuzamos SPE extrakciót végeztem. A minták térfogata szennyvíz esetén 0,5L vagy 1,0L; Duna-víznél 3L, 5L, 10L volt.

Az extrakcióhoz alkalmazott Oasis HLB 6 mL (200 mg) SPE tölteteket előzetesen, sorra, 5 mL hexánnal, 5 mL etil-acetáttal, 10 mL metanollal és 10 mL desztillált vízzel készítettem elő.

A vízminták szteroid tartalmának dúsítását 12 mintafeltétes vákuumkádon, vízlégszivattyú segítségével végeztem. Az extrakció sebessége 4-5 mL/perc (1 csepp/másodperc), ez 3-5L mintatérfogat esetén akár 12 órát is jelenthetett. A minták sikeres felvitele után az SPE tölteteket 60 percen át szárítottam vákuumpumpával, levegő átszívatásával.

Az extraktumok elúciója az előkészítéshez használt oldószer eleggyel, tehát sorra 5 mL hexánnal, 5 mL EtAc-tal, 10 mL MeOH-lal, történt. Az egyesített oldathoz 250 µL ammóniás MeOH-t adtam, majd térfogatukat elszívófülke alatti bepárlással 0,5-1 mL-re csökkentettem. A kis térfogatú mintákat ezt követően, mennyiségileg, 4 mL-es, teflonnal bélelt kupakkal záródó kémcsövekbe mostam, hexán:EtAc:MeOH 1:1:2 (v/v/v) arányú elegyével.. Az extraktumokat rotációs vákuumbepárló készülékkel, 40°C-os vízfürdőben, tömegállandóságig, szárazra pároltam.

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

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

Az egyesített extraktumokat az SPE kivonatokkal azonos módon kezeltem.

3.3.4.3.A minták származékká alakítása és mérése

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

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

4. Eredmények

4.1. A szteroid vegyületek származékkészítési tanulmányának összefoglalása

- A korábban kidolgozott, sok összetevőjű elemző rendszer kromatogramjának utolsó harmadába, a szteroid vegyületek változatos csoportjainak számos képviselőjét illesztettem. Ezek természetes androgének (androszteron, transzdehidroandroszteron, transzandroszteron, dihidrotesztoszteron, tesztoszteron, 4-androszten-3,17-dion), természetes ösztrogének (β-ösztradiol, ösztriol), mesterséges ösztrogének (mesztranol, etinilösztradiol), mesterséges progesztogének (noretiszteron, gesztoden, levonorgesztrel, etonogesztrel, medroxiprogeszteron-acetát), a természetes progesztogén (progeszteron), fekális szterolok (koprosztanol, koleszterin), és fitoszterolok (sztigmaszterol, β-szitoszterol), összesen húsz összetevő, voltak.
- A ketocsoportot tartalmazó szteroidok esetében, a kétlépéses származékkészítés (1. oximálás, 2. trimetilszililezés) kiemelkedően fontos: a trimetilszilil-oxim-éterek válaszjelének arányát a csak trimetilszilil-éterekéhez, vagy a változatlan formában meghatározottakéhoz viszonyítva, minden ketocsoporttal rendelkező vegyület esetében >1, azaz 1,46 (gesztoden) és 4,56 (progeszteron) között változott.
- Az egyes szteroid vegyületek fragmentációs viselkedése összefüggést mutat az eredeti molekulaszerkezettel: a 3-ketoszteroidok és a hidroxiszteroidok trimetilszilil-oxim-éter származékai stabilak, jellemző ionjaik a molekulaion és az egy metilcsoport elvesztésével keletkező ion; míg a 17-ketoszteroidok tömegspektrumát a szteránváz feltöredezésével keletkező fragmens ionok jellemzik.
- Az irodalomban leggyakrabban alkalmazott szililezőszerek (BSTFA, MSTFA, MTBSTFA), a korábban is alkalmazott HMDS+TFA reagenssel összehasonlítása alapján, a különböző szililezőszerekkel képzett szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek válaszjelei összemérhetőek. Az alkalmazott reakcióhőfok és –idő tekintetében, az oximálás és szililezés esetében is, kölcsönösen változtatott körülmények vizsgálata alapján elmondható, hogy minden alkalmazott körülmény (50°C, 70°C, 90°C, 30, 60, 90 perc), a származékkészítés mindkét lépésének tekintetében kielégítő eredményekkel szolgált.
- Következésképpen, és a korábbi tapasztalatok figyelembe vételével, a további vizsgálatokhoz a HMDS+TFA reagenst választottam. Az optimális reakciókörülményeket az oximálás esetében 70°C, 30 perc és trimetilszililezés során 70°C 90 percben állapítottam meg.
- A nyolc, 1,88-750 ng/L közötti mennyiségű szteroid-trimetilszilil-(oxim)-éterek, modelloldatokból mérésével meghatározott LOQ értékek 1,88-37,6 ng/L közé estek.

