

SZAKÉRTŐI JELENTÉS

Felszíni vizek gyógyszermaradvány-tartalom meghatározása

BENU Magyarország Zrt.



Készítette:

**Pannon Egyetem Nagykanizsa – Körforgásos Gazdasági Egyetemi Központ
Soós Ernő Kutató–Fejlesztő Központ**

2025.

Megrendelő adatai: **BENU Magyarország Zrt.**

Képviselője: Fett Georgina

Székhelye: 1095 Budapest, Soroksári út 30-34. Haller Gardens B/5

adószám: 11929853243

cégjegyzékszám: 01 10 044223

Honlap: www.benu.hu

Projektben résztvevő személyek:

Pannon Egyetem Nagykanizsa – Körforgásos Gazdasági

Egyetemi Központ

Soós Ernő Kutató–Fejlesztő Központ

8800 Nagykanizsa, Zrínyi M. u. 18

Dr. Galambos Ildikó

Kovács Nikoletta

Dr. Maász Gábor

Jelentés tárgya:

**Felszíni vizek gyógyszermaradvány-tartalom
meghatározása**

Nagykanizsa, 2025.08.18.



Dr. Galambos Ildikó

kutató-fejlesztő központ vezető

Szakértői Jelentés a BENU Magyarország Zrt. által megrendelt „Felszíni víz minták gyógyszermaradvány méréséről”, amely a három kiválasztott víztest (Balaton, Duna, Tisza) egyszeri mintázása során gyűjtött vízminták nagyműszeres analitikai vizsgálatának eredményeit, a mintaelőkészítések és a vizsgálatok során használt mérési módszertanok bemutatását tartalmazza.

Vizsgált Minták:

1. Balaton (Csopak; GPS koordináták: 46.96990, 17.93854)
2. Duna (Budapest; GPS koordináták: 47.48468, 19.05397)
3. Tisza (Tiszaújváros; GPS koordináták: 47.90274, 21.05976)

2 L felszíni vízminta, 2 mL cc. hangyasavval savanyítva ($\text{pH} < 3$), hűtve (4 °C -on szállítva).
Minta érkezésétől számított 24 órán belül a mintafeldolgozás megkezdése.

Minták érkezése: 2025.07.31., minták mérésre való előkészítése: 2025.08.01-04., minták UPLC-MS/MS elemzése: 2025.08.05-07., eredmények kiértékelése: 2025.08.08-12., eredmények validálása: 2025.08.13., jegyzőkönyv készült: 2025.08.13.

Mérendő hatóanyagok: atenolol, alprazolam, carbamazepine, cetirizine, citalopram, clindamycin, diclofenac, ethinylestradiol, fluconazole, lamotrigine, lidocaine, naproxen, perindopril, propranolol, sulfamethoxazole, tramadol, trimethoprim, venlafaxine

Minden mintát három párhuzamos injektálással mértünk. Az eredményeket a három injektálás átlagaként $\pm$ szórásként (SD) adjuk meg.

Mellékletek:

- I. Mintaelőkészítés leírása
- II. Analitikai módszerek leírása
- III. Vak és QC (ellenőrző minták) eredményei

