

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**NINA ŽIGART**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA**

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**NINA ŽIGART**

**OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA METODE ZA DOLOČANJE BISFENOLOV V  
POVRŠINSKIH VODAH S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE  
LOČLJIVOSTI IN MASNO DETEKCIJO**

**OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE HIGH-PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY AND MASS DETECTION METHOD FOR  
DETERMINATION OF BISPHENOLS IN SURFACE WATERS**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA**

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Robertom Roškarjem, mag. farm.

### **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za strokovno pomoč in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge ter somentorju izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za pomoč pri eksperimentalnem delu in zbiranju ter obdelavi rezultatov. Posebna zahvala gre tudi predsedniku komisije izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm. in članici komisije doc. dr. Tanji Gmeiner, mag. farm. za hitro pripravljenost. Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem, ki so me podpirali in spodbujali med časom študija.

### **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorja izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Nina Žigart

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Tanja Gmeiner, mag. farm., spec.

# VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 HORMONSKI MOTILCI .....	1
1.2 BISFENOLI.....	2
1.3 ANALIZNE METODE .....	11
1.3.1 Priprava vzorcev.....	11
1.3.2 Analiza vzorcev.....	12
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>14</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>15</b>
3.1 MATERIALI .....	15
3.1.1 Vzorci površinskih vod in vodovodne vode .....	15
3.1.2 Standardi preučevanih bisfenolov.....	15
3.1.3 Reagenti in topila.....	16
3.1.4 Pribor in aparature.....	16
3.2 METODE .....	18
3.2.1 Metoda SPE .....	18
3.2.1.1 Priprava topil .....	18
3.2.1.2 Priprava pufru .....	18
3.2.1.3 Začetni protokol za metodo SPE.....	18
3.2.1.4 Razvoj metode SPE .....	20
3.2.1.5 Končni protokol za metodo SPE.....	22
3.2.2 Metoda LC-MS/MS .....	23
3.2.2.1 Začetna metoda.....	23
3.2.2.2 Razvoj metode .....	24
3.2.2.3. Končna metoda.....	24
3.2.3 Priprava osnovnih raztopin .....	25
3.2.4 Validacija metode .....	30
3.2.5 Analiza vzorcev.....	34
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>35</b>
4.1 ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI ANALIZE .....	35
4.2 RAZVOJ METODE SPE.....	35
4.3 RAZVOJ METODE LC-MS/MS.....	43
4.3 VREDNOTENJE METODE .....	45
4.4 ANALIZA VZORCEV POVRŠINSKIH VOD IN PITNE VODE .....	51
<b>5 SKLEP</b> .....	<b>53</b>
<b>6 LITERATURA</b> .....	<b>54</b>

## POVZETEK

Bisfenol A (BPA) se je pri izdelavi mnogih izdelkov začel nadomeščati z njegovimi analogi zaradi svojega delovanja kot hormonski motilec, vendar pa imajo tudi njegovi analogi nekatere hormonske aktivnosti in izkazujejo druge toksične učinke. Mnogo bisfenolov se nabira v okolju, zato smo jim ljudje vedno bolj izpostavljeni. Vedno več raziskav se tako usmerja k identifikaciji analogov bisfenola A v okoljskih in bioloških vzorcih.

V preteklih raziskavah so se ukvarjali s hkratno določitvijo 3 – 9 analogov BPA v vzorcih, mi pa smo se odločili za razvoj metode za analizo 13 različnih bisfenolov. Uporabili smo metodo tekočinske kromatografije z masno detekcijo (LC-MS/MS), ki je tudi ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za analizo bisfenolov. Za pripravo vzorcev smo izbrali ekstrakcijo na trdnih nosilcih (SPE). Metodo tekočinske kromatografije smo tekom dela le rahlo modificirali, več časa pa smo namenili razvoju metode SPE.

Analizno metodo smo validirali v skladu s smernicami Ameriške zvezne agencije za hrano in zdravila (FDA) za validacijo bioanaliznih metod. Potrdili smo selektivnost, dnevno in meddnevno ponovljivost, ponovljivost injiciranja, linearnost in točnost metode ter določili izkoristek ekstrakcije in mejo določitve za vse bisfenole. Z validirano metodo smo analizirali pet vzorcev površinskih voda v Sloveniji in en vzorec vodovodne vode (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana). V vzorcih površinskih voda smo detektirali bisfenol A (BPA), bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF), bisfenol B (BPB) in bisfenol C (BPC). BPA je bil prisoten v vzorcih Drave (Maribor, Studenška brv), Sore (Vešter) in Obrha (Loško polje) v povprečnih koncentracijah od 30,54 – 71,06 ng/L. BPC smo določili v vzorcih Save (Črnuče) (43,20 ng/L), Drave (44,65 ng/L) in Sore (46,38 ng/L). V vzorcu Ljubljanice (Ljubljana, Gruberjevo nabrežje) je bil BPC prisoten, vendar pod mejo določitve (LOQ). BPS smo zaznali v vseh vzorcih površinskih voda (<LOQ – 2,70 ng/L). BPF smo določili le v vzorcih Drave (5,30 ng/L) in Ljubljanice (28,52 ng/L). V vzorcu Obrha pa smo določili tudi BPB in sicer v povprečni koncentraciji 1,54 ng/L. V vzorcu vodovodne vode je bil prisoten le BPA, pa še ta v približno enaki količini kot v praznih vzorcih. V literaturi nismo našli prisotnosti BPB in BPC v površinskih vodah, v okviru magistrske naloge pa smo oba določili v zbranih vzorcih. Koncentracije ostalih določenih bisfenolov pa ustrezajo tistim, ki jih lahko najdemo v literaturi.

**Ključne besede:** bisfenoli, tekočinska kromatografija, masna spektrometrija, okoljski vzorci

## ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) started to get replaced by its analogues in many products, since researchers realized that it works as an endocrine disrupting compound. Unfortunately the analogues have some of the hormonal and toxic properties similar to BPA. Many bisphenols accumulate in the environment, which makes human exposure to them common. More research is therefore dedicated to identifying BPA analogues in environmental and biological samples.

In previous research, 3 to 9 BPA analogues were simultaneously analyzed in samples. We decided to develop a method of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) for the analysis of 13 different bisphenols. We selected solid phase extraction (SPE) as the extraction method. During the course of work we devoted most of the time developing the SPE method, whereas the liquid chromatography method only needed slight modifications.

We validated the analytical method in accordance with the Food and Drug Administration (FDA) guidelines for the validation of bioanalytical methods. We determined selectivity, repeatability, linearity, accuracy, recovery and the limit of quantification for all the bisphenols. We used the validated method to analyze five surface water samples collected in Slovenia and one additional drinking water supply sample (Faculty of pharmacy, Ljubljana). We found bisphenol A (BPA), bisphenol S (BPS), bisphenol F (BPF), bisphenol B (BPB) and bisphenol C (BPC) in surface waters. BPA was detected in Drava river (Maribor, Studenška brv), Sora river (Vešter) and Obrh stream (Loško polje) samples. Mean concentrations were ranging from 30,54 to 71,06 ng/L. BPC was detected in Sava (Črnuče) (43,20 ng/L), Drava (44,65 ng/L) and Sora (46,38 ng/L) samples. There was some BPC detected in the Ljubljanica (Ljubljana, Gruberjevo nabrežje) sample, but the concentration was lower than the limit of qualification (LOQ). BPS was detected in all the surface water samples (<LOQ – 2,70 ng/L). BPF was detected only in Drava (5,30 ng/L) and Ljubljanica (28,52 ng/L) samples. The sample of Obrh also showed elevated levels of BPB, where the detected concentration was 1,54 ng/L on average. The drinking water supply contained only BPA, in similar concentrations as blank samples. We found no data in literature about the presence of BPB and BPC in surface waters, while we detected them both in the collected samples. The concentrations of the other bisphenols, found in the samples, correspond to those stated in the literature.

**Key words:** bisphenols, liquid chromatography, mass spectrometry, environmental samples

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	acetonitril
APCI	kemična ionizacija pod atmosferskim tlakom
APPI	fotoionizacija pod atmosferskim tlakom
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPAP	bisfenol AP
BPB	bisfenol B
BPC	bisfenol C
BPE	bisfenol E
BPF	bisfenol F
BPP	bisfenol P
BPS	bisfenol S
BPZ	bisfenol Z
CAS	<i>angl. Chemical Abstract Service</i>
CYP	citokrom P450
DHBP	dihidroksibenzofenol
DNA	deoksiribonukleinska kislina ( <i>angl. deoxyribonucleic acid</i> )
EC	Evropska skupnost
EDC	motilci endokrinega sistema
ER	estrogenski receptor
ESI	elektrozaprševalna ionizacija
FDA	Ameriška zvezna agencija za hrano in zdravila ( <i>angl. Food and Drug Administration</i> )
FL	fluorescenčni detektor
GC	plinska kromatografija
GPR	s proteinom G sklopljen receptor
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPP	4-kumilfenol
HSD3B2	hidroksi-delta-5-steroid dehidrogenaza, 3-beta in steroid delta-izomeraza 2
iPrOH	izopropanol
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogen fosfat
LC	tekočinska kromatografija
LOQ	limita/meja določitve
MM	molekulska masa
MeOH	metanol
MRM	multirezidualna analiza ( <i>angl. multiple reaction monitoring</i> )
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
nd	nedetektirano
Nrf2	transkripcijski, eritroidu-2 podobni dejavnik 2 ( <i>angl. nuclear factor (erythroid 2)-like 2</i> )
pKa	ionizacijska konstanta
QSAR	kvantitativno razmerje med strukturo in delovanjem
R <sup>2</sup>	determinacijski koeficient
RSD	relativni standardni odklon
SPE	ekstrakcija na trdnih nosilcih ( <i>angl. Solid phase extraction</i> )
StAR	steroidogeni akutni regulatorni protein ( <i>angl. Steroidogenic acute regulatory protein</i> )
TBBPA	tetrabromobisfenol A
UV	ultravijoličen
LogP	porazdelitveni koeficient oktanola in vode
LogP-AA	porazdelitveni koeficient oktanola in vode, izračunan s pomočjo seštevanja prispevkov posameznih atomov v molekuli

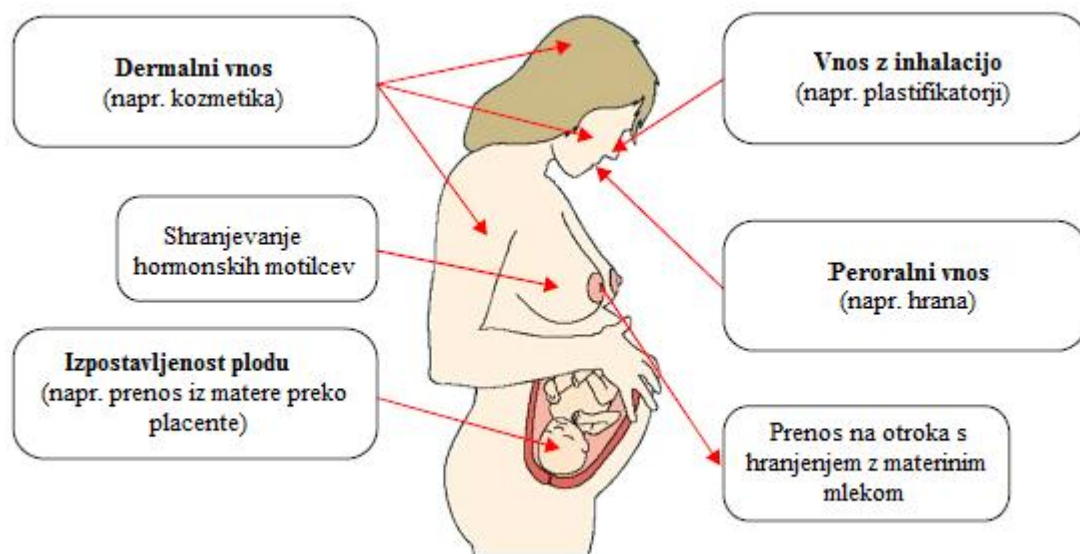


# 1 UVOD

## 1.1 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilci ali motilci delovanja endokrinega sistema (*angl. endocrine disrupting compounds, EDCs*) so snovi, ki motijo sintezo, sekrecijo, transport, vezavo ali izločanje naravnih hormonov v telesu. Slednji so odgovorni za homeostazo, reprodukcijo, razvoj in/ali obnašanje (1). Hormonski motilci se nahajajo v mnogih izdelkih, kot so plastenke, pločevinke za hrano, hrana, detergenti, igrače, kozmetika in pesticidi. Pokazalo se je, da lahko v okolju že v zelo majhnih koncentracijah povzročajo neželene učinke tako pri živalih kot ljudeh. Najpogosteje vplivajo na zmanjšanje plodnosti in na napredovanje nekaterih bolezni, kot so diabetes, debelost, endometrioza in nekateri tipi raka (1).

Hormonske motilce najpogosteje vnašamo v telo s hrano in vodo ter z dihanjem zraka in prahu. Možen pa je tudi vnos skozi kožo, intravenski vnos in prenos EDC iz placente ali materinega mleka (1, 2) (Slika 1).



**Slika 1:** Način vnosa hormonskih motilcev; prirejeno po (2).

Hormonski motilci se nabirajo v okolju. Pogosto imajo dolge razpolovne čase, zato jih lahko najdemo v okolju še dolgo po njihovi uporabi. Odpadna voda je glavni vir onesnaženja okolja z bisfenoli. Čistilni postopki, ki so v uporabi, pa bisfenolov ne odstranijo popolnoma (1).

## 1.2 BISFENOLI

Bisfenoli so skupina kemičnih spojin, katerih struktura sta dva fenolna obroča, povezana preko vmesnega ogljika ali drugih kemičnih struktur. Spadajo med hormonske motilce. Med njimi je najpogosteje uporabljen bisfenol A (BPA) (3).

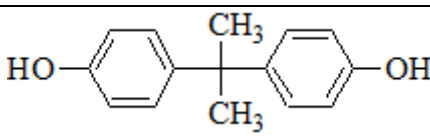
BPA se uporablja kot monomer pri izdelavi polikarbonatne plastike in epoksi smol. Ti polimeri se uporabljajo kot materiali za stik s hrano: polikarbonatna plastika v embalaži za ponovno uporabo, namiznem priboru in vodnih pipah ter epoksi smole za notranjo oblogo pločevink in pokrovov na steklenih kozarcih in steklenicah za hrano in pijačo (4).

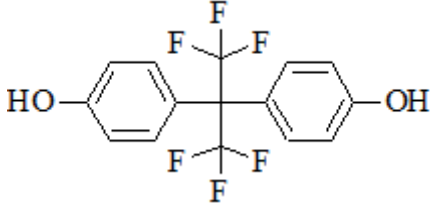
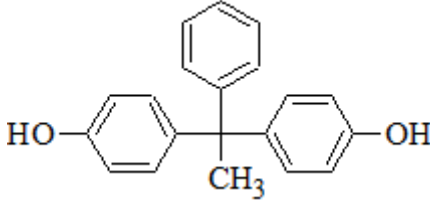
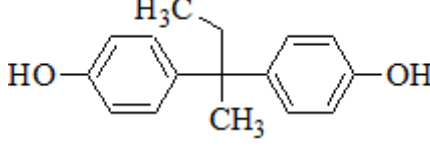
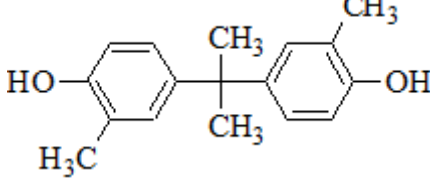
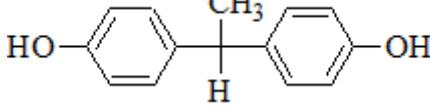
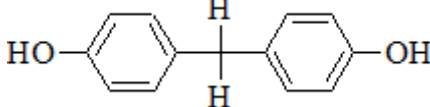
Mnogo študij je pokazalo, da ima BPA neželene učinke na človeško zdravje. Uporabo BPA so prav zaradi teh učinkov tudi prepovedali v mnogih izdelkih, kot so stekleničke za dojenčke, embalaža za formulo za dojenčke in termalni papir za račune. Iskanje nadomestkov zanj je zato nujno (3, 5).

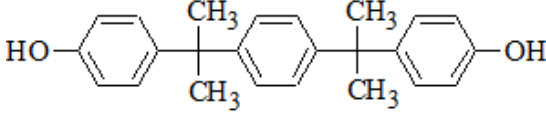
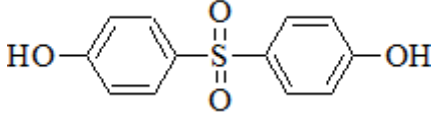
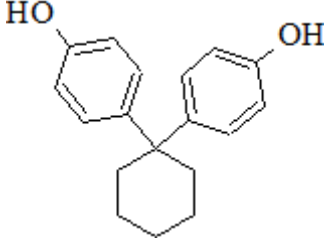
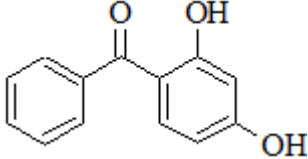
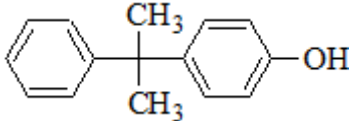
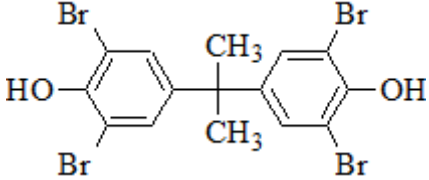
BPA-ju podobne spojine oziroma drugi bisfenoli so začeli nadomeščati BPA v industrijski proizvodnji. Naraščujoče koncentracije nekaterih bisfenolov v okoljskih in bioloških vzorcih so posledica porasti njihove uporabe v industriji. To je zaskrbljujoče, saj so raziskave pokazale, da mnogi izmed teh analogov bisfenola A kažejo hormonske lastnosti podobne bisfenolu A (6).

