

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA LENARČIČ

MAGISTRSKO DELO

DOLOČANJE VSEBNOSTI ANALOGOVI BISFENOLA A V ODPADNIH VODAH

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA LENARČIČ

MAGISTRSKO DELO

DOLOČANJE VSEBNOSTI ANALOGOV BISFENOLA A V ODPADNIH VODAH

DETERMINATION OF CONCENTRATION OF BISPHENOL A ANALOGUES IN
WASTEWATERS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Institutu Jožefa Stefana pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Ester Heath. Priprave vzorcev in GC-MS meritve smo opravili na Institutu Jožefa Stefana na Odseku za Znanosti o okolju.

Mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, se iskreno zahvaljujem za vso pomoč, usmerjanje, spodbude in potrpežljivost, prav tako pa tudi somentorici prof. dr. Ester Heath, za vso potrpežljivost, spodbudo in praktične nasvete. Zahvala gre tudi dr. Marjeti Česen za neskočno potrpežljivost, predvsem takrat, ko nisem bila čisto prepričana v svoje delo, in za vse preglede magistrske naloge med pisanjem, resnično hvala. Upam, da nisem bila preveč tečna! Hvala tudi Tjaši, Anji in Jasni, saj sploh ne vem, če boste videle to, ampak ste mi polepšale marsikateri dan na Institutu! Also, Marianthi, I also doubt you'll ever see that, but thanks for everything and I miss you! Also so much thanks to dr. David John Heath for helping with english abstract revision!

Največja zahvala gre mojim staršem, brez katerih zagotovo ne bi prišla tako daleč. Hvala za vso finančno podporo, za vse pogovore, ko sem bila čisto na dnu in nisem bila prepričana, ali sem izbrala pravi študij, za vse nasvete (čeprav jih večinoma nisem poslušala), vse spodbudne besede, hvala, ker sta vedno verjela vame in ker me vedno podpirata.

Seveda velika zahvala gre tudi preostali družini, za vso spodbudo in za nenehno opominjanje, da naj že končno dokončam magistrsko delo, sicer iz tega res ne bi bilo nič, pa da vseeno niste preveč spraševali, kdaj bo kaj.

Res neizmerna hvala vsem mojim prijateljem; hvala vam za vse pogovore, tudi, ko nisem vedela, kako in kaj, za vso spodbudo in potrpežljivost, hvala, ker ste vedno, ampak res vedno, verjeli vame in mi stali ob strani; hvala vam, ker ste takšni, kot ste, izjemni.

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm., in somentorstvom prof. dr. Ester Heath.

Ljubljana, 2018

Kaja Lenarčič

POVZETEK

Bisfenol A (BPA) in njegovi analogi spadajo v skupino spojin, ki jih imenujemo motilci endokrinega sistema. To pomeni, da jih hormonski receptorji prepoznajo kot endogene ligande, kar lahko povzroči škodo, saj je endokrini sistem med drugim odgovoren za uravnavanje metabolizma, telesne mase, krvnega tlaka, imunskega odziva in spolnih funkcij.

BPA je bil prvič sintetiziran leta 1891, njegova industrijska uporaba pa se je pričela po letu 1950 kot monomer polikarbonatne plastike, ki se danes v veliki količini uporablja kot ovojna, pa tudi za izdelavo epoksidnih premazov konzerv in pločevink za živila. Ker se je izkazalo, da je BPA motilec endokrinega sistema, so se na tržišču pojavili kot njegova zamenjava številni analogi (npr. bisfenol F (BPF) in bisfenol S (BPS)), vendar njihov učinek na endokrini sistem še ni jasno opredeljen. Pregled literature je pokazal prisotnost BPA, BPAF, BPE, BPF in BPS v odpadnih vodah. BPZ in BPC sta v literaturnem pregledu zelo slabo zastopana, še posebej BPC, ki je le redko vključen v raziskave, pa naj bodo to raziskave njegovih učinkov ali pa preverjanje njegovih koncentracij v okolju.

V okviru magistrske naloge smo se osredotočili na določitev prisotnosti izbranih analogov BPA, BPAF, BPAP, BPB, BPC, BPE, BPF, BPS in BPZ v slovenskih odpadnih vodah. V ta namen smo analizirali vtoke in iztoke petih slovenskih čistilnih naprav (Ljubljana, Domžale – Kamnik, Golnik, Novo mesto in Šaleška dolina). V primeru centralnih čistilnih naprav Ljubljana in Domžale – Kamnik smo analizirali še 23 dotokov iz različnih industrijskih obratov, v primeru CČN Domžale – Kamnik pa smo analizirali še vzorce dotokov z dovozi odpadne vode s cisternami iz industrijskih obratov brez lastnih čistilnih naprav.

Za pripravo vzorca smo uporabili ekstrakcijo na trdnih nosilcih, nakar smo vzorce še spirali, koncentrirali in derivatizirali. Ekstrakcijo in derivatizacijo smo pred analizo realnih vzorcev optimizirali. Za separacijo smo uporabili plinsko kromatografijo, kot detekcijo pa masno spektrometrični detektor (GC-MSD). Metodo smo validirali po FDA smernicah in z njo pomerili koncentracije analogov BPA v 47 vzorcih odpadnih vod.

Rezultati naše preiskave so pokazali vsebnost vseh izbranih analogov v vzorcih odpadne vode. Najvišjo vsebnost med analiziranimi alternativami BPA je imel BPC s 388 ng/L, v

vtokih z dovozi pa BPZ s 403 ng/L. V iztokih so bile vsebnosti analogov BPA v večini vzorcev pod mejo detekcije (LOD), v najvišji koncentraciji je bil določen BPZ s 85,7 ng/L. Vzorci iz čistilnih naprav iz Novega mesta, Šaleške doline in Golnika vsebujejo veliko nižje koncentracije bisfenolov kot pa vzorci iz čistilnih naprav Ljubljana in Domžale – Kamnik, v najvišji koncentraciji je bil določen BPF (6,15 ng/L) v vzorcu enega vtoka. V vzorcih iztokov teh treh čistilnih naprav so bile nad LOD samo koncentracije BPB, BPE in BPAP. Izračunali smo tudi odstotke odstranitve spojin za vse čistilne naprave. Za večino čistilnih naprav je bil odstotek odstranitve spojin zelo visok, tj. nad 90 %.

Vzorčili smo tudi iztoke iz industrijskih obratov na CCN Ljubljana in CCN Domžale – Kamnik. V najvišji koncentracijah smo določili BPC (2558 ng/L) v vzorcu iztoka tovarne mesnin, BPF (958 ng/L) v vzorcu iztoka kemične čistilnice oblačil in BPZ (403 ng/L) v vzorcu iztoka zbirnega centra odpadkov.

Ključne besede: bisfenoli, odpadna voda, plinska kromatografija, masna spektrometrija

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) and its' analogues are part of a group of compounds, called Endocrine Disrupting Compounds (EDCs). This means, that hormone receptors mistakenly recognize them as endogenous ligands. This can create lots of problems, because endocrine system among other things regulates metabolism, weight, blood pressure, immune response and sexual functions.

BPA has been synthesized for the first time in 1891, its industrial application began in 1950. His most known use is as monomer unit in the production of polycarbonate plastic, which is used as plastic packaging. It is also used in the production of the epoxy resin coating on the inside of food cans. Because BPA is an endocrine system disruptor, several new substitutes have emerged, (for example bisphenol F (BPF) and bisphenol S (BPS)), but their effect on the endocrine system is not yet clearly understood. Literature research has shown presence of BPA, BPAF, BPE, BPF and BPS in in wastewaters. It also reveals that BPZ and BPC are poorly researched, especially BPC that is rarely included in studies regarding both its presence in the environment and of its effects on endocrine system.

In frame of our masters thesis we have focused on determining the presence of selected analogues of BPA (BPAF, BPAP, BPB, BPC, BPE, BPF, BPS and BPZ) in Slovenian wastewaters. To this end we analysed influents and effluents of 5 slovenian wastewater treatment plants (WWTP: Ljubljana, Domžale – Kamnik, Golnik, Novo mesto and Šaleška dolina). In case of central wastewater treatment plants (CWWTP: Ljubljana and Domžale – Kamnik we also analysed 23 inflows from various industrial plants and in case of CWWTP Domžale – Kamnik also samples of influents that include wastewater that is driven to CWWTP with cisterns from industrial plants without their own WWTP.

As sample preparation we applied solid phase extraction (SPE), followed by concentration and derivatization. We optimized them both before analysing real samples. For separation we used gas chromatography and we used mass spectrometry for detection (GC-MSD). We validated the method with FDA standards and then measured concentrations of BPA analogues in 47 samples of wastewaters.

In our analysis we detected all BPA analogues. Highest concentration of BPA alternatives in influents was concentration of BPC with 388 ng/L, while for influents with inflows from local industrial plants highest concentration was that of BPZ with 403 ng/L. In effluents

most concentrations of BPA analogues were below LOD, except in one sample, where concentration of BPZ was 85,7 ng/L. Samples from WWTPs Novo mesto, Šaleška Dolina and Golnik show much lower concentrations of bisphenols than in the samples from CWWTPs Ljubljana and Domžale – Kamnik. Highest concentration of all bisphenols in those three WWTPs was detected for BPF (6,15 ng/L) in one influent. In effluents for those three WWTPs only BPB, BPE and BPAP were present in concentrations above the LOD. We also calculated % of removal for all WWTPs. For the majority of WWTPs, the percentage of removal was high (> 90 %).

We also sampled inflows from various industrial plants at the WWTPs Ljubljana and Domžale – Kamnik. In surprisingly high concentrations we detected BPC (2558 ng/L) in effluent sample from a meat processing factory, BPF (958 ng/L) in effluent sample from dry-cleaning facility and BPZ (403 ng/L) in effluent sample from a recycling facility.

Keywords: bisphenols, wastewater, gas chromatography, mass spectrometry

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|----------------------|--|
| AO _{t1/2} | razpadni čas spojine, podvržene atmosferski oksidaciji |
| BPA | bisfenol A |
| BPAF | bisfenol AF |
| BPAP | bisfenol AP |
| BPB | bisfenol B |
| BPC | bisfenol C |
| BPE | bisfenol E |
| BPF | bisfenol F |
| BPS | bisfenol S |
| BPZ | bisfenol Z |
| BAF | biološko akumulacijski faktor |
| BCF | biološko koncentracijski faktor |
| BLYES | bioluminescenčni test na kvasovkah |
| ČČN | centralna čistilna naprava |
| ČČN DK | Centralna čistilna naprava Domžale – Kamnik |
| ČČN LJ | Centralna čistilna naprava Ljubljana |
| CWWTP | central wastewater treatment plant |
| ČN | čistilna naprava |
| ČN G | Čistilna naprava Golnik |
| ČN NM | Čistilna naprava Novo mesto |
| ČN ŠD | Čistilna naprava Šaleška dolina |
| dBPA-d ¹⁶ | devterirani bisfenol A |
| DCM | diklorometan |
| EtAc | etilacetat |
| EI | elektronska ionizacija |
| ER | estrogenski receptor |
| ER α | estrogenski receptor alfa |
| ER β | estrogenski receptor beta |
| ERR gama | estrogenski receptor gama |
| GC | plinska kromatografija |
| GC-MS | plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo |
| GSH | glutation |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| LC | tekočinska kromatografija |
| LC-MS | tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometričnim detektorjem |
| LOD | limita detekcije |
| LOQ | limita kvantifikacije |
| LOEC | najnižja koncentracija, pri kateri je opažen merljiv učinek |
| logK _{oc} | logaritem porazdelitvenega koeficienta med vodo in organskim ogljikom v zemlji |
| logK _{ow} | logaritem porazdelitvenega koeficienta med oktanolom in vodo |
| MeOH | metanol |
| MS | masna spektrometrija |
| MTBSTFA | N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamid |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |

| | |
|-----------------|---|
| pKa | disociacijska konstanta kisline |
| RSD | relativna standardna deviacija |
| S-PEKES | sulfoniran poli(eter keton eter sulfon) |
| SERM | selektivni modulator estrogenskih receptorjev |
| SIM | metoda spremljanja posameznega iona |
| SPE | ekstrakcija na trdnih nosilcih |
| <i>t</i> -BDMCS | terc-butildimetilklorosilan |
| T _r | retencijski čas spojine |

VSEBINSKO KAZALO

| | |
|---|------|
| ABSTRACT..... | vi |
| SEZNAM OKRAJŠAV..... | viii |
| VSEBINSKO KAZALO..... | x |
| KAZALO SLIK..... | xi |
| KAZALO PREGLEDNIC..... | xii |
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Endokrini sistem in motilci endokrinega sistema..... | 1 |
| 1.2. BPA in nadomestki bisfenola A..... | 3 |
| 1.3. Sledovi analogov bisfenola A v okolju..... | 13 |
| 1.4. Določanje vsebnosti analogov bisfenola A v odpadnih vodah..... | 14 |
| 2. NAMEN DELA..... | 16 |
| 3. MATERIALI IN METODE..... | 17 |
| 3.1. Materiali..... | 17 |
| 3.1.1. Standardi merjenih spojin, topila in ostale kemikalije..... | 17 |
| 3.1.2. Pribor in aparature..... | 18 |
| 3.2. Metode dela..... | 19 |
| 3.2.1. Priprava raztopin standardov merjenih spojin..... | 19 |
| 3.2.2. Postopek priprave vzorcev za GC-MS..... | 20 |
| 3.2.3. Vzorčenje realnih vzorcev..... | 24 |
| 3.2.4. Validacija analizne metode za določanje vsebnosti analogov bisfenola A v odpadni vodi..... | 28 |
| 4. REZULTATI IN RAZPRAVA..... | 31 |
| 4.1. Optimizacija postopka za analizo vzorcev z GC-MS..... | 31 |
| 4.1.1. Optimizacija SPE..... | 31 |
| 4.1.2. Optimizacija derivatizacije..... | 31 |
| 4.2. Validacija analizne metode..... | 33 |
| 4.3. Določanje vsebnosti analogov BPA v realnih vzorcih odpadnih vod..... | 36 |
| 4.3.1. Odpadne vode, ki izvirajo iz mesne, živilske, farmacevtske in splošne industrije ter zdravstvenih domov..... | 36 |
| 4.3.2. Vtoki in iztoki CČN..... | 40 |
| 5. SKLEP..... | 48 |
| VIRI..... | 50 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Endokrine žleze v človeškem telesu – prirejeno po (2) | 1 |
| Slika 2: Endogeni estrogeni – prirejeno po (3) in (4) | 2 |
| Slika 3: Shema injektorja v plinskem kromatografu - prirejeno po (76) | 15 |
| Slika 4: Shema GC-MS – prirejeno po (77)..... | 15 |
| Slika 5: Strukturna formula dBPA-d16. | 17 |
| Slika 6: Kadička za ekstrakcijo na trdnih nosilcih (SPE) | 19 |
| Slika 7: Shema postopka SPE in GC-MS. | 21 |
| Slika 8: Prikaz reakcije derivatizacije preiskovanih spojin na primeru BPA..... | 22 |
| Slika 9: Zemljevid lokacij čistilnih naprav – prirejeno po (78) | 25 |
| Slika 10: Shema pritokov industrij na CČN Ljubljana in CČN Domžale – Kamnik..... | 26 |
| Slika 11: MTBSTFA in <i>t</i> -BDMCS..... | 32 |
| Slika 12: Odstranjevanje posameznih spojin med postopkom čiščenja na CČN DK..... | 46 |

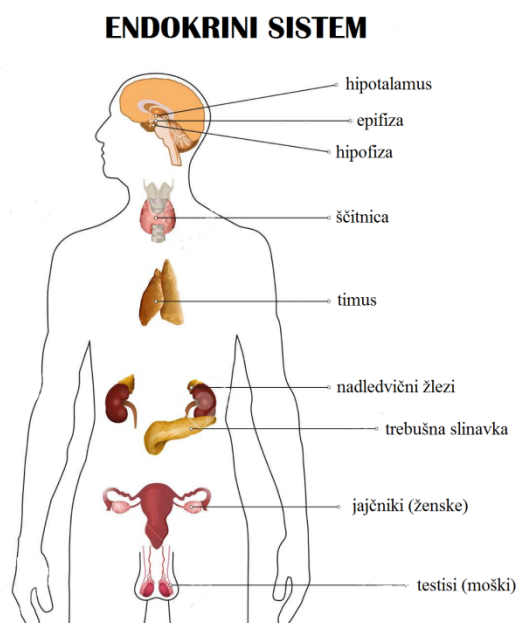
KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| Preglednica I: Učinki BPA kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem ter razgradnja | 4 |
| Preglednica II: Učinki BPAF kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem ter razgradnja | 7 |
| Preglednica III: Učinki BPB kot motilca endokrinega sistema in njegov metabolizem..... | 8 |
| Preglednica IV: Učinki BPE kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem in razgradnja | 9 |
| Preglednica V: Učinki BPF kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem ter razgradnja | 10 |
| Preglednica VI: Učinki BPS kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem ter razgradnja..... | 11 |
| Preglednica VII: Koncentracije analogov BPA v okoljskih in človeških vzorcih (velikostni razredi so podani glede na pričakovane izmerjene koncentracije)..... | 13 |
| Preglednica VIII: Imena spojin, proizvajalci, čistost in CAS kode spojin | 17 |
| Preglednica IX: Seznam steklovine in pribora..... | 18 |
| Preglednica X: Zatehte posameznih bisfenolov za pripravo standarda in pripadajoče koncentracije v bučkah. | 19 |
| Preglednica XI: Pogoji GC-MS analize | 23 |
| Preglednica XII: Temperaturni program GC-MS analize | 23 |
| Preglednica XIII: Karakteristični ioni za derivatizirane spojine in retencijski časi (ion za kvantifikacijo je v odebeljenem poševnem tisku) | 24 |
| Preglednica XIV: Značilnosti ČN | 25 |
| Preglednica XV: Oznake in opisi vzorcev pritokov industrijskih obratov (trenutni vzorci)..... | 27 |
| Preglednica XVI: oznake in opisi vzorcev za dotoke, iztoke in dotoke s privozi vseh petih čistilnih naprav (24-urni povprečni vzorci, razen LJ_Inf1 in LJ_Eff1) | 28 |
| Preglednica XVII: Odpipetirani volumni in koncentracije, uporabljene za kalibracijsko krivuljo..... | 29 |
| Preglednica XVIII: Ponovljivost metode | 33 |
| Preglednica XIX: Ponovljivost instrumenta | 33 |
| Preglednica XX: Točnost v % pri šestih različnih koncentracijah | 34 |
| Preglednica XXI: Koeficient premice, R^2 in n-vrednost za dve paraleli kalibracijske krivulje..... | 34 |
| Preglednica XXII: Izkoristek v %, SD in RSD..... | 35 |
| Preglednica XXIII: Določena LOD in LOQ za preiskovane spojine | 36 |
| Preglednica XXIV: Vsebnost preiskovanih spojin (ng/L) v dotokih industrije na CČN LJ | 37 |
| Preglednica XXV: Vsebnost preiskovanih spojin (ng/L) v dotokih industrije in zdravstvenih domov na CČN DK | 37 |
| Preglednica XXVI: Celokupne koncentracije (ng/L) preiskovanih spojin v pritokih na CČN LJ in CČN DK..... | 39 |
| Preglednica XXVII: CČN Ljubljana, trenutni vtok in iztok, 24-urni kompozitni vtok in iztok, % odstranitve spojine (koncentracije so v ng/L)..... | 40 |
| Preglednica XXVIII: Koncentracije spojin v vtokih, vtoki z dovozi in iztoki CČN DK (koncentracije so v ng/L) | 42 |
| Preglednica XXIX: Povprečne koncentracije spojin v vzorcih, odvzetih na različne dni v vtokih, vtokih s pritoki in iztokih, ter ustrezni RSD-ji (koncentracije so v ng/L, RSD v %)..... | 45 |
| Preglednica XXX: Koncentracije spojin v vzorcih (koncentracije v ng/L), pridobljenih v vtokih in iztokih CČN NM, CČN ŠD in ČN G..... | 47 |
| Preglednica XXXI: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPA | 60 |
| Preglednica XXXII: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPAF | 60 |
| Preglednica XXXIII: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPAP | 61 |
| Preglednica XXXIV: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPB | 61 |
| Preglednica XXXV: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPC..... | 62 |
| Preglednica XXXVI: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPE | 62 |
| Preglednica XXXVII: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPF | 63 |
| Preglednica XXXVIII: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPS | 63 |
| Preglednica XXXIX: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPZ | 64 |