Eredmények

Hatóanyag	IS	LOD [ng/L]	LOQ [ng/L]	Minta					
				Balaton (Csopak)		Duna (Budapest)		Tisza (Tiszaújváros)	
				$\bar{x}$ (n=3) [ng/L]	SD	$\bar{x}$ (n=3) [ng/L]	SD	$\bar{x}$ (n=3) [ng/L]	SD
atenolol	TRI-D9	0.1	0.5	<LOD		<LOD		<LOD	
alprazolam	ALP-D5	0.2	0.6	0.7	0.0	<LOD		<LOD	
carbamazepine	CBZ-D10	0.4	1.2	5.4	0.3	15.6	0.1	43.9	1.0
cetirizine	CBZ-D10	0.1	0.3	<LOD		2.6	0.2	2.2	0.0
citalopram	CIT-D6	0.1	0.3	<LOD		<LOD		<LOD	
clindamycin	CIT-D6	0.1	0.3	<LOD		3.1	0.2	3.3	0.1
diclofenac	DIC- ¹³ C6	0.1	0.4	<LOD		13.3	0.4	9.1	0.1
ethinylestradiol	E2- ¹³ C2	0.1	0.2	0.3	0.0	0.6	0.1	1.0	0.0
fluconazole	TRI-D9	1.0	3.0	4.0	0.3	3.4	0.0	9.3	0.4
lamotrigine	TRA- ¹³ C,D3	0.3	0.8	<LOD		14.3	1.9	10.4	0.6
lidocaine	TRA- ¹³ C,D3	0.1	0.5	<LOD		4.4	0.2	9.0	0.1
naproxen	DIC- ¹³ C6	0.8	2.5	<LOD		<LOD		<LOD	
perindopril	CBZ-D10	0.2	0.5	<LOD		0.6	0.1	8.9	0.1
propanolol	CBZ-D10	0.2	0.5	<LOD		<LOD		<LOD	
sulfamethoxazole	SMX- ¹³ C	0.5	1.5	3.0	0.1	13.2	0.3	16.2	0.3
tramadol	TRA- ¹³ C,D3	0.2	0.5	<LOQ		8.7	0.3	11.7	0.2
trimethoprim	TRI-D9	0.2	0.5	<LOD		1.4	0.2	<LOQ	
venlafaxine	CBZ-D10	0.5	1.5	4.5	0.3	15.6	1.0	4.2	0.1

<LOD kimutatási határ alatt, < LOQ kimutatási határ felett, de meghatározási határ alatt

Összefoglalás

Összesen 18 gyógyszerhatóanyag (atenolol, alprazolam, carbamazepine, cetirizine, citalopram, clindamycin, diclofenac, ethinylestradiol, fluconazole, lamotrigine, lidocaine, naproxen, perindopril, propranolol, sulfamethoxazole, tramadol, trimethoprim, venlafaxine) SPE-UPLC-MS/MS vizsgálata történt 3 felszíni víz mintából korábban validált módszerekkel.

Minden mintát három párhuzamos injektálással elemeztünk, és eredményként a három mérés során kapott átlagkoncentrációt adtuk meg a szórással együtt. Az összes mért koncentráció a módszerek korábban meghatározott dinamikus tartományain belül volt (átlagosan 1–250 ng/L), és meghaladta a megfelelő analitokra vonatkozó kimutatási határt (LOQ). A minták három párhuzamos injektálásának szórása megfelelt a rendszeralkalmassági kritériumoknak.

A 18 hatóanyag közül 14 került kimutatásra a vizsgált három minta valamelyikében.

A 10 vakpróba (oldószer) egyikében sem mutattunk ki a vizsgálati komponenseket.

Összesen 6 QC mintát injektáltuk az elemzés során. Az elemzett QC minták mindegyike megfelelt az előzetes követelménynek.

Mellékletek

I. Mintaelőkészítés

Minták kimérése, kísérő sztenderd adalékolása

1,1 L felszíni víz kimérése kalibrált mérőhengerbe, valamint izotópjelölt kísérő sztenderdek (IS) hozzáadása a következők szerint:

1. 1 µg/mL IS sztenderd mix oldatból (metanol) 55 µL-t hozzáadni az 1,1 L vízhez (homogenizálni), végső IS koncentráció 50 ng/L.

1 µg/mL IS mix összetétele:

Citalopram-D6, Carbamazepine-D10, Alprazolam-D5, Trimetoprim-D9, Sulfamethoxazole-C13, Tramadol-C13,D3, Diclofenac-13C6, Tebuconazole-D9, Atrazine-D5, Imidacloprid-D4, Metolachlor-D6

2. 1 µg/mL C13-estradiol IS oldatból 11 µL-t hozzáadni az 1,1 L vízhez (homogenizálni), végső IS koncentráció 10 ng/L.

Homogenizálást követően a minták szűrése:

1. GF/A 1.6 µm glass microfibre filter (#1820-047, Whatman)
2. GF/F 0.7 µm glass microfibre filter (#516-0345, VWR)

Minták szilárd fázisú extrakciója (SPE) Dionex AutoTrace 280 (Thermo Scientific, MA, USA) SPE automata segítségével.