V Preglednicah I in II so predstavljene kemijske in biološke lastnosti bisfenolov, na katere smo se osredotočili v magistrski nalogi. Za nekatere izmed njih je narejenih že veliko študij nahajanja v okolju ter učinkov na različne organizme, za druge pa je teh podatkov zelo malo. Najbolje raziskani so bisfenol A, bisfenol AF, bisfenol F in bisfenol S. Uporaba teh je v industriji najbolj pogosta. Zelo malo podatkov pa najdemo za bisfenol C, bisfenol Z in dihidroksibenzofenol. Nekateri bisfenoli se namreč šele uvajajo v proizvodnjo in njihova uporaba do sedaj ni bila tako pogosta.

**Preglednica I:** Bisfenoli, njihova struktura in osnovne kemijske lastnosti.

Ime	Struktura	Lastnosti	Viri
<b>Bisfenol A (BPA)</b> IUPAC : 4-[2-(4-hidroksifenil)propan-2-il]fenol CAS: 80-05-7 EC : 201-245-8		MM= 228,291g/mol LogP*= 3,3 pKa= 9,6	7

<p><b>Bisfenol AF (BPAF)</b>  IUPAC : 4-[1,1,1,3,3,3-  heksafluoro-2-(4-  hidroksifenil)propan-2-  il]fenol  CAS: 1478-61-1  EC : 216-036-7</p>		<p>MM= 336,233 g/mol  LogP*= 4,5  pKa= 9,2</p>	<p>8</p>
<p><b>Bisfenol AP (BPAP)</b>  IUPAC : 4-[1-(4-  hidroksifenil)-1-  feniletil]fenol  CAS : 1571-75-1  EC : 433-130-5</p>		<p>MM= 290,362 g/mol  LogP*= 4,4  pKa= 10,22</p>	<p>4, 9</p>
<p><b>Bisfenol B (BPB)</b>  IUPAC : 4-[2-(4-  hidroksifenil)butan-2-  il]fenol  CAS: 77-40-7  EC : 201-025-1</p>		<p>MM= 242,318 g/mol  LogP*= 3,9  pKa= 10,1   Topnost v MeOH  (100g) : 166g</p>	<p>10</p>
<p><b>Bisfenol C (BPC)</b>  IUPAC : 4-[2-(4-hidroksi-  3-metilfenil)propan-2-il]-2-  metilfenol  CAS : 79-97-0  EC : 201-240-0</p>		<p>MM= 256,345 g/mol  LogP*= 4,7</p>	<p>11,  12,  13</p>
<p><b>Bisfenol E (BPE)</b>  IUPAC : 4-[1-(4-  hidroksifenil)etil]fenol  CAS : 2081-08-5  EC: 627-637-2</p>		<p>MM= 214,264 g/mol  LogP*= 3,9  pKa= 10,10</p>	<p>4, 14,  15</p>
<p><b>Bisfenol F (BPF)</b>  IUPAC: 4-[(4-  hidroksifenil)metil]fenol  CAS: 620-92-8  EC: 210-658-2</p>		<p>MM= 200,237 g/mol  LogP*= 2,9  pKa= 9,91   Topen v etanolu,  etru, kloroformu in  alaklijskih  raztopinah</p>	<p>4, 16</p>

<p><b>Bisfenol P (BPP)</b>  IUPAC : 4-[2-[4-[2-(4-hidroksifenil)propan-2-il]fenil]propan-2-il]fenol  CAS : 2167-51-3  EC : 606-820-0</p>		MM= 346,47 g/mol LogP*= 6,1 pKa= 10,31	4, 17, 18
<p><b>Bisfenol S (BPS)</b>  IUPAC : 4-(4-hidroksifenil)sulfonilfenol  CAS : 80-09-1  EC : 201-250-5</p>		MM= 250,268 g/mol LogP*= 1,9 pKa= 8,2  Topen v etanolu in etru	19
<p><b>Bisfenol Z (BPZ)</b>  IUPAC : 4-[1-(4-hidroksifenil)cikloheksil]fenol  CAS : 843-55-0  EC : 212-677-1</p>		MM= 268,356 g/mol LogP-AA*= 5,4 pKa= 9,91	4, 20
<p><b>Dihidroksibenzofenol (DHBP)</b>  IUPAC : (2,4-dihidroksifenil)-phenilmetanon  CAS : 131-56-6  EC : 205-029-4</p>		MM=214,22 g/mol LogP*=3,2  Topen v metanolu	21
<p><b>4-kumilfenol (HPP)</b>  IUPAC : 4-(2-fenilpropan-2-il)fenol  CAS : 599-64-4  EC : 209-968-0</p>		MM= 212,292 g/mol LogP*= 3,7 pKa= 10,0	22, 23
<p><b>Tetrabromobisfenol A (TBBPA)</b>  IUPAC : 2,6-dibromo-4-[2-(3,5-dibromo-4-hidroksifenil)propan-2-il]fenol  CAS : 79-94-7  EC : 201-236-9</p>		MM= 543,875 g/mol LogP-AA*= 6,8 pKa <sub>1</sub> = 7,5 pKa <sub>2</sub> = 8,5  Topen v etanolu, etru, benzenu in kloroformu	24

\*izračunana vrednost LogP

**Preglednica II:** Toksikokinetične in toksikodinamične lastnosti bisfenolov ter njihove koncentracije, določene v okolju in bioloških vzorcih.

Ime	Toksikokinetične in toksikodinamične lastnosti	Koncentracije v okolju in bioloških vzorcih	Viri
BPA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prehaja placentno;</li> <li>- pozitiven rezultat na modelu QSAR za rak;</li> <li>- estrogenske in antiandrogene lastnosti (vezava na oba estrogenska receptorja, ER<math>\alpha</math> in ER<math>\beta</math>);</li> <li>- vezava na humani estrogenu podobni receptor gama (ERR<math>\gamma</math> se nahaja na zarodkovih možganih in placenti), nejedrne receptorje in membranske estrogenske receptorje (mER) ter s proteinom G sklopljeni receptor 30 (GPR30);</li> <li>- vezava na mER v celicah GH3/B6 hipofize, kar povzroča sproščanje prolaktina;</li> <li>- vezava na mER v celicah <math>\alpha</math> trebušne slinavke in posledično sproščanje glukagona;</li> <li>- vezava na GPR30 sproži priloferacijo in apoptozo celic - GPR30 se nahaja v tumorskih celicah raka dojke, <math>\beta</math>-celicah Langerhansovih otočkov in adipocitih;</li> <li>- vezava na ERR<math>\gamma</math> lahko provzroča spremembe na fetalnem tkivu;</li> <li>- ↓ sproščanje progesterona;</li> <li>- ↓ sproščanje aldosterona;</li> <li>- ↓ sproščanje kortizola;</li> <li>- ↓ sproščanje testosterona;</li> <li>- zaviranje genskih prepisov StAR in CYP11A1 (katalizirata reakcije nastanka progesterona iz holesterola);</li> <li>- ↑ CYP11B1 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz progesterona in kortizola iz 17<math>\alpha</math>-OH-progesterona);</li> <li>- ↓ CYP11B2 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hrana : nd-521 ng/g</li> <li>Pijača : nd-46,4 ng/mL</li> <li>Pitna voda : nd-0,128 ng/mL</li> <li>Izdelki za os. nego : nd-88,3 ng/g</li> <li>Papir : nd-70000 ng/g</li> <li>Prah : 9,6-32000 ng/g</li> <li>Površinske vode: nd-4687 ng/L</li> <li>Sediment vode : nd-13370 ng/g</li> <li>Blato odp. voda : 0,42-4700 ng/g</li> <li>Urin : nd-40 ng/mL</li> <li>Serum : nd-7,12</li> <li>Placentno tkivo : nd-34,9 ng/g</li> <li>Materino mleko : &lt;0,001-3,29 mg/mL</li> <li>Adipozno tkivo : nd-12,01 ng/g</li> <li>Vodni organizmi: nd-14,5 ng/g</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3, 4, 6,</li> <li>23, 25,</li> <li>26, 27,</li> <li>28, 29,</li> <li>30, 31,</li> <li>32, 33,</li> <li>34, 35,</li> <li>36</li> </ul>

	<p>progesterona);</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ↓ gensko ekspresijo CYP17A1 (katalizira reakcije za nastanek testosterona in 17β-estradiola iz progesterona);</li> <li>- ↓ aktivnost androgenskega receptorja v kvasovkah ob dodatku testosterona;</li> <li>- ↓ aktivnost glukokortikoidnega receptorja v kvasovkah ob dodatku agonista deksametazona;</li> <li>- ↓ sekrecija bazalnega testosterona v humanih in mišjih kulturah fetalnih testisov;</li> <li>- ↓ obmodka pri mišjih potomcih v nizkih koncentracijah;</li> </ul> <p>↓ učinkovitost produkcije sperme za 20 % pri miših:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- napredovanje pubertete, spremembe v DNK sintezi in povečana ekspresija ERα in progesteronskega receptorja v endometriju ženskih mišjih zarodkov v postnatalnem obdobju rasti;</li> <li>- rast prostate (povečano število in velikost dorzolateralnih kanalov prostate) pri moških mišjih zarodkih;</li> <li>- oslABLjena spolna diferenciacija antroventralnega periventrikularnega jedra hipotalamusa pri podganah;</li> <li>- ↑ aktivnost proteina p53;</li> <li>- vezava na DNA telečjega timusa;</li> <li>- vpliv na razvoj zarodkov rib zebrič in reprodukcijska toksičnost pri vodnih bolhah;</li> <li>- indukcija aktivnosti β-galaktozidaze v kvasovkah.</li> </ul>		
BPAF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- močnejša vezava na estrogenske receptorje od BPA (vezava na ERα-agonist in ERβ-antagonist);</li> <li>- antiandrogeno delovanje;</li> <li>- lahko povzroči zmanjšanje testosterona z delovanjem na funkcijo testisov;</li> <li>- vpliv na ravnovesje hormonov pri ribah zebričah in vpliv na razvoj potomcev;</li> </ul>	<p>Hrana : nd-0,76 ng/g  Pijača : nd-0,009 ng/mL  Izd. za os. nego : nd-0,07 ng/g  Prah : &lt;0,1-54 ng/g  Površinske vode: 0,13-245,69 ng/L  Sediment : nd-2009,8 ng/g  Blato odp. voda : nd-72,2 ng/g  Urin: nd-0,173 ng/mL</p>	<p>3, 4, 6,  25, 26,  28, 29,  30, 31,  33, 35,  36, 37</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- možnost indukcije endogenega prepisa genov, ki se odzivajo na estrogen;</li> <li>- ↑ sproščanje progesterona;</li> <li>- ↓ sproščanje aldosterona;</li> <li>- ↓ sproščanje kortizola;</li> <li>- ↓ sproščanje testosterona;</li> <li>- pri višjih koncentracijah ↓ CYP11B1 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz progesterona in kortizola iz 17a-OH-progesterona);</li> <li>- ↓ CYP11B2 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz progesterona);</li> <li>- ↓ gensko ekspresijo CYP17A1 (katalizira reakcije za nastanek testosterona in 17β-estradiola iz progesterona);</li> <li>- 20x močnejša vezava na ERα od BPA;</li> <li>- vezava na DNA telečjega timusa;</li> <li>- reprodukcijska toksičnost pri vodnih bolhah;</li> <li>- indukcija aktivnosti β-galaktozidaze v kvasovkah.</li> </ul>	Vodni organizmi: <LOQ-57,11 ng/g	
<b>BPAP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- motilec endokrinega sistema;</li> <li>- vezava na DNA telečjega timusa.</li> </ul>	<p>Hrana : nd-1,27 ng/g</p> <p>Pijača : nd</p> <p>Izd. za os. nego : nd-1,01 ng/g</p> <p>Prah : &lt;0,5-4,5 ng/g</p> <p>Površinske vode: nd-0,39 ng/L</p> <p>Blato odp. voda: &lt;1,79 ng/g</p> <p>Sediment : nd-252 ng/g</p> <p>Blato odp. voda : nd</p>	4, 28, 30, 31
<b>BPB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- metaboliti so aktivni (povečano estrogensko delovanje);</li> <li>- pozitivne napovedi na modelu QSAR za rak;</li> <li>- močnejše estrogensko delovanje od BPA;</li> <li>- antiandogeno delovanje;</li> <li>- ↑ sproščanje progestagenov;</li> <li>- ↑ sproščanje dehidroepiandrosterona;</li> <li>- ↑ sproščanje estrona;</li> <li>- ↓ sproščanje kortizola;</li> <li>- ↓ sproščanje kortikosterona;</li> <li>- ↑ aktivnost p53.</li> </ul>	<p>Hrana : nd-85,7 ng/g</p> <p>Pijača : nd-0,16 mg/mL</p> <p>Izd. za os. nego : nd-0,014 ng/g</p> <p>Prah : &lt;1-8,4 ng/g</p> <p>Površinske vode: nd</p> <p>Sediment vode : nd-10,6 ng/g</p> <p>Blato odp. voda : nd-5,6 ng/g</p> <p>Urin : nd-1,15 ng/mL</p> <p>Serum : nd-11,94 ng/mL</p> <p>Vodni organizmi: nd</p>	4, 6, 21, 28, 29, 30, 31

BPC	- 23x močnejša vezava na ER $\alpha$ od BPA.	Površinske vode: nd Sediment vode: nd	28, 30, 37
BPE	- estrogensko delovanje; - antiandrogeno delovanje; - $\uparrow$ sproščanje progestagenov; - $\uparrow$ sproščanje kortikosterona; - potencial za povzročitev poškodbe DNA.	Hrana : nd Pijača : nd Blato odp. voda: 0,06-167 ng/g	4, 23, 25, 30, 38, 39
BPF	- pozitivne napovedi na modelu QSAR za rak; - estrogensko in antiandrogeno delovanje; - reprodukcijska toksičnost; - estrogenske lastnosti pri podganah; - $\uparrow$ sproščanje progesterona; - $\downarrow$ ali $\uparrow$ sproščanje kortizola; - $\uparrow$ sproščanje 17 $\beta$ -estradiola; - zaviranje genske ekspresije HSD3B2 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka progesterona iz holesterola); - $\downarrow$ CYP21A2 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz progesterona in kortizola iz 17a-OH-progesterona); - pri višjih koncentracijah $\downarrow$ CYP11B1 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz progesterona in kortizola iz 17a-OH-progesterona); - $\downarrow$ CYP11B2 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz progesterona); - $\downarrow$ gensko ekspresijo CYP17A1 (katalizira reakcije za nastanek testosterona in 17 $\beta$ -estradiola iz progesterona); - $\downarrow$ aktivnost androgenskega receptorja v kvasovkah ob dodatku testosterona; - $\downarrow$ aktivnost glukokortikoidnega receptorja v kvasovkah ob dodatku deksametazona (agonist); - $\uparrow$ sekrecija testosterona iz mišjih tumorogenih Leydigovih celic; - $\uparrow$ sproščanje kortikosterona; - $\uparrow$ aktivnost Nrf2 (potencial za oksidativni	Hrana : nd-623 ng/g Pijača : nd-0,26 ng/mL Izd. za os. nego: nd-0,79 ng/g Prah : <1-110000 ng/g Površinske vode: nd-2850 ng/L Sediment : nd-9650 ng/g Blato odp. voda : nd-259 ng/g Urin: nd-1,368 ng/mL Vodni organizmi: nd-1,278 ng/g	3, 4, 6, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36



	<p>stres);</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- vpliv na razvoj zarodkov rib zebrič in reprodukcijska toksičnost pri vodnih bolhah;</li> <li>- indukcija aktivnosti <math>\beta</math>-galaktozidaze v kvasovkah.</li> </ul>		
BPP	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ne izkazuje estrogenskega potenciala pri moških primerkih japonske medake <i>in vivo</i> (<i>Oryzias latipes</i>).</li> </ul>	<p>Hrana : nd-73,1 ng/g  Pijača : nd-0,03 ng/mL  Izd. za os. nego : nd  Prah : &lt;2-9,4 ng/g  Sediment : nd  Blato odp. voda : nd-6,4 ng/g</p>	4, 31
BPS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- motilec endokrinega sistema (šibko estrogensko delovanje- vezava na oba estrogenska receptorja, vendar večja afiniteta za ER<math>\beta</math>);</li> <li>- vezava na membranske ER- indukcije negenomskega odziva;</li> <li>- šibko androgeno delovanje;</li> <li>- reprodukcijska toksičnost;</li> <li>-estrogenske lastnosti pri podganah;</li> <li>- ↓ sproščanje aldosterona;</li> <li>- ↓ sproščanje kortizola;</li> <li>- ↓ sproščanje testosterona;</li> <li>- ↑ sproščanje progesterona;</li> <li>- ↑ CYP11B1 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz progesterona in kortizola iz 17a-OH-progesterona);</li> <li>- pri višjih koncentracijah ↓ CYP11B1 (katalizira eno izmed zaporednih reakcij nastanka aldosterona iz progesterona in kortizola iz 17a-OH-progesterona);</li> <li>- ↓ gensko ekspresijo CYP17A1 (katalizira reakcije za nastanek testosterona in 17<math>\beta</math>-estradiola iz progesterona);</li> <li>- ↑ progesterona in pregnenolona iz mišjih tumorogenih Leydigovih celic;</li> <li>- pri ribah zebričah (<i>Danio rerio</i>): razvojna toksičnost, reproduktivne okvare, steroidno in</li> </ul>	<p>Hrana : nd-175 ng/g  Pijača : nd-0,007 ng/mL  Izd. za os. nego : nd-0,04 ng/g  Papir : 1000-60000 ng/g  Prah : &lt;2-21000 ng/g  Površinske vode: nd-7200 ng/L  Sediment : nd-1970 ng/g  Blato odp. voda : nd-1480 ng/g  Urin: nd-2,511 ng/mL  Materino mleko : nd-0,23 ng/mL  Vodni organizmi: &lt;LOQ-0,204 ng/g</p>	3, 4, 6, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 37

	ščitnično hormonsko neravnovesje, indukcija vitelogenina (specifično ženski protein) pri moških; - ↓ sproščanje kortikosterona.		
BPZ	Ni dosegljivih podatkov.	Hrana : nd-2,6 ng/g Pijača : nd-0,09 ng/mL Izd. za os. nego : nd Prah : <0,5 ng/g Površinske vode: nd-0,7 ng/L Sediment : nd-63,3 ng/g Blato odp. voda : nd-66,7 ng/g Vodni organizmi: 0,175-2,87 ng/g	4, 28, 30, 31
DHBP	- estrogensko delovanje.	Blato odp. voda: 0,2-110 ng/g	25, 39
HPP	- ↑ sproščanje progesteronov; - ↑ sproščanje estrona; - ↓ sproščanje kortizola; - ↓ sproščanje kortikosterona; - vezava na estrogenske receptorje; - antiandrogeno delovanje šibkejša od BPA; - ↑ aktivnost Nrf2 (potencial za oksidativni stres).	Vodni organizmi: nd-1,96 ng/g	23, 34, 37
TBBPA	- manjše estrogensko delovanje od BPA; - ↓ aktivnost tiroidnega receptorja v kvasovkah; - ↓ aktivnost androgenega receptorja v kvasovkah ob dodatku testosterona; - ↓ aktivnost glukokortikoidnega receptorja v kvasovkah ob dodatku deksametazona (agonist); - ↑ sekrecija testosterona iz mišjih tumorogenih Leydigovih celic; - povečana testikularna masa; - testikularni adenom; - indukcija progesterona, 17-OH-progesterona, deoksikortikosterona, androstenediona, α-testosterona in β-testosterona v mišjih tumorogenih Leydigovih celicah.	Površinske vode: nd Sediment: nd-5,08 Blato odp. voda: 0,95-259 ng/g Vodni organizmi: nd- <LOQ	6, 25, 29, 32, 33

Legenda: nd – nedetektirano

## 1.3 ANALIZNE METODE

### 1.3.1 Priprava vzorcev

Bisfenoli se veliko določajo v vzorcih hrane, odpadnih voda ter pijač. Ti vzorci potrebujejo obsežno pripravo pred instrumentalno analizo. Priprava vzorca lahko vsebuje predpripravo, ekstrakcijo, čiščenje, koncentriranje in včasih derivatizacijo. Trdne vzorce navadno najprej homogeniziramo, tekoče pa filtriramo ali centrifugiramo. Glede na specifičnost vzorca pa je potrebna uporaba posebnih postopkov, kot na primer precipitacija proteinov ali liofilizacija.