1. UVOD

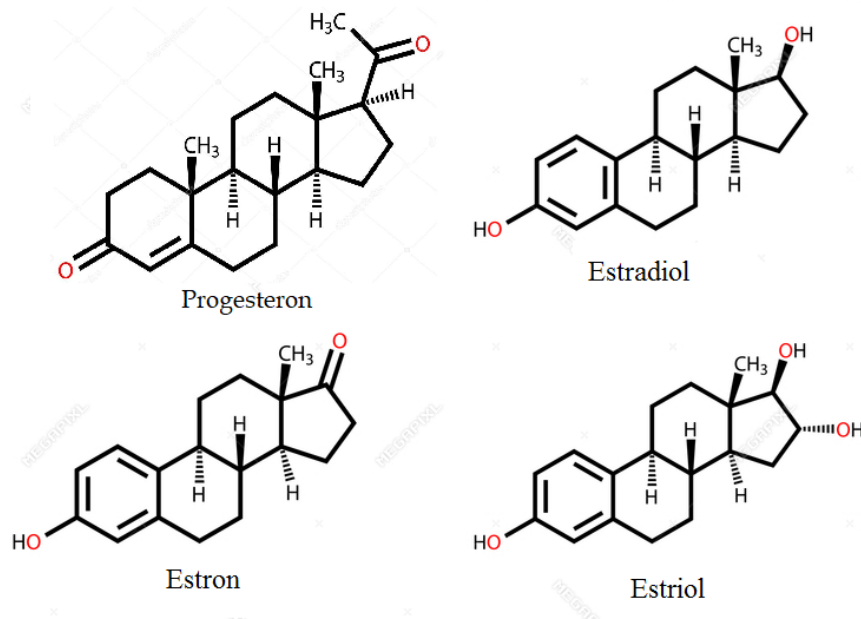
1.1. Endokrini sistem in motilci endokrinega sistema

V človeškem telesu sta dva pomembna komunikacijska sistema, to sta živčni sistem in endokrini sistem. Endokrini sistem preko izločanja hormonov iz endokrinih žlez vpliva na mnogo procesov v telesu, med drugim na prebavo, uravnavanje krvnega tlaka, odziv imunskega sistema, hitrost metabolizma in razmnoževanje (1). Glavne endokrine žleze v telesu so hipofiza, epifiza, hipotalamus, timus, nadledvični žlezi, ščitnica, trebušna slinavka, jajčniki pri ženskah in testisi pri moških (Slika 1) (2).



Slika 1: Endokrine žleze v človeškem telesu – prirejeno po (2)

Med endokrine hormone spadajo različne vrste hormonov, med drugim steroidni hormoni in tiroidni hormoni. Njihova vezava na ustrezni (komplementarni) receptor sproži signalizacijo v hormonsko odzivnih celicah. Dve veliki skupini steroidnih endokrinih hormonov sta estrogenska in androgenska. Estrogeni se pri ženskah izločajo iz jajčnikov, pri moških pa iz testisov. Čeprav poznamo vsaj 6 različnih estrogenov, so v ženskem telesu samo štirje prisotni v omembe vredni koncentraciji, to so β -estradiol, estron, estriol in progesteron. (Slika 2) (3, 4). Uravnavajo rast in razvoj ženskih spolnih organov, sekundarnih spolnih znakov ter rast maternice v nosečnosti. Najbolj pomemben androgen je testosteron, ki je pri moških odgovoren za razvoj sekundarnih spolnih znakov (1).



Slika 2: Endogeni estrogeni – prirejeno po (3) in (4)

V skupino motilcev endokrinega sistema (po angleško endocrine disrupting chemicals – EDCs) uvrščamo spojine, ki so strukturno dovolj podobne endokrinim hormonom, da jih ustrezni receptorji napačno prepoznajo kot hormon, lahko pa tudi motijo sintezo, transport in metabolizem endokrinih hormonov. Steroidni skelet je sestavljen iz treh šestčlenskih in enega petčlenskega obroča (Slika 2) (3, 4), pomemben strukturni element, skupen z mnogimi endokrinimi motilci, pa je fenolni obroč. Endokrini motilci lahko na receptor delujejo kot agonist (na receptor delujejo kot sam hormon in s tem povzročijo pričakovan odziv), antagonist (vežejo se na receptor, s tem blokirajo vezavno mesto in hormonu preprečijo vezavo) ali delni agonist (vežejo se na receptor, vendar ne povzročijo učinka v isti meri, kot bi ga hormon, ki ga posnemajo) (1). To pa ni njihov edini mehanizem delovanja, saj med drugim vplivajo tudi na metabolizem maščob in preko tega povzročajo debelost, specifični molekularni mehanizem, preko katerega povzročajo rakave bolezni, pa še ni znan (5).

Raziskave vpliva na endokrini sistem se izvajajo predvsem na kvasovkah (7, 8), ribah zebrih (9, 10, 11, 12) in mišjih/človeških celičnih linijah (7, 13, 14, 15, 16). Endokrini motilci povzročajo reproduktivne nepravilnosti, različne vrste raka (med drugim rak na prsih) in moško neplodnost, vplivajo na tanjšanje jajčne lupine pri pticah in spremembe gonad pri plazilcih (1). Večina raziskav bisfenolov preiskuje BPA in literaturni podatki kažejo, da bi BPA lahko bil vzrok za povečano razširjenost avtoimunih bolezni in

alergijskih obolenj tipa 1 (6), da je kloriran BPA akutno toksičen za ribe zebrice (11), ter da BPAF pri ribah vpliva na spolni razvoj zarodka (9, 10, 11, 12), kar so znanstvene raziskave pokazale tudi za BPF (12).

Zaradi zgoraj naštetega je zelo zaskrbljujoče dejstvo, da so endokrinim motilcem izpostavljeni tako ljudje kot živali, saj se nahajajo v okolju, med drugim v odpadnih in površinskih vodah, termalnem papirju (ki se med drugim uporablja za blagajniške račune), vsebnikih za shranjevanje hrane in celo v pitni vodi, kar podrobneje predstavljamo v poglavju 1.2.

1.2. BPA in nadomestki bisfenola A

Pod motilce endokrinega sistema spadajo različne skupine spojin, kot so ftalati, sintetični estrogeni in bromirani zaviralci gorenja (1). Eno najpomembnejših skupin endokrinih motilcev predstavljajo bisfenol A (BPA) in njegovi analogi. Strukturno sta za te spojine značilna dva fenolna obroča, povezana z metilenskim mostičkom. Zgodovina uporabe bisfenolov se je začela z BPA, ki ima zelo raširjeno uporabo kot monomer v proizvodnji plastike (17, 18). Zaradi njegovih potencialnih vplivov na endokrini sistem, kot smo omenili v poglavju 1.1., so ga začeli nadomeščati z njegovimi analogi, predvsem z bisfenolom F (BPF) in bisfenolom S (BPS). To se je sprva zdelo kot dobra ideja, a se je kasneje izkazalo, da sta BPF in BPS v enaki meri oziroma še bolj škodljiva kot motilca endokrinega sistema (7, 8, 12, 14, 15, 19).

1.2.1. BPA

Najbolj poznan in razširjen predstavnik bisfenolov je BPA, ki je bil prvič sintetiziran leta 1891, medtem ko je bil v strokovni literaturi prvič omenjen leta 1905 (20). Je monomer v proizvodnji fenolnih smol, poliakrilatov, poliestrov, epoksi smol in polikarbonatne plastike. Epoksi smole se uporabljajo kot laki, med drugim za stične površine med hrano in kovinsko ovojnino v konzervirani hrani, laki za avtomobilske dele, kovinske pokrove, zaščitni laki in prevleke za PVC pipe (17). Polikarbonatna plastika se uporablja v proizvodnji nosilcev zvoka, plastike za avtomobilske luči, gospodinjskih aparatov, ovojnine za hrano in platenk (18). Prav tako se uporablja kot razvijalec papirja v termičnem papirju (21). Januarja leta 2015 je Evropska agencija za varnost hrane (angleško European Food Safety Authority, EFSA) znižala dovoljeno mejo varnega vnosa BPA s 50 µg/kg telesne mase na dan na 4 µg/kg telesne mase na dan (22), a se pripravlja že nov protokol določanja toksičnosti, ki bo objavljen v letu 2018. Trenutno je dovoljena meja

prehajanja BPA iz ovojnine hrane v hrano 0,05 mg BPA/kg hrane (23), znižano z 0.6 mg BPA/kg hrane iz leta 2011 (24).

Izbrane fizikalno-kemijske lastnosti BPA prikazuje Preglednica XXXI v Prilogi 1. Po vrsti so te lastnosti molska masa, disociacijska konstanta (pKa), topnost v vodi, koeficient porazdelitve med vodo in oktanolom ($\log K_{ow}$), koeficient porazdelitve med organskim ogljikom v zemlji in vodo ($\log K_{oc}$), ki pomeni razmerje koncentracije spojine v tleh/zemlji in koncentracije spojine v vodnem mediju, razpadni čas pod vplivom zraka (normalne atmosfere), biokoncentracijski faktor (BCF) in bioakumulacijski faktor (BAF).

Vse večja skrb glede toksičnosti BPA in njegovih analogov, posledica katere je znižanje tako dovoljene meje zaužitja BPA (22) kot tudi prehajanja spojine iz ovojnine hrane v samo hrano (23, 24), je posledica mnogih raziskav, ki so dokazale učinke na hormone endokrinega sistema *in vitro* in *in vivo*, prav tako pa tudi reproduktivne in druge nepravilnosti na preiskovanih organizmih, predvsem na ribah zebrih. V spodnji Preglednici I prikazujemo učinke BPA kot endokrinega motilca in njegov metabolizem.

Preglednica I: Učinki BPA kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem ter razgradnja

| | |
|--|--|
| <p>estrogenost BPA v splošnem</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Estrogenost, izražena kot ekvivalent 17β-etnil estradiola (1,2–1,3 EEQ), zmanjšana pod LOD po kloriranju BPA (25) - kombinacija UV obsevanja in oksidacije z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi zniža estrogenost BPA, samo UV obsevanje pa je ne zniža (50–100 x višja koncentracija UV kot pri običajni dezinfekciji) (26) - ko je bila raztopina BPA podvržena oksidaciji z UV/H₂O₂, je prišlo do nastanka citotoksičnih produktov, pri testiranju vzorcev iz čistilnih naprav, v katerih je bilo čiščenje na podlagi ozoniranja, pa do nastanka citotoksičnih produktov ni prišlo (tekmovalje z drugimi spojinami) (16) - testiranje estrogenosti <i>in vitro</i> v odpadnih vodah z uporabo testa BLYES je pokazalo, da je manj estrogen kot pa BPAF (8) - v testiranju estrogenosti sedmih bisfenolov v aktivnem blatu je prispeval k skupni estrogenosti z 81 % (27) |
|--|--|

| | |
|--|---|
| <p>endokrino delovanje BPA</p> <p>**v virih z zaporednima številčkama 18 in 20 je v raziskavah uporabljen H295R test steroidogeneze <i>in vitro</i>, ki se izvaja na celicah adenokarcinoma</p> | <ul style="list-style-type: none"> - ima estrogeno aktivnost, oksidiran BPA ne (16) - bioluminescenčni test na kvasovkah (BLYES) je pokazal, da je koncentracija potrebna za 50 % maksimalnega odziva (EC_{50}) $4,1 \times 10^3$ nM (8) - zavira izločanje testosterona tako iz celic mišjih kot iz celic človeških testisov (14) - zviša koncentracijo 17β-estradiola ($EC_{50} = 14 \mu M$) (19, 21) - zviša koncentracijo prostega testosterona (LOEC = $1 \mu M$) (21) - skoraj nima učinka na koncentracijo progestagena ($EC_{50} = 0,004 \mu M$) (19) - zniža koncentracijo celotnega testosterona (prostega in vezanega na plazemske albumine) ($EC_{50} = 3,2 \mu M$) (19) - zniža koncentracijo androgenov ($EC_{50} = 1,4; 3,1; 3,2 \mu M$) (19) - zniža raven kortizola ($EC_{50} = 73 \mu M$) (19) - ne vpliva na koncentracijo kortikosterona (19) - zviša raven estrogenov ($EC_{50} = 7,2; 14 \mu M$) (19) - zviša raven estrona ($EC_{50} = 7,2 \mu M$) (19) |
| <p>vpliv BPA kot agonista/antagonista estrogenskih receptorjev</p> | <ul style="list-style-type: none"> - nizka jakost vezave na $ER\alpha$ in $ER\beta$ (28) - je bolj selektiven za ERR gama, kot za $ER\alpha$ in $ER\beta$ (28) - je zelo šibek aktivator, tako za $ER\alpha$ kot $ER\beta$ (28) |
| <p>metabolizem BPA</p> | <ul style="list-style-type: none"> - pri čiščenju pitne vode se pogosto uporablja klor, pri kloriranju BPA nastane 21 različnih kloriranih derivatov, prav tako pa tudi bromirani derivati (25) - nekaj BPA je v človeškem urinu v obliki acetata (29) - je CYP3A4 substrat in podvržen oksidaciji (19) - glavni metabolit biotransformacije v človeških jetrnih mikrosomih (ob dodatku NADPH in GSH) je hidroksiliran BPA, ki se nato pretvori v glukuronid in se tako izloči iz telesa z urinom (30) |
| <p>razgradnja BPA</p> | <ul style="list-style-type: none"> - se oksidira pod vplivom UV/H_2O_2 v p-hidroksiacetofenon, ki je bolj toksičen (16) - bolj podvržen biorazgradnji kot mehanizmu odstranjevanja (31) - mineralizacija pod vplivom TiO_2 |

| | |
|---|--|
| | fotokatalizatorja (32) - razpad v prisotnosti superoksidnega aniona (O_2^-) in hidroksilnega radikala ($OH\cdot$) (33) |
| genotoksičnost, toksičnost na organske sisteme, embriotoksičnost BPA | <ul style="list-style-type: none"> - povzroči poškodbe DNA že pri nizkih koncentracijah (4,36 $\mu\text{g/L}$) (13) - oksidirani produkti BPA (pod vplivom UV/H_2O_2) so citotoksični (16) - toksičen za <i>Vibrio fischeri</i>, vodne bolhe in ribe zebrice (12) - zaradi strukturnega elementa fenola, ki je znan uremični toksin (spojina, ki se kopiči pri obolenju ledvic), je potencialno toksičen za ledvice (34) - zniža ravni antioksidantnih encimov in zviša oksidativni stres v jetrih samic podgan in je na ta način hepatotoksičen (35) - koncentracije BPA med 300 in 500 $\mu\text{g/L}$ povzročajo napake v razvoju okostja na zarodkih morskega ježka (<i>Paracentrotus lividus</i>), višje koncentracije povzročajo napake v zgodnjem razvoju zarodka, pri koncentraciji 3500 $\mu\text{g/L}$ je smrtnost zarodkov 100 % (36) |

1.2.2. BPAF

Bisfenol AF (BPAF) je analog BPA, ki se strukturno razlikuje v zamenjavi dveh metilnih funkcionalnih skupin na metilenskem mostičku za trifluorometilni skupini. Uporablja se kot zamenjava BPA v proizvodnji polikarbonatnih kopolimerov, poliimidov, poliamidov, poliestrov, plastičnih optičnih vlaken in valovnih vodnikov (28). Strukturno formulo in fizikalno-kemijske lastnosti spojine (okrajšave razložene v podpoglavju 1.2.1.) prikazuje Preglednica XXXII v Prilogi 1.

BPAF je manj razširjen kot BPA, zato je tudi predmet manjšega števila raziskav. Izkazalo se je, da so nanj zaradi $-CF_3$ funkcionalne skupine dosti bolj občutljive vodne bolhe, ki se redno uporabljajo v raziskavah estrogenosti in genotoksičnosti (32). BCF in BAF sta skoraj 6 x višja kot pri BPA, kar pomeni večjo raven nalaganja v okolju in s tem povečan problem toksičnosti. Potencialna nova metoda odstranjevanja BPAF bi lahko bila adsorpcija na kroglice iz aktiviranega oglja in alginata z dodatkom cetiltrimetil amonijevega bromida, saj je v laboratorijskih pogojih hitra, preprosta in zanesljiva (37). Preglednica II prikazuje učinke BPAF kot endokrinega motilca in njegov metabolizem ter razgradnjo.

Preglednica II: Učinki BPAF kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem ter razgradnja

| | |
|---|---|
| <p>estrogenost BPAF v splošnem</p> | <ul style="list-style-type: none"> - v <i>in vitro</i> eksperimentih na kvasovkah je bila relativna estrogenska aktivnost (glede na ultra čisto vodo) 81 %, dosti višja v primerjavi z BPF (33 %) in BPA (12 %) (32) - vpliva na steroidogenezo v ribah zebrih, kar bi se lahko kazalo na gametogenezi, spolnem razvoju in razmnoževanju rib (10, 12) - v raziskavi estrogene aktivnosti vode iz čistilnih naprav je imel BPAF 13 % prispevek k skupni estrogenosti vseh preiskovanih bisfenolov (gledano na ekvivalent 17β-estradiola) (27) - v testiranju estrogenosti <i>in vitro</i> odpadnih vod je imel višji prispevek k ravni estrogenosti kot BPE in dosti višji kot BPF, BPS in BPA (8) - izkazuje višjo estrogenost v primerjavi z BPA v ribah zebrih <i>in vivo</i> in <i>in vitro</i> (11) |
| <p>endokrino delovanje BPAF</p> | <ul style="list-style-type: none"> - pod vplivom BPAF se zmanjša koncentracija tiroksina (T4) tako v vezani kot prosti obliki, kakor tudi trijodtironina (T3) v vezani in prosti obliki (9) - zelo poveča koncentracijo 17β-estradiola tako v samcih kot samicah rib zebrih (10) - zelo zniža koncentracijo testosterona v samcih rib zebrih (10) |
| <p>vpliv BPAF kot agonista/antagonista estrogenskih receptorjev</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 20 x večja jakost vezave na ERα v primerjavi z BPA (28) - 40 x večja jakost vezave za ERβ v primerjavi z BPA (28) - selektiven za ERα in ERβ (28) - polni agonist ERα med koncentracijami 10⁻¹⁰ do 10⁻⁵ M (28) - inhibira interakcijo med 17β-estradiolom in ERβ, je močno selektiven antagonist ERβ zaradi CF₃ skupin v strukturi (28) |
| <p>metabolizem BPAF</p> | <ul style="list-style-type: none"> - glavna primarna metabolita sta hidroksilirani BPAF in 4-heksafluorohidroksiizopropilidenfenol (v človeških jetrnih mikrosomih ob dodatku NADPH in GSH) (30) |
| <p>razgradnja BPAF</p> | <ul style="list-style-type: none"> - je odporen na biorazgradnjo (31) |
| <p>genotoksičnost, toksičnost za organske sisteme, embriotoksičnost BPAF</p> | <ul style="list-style-type: none"> - kronična toksičnost za vodne bolhe (od 0,45 mg/L) (12) - za bakterije <i>Vibrio fischeri</i> primerljiva toksičnost |

| | |
|--|--|
| | <p>z BPA (IC₅₀ po 30 minutah 4,2 in 4,8 mg/L) (12)</p> <ul style="list-style-type: none"> - veliko bolj toksičen za ribe zebrice, kot pa BPA ali BPF (vse opazovane EC₅₀ vrednosti pod 3,5 mg/L) (12) - zelo strupen za zelene alge, IC₅₀ po 72 urah 3 mg/L v primerjavi z 19,6 mg/L (BPA) ali 22,1 mg/L (BPF) (12) |
|--|--|

1.2.3. BPAP

Bisfenol AP (BPAP) je analog BPA, ki se od BPA razlikuje v dodatnem fenilnem obroču na metilenskem mostičku, kot kaže Preglednica XXXIII v Prilogi 1. Je še precej neraziskan analog BPA in o njem ni veliko podatkov, razen fizikalno-kemijskih lastnosti (Preglednica III v Prilogi 1) ter tega, da se uporablja kot zamenjava BPA in je motilec endokrinega sistema (38). Njegova prisotnost v okolju je obravnavana v poglavju 1.3.