4.2. Két magyar szennyvíztisztító telep mintáinak elemzése

- Az SPE kivonás hatásfokát 1-2 μg/L mennyiségű standard oldattal hozzáadott kifolyó szennyvízminták extrakciójával vizsgáltam. Az extrakció visszanyerésének százalékos értékei a legtöbb szteroid esetében 79% (mesztranol) és 106% (etonogesztrel) között alakultak. A szterolok: koprosztanol, koleszterin, sztigmaszterol és *β*-szitoszterol visszanyerése, valószínűleg csekély vízoldhatóságuk miatt, átlagosan 34% volt.
- A 2009 decemberétől 2010 szeptemberéig tartó, 10 hónapos időszak alatt két magyarországi szennyvíztisztító telep (Dél-Pest, Telki) be- és kifolyó szennyvízmintáinak összetételét vizsgáltam az ismertetett módszerrel.
- A húsz kutatott szteroidból kilencet sikerült azonosítanom szennyvízmintákban. Az androgének koncentrációi 0,74-4,28 μg/L (androszteron), 0,138-4,00 μg/L (transzandroszteron) és 0,058-4,50 μg/L (androszteron-3,11-diol-17-on) között változtak a befolyó szennyvízmintákban, míg a kifolyó szennyvízmintákban nem voltak kimutathatóak. Az ösztrogének közül a *β*-ösztradiolt és az ösztriolt egyetlen befolyó mintában sikerült azonosítanom, 0,100 μg/L és 0,054 μg/L mennyiségben. Szennyvízmintáknak megfelelően, minden mintában nagy koprosztanol (20,0-302 μg/L) és koleszterin (6,7-47,3 μg/L) tartalmat mértem. A sztigmaszterol és *β*-szitoszterol koncentrációi, rossz vízoldhatóságuknak és gyengébb válaszjelüknek köszönhetően, a vízminták többségében az LOQ alatt maradtak.
- A táblázatban feltüntetett androszteron-3,11-diol-17-ont előzetes fragmentum-analitikai tapasztalataim alapján, kettős trimetilszilil-oxim-éter származék formájában azonosítottam.

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

- Javaslatot tettem a vizsgált 20 szteroid és a velük egy szakaszon eluálódó kólsavak (litokólsav, kólsav, kenodeoxikólsav, urzodeoxikólsav, 3-hidroxi-7-ketokolánsav, dehidrokólsav) MIM és MRM adatgyűjtési módszereire.
- A három adatgyűjtési technika (FS, MIM, MRM) összehasonlítása, ugyanazon mátrixmentes oldatok, majd szennyvízminták, szigorúan azonos műszeres körülmények közötti, mérése alapján történt. A detektálási módszerek, az analitikai teljesítményjellemzőik szerinti, kritikai összevetése alapján, elmondható, hogy az FS, MIM, MRM módszerek hat pontos kalibrációjának átlagolt adatai: a lineáris regressziós koefficiensek, és az RSD%-ban kifejezett szórások, az adatgyűjtési technikától függetlenek. A három összehasonlított módszer közötti különbségek az

LOQ és az ILQ értékeknél jelentkeztek: átlaguk az FS, a MIM és az MRM módszerek sorrendjében, valamennyi vizsgált vegyületcsoport esetében, csökkennek.

- Az MRM módszer legkisebb ILQ és LOQ értékei mellett, a három módszerrel meghatározható legkisebb mennyiségek kromatográfiás csúcsainak jel/zaj viszonyai is az MRM módszert, mint a legszelektívebb adatgyűjtési technikát igazolták.
- A három vizsgált adatgyűjtési eljárás alkalmasságát öt összetartozó, be- és kifolyó szennyvízminta, párhuzamosan, mindhárom adatgyűjtési technikával, elemzése alapján hasonlítottam össze. Az MRM módszer használata az FS vagy MIM adatgyűjtéssel szemben jelentősen érzékenyebb, szelektívebb, és megbízhatóbb: az FS technika nem volt alkalmas a ng/L nagyságrendű *β*-ösztradiol, etinilösztradiol és ösztriol meghatározására. Az MRM eljárás MIM-mel szembeni előnyeit a szennyvízminták *β*-ösztradiol és etinilösztradiol tartalmának túlbecslése mutatja: ennek mértéke *β*-ösztradiol esetében 156% és 1325%, az etinilösztradiolnál 582% és 831% között változott.