Za izolacijo bisfenolov se najpogosteje uporabljata ekstrakcija s topilom in ekstrakcija na trdnih nosilcih (SPE). Koncentriranje vzorca z evaporacijo topila pa je nujno potreben korak, zaradi nizke koncentracije teh analitov v vzorcih (40).

#### Metoda SPE

To je najpogosteje uporabljena metoda za ekstrakcijo in očiščenje vzorca, ki vsebuje bisfenole (40). Za SPE se uporabljajo kolone, to so majhne polipropilenske ali steklene cevke za brizgo, ki so napolnjene z adsorbtiivnim medijem. Nad in pod adsorbtiivnim medijem je disk iz polietilena ali nerjavečega jekla. Za doseganje najboljšega izkoristka moramo izbrati ustrezne stacionarne faze. Tekoča faza lahko teče skozi kolono z gravitacijsko silo, s pomočjo centrifugiranja ali s pomočjo vakuuma. Poleg kolon za SPE lahko uporabimo tudi ekstrakcijske diske. Sorpcijski materiali so enaki kot pri kolonah, vendar pa so njihovi delci precej manjši. Za izvedbo postopka SPE lahko uporabimo tudi posebne nastavke za pipete ali plošče z večimi vdolbinami (41).

Poznamo različne vrste metode SPE: reverznofazno, normalnofazno, ionsko izmenjevalno in adsorpcijsko (42). Analiti tvorijo različne interakcije s sorbentom, kar je prikazano v Preglednici III.

**Preglednica III:** Predstavitev mehanizmov zadrževanja sestavin analitov na sorbentu, v odvisnosti od lastnosti mobilne in stacionarne faze (42).

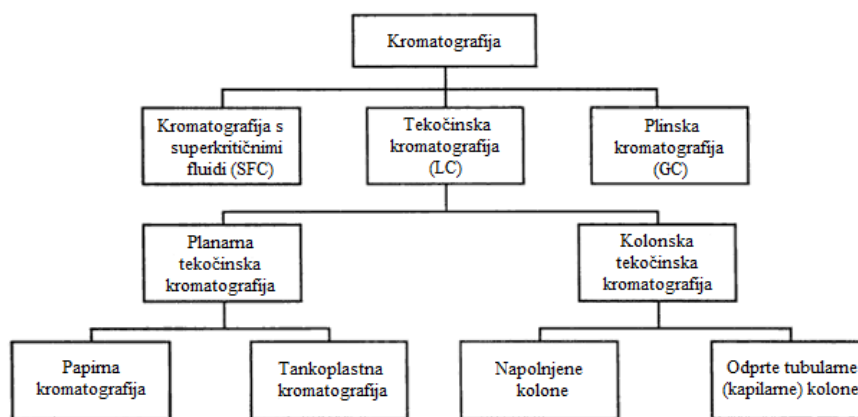
STACIONARNE/MOBILNE FAZE	VRSTE INTERAKCIJ
<b>Reverzna faza</b> (polarna tekoča faza, nepolarna modificirana trdna faza)	Hidrofobne interakcije: <ul style="list-style-type: none"> <li>• nepolarne interakcije</li> <li>• Van der Waalsove disperzijske sile</li> </ul>
<b>Normalna faza</b> (nepolarna tekoča faza, polarna modificirana trdna faza)	Hidrofilne interakcije: <ul style="list-style-type: none"> <li>• polarne interakcije</li> <li>• vodikov vezi</li> <li>• interakcije <math>\pi</math>-<math>\pi</math></li> <li>• interakcije dipol-dipol</li> <li>• interakcije dipol-inducirani dipol</li> </ul>
<b>Ionska izmenjava</b>	elektrostatska privlačnost med nabito skupino v molekuli in nabito skupino na sorbentu
<b>Adsorpcija</b> (interakcije spojin z nemodificiranimi materiali)	lahko pride do hidrofobnih in hidrofilnih interakcij, odvisno od izbire trdne faze

### 1.3.2 Analiza vzorcev

Zaradi nizkih koncentracij bisfenolov v vzorcih moramo uporabljati zelo občutljive in selektivne metode. Največkrat se uporabljata tekočinska kromatografija, sklopljena s fluorescenčnim (LC-FL) ali masnim detektorjem (LC-MS) ter plinska kromatografija, sklopljena z masnim detektorjem (GC-MS). Tekočinska kromatografija je preprostejša od plinske, saj vzorcev ni potrebno derivatizirati. Plinska pa ponuja boljšo resolucijo. Uporabljajo tudi metode, kot sta tekočinska kromatografija sklopljena z elektrokemičnim detektorjem in imunski testi, a manj pogosto (40).

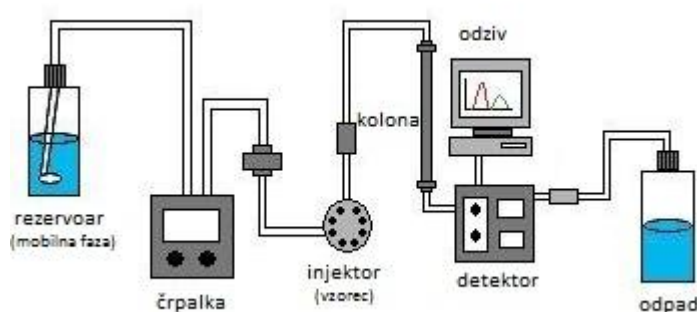
#### Metoda HPLC-MS

Oznaka HPLC pomeni tekočinska kromatografija visoke ločljivosti. To je analizna metoda za ločevanje vzorcev po komponentah. Ločitev poteka glede na interakcije vzorca z mobilno in stacionarno fazo, pri čemer je mobilna faza tekoča, stacionarna pa trdna. Glede na polarnost stacionarne faze poznamo normalnofazno in reverznofazno kromatografijo. Pri prvi je stacionarna faza polarna, mobilna pa nepolarna, pri drugi pa ravno obratno. HPLC spada, glede na obliko nosilca trdne faze, med metode kolonske kromatografije, kjer je stacionarna faza napolnjena v kolono (Slika 2) (43, 44).



**Slika 2:** Oblike kromatografij; prirejeno po (45).

Osnovne komponente sistema HPLC so: mobilna faza v rezervoarju, sistem za dostavo mobilne faze oz. črpalka, naprava za dostavo vzorca oz. injektor, ki je lahko ročen ali avtomatičen, kolona, en ali več detektorjev ter sistem za zajemanje in obdelavo podatkov (Slika 3) (44).



**Slika 3:** Shema sistema za tekočinsko kromatografijo; prirejeno po (43).

Kompleksnost nekaterih vodnih in drugih okoljskih vzorcev lahko predstavlja težavo pri identifikaciji in kvantifikaciji posameznih komponent analitov. Prihaja namreč lahko do prekrivajočih in razvlečenih vrhov. Tem težavam se lahko izognemo z uporabo LC-MS. Pri LC-MS za detekcijo uporabljamo masni spektrometer (46). LC-MS je občutljiva in visoko selektivna metoda, še posebej ob uporabi MS/MS (47). Z njo lahko dosežemo zelo nizke meje detekcije brez derivatizacije, ki je potreben korak pri analizi z GC-MS. Za ionizacijo vzorca se največkrat uporabljajo elektrorazprševalna ionizacija (ESI), kemična ionizacija pod atmosferskim tlakom (APCI) ali fotoionizacija pod atmosferskim tlakom (APPI) (46). Uporaba ESI zagotavlja boljšo občutljivost metode, zato se najpogosteje uporablja. Masni analizatorji, ki se uporabljajo za analizo bisfenolov, so kvadrupoli in analizatorji z ionsko pastjo (40).

## 2 NAMEN DELA

Bisfenoli se nabirajo v odpadnih in površinskih vodah. Najdemo pa jih tudi v hrani, pijači in prahu. Tako smo ljudje v neposrednem stiku z njimi praktično vsak dan. Večina analogov bisfenola A izkazuje hormonske lastnosti. Za nekatere od njih pa nimamo tovrstnih podatkov, kar je mogoče še bolj zaskrbljujoče. V okviru velikega števila raziskav so se že ukvarjali z ugotavljanjem prisotnosti teh snovi v površinskih, pitnih in odpadnih vodah. Večino tovrstnih analiz so izvedli v azijskih državah, najdemo pa tudi podatke za Združene države Amerike in Kanado. Pri tem so večinoma uporabljali metode za hkratno analizo manjšega števila bisfenolov. Le nekaj raziskav pa je hkrati obravnavalo 8 ali 9 analogov bisfenola A.

Naš cilj je razviti metodo LC-MS/MS za sočasno analizo čim večjega števila analogov BPA, saj jih imamo na voljo kar 13. Z njo nameravamo nato ugotoviti, kakšne so njihove koncentracije v okoljskih vzorcih vode v Sloveniji. Zbrane vzorce bomo za analizo pripravili s postopkom ekstrakcije na trdnih nosilcih (metoda SPE). Metodi SPE in LC-MS/MS bomo optimizirali z analizo standardnih raztopin bisfenolov. Na podlagi teh rezultatov bomo izbrali najustreznejšo kolono SPE, optimalno elucijsko topilo, najprimernejši volumen vzorca ter najustreznejša postopka sušenja in rekonstitucije vzorcev. Ustreznost razvite analizne metode bomo potrdili z validacijo. Pri tem bomo določili njeno linearnost, točnost, natančnost, ponovljivost, mejo določitve in izkoristek. V nadaljevanju bomo zbrali nekaj okoljskih vodnih vzorcev, pri čemer se bomo ostedotočili predvsem na površinske vode v Sloveniji in z novo, validirano metodo analizirali vsebnosti bisfenolov v njih. S tem bomo tudi ovrednotili primernost na novo vpeljane metode za rutinsko uporabo.

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 MATERIALI**

#### **3.1.1 Vzorci površinskih vod in vodovodne vode**

Zbrali smo 5 vzorcev površinskih vod v Sloveniji in 1 vzorec vodovodne vode. Vzorci površinskih voda so bili zajeti iz rek ali potokov.

Mesta odvzeta vzorcev:

- Ljubljana: Ljubljana, Gruberjevo nabrežje
- Drava: Maribor, Studenška brv
- Sava: Ljubljana, Črnuče, Gameljska cesta
- Selška Sora: Vešter, Škofja Loka
- Obrh: Loško polje, Loška dolina

Vzorec vodovodne vode je bil odvzet na Fakulteti za farmacijo, Aškerčeva cesta 7, v Ljubljani.

Odvzeli smo po 1 L posameznega vzorca. Zbrali smo jih v steklenicah, ki smo jih predhodno očistili s prečiščeno vodo in etanolom. Vzorce površinskih vod smo zajeli približno pol metra pod gladino reke ali potoka in jih analizirali v roku 24 ur, z izjemo vzorca Drave, ki smo ga analizirali v roku 48 ur. Pred tem smo ga shranili v hladilniku.

#### **3.1.2 Standardi preučevanih bisfenolov**

- BPAF, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- BPAP, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- BPB, 95% čistost, Dr. Ehrenstoffer, Nemčija
- BPC, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- BPE, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- BPF, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- BPP, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- BPS, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- BPZ, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- HPP, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA
- DHBP, 95% čistost, Sigma Aldrich, ZDA

### 3.1.3. Reagenti in topila

- Metanol CHROMASOL V<sup>®</sup> za HPLC,  $\geq 99,9\%$  (Honeywell Riedel-de Haën<sup>®</sup>, Seelze, Nemčija)
- Acetonitril CHROMASOL V<sup>®</sup> gradient za HPLC,  $\geq 99,9\%$  (Honeywell Riedel-de Haën<sup>®</sup>, Seelze, Nemčija)
- Metanol CHROMASOL V<sup>®</sup> za LC-MS (Honeywell Riedel-de Haën<sup>®</sup>, Seelze, Nemčija)
- Natrijev hidroksid za 1.000 mL, Titrisol<sup>®</sup> (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- Klorovodikova kislina za 1.000 mL, Titrisol<sup>®</sup> (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- Kalijev dihidrogen fosfat za analizo, Emsure<sup>®</sup> ISO,  $> 99,5\%$  (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- 2-propanol CHROMASOL V<sup>®</sup> za HPLC, 99,9% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Steinheim, Nemčija)
- Demineralizirana voda (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija)
- Voda Milli-Q (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija)
- Stisnjen dušik (Messer, Ruše, Slovenija)

### 3.1.4. Pribor in aparature

- Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, epruvete, vialo, inserti, natehtalke
- Polavtomatske pipete: 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , 1-10 mL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Ultrazvočna kopel Sonis 4 (Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija)
- Ultrazvočna kopel Sonorex (Bandelin, Berlin, Nemčija)
- Sušilnik TurboVap<sup>®</sup> LV (Caliper LifeSciences, Zimark, Portland, ZDA)
- pH meter FiveEasy Plus (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica)
- Mešalnik Rotamix 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Tehtnica Exacta 300 EB (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Tehtnica Excellence Plus XP105 Delta Range<sup>®</sup> (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica)
- Stesalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)



- Sistem za vodo Milli-Q: Advantage 10, Automatic Sanitation Module, Millipore Q-Pod<sup>®</sup>, Millipak<sup>®</sup> 40 Gamma Gold filter 0,22 µm (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, ZDA)
- Ostalo: nastavki za pipete, vzmeti za inserte, plastične kapalke, škarje, Parafilm M, spatula

#### Sistem za SPE:

- Kolone za SPE Oasis<sup>®</sup> HLB 3cc (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, ZDA)
- Kolone za SPE Strata<sup>™</sup>-X (Phenomenex<sup>®</sup>, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Kolone za SPE Strata<sup>™</sup>C18-T (Phenomenex<sup>®</sup>, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Kadička Visiprep<sup>™</sup> Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, Pensilvanija, ZDA)
- Oljna vakuumska črpalka (Gast manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)
- Plastične brizge BD Plastipak volumna 60 mL (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA)
- Plastične brizge BD Plastipak volumna 22 mL (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA)
- Nastavki za plastične brizge (Phenomenex<sup>®</sup>, Torrance, Kalifornija, ZDA)

#### Sistem HPLC-MS/MS:

- Agilent 1290 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA): vključuje razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono in UV-VIS detektor (DAD)
- Agilent 6460 Triple Quadropole LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA): vključuje Jetstream<sup>®</sup> ionski izvor ESI
- Kromatografska kolona Zorbax SB-C18, 50×2,1 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Metoda SPE

#### 3.2.1.1 Priprava topil

Pri razvoju metode SPE smo uporabljali naslednja topila: vodo Milli-Q, 100% metanol, acetonitril/metanol (razmerje 3:1), acetonitril/metanol (razmerje 1:1), 100% acetonitril, acetonitril/izopropanol (razmerje 1:1), acetonitril/metanol/izopropanol (razmerje 2:1:1) in 20% metanol.

Topila, ki jih je bilo potrebno zmešati, smo pripravljali sproti v količinah 50 mL ali 100 mL.

- Acetonitril/metanol (3:1): V 50 mL bučko smo odmerili 37,5 mL ACN in z MeOH dopolnili do oznake.
- Acetonitril/metanol (1:1): V 50 mL bučko smo odmerili 25 mL ACN in dopolnili z MeOH do oznake.
- Acetonitril/izopropanol (1:1): V 50 mL bučko smo odmerili 25 mL ACN in dopolnili z iPrOH do oznake.
- Acetonitril/metanol/izopropanol (2:1:1): V 50 mL bučko smo odmerili 25 mL ACN, dodali smo mu 12,5 mL iPrOH in z MeOH dopolnili do oznake.
- 20% metanol: V 100 mL bučko smo odmerili 20 mL MeOH in z Milli-Q vodo dopolnili do oznake.