1.2.4. BPB

Bisfenol B (BPB) je analog BPA, ki ima na metilenskem mostičku eno metilno skupino zamenjano z etilno skupino. (Preglednica XXXIV v Prilogi 1). Uporablja se v proizvodnji epoksi smol (29) in je motilec endokrinega sistema. (19). Preglednica IV v Prilogi 1 prikazuje strukturno formulo in fizikalno-kemijske lastnosti. Pregled do zdaj opravljenih raziskav BPB kot motilca endokrinega sistema predstavlja Preglednica III.

Preglednica III: Učinki BPB kot motilca endokrinega sistema in njegov metabolizem

| | |
|---|---|
| <p>endokrino delovanje BPB</p> <p>**v viru z zaporedno številko 18 je v raziskavi uporabljen H295R test steroidogeneze <i>in vitro</i>, ki se izvaja na celicah adenokarcinoma</p> | <ul style="list-style-type: none"> - zviša koncentracijo progestagena (EC₅₀ = 8,2 μM) (19) - minimalno vpliva na raven progesterona (19) - zviša koncentracijo testosterona, androstendiona, androstenolona (EC₅₀ = 10,8; 16,8; 3,8 μM) (19) - zviša koncentracijo 17β-estradiola in estrona (EC₅₀ = 13,4; 17,4 μM) (19) - zniža raven kortizola (EC₅₀ = 11,8 μM) (19) - zniža raven kortikosterona (EC₅₀ = 4,5 μM) (19) |
| <p>metabolizem BPB</p> | <ul style="list-style-type: none"> - v človeškem urinu se nahaja tako v prosti obliki kot v obliki acetata (29) - je inhibitor CYP2D6 (19) - CYP3A4 substrat, se oksidira (19) |

1.2.5. BPC

Bisfenol C (BPC) je analog BPA, ki se od njega razlikuje po CH₃ funkcionalni skupini na meta mestu obeh fenolnih obročev. Uporablja se v izdelavi epoksi smol (39) in kot razvijalec barve v toplotno prevodnih materialih za senzorje (40). Njegovo strukturno formulo in fizikalno-kemijske lastnosti predstavlja Preglednica XXXV v Prilogi 1. Raziskave na estrogenskih receptorjih so dokazale, da BPC v manjšem obsegu (35 %) kot BPA (80 %) aktivira ER β , se močnejše kot BPA veže tako ER α , kot ER β in je selektivni modulator estrogenskih receptorjev (selective estrogen receptor modulator – SERM) (40).

1.2.6. BPE

Bisfenol E (BPE) je analog BPA, ki se od njega razlikuje v metilni skupini na metilenskem mostičku. Uporablja se kot razvijalec v termičnem papirju (41). Njegovo strukturno formulo in izbrane fizikalno-kemijske lastnosti prikazuje Preglednica XXXVI v Prilogi 1. Pregled do zdaj opravljenih raziskav s tematiko BPE kot motilca endokrinega sistema prikazuje Preglednica IV.

Preglednica IV: Učinki BPE kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem in razgradnja

| | |
|---|--|
| estrogenost BPE v splošnem | <ul style="list-style-type: none">- testiranje estrogenosti <i>in vitro</i> z uporabo testa BLYES, primerljiva estrogenost z BPA (EC₅₀ je 7,43 x 10³ nM v primerjavi z 4,1 x 10³ nM) (8) |
| endokrino delovanje BPE **v viru z zaporedno številko 18 je v raziskavi uporabljen H295R test steroidogeneze <i>in vitro</i> , ki se izvaja na celicah adenokarcinoma | <ul style="list-style-type: none">- bioluminescenčni test na kvasovkah (BLYES) je pokazal, da je koncentracija potrebna za 50 % maksimalnega odziva (EC₅₀) 7,43 x 10³ nM (8)- zviša koncentracijo progestagena (EC₅₀ = 23 μM) (19)- zniža koncentracijo testosterona (EC₅₀ = 5 μM) (19)- zniža koncentracijo androgenov (EC₅₀ = 0,3; 0,5; 5 μM) (19)- zviša koncentracijo estrogenov 17β-estradiola in estrona (EC₅₀ = 13,6; 22,2 μM) (19)- zviša raven kortikosterona (EC₅₀ = 16,1 μM) (19) |
| metabolizem BPE | <ul style="list-style-type: none">- CYP3A4 substrat, oksidacija na orto mestu (19) |
| razgradnja BPE | <ul style="list-style-type: none">- odporen na adsorbcijo in biorazgradnjo (31) |

1.2.7. BPF

Eden najbolj razširjenih analogov BPA je bisfenol F (BPF). BPF se uporablja v proizvodnji epoksi smol in polikarbonatov za notranje obloge ovojnin za hrano in oblogo vodnih pip.

(42). Ima podobne kemijske lastnosti kot BPA, zato bi morali biti njegovi učinki v okolju in usoda podobna (42, 43). Od BPA se strukturno razlikuje v zamenjavi dveh metilnih skupin na metilenskem mostičku z vodikovima atomoma (Preglednica XXXVII v Prilogi 1). Obstaja v treh izomerih, to so 4,4'-BPF, 2,4'-BPF in 2,2'-BPF (44). Nekaj časa je bil najbolj razširjen analog BPA, vendar se je izkazalo, da je zaradi bolj izraženih učinkov kot motilec endokrinega sistema slabša izbira (14). Preglednica XXXVII v Prilogi 1 prikazuje strukturno formulo in fizikalno-kemijske lastnosti. Preglednica V prikazuje izsledke raziskav BPF kot motilca endokrinega sistema.

Preglednica V: Učinki BPF kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem ter razgradnja

| | |
|--|---|
| <p>estrogenost BPF v splošnem</p> | <ul style="list-style-type: none"> - testiranje estrogenosti <i>in vitro</i> v odpadnih vodah z uporabo testa BLYES, primerljiva raven estrogenosti z BPA (8) - v testiranju estrogenosti sedmih bisfenolov v aktivnem blatu je BPA prispeval k skupni estrogenosti z 1,9 % (gledano na ekvivalent 17β-estradiola) (27) |
| <p>endokrino delovanje BPF</p> <p>**v virih z zaporednima številčkama 18 in 20 je v raziskavah uporabljen H295R test steroidogeneze <i>in vitro</i>, ki se izvaja na celicah adenokarcinoma</p> | <ul style="list-style-type: none"> - bioluminescenčni test na kvasovkah (BLYES) je pokazal, da je koncentracija potrebna za 50 % maksimalnega odziva (EC₅₀) 4,01 x 10³ nM (8) - zavira izločanje testosterona iz celic mišjih in človeških testisov že pri 10 nmol/L, kar je nižja začetna koncentracija kot pa za BPA (14) - zviša koncentracijo 17β-estradiola (EC₅₀ = 17,6 μM) (19, 21) - zviša raven progestagena (EC₅₀ = 16 μM) (19) - zviša raven progesterona (EC₅₀ = 20,8 μM) (19) - zniža koncentracijo testosterona (EC₅₀ = 24,9 μM) (19) - zviša koncentracijo estrona (EC₅₀ = 19,7 μM) (19) - poviša raven kortizola (EC₅₀ = 3,3 μM) (19) - poviša raven kortikosterona (EC₅₀ = 18,1 μM) (19) |
| <p>metabolizem BPF</p> | <ul style="list-style-type: none"> - CYP3A4 substrat, podvržen oksidaciji (19) - glavni primarni metabolit biotransformacije v človeških jetrnih mikrosomih (ob dodatku NADPH in GSH) je hidroksiliran BPF (30) |
| <p>razgradnja BPF</p> | <ul style="list-style-type: none"> - se biorazgradi in adsorbira (31) - popolna mineralizacija pod vplivom TiO₂ fotokatalizatorja (32) |

| | |
|---|--|
| genotoksičnost, toksičnost za organske sisteme, embriotoksičnost BPF | <ul style="list-style-type: none"> - akutna toksičnost za <i>Vibrio fischeri</i> (IC₅₀ je 2,1 mg/L po 30 minutah), kronična toksičnost za vodne bolhe (EC₅₀ je 13,1 mg/L po 24 urah) (12, 32) |
|---|--|

1.2.8. BPS

Bisfenol S (BPS) se od vseh analogov BPA, obravnavanih v tej nalogi, od njega najbolj razlikuje, saj nima metilenskega mostička, ampak sta fenola med sabo povezana s SO₂ skupino (Preglednica XXXVIII v Prilogi 1). Je bolj toplotno odporen od BPA (15). V vodnih raztopinah je podvržen fotorazpadu pod vplivom UV svetlobe, ki v koncentracijskem območju 5–50 mg/L poteka po kinetiki prvega reda (45).

Spojina je pomemben kemični dodatek v pesticidih, barvilih, ohranjevalcih barve za oblačila, pripravkih za barvanje usnja, disperzijskih barvilih in izboljševalcih lastnosti vlaken (45), prav tako se uporablja v proizvodnji sulfoniranega poli (eter-ketona-eter-sulfona) (S-PEKES) (46) in v utrjevanju hitro sušecih epoksi lepil; je antikoroziv in monomer polietersulfona (PES) (47) ter se uporablja v sintezi cikličnih karbonatov (48), proizvodnji epoksi smol (49) in kot razvijalec termalnega papirja (21). Potencialno možnost odstranjevanja BPS iz vodne raztopine predstavlja nanozeolit NaY, ki je v eni izmed raziskav omogočil 93,1 % odstranitvev (50). Strukturno formulo BPS in fizikalno kemijske lastnosti predstavlja Preglednica VIII v Prilogi 1. Izsledke raziskav, ki so preučevale vpliv BPS kot motilca endokrinega sistema, prikazuje Preglednica VI.

Preglednica VI: Učinki BPS kot motilca endokrinega sistema, njegov metabolizem ter razgradnja

| | |
|-----------------------------------|---|
| estrogenost BPS v splošnem | <ul style="list-style-type: none"> - testiranje estrogenosti <i>in vitro</i> v odpadnih vodah z uporabo testa BLYES, veliko nižja raven estrogenosti od BPA (8) - v testiranju estrogenosti sedmih bisfenolov v blatu je BPA prispeval k skupni estrogenosti z 3,5 % (gledano kot ekvivalent 17β-estradiola) (27) - monokloriranje BPS znižuje njegovo estrogenost <i>in vitro</i>, dikloriranje in trikloriranje jo spet poveča (15) - vpliva na izločanje testosterona tako iz mišjih, kot iz človeških testisov, bolj kot BPA (14) |
| endokrino delovanje BPS | <ul style="list-style-type: none"> - bioluminescenčni test na kvasovkah (BLYES) je pokazal, da je koncentracija potrebna za 50% |

| | |
|--|---|
| <p>**v virih z zaporednima številčkama 18 in 20 je v raziskavah uporabljen H295R test steroidogeneze <i>in vitro</i>, ki se izvaja na celicah adenokarcinoma</p> | <p>maksimalnega odziva (EC₅₀) 4.13 x 10³ nM (8)</p> <ul style="list-style-type: none"> - zniža koncentracijo prostega testosterona (21) - izraža estrogensko aktivnost po metabolni aktivaciji (21) - zviša koncentracijo progestagena (EC₅₀ = 8 μM) (19) - v skupini BPA in štirih analogov (BPB, BPE, BPF, BPS) najbolj vpliva na E_{max} za 17α-OH progesteron (E_{max} = 1676 %) (19) - zniža raven kortizola (EC₅₀ = 4,8 μM) (19) - zniža raven kortikosterona (EC₅₀ = 4,7 μM) (19) |
| <p>vpliv BPS kot agonista/antagonista estrogenskih receptorjev</p> | <ul style="list-style-type: none"> - BPS in hidroksiliran BPS sta agonista estrogenskega receptorja (7) - BPS glukoronid ni agonist estrogenskega receptorja (7) - BPS, hidroksiliran BPS in BPS glukoronid ne vplivajo na androgenske receptorje (7) - BPS in BPS glukoronid ne vplivata na ščitnične receptorje (7) - hidroksiliran BPS je agonist ščitničnih receptorjev (7) |
| <p>metabolizem BPS</p> | <ul style="list-style-type: none"> - v prisotnosti NADPH v jetnih mikrosomih je BPS podvržen hidroksilaciji fenolnega obroča, kar kaže na metabolizem preko CYP encimov (7) |
| <p>razgradnja BPS</p> | <ul style="list-style-type: none"> - biorazgradljiv (31) |

1.2.9. BPZ

Bisfenol Z (BPZ) je analog BPA s heksenskim obročem na metilenskem mostičku. Uporablja se kot zamenjava BPA v proizvodnji polikarbonatne plastike (predvsem plastenki) (51) ter za utrjevanje toplotno zelo odpornih materialov in za toplotno izolacijo (52). Glavni primarni metabolit BPZ v človeških jetnih mikrosomih je ob dodatku NADPH in GSH hidroksiliran BPZ (30). Strukturno formulo in fizikalno-kemijske lastnosti prikazuje Preglednica XXXIX v Prilogi 1.

V pregledu literature smo ga zasledili le v kontekstu analize koncentracij analogov BPA v okoljskih vzorcih, ne pa tudi v raziskavah njegovih učinkov kot motilca endokrinega sistema.

1.3. Sledovi analogov bisfenola A v okolju

Zaradi potencialnih učinkov analogov BPA na endokrini sistem je zelo pomemben monitoring le-teh v okolju. Kot je navedeno v poglavju 1.2., se vsi obravnavani bisfenoli uporabljajo kot zamenjava BPA v proizvodnji različnih vrst plastike. Dandanes je odnos človeštva do plastike zelo zaskrbljujoč. Na letni ravni (informacija za leto 2017) proizvedemo 32 milijonov ton plastike in pričakuje se, da bodo do leta 2050 plastični delci prisotni v zaznavni količini v prebavilih 95 % vseh ptičev in da bo v morjih količinsko 3 x več plastike kot rib (53).

Različne vrste plastike so zelo raznovrstne v svojih lastnostih, da se jih zlahka oblikovati, so odporne na vlago, so močan material in so relativno poceni. Zato je njihova uporaba izjemno razširjena. Problem nastane, ker se plastika zelo počasi razgrajuje (54). V nadaljevanju magistrskega dela obravnavamo koncentracije analogov BPA v odpadnih vodah iz čistilnih naprav, saj se očiščena voda iz le-teh kasneje vrne nazaj v okolje, med drugim se tudi lahko uporablja za namakanje polj (13), kar seveda pomeni, da se analogi BPA lahko pojavijo v pridelkih. Odpadne vode, četudi po čiščenju, so tudi glavni vir ostankov bisfenolov v okolju (55). Preglednica VII prikazuje vsebnosti analogov BPA, določene v analizah okoljskih in človeških vzorcev iz pregleda literature.

Preglednica VII: Koncentracije analogov BPA v okoljskih in človeških vzorcih (velikostni razredi so podani glede na pričakovane izmerjene koncentracije)

| | odpadne vode | odpadno blato | površinske vode | pitna voda |
|------|--|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| BPA | 0–12,7 µg/L (13, 31, 42, 56, 57, 58, 59) | 0–25,6 mg/kg (27, 31, 42, 60, 61) | 0–1,95 µg/L (42, 62, 63, 64, 65) | 0–22,2 µg/L (66) |
| BPAF | 0–13,2 ng/L (31) | 0–45,1 ng/g (31, 60, 61) | / | / |
| BPAP | / | 0–16,0 ng/g (31) | / | / |
| BPB | / | 0–5,6 ng/g (27) | / | / |
| BPC | / | / | / | / |
| BPE | 0–8,06 ng/L (31) | 0–167 ng/g (61) | / | / |
| BPF | 0–1,43 µg/L (31, 42, 57, 58, 59) | 0–1,78 mg/kg (27, 31, 42, 60, 61) | 0–2,85 µg/L (42, 64, 65) | / |
| BPS | 0–0,746 µg/L (31) | 0–1,48 mg/kg (27, 60, 61) | 0–7,2 µg/L (64, 65) | / |
| BPZ | / | 0–0,969 mg/kg (27, 60) | / | / |
| | hrana | pijača | termični papir | urin |
| BPA | 0–395 µg/kg (22, 67, 68, 69) | 0–1,26 µg/L (51, 52) | 0–30,4 mg/g (21, 41) | 0–6,24 µg/L (29, 70) |
| BPAF | / | / | / | / |
| BPAP | / | / | / | / |
| BPB | 0–146 µg/kg (22, 68) | / | / | 0–1,15 µg/L (29) |
| BPC | / | / | / | / |
| BPE | 0–12,8 µg/kg (69) | / | / | / |
| BPF | 0–31,6 µg/kg (69) | 0–7,07 µg/L (51, 52) | / | / |

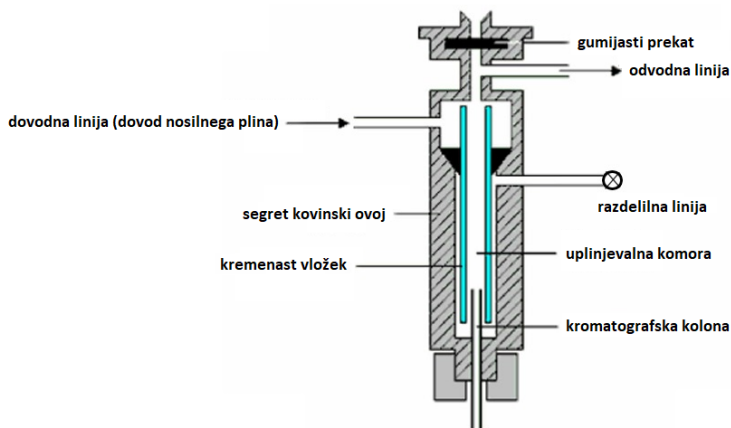
| | | | | |
|------|-------------------|----------------|----------------------|------------------|
| BPS | 0–302 µg/kg (69) | / | 0–12,6 mg/g (21, 41) | 0–21,0 µg/L (72) |
| BPZ | 0–28,4 µg/kg (69) | 0–90 ng/L (52) | / | / |
| | serum | | | |
| BPA | 0–66,5 µg/L (72) | | | |
| BPAF | / | | | |
| BPAP | / | | | |
| BPB | / | | | |
| BPC | / | | | |
| BPE | / | | | |
| BPF | / | | | |
| BPS | / | | | |
| BPZ | / | | | |

1.4. Določanje vsebnosti analogov bisfenola A v odpadnih vodah

Običajne metode za določanje vsebnosti analogov BPA v odpadnih vodah in ostalih okoljskih vzorcih so sklopljene metode tekočinske kromatografije (LC), tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) ali plinske kromatografije (GC) z masno spektrometrijo (MS) oziroma tandemsko masno spektrometrijo (MS/MS). Nekatere izmed pogosto uporabljenih metod so GC-MS (13), LC-MS (22), LC-MS/MS (56) in HPLC-MS/MS (61). V nadaljevanju magistrskega dela se osredotočamo na GC-MS, ki je bila metoda, s katero smo analizirali naše vzorce.