SPE cső típusa: Strata X-CW 200 mg, 33 µm, 6 mL (Phenomenex)

Oldószerek:

1. Metanol (HPLC grade)
2. ultratiszta víz + 0.1% v/v hangyasav (HPLC grade)
3. 20% v/v acetonitril (HPLC grade) 80% 0.1% v/v hangyasav tartalmú ultratiszta víz
4. 20% NH₄OH (ammónia oldat 25% m/m) 80% acetonitril (HPLC grade)
5. 95% metanol 5% víz

SPE protokoll:

1. Process 6 Samples using the following method steps:
2. Condition Cartridge with 3.0 mL of MeOH into solvent waste
3. Condition Cartridge with 3.0 mL of H₂O + 0.1% HCOOH into aqueous waste
4. Load 1000.0 mL of sample onto Cartridge
5. Rinse Cartridge with 6.0 mL of H₂O + 0.1% HCOOH into aqueous waste
6. Rinse Cartridge with 6.0 mL of 20%ACN 80% H₂O + 0.1% HCOOH into aqueous waste
7. Wash Syringe with 6.0 mL of 20% ammonia 80% acetonitrile
8. Dry Cartridge with gas for 2.0 minutes
9. Soak and Collect 1.0 mL Fraction using 20% ammonia 80% acetonitrile
10. Pause for 1.0 minutes
11. Collect 4.0 mL Fraction into sample tube using 20% ammonia 80% acetonitrile
12. End

Az eluátumokat 5 mL-s Eppendorf csőbe gyűjtjük, majd nitrogén gázáram alatt szárazra pároljuk. A szárazra párolt mintákat LC-MS analízisig -20 °C-on tároljuk.

Mintaelőkészítés LC-MS méréshez SPE után szárazra párolt mintákból

A szárazra párolt mintákat 500 µL LC-MS tisztaságú acetonitrilben oldjuk vissza, az oldódást 30 sec vortex kevertetést követő 5 min ultrahangos vízfürdős kezeléssel segítjük.

400 µL-hez 400µL ultratiszta vizet adunk. 30 sec vortex kevertetést követő 5 min ultrahangos vízfürdős kezelést követően 5 percig 4500 rpm centrifugáljuk, majd a felülúszóból a megfelelő LC-MS/MS módszerekkel meghatározzuk a mérendő komponenseket.

100 µL acetonitriles oldatot 2 mL-es Eppendorf csőben hormon méréshez derivatizálunk a következők szerint:

100 µL minta + 20 µL dansyl chloride (40 mM/acetonitril) + 80 µL Na₂CO₃-oldat (100 mM/H₂O) a megadott sorrendben. A Na₂CO₃-oldat hozzáadása után a mintákat késedelem nélkül vortexeljük, majd egyszerre termoblokkba helyezzük, 15 percig 65 °C-on derivatizáljuk. A reakció lejártá után a mintákat 5 percig 4 °C-on hűtjük. Ezt követően 40 µL toluolt adunk a mintákhoz és 1 percig vortexeljük, majd 10000 rpm sebességgel, 5 percig centrifugáljuk. A

felülúszóból 80 µL-t gyűjtünk és N₂ gázáram alatt szárazra pároljuk. A szárazra párolt mintákat -20 °C-on tartjuk az LC-MS mérésig. Minták visszaoldása közvetlenül LC-MS mérés előtt: 125 µL LC-MS minőségű metanol + 125 µL ultratiszta víz, 30 sec vortex, majd hormonok meghatározása LC-MS/MS módszerrel.

II. Analitikai módszerek

Készülék: ACQUITY UPLC H-Class System (Waters, MA, USA)- Xevo TQ-S micro (Waters, MA, USA)

1. Módszer (EPA Method 1694 szerint validált, nem akkreditált, UPLC-MS/MS, módszer belső megnevezése: Screening)

Ezzel a módszerrel meghatározva: atenolol, alprazolam, carbamazepine, cetirizine, citalopram, diclofenac, lamotrigine, lidocaine, naproxen, sulfamethoxazole, tramadol, trimethoprim

Analitikai oszlop: XBridge Premier BEH C18 (100×2.1 mm i.d., 2.5 µm; Waters, MA, USA).

Oszloptermosztát: 40 °C

Injektált térfogat: 10 µL.