#### 3.2.1.2 Priprava pufra

Za razvoj metode SPE smo uporabljali 25 mM pufer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  z različnimi pH (3, 4, 5 in 7). Pufer smo pripravili tako, da smo natehtali 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in ga raztopili v 2 L vode Milli-Q. Nato smo uravnali pH pufra z dodajanjem 1M NaOH ali 1M HCl.

#### 3.2.1.3 Začetni protokol za metodo SPE

Za pripravo vzorcev smo uporabili kolone za SPE, Strata<sup>TM</sup>-X. Metodo smo izvajali v vakuumski kadički. Začetni protokol je potekal po sledečih navodilih:

V kadičko smo namestili odpadni čaši.

1. Prekondicioniranje:

Na vsako kolono smo nanесли 10 mL metanola.

2. Uravnovešenje:

Najprej smo nanegli 5 mL pufru 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s pH 4, nato pa 5 mL vode Milli-Q. Pri uravnovešanju smo vklopili vakuumsko črpalko in pritisk vzdrževali na najmanjši možni točki s prižgano črpalko in pretokom približno 1 mL/min (tlak < -5 kPa).

3. Nanos vzorca:

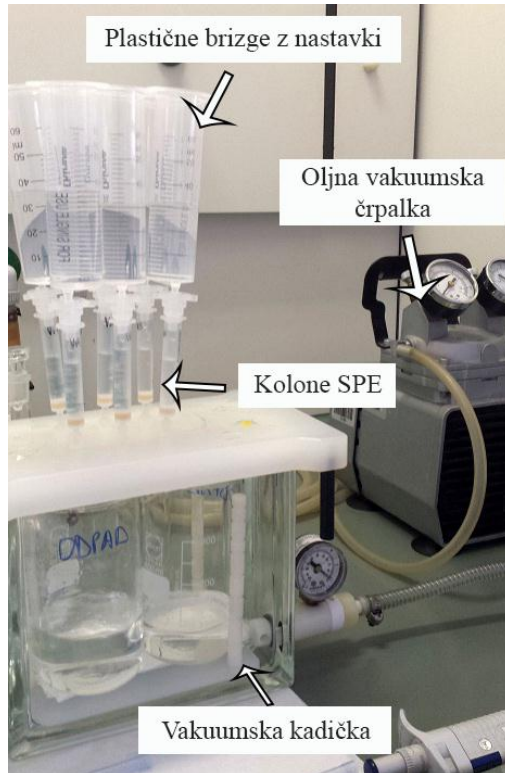
Pri nanosu vzorca smo si pomagali z brizgami, ki smo jih s pomočjo nastavkov namestili na kolone (Slika 4). Pazili smo, da se kolona od začetka prekondicioniranja do konca nanosa vzorca ni posušila.

4. Sušenje:

Po nanosu vzorca smo kolone sušili z vakuumskim sušenjem 10 min. Vakuum smo povečali do -40 kPa.

5. Elucija:

Pred elucijo smo odpadni čaši zamenjali z epruветami, ugasnili črpalko in na vsako kolono štirikrat nanegli po 500  $\mu\text{L}$  acetonitrila v metanolu v razmerju 3:1. Med nanosi smo počakali, da je topilo steklo do konca kolone in šele nato nanegli novih 500  $\mu\text{L}$  elucijskega topila.



**Slika 4:** Nanos vzorca na kolone SPE z označenimi deli sistema za SPE.

### Sušenje vzorcev in rekonstitucija

Vzorci smo po eluciji posušili s prepihanjem z dušikom pri temperaturi 50 °C, 30 min. Posušeni vzorci smo nato dodali 200 µL acetonitrila v metanolu v razmerju 1:1. Raztopine smo vorteksirali 1 min, jih zatesnili s pomočjo parafilma in jih za 15 min postavili v ultrazvočno kadičko. Iz epruвет smo vzorce prenesli v vialo za analizo HPLC.

#### **3.2.1.4 Razvoj metode SPE**

##### **Prekondicioniranje**

Zaostanek analitov na predhodno uporabljenih kolonah smo preverjali s spiranjem 6 kolon za SPE s 3 mL metanola, ki smo mu nadalje določili vsebnosti bisfenolov.

##### **Nanos vzorca**

###### Kolona za SPE

Testirali smo naslednje kolone SPE: Strata™-X (Strata-X), Strata™C18-T (C18) in Oasis® HLB (HLB). Pripravili smo zmes bisfenolov s koncentracijo 1 µg/L tako, da smo redčili zmes standardov s koncentracijo 250 µg/L (poglavje 3.2.3) s pufrom (pH = 7). Na posamezno kolono smo nanесли 25 ml pripravljene zmesi bisfenolov. Postopek SPE smo izvajali dvakrat. Posamezna ponovitev je vsebovala dve koloni Strata-X, dve koloni C18 in dve koloni HLB.

###### Izbira pH

Za izbiro pH puфра smo testirali 25 mM pufer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s pH 3, 5 in 7 ter vodo. Uporabili smo kolone Strata-X za SPE, saj smo pH puфра izbirali pred izbiro kolon. Zmes bisfenolov s koncentracijo 1 µg/L smo pripravili v različnih pufrih. 25 mL vzorca smo nato nanесли na kolone v treh ponovitvah. Kjer smo za pripravo vzorcev uporabljali pufer, smo tudi pri uravnovešanju namesto 5 mL puфра in 5 mL vode nanašali le 10 mL izbranega puфра.

###### Izbira volumna nanosa

Za določitev volumna vzorca smo nanašali različne volumne vzorca s koncentracijo standardov 50 ng/L. Vzorec smo pripravili iz prilagojene zmesi standardov s koncentracijo 200 µg/L (poglavje 3.2.3, Zmes P2). Nanašali smo 50 mL, 100 mL, 200 mL in 500 mL vzorca. Vzorce smo pripravili v 25 mM pufru KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s pH 7 in jih nanašali na kolone HLB. Vsak volumen smo testirali v štirih ponovitvah.

## **Elucija**

Testirali smo tako volumen elucijskega topila, kot tudi različna topila.

### Izbira elucijskega topila

Elucijsko topilo smo izbirali na kolonah HLB. Na kolone smo nanašali 100 mL vzorca zmesi bisfenolov s koncentracijo 50 ng/L, ki smo ga pripravili z redčenjem prilagojene zmesi standardov s koncentracijo 100 µg/L (točka 3.2.3, Zmes P) s pufrom (pH 7). Testirali smo elucijo z naslednjimi topili: acetonitril v metanolu (1:1), acetonitril v metanolu (3:1), acetonitril v izopropanolu (1:1) in acetonitril v metanolu in izopropanolu (2:1:1). Postopek SPE smo izvajali na treh kolonah za posamezno topilo.

### Izbira volumna elucijskega topila

Volumen smo testirali na kolonah Strata-X, z uporabo acetonitrila v metanolu (razmerje 3:1). Za elucijo smo uporabili dvakrat 1 mL (na kolono smo nanесли 1 mL topila, ko je topilo steklo do konca kolone, pa smo nanесли še 1 mL topila), trikrat 0,5 mL, štirikrat 0,5 mL in petkrat 0,5 mL topila. Posamezno elucijo smo izvajali enkrat.

## **Sušenje vzorcev**

Pripravili smo zmes standardov bisfenolov s koncentracijo 5 µg/L. Za topilo smo uporabili acetonitril v metanolu, v razmerju 3:1. Sušili smo 2 mL vzorca. Po sušenju smo za rekonstitucijo uporabili 200 µL acetonitrila v metanolu (razmerje 1:1). Šest paralel smo sušili na 40 °C in šest paralel na 50 °C.

Nato smo sušili še vzorce zmesi standardov z različnimi koncentracijami (1, 5, 10, in 20 µg/L) pri temperaturi 40 °C. Prav tako smo sušili šest paralelek vsake koncentracije. Topila in volumni so bili enaki kot poprej.

## **Rekonstitucija**

Pripravili smo zmes bisfenolov s koncentracijo 12,5 µg/L. Izhajali smo iz zmesi standardov s koncentracijo 250 µg/L (poglavje 3.2.3) in jo redčili z elucijskim topilom (ACN:MeOH = 3:1). 2 mL vzorca smo sušili in ga nato rekonstituirali z 200 µL acetonitrila v metanolu (1:1). Tri paralele smo le vorteksirali, tri pa vorteksirali in postavili v ultrazvočno kadičko za 15 min. Korist ultrazvoka smo izračunali z *Enačbo 1*.

*Enačba 1:* Korist ultrazvoka, % povečanja odziva (površine kromatografskih vrhov)

$$\text{korist UZ} = \left[ \left( \frac{x_{v+UZ}}{x_v} \right) - 1 \right] \times 100\%$$

$x_{v+UZ}$  – povprečni odziv za vzorce, ki smo jih vorteksirali in postavili v UZ kad

$x_v$  – povprečni odziv za vzorce, ki smo jih le vorteksirali

### **Slepi in standardni vzorci**

Metodo SPE smo preverjali z ekstrakcijo slepih vzorcev (25 mM pufer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7, kolona HLB), nato pa še z ekstrakcijo zmesi standardov s koncentracijo 1  $\mu\text{g/l}$ , ki smo jo pripravili z redčenjem prilagojene zmesi standardov s koncentracijo 200  $\mu\text{g/L}$  (poglavje 3.2.3, Zmes P) s pufrom (pH = 7). Nanašali smo po 25 mL posameznih vzorcev.

#### **3.2.1.5 Končni protokol za metodo SPE**

Za pripravo vzorcev smo uporabili postopek SPE s kolonami Oasis<sup>®</sup> HLB. Metodo smo izvajali v vakuumski kadički. Končni protokol je potekal po sledečih navodilih:

V kadičko smo namestili odpadni čaši.

1. Prekondicioniranje:

Na vsako kolono smo nanesti 10 mL metanola.

2. Uravnovešenje:

Nanesli smo 10 mL pufru 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s pH 7. Pri uravnovešanju smo vklopili vakuumsko črpalko in pritisk vzdrževali na najmanjši možni točki s prižgano črpalko in pretokom približno 1 mL/min (tlak < -5 kPa).

3. Nanos vzorca:

Pri nanosu vzorca smo si pomagali z brizgami, ki smo jih s pomočjo nastavkov namestili na kolone.

4. Spiranje:

Po nanosu vzorca smo kolono sprali s 5 mL vode Milli-Q, čemur je sledilo še spiranje s 5 mL 20% metanola. Pazili smo, da se kolona od začetka prekondicioniranja, do konca spiranja ni posušila.

5. Sušenje:

Kolone smo sušili z vakuumskim sušenjem 10 min. Vakum smo povečali do -40 kPa.

## 6. Elucija:

Pred elucijo smo odpadni čaši zamenjali z epruветami, ugasnili črpalko in na vsako kolono štirikrat nanесли po 500  $\mu\text{L}$  acetonitrila v metanolu v razmerju 3:1.

### Sušenje vzorcev in rekonstitucija

Vzorце smo po eluciji posušili s preprihovanjem z dušikom pri temperaturi 40 °C, do 30 min. Vzorce smo med sušenjem kontrolirali in jih vzeli iz sušilnika takoj ko so bili suhi. Navadno je to bilo že po 20 - 25 min. Posušenim vzorcem smo nato dodali 200  $\mu\text{L}$  acetonitrila v metanolu v razmerju 1:1. Rastopine smo vorteksirali 1 min. Iz epruвет smo rastopine prenesli v vialе za analizo HPLC.

## **3.2.2 Metoda LC-MS/MS**

### **3.2.2.1 Začetna metoda**

#### Metoda LC

- Kromatografska kolona: Zorbax SB-C18, 50 $\times$ 2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$
- Mobilna faza:
  - A – Voda Milli-Q
  - B – Metanol čistote LC-MS
- Gradientni program mobilne faze:
  - 0 - 2 min: 80 % A, 20 % B
  - 2 - 4,1 min: 10 % A, 90 % B
  - 4,1 - 5,2 min: 80 % A, 20 % B
- Volumen injiciranja: 3  $\mu\text{L}$
- Pretok mobilne faze: 0,5 mL/min
- Temperatura kolone: 50 °C
- Spiranje igle: 4 s z 80% metanolom

#### Metoda MS/MS

- Masni analizator: Agilent 6460 s trojnim masnim kvadrupolom
- Ionski izvir: Agilent Jetstream<sup>®</sup> ESI
- EMV: 300 V
- Napetost na kapilari: 3500 V
- Napetost na šobi: 500 V

- Sušilni plin (povzroči izhlapevanje topila): 300 °C, 10 L/min
- Nebulizator (povzroči nastanek kapljic iz raztopine vzorca): 45 psi
- Plin Jetstream<sup>®</sup>: 300 °C, 11 L/min
- Prehodi MRM so vidni v Preglednici IV

**Preglednica IV:** MRM-prehodi bisfenolov in njihovi razdelilni časi, kolizijske energije, napetosti fragmentorja in polarnosti nastalih ionov.

Ime analita	Prekurzorski ion (m/z)	Produktni ion (m/z)	Razdelilni čas/ Dwell (ms)	Fragmentor (V)	Kolizijska energija (eV)	Polarnost
TBBPA	538,8	415,8	10	200	41	Negativna
BPP	345,2	330,2	10	210	25	Negativna
BPAF	335,0	265,1	10	174	21	Negativna
BPAP	289,1	274,1	10	164	17	Negativna
BPZ	267,1	223,1	10	174	33	Negativna
BPC	255,1	240,1	10	154	17	Negativna
BPS	249,0	108,0	10	164	29	Negativna
BPB	241,1	212,1	10	144	17	Negativna
BPA	227,1	212,1	10	148	17	Negativna
BPE	213,1	198,1	10	138	13	Negativna
DHBP	213,1	135,0	10	118	17	Negativna
HPP	211,1	196,1	10	118	13	Negativna
BPF	199,1	93,1	10	138	21	Negativna

### 3.2.2.2 Razvoj metode

#### Vpliv zmesi bisfenolov

Pripravili smo zmesi A in B ter zmes C, ki je vsebovala vse bisfenole (poglavje 3.2.3). Zmesi smo sušili in jih raztopili v ACN:MeOH = 1:1, nato pa analizirali z LC-MS/MS.

Za boljše ločevanje kromatografskih vrhov smo spremenili gradientni program mobilne faze (poglavje 3.2.2.3). Povečali smo še volumen injiciranja na 5 µL, da bi lahko zaznali nižje koncentracije v vzorcu.

### 3.2.2.3. Končna metoda

Pri končni metodi smo spremenili le volumen injiciranja in gradient mobilne faze. Ostali parametri so ostali enaki (poglavje 3.2.2.1).

- Gradientni program mobilne faze:
  - 0 - 2 min: 80 % A, 20 % B
  - 2 - 3 min: 50 % A, 50 % B
  - 3 - 3,5 min: 30 % A, 70 % B
  - 3,5 - 4,1 min: 10 % A, 90 % B



4,1 - 5,2 min: 80 % A, 20 % B

- Volumen injiciranja: 5  $\mu$ L

### **3.2.3 Priprava osnovnih raztopin**

#### **Priprava raztopin standardov**

##### **Osnovne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL**

Natehtali smo 1 mg trdnega standarda, temu pa s pipeto dodali 1 mL metanola. To smo naredili za vseh 13 bisfenolov.

Priprava različnih koncentracij bisfenolov pa je bila sledeča:

##### **a) 5 mg/L**

Petindvajset  $\mu$ L osnovne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL smo prenesli v 5 mL bučko in jih redčili z metanolom do oznake.

Za 10 mL standardne raztopine s koncentracijo 5 mg/L smo odpipetirali 50  $\mu$ L osnovne raztopine v 10 mL bučko in jih dopolnili z metanolom do oznake.

##### **b) 10 mg/L**

V 10 mL bučko smo napipetirali 100  $\mu$ L osnovne raztopine in jih dopolnili z metanolom do oznake.

Standardne raztopine smo shranili v hladilniku. Standardi s koncentracijo 1 mg/mL so bili shranjeni v steklenih vialah, standardi s koncentracijo 5 mg/L in 10 mg/L pa v plastičnih vsebnikih.

#### **Zmesi standardov**

Zmesi standardov vsebujejo vseh 13 standardov bisfenolov. Priprava različnih zmesi bisfenolov je bila sledeča:

##### **a) Zmes 50 $\mu$ g/L**

Po 100  $\mu$ L vsake standardne raztopine s koncentracijo 5 mg/L smo odpipetirali v 10 mL bučko in jih dopolnili z metanolom do oznake.

**b) Zmes 250 µg/L**

V 5 mL bučko smo odpipetirali po 250 µL vsakega standarda s koncentracijo 5 mg/L in jih dopolnili z metanolom do oznake.

Za pripravo 25 mL zmesi smo odpipetirali po 1,25 mL vsakega standarda s koncentracijo 5 mg/L v 25 mL bučko in jih dopolnili z metanolom do oznake.

**c) Zmes A 250 µg/L**

V 5 mL bučko smo odpipetirali po 250 µL raztopin BPS, BPF, BPA, BPB, BPAP, BPZ in BPP s koncentracijami 5 mg/L in jih dopolnili z metanolom do oznake.

**d) Zmes B 250 µg/L**

V 5 mL bučko smo odpipetirali po 250 µL raztopin BPE, DHBP, BPAF, BPC, HPP in TBBPA s koncentracijami 5 mg/L in jih z metanolom dopolnili do oznake.

**Prilagojene zmesi standardov**

Zmesi smo prilagajali glede na odzive njihovih sestavin pri analizi z LC-MS/MS. Za lažjo primerjavo podatkov smo želeli podobne odzive vseh standardov.

**a) Zmes P 100 µg/L**

V 10 mL bučko smo odpipetirali različne volumne standardov s koncentracijo 5 mg/L (Preglednica V) in jih z metanolom dopolnili do oznake ter dobro premešali. Zaradi nenatančnosti pipete smo BPS najprej redčili do koncentracije 2,5 mg/L, tako da smo v vialo odpipetirali 40 µL BPS s koncentracijo 5 mg/L in temu dodali 40 µL metanola. Dobro smo premešali in nato odpipetirali 40 µL redčenega standarda v 10 mL bučko za pripravo Zmesi P s koncentracijo 100 µg/L.