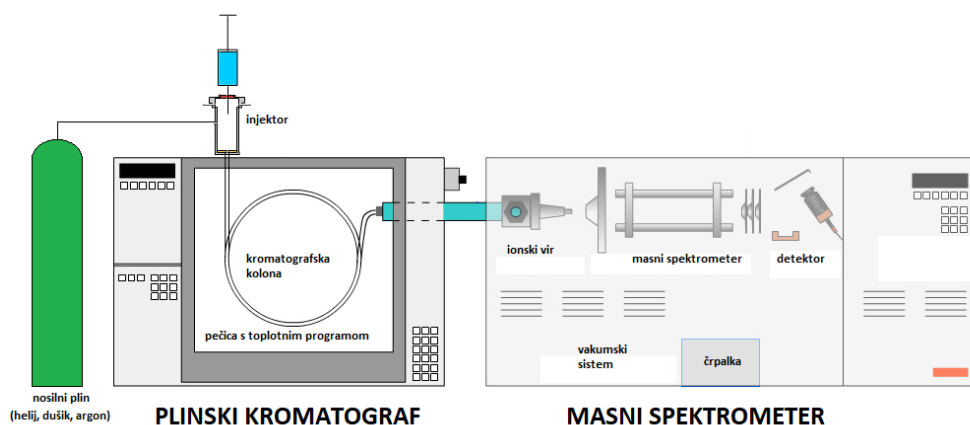
GC-MS je metoda, ki jo izberemo, ko analiziramo manjše molekule (razmerje mase in naboja m/z do 550), ki morajo biti hlapne (73) in toplotno stabilne (74). Je zelo razširjena metoda, ker je hitra, zahteva le majhne količine vzorca, ki je lahko tekoč, plinast ali razplinjena trdna snov (75), omogoča separacijo kompleksnih mešanic, kvantifikacijo analitov in zaznavo zelo nizkih koncentracij (sledov) analitov (73).

Potek metode se začne z injiciranjem vzorca v plinski kromatograf (75), kar lahko izvedemo na enega od dveh načinov. To sta način z delitvijo nosilnega plina in način brez delitve nosilnega plina. Razlikujeta se glede na to, če je razdelilna linija (Slika 3) v injektorju odprta ali zaprta. Pri »splitless« načinu ves injicirani vzorec doseže kolono, saj je linija zaprta, vendar to lahko kasneje v kromatogramu namesto ozkih povzroči široke vrhove, česar pa si ne želimo. V »splitless« načinu je razdelilna linija odprta in lahko kontroliramo, kolikšen delež vzorca doseže kromatografsko kolono in kolikšen del izhlapi (76).



Slika 3: Shema injektorja v plinskem kromatografu - prirejeno po (76)

Kot mobilna faza deluje nosilni plin. To je lahko helij, dušik ali argon (73). Vzorec nadaljuje pot (Slika 4) v pečico z določenim temperaturnim programom, skozi kromatografsko kolono, kjer se spojine v vzorcu ločijo na stacionarni fazi glede na polarnost in velikost (75). Sledi analiza v masnem spektrometru. Ta je razdeljen na 3 dele, tj. na ionizator, masni filter in detektor. Ionizator molekule pretvori v ione. Poznamo več vrst ionizatorjev. Najpogosteje uporabljana metoda je elektronska ionizacija (EI), pri kateri snop elektronov ionizira molekule vzorca, pri čemer vsaka molekula izgubi en elektron, lahko pa ga tudi pridobi. Tako nastane radikalski kation ali radikalski anion (74). Ta radikalski ion gre skozi masni filter, ki loči ione glede na njihovo razmerje mase in naboja (m/z) (73). Končna rezultata metode sta kromatogram, v katerem ima vsaka preiskovana spojina svoj značilni retencijski čas (T_r) in masni spekter, v katerem lahko razberemo molsko maso spojine in njene značilne fragmente (74).



Slika 4: Shema GC-MS – prirejeno po (77)

2. NAMEN DELA

BPA se pogosto uporablja kot mehčalec v proizvodnji plastike. Ker se je izkazalo, da ima BPA škodljive učinke na endokrini sistem, so se kot njegova zamenjava začele uporabljati alternative v obliki analogov BPA, vendar so nadaljnje raziskave pokazale, da imajo tudi analogi (najbolj razširjena in raziskana sta BPF in BPS) škodljive učinke. V okolju jih najdemo tako v odpadnih vodah in blatu kot tudi v površinskih vodah, najdemo pa jih lahko tudi v hrani, pijači in papirju, ki se uporablja za blagajniške račune in se reciklira, na ta način pa se bisfenoli lahko pojavijo tudi v knjigah in časopisih. Večina raziskav analogov BPA se je do sedaj osredotočala predvsem na določitev BPA, občasno pa zajemajo raziskave tudi BPF in BPS, le redko pa ostale analoge. Med najmanj zastopanimi v pregledu literature sta BPAP in BPC. BPC je bil le nekajkrat vključen v raziskave prisotnosti v okoljskih vzorcih, njegova vsebnost pa je bila v vseh raziskavah pod ustrezno mejo določitve uporabljene analizne metode (LOD).

V tem magistrskem delu se bomo posvetili določitvi vsebnosti BPA analogov, izpustili pa bomo preverjanje vsebnosti BPA, saj le-ta spada med najbolj preučevane spojine v odpadnih vodah in okolju. Poleg tega so njegove pričakovane koncentracije za 3 velikostne razrede višje od vsebnosti večine ostalih analogov ($\mu\text{g/L}$ v primerjavi z ng/L). V magistrskem delu se bomo osredotočili na 8 njegovih analogov, in sicer na BPAF, BPAP, BPB, BPC, BPE, BPF, BPS in BPZ. Namen dela je optimizirati in validirati analizo metodo za sočasno kvalitativno in kvantitativno določitev prej navedenih analogov. Prav tako pa želimo določiti vsebnosti teh bisfenolov v 47 vzorcih odpadne vode iz 5 slovenskih čistilnih naprav.

3. MATERIALI IN METODE

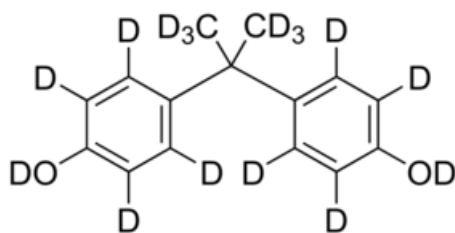
3.1. Materiali

3.1.1. Standardi merjenih spojin, topila in ostale kemikalije

V preglednici VIII navajamo imena uporabljenih spojin, njihovih proizvajalcev in državo proizvodnje, čistost in CAS številke. Strukture spojin in njihove fizikalno-kemijske lastnosti navajamo v Preglednicah I–IX v Prilogi I. Standardi bisfenolov so bili shranjeni na sobni temperaturi v originalnih steklenih oziroma plastičnih vsebnikih v obliki prahu ali zrn. Kot interni standard smo uporabljali devterirani BPA (dBPA-d₁₆), v katerem je 16 vodikovih atomov zamenjanih z izotopom devterijem (Slika 5). Interni standard je bil shranjen pri 4 °C.

Preglednica VIII: Imena spojin, proizvajalci, čistost in CAS kode spojin

| ime | proizvajalec, država | čistost | CAS koda |
|----------------------|---------------------------|--------------|------------|
| BPAF | Sigma-Aldrich, ZDA | 99 % | 1478-61-1 |
| BPAP | Sigma-Aldrich, ZDA | 99 % | 1571-75-1 |
| BPB | Dr. Ehrenstorfer, Nemčija | 99.8 % | 77-40-7 |
| BPC | Sigma-Aldrich, ZDA | 99 % | 79-97-0 |
| BPE | Sigma-Aldrich, ZDA | 98 % | 2081-08-5 |
| BPF | Sigma-Aldrich, ZDA | 98 % | 620-92-8 |
| BPP | Sigma-Aldrich, ZDA | 99 % | 2167-51-3 |
| BPS | Sigma-Aldrich, ZDA | 98 % | 80-09-1 |
| BPZ | Sigma-Aldrich, ZDA | 98 % | 843-55-0 |
| dBPA-d ¹⁶ | Sigma-Aldrich, ZDA | 98 % atom. D | 96210-87-6 |



Slika 5: Strukturna formula dBPA-d₁₆.

Pri delu smo uporabljali sledeča topila: ultra čisto vodo, metanol (MeOH) za LC-MS oziroma GC-MS, diklorometan (DCM) in etilacetat (EtAc). Proizvajalec vseh topil, razen MeOH za LC-MS, je J. T. Baker (Phillipsburg, ZDA). Proizvajalec MeOH za LC-MS je Merck (Darmstadt, Nemčija). Vsa uporabljena topila so bila analitske čistote. MeOH za GC-MS smo uporabili za pripravo raztopin vseh standardov, razen pri pripravi skupnega standarda, kjer smo uporabili MeOH za LC-MS.

Derivatizacijo smo izvedli z derivatizacijskim sredstvom N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamid (*MTBSTFA*): C₉H₁₈F₃NOSi z 1 % terc-butildimetilchlorosilanom (*t*-BDMCS) kot katalizatorjem (Sigma-Aldrich, ZDA). Derivatizacijsko sredstvo smo shranjevali pri – 20 °C.

3.1.2. Pribor in aparature

Vso steklovino in splošni pribor, ki smo ga uporabili pri eksperimentih, navajamo v Preglednici IX.

Preglednica IX: Seznam steklovine in pribora

| | |
|------------------------|---|
| steklovina | čaše različnih velikosti, 250 mL in 500 mL steklenice za vzorce, presesalna erlenmajerica, steklena buča z nastavkom, 50 mL, 100 mL in 200 mL bučke, steklene palčke, eluirke |
| kovinski pribor | spatule, žličke za tehtanje |
| tehtnica | analitska tehtnica model AT201 (Mettler-Toledo, Švica) |
| ostalo | polavtomatske pipete (20–200 µL, 100–1000 µL, 1000–5000 µL) z nastavki (Gilson, ZDA), vortex model Vibromix 10 (Domel d.o.o, Slovenija), hladilnik in zamrzovalnik (Gorenje, Slovenija), naprava za prepihanje v toku dušika (Glas-Col, ZDA), sušilnik (Memmert, Nemčija), sušilnik za steklovino Heratherm Oven OGS60 (Thermos Scientific, ZDA) |

Za filtriranje vzorcev smo uporabili filter z nedefinirano velikostjo por < 1 µm, premera 55 mm, proizvajalca Macherey-Nagel (Nemčija), ter celulozno-nitratni filter z velikostjo por 0,45 µm, proizvajalca Sartorius Stedim Biotech (Nemčija). Pri ekstrakciji in eluciji smo uporabljali kartuše OASIS[®] HLB 3 cc/60 mg proizvajalca Waters ter kadičko za ekstrakcijo Vacuum Manifold Processing Station (Slika 6) proizvajalca Agilent (ZDA) z vakuumsko črpalko 220 V/50 Hz proizvajalca Millipore (ZDA). Ekstrakte vzorcev smo pred kemijsko analizo z GC/MS derivatizirali v 1,5 mL steklenih vialah s plastičnimi pokrovi proizvajalca Sigma-Aldrich (ZDA).



Slika 6: Kadička za ekstrakcijo na trdnih nosilcih (SPE)

Vzorce smo analizirali s plinskim kromatografom GC 7890B (Agilent Technologies, ZDA) sklopljenim z masno-selektivnim detektorjem MSD 5977A (Agilent Technologies, ZDA).

3.2. Metode dela

3.2.1. Priprava raztopin standardov merjenih spojin

Standardne raztopine preučevanih spojin smo pripravili tako, da smo zatehtali ustrezno količino spojine v 50 mL ali 100 mL bučko in jo dopolnili z MeOH do oznake (Preglednica X). Za lažje rokovanje s standardi smo nato iz vseh standardov (brez dodatka internega standarda) pripravili skupno standardno raztopino. Za njeno pripravo smo 50 μL vsakega standarda odpipetirali v 250 mL bučko in jo dopolnili z MeOH do oznake. Koncentracija vsakega bisfenola v 250 mL bučki je bila 10 $\mu\text{g/L}$. Za pripravo skupnega standarda za razširitev krivulje med 100 ng/L in 1000 ng/L smo odpipetirali 1 mL vsakega standarda v 250 mL bučko, koncentracija vsakega bisfenola v tej bučki pa je bila 200 $\mu\text{g/L}$.

Preglednica X: Zatehte posameznih bisfenolov za pripravo standarda in pripadajoče koncentracije v bučkah.

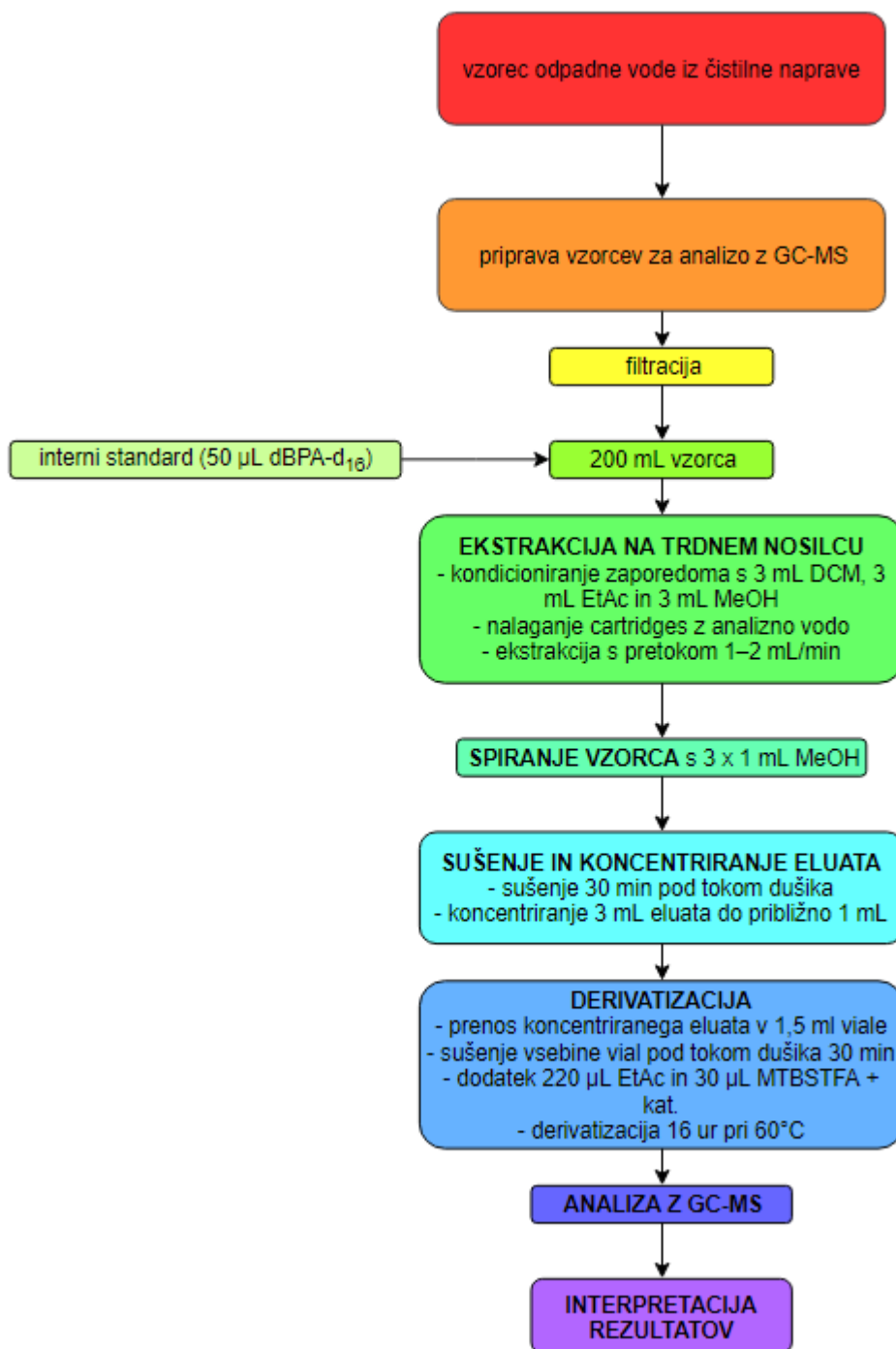
| ime spojine | zatehta (mg) | volumen bučke (mL) | koncentracija v bučki (mg/L) |
|-------------|--------------|--------------------|------------------------------|
| BPAF | 5,23 | 100 | 52,3 |
| BPAP | 5,12 | 100 | 51,2 |
| BPB | 2,56 | 50 | 51,2 |
| BPC | 5,14 | 100 | 51,4 |
| BPE | 5,40 | 100 | 54,0 |
| BPF | 5,35 | 100 | 53,5 |
| BPS | 5,32 | 100 | 53,2 |
| BPZ | 5,29 | 100 | 52,9 |

Ločeno smo pripravili raztopino dBPA in sicer smo odpipetirali 124 μL osnovne raztopine dBPA s koncentracijo 0,2018 mg/mL v 250 mL bučko. Tako smo dobili raztopino s

koncentracijo 0,1 mg/L. V vsak vodni vzorec smo odpipetirali 50 μ L tega standarda in tako dobili končno koncentracijo dBPA v vzorcu, to je 25 ng/L.

3.2.2. Postopek priprave vzorcev za GC-MS

Priprava vzorcev pred analizo z GC-MS je vključevala filtriranje vzorcev, ekstrakcijo na trdnih nosilcih (SPE), sušenje, kvantitativen prenos v vialo in derivatizacijo. Posamezne dele postopka bomo podrobneje predstavili v sledečih podpoglavjih, celotno shemo pa prikazuje Slika 7.



Slika 7: Shema postopka SPE in GC-MS.

VZORČENJE

Za validacijo smo uporabili umetno odpadno vodo (iztok) iz pilotnih bioloških reaktorjev. To smo storili zato, da smo zagotovili, da ta odpadna voda ne vsebuje bisfenolov. Pri posameznih analizah smo uporabili po 200 mL vzorca, razen na začetku, pred optimizacijo, ko smo uporabili 100 mL vzorca. Podrobnosti vzorčenja realnih vzorcev prikazujemo v poglavju 3.2.3.

FILTRIRANJE

Filtrirali smo s pomočjo vakuumske črpalke 220 V/50 Hz proizvajalca Millipore (ZDA). Najprej smo vzorec filtrirali skozi grobi filter iz steklenih vlaken z nedefinirano velikostjo por $< 1 \mu\text{m}$ proizvajalca Macherey-Nagel (Nemčija), nato pa še skozi celulozno-nitratni filter z velikostjo por $0,45 \mu\text{m}$ proizvajalca Sartorius Stedim Biotech (Nemčija).

EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU

Sorbent v kartušah smo najprej aktivirali s po 3 mL DCM, EtAc in MeOH. Pri tem smo bili pozorni na to, da je bil sorbent vedno omočen. Nato smo kartuše do vrha napolnili z analizno vodo.

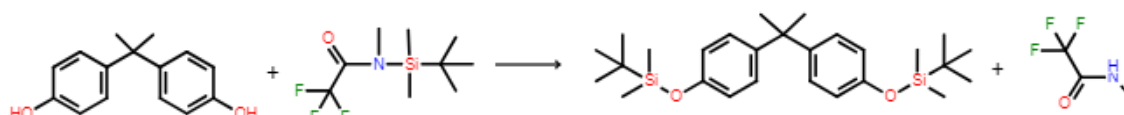
Sledila je priprava vzorcev v 250 mL steklenicah. Priprava vzorcev za posamezne eksperimente je opisana v podpoglavju 3.2.4. Preko cevk smo povezali kartuše in vzorce v steklenicah. S pomočjo vakuumske črpalke smo uravnali pretok skozi kartuše na približno 1–2 mL/min in nanесли vzorce na kartuše. Po nanosu vzorcev smo počakali, da so vsi vzorci stekli skozi in vsako steklenico sprali še z nekaj mL prečiščene vode.