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

- Javaslatot tettem egy egyszerű, kis munka- és költségigényű, ultrahanggal segített extrakcióra, amely lehetővé teszi a vizsgált vízminták lebegőanyagaihoz kötődött szteroidok meghatározását is.
- Az ultrahanggal segített extrakció hatékonyságát, több ízben: egy befolyó szennyvízminta szűrőpapírjának kivonása során, az egymást követő oldószer-részletek elemzésével, valamint azonos szenny- és Duna-víz minták különböző térfogataiból kiszűrt szilárd anyagok extrakciójával igazoltam.
- A szennyvízminták szuszpendált szilárd anyagaiból meghatározott szteroidok mennyisége, sok esetben meghaladta a hozzájuk tartozó vízmintákban mérhető koncentrációkat. A természetes ösztrogén *β*-ösztradiol kisebb 0,0049-0,0322 μg/L, míg a fekális- és fitoszterolok jóval nagyobb mennyiségűek voltak (koprosztanol 9,3-488 μg/L, koleszterin 0,79-427 μg/L, sztigmaszterol 0,173-48,5 μg/L, *β*-szitoszterol 0,415-130 μg/L).
- A Duna-vízminták oldott fázisában koprosztanolt, koleszterint, *β*-szitoszterolt minden esetben, *β*-ösztradiolt és kólsavat két, sztigmaszterolt egyetlen alkalommal sikerült mérni. Koncentrációik 0,330-0,449 μg/L (*β*-ösztradiol), 1,14-1,16 μg/L (etinilösztradiol), 18,6-42,1 μg/L (koprosztanol), 88-170 μg/L (koleszterin), 23,3 μg/L (sztigmaszterol), 8,1-128 μg/L (kólsav) és 128-379 μg/L (*β*-szitoszterol) voltak.

- A Duna-víz szilárd lebegőanyainak kivonataiban koprosztanolt, koleszterint és *β*-szitoszterolt valamennyi esetben, etinilösztradiolt és sztigmaszterolt négy esetből háromban mértem. A szilárd anyagokban mért koncentrációk a legtöbbször összemérhetőek, vagy nagyobbak voltak az oldott fázisban mértekkel: 0,352-0,461 µg/L (etinilösztradiol), 218-263 µg/L (koprosztanol); 14,5-525 µg/L (koleszterin); 18,3-179 µg/L (sztigmaszterol) és 22,3-1780 µg/L (*β*-szitoszterol).
- A teljes szteroid mennyiség túlnyomó része (71% a szennyvízminták, és 64% a Duna-vízminták esetében), a jelen tanulmány szerint a szuszpendált szilárd anyagokban volt.

5. Összefoglalás

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

Alapkutatásként részletes származékkészítési tanulmányokat készítettem, melynek tanulságai, hogy:

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

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

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

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

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

6. Saját publikációk

1. Andrási N, Helenkár A, Záray Gy, Vasanits A, Molnár-Perl I. (2011) The role of the acquisition methods in the analysis of natural and synthetic steroids and cholic acids by gas chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr A, 1218: 8264-8272.

2. Andrási N, Helenkár A, Záray Gy, 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 J Chromatogr A, 1218: 1878–1890.

3. Perlné Molnár Ibolya, Zsigrainé Vasanits Anikó, Sebők Ágnes, Helenkár András, Andrási Nóra, Faludi Tamás, Molnár Borbála, Záray Gyula (2012): Környezeti vizek szerves szennyezőinek azonosítása és mérése, trimetilszilil (oxim) éter/észter származékokként, a gázkromatográfia tömegspektrometria felhasználásával Magyar Kémiai Folyóirat, 2-4: 55-64.

4. Andrási N., Molnár B., Vasanits-Zsigrai A., Záray Gy., Molnár-Perl I. (2013): Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry Talanta, 115: 367–373.