**Preglednica V:** Prilagoditve količin bisfenolov za pripravo 10 mL zmesi P s koncentracijo 100 µg/L.

Standard	Prilagoditveni faktor	V stand. s konc. 5 mg/L [µL]
BPS	0,1	20
BPF	2	400
BPE	1	200
BPA	1	200
DHBP	0,2	40
BPB	1	200
BPAF	0,2	40
BPAP	0,5	100
BPC	2	400
BPZ	1	200
HPP	1	200
BPP	0,5	100
TBBPA	5	1.000

**b) Zmes P 200 µg/L**

V 10 mL bučko smo odpipetirali različne volumne standardov s koncentracijami 10 mg/L (Preglednica VI) in jih z metanolom dopolnili do oznake.

**Preglednica VI:** Prilagoditve količin bisfenolov za pripravo 10 mL zmesi P s koncentracijo 200 µg/L.

Standard	Prilagoditveni faktor	V stand. s konc. 10 mg/L [µL]
BPS	0,1	20
BPF	2	400
BPE	1	200
BPA	1	200
DHBP	0,2	40
BPB	1	200
BPAF	0,2	40
BPAP	0,5	100
BPC	2	400
BPZ	1	200
HPP	1	200
BPP	0,5	100
TBBPA	5	1.000

Zaradi nenatančnosti pipete smo raje odpipetirali 40  $\mu\text{L}$  BPS s koncentracijo 5 mg/L in ne 20  $\mu\text{L}$  standarda s koncentracijo 10 mg/L, kot je navedeno v Preglednici VI.

**c) Zmes P2 200  $\mu\text{g/L}$**

To zmes smo kasneje prilagodili še enkrat.

**Preglednica VII:** Prilagoditve količin bisfenolov za pripravo 10 mL zmesi P2 s koncentracijo 200  $\mu\text{g/L}$ .

Standard	Prilagoditveni faktor	V stand. s konc. 10 mg/L [ $\mu\text{L}$ ]
BPS	0,05	10
BPF	6	1.200
BPE	2	400
BPA	2	400
DHBP	0,05	10
BPB	2	400
BPAF	0,06	12
BPAP	0,5	100
BPC	8	1.600
BPZ	2	400
HPP	8	1.600
BPP	0,5	100
TBBPA	2,5	500

V 10 mL bučko smo odpipetirali različne volumne standardov s koncentracijami 10 mg/L (Preglednica VII) in jih z metanolom dopolnili do oznake. Zaradi nenatančnosti pipete nismo pipetirali volumnov manjših od 40  $\mu\text{L}$ . Standarde, ki so zahtevali pipetiranje manjših volumnov (BPS, DHBP in BPAF), smo zato najprej redčili, nato pa odpipetirali ustrezne količine.

**d) Zmes V 250  $\mu\text{g/L}$**

Zmes, prilagojena za validacijo nove metode.

Odpipetirali smo različne volumne standardov s koncentracijami 5 mg/L (Preglednica VIII) in jim dodali 100  $\mu\text{L}$  metanola, da smo dobili 10 mL zmesi.

**Preglednica VIII:** Prilagoditve količin bisfenolov za pripravo 10 mL zmesi V s koncentracijo 250 µg/L.

Standard	Prilagoditveni faktor	V stand. s konc. 5 mg/L [µL]
BPS	0,05	25
BPF	3	1.500
BPE	1	500
BPA	1	500
DHBP	0,05	25
BPB	1	500
BPAF	0,2	100
BPAP	0,5	250
BPC	3	1.500
BPZ	1,5	750
HPP	2	1.000
BPP	1,5	750
TBBPA	5	2.500

Za izvedbo validacije smo to zmes redčili, da smo dobili želene koncentracije. Dejanske koncentracije bisfenolov v tej zmesi so podane v Preglednicah IX in X. Celotno validacijo (poglavje 3.2.4) smo izvajali z omenjeno zmesjo standardov, pri računanju pa smo upoštevali dejanske koncentracije bisfenolov v zmesi. Metodo SPE smo izvajali s po 200 mL vzorci posameznih koncentracij, po sušenju pa smo suhe ostanke raztopili v po 200 µL mešanice ACN:MeOH = 1:1. Tako smo pripravili vzorce 1.000-krat višje koncentracije za analizo z LC-MS/MS.

**Preglednica IX:** Izračunane dejanske koncentracije bisfenolov v različnih koncentracijah zmesi V.

Analit	Zmes V	BPS	BPF	BPE	BPA	DHBP	BPB	BPAF
Prilagoditveni faktor	1	0,05	3	1	1	0,05	1	0,2
Koncentracije [ng/L]	0,1	0,005	0,3	0,1	0,1	0,005	0,1	0,02
	0,5	0,025	1,5	0,5	0,5	0,025	0,5	0,1
	1	0,05	3	1	1	0,05	1	0,2
	5	0,25	15	5	5	0,25	5	1
	10	0,5	30	10	10	0,5	10	2
	25	1,25	75	25	25	1,25	25	5
	100	5	300	100	100	5	100	20
	500	25	1.500	500	500	25	500	100
	750	37,5	2.250	750	750	37,5	750	150
	1.000	50	3.000	1.000	1.000	50	1.000	200

**Preglednica X:** Izračunane dejanske koncentracije bisfenolov v različnih koncentracijah zmesi V – nadaljevanje Preglednice IX.

Analit	Zmes V	BPAP	BPC	BPZ	HPP	BPP	TBBPA
Prilagoditveni faktor	1	0,5	3	1,5	2	1,5	5
Koncentracije [ng/L]	0,1	0,05	0,3	0,15	0,2	0,15	0,5
	0,5	0,25	1,5	0,75	1	0,75	2,5
	1	0,5	3	1,5	2	1,5	5
	5	2,5	15	7,5	10	7,5	25
	10	5	30	15	20	15	50
	25	12,5	75	37,5	50	37,5	125
	100	50	300	150	200	150	500
	500	250	1.500	750	1.000	750	2.500
	750	375	2.250	1.125	1.500	1.125	3.750
	1.000	500	3.000	1.500	2.000	1.500	5.000

### 3.2.4 Validacija metode

Validacijo nove analizne metode smo izvedli v skladu s smernicami FDA za validacijo bioanaliznih metod (48). Temeljni parametri pri razvoju vsake analizne metode so njena točnost, natančnost, selektivnost, občutljivost, ponovljivost in stabilnost.

Z validacijo smo ovrednotili naslednje parametre: linearnost, ponovljivost (dnevno, meddnevno in ponovljivost injiciranja), točnost, mejo določitve (*angl. limit of quantification* ali LOQ), selektivnost in izkoristek.

Validacijo smo izvajali na ekstrahiranih vzorcih standardov bisfenolov v 25 mM pufru  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s  $\text{pH} = 7$ . V ta namen smo pripravili zmes V s prilagojenimi koncentracijami bisfenolov (Preglednica VIII), pri računanju rezultatov pa smo upoštevali dejanske koncentracije bisfenolov v omenjeni zmesi (Preglednici IX in X).

#### Selektivnost

Selektivnost je zmožnost analitske metode, da razlikuje in količinsko opredeli analit v prisotnosti drugih sestavin vzorca. Metodo lahko opredelimo za selektivno, kadar so kromatografski vrhovi med posameznimi komponentami v vzorcu jasno ločeni in med njimi ne prihaja do interferenc.

Za vrednotenje selektivnosti metode smo analizirali prazne vzorce (vzorci 25 mM pufru  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s  $\text{pH} = 7$ ), vzorce zmesi V, pripravljene z enakim pufrom, in sicer s koncentracijo 100 ng/L ter topilo (ACN:MeOH = 1:1). Vzorce smo ekstrahirali z metodo SPE, jih posušili in rekonstituirali.

### Ponovljivost

Ponovljivost je del natančnosti analitske metode in določa njeno natančnost skozi daljši čas. Natančnost analitske metode nam pove, kako blizu so izmerjene vrednosti analita, ko zaporedno analiziramo več alikvotov istega vzorca. Za določitev natančnosti naj bi uporabili najmanj 5 meritev na posamezno koncentracijo analita. Priporočena je uporaba vsaj treh različnih koncentracij v razponu pričakovanih koncentracij v realnih vzorcih. Natančnost naj ne bi presegla 15 % relativnega standardnega odklona (RSD), razen pri LOQ, kjer naj ne bi presegla 20 % RSD.

Ponovljivost podajamo s standardnim odklonom (SD) in relativnim standardnim odklonom (RSD) (Enačbi 2 in 3) (49).

**Enačba 2:** Izračun standardnega odklona (SD).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$x_i$  – odziv (višina ali površina vrha)

$\bar{x}$  – povprečna vrednost odziva

n – število meritev

**Enačba 3:** Izračun relativnega standardnega odklona (RSD).

$$RSD = \left(\frac{SD}{\bar{x}}\right) \times 100\%$$

SD – standardni odklon

$\bar{x}$  – povprečna vrednost odziva

Določili smo dnevno ponovljivost, meddnevno ponovljivost in ponovljivost injiciranja pri treh različnih koncentracijah zmesi V, in sicer 10, 100 in 500 ng/L. Pri koncentraciji 10 ng/L smo prvi dan pripravili 6 vzorcev, drugi dan 3 vzorce in tretji dan 2 vzorca. Ponovljivost znotraj dneva smo podali na osnovi rezultatov drugega dneva. Za koncentracijo 100 ng/L smo vsak dan pripravili 3 vzorce, nato pa 4. dan še 6 vzorcev. Meritve slednjih smo uporabili za dnevno ponovljivost in ponovljivost injiciranja. Za koncentracijo 500 ng/L pa smo prvi dan pripravili 6 vzorcev, naslednja dva dneva pa po 3 vzorce. Za dnevno ponovljivost smo tokrat upoštevali rezultate prvega dne. Vzorce za dnevno in meddnevno ponovljivost smo injicirali dvakrat, za ponovljivost injiciranja pa smo en vzorec injicirali šestkrat.

### Standardna umeritvena krivulja in linearnost meritev

Umeritvena krivulja predstavlja razmerje med odzivom analiznega aparata in znano koncentracijo analita. Narediti jo moramo za vsak analit v vzorcu. Pri tem moramo izbrati koncentracijsko območje, ki ga pričakujemo v vzorcih, ki jih želimo z metodo analizirati. Izbrati moramo tudi najenostavnejši model, ki zadovoljivo opisuje razmerje med koncentracijo analita in odzivom aparata. Posamezne meritve lahko odstopajo za največ 15 % od nominalne koncentracije oziroma za 20 % v primeru koncentracije, ki velja za LOQ. Tem kriterijem morajo ustrezati vsaj 4 od 6 standardov, ki niso prazni vzorci, skupaj z LOQ in umeritvenim standardom z najvišjo koncentracijo.

Kadar je umeritvena krivulja premica, je odziv linearen. Če je torej metoda linearna, so odzivi premosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Linearnost preverjamo z regresijo najmanjših kvadratov (*Enačba 4*).

***Enačba 4:*** Enačba regresijske/umeritvene premice.

$$y = kx + n$$

y – odziv (višina ali površina vrha)

k – naklon premice

x – koncentracija analita

n – odsek na ordinatni osi, kjer premica preseka ordinatno os

Povezanost oz. korelacijo med odzivom in koncentracijo podajamo s Pearsonovim koeficientom (R) oz. determinacijskim koeficientom ( $R^2$ ). Pri popolni linearnosti je vrednost  $R^2$  enaka 1 (49).

Pri določanju linearnosti smo vrednotili raztopine zmesi V v koncentracijskem območju od 0,1 do 1.000 ng/L. Izračunali smo linearnost v nizkem koncentracijskem (koncentracija zmesi V do 100 ng/L) in v celotnem koncentracijskem območju za vsako analizirano spojino, in sicer tako, da smo določili regresijske premice in vrednosti  $R^2$ . Za ustrezno linearnost smo postavili mejo vrednosti  $R^2 \geq 0,99$ .

### Izkoristek ekstrakcije analitov

Izkoristek je primerjava odzivov, ki ju dobimo z meritvijo analita, ki je bil podvržen celotnemu postopku, od priprave vzorca do analize z izbrano analitsko metodo, in meritvijo pričakovane koncentracije standarda analita, ki jo injiciramo neposredno na kolono (*Enačba 5*). Izkoristek je torej odvisen od učinkovitosti ekstrakcije analizne



metode. Seveda ni potrebe, da je izkoristek analita 100 %, vendar pa mora biti konsistenten, natančen in ponovljiv. Izračunati oz. določiti ga moramo pri treh različnih koncentracijah (nizki, srednji in visoki).

*Enačba 5:* Izračun izkoristka

$$\text{izkoristek} = \frac{x_{vz.}}{x_{st.}} \times 100\%$$

$x_{vz.}$  – odziv ekstrahiranega vzorca

$x_{st.}$  – odziv standarda injiciranega neposredno na kolono

Izkoristek smo izračunali le za koncentracijo 100 ng/L zmesi V.

### Točnost

Točnost analitske metode pomeni ujemanje povprečja izmerjenih rezultatov pridobljenih z metodo, z deklariranimi vrednostmi oz. dejansko vrednostjo (koncentracijo) analita. Točnost določimo z analiziranjem vzorcev z znano koncentracijo analitov. Priporočena je uporaba vsaj 5 izmerjenih vrednosti na posamezno koncentracijo, in sicer pri vsaj treh različnih koncentracijah, ki so v razponu pričakovanih vrednosti. Povprečna vrednost meritev naj ne bi odstopala za več kot 15 % dejanske vrednosti, razen pri LOQ, kjer naj ne bi odstopala za več kot 20 %.

Točnost smo določili pri treh različnih koncentracijah zmesi V, in sicer pri 5, 100 in 750 ng/L. Iz povprečnih vrednosti 2 meritev smo za vsako od izbranih koncentracij bisfenolov izračunali njihove količine iz umeritvenih premic. Nato smo s pomočjo *Enačbe 6* izračunali točnost metode.

***Enačba 6:*** Izračun točnosti.

$$\text{točnost} = \frac{C_i}{C_d} \times 100\%$$

$C_i$  – izračunana koncentracija

$C_d$  – dejanska oz. deklarirana koncentracija

### Meja določitve (LOQ)

Meja določitve je najnižja točka oz. koncentracija na standardni umeritveni krivulji, ki jo še lahko izmerimo s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo. Priporočljivo je, da vrednost LOQ določimo z uporabo vsaj 5 vzorcev, pri čemer moramo izračunati tudi koeficiente

variacije. Glede na omenjene parametre, naj točnost pri meji določitve ne bi odstopala za več kot 20 %, RSD pa naj bi bil manjši od 20 %. Te omejitve smo dosledno upoštevali pri določanju vrednosti LOQ za obravnavane analite.

Ponovljivosti pri koncentracijskih vrednostih LOQ smo izračunali iz povprečja skupno 4 meritev, saj zaradi narave dela nismo imeli na voljo večjega števila vzorcev pri teh koncentracijah.

### **3.2.5 Analiza vzorcev**

Vzorci odvzetih vod (5 vzorcev površinskih vod in 1 vzorec vodovodne vode) smo s postopkom SPE ekstrahirali v treh ponovitvah (poglavje 3.2.1). Vsakič smo vzeli 100 mL vzorca in 100 mL pufra (25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7). Nato smo z metodo LC-MS/MS (poglavje 3.2.2) ugotavljali vsebnosti posameznih bisfenolov. Vsak vzorec smo injicirali dvakrat. Koncentracije bisfenolov v vzorcih smo izračunali s pomočjo umeritvenih premic (nizko koncentracijsko območje; Preglednica XX).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI ANALIZE

#### **Postopek pomivanja steklovine**

Zaradi uporabe izredno občutljive metode LC-MS/MS in onesnaženja okolja z bisfenoli in ostalimi substancami, ki so se uporabljale v laboratoriju, smo se poslužili posebnega postopka pomivanja steklovine. Steklovino smo najprej očistili z 1 M HCl, nato pa jo sprali z demineralizirano vodo. Sledilo je pranje z 1 M NaOH in ponovno spiranje z demineralizirano vodo. Na koncu pa smo steklovino sprali še z etanolom. Kasneje smo etanol zamenjali za metanol kakovosti HPLC. Tak postopek je bil zelo učinkovit, kar je bilo opazno pri rezultatih. Steklovino smo na tak način pomivali enkrat tedensko ali če smo opazili onečiščenje vzorcev. Za pomivanje ostale opreme, predvsem plastičnih delov vakumske kadičke, pa smo uporabili podoben postopek, le da smo kislino in bazo 10-krat razredčili.

#### **Injiciranje zmesi standardov**

Pri večkratnem injiciranju istega vzorca zmesi standardov smo opazili, da odzivi (površine kromatografskih vrhov) analitov tekom analize občasno naraščajo. Zato smo na vsakih nekaj vzorcev ponovno injicirali standard. Rezultate smo nato prilagodili glede na oklepajoče odzive standardov (*angl. bracketing*). Kasneje se je izkazalo, da se sistem šele pozneje stabilizira in se odzivi analitov ustalijo zaradi uporabe metanola in vode v mobilni fazi. Tako smo injiciranje standardne zmesi med posameznimi vzorci nadomestili le z injiciranjem na začetku in na koncu celotne analize. Na začetku smo zmes standardov injicirali tolikokrat, da so se odzivi ustalili. Z odzivi na koncu analize pa smo se prepričali o zanesljivosti rezultatov analize vzorcev.

### 4.2 RAZVOJ METODE SPE

Za pripravo vzorca smo izbrali metodo SPE. Ta se najpogosteje uporablja za ekstrakcijo bisfenolov (40, 41). Ker se bisfenoli v površinskih vodah pojavljajo v zelo nizkih koncentracijah (Preglednica II), smo potrebovali metodo, s katero lahko analite v vzorcih skoncentriramo. Z nanašanjem vzorca na kolono SPE pa se znebimo tudi nekaterih nečistot, ki so lahko prisotne v površinskih vodah. Komponente prisotne v matriksu lahko vplivajo na učinkovitost ionizacije masnega detektorja in povečajo šum, s čimer posredno

vplivajo na vrednost LOQ. Ko vzorec očistimo pa hkrati poskrbimo tudi za podaljšanje življenjske dobe kolone za HPLC (40). Izhajali smo torej iz metode SPE, ki je bila razvita na Katedri za Biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo, in sicer za vrednotenje prisotnosti večjega števila zdravilnih učinkovin v površinskih vodah. Za razvoj naše metode smo testirali različne kolone SPE, preverjali postopek prekondicioniranja, izbirali ustrezno vrednost pH pufru za nanos vzorca, določali najustreznejši volumen nanosa vzorca, izbirali najprimernejše elucijsko topilo in njegov volumen ter preverjali postopek sušenja in rekonstrukcije vzorcev.