Kadičko smo nato osušili in priklopili na vakuumsko črpalko. Počakali smo, da se je sorbent v kartušah posušil in postal sipek, kar je trajalo približno 45 minut.

Vzorce smo eluirali s 3 x 1 mL MeOH v eluirke, vsebino katerih smo nato sušili v toku dušika pri temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$, do približnega volumna 1 mL. Vsebino epruвет smo kvantitativno prenesli v steklene vialе in nato z 200 μL etilacetata sprali stene. Vzorce smo v toku dušika posušili do suhega. Sledila je derivatizacija vzorcev. Če vzorcev nismo derivatizirali in analizirali še isti dan, smo posušene ekstrakte shranili pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

DERIVATIZACIJA

V vialе smo odpipetirali 220 μL etilacetata in 30 μL *MTBSTFA* z 1 % *t*-BDMCS (Sigma-Aldrich, ZDA), jih zaprli s pokrovčkom in jih premešali na stresalniku. Nato smo jih derivatizirali 16 ur pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Reakcijo derivatizacije (na primeru BPA) prikazuje Slika 8.



Slika 8: Prikaz reakcije derivatizacije preiskovanih spojin na primeru BPA

ANALIZA Z GC-MS

Derivatizirane vzorce smo še enkrat premešali na stresalniku in jih nato analizirali s plinskim kromatografom GC 7890B (Agilent Technologies, ZDA) sklopljenim z masno-selektivnim detektorjem MSD 5977A (Agilent Technologies, ZDA). Pogoje analize navajamo v Preglednici XI.

Preglednica XI: Pogoji GC-MS analize

| | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| kromatografska kolona | HP-5MS Ultra Inert (Agilent, ZDA) |
| delovno območje kolone | 0 °C–325 °C (350 °C) |
| dimenzije kolone | 30 m × 250 μm × 0,25 μm |
| nosilni plin | helij |
| pretok nosilnega plina | 1 mL/min |
| hitrost nosilnega plina | 25.303 cm/s |
| način injiciranja | brez razdeljevanja |
| temperatura injektorja | 250 °C |
| temperatura vsebnika | 280 °C |
| volumen injiciranega vzorca | 1 μL |

Pred in po koncu vsakega sklopa analiz smo na GC-MS posneli tudi vzorec topila (EtAc). Temperaturni program pečice kromatografa je razviden iz Preglednice XII. Skupni čas pomeni celotni čas snemanja kromatogramov in spektrov.

Preglednica XII: Temperaturni program GC-MS analize

| začetna temperatura (°C) | hitrost naraščanja T (°C/min) | končna temperatura (°C) | pretečen čas (min) |
|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 120 | | 120 | 0 |
| 120 | 20 | 200 | 2 |
| 200 | 20 | 280 | 5 |
| 280 | 20 | 310 | 10 |
| | | | 17 (celotni čas) |

Pri analizi spojin smo uporabljali metodo SIM (Single Ion Monitoring oziroma metoda izbranih ionov), pri kateri snemamo le značilne ione za vsako spojino. Za vsako spojino smo izbrali tri ione, za potrditev prisotnosti posamezne spojine v vzorcu pa preverili prisotnost in razmerje odzivov vseh treh ionov. Kot odziv smo upoštevali površino pod kromatografskim vrhom. Za kvantifikacijo smo uporabili površino kromatografskega vrha, ki je ustrezala ionu z najvišjim odzivom (kvantifikacijski ion). Kvantifikacijski ion smo izbrali glede na to, kateri vrhovi v masnem spektru so bili značilni za določeno spojino, to pomeni, da se niso pojavili v spektrih več spojin. Tri od teh ionov smo uporabili za to, da smo preverili identiteto spojine. Kvantifikacijski ion smo nato izbrali glede na to, kateri vrh je imel v kromatogramu največjo površino in je bil najožji.

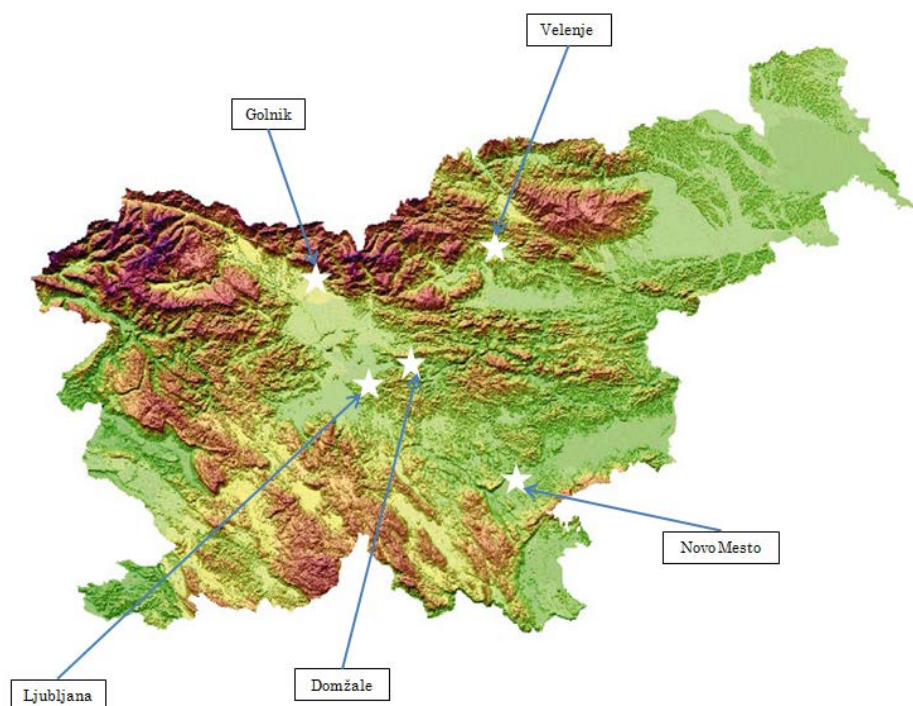
V Preglednici XIII so navedeni izbrani ioni za derivatizirane oblike spojin. Poleg izbranih značilnih ionov so v preglednici navedeni tudi retencijski časi.

Preglednica XIII: Karakteristični ioni za derivatizirane spojine in retencijski časi (ion za kvantifikacijo je v odebeljenem poševnem tisku)

| spojina | ion ₁ | ion ₂ | ion ₃ | t _r (min) |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|
| BPAF | 225 | 315 | 357 | 14,08 |
| BPAP | 269 | 503 | 518 | 22,48 |
| BPB | 221 | 441 | 470 | 17,37 |
| BPC | 263 | 469 | 484 | 17,5 |
| BPE | 235 | 427 | 442 | 16,05 |
| BPF | 179 | 221 | 428 | 15,8 |
| BPS | 229 | 379 | 478 | 22,28 |
| BPZ | 247 | 289 | 496 | 21,21 |
| dBPA-d ₁₆ | 452 | 453 | 470 | 16,3 |

3.2.3. Vzorčenje realnih vzorcev

Analizirali smo 24-urne časovno povprečne vzorce vtokov in iztokov petih čistilnih naprav, to so centralne čistilne naprave Ljubljana (CČN LJ), Šaleška dolina (CČN ŠD), Domžale – Kamnik (CČN DK), centralna čistilna naprava Novo mesto (CČN NM) in čistilna naprava Golnik (ČN G). Zemljevid lokacij ČN prikazuje Slika 9. Vzorci CČN DK in CČN LJ so poleg vtokov in iztokov (skupno 22) zajemali tudi trenutne vzorce glavnih dotokov tehnoloških voda, in sicer 13 v primeru CČN DK, 12 pa v primeru CČN LJ (Slika 10). Skupni nabor vzorcev je tako obsegal 47 vzorcev mešanih tehnoloških in komunalnih voda. Oznake in opisi vseh vzorcev so navedeni v Preglednici XIV. Pri parih vzorcev vtokov in iztokov iz ČN smo določili % odstranitve posamezne spojine. Izračunali smo ga iz iztoka ter pripadajočega vtoka s privozi, saj ta omogoča boljšo predstavo skupne koncentracije posamezne spojine kot samo vtok. To je zato, ker smo v okviru vzorčenj zajeli samo določene vzorce, ki smo jih izbrali kot potencialne vire bisfenolov, vtok s privozi pa zavzema tudi vire bisfenolov, ki jih nismo izbrali.

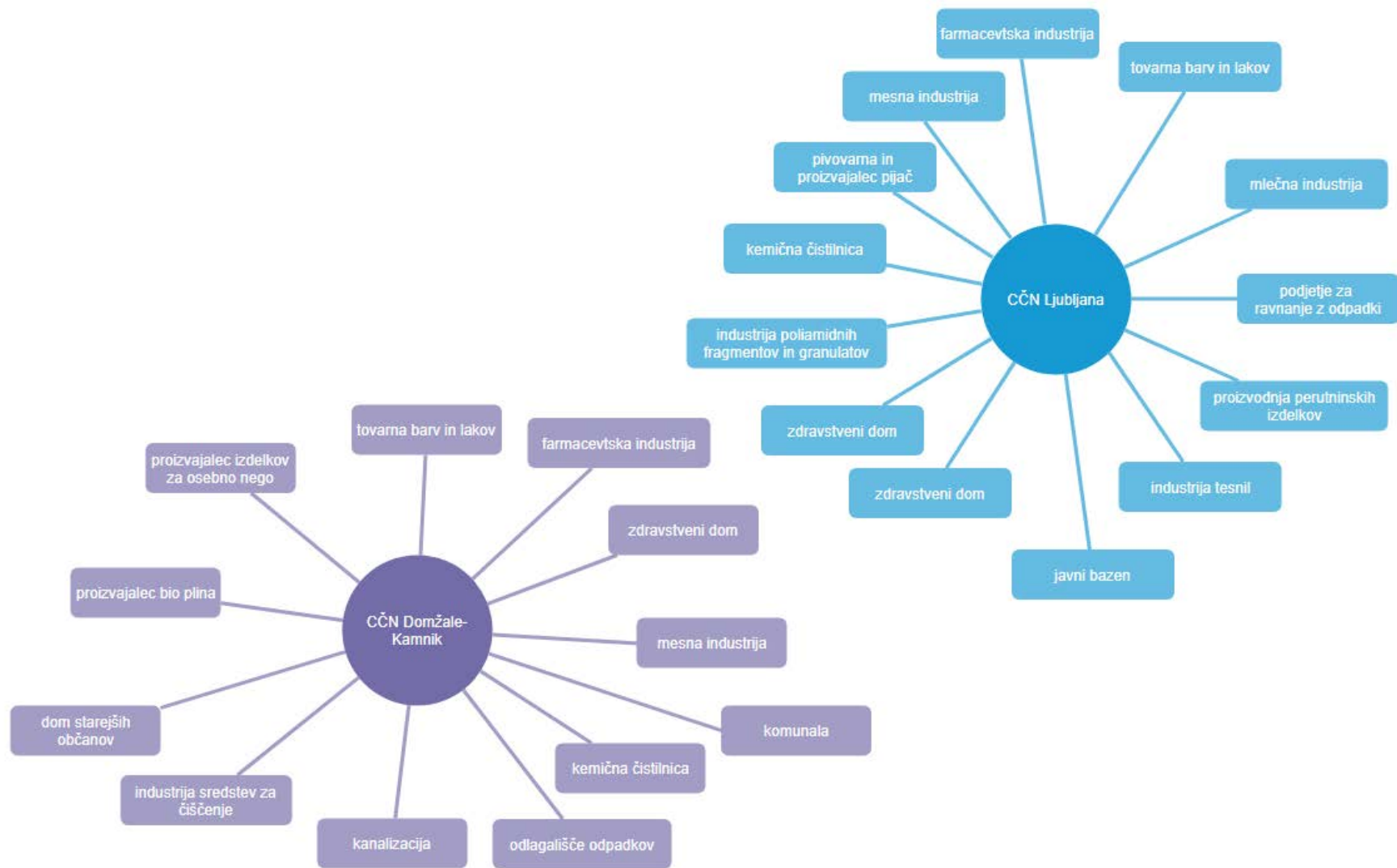


Slika 9: Zemljevid lokacij čistilnih naprav – prirejeno po (78)

V Preglednici XIV so predstavljene značilnosti vseh čistilnih naprav, njihova lokacija, tip čistilne naprave (način čiščenja), leto izgradnje in število populacijskih enot. Populacijska enota oziroma populacijski ekvivalent je enota za obremenjevanje vode, ki ustreza onesnaževanju, ki ga povzroči en prebivalec na dan. Slika 10 predstavlja shematski prikaz vseh pritokov iz industrijskih čistilnih naprav na CCN LJ in DK, iz preostalih treh ČN sta bila odvzeta vsakokrat samo po dva vzorca, to sta vtok in iztok, odvzeta v razmaku 24 ur.

Preglednica XIV: Značilnosti ČN

| ime čistilne naprave | tip čistilne naprave | leto izgradnje | število populacijskih enot (PE) |
|----------------------|---|-----------------------------|---------------------------------|
| CCN Ljubljana | mehansko biološka filtracija (1 stopnja) z anaerobno stabilizacijo blata | 1991 (nadgradnja 2006) | 360000 |
| CCN Domžale – Kamnik | mehansko biološka filtracija (2 stopnji) z anaerobno stabilizacijo blata | 1981 (nadgradnja 2014–2016) | 200000 |
| CCN Novo mesto | membransko biološki reaktor (biološko čiščenje in ultrafiltracija odpadnih vod) | 2012 (nova) | 55000 |
| CCN Šaleška Dolina | biofiltracija | 1990 | 50000 |
| ČN Golnik | mehansko biološka filtracija | / | 800 |



Slika 10: Shema pritokov industrij na CČN Ljubljana in CČN Domžale – Kamnik

Preglednici XV in XVI prikazujeta vse oznake in opise vzorcev. V preglednici XV so vsi privozi iz industrijskih obratov na CČN LJ in CČN DK, ki so vsi trenutni vzorci. Preglednica XVI prikazuje vse vtoke, iztoke in vtoke z dovozi za vseh 5 čistilnih naprav. Vsi ti vzorci so 24-urni povprečni vzorci, razen vzorcev LJ_Infl in LJ_Eff1, ki sta trenutna vzorca. Številka v oklepaju pomeni, da je vzorec del skupine vzorcev, ki so bili odvzeti na isti dan, v primeru (4) pa gre za vzorca, odvzeta v razmaku dveh dni. Oznaka LJ pomeni vzorce, odvzete iz CČN Ljubljana, DK vzorce, odvzete iz CČN Domžale – Kamnik, NM vzorce, odvzete iz CČN Novo mesto, medtem ko GO pomeni vzorce, odvzete iz ČN Golnik, VE pa vzorce, odvzete iz ČN Šaleška Dolina v Velenju. ZD pomeni zdravstveni dom, UKC pa Univerzitetni klinični center Ljubljana. Dotok pomeni zajem vzorca pred čiščenjem, iztok pomeni zajem vzorca po čiščenju. Privozi pomenijo odpadno vodo iz bližnjih industrij oziroma objektov, ki nimajo svoje lastne čistilne naprav in ki je do CČN bila pripeljana z vozilom.

Preglednica XV: Oznake in opisi vzorcev pritokov industrijskih obratov (trenutni vzorci)

| oznaka vzorca | opis vzorca | oznaka vzorca | opis vzorca |
|----------------------|---|----------------------|--------------------------------------|
| LJ_Pool | javni bazen | DK_Clean | proizvodnja čistilnih sredstev |
| LJ_Paint | tovarna barv in lakov | DK_Cloth | kemična čistilnica |
| LJ_Do | industrija tesnil | DK_Meat | mesna industrija |
| LJ_Mle | mlečna industrija | DK_Trash | odlagališče odpadkov |
| LJ_Far | farmacevtska industrija | DK_To | proizvajalec izdelkov za osebno nego |
| LJ_Beer | pivovarna in proizvajalec pijač | DK_Gas | proizvajalec bioplina |
| LJ_Gran | industrija poliamidnih fragmentov in granulativ | DK_Paint | tovarna barv in lakov |
| LJ_Hosp | bolnišnica | DK_Far | farmacevtska industrija |
| LJ_Trash | podjetje za ravnanje z odpadki | DK_Kom | komunala |
| LJ_Cloth | kemična čistilnica | DK_RetHome | dom starejših občanov |
| LJ_Health | zdravstveni dom | DK_Health | zdravstveni dom |
| LJ_Poultry | proizvodnja perutninskih izdelkov | DK_Canal | kanalizacija |
| LJ_Meat | mesna industrija | | |

Preglednica XVI: oznake in opisi vzorcev za dotoke, iztoke in dotoke s privozi vseh petih čistilnih naprav (24-urni povprečni vzorci, razen LJ_Inf1 in LJ_Eff1)

| oznaka vzorca | opis vzorca | oznaka vzorca | opis vzorca |
|---------------|---------------------|---------------|----------------------|
| LJ_Inf1 | vtok (trenutni) | DK_Inf+4 | dotok s privozi (4) |
| LJ_Eff1 | iztok (trenutni) | DK_Eff1 | dztok CČN DK (1) |
| LJ_Inf2 | vtok (24h) | DK_Eff2 | iztok CČN DK (2) |
| LJ_Eff2 | iztok (24 h) | DK_Eff3 | iztok CČN DK (3) |
| DK_Inf1 | dotok CČN DK (1) | DK_Eff4 | iztok CČN DK (4) |
| DK_Inf2 | dotok CČN DK (2) | NM_Inf | dotok Novo mesto |
| DK_Inf3 | dotok CČN DK (3) | NM_Eff | iztok Novo mesto |
| DK_Inf4 | dotok CČN DK (4) | GO_Inf | dotok Golnik |
| DK_Inf+1 | dotok s privozi (1) | GO_Eff | iztok Golnik |
| DK_Inf+2 | dotok s privozi (2) | VE_Inf | dotok Šaleška dolina |
| DK_Inf+3 | dotok s privozi (3) | VE_Eff | iztok Šaleška dolina |

Vzorci smo vzorčili na dva načina, in sicer smo vse pritoke pridobili s trenutnim vzorčenjem, medtem ko so bili vzorci s čistilnih naprav 24-urni časovno povprečni vzorci, pri čemer je med začetkom vzorčenja vtoka in iztoka preteklo 24 ur, z namenom upoštevanja zadrževalnega časa na posamezni čistilni napravi. Vsi vzorci so bili vzorčeni ob delovnikih. Trenutni vzorec je vzorec, ki se odvzame samo enkrat. Kompozitni vzorec oziroma sestavljeni vzorec je vzorec, ki je mešanica števila naključnih vzorcev za neko časovno obdobje, ponavadi 24 ur. Vzorce smo vzorčili med 21. 7. 2015 in 1. 10. 2015, do analize, ki smo jo izvedli med 1. 12. 2015 in 8. 2. 2016, pa so bili vzorci hranjeni pri – 20 °C.

3.2.4. Validacija analizne metode za določanje vsebnosti analogov bisfenola A v odpadni vodi

V sklopu validacije smo pripravili 2 kalibracijski krivulji, preverili mejo zaznavnosti (**LOD** – **L**imit **o**f **D**etection) in mejo kvantifikacije (**LOQ** – **L**imit **o**f **Q**uantification), določili izkoristek ekstrakcije, točnost kalibracijske krivulje ter ponovljivost instrumenta in metode.

Kalibracijsko krivuljo smo pripravili dvakrat, enkrat v območju 4–100 ng/L, drugič v območju 0–1000 ng/L. Odpipetirani volumni skupnih standardov in končne koncentracije v 200 mL vzorcev sintetične odpadne vode so prikazane v Preglednici XVII. Skupni standard pomeni mešanico standardov BPAF, BPAP, BPB, BPC, BPE, BPF, BPS in BPZ,

ki smo jo pripravili, ker bi bilo pipetiranje vsakega standarda posebej dolgotrajno in bi prispevalo k celokupni napaki določitve. Skupni standard smo pripravili po postopku, predstavljenem v poglavju 3.2.1. V vsak vzorec smo odpipetirali tudi 50 µL internega standarda devteriranega BPA-d₁₆ s koncentracijo 0,1 mg/L. Vzorce smo nato ekstrahirali po postopku, predstavljenem v poglavju 3.2.2.