A: ultratiszta víz + 0.1% v/v hangyasav (LC-MS grade)

B: metanol (LC-MS grade) + 0.1 % v/v hangyasav

Áramlási sebesség: 0.4 mL/min

Gradiens:

Idő [min]	A%	B%
initial	97	3
1	97	3
3,5	60	40
5	60	40
7	5	95
9	5	95
9,1	97	3
10	97	3

MRM átmenetek:

Hatóanyag	t _R	M	PI	DI1	CE	DI2	CE	DI3	CE	CV
Atenolol	3,26	266,16	267,0	190,0	18	145,0	25	74,0	25	25
Carbamazepine	7,29	236,10	237,0	194,0	22	165,0	40	179,0	35	25
Cetirizin	7,46	388,16	389,0	166,0	40	200,9	20	367,1	15	25
Citalopram	6,27	324,16	325,2	108,9	25	262,0	20	165,9	25	25
Diclofenac	8,12	295,02	296,0	250,0	14	278,0	8	215,0	19	25
Lamotrigin	4,68	255,00	256,0	211,0	25	145,0	30	109,0	45	25
Lidokain	4,15	234,17	235,0	86,1	11	58,0	30			25
Naproxen	7,75	230,09	231,0	185,0	12	115,0	45			25
Sulfamethoxazole	4,53	253,05	254,2	156,0	15	108,0	24	92,0	20	25
Tramadol	4,59	263,19	264,2	58,0	13	246,2	8			25
Trimetoprim	3,96	290,14	291,2	230,1	20	123,1	25	261,0	25	20

t_R: retenció idő [perc], M: monoizotópos tömeg, PI: anyaion, DI: leányion, CE: fragmentációs feszültség [eV], CV: kúp feszültség [V], félkövér kiemelés: kvantifikáláshoz használt átmenet. Kapilláris feszültség 3,0 kV (pozitív ion mód), forrás hőmérséklet: 150 °C. Száritógáz hőmérséklete: 450 °C, száritógáz áramlás: 1000 l/óra, függőnygáz áramlás: 50 l/óra.

2. Módszer (EPA Method 1694 szerint validált, nem akkreditált, UPLC-MS/MS, módszer belső megnevezése: WL4K, UPLC-MS/MS)

Ezzel a módszerrel meghatározva: clindamycin, fluconazole, venlafaxine

Analitikai oszlop: XSelect Premier CSH C18 (100×2.1 mm i.d., 2.5 µm; Waters, MA, USA).

Oszloptermosztát: 60 °C

Injektált térfogat: 1 µL.

A: ultratiszta víz + 0.1% v/v hangyasav (LC-MS grade)

B: metanol (LC-MS grade) + 0.1 % v/v hangyasav

Áramlási sebesség: 0.4 mL/min

Gradiens:

Idő [min]	A%	B%
initial	65	35
3	30	70
3,1	30	90
6	3	97
8	3	97
8,1	65	35
10	65	35

MRM átmenetek:

Hatóanyag	t _R	M	PI	DI1	CE	DI2	CE	DI3	CE	CV
Clindamycin	1,59	424,18	425,2	126,2	25	377,0	20	335,0	18	25
Fluconazole	1,48	306,10	307,1	219,8	15	238,2	15	169,0	25	25
Venlafaxine	1,26	277,20	278,3	58,0	18	121,0	25	147,0	25	25

t_R: retenciós idő [perc], M: monoizotópos tömeg, PI: anyaion, DI: leányion, CE: fragmentációs feszültség [eV], CV: kúp feszültség [V], félkövér kiemelés: kvantifikáláshoz használt átmenet. Kapilláris feszültség 3,0 kV (pozitív ion mód), forrás hőmérséklet: 150 °C. Szárítógáz hőmérséklete: 450 °C, szárítógáz áramlás: 1000 l/óra, függőnygáz áramlás: 50 l/óra.

3. Módszer (EPA Method 1694 szerint validált, nem akkreditált, UPLC-MS/MS, módszer belső megnevezése: HormoneDansyl)

Ezzel a módszerrel meghatározva: ethinylestradiol

Analitikai oszlop: Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm; 50 x 2,1 mm; Waters, MA, USA).

Oszloptermosztát: 60 °C

Injektált térfogat: 10 µL.

A: ultratiszta víz + 0.1% v/v hangyasav (LC-MS grade)

B: metanol (LC-MS grade) + 0.1 % v/v hangyasav

Áramlási sebesség: 0.4 mL/min

Gradiens:

Idő [min]	A%	B%
initial	30	70
9	5	95
11	5	95
11,1	30	70
13	30	70

MRM átmenetek:

Hatóanyag	t _R	M	PI	DI1	CE	DI2	CE	DI3	CE	CV
17-α-etinilösztadiol	2,89	529,23	530,2	170,9	35	114,9	70	156,0	55	25

t_R: retenciós idő [perc], M: monoizotópos tömeg, PI: anyaion, DI: leányion, CE: fragmentációs feszültség [eV], CV: kúp feszültség [V], félkövér kiemelés: kvantifikáláshoz használt átmenet.