### **Prekondicioniranje**

V nekaterih praznih vodnih vzorcih smo zaznali nekatere bisfenole, predvsem BPA in BPE. Ker smo kolone za SPE uporabljali večkrat, smo se želeli prepričati, da po eluciji ti ne zaostajajo v njih oz. da bisfenole s prekondicioniranjem z metanolom v celoti odstranimo. Zato smo preverili ali so po prekondicioniranju v zbiranem metanolnem eluatu prisotni analiti (poglavje 3.2.1.4).

Zbran eluat je vseboval nekaj BPA, BPE in BPAF, vendar pa so bile koncentracije teh še vedno veliko nižje kot v slepih vzorcih. Najverjetneje je bila težava s povišanimi koncentracijami teh analitov v praznih vzorcih v kontaminaciji samega okolja in opreme.

### **Nanos vzorca**

#### Kolona SPE

Na trgu je veliko različnih kolon SPE. Glede na njihove lastnosti trdne faze smo se odločili za testiranje kolon Strata<sup>TM</sup>-X (Strata-X), Strata<sup>TM</sup>C18-T (C18) in Oasis<sup>®</sup> HLB (HLB), ker se tovrstne stacionarne faze najpogosteje uporabljajo za pripravo vodnih vzorcev (6, 27, 28, 30, 46, 49).

Izračunali smo izkoristke elucije na posameznih kolonah in RSD. Rezultati so podani v Preglednici XI. Nekateri rezultati so precej odstopali. Posebej je bilo opazno odstopanje pri vzorcih, pri katerih se je po uporabi ultrazvoka nabral kondenz. Zaradi tega so bile ponekod vrednosti RSD precej višje. Postopek je trajal občutno dlje pri kolonah C18. Tudi sušenje vzorca z dušikom je bilo daljše pri tistih vzorcih, ki smo jih eluirali s teh kolon. Sušenje smo po začetnih 30 min podaljšali tudi za do 28 min. Najverjetneje se kolone pri vakumskem sušenju, po nanosu vzorca na kolono, niso povsem posušile. Po raztapljanju posušenih vzorcev s pomočjo ultrazvoka se je v njih pojavila oborina, kar smo pripisovali prisotnosti pufru v eluiranem vzorcu. Vzorce z oborino smo v tem primeru centrifugirali in

v vialo prenesli supernatant. Izkoristki so bili sicer najboljši pri kolonah HLB, a je bila ponovljivost nekoliko slabša. Kljub temu smo se odločili za uporabo kolon HLB, saj smo prednost dali izkoristku, zaradi predhodno omenjenih težav s kondenzom in posledično višjih vrednosti RSD.

**Preglednica XI:** Rezultati testiranja postopka SPE na različnih kolonah.

	Strata-X		HLB		C18	
	Izkoristek (%)	RSD (%)	Izkoristek (%)	RSD (%)	Izkoristek (%)	RSD (%)
BPS	74,3	13	80,6	9	72,2	20
BPF	38,8	12	44,5	16	41,3	20
BPE	38,2	13	44,0	17	41,8	16
BPA	44,4	10	48,4	16	45,9	14
DHBP	153,5	11	150,3	19	141,2	12
BPB	53,8	11	59,2	24	53,4	12
BPAF	92,7	5	98,8	22	91,7	17
BPAP	72,2	7	73,2	19	69,9	13
BPC	70,0	11	76,6	26	64,5	15
BPZ	61,8	10	66,4	26	58,2	12
HPP	93,4	26	113,5	43	51,3	13
BPP	78,8	16	84,0	25	58,1	8
TBBPA	102,7	8	111,9	13	53,3	32
<b>Povprečno</b>	75,0	12	80,9	21	64,8	16

#### Izbira pH pufra za nanos vzorcev

Želeli smo izbrati tudi optimalen pH pufra za nanos vzorcev, saj lahko le-ta pomembno vpliva na izkoristek ekstrakcije (poglavje 3.2.1.4).

Povprečni odzivi (površine kromatografskih vrhov) testiranja različnih vrednosti pH nanašalnega pufra in izračunane vrednosti RSD so predstavljeni v Preglednicah XII in XIII. Najboljša ponovljivost meritev in zadovoljivo visoki odzivi so bili pri vzorcih pripravljenih v pufri s pH 7. Nekateri vzorci so bili po eluciji motni. Motnost je lahko posledica uporabe pufra, če se s kolone povsem ne odstrani po sušenju z vakuumom pred elucijo, zato smo se odločili za spiranje kolone po nanosu vzorca še s 5 mL vode Milli-Q. S tem ukrepom smo uspešno odpravili motnost eluata.

Ker smo se odločili za pripravo vzorcev v pufri, smo v nadaljevanju pri uravnovešanju kolone SPE namesto 5 mL pufra in 5 mL vode nanesli le 10 mL izbranega pufra.

**Preglednica XII:** Odzivi (površine kromatografskih vrhov) in vrednosti RSD bisfenolov pri uporabi pufrov z različnimi vrednostmi pH.

		<b>BPS</b>	<b>BPF</b>	<b>BPE</b>	<b>BPA</b>	<b>DHBP</b>	<b>BPB</b>	<b>BPAF</b>
pH 3	Povpr. odziv	502950	8715	30593	24200	722348	30033	456885
	RSD (%)	12	12	9	9	9	8	9
pH 5	Povpr. odziv	561548	8915	32595	25176	611366	33215	455330
	RSD (%)	4	10	11	7	6	12	10
pH 7	Povpr. odziv	435915	10589	35542	25660	658887	32549	577873
	RSD (%)	7	8	10	11	8	9	12
H <sub>2</sub> O	Povpr. odziv	483590	11666	38310	28650	768675	31950	637780
	RSD (%)	11	9	7	11	10	9	17

**Preglednica XIII:** Odzivi (površine kromatografskih vrhov) in vrednosti RSD bisfenolov pri uporabi pufrov z različnimi vrednostmi pH – nadaljevanje.

		<b>BPAP</b>	<b>BPC</b>	<b>BPZ</b>	<b>HPP</b>	<b>BPP</b>	<b>TBBPA</b>	<b>povpr. RSD</b>
pH 3	Povpr. odziv	137402	13534	45832	22582	107488	11859	
	RSD (%)	9	8	9	16	15	18	<b>11</b>
pH 5	Povpr. odziv	144069	15959	52911	37919	141313	12193	
	RSD (%)	9	12	13	18	16	7	<b>10</b>
pH 7	Povpr. odziv	142569	14309	48011	28556	115037	9102	
	RSD (%)	7	10	9	11	9	9	<b>9</b>
H <sub>2</sub> O	Povpr. odziv	156617	15188	54683	27730	159780	12980	
	RSD (%)	11	12	16	32	18	16	<b>14</b>

#### Izbira volumna nanosa

Hoteli smo čim večji volumen nanosa vzorca, saj se obravnavani analiti v okolju nahajajo v zelo nizkih koncentracijah. Z večjim nanosom bi lahko namreč detektirali tudi manjše koncentracije v vzorcih površinskih voda. Testirali smo različne volumne vzorca med 50 in 500 mL (poglavje 3.2.1.4).

Izračunali smo izkoristke elucije in RSD za različne volumne nanašanja vzorca. Rezultati so podani v Preglednicah XIV in XV. Izkoristki so bili pri večjem volumnu nanosa nekoliko manjši. Prav tako pa je sam postopek trajal občutno dlje, velika časovna razlika pa je nastala tudi med nanosi posameznih vzorcev volumna 500 mL. Med najhitrejšim in najpočasnejšim nanosom vzorca je bilo tudi do 1 h razlike. Po drugi strani pa smo pri večjem volumnu nanosli večjo količino analitov na kolono SPE. Zaradi tega smo se odločili za kompromis in izbrali volumen nanosa vzorca 200 mL.

**Preglednica XIV:** Izkoristki in ponovljivost postopka (RSD) ekstrakcije bisfenolov pri različnih volumnih vzorca.

		<b>BPS</b>	<b>BPF</b>	<b>BPE</b>	<b>BPA</b>	<b>DHBP</b>	<b>BPB</b>	<b>BPAF</b>
50 mL	Izkoristek (%)	99,1	93,2	89,2	91,6	93,2	71,4	96,0
	RSD (%)	17	7	8	6	9	6	11
100 mL	Izkoristek (%)	108,7	108,0	101,8	97,0	100,2	75,6	82,1
	RSD (%)	5	7	8	7	4	7	5
200 mL	Izkoristek (%)	96,4	85,4	85,8	78,5	90,2	61,5	65,7
	RSD (%)	4	5	4	4	5	8	10
500 mL	Izkoristek (%)	88,0	80,6	79,0	64,6	87,0	53,2	47,9
	RSD (%)	5	7	4	2	7	4	5

**Preglednica XV:** Izkoristki in ponovljivost postopka (RSD) ekstrakcije bisfenolov pri različnih volumnih vzorca – nadaljevanje.

		<b>BPAP</b>	<b>BPC</b>	<b>BPZ</b>	<b>HPP</b>	<b>BPP</b>	<b>TBBPA</b>
50 mL	Izkoristek (%)	75,9	71,2	72,2	55,2	64,5	62,8
	RSD (%)	8	8	7	12	9	5
100 mL	Izkoristek (%)	87,1	76,5	82,0	62,9	52,6	60,1
	RSD (%)	8	8	6	7	9	13
200 mL	Izkoristek (%)	85,8	62,5	73,8	46,6	52,2	62,6
	RSD (%)	7	6	7	8	17	19
500 mL	Izkoristek (%)	66,6	50,8	59,1	34,2	30,0	40,6
	RSD (%)	5	4	6	4	15	7

## Elucija

### Izbira elucijskega topila

Izbira elucijskega topila je za metodo SPE eden izmed ključnih parametrov. Analiti naj bi se z elucijskim topilom v celoti eluirali iz kolon SPE. Ključen parameter je torej izkoristek elucije. Poleg izkoristka smo preverjali še ponovljivost postopka (RSD). Izračunali pa smo tudi povprečni izkoristek in RSD ter povprečni izkoristek brez BPA in BPC (Preglednici XVI in XVII). Pri slednjih dveh bisfenolih je bil izkoristek zaradi onečiščenja precej večji od 100 %, in to pri vseh načinih elucij.

Najboljše vrednosti RSD in primerljive izkoristke smo dobili pri eluciji z acetonitrilom v metanolu (3:1), zato smo to mešanico topil tudi izbrali kot optimalno.

**Preglednica XVI:** Izkoristki in ponovljivost postopka (RSD) ekstrakcije bisfenolov pri eluciji na koloni HLB z različnimi topili.

		<b>BPS</b>	<b>BPF</b>	<b>BPE</b>	<b>BPA</b>	<b>DHBP</b>	<b>BPB</b>	<b>BPAF</b>	<b>BPAP</b>
MeOH:ACN=1:1	Izkoristek (%)	78	69	82	312	77	79	80	68
	RSD (%)	13	10	31	4	2	17	14	10
ACN:iPrOH=1:1	Izkoristek (%)	85	95	85	279	78	89	97	75
	RSD (%)	10	13	35	24	6	14	14	8
ACN:MeOH=3:1	Izkoristek (%)	88	75	86	214	84	77	110	83
	RSD (%)	12	8	4	21	4	7	4	5
ACN:MeOH:iPrOH=2:1:1	Izkoristek (%)	93	71	81	198	79	67	105	75
	RSD (%)	11	10	11	12	7	10	8	6

**Preglednica XVII:** Izkoristki in ponovljivost postopka (RSD) ekstrakcije bisfenolov pri eluciji na koloni HLB z različnimi topili – nadaljevanje.

		<b>BPC</b>	<b>BPZ</b>	<b>HPP</b>	<b>BPP</b>	<b>TBBPA</b>	<b>Povpr. vseh</b>	<b>Povpr. brez BPA in BPC*</b>
MeOH:ACN= 1:1	Izk. (%)	141	74	91	68	76	100	77
	RSD (%)	10	9	15	9	6	12	12
ACN:iPrOH= 1:1	Izk. (%)	155	88	104	76	75	106	86
	RSD (%)	5	11	26	24	3	15	15
ACN:MeOH= 3:1	Izk. (%)	138	91	84	67	77	98	84
	RSD (%)	11	4	11	10	3	8	7
ACN:MeOH:iPrOH= 2:1:1	Izk. (%)	126	83	88	65	78	93	81
	RSD (%)	7	11	11	11	6	9	9

\*zaradi onečiščenja z obema analitoma

#### Izbira volumna elucijskega topila

Z večjim volumnom elucije lahko dobimo boljše izkoristke. Prav tako so lahko izkoristki boljši, če nanašamo manjše volumne večkrat, torej da namesto 1 mL nanese dvakrat po 0,5 mL, vmes pa počakamo da elucijsko topilo steče do konca kolone. Zato smo hoteli preveriti, če na bisfenole vpliva volumen nanosa ter kakšen volumen daje najboljše izkoristke. Rezultati so predstavljeni v Preglednici XVIII.

Vidimo, da je bil v povprečju izkoristek elucije, kjer smo nanašali 5 x 0,5 mL elucijskega topila, najvišji. Izkoristek pa je bil v primerjavi z nanosom 4 x 0,5 mL topila višji tudi pri nanosu 3 x 0,5 mL topila. Na osnovi rezultatov lahko sklepamo, da sam volumen elucijskega topila ni imel vpliva in da do razlik v izkoristku prihaja zaradi drugih nepredvidenih sprememb v sistemu. Izkoristki so se prav tako razlikovali za največ 7,1 % (če primerjamo 4 x 0,5 mL in 5 x 0,5 mL). Zaključili smo, da volumen topila nima velikega vpliva, zato smo ostali pri uporabi 4 x 0,5 mL elucijskega topila.



**Preglednica XVIII: Izkoristki pri različnih elucijskih volumnih.**

	4x0,5 mL	2x1 mL	3x0,5 mL	5x0,5 mL
BPS	71,0	75,9	65,2	75,6
BPF	68,6	75,7	68,3	73,8
BPE	59,4	67,2	74,8	62,4
BPA	63,3	69,8	85,8	70,4
DHBP	106,9	102,2	96,3	105,7
BPB	55,5	60,4	65,1	58,9
BPAF	90,2	113,8	122,7	96,6
BPAP	68,3	69,1	70,5	68,5
BPC	55,5	60,6	66,0	73,0
BPZ	60,2	66,0	60,3	66,4
HPP	47,4	51,7	48,5	78,4
BPP	55,4	59,9	63,0	64,7
TBBPA	81,9	73,7	64,5	82,2
Povprečni izkoristek	68,0	72,8	73,1	75,1

**Sušenje vzorcev**

Sušenje vzorcev z dušikom v avtomatskem sistemu TurboVap je trajalo več kot 30 min. Čas smo morali pri nekaterih vzorcih podaljšati tudi za dodatnih 15 min. Ponovljivost je bila zelo slaba pri vzorcih, ki so se sušili daljši čas, prav tako pa je bila koncentracija bisfenolov pri vzorcih s podaljšanim sušenjem nižja kot pri ostalih. Zaradi tega smo se odločili za preverjanje postopka sušenja.

Primerjali smo sušenje pri 40 °C in 50 °C (poglavje 3.2.1.4) ter izračunali količnik na osnovi povprečnih odzivov (površin kromatografskih vrhov) vzorcev po sušenju na obeh temperaturah (Preglednica XIX).

Vsi vzorci pripravljenih standardov so se posušili v 30 min, tako pri temperaturi 40 °C kot 50 °C. Pri nekaterih vzorcih pa je prišlo do nabiranja kondenza na parafilmu pri rekonstituciji vzorca v ultrazvočni kadički.

Ko smo sušili vzorce različnih koncentracij pri 40 °C, smo spremljali postopek sušenja, da smo lahko določili čas sušenja vzorcev. Pri tem smo ugotovili, da se večinoma vzorci posušijo že v roku 25 min. Ugotovili smo, da je vzrok za podaljšano sušenje vzorcev z dušikom v avtomatskem sistemu TurboVap slab vakuum pri sušenju kolon SPE po nanosu vzorca. Težavo z vakuumom smo uspeli odpraviti. Tako smo uspešno odstanili vodno fazo (pufer) iz kolon SPE pred elucijo vzorcev. S tem smo odpravili tudi podaljšano sušenje vzorcev. Ponovljivost vzorcev se je tako bistveno izboljšala.

Odločili smo se za nadaljnje sušenje vzorcev pri temperaturi 40 °C namesto pri 50 °C, saj so se vzorci že pri nižji temperaturi ustrezno posušili. S tem smo se izognili njihovem

nepotrebnemu obremenjevanju s povišano temperaturo, ki bi lahko vplivala na razpad bisfenolov.

**Preglednica XIX:** Rezultati sušenja standardov pri različnih temperaturah.

	40 °C		50 °C		Razmerje odzivov*
	Povprečni odziv*	RSD (%)	Povprečni odziv*	RSD (%)	40 °C / 50 °C
BPS	386.673	18	386.486	5	1,0
BPF	10.860	12	10.208	7	1,1
BPE	24.415	12	24.434	6	1,0
BPA	22.519	11	21.786	7	1,0
DHBP	302.138	11	271.334	4	1,1
BPB	27.160	11	25.583	8	1,1
BPAF	276.660	13	252.587	5	1,1
BPAP	98.761	11	95.359	5	1,0
BPC	11.046	9	10.522	7	1,0
BPZ	31.197	11	29.829	6	1,0
HPP	19.622	21	11.868	12	1,7
BPP	80.540	13	76.650	5	1,1
TBBPA	12.351	6	10.007	7	1,2

\*odziv = površina kromatografskega vrha

### Rekonstitucija

Pri vzorcih, kjer se je pojavljal kondenz, so bili rezultati občutno slabši. Predvsem je bilo vidno odstopanje pri RSD. Zato smo preverili ali je vpliv uporabe ultrazvoka na raztapljanje znaten (poglavje 3.2.1.4).