Preglednica XVII: Odpipetirani volumni in koncentracije, uporabljene za kalibracijsko krivuljo

| koncentracija skupnega standarda (µg/L) | odpipetiran volumen (µL) | končna koncentracija v 200 mL (ng/L) |
|---|--------------------------|--------------------------------------|
| 10 | 80 | 4 |
| | 160 | 8 |
| | 500 | 25 |
| | 1000 | 50 |
| | 1500 | 75 |
| | 2000 | 100 |
| 200 | 250 | 250 |
| | 500 | 500 |
| | 750 | 750 |
| | 1000 | 1000 |

Za določitev LOD in LOQ smo pripravili 6 paralelk vzorcev umetne odpadne vode (slepi vzorci), v katere smo odpipetirali samo po 50 µL internega standarda in jih nato analizirali po postopku, predstavljenem v poglavju 3.2.2. LOD in LOQ smo izračunali po Enačbi 1, pri čemer σ označuje standardno deviacijo, S pa koeficient kalibracijske premice:

Enačba 1: Izračun LOD in LOQ:

$$LOD = \frac{3\sigma}{S} \quad LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

Izkoristek ekstrakcije smo preverili pri koncentracijah 20 ng/L in 80 ng/L. Za vsako koncentracijo smo pripravili 6 vzorcev. V tri vzorce umetne odpadne vode smo pred ekstrakcijo odpipetirali skupni standard preiskovanih spojin (400 µL za koncentracijo 20 ng/L, 1600 µL za koncentracijo 80 ng/L), v preostale 3 vzorce skupnega standarda preiskovanih spojin nismo dodali. Vzorce smo ekstrahirali po postopku, predstavljenem v podpoglavju 3.2.2., jih eluirali in kvantitativno prenesli v vialo. Nato smo v 3 slepe ekstrakte, to so bili vzorci, ki jim pred ekstrakcijo nismo dodali standardov preiskovanih spojin, dodali 400 oziroma 1600 µL skupnega standarda. V vse ekstrakte pa smo odpipetirali 50 µL internega standarda. Za izračun smo uporabili Enačbo 2.

Enačba 2: Izračun % ekstrakcije:

$$\% \text{ ekstrakcije} = 100 \times \frac{\frac{A_x}{A_{IS}} \text{ pred ekstrakcijo}}{\frac{A_x}{A_{IS}} \text{ po ekstrakciji}}$$

Indeks »pred ekstrakcijo« se nanaša na vzorce, v katere smo skupni standard dodali pred ekstrakcijo, indeks »po ekstrakciji« pa na vzorce, v katere smo skupni standard dodali po ekstrakciji.

Za izračun točnosti kalibracijske krivulje smo uporabili vzorce iz kalibracijske krivulje, ki smo jih preračunali po Enačbi 3. C_{dejanska} je koncentracija posamezne spojine v kalibracijski točki, odčitana iz kalibracijske krivulje, $C_{\text{kalibracija}}$ je dejanska koncentracija posamezne spojine v kalibracijski točki, preračunana iz zatehtane mase spojine. Da smo dobili %, smo rezultat enačbe pomnožili s 100.

Enačba 3: Izračun ujemanja koncentracij v kalibracijski krivulji z dejanskimi izmerjenimi koncentracijami:

$$\text{točnost} = (C_{\text{dejanska}} - C_{\text{kalibracija}}) / C_{\text{dejanska}}$$

Za preverjanje ponovljivosti instrumenta in metode smo po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2., pripravili vzorce s koncentracijama 25 ng/L in 100 ng/L (v treh paralelkah). Ponovljivost instrumenta smo preverili tako, da smo eno paralelko vsakega vzorca injicirali trikrat, ponovljivost metode pa tako, da smo zaporedoma injicirali 3 paralelke vzorca. Ponovljivost smo izrazili z relativno standardno deviacijo (RSD).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultate te študije smo objavili v članku (79) in o njih poročali na različnih domačih in tujih konferencah (80, 81, 82, 83). V nadaljevanju pa podajamo natančen opis rezultatov in naših opažanj pri merjenju in nadaljnjem vrednotenju koncentracij analogov BPA v odpadnih vodah.

4.1. Optimizacija postopka za analizo vzorcev z GC-MS

4.1.1. Optimizacija SPE

V začetnih eksperimentih smo analize izvajali na polovičnem volumnu vzorca, to je 100 mL. Nato smo količino vzorca povečali na 200 mL. Ta sprememba je pomenila, da so bile površine posameznih vrhov v kromatogramu večje, kar je omogočilo zaznavo nižjih koncentracij spojin in s tem boljšo občutljivost. Naslednja optimizacija, ki smo jo izvedli, je bilo povečanje števila točk v kalibracijski krivulji s 6 na 8. To je izboljšalo linearnost in s tem natančnost določanja koncentracij z uporabo kalibracijske krivulje. V nadaljevanju smo za določene vzorce, pri katerih so bile koncentracije določenih bisfenolov izven območja linearnosti, kalibracijsko krivuljo razširili na 12 točk.

LOD in LOQ vrednosti smo poskusili znižati z analizo večjih volumnov vzorcev (500 mL) na kartušah z večjo količino sorbenta Oasis HLB (6 cm³ s 500 mg sorbenta). Začetne analize so bile izvedene na 4-ih 200 mL slepih vzorcih in kartušah Oasis HLB 3 cm³ s 60 mg sorbenta. Slepe vzorce smo pripravili tako, da smo v vzorec iztoka iz bioreaktorjev odpipetirali interni standard dBPA-d₁₆. Kot poskus optimizacije smo analizo izvedli na 4-ih 500 mL slepih vzorcih in 6 cm³ kartušah. Rezultati niso pokazali bistvenih razlik v določenih LOD in LOQ, kar je pomenilo, da ni potrebe za uporabo večjih volumnov vzorca in večjih ter dražjih kartuš. Nato smo se odločili povečati število slepih vzorcev, analiziranih na kartušah velikosti 3 cm³ s 60 mg sorbenta, kar je močno izboljšalo LOD in LOQ. Ker število kartuš vpliva na ceno analize, tega v optimizirano metodo nismo vključili.

4.1.2. Optimizacija derivatizacije

V optimizaciji postopka derivatizacije smo preverili dve derivatizacijski sredstvi, in sicer N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamid (MTBSTFA) in MTBSTFA z 1 % terc-butildimetilklorosilan (*t*-BDMCS) kot katalizatorjem. Preostali parametri derivatizacije, kot so uporaba 220 µL EtAc kot topila, količina derivatizacijskega sredstva (30 µL) in 16

ur derivatizacije so ostali nespremenjeni. Uporaba derivatizacijskega sredstva s katalizatorjem je zadovoljivo povečala razmerja med površinami naših spojin v kromatogramu in površino internega standarda, zato smo derivatizacijsko sredstvo s katalizatorjem od takrat dalje uporabljali v vseh analizah. Strukturni formulami MTBSTFA in *t*-BDMCS sta prikazani na Sliki 11.



Slika 11: MTBSTFA in *t*-BDMCS

Katalizator je spojina, ki pospeši kemijsko reakcijo tako, da zniža njeno aktivacijsko energijo, zato ni potrebne toliko energije za potek reakcije, ki traja manj časa. To pa tudi pomeni, da je na neki določeni časovni točki reaktant ob dodatku katalizatorja pretvorjen v produkt z višjim izkoristkom, kar pomeni večje površine kromatografskih vrhov. Prav tako v našem konkretnem primeru katalizator izboljša stabilnost derivatov (84).

4.2. Validacija analizne metode

Analizno metodo smo validirali na podlagi več parametrov, katerih postopki so predstavljeni v poglavju 3.2.4. Najprej smo preverili ponovljivost metode, kakor tudi ponovljivost instrumenta, rezultati so predstavljeni v preglednicah XVIII in XIX.

Preglednica XVIII: Ponovljivost metode

| spojina | RSD v % (25 ng/L) | RSD v % (100 ng/L) |
|---------|-------------------|--------------------|
| BPAF | 14,3 | 4,92 |
| BPF | 8,72 | 5,33 |
| BPE | 8,02 | 4,08 |
| BPB | 3,11 | 6,98 |
| BPC | 8,70 | 23,9 |
| BPZ | 3,06 | 7,83 |
| BPS | 1,16 | 14,4 |
| BPAP | 13,4 | 10,7 |

Ponovljivost metode pomeni preverjanje napake pri analizi treh paralelk istega vzorca. RSD smo določili pri koncentraciji 25 ng/L od 1,16 do 14,3 % ter pri koncentraciji 100 ng/L od 3,49 do 23,9 %. Pričakovali smo, da bodo napake višje pri nižji koncentraciji, vendar je bila skoraj v polovici primerov (BPB, BPC, BPZ, BPS) napaka večja pri 100 ng/L. Vse napake so nižje od 25 %, najvišji RSD smo izračunali za BPC pri 100 ng/L (23,9 %), zato smo ocenili, da je ponovljivost metode ustrezna.

Preglednica XIX: Ponovljivost instrumenta

| spojina | RSD v % (25 ng/L) | RSD v % (100 ng/L) |
|---------|-------------------|--------------------|
| BPAF | 16,1 | 9,13 |
| BPF | 14,8 | 18,0 |
| BPE | 3,90 | 7,37 |
| BPB | 3,65 | 7,49 |
| BPC | 3,85 | 6,04 |
| BPZ | 4,64 | 7,33 |
| BPS | 4,58 | 12,5 |
| BPAP | 7,12 | 7,50 |

Ponovljivost instrumenta zagotovimo z določitvijo RSD pri trikratnem injiciranju iste paralelke vzorca. Napake pri koncentraciji 25 ng/L so v razponu med 3,65 in 16,1 %, pri 100 ng/L pa med 2,76 in 18,0 %. Kakor pri preverjanju ponovljivosti metode, smo tudi tu pričakovali večje napake pri nižji koncentraciji, a se je to zgodilo le pri BPAF. Vsi RSD so pod 25 %, zato ocenjujemo, da je metoda ustrezna.

V Preglednici XX je prikazana točnost oziroma odstopanje dejanske koncentracije od koncentracije na kalibracijski premici v %. Pričakovali smo, da je odstopanje manjše pri

višjih koncentracijah, vendar smo pri nekaterih spojinah opazili, da je bilo odstopanje manjše pri nižjih koncentracijah. Pri BPAP so bila vsa odstopanja nad 25 % (med 29,7 % in 46 %), sicer pa je BPAP bil edini izmed bisfenolov, ki je imel R^2 koeficient kalibracijske krivulje okoli 0,8, medtem ko so vsi ostali bisfenoli imeli koeficient vsaj nad 0,97. Prav tako ima BPAP najmanjše površine pod kromatografskimi vrhovi. BPB in BPE imata ravno tako odstopanja nad 25 %, vendar so ta bolj konstantna (predvsem pri BPF, v razponu 4,3 %), zato ni takšnega vpliva na rezultate.

Preglednica XX: Točnost v % pri šestih različnih koncentracijah

| spojina | 4 ng/L | 8 ng/L | 25 ng/L | 50 ng/L | 75 ng/L | 100 ng/L |
|---------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|
| BPAF | 7,11 | 6,01 | 8,07 | 27,8 | 17,1 | 21,2 |
| BPF | 27,8 | 29,7 | 30,4 | 33,9 | 32,1 | 29,6 |
| BPE | 31,8 | 22,4 | 24,1 | 30,1 | 27,0 | 25,9 |
| BPB | 14,6 | 20,5 | 20,0 | 22,2 | 25,2 | 17,5 |
| BPC | 5,58 | 8,54 | 2,55 | 16,4 | 13,2 | 15,6 |
| BPZ | 6,75 | 19,9 | 20,2 | 26,7 | 26,8 | 23,9 |
| BPS | 52,3 | 46,1 | 31,6 | 25,0 | 27,5 | 21,7 |
| BPAP | 29,7 | 46,0 | 40,0 | 36,5 | 37,0 | 33,2 |

Ustreznost kalibracijske krivulje smo preverjali v dveh paralelah. Rezultate predstavlja Preglednica XXI. Ustrezna vrednost R^2 je nad 0,995 (85), čemur ustrezajo kalibracijske krivulje vseh spojin v obeh paralelah. Največji preskok v vrednosti R^2 je viden pri BPAP, saj je imel ta na začetku analiz, ko smo šele določali število točk v kalibracijski krivulji in volumen vzorca, R^2 okoli 0,8.

Preglednica XXI: Koeficient premice, R^2 in n-vrednost za dve paraleli kalibracijske krivulje

| spojina | k | R^2 | n | | k | R^2 | n |
|---------|--------|-------|---------|--|--------|--------|---------|
| BPAF | 0,259 | 0,999 | -0,347 | | 0,241 | 0,9996 | -0,121 |
| BPF | 0,372 | 0,999 | 0,728 | | 0,399 | 0,9998 | 1,76 |
| BPE | 0,0464 | 0,997 | -0,0622 | | 0,0450 | 0,9996 | -0,0691 |
| BPB | 0,116 | 0,998 | 0,113 | | 0,129 | 0,9997 | -0,0250 |
| BPC | 0,0345 | 0,997 | 0,085 | | 0,0395 | 0,996 | 0,110 |
| BPZ | 0,0242 | 0,996 | 0,0780 | | 0,0328 | 0,999 | 0,131 |
| BPS | 0,0983 | 0,993 | 0,178 | | 0,128 | 0,9999 | 0,0593 |
| BPAP | 0,0298 | 0,998 | 0,0214 | | 0,0388 | 0,9997 | 0,00730 |

Preglednica XXII predstavlja izkoristek metode pri dveh koncentracijah, SD in RSD. Želeni izkoristek je čim bližje 100 %, čemur ustrezajo vse spojine pri obeh koncentracijah, razen BPC pri 80 ng/L, ki ima 56,1 % izkoristek. Za RSD ocenjujemo, da je ustrezen pri vrednostih pod 25 %, čemur ne ustrezata BPB in BPAP pri 20 ng/L. BPAP je bil že tekom

razvoja analizne metode najbolj problematična spojina tudi z vidika zaznavnosti. Kot vidimo v Preglednici XXI, je imel na začetku poskusov R^2 koeficient kalibracijske premice okoli 0,8 in tudi v končnih analizah je imel koeficient med nižjimi. BPAP se strukturno razlikuje od ostalih spojin. V svoji strukturni formuli ima dodaten benzenski obroč, ki morda sferično moti potek reakcije, zato reakcija ne poteče v celoti, s čimer je s tem izkoristek reakcije manjši.

Preglednica XXII: Izkoristek v %, SD in RSD

| spojina | 20 ng/L | | | 80 ng/L | | |
|---------|-------------|------|------|-------------|------|------|
| | povprečni % | SD | RSD | povprečni % | SD | RSD |
| BPAF | 97,0 | 9,22 | 9,51 | 86,8 | 12,3 | 14,2 |
| BPF | 96,6 | 13,1 | 13,5 | 81,4 | 11,5 | 14,1 |
| BPE | 95,5 | 10,5 | 11,0 | 82,5 | 11,5 | 13,9 |
| BPB | 93,5 | 14,3 | 15,3 | 84,7 | 12,6 | 14,9 |
| BPC | 83,3 | 25,6 | 30,8 | 56,1 | 8,12 | 14,5 |
| BPZ | 96,0 | 18,3 | 19,0 | 85,3 | 12,1 | 14,2 |
| BPS | 100 | 17,4 | 17,4 | 89,4 | 17,9 | 20,0 |
| BPAP | 79,1 | 32,3 | 40,9 | 86,8 | 14,9 | 17,2 |

Preglednica XXIII predstavlja določene LOD in LOQ. V literaturi smo našli podatke samo za LOD, zato dobljenih LOQ ne moremo primerjati z literaturnimi podatki. V enem izmed virov (57), kjer so določali vsebnost BPA in BPF v odpadnih in površinskih vodah, je bil LOD za oba podan kot interval med 30 in 35 ng/L, to pa zato, ker je bila preiskovana nova metoda ekstrakcije, pri kateri so uporabljali koacervate oktanojske, dekanoske, dodekanojske in tetradekanojske kisline. Ta metoda se zelo razlikuje od metode, ki smo jo razvili mi, zato je direktna primerjava LOD nerelevantna. V preostalih literaturnih podatkih za LOD (za BPAP nismo našli nobenih podatkov) se LOD gibljejo med 0,043 in 2,43 ng/L (42, 59), kar ustreza našim rezultatom.

Preglednica XXIII: Določena LOD in LOQ za preiskovane spojine

| | LOD (ng/L) | LOQ (ng/L) |
|------|-------------------|-------------------|
| BPAF | 0,777 | 1,85 |
| BPF | 0,47 | 1,28 |
| BPE | 0,207 | 0,465 |
| BPB | 0,234 | 0,549 |
| BPC | 0,346 | 0,786 |
| BPZ | 1,24 | 4,13 |
| BPS | 0,317 | 1,06 |
| BPAP | 0,529 | 1,24 |

4.3. Določanje vsebnosti analogov BPA v realnih vzorcih odpadnih vod

Z optimizirano in validirano metodo smo določili vsebnosti analogov BPA v 47 vzorcih odpadnih vod. V sledečih podpoglavjih smo vzorce in njihovo vsebnost merjenih spojin razdelili glede na njihove glavne vire (dotoki iz različnih obratov na CČN LJ in CČN DK), ter vtoke in iztoke petih slovenskih ČN.

4.3.1. Odpadne vode, ki izvirajo iz mesne, živilske, farmacevtske in splošne industrije ter zdravstvenih domov

Nabor tovrstnih vzorcev obsega 25 vzorcev odpadnih vod, ki izvirajo iz različnih vej industrije in zdravstvenih domov ter so glavni dotoki odpadnih vod na CČN LJ (n = 13) in CČN DK (n = 12). Vzorci so bili odvzeti s postopkom trenutnega vzorčenja. Prikazani so v Preglednicah XXIV in XXV. Vzorci so ločeni glede na izvor (ČN Ljubljana in Domžale – Kamnik).