Kapilláris feszültség 3,0 kV (pozitív ion mód), forrás hőmérséklet: 150 °C. Száritógáz hőmérséklete: 450 °C, száritógáz áramlás: 1000 l/óra, függőnygáz áramlás: 50 l/óra.

4. Módszer (EPA Method 1694 szerint validált, nem akkreditált, UPLC-MS/MS, módszer belső megnevezése: Drugs)

Ezzel a módszerrel meghatározva: perindopril, propranolol

Analitikai oszlop: XBridge Premier BEH C18 (100×2.1 mm i.d., 2.5 µm; Waters, MA, USA).

Oszloptermosztát: 40 °C

Injektált térfogat: 10 µL.

A: ultratiszta víz + 0.1% v/v hangyasav (LC-MS grade)

B: metanol (LC-MS grade) + 0.1 % v/v hangyasav

Áramlási sebesség: 0.4 mL/min

Gradiens:

Idő [min]	A%	B%
initial	85	15
1	85	15
11	5	95
12	5	95
12,1	85	15
15	85	15

MRM átmenetek:

Hatóanyag	t _R	M	PI	DI1	CE	DI2	CE	DI3	CE	CV
perindopril	6,71	368,0	369,0	170,0	20	172,0	20	156,0	30	25
propranolol	5,95	259,0	260,0	183,0	15	116,0	15	98,0	15	25

t_R: retenciósi idő [perc], M: monoizotópos tömeg, PI: anyaion, DI: leányion, CE: fragmentációs feszültség [eV], CV: kúpfeszültség [V], félkövér kiemelés: kvantifikáláshoz használt átmenet.
Kapilláris feszültség 3,0 kV (pozitív ion mód), forrás hőmérséklet: 150 °C. Száritógáz hőmérséklete: 450 °C, száritógáz áramlás: 1000 l/óra, függőnygáz áramlás: 0 l/óra.

III. Vak és QC (ellenőrző minták)

Vak minta:

- acetonitril: ultratiszta víz 50:50 v/v% (1,2,4. módszer)

- metanol: ultratiszta víz 50:50 v/v% (3. módszer)

Követelmény: célkomponensek <LOD.

QC minta:

10 ng/mL sztenderd mix + 50 ng/mL IS (tartalmaz: Carbamazepine, Tramadol, Diclofenac, Sulfamethoxazole, Venlafaxine, Fluconazole + IS mix). Követelmény: $10,0 \pm 1,5$ ng/mL.

Összesen 10 oldószer-vakpróbát injektáltuk az elemzés során. Az eredményeket elfogadhatónak tekintettük, ha a vakmintákban nem mutattuk ki a célkomponenseket. A 10 oldószer vakpróbából egyikben sem volt kimutatható a vizsgált hatóanyagok egyike sem. Összesen 6 QC mintát injektáltuk az elemzés során. Az eredményeket érvényesnek tekintettük, ha a mért koncentrációk a névleges értékek $\pm 15\%$ -án belül voltak. Az elemzett QC minták mindegyike megfelelt a követelménynek.

	CBZ	TRA	DIC	SMX	VEN	FLU	Követelmény	Minősítés
QC_1	10.9	9.2	9.0	8.8	9.0	9.0	10.0 ± 1.5	megfelelt
QC_2	10.7	9.0	9.1	8.9	8.9	8.8	10.0 ± 1.5	megfelelt
QC_3	10.4	8.8	9.0	9.2	9.2	8.8	10.0 ± 1.5	megfelelt
QC_4	10.9	8.5	8.9	8.6	10.5	8.6	10.0 ± 1.5	megfelelt
QC_5	10.5	9.3	8.9	9.1	11.2	8.6	10.0 ± 1.5	megfelelt
QC_6	11.0	9.3	9.0	8.9	10.6	8.8	10.0 ± 1.5	megfelelt

CBZ carbamazepine, TRA tramadol, DIC diclofenac, SMX sulfamethoxazole, VEN venlafaxine, FLU fluconazole