V Preglednicah XX in XXI so podani rezultati testiranja vpliva uporabe ultrazvoka na rekonstitucijo vzorca po sušenju.

**Preglednica XIII:** Odzivi (površine kromatografskih vrhov) bisfenolov pri rekonstituciji z vorteksiranjem in ultrazvokom

	BPS	BPF	BPE	BPA	DHBP	BPB	BPAF
Povpr. vorteks	624.214	12.351	38.473	27.124	515.132	23.723	497.042
Povpr. vorteks + UZ	634.240	12.334	37.799	26.669	530.725	23.697	507.435
Korist UZ (%)	1,61	-0,14	-1,75	-1,68	3,03	-0,11	2,09

**Preglednica XIV:** Odzivi (površine kromatografskih vrhov) bisfenolov pri rekonstituciji z vorteksiranjem in ultrazvokom - nadaljevanje

	BPAP	BPC	BPZ	HPP	BPP	TBBPA
Povpr. vorteks	112.471	9.653	30.044	10.215	73.297	12.038
Povpr. vorteks + UZ	114.554	9.965	30.905	11.100	74.957	12.052
Korist UZ (%)	1,85	3,23	2,87	8,66	2,27	0,12

Ugotovili smo, da se vzorec ustrezno raztopi tudi le z vorteksiranjem, saj uporaba ultrazvoka nima bistvenega vpliva na rezultat. Vzorce smo zato pri nadaljnih poskusih pri rekonstituciji le vorteksirali. S tem smo se izognili težavam z nabiranjem kondenza pri rekonstituciji vzorcev z uporabo ultrazvočne kadičke. Na ta način je bil tudi postopek SPE bolj ponovljiv.

### **Slepi in standardni vzorci**

Pri izvedbi metode SPE s slepimi vzorci (nanos pufra brez bisfenolov) smo opazili onečiščenje z bisfenoli. Pri BPE in BPP se je pojavljal dodatni kromatografski vrh tako pri standardnih vzorcih, kot pri slepih vzorcih. Kromatografski vrh se je pojavljal pri krajšem retencijskem času v primeru BPE in daljšem retencijskem času v primeru BPP. Vrh se je pri BPB razcepil na dva vrhova in/ali se je razširil. V slepih vzorcih sta bila prisotna BPA in DHBP.

Kontaminacij smo se skušali znebiti s temeljitim pomivanjem vse steklovine. Dodatno smo po nanosu vzorca in 5 mL vode vključili še nanos 5 mL 20% metanola.

## **4.3 RAZVOJ METODE LC-MS/MS**

Za analizo vzorcev smo izbrali metodo LC-MS/MS. Je med najpogosteje uporabljenimi metodami za analizo bisfenolov v okoljskih vzorcih. Drugi pogosto uporabljeni metodi sta GC-MS oz. GC-MS/MS, a je vzorce potrebno derivatizirati, čemur se pri uporabi LC-MS/MS izognemo. Za ionizacijo smo uporabili postopek ESI, saj daje boljšo občutljivost metode od ionizacijskih postopkov APCI ali APPI, ki se sicer prav tako uporabljata za analizo bisfenolov (40, 46). Za masni analizator smo uporabili trojni kvadrupol. Ta metoda je zelo občutljiva in selektivna, kar je pomembno za okoljske vzorce, saj je njihova sestava precej kompleksna, vsebnost analitov pa zelo nizka (50).

### **Vpliv zmesi bisfenolov**

V izbor smo vključili 13 bisfenolov. Zaradi večjega števila analitov, med katerimi imajo nekateri zelo podobne fizikalno-kemijske lastnosti, vseh bisfenolov nismo kromatografsko ločili. To pa pri detekciji LC-MS/MS niti ni potrebno. Zanimalo nas je ali imajo bisfenoli vpliv drug na drugega, predvsem ali prihaja do spremembe odziva pri tistih, ki se deloma kromatografsko prekrivajo. S tem namenom smo testirali ločene zmesi bisfenolov

(poglavje 3.2.2.2). Zmesi smo tudi sušili, saj bi lahko imela povečana temperatura prav tako vpliv na medsebojne interakcije. Pri ločenih zmesih smo razdelili bisfenole v dve skupini ter tako zagotovili, da ni prišlo do kromatografskega prekrivanja analitov v posameznem vzorcu. V Preglednicah XV in XVI so predstavljeni odzivi (površine kromatografskih vrhov) bisfenolov v ločenih zmesih (zmes A in zmes B) ter v zmesi vseh bisfenolov (zmes C).

**Preglednica XV:** Rezultati analize različnih zmesi bisfenolov

	<b>BPS</b>	<b>BPF</b>	<b>BPE</b>	<b>BPA</b>	<b>DHBP</b>	<b>BPB</b>	<b>BPAF</b>
Zmes A	608.956	10.393		25.269		26.642	
Zmes B			29.171		440.686		396.566
Zmes C	604.709	9.059	30.496	21.347	423.060	18.778	409.910
Zmes A/Zmes C	1,01	1,15		1,18		1,42	
Zmes B/Zmes C			0,96		1,04		0,97

**Preglednica XVI:** Rezultati analize različnih zmesi bisfenolov - nadaljevanje

	<b>BPAP</b>	<b>BPC</b>	<b>BPZ</b>	<b>HPP</b>	<b>BPP</b>	<b>TBBPA</b>
Zmes A	113.432		27.305		69.859	
Zmes B		7.688		8.705		9.903
Zmes C	89.392	7.527	22.753	8.101	53.305	9.248
Zmes A/Zmes C	1,27		1,20		1,31	
Zmes B/Zmes C		1,02		1,07		1,07

Iz Preglednic XV in XVI je razvidno, da ni bistvenega vpliva, če zmesi ločimo. Količnik je za vse bisfenole blizu 1. Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da kromatografskih pogojev ni potrebno dodatno prilagoditi za doseg kromatografske ločbe vseh deloma prekritih bisfenolov.

### **Sprememba gradienta**

Ker so se pri analizi nekaterih ekstrahiranih slepih in z bisfenoli obogatenih vzorcev, pojavljali dodatni vrhovi, se vrhovi razcepili ali pa se vrhovi razširili, smo se odločili za spremembo gradientnega programa mobilne faze v sistemu LC-MS/MS (točka 3.2.2.3). Pri testiranju različnih volumnov nanosa vzorca na kolone SPE smo ekstrahirane vzorce analizirali z obema metodama LC-MS/MS. V Preglednici XVII je navedena primerjava povprečnih izkoristkov in povprečnih vrednosti RSD za posamezne volumne nanosa. Povprečni izkoristek in RSD sta izračunana iz izkoristkov in RSD vseh bisfenolov. Na

začetku in koncu metode smo trikrat injicirali tudi standardno zmes bisfenolov ter izračunali ponovljivost.

**Preglednica XVII:** Rezultati analiz vzorcev, pripravljenih z nanosi njihovih različnih volumnov na kolono SPE, analiziranih z dvema gradientnima programoma metode LC-MS/MS

		50 mL	100 mL	200 mL	500 mL	Standard na začetku in koncu metode
Osnovna metoda	Povpr. izkoristek (%)	73,6	81,5	70,9	71,1	
	Povpr. RSD (%)	20	14	17	26	14
Modificirana metoda	Povpr. izkoristek (%)	80,6	85,8	73,9	60,8	
	Povpr. RSD (%)	9	7	8	6	7

Z uporabo modificirane metode je bila ponovljivost občutno boljša, kar je neposredno povezano z odsotnostjo koelucije. Izkoristki so v povprečju podobni vendar so bili pri osnovni metodi boljši izkoristki analitov z daljšim retencijskim časom in slabši analitov s krajšim retencijskim časom, pri modificirani metodi pa smo opazili ravno obratno. Pomembno je tudi, da se odziv standarda značilno ne spreminja tekom metode. Ker je v prid modificirani metodi tudi boljša ponovljivost odziva standarda, smo slednjo metodo obržali.

### **Volumen injiciranja**

Ker so obravnavani analiti v okoljskih vzorcih površinskih voda prisotni v zelo nizkih koncentracijah, smo stremeli k doseganju čim nižjih vrednosti LOQ. Eden od načinov je tudi povečanje volumna injiciranja. Zato smo volumen injiciranja povečali na 5  $\mu$ L, kar je še vedno zagotavljalo ozke in simetrične kromatografske vrhove.

## **4.3 VREDNOTENJE METODE**

Za vrednotenje smo uporabljali zmes bisfenolov V (poglavje 3.2.3) s prilagojeno koncentracijo posameznih bisfenolov glede na njihove odzive. Za analizo vodnih vzorcev ni splošnih smernic, po katerih se tovrstne metode validirajo, zato smo se zgledovali po smernicah FDA za validacijo bioanaliznih metod (48).

## Selektivnost

Rezultati selektivnosti so podani v preglednici XVIII. Pri topilu so odzivi (površine kromatografskih vrhov) za bisfenole pri MRM prehodih zelo nizki (šum). Odzivi praznih vzorcev so pri nekaterih analitih povišani, zaradi onesnaženja s temi bisfenoli. Prisotnost nekaterih bisfenolov v praznih vzorcih je vplivala na njihovo LOQ, ki se je temu primerno povišala (poglavje 4.4). Vzorci s koncentracijo 100 ng/L pa imajo občutno višje odzive. Vrhovi so bili dobro vidni in ločeni od šuma ter morebitnih drugih vrhov.

**Preglednica XVIII:** Povprečni odzivi (površine kromatografskih vrhov) topila, praznih vzorcev in vzorcev zmesi V, s koncentracijo 100 ng/L.

	Topilo	Prazni vzorci	Vzorci
BPS	12	181	117.448
BPF	113	33	99.246
BPE	73	85	126.657
BPA	174	3.242	84.477
DHBP	133	3.293	200.994
BPB	52	85	83.081
BPAF	767	1.112	257.152
BPAP	69	503	182.908
BPC	164	1.186	90.396
BPZ	27	56	111.298
HPP	45	171	134.124
BPP	29	1.104	128.566
TBBPA	54	60	122.677

## Ponovljivost

Vrednotili smo dnevno in meddnevno ponovljivost ter ponovljivost injiciranja pri koncentracijah zmesi V 10, 100 in 500 ng/L (Preglednica XIX).

Vrednost RSD pri dnevni ponovljivosti je bila za vse koncentracije manjša od 15 %. Pri meddnevni ponovljivosti je bila ponovljivost pri koncentraciji 10 ng/L za HPP in TBBPA slabša. Vrednost RSD je presegla 15 %, vendar pa je bila manjša od mejne vrednosti, ki je dovoljena pri nizkih koncentracijah – 20 %. Le pri koncentraciji BPA 10 ng/L je bil RSD večji od 20 %, kar pa je posledica že omenjenega onesnaženja z BPA. Pri koncentracijah 100 ng/L in 500 ng/L je bila meddnevna ponovljivost za vse bisfenole ustrezna (RSD < 15 %). Prav tako je bila ustrezna ponovljivost injiciranja, saj RSD ni presegel 4 %.

**Preglednica XIX:** Ponovljivost analizne metode izražena z RSD (%).

	Dnevna ponovljivost RSD (%)			Meddnevna ponovljivost RSD (%)			Ponovljivost injiciranja RSD (%)		
	10 ng/L	100 ng/L	500 ng/L	10 ng/L	100 ng/L	500 ng/L	10 ng/L	100 ng/L	500 ng/L
BPS	5,71	6,38	1,44	13,55	6,08	3,28	2,73	1,57	1,22
BPF	7,18	4,46	5,72	13,12	7,49	3,47	2,34	1,13	1,40
BPE	8,81	3,74	2,87	10,91	4,72	2,89	2,76	1,44	1,04
BPA	4,86	6,59	1,55	22,51	14,08	0,96	2,54	1,06	0,88
DHBP	13,94	1,73	4,91	3,59	4,64	4,38	2,88	0,74	1,07
BPB	2,74	4,88	2,37	5,65	3,51	2,50	1,47	1,91	0,75
BPAF	5,97	1,72	1,61	2,03	8,79	2,42	2,82	1,18	1,02
BPAP	8,58	3,57	2,14	9,58	12,90	5,66	1,68	1,39	0,77
BPC	6,35	4,70	4,34	10,42	12,56	3,27	1,59	1,89	0,45
BPZ	1,17	1,89	5,13	11,99	4,64	10,14	3,23	1,29	0,66
HPP	7,09	2,65	1,46	16,72	4,58	4,59	2,12	0,68	1,00
BPP	8,14	5,01	2,15	13,26	10,11	6,07	3,23	1,37	1,12
TBBPA	4,69	1,08	3,84	17,55	12,55	4,74	3,10	1,28	1,24

**Linearnost**

Zaradi širokega razpona koncentracijskega območja in detekcije LC-MS/MS smo določili regresijske premice za linearnost bisfenolov v nizkem koncentracijskem območju in v celotnem koncentracijskem območju. Parametri regresijske premice in determinacijski koeficienti v nizkem koncentracijskem območju so podani v Preglednici XX. Parametri regresijske premice in determinacijski koeficienti v celotnem koncentracijskem območju pa so podani v Preglednici XXI.

**Preglednica XX:** Linearnost analizne metode v nizkem koncentracijskem območju.

	Koncentracijsko območje [ng/L]	Naklon (k)	Presek (n)	R <sup>2</sup>
BPS	0,25 - 5,0	23.040	925	0,9991
BPF	0,30 - 15	746	42	0,9994
BPE	0,10 - 100	2.605	-813	0,9995
BPA	5,00 - 100	812	14.084	0,9971
DHBP	0,005 - 5,0	38.951	1.418	0,9991
BPB	0,50 - 10	1.516	-197	0,9996
BPAF	0,02 - 20	14.645	281	0,9997
BPAP	0,05 - 50	610	1.594	0,9983
BPC	1,50 - 75	619	3.458	0,9994
BPZ	0,15 - 150	1.248	83	0,9989
HPP	0,20 - 200	1.000	250	0,9990
BPP	0,15 - 150	1.077	3.641	0,9967
TBBPA	0,50 - 500	170	1.497	0,9944

R<sup>2</sup> je večji od 0,994 za vse analite, kar ustreza našim pogojem za linearnost.

**Preglednica XXI:** Linearnost analizne metode v celotnem koncentracijskem območju.

	<b>Koncentracijsko območje [ng/L]</b>	<b>Naklon (k)</b>	<b>Presek (n)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
BPS	0,25 - 50	19.340	4.493	0,9989
BPF	0,30 - 3000	745	2.026	0,9919
BPE	0,10 - 1000	2.636	3.970	0,9979
BPA	5,00 - 1000	882	15.060	0,9987
DHBP	0,005 - 50	26.181	11.373	0,9966
BPB	0,50 - 1000	1.799	1.422	0,9953
BPAF	0,02 - 200	17.538	-23.548	0,9972
BPAP	0,05 - 500	4.634	-29.509	0,9922
BPC	1,50 - 3000	396	13.825	0,9994
BPZ	0,15 - 1500	1.134	4.056	0,9997
HPP	0,20 - 2000	933	422	0,9983
BPP	0,15 - 1500	707	15.588	0,9963
TBBPA	0,50 - 5000	109	7.671	0,9972

R<sup>2</sup> je večji od 0,991 za vse analite, kar ustreza našim pogojem linearnosti.

### Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije smo izračunali pri koncentraciji 100 ng/L. Validacijo smo izvajali v dveh delih, ki sta se časovno razlikovala in smo zato morali pripraviti tudi vsakič novo zmes V za validacijo. Odzivi bisfenolov v obeh osnovnih zmesih pa so se kljub enaki pripravi med seboj nekoliko razlikovali, zato rezultati med seboj niso najbolj primerljivi. Izkoristek smo zato izračunali le pri vmesni koncentraciji. Rezultati izkoristkov so podani v Preglednicah XXII in XXIII.

**Preglednica XXII:** Izkoristki metode SPE.

	<b>BPS</b>	<b>BPF</b>	<b>BPE</b>	<b>BPA</b>	<b>DHBP</b>	<b>BPB</b>
100 ng/L	119.480	98.023	123.957	83.399	197.009	84.479
Standard	145.228	100.981	123.461	91.129	199.569	135.621
Izkoristek (%)	82,3	97,1	100,4	91,5	98,7	62,3

**Preglednica XXIII:** Izkoristki metode SPE – nadaljevanje

	<b>BPAF</b>	<b>BPAP</b>	<b>BPC</b>	<b>BPZ</b>	<b>HPP</b>	<b>BPP</b>	<b>TBBPA</b>
100 ng/L	252.933	178.953	89.002	108.060	130.870	127.270	119.900
Standard	307.272	232.948	122.577	153.810	223.803	228.304	190.398
Izkoristek (%)	82,3	76,8	72,6	70,3	58,5	55,7	63,0

Izkoristki ekstrakcije so bili pri koncentraciji 100 ng/L večji od 50 % za vse analite. Boljši izkoristki so bili pri analitih s krajšim retencijskim časom. Izkoristek je za BPF, BPE, BPA in DHBP večji od 90 %.



## Točnost

Točnost smo vrednotili pri treh koncentracijah in sicer 5, 100 in 750 ng/L. Namesto 10 ng/L in 500 ng/L smo izbrali koncentraciji 5 in 750 ng/L, saj s tem zajamemo širše območje koncentracij. Dodatno pa je velikokrat ravno pri koncentraciji 10 ng/L prišlo do odstopanja na umeritveni premici. Rezultati so podani v Preglednici XXIV.