Preglednica XXIV: Vsebnost preiskovanih spojin (ng/L) v dotokih industrije na CČN LJ

| spojina | LJ_Mle | LJ_Beer | LJ_Poultry | LJ_Meat | LJ_Pharm | LJ_Gran | LJ_Hosp | LJ_Health | LJ_Paint | LJ_Do | LJ_Pool | LJ_Trash | LJ_Cloth |
|---------|--------|---------|------------|---------|----------|---------|---------|-----------|----------|-------|---------|----------|----------|
| BPAF | 1,23 | 3,83 | <LOD | 49,0 | <LOD | <LOD | 1,25 | 26,2 | 0,964 | <LOD | 0,365 | 4,99 | <LOD |
| BPF | <LOD | <LOD | 1,19 | 19,3 | 5,24 | <LOD | 15,9 | 27,5 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 1,24 |
| BPE | <LOD | <LOD | 11,4 | 101 | 3,70 | 11,4 | <LOD | <LOD | <LOD | 0,878 | 0,877 | 28,3 | 21,3 |
| BPB | <LOD | <LOD | <LOD | 15,2 | <LOD | <LOD | 0,344 | 14,9 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 1,44 |
| BPC | <LOD | <LOD | <LOD | 2560 | 7,68 | <LOD | 5,86 | 175 | <LOD | <LOD | <LOD | 4,97 | 1,84 |
| BPZ | <LOD | <LOD | 2,52 | 87,1 | 1,47 | <LOD | <LOD | 159 | <LOD | 2,02 | <LOD | <LOD | <LOD |
| BPS | <LOD | <LOD | <LOD | 164 | <LOD | <LOD | <LOD | 34,6 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| BPAP | <LOD | 1,79 | <LOD | 33,8 | <LOD | 6,77 | <LOD | 84,6 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |

Preglednica XXV: Vsebnost preiskovanih spojin (ng/L) v dotokih industrije in zdravstvenih domov na CČN DK

| spojina | DK_Meat | DK_RetHome | DK_Health | DK_Pharm | DK_Paint | DK_Clean | DK_Cloth | DK_Trash | DK_To | DK_Gas | DK_Kom | DK_Canal |
|---------|---------|------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|--------|--------|----------|
| BPAF | 19,3 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 1,08 | 115 | 15,9 | 5,91 | <LOD | 27,7 | 3,01 |
| BPF | 26,0 | 15,8 | <LOD | <LOD | <LOD | 72,2 | 958 | 112 | <LOD | <LOD | 14,6 | 3,99 |
| BPE | 292 | 5,90 | 1,81 | <LOD | <LOD | 26,3 | <LOD | 128 | <LOD | 81,9 | 52,7 | <LOD |
| BPB | <LOD | 0,929 | 0,784 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 23,1 | 0,471 | 0,899 | 19,1 | 1,21 |
| BPC | 95,4 | 29,0 | 6,44 | <LOD | <LOD | 3,98 | 128 | 247 | <LOD | <LOD | 15,2 | <LOD |
| BPZ | 68,6 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 429 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| BPS | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 17,2 | <LOD | <LOD | <LOD | 30,1 | <LOD |
| BPAP | 73,4 | <LOD | <LOD | <LOD | 15,8 | <LOD | 55,2 | 46,7 | <LOD | 3,32 | <LOD | 2,96 |

Najvišje koncentracije, določene v štirih vzorcih, so:

- LJ_Meat (posebej izstopata koncentracija BPC z 2560 ng/L in koncentracija BPS s 164 ng/L),
- DK_Meat (posebej izstopa koncentracija BPE z 292 ng/L),
- DK_Cloth (izstopajo koncentracije BPAF s 115 ng/L, BPF z 958 ng/L in BPC s 128 ng/L) ter
- DK_Trash (izstopajo koncentracije BPF s 112 ng/L, BPE s 128 ng/L, BPC z 247 ng/L, BPZ s 429 ng/L).

Vse navedene koncentracije so izjemno visoke in izstopajo iz prve kalibracijske krivulje, ki je bila narejena v koncentracijskem območju med 0 in 100 ng/L. Ker so bile te koncentracije nad 100 ng/L, smo za pravilnost meritev kalibracijsko krivuljo razširili do 1000 ng/L. Pri ponovnem določanju koncentracije so bile vse koncentracije, z izjemo ene, v novem območju linearnosti. Koncentracija, ki je še vedno izstopala, je bila koncentracija BPC v vzorcu obrata LJ_Meat, zato je ta rezultat (zaradi linearnosti) podan zgolj kot ocena. Ne glede na to pa ta vrednost vidno izstopa (2560 ng/L) in je najvišja med vsemi določenimi bisfenoli v naši raziskavi.

V literaturi smo našli podatek, da se BPC uporablja najpogosteje v proizvodnji epoksi smol (39), ki se uporabljajo med drugim kot laki za avtomobile, in da je izredno močan adheziv. V primeru vzorca, kateremu smo določili najvišjo vsebnost BPC (LJ_Meat), gre za mesno predelovalni obrat, kjer pričakujemo, da se plastika večinoma uporablja kot ovojnina za mesne izdelke, kjer se uporabljajo analogi BPA kot plastifikatorji. Možno pa je, da BPC izhaja iz epoksi smol, ki se uporabljajo kot zaščitni sloj konzerv v mesni industriji.

V pregledu literature smo BPC zasledili v nekaj raziskavah, ki so se ukvarjale s preverjanjem njegove vsebnosti v okoljskih vzorcih, vendar niti v eni ni bila njegova vsebnost določena nad LOD. V raziskavah vsebnosti BPC v obojnini hrane in pijače je bil BPC vključen samo v eni raziskavi, ki se je ukvarjala s določanjem vsebnosti analogov BPA v pločevinkah alkoholnih in brezalkoholnih pijač. Kot prej omenjeno, je bila koncentracija BPC pod LOD (51).

Povišana koncentracija BPS v istem vzorcu se morda lahko razloži s tem, da je to antikorozi v kovinskih pločevinkah (48), možna ovojnina mesnih izdelkov pa, kot navedeno prej, ni samo plastika, ampak so tudi pločevinke.

Zanimive rezultate smo dobili tudi za vzorec DK_Trash. To je vzorec iz deponije odpadkov, ki vključujejo odpadke iz gospodinjstev oziroma različnih industrijskih obratov, trgovin, storitvenih in drugih dejavnosti. V tem vzorcu izstopajo koncentracije kar štirih bisfenolov, njihov vir pa je na osnovi podatkov, s katerimi smo razpolagali, težko določiti. Predvidevamo, da velik del h koncentraciji prispeva plastična ovojnina, pločevinke, termični papir, zelo verjetno tudi recikliran termični papir, ki se potem kasneje znajde tudi v časopisih, knjigah in revijah.

Preglednica XXVI podaja celokupno vsebnost spojin v seštevku vseh dotokov na CČN LJ in CČN DK.

Preglednica XXVI: Celokupne koncentracije (ng/L) preiskovanih spojin v pritokih na CČN LJ in CČN DK

| spojina | skupne koncentracije spojin v pritokih na CČN LJ | skupne koncentracije spojin v dotokih na CČN DK |
|----------------|---|--|
| BPAF | 87,8 | 185 |
| BPF | 70,5 | 1198 |
| BPE | 179 | 589 |
| BPB | 31,9 | 45,3 |
| BPC | 2753 | 526 |
| BPZ | 252 | 498 |
| BPS | 199 | 47,4 |
| BPAP | 127 | 194 |

Primerjava skupnih koncentracij spojin v pritokih na CČN Ljubljana in CČN Domžale – Kamnik (Preglednica XXVI) s koncentracijami 24-urno povprečnega vtoka na CČN Ljubljana (Preglednica XXIV) in CČN DK (Preglednica XXV) kaže na to, da so vrednosti seštevka vsebnosti posameznih bisfenolov iz posameznih virov odpadnih vod višje od vsebnosti posameznih bisfenolov na vtokih ČN, kar je razumljivo, saj se odpadna voda dolvodno redči. Poudarili bi še, da so bili vzorci pritokov na CČN vedno odvzeti na delovnik, vendar na različne dni. Poleg tega so pritoki na CČN vzorčeni trenutno, dotok na ČN pa 24-urno časovno proporcionalno. Zato smo lahko naredili le okvirno primerjavo; za natančnejšo bi morali biti vsi vzorci odvzeti na isti dan, ob isti uri in na isti način. Bolj primerno od trenutnega vzorčenja bi bilo časovno ali pretočno proporcionalno vzorčenje tekom nekaj ur (8 h ali celo 24 h).

4.3.2. Vtoki in iztoki CČN

Vzorci vtokov in iztokov so v tem poglavju obravnavani ločeno za posamezne ČN. Vsi vzorci, razen dveh vzorcev in sicer vtoka in iztoka iz CČN LJ, ki sta bila trenutno vzorčena, so bili odvzeti časovno proporcionalno z ustreznim časovnim zamikom (24 ur) med vzorčenjem vtoka in iztoka. Preglednica XXVII podaja vsebnosti posameznih bisfenolov v vtokih in iztokih CČN LJ ter odstotek (%) odstranitve posamezne spojine tekom čiščenja na posamezni ČN.

Preglednica XXVII: CČN Ljubljana, trenutni vtok in iztok, 24-urni kompozitni vtok in iztok, % odstranitve spojine (koncentracije so v ng/L)

| | trenutni | trenutni | % odstranitve spojine | 24h | 24h | % odstranitve spojine |
|------|----------|----------|-----------------------|---------|---------|-----------------------|
| | četrtek | četrtek | | torek | torek | |
| | LJ_Inf1 | LJ_Eff1 | | LJ_Inf2 | LJ_Eff2 | |
| BPAF | 4,97 | 7,04 | / | <LOD | 6,66 | / |
| BPF | 5,08 | <LOD | 95,38 | <LOD | <LOD | / |
| BPE | 4,74 | <LOD | 97,82 | <LOD | <LOD | / |
| BPB | <LOD | <LOD | / | 1,13 | <LOD | 89,60 |
| BPC | <LOD | <LOD | / | 4,18 | <LOD | 95,86 |
| BPZ | 1,64 | <LOD | 62,11 | 6,95 | <LOD | 91,09 |
| BPS | <LOD | <LOD | / | <LOD | <LOD | / |
| BPAP | <LOD | <LOD | / | <LOD | <LOD | / |

Vrednosti bisfenolov v vzorcih LJ_Inf1, LJ_Eff1, LJ_Inf2 in LJ_Eff2 so pod 8 ng/L, kar ustreza določenim koncentracijam bisfenolov v do zdaj objavljenih raziskavah, za vse bisfenole, razen za BPF (koncentracije v odpadnih vodah do 1,43 µg/L (31, 42, 57, 58, 59) in BPS (koncentracije do 0,746 µg/L) (31). V iztokih so vse vrednosti analogov bisfenolov pod LOD, razen v primerih BPAF (koncentracije 6,66 in 7,04 ng/L) (30).

Pri BPAF opazimo, da je koncentracija v iztoku nekoliko višja kot koncentracija v vtoku, vendar je razlika minimalna in v okviru napake.

Za pare vzorcev vtokov in iztokov smo izračunali % odstranitve posamezne spojine (Preglednica XXVII). V primerih, ko je bila koncentracija v vtoku > LOD in v iztoku < LOD, smo za koncentracijo v iztoku vzeli polovico LOD za spojino (86). Rezultati kažejo, da so bili odstotki odstranitve posameznih spojin v vseh primerih, razen v primeru BPZ v paru vzorcev LJ_Inf1 in LJ_Eff1, nad 89 %. V primerih, ko so bile koncentracije v vzorcih vtokov in iztokov < LOD (BPB, BPC, BPS, BPAP v trenutnih vzorcih, ter BPF, BPE, BPS, BPAP v 24-urnih kompozitnih vzorcih), deleža odstranitve spojine nismo računali.

V naslednjem sklopu vzorcev imamo po 4 vzorce vtokov, vtokov z dovozi in iztokov iz CČN DK. Oznaka Inf pomeni vtoke, Eff iztoke, Inf+ pa vtoke z dovozi. Vzorci z oznako dovozi predstavljajo dovoze odpadnih vod iz industrij, ki nimajo lastnih čistilnih naprav in jih pripeljejo na čistilno napravo s cisternami. Kot kaže Preglednica XXVIII, so bili vzorci odvzeti na 4 različne dni; vsak dan so bili odvzeti vzorci vtoka, vtoka s dovozi in iztoka. Edina izjema je vzorec DK_Eff4, ki je bil odvzet dva dni za pripadajočim vtokom in vtokom z dovozi (vzorca DK_Inf4 in DK_Inf+4). V Preglednici XXVIII so prikazane vsebnosti preučevanih spojin v posameznih vzorcih, prav tako pa tudi % odstranitvev spojin.

Preglednica XXVIII: Koncentracije spojin v vtokih, vtoki z dovozi in iztoki CČN DK (koncentracije so v ng/L)

| | 27. 7. 2015 | 27. 7. 2015 | 27. 7. 2015 | | 1. 9. 2015 | 1. 9. 2015 | 1. 9. 2015 | |
|------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|
| | sreda | sreda | sreda | | torek | torek | torek | |
| | DK_Inf1 | DK_Inf+1 | DK_Eff1 | % odstranitve spojine | DK_Inf2 | DK_Inf+2 | DK_Eff2 | % odstranitve spojine |
| BPAF | 11,4 | 23,0 | <LOD | 96,59 | 19,4 | <LOD | 9,53 | / |
| BPF | 15,1 | 18,7 | <LOD | 98,44 | 25,8 | <LOD | <LOD | / |
| BPE | 77,8 | 91,6 | <LOD | 99,87 | 215 | 3,17 | 0,326 | 89,74 |
| BPB | 16,3 | 15,1 | 0,566 | 96,53 | 17,8 | 0,439 | <LOD | 73,32 |
| BPC | <LOD | <LOD | 1,45 | / | 388 | 1,01 | <LOD | 82,80 |
| BPZ | 120 | 403 | <LOD | 99,48 | <LOD | <LOD | <LOD | / |
| BPS | <LOD | <LOD | <LOD | / | 41,5 | <LOD | <LOD | / |
| BPAP | <LOD | <LOD | <LOD | / | <LOD | 35,6 | 9,49 | 73,32 |
| | 9. 9. 2015 | 9. 9. 2015 | 9. 9. 2015 | | 22. 9. 2015 | 22. 9. 2015 | 24. 9. 2015 | |
| | sreda | sreda | sreda | | torek | torek | četrtek | |
| | DK_Inf3 | DK_Inf+3 | DK_Eff3 | % odstranitve spojine | DK_Inf4 | DK_Inf+4 | DK_Eff4 | % odstranitve spojine |
| BPAF | 5,08 | 29,8 | <LOD | 92,36 | <LOD | 8,20 | <LOD | / |
| BPF | 23,7 | 36,7 | <LOD | 99,01 | 7,08 | 15,2 | <LOD | 96,68 |
| BPE | <LOD | <LOD | 1,30 | / | 31,9 | 238 | 1,28 | 95,99 |
| BPB | 15,1 | 27,6 | 0,318 | 97,89 | 0,28 | 19,9 | 0,624 | -125,23 |
| BPC | <LOD | <LOD | <LOD | / | 0,743 | <LOD | <LOD | 76,72 |
| BPZ | <LOD | 290 | 2,70 | / | 91,2 | 199 | 85,7 | 5,99 |
| BPS | <LOD | <LOD | <LOD | / | <LOD | 40,6 | <LOD | / |
| BPAP | 99,9 | 83,7 | 3,17 | 96,83 | <LOD | 177 | <LOD | / |

Kot je razvidno iz preglednice XXVIII, so bili vsi vzorci odvzeti ob delovnikih. Če primerjamo vzorce z dne 27. 7. 2015, opazimo, da so koncentracije v vtoku s pritoki vedno višje, kot so koncentracije samo v vtokih (razen v primerih, kjer sta obe koncentraciji pod LOD), kar smo pričakovali zaradi redčitve dolvodno od mesta vzorčenja do ČN. V iztokih so vse koncentracije spojin, z izjemo BPB in BPC, pod LOD in % odstranitve spojin so v vseh primerih nad 99 %. V vzorcu DK_Inf+1 opazimo visoki koncentraciji BPE (91,6 ng/L) in BPZ (402 ng/L), kar pomeni, da je to eden izmed vzorcev, ki je vseboval najvišje koncentracije izbranih spojin.

V vzorcih, vzorčenih 1. 9. 2015, opazimo, da so koncentracije v vtoku višje kot koncentracije v vtoku z dovozi. Delež odstranitve spojin smo v tem primeru zato računali tako, da smo kot skupno koncentracijo vzeli koncentracijo v vtokih z dovozi. Pri vzorcu vtoka DK_Inf2 (1. 9. 2015) vidimo, da je koncentracija BPAF v vtoku višja, kot je koncentracija v vtoku z dotoki. To lahko razložimo tako, da je spojina v vtoku v visoki koncentraciji, prav tako pa na tej poti ni bilo nobenih drugih dotokov, ki bi bili vir te spojine oziroma vir te spojine v visokih koncentracijah.

V vzorcu DK_Inf2 opazimo visoke vsebnosti BPE in BPC. V vzorcih, vzorčenih 9. 9. 2015, izstopa visoka vsebnost BPZ v vzorcu DK_Inf+3. Vsi % odstranitve so nad 92 %. V izračunu % odstranitve za BPZ iz vzorcev DK_Inf4 in DK_Eff4 vidimo, da je % odstranitve te spojine samo 5,99 %. Ta nizek odstotek težko pripišemo slabi razgradljivosti te spojine, saj lahko to vrednost primerjamo samo z vzorci, odvzetimi 27. 7. 2015. V ostalih dveh setih vzorcev je bila namreč koncentracija BPZ v vtokih pod LOD, kar onemogoča izračun % odstranitve te spojine. V vzorcu DK_Inf+4 opazimo zelo visoke koncentracije spojin BPE, BPZ in BPAP. Ker se vse navedene spojine uporabljajo v različnih industrijah, predvsem pa kot monomerne enote za polimerne smole in ker imamo vzorce ČN, lahko sklepamo, da so tako visoke koncentracije spojin posledica velike količine pritokov iz raznih industrijskih obratov.

V vzorcih iztokov izstopa vzorec DK_Eff4, v katerem je BPZ v koncentraciji 85,7 ng/L. Koncentracije BPZ v vzorcih, vzorčenih med 22. 9. 2015 in 24. 9. 2015, so splošno gledano visoke, zato v tem primeru tega ne moremo pripisati naključju. BPZ je temperaturno zelo stabilna spojina in se uporablja pri izdelavi polikarbonatne plastike (49). Iz preglednic XXIII in XXIV je razvidno, da sta največja vira BPZ izmed dotokov na ČN

DK vzorca DK_Meat in DK_Trash, ki sta odpadni vodi iz mesne industrije in deponije. V mesni industriji bi lahko bil vir plastična ovojnina, v katero pakirajo mesne izdelke, v deponijo pa se zbira mnogo raznovrstnih odpadkov, ki so lahko vir teh spojin v izcednih vodah iz deponije.

Če se na splošno osredotočimo na % odstranitve posameznih spojin v vzorcih odpadnih vod, opazimo, da izstopajo predvsem vzorci, odvzeti 1. 9. 2015, in sicer v tem, da so % odstranitve sicer konstantni, med 70 % in 90 %, toda dosledno pod 90 % za BPE, BPB, BPC in BPAP. To velja tudi v primeru, v katerem smo za izračun % odstranitve uporabili vzorec DK_Inf+2, ker je imel vzorec DK_Inf2 nepričakovano višje koncentracije spojin. BPZ ima v enem primeru (vzorci, odvzeti 27. 7. 2015) odstotek odstranitve nad 99 %, v drugem primeru (vzorci, odvzeti 22. 9. 2015 in 24. 9. 2015) pa komaj okoli 6 %, v preostalih dveh primerih (vzorci, odvzeti 1. 9. 2015 in 9. 9. 2015) pa % nismo mogli izračunati, zato sklepamo, da je v primeru BPZ razgradnja zelo variabilna. Ker v pregledu literature glede njegove razgradnje nismo našli nobenih podatkov, tega pojava ne moremo podkrepiti z literaturnimi podatki. Zanimivi so tudi vzorci DK_Inf4, DK_Inf+4 in DK_Eff4, pri katerih moramo spet upoštevati, da niso bili vsi odvzeti na isti dan, kar je mogoče vzrok za nekoliko nenavadne rezultate. Odstranitev BPZ je bila naprimer zgolj 6 %. V primeru BPB pa smo sicer lahko izračunali % odstranitve, vendar je le-ta negativen, saj je koncentracija v vtoku nižja kot v iztoku. Vzrok bi lahko bilo trenutno vzorčenje, kjer se pogosto dogodi, da je spojina prisotna ob času vzorčenja v iztoku, v vtoku pa ne. V Preglednici XXIX so prikazane povprečne koncentracije proučevanih spojin v vtokih, vtokih z dovozi industrij in iztokih iz različnih dni za CČN DK ter ustrezni RSD-ji. Povprečna koncentracija je aritmetična sredina, pridobljena s seštevkom koncentracij ustreznih vzorcev in deljenjem s številom vzorcev.