**Preglednica XXIV:** Izračunana točnost (%) analizne metode za posamezne analite.

	5 ng/L	100 ng/L	750 ng/L
BPS	121,1	99,9	97,5
BPF	100,3	81,7	92,0
BPE	102,3	100,0	96,2
BPA	95,8	99,3	102,0
DHBP	102,7	100,4	94,7
BPB	98,2	95,4	96,4
BPAF	91,0	104,8	97,6
BPAP	93,7	100,0	99,4
BPC	108,4	83,9	96,2
BPZ	93,9	99,6	98,6
HPP	103,8	99,7	91,3
BPP	107,6	80,1	100,4
TBBPA	103,5	98,9	98,8

Pri večini analitov je pri vseh koncentracijah točnost ustrezala merilom smernic FDA in odstopanje točnosti ne presega 15 %. Odstopanje je bilo opazno pri koncentraciji 5 ng/L za analit BPA in pri koncentraciji 100 ng/L za BPF, BPC ter BPP, a je odstopanje < 20 %. Koncentracija 100 ng/L je lahko pri računanju točnosti zahtevna. Poraja se vprašanje ali naj računamo s pomočjo umeritvene premice v nizkem koncentracijskem območju ali celotnem koncentracijskem območju, saj je ta koncentracija ravno na meji nizkega koncentracijskega območja. V našem primeru smo uporabili linearnost za celotno koncentracijsko območje. Pri nekaterih analitih koncentracija 100 ng/L ni bila v nizkem koncentracijskem območju, zato je bila bolj smiselna uporaba regresijske premice za celotno koncentracijsko območje.

## Vrednosti LOQ

Za določitev vrednosti LOQ smo uporabili način z vrednotenjem točnosti in ponovljivosti. Meja določitve je pri tisti koncentraciji, kjer parametra ne presežeta RSD 20 % in točnost  $100 \pm 20$  %. Meje določitve so podane v Preglednici XXV.

**Preglednica XXV:** Meje določitve analizne metode (LOQ) za posamezne analite.

	<b>LOQ [ng/L]</b>	<b>Točnost</b>	<b>Ponovljivost RSD (%)</b>
BPS	0,3	121,1	14,6
BPF	1,5	103,3	7,7
BPE	1,0	109,4	3,7
BPA	5,0	95,8	6,4
DHBP	0,3	102,7	19,8
BPB	0,5	119,1	17,6
BPAF	0,2	109,2	5,3
BPAP	2,5	93,7	5,1
BPC	1,5	87,4	8,7
BPZ	0,8	93,8	10,7
HPP	1,0	112,5	18,9
BPP	7,5	107,6	2,3
TBBPA	25	103,5	19,2

Točnost in ponovljivost metode sta bili na meji določitve znotraj 20 %. Smernice FDA sicer pravijo, da naj bi LOQ določali na osnovi 5 vzorcev, mi pa smo zaradi narave dela vključili le 4 meritve.

Pri uporabljenem načinu določitve vrednosti LOQ po smernicah FDA za validacijo bioanaliznih metod, smo določili višje vrednosti, kot bi jih z določitvijo na osnovi razmerja signal/šum. Vendar pa so določene vrednosti LOQ za bisfenole pri uporabljenem pristopu bolj relevantne in zanesljive, saj na ta način zagotovimo ustrezno točnost in ponovljivost analizne metode tudi pri nizkih mejnih koncentracijah.

Vrednosti LOQ analizne metode smo primerjali z literaturnimi podatki. V eni izmed študij, kjer so testirali tudi površinske vode, so postavili naslednje vrednosti LOQ: BPS (0,12 ng/L), BPF (1,49 ng/L), BPA (0,72 ng/L), BPB (0,36 ng/L), BPAF (0,05 ng/L) in TBBPA (0,34 ng/L). Na kolone SPE so nanašali 300 mL vzorca (6). Kljub temu, da so v tej študiji uporabili za 50 % večji volumen vzorca, vrednotili 2-krat manj bisfenolov in za določitev LOQ uporabili razmerje signal/šum = 10:1, smo za večino bisfenolov dobili primerljive vrednosti LOQ. Odstopata le BPA, kar je posledica že prej omenjega onečiščenja ozadja, in TBBPA. Na enak način so določili LOQ v študiji, kjer so testirali vode na Japonskem, Kitajskem, Koreji in Indiji. Določene vrednosti so bile zaradi različnega matriksa postavljene za vsak vzorec posebej in so znašale od 0,1 – 58 ng/L za BPA, od 1,1 – 9,3 ng/L za BPS in od 5 – 25 ng/L za BPF. Nanašali so 10, 20 in 50 mL vsakega vzorca (27). Vrednosti LOQ naše analizne metode za BPS in BPF sta bili nižji od najmanj zahtevnega matriksa v tej študiji, vrednost LOQ za BPA pa je bila znotraj intervala. V obeh študijah so

uporabili metodo SPE za ekstrakcijo in LC-MS/MS za analizo vzorcev, a so analizirali bistveno manj bisfenolov.

#### 4.4 ANALIZA VZORCEV POVRŠINSKIH VOD IN PITNE VODE

Po validaciji smo analizno metodo preverili na zbranih okoljskih vzorcih. Analizirali smo 5 površinskih voda v Sloveniji in vodovodno vodo, ki smo jo odvzeli na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorci površinskih vod so bili odvzeti v različnih regijah Slovenije. Vzorci reke Drave, Save in Ljubljanice so bili odvzeti na urbanih območjih, medtem ko vzorca reke Selške Sore in potoka Obrha prihajata iz manj naseljenih območij. Vzorec reke Drave smo odvzeli v mestu Mariboru pri Studenški brvi, vzorec reke Save smo odvzeli v Črnučah pri Gameljski cesti, vzorec reke Ljubljanice pa v Ljubljani pri Gruberjevem nabrežju. Vzorec reke Selške Sore je bil odvzet v naselju Vešter, kjer je tudi kopalno območje reke. Vzorec potoka Obrha je bil odvzet na Loškem polju.

Koncentracije v vzorcih smo izračunali s pomočjo regresijskih premic v nizkem koncentracijskem območju, saj so se analiti v vzorcih nahajali v nizkih koncentracijah. Pred analizo vzorcev površinskih voda in pitne vode, smo ekstrahirali in analizirali še prazne vzorce. Rezultate praznih vzorcev smo upoštevali pri ovrednotenju rezultatov vzorcev površinskih in vodovodnih voda. Za analite, ki smo jih našli v praznih vzorcih, smo ustrezno prilagodili tudi LOQ. Rezultati najdenih bisfenolov so podani v Preglednici XXVI, in sicer kot povprečne koncentracije v vzorcih.

**Preglednica XXVI:** Povprečne koncentracije bisfenolov v odvzetih vzorcih vod [ng/L] (n=3).

	<b>BPS</b>	<b>BPF</b>	<b>BPA</b>	<b>BPB</b>	<b>BPC</b>
<b>Sava</b>	1,06				43,20
<b>Drava</b>	<LOQ	5,30	32,03		44,65
<b>Sora</b>	0,33		71,06		46,38
<b>Obrh</b>	<LOQ		30,54	1,54	
<b>Ljubljana</b>	2,70	28,52			<LOQ
<b>Vodovod FFA</b>					

V vseh analiziranih vzorcih smo zaznali BPA, vendar je bil prisoten tudi v praznih vzorcih, zato je bila zanesljiva kvantifikacija le v vzorcih vod Drave, Sore in Obrha.

Bisfenol S smo prav tako zaznali v vseh vzorcih površinskih voda, BPF pa le v vzorcih Drave in Ljubljanice. V vzorcu potoka Obrha je bil v manjši koncentraciji prisoten tudi

BPB. V literaturi je zelo malo podatkov glede vplivov BPC in njegove koncentracije v okolju. Mi smo ga zaznali v kar znatnih koncentracijah. Nahajal se je v vzorcih Save, Drave, Sore in Ljubljane. Ocenjena koncentracija BPC v vzorcu Ljubljane je bila 6,98 ng/L. Vrednost LOQ je bila sicer 1,5 ng/L, vendar smo jo zaradi kontaminacije predstavili na 15 ng/L. Zaradi tega je koncentracija BPC v vzorcih Ljubljane pod mejo določitve. Če koncentracije seštejemo, lahko približno ocenimo celokupno onesnaženost z bisfenoli. Zanimivo je, da je najbolj onesnažena Selška Sora (celokupno 117,77 ng/L) z zelo visokimi koncentracijami BPA in BPC. Sledita ji Drava (celokupno 81,98 ng/L) in Sava (celokupno 44,26 ng/L). Najmanj bisfenolov pa smo zaznali v vzorcih potoka Obrha (celokupno 32,08 ng/L) in Ljubljane (celokupno 31,22 ng/L). Rezultati meritev iz Ljubljane so precej nižji od pričakovanih, saj bi pričakovali večje onesnaženje z bisfenoli na bolj urbanem področju. Moramo pa vzeti v zakup, da je bilo v vzorcih Save in Ljubljane prisotnega nekaj BPA, ki ga nismo ovrednotili zaradi povišanih vrednosti v slepih vzorcih. V vodovodni vodi smo zaznali le BPA, ki je bil prisoten v približno enakih koncentracijah kot v slepih vzorcih.

Koncentracije BPS, BPF in BPA ustrezajo tistim, ki jih lahko najdemo v literaturi (Preglednica II). BPB in BPC pa v površinskih vodah v raziskavah, ki smo jih zajeli v Preglednici II, še niso zaznali. Glede na literaturne podatke bi lahko pričakovali tudi povišane koncentracije BPAF v vzorcih, ki pa ga mi nismo zaznali.

Zaradi nadomeščanja bisfenola A z njegovimi analogi lahko v okoljskih vzorcih določimo vedno več ostalih bisfenolov. Za večino bisfenolov je bilo izvedenih že več študij, s katerimi so potrdili njihovo hormonsko delovanje, tisti, za katere pa študij ni izvedenih, pa imajo podobne napovedi zaradi podobne strukture, zato je še toliko bolj smiselno spremljanje koncentracij bisfenolov v okolju in iskanje načinov čiščenja bisfenolov iz odpadnih voda.

## 5 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo razvili analizno metodo za sočasno analizo 13 bisfenolov v vodnih vzorcih. Vzorce smo pripravljali z metodo SPE, analizo tako pripravljenih vzorcev pa smo izvedli s postopkom LC-MS/MS. Pri delu smo optimizirali postopek SPE in zagotovili kakovost analiz tudi z dodatnim postopkom pomivanja steklovine in analizne opreme. Analizno metodo smo nato še validirali v skladu s smernicami FDA za validacijo bioanaliznih metod. Potrdili smo njeno selektivnost, dnevno in meddnevno ponovljivost, ponovljivost injiciranja, linearnost in točnost ter določili še izkoristek ekstrakcije in meje določitve LOQ za vse bisfenole. Slednje so primerljive z drugimi objavljenimi metodami, s katerimi pa so sočasno analizirali manjše število bisfenolov.

Bisfenole smo določali v petih vzorcih površinskih voda v Sloveniji (Sava, Drava, Ljubljana, Selška Sora in potok Obrh) in enem vzorcu vodovodne vode, ki smo ga odvzeli na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Bisfenol A (BPA) smo zaznali že v slepih vzorcih, čeprav smo uporabili vodo Milli-Q, kar je najverjetneje posledica onečiščenja samega okolju (voda, zrak, prah, uporabljene kolone SPE). Najverjetneje je bil zato BPA v podobni koncentraciji prisoten tudi v vzorcu testirane vodovodne vode. Znatno povišane koncentracije BPA pa so bile v vzorcih Drave (32,03 ng/L), Sore (71,06 ng/L) in Obrha (30,54 ng/L). Poleg BPA smo v vseh vzorcih površinskih vod zaznali tudi bisfenol S (BPS) (Sava: 1,06 ng/L; Sora: 0,33 ng/L; Ljubljana: 2,70 ng/L; Drava in Obrh: <LOQ). Ostale bisfenole pa smo našli le v nekaterih analiziranih vzorcih: Bisfenol C (BPC) (Sava: 43,20 ng/L; Drava: 44,65 ng/L; Sora: 46,38 ng/L; Ljubljana: <LOQ – ocenjeno na 6,98 ng/L), bisfenol F (BPF) (Drava: 5,30 ng/L; Ljubljana: 28,52 ng/L) in bisfenol B (BPB) (Obrh: 1,54 ng/L).

Zanimivo je, da v literaturi nismo zasledili podatkov o prisotnosti BPB in BPC v površinskih vodah, v okviru magistrske naloge pa smo BPC našli v zelo visokih koncentracijah (do 46,38 ng/L). Koncentracije ostalih bisfenolov pa ustrezajo tistim, ki jih lahko zasledimo v literaturi.

## 6 LITERATURA

1. Rahman Kabir E, Sharfin Rahman M, Rahman I: A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2015; 40: 241-258
2. Yang O, Lim Kim H, Weon J.I, Rok Seo Y: Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *Journal of Cancer Prevention* 2015; 20: 12-24
3. Feng Y, Jiao Z, Shi J, Li M, Guo Q, Shao B: Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere* 2016; 147: 9-19
4. Caballero-Casero N, Lunar L, Rubio S: Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Analytica Chimica Acta* 2016; 908: 22-53
5. Usman A, Ahmad M: From BPA to its analogues: Is it a safe journey?. *Chemosphere* 2016; 158: 131-142
6. Yang Y, Lu L, Zhang J, Yang Y, Wu Y, Shao B: Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2014; 1328: 26-34
7. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623>. Dostop: julij 2017
8. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73864>. Dostop: julij 2017
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/623849>. Dostop: julij 2017
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/66166>. Dostop: julij 2017

11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6620>. Dostop: julij 2017
12. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.001.128>. Dostop: julij 2017
13. <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C79970&Units=CAL>. Dostop: julij 2017
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/608116>. Dostop: julij 2017
15. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.155.981>. Dostop: julij 2017
16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12111>. Dostop: julij 2017
17. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/630355>. Dostop: julij 2017
18. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.125.643>. Dostop: julij 2017
19. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6626>. Dostop: julij 2017
20. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/232446>. Dostop: julij 2017
21. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8572>. Dostop: julij 2017
22. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11742>. Dostop: julij 2017
23. Rosenmai A.K, Dybdahl M, Pedersen M, van Vugt-Lussenburg B.M.A, Wedebye E.B, Taxvig C, Vinggaard A.M: Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives?. *Toxicological sciences* 2014; 139(1): 35-47
24. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6618>. Dostop: julij 2017

25. Song S, Song M, Zeng L, Wang T, Liu R, Ruan T: Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environmental Pollution* 2014; 186: 14-19
26. Yang Y, Guan J, Yin J, Shao B, Li H: Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Cemosphere* 2014; 112: 481-486
27. Yamazaki E, Yamashita N, Taniyasu S, Lam J, Lam P.K.S, Moon H.B, Jeong Y, Kanna P, Achyuthan H, Munuswamy N, Kannan K: Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2015; 122: 565-572
28. Jin H, Zhu L: Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohe River Basin and Taihu Lake, China. *Water Research* 2016; 103: 343-351
29. Lu L, Yang Y, Zhang J, Shao B: Determination of seven bisphenol analogues in reed and Callitrichaceae by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2014; 953-954: 80-85
30. Wang Q, Chen M, Shan G, Chen P, Cui S, Yi S, Zhu L: Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China. *Science of the Total Environment* 2017; 598: 814-820
31. Yu X, Xue J, Xiao H, Wu Q, Venkatesan A.K, Halden R.U, Kannan K: Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the U.S. EPA targeted national sewage sludge survey. *Journal of Hazardous Materials* 2015; 299: 733-739
32. Roelofs M.J.E, van den Berg M, Bovee T.F.H, Piersma A.H, van Duursen M.B.M: Structural bisphenol analogues differentially target steroidogenesis in murine MA-10 Leydig cells as well as the glucocorticoid receptor. *Toxicology* 2015; 329: 10-20



33. Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L: Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity?. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016; 47: 182-199
34. Zuo Y, Zhu Z: Simultaneous identification and quantification of 4-cumylphenol, 2,4-bis-(dimethylbenzyl)phenol and bisphenol A in prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Chemosphere* 2014; 107: 447-453
35. Erjavec B, Hudoklin P, Perc K, Tišler T, Sollner Dolenc M, Pintar A: Glass fiber-supported TiO<sub>2</sub> photocatalyst: Efficient mineralization and removal of toxicity/estrogenicity of bisphenol A and its analogs. *Applied Catalysis B: Environmental* 2016; 183: 149-158
36. Tišler T, Krel A, Gerželj U, Erjavec B, Sollner Dolenc M, Pintar A: Hazard identification and risk characterization of bisphenols A, F and AF to aquatic organisms. *Environmental Pollution* 2016; 212: 472-479
37. Yamaguchi A, Ishibashi H, Arizono K, Tominaga N: In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of bisphenol analogs in medaka (*Oryzias latipes*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2015; 120: 198-205
38. Bjömsdotter M.K, de Boer J, Ballesteros-Gómez A: Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere* 2017; 182: 691-706
39. Ruan T, Liang D, Song S, Song M, Wang H, Jiang G: Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere* 2015; 124: 150-155
40. Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D: Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216: 449-469

41. Płotka-Wasyłka J, Szczepańska N, de la Guardia M, Namieśnik J: Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *Trends in Analytical Chemistry* 2016; 77: 23-43
42. Bulletin 910 – Guide to Solid Phase Extraction. Sigma-Aldrich Co. 1998
43. [https://chem.libretexts.org/Core/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Liquid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography). Dostop: julij 2017
44. Robards K, Haddad P.R, Jackson P.E: Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods. Elsevier Ltd, 2004: 8-12, 228
45. Lough W.J, Wainer I.W: High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice. Chapman & Hall, 1996: 37
46. Salgueiro-González N, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, Prada-Rodríguez D: Trends in analytical methodologies for the determination of alkylphenols and bisphenol A in water samples. *Analytica Chimica Acta* 2017; 962: 1-14
47. Dekant W, Völkel W: Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 228: 114-134
48. Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2001
49. Peterec A: Primerjava vsebnosti bisfenola A v pitnih vodah iz vodomatov in različnih vodovodnih zajetij. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011
50. Zimmer D: Introduction to Quantitative Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Chromatographia Supplement* 2003; 57: 325-332