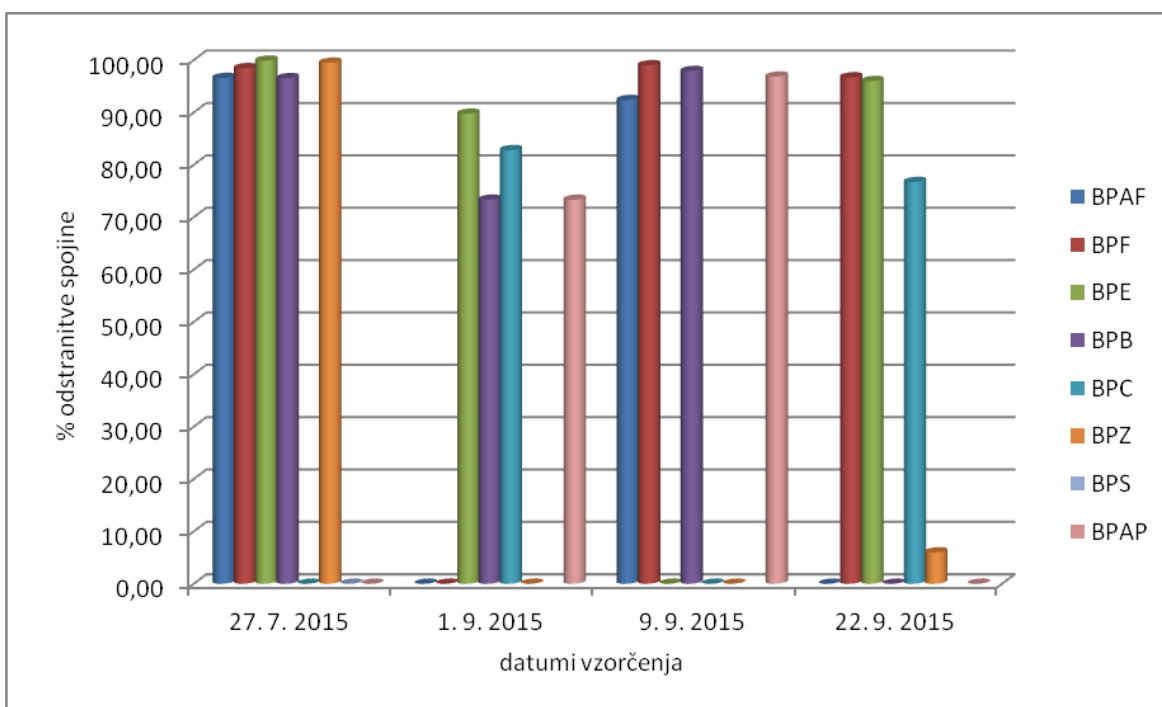
Preglednica XXIX: Povprečne koncentracije spojin v vzorcih, odvzetih na različne dni v vtokih, vtokih s pritoki in iztokih, ter ustrezni RSD-ji (koncentracije so v ng/L, RSD v %)

| spojina | vtoki (povp. konc.) | RSD | vtoki + dovozi (povp. konc.) | RSD | iztoki (povp. konc.) | RSD |
|---------|---------------------|------|------------------------------|------|----------------------|------|
| BPAF | 11,9 | 59,9 | 20,3 | 54,3 | 9,53 | / |
| BPF | 17,9 | 47,9 | 23,5 | 49,2 | < LOD | // |
| BPE | 108 | 88,0 | 111 | 107 | 0,967 | 57,4 |
| BPB | 12,4 | 65,8 | 15,8 | 72,6 | 0,503 | 32,4 |
| BPC | 194 | 141 | 1,0 | / | 1,45 | / |
| BPZ | 105 | 19,2 | 297 | 34,2 | 44,2 | 133 |
| BPS | 41,5 | / | 40,6 | / | < LOD | // |
| BPAP | 99,9 | / | 98,8 | 72,9 | 6,33 | 70,6 |

** / - samo ena koncentracija > LOD, // - vse koncentracije < LOD

Povprečne koncentracije spojin v vtokih, vtokih z dovozi iz različnih obratov in iztokih ustrezajo pričakovanju, da je vsebnost posameznih spojin v vtoku z dovozi višja kot v vtokih, obe koncentraciji pa sta tudi višji kot vsebnost v iztokih. Vzrok je verjetno tudi v tem, da pridejo med točko, kjer je bil vzorčen vtok in iztok, dodani še dovozi iz obratov. Pri BPC se pojavi anomalija, saj je povprečna koncentracija v vtokih z dotoki veliko nižja kot povprečna koncentracija v vtokih in nekoliko nižja kot povprečna koncentracija v iztokih. Pri BPS nismo mogli izračunati RSD v nobenem primeru, ker je bil v vtokih in vtokih z dovozi BPS nad LOD zaznan samo enkrat, v iztokih pa je bila koncentracija vedno pod LOD. Vidimo, da so RSD zelo visoke, kar pomeni, da koncentracije zelo nihajo, kar lahko pripišemo temu, da vzorci niso bili odvzeti na isti dan in ob istem času ter na isti način.

Na Sliki 12 je prikazana grafična primerjava % odstranitve spojin za vsak dan.



Slika 12: Odstranjevanje posameznih spojin med postopkom čiščenja na CČN DK

Za BPS nismo mogli izračunati % odstranitve spojine, saj sta bili koncentraciji v vtoku in iztoku vedno pod LOD; v vzorcih, vzorčenih 1. 9. 2015, sta bili to koncentraciji v iztoku in v vtoku z dovozi. Za BPZ smo lahko izračunali % odstranitve dvakrat, vendar gre v teh primerih za dva različna koncentracijska razreda, zato ne moremo zaključiti, da je obstoječe čiščenje CČN DK neučinkovito oz. manj učinkovito za to spojino in da iz tega izvira visoka variabilnost, ki je dobro razvidna iz Slike 12. Prav tako pa že majhna razlika v količini odstranjene spojine pomeni veliko razliko v % odstranitve (zaradi nizkih koncentracij), kar tudi prispeva k variabilnosti rezultatov.

V nadaljevanju (Preglednica XXX) obravnavamo vtoke in iztoke preostalih treh ČN, to so Novo mesto, Golnik in Šaleška dolina. Vsi vzorci so bili 24-urni časovno proporcionalni vzorci. CČN ŠD (vzorci iz Velenja) je bila zgrajena leta 1990 in od takrat še ni bila obnovljena. CČN LJ je bila posodobljena leta 2006, CČN DK pa med letoma 2014 in 2016. CČN LJ in CČN DK imata isti način čiščenja, tj. mehansko-biološko filtracijo z anaerobno sterilizacijo. ČN GO uporablja samo mehansko-biološko filtracijo, CČN ŠD uporablja biofiltracijo, CČN NM pa uporablja membransko-biološki reaktor. CČN GO je stara več kot 40 let in ni bila nikoli obnovljena.

Preglednica XXX: Koncentracije spojin v vzorcih (koncentracije v ng/L), pridobljenih v vtokih in iztokih CČN NM, CČN ŠD in ČN G

| | 6. 8. 2015 | 7. 8. 2015 | % ods. | 28. 8. 2015 | 28. 8. 2015 | % ods. | / | / | % ods. |
|------|------------|------------|--------|-------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| | NM_Inf | NM_Eff | | GO_Inf | GO_Eff | | VE_Inf | VE_Eff | |
| BPAF | <LOD | <LOD | / | <LOD | <LOD | / | <LOD | <LOD | / |
| BPF | 6,15 | <LOD | 96,2 | <LOD | <LOD | / | <LOD | <LOD | / |
| BPE | <LOD | 2,83 | / | <LOD | 5,62 | / | <LOD | 0,28 | / |
| BPB | 0,295 | <LOD | 60,3 | 2,65 | 1,51 | 43,2 | 0,431 | 0,192 | 55,4 |
| BPC | 11,8 | <LOD | 98,5 | <LOD | <LOD | / | <LOD | <LOD | / |
| BPZ | 4,66 | <LOD | 86,7 | <LOD | <LOD | / | <LOD | <LOD | / |
| BPS | <LOD | <LOD | / | <LOD | <LOD | / | 1,95 | <LOD | 91,9 |
| BPAP | <LOD | <LOD | / | 3,26 | 2,08 | 36,1 | <LOD | <LOD | / |

V vzorcih čistilnih naprav CČN NM, ČN G in ČN ŠD opazimo veliko nižje vsebnosti spojin kot v vzorcih CČN LJ in CČN DK (Preglednici XXIV in XXV), kar lahko pripišemo manjši poseljenosti in industrijsko manj obremenjenemu okolju. To lahko sklepamo tudi glede na podatke, prikazane v Preglednici XV, ki kažejo, da je skupno število populacijskih enot za te 3 ČN manjše kot število populacijskih enot CČN LJ in DK (vsake posebej). Ker so vsebnosti večine spojin na vtokih in iztokih teh ČN pod LOD, deleža odstranitve posameznih spojin v večini primerov ne moremo izračunati. Vseeno pa sklepamo, da je v primerjavi s CČN LJ in CČN DK % odstranitve spojin precej nižji in zelo niha (v LJ okoli 99 %, v Domžalah okoli 99 %, v vzorcih iz Novega mesta okoli 80 %, v vzorcih iz Golnika okoli 40 %, v vzorcih iz Velenja pa okoli 70 %), kar lahko pripišemo različnim tehnologijam čiščenja in letnici izgradnje oz. nadgraditve posamezne čistilne naprave. Poleg tega smo v veliko primerih obravnavali za vtok in iztok samo en vzorec, kar ne zadostuje za utemeljene zaključke glede uspešnosti čiščenja posamezne čistilne naprave.

5. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo za določanje osmih nadomestkov BPA v odpadnih vodah optimizirali in validirali analizno metodo, ki je vključevala ekstrakcijo na trdnem nosilcu, derivatizacijo in določitev s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrično detekcijo.

Analizni postopek je smo optimizirali s povečanjem volumna vzorca ter z uporabo večjega števila paralelnih vzorcev pri validaciji. Derivatizacijo smo optimizirali z zamenjavo derivatizacijskega sredstva *MTBSTFA* z uporabo istega derivatizacijskega sredstva z dodatkom katalizatorja *t*-BDMCS (1 %). To se je izrazilo v večjih površinah kromatografskih vrhov, višjim razmerjem med površinami naših bisfenolov in površino internega standarda in posledično nižjim LOD, kar je pripomoglo k boljši ločljivosti in večji zanesljivosti metode. V postopku validacije metode smo validirali parametre linearnosti, natančnosti, izkoristka metode, ponovljivosti metode in instrumenta ter LOD in LOQ.

Določene vrednosti LOD so primerljive z literaturnimi podatki (0,043 in 2,43 ng/L) in so bile od 0,207 do 1,24 ng/L za izbrane spojine. Optimizirano analizno metodo smo uporabili za določitev vsebnosti izbranih bisfenolov v 47 vzorcih odpadne vode iz petih slovenskih čistilnih naprav z različno konfiguracijo in letnico izdelave/nadgradnje. V naših vzorcih smo določili vseh 8 bisfenolov v vsaj enem vzorcu, medtem ko v pregledu literature vsebnost BPB, BPC, BPZ in BPAP nad LOD v analizah odpadnih voda nismo zasledili, pri čemer BPC in BPAP sploh nista bila vključena v analizne postopke njihove določitve v odpadnih vodah. To je zanimivo, ker je po pregledu naših rezultatov prav BPC tisti analog, ki je koncentracijsko najbolj izstopal z vsebnostjo 2,56 µg/L v vzorcu iz obrata predelovalne mesne industrije (LJ_Meat). Pojavnost bisfenolov v koncentracijskem redu µg/L je namreč bolj pričakovana za BPA kot za njegove nadomestke, ki so pričakovani v velikostnem razredu ng/L. Visoke vsebnosti smo določili tudi za BPZ z 403 ng/L v vzorcih vtoka na to ČN v primeru, ko so bili v vzorec zajeti tudi dovozi s cisternami (DK_Inf+1).

Bisfenoli, za katere najdemo v literaturi objavljene vsebnosti v odpadnih vodah, so BPAF, BPF, BPE in BPS. Najbolj razširjena analoga sta BPF in BPS. Njune vsebnosti v odpadnih vodah so v velikostnem razredu µg/L (za BPS 0–0,746 µg/L, za BPF 0–1,46 µg/L) in so primerljive z našimi določenimi vsebnostmi. Najvišja vsebnost za BPF v naših vzorcih je

bila sicer nižja od najvišje vsebnosti v pregledu literature in sicer je bila najvišja koncentracija 0,958 µg/L v iztoku obrata kemične čistilnice oblačil (DK_Cloth), prav tako smo zasledili nižje vsebnosti od literaturnih za BPS, ki je imel najvišjo koncentracijo 164 ng/L v vzorcu iz obrata predelovalne mesne industrije (LJ_Meat). BPE in BPAF imata v pregledu literature pričakovano koncentracijo v velikostnem razredu ng/L (BPE 0–8,06 ng/L, BPAF 0–13,2 ng/L). V naši raziskavi pa so bile koncentracije za obe spojini precej višje, pri čemer moramo upoštevati, da je bila koncentracija za BPAF (115 ng/L v DK_Cloth) absolutno najvišja, sledi pa ji koncentracija 27,7 ng/L (DK_Kom), ki pa je primerljiva z literaturnimi vrednostmi. BPE ima v naših analizah najvišjo vsebnost 292 ng/L (DK_Meat), vse ostale koncentracije pa so zelo enakomerno razporejene med LOD (0,207 ng/L) in 292 ng/L. Pomembno je poudariti, da smo v naši raziskavi najvišje vsebnosti določili v iztokih iz industrijskih obratov, ki predstavljajo bolj skoncentrirano odpadno vodo, literaturni podatki pa se nanašajo večinoma samo na iztoke čistilnih naprav, zato so vsebnosti v naši raziskavi pričakovano višje.

Na podlagi naših izsledkov in literaturne podlage zaključujemo, da v literaturi primanjkuje raziskav, ki se ne osredotočijo samo na BPA kot edini oz. glavni bisfenol. Glede na trenutno zakonodajo pričakujemo, da se bo v prihodnosti zvišala uporaba drugih analogov, morda bo celo prišlo do sinteze novih spojin v ta namen. Za ilustracijo vzemimo npr. BPC in BPZ, ki smo ju v naših analizah določili v zelo visokih koncentracijah (BPC – 2558 ng/L, BPZ – 403 ng/L), v pregledu literature pa sta bila v raziskavah komaj omenjena, npr. v pregledu vsebnosti bisfenolov v okoljskih vzorcih, medtem ko v pregledu učinkov analogov BPA na endokrini sistem sploh nista bila omenjena.

V prihodnje je pomembno slediti napredku industrije na tem področju in spremljati uporabo novih spojin v proizvodnji plastičnih materialov ter spremljati njihove vsebnosti in učinke na okolje. Pomemben je tudi razvoj sklopljenih metod kromatografije in masne spektrometrije, ki bodo omogočile nizke meje določitve in učinkovito hkratno določitev čimvečjega števila bisfenolov. Prav tako je pomemben tudi načrt sistematičnih raziskav učinkov teh spojin na endokrini sistem različnih organizmov (npr. ribe zebrice, zelene alge, bakterije *Vibrio fischeri*, celične linije), določitev maksimalnega dovoljenega dnevnega vnosa, kot je že določeno za BPA, nujno potrebno pa je morda tudi opozorilo na plastični ovojnini živil oz. na pločevinkah, da lahko ti materiali izlužujejo analoge BPA v živila.

VIRI

1. Regan F., Fogarty B.: Endocrine disrupting chemicals, *Encyclopaedia of Analytical Chemistry*, Wiley, USA, 2005, 495–502
2. <https://previews.123rf.com/images/annyart/annyart1707/annyart170700087/83045014-male-endocrine-system-human-anatomy-human-silhouette-with-detailed-internal-organs-vector-illustrati.jpg> (dostopano: 4. 3. 2018)
3. Know Your Estrogens and Your Body, <https://www.kingsrxandwellness.com/wp-content/uploads/2014/01/estrogen.jpeg> (dostopano: 4. 3. 2018)
4. Progesteron-Strukturformel, <https://de.depositphotos.com/13258948/stock-illustration-progesterone-structural-formula.html> (dostopano: 8. 9. 2018)
5. Yang O., Kim H.L., Weon J.-I., Seo Y.R.: Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis, *Journal of Cancer Prevention*, 2015, 20, 12–24
6. Ishikawa S.: Possible Roles of B1 Cells and Environmental Estrogens (Endocrine Disruptors) in the Development of Autoimmune diseases, *Allergology International*, 2005, 54, 499–505
7. Gramec Skledar D., Schmidt J., Fic A., Klopčič I., Trontelj J., Sollner Dolenc M., Finel M., Peterlin Mašič L.: Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S, *Chemosphere*, 2016, 157, 152–159
8. 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
9. Kwon B., Kho Y., Kim P.-G., Ji K.: Thyroid endocrine disruption in male zebrafish following exposure to binary mixture of bisphenol AF and sulfametoxazole, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 48, 168–174
10. Shi J., Jiao Z., Zheng S., Li M., Zhang J., Feng Y., Yin J., Shao B.: Long-term effects of Bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (*Danio rerio*), and the impact on offspring, *Chemosphere*, 2015, 128, 252–257

11. Song M., Liang D., Liang Y., Chen M., Wang F., Wang H., Jiang G.: Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere*, 2014, 112, 275–281
12. 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
13. Al-Saleh I., Elkhatib R., Al-Rajoudi T., Al-Qudaihi G.: Assessing the concentration of phthalate esters (PAEs) and bisphenol A (BPA) and the genotoxic potential of treated wastewater (final effluent) in Saudi Arabia, *Science of the Total Environment*, 2017, 578, 440–451
14. Eladak S., Grisin T., Moison D., Guerquin M.-J., N'Tumba-Byn T., Pozzi-Gaudin S., Benachi A., Livera G., Rouiller-Fabre V., Habert R.: A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound, *Fertil Steril*, 2015, 103, 11–21
15. Kuruto-Niwa R., Nozawa R., Miyakoshi T., Shiozawa T., Terao Y.: Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, 19, 121–130
16. Richard J., Boergers A., vom Eiser C., Bester K., Tuerk J.: Toxicity of the micropollutants Bisphenol A, Ciprofloxacin, Metoprolol and Sulfametoxazole in water samples before and after the oxidative treatment, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2004, 217, 506–514
17. Kang J.-H., Kondo F., Katayama Y.: Human exposure to bisphenol A, *Toxicology*, 2006, 226, 79–89
18. Staples C.A., Dorn P.B., Klecka G.M., O'Block S.T., Harris L.R.: A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A, *Chemosphere*, 1998, 36, 2149–2173
19. Rosenmai A. K., Dybdahl M., Pedersen M., van Vugt-Lussenburg B.M.A., Vedebye E.B., Taxvig C., Vinggaard A.M.: Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives?, *Toxicological Sciences*, 2014, 139, 35–37
20. Caliendo H.: History of BPA, <http://www.packagingdigest.com/food-safety/history-bpa> (dostopano: 6. 3. 2018)

21. Goldinger D.M., Demierre A.-L., Zoller O., Rupp H., Reinhard H., Magnin R., Becker T.W., Bourqui-Pittet M.: Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015, 71, 453–462
22. Fattore M., Russo G., Barbato F., Grumetto L., Albrizio S.: Monitoring of bisphenols in canned tuna from Italian markets, *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 83, 68–75
23. COMMISSION REGULATION (EU) No 2018/213 of 23 February 2018 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32018R0831&qid=1531707237536&from=EN> (dostopano: 10. 6. 2018)
24. COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0010&from=EN> (dostopano: 10. 6. 2018)
25. Bourgin M., Bichon E., Antignac J.-P., Monteau F., Leroy G., Barritaud L., Chachignon M., Ingrand V., Roche P., Le Bizec B.: Chlorination of bisphenol A: Non-targeted screening for the identification of transformation products and assessment of estrogenicity in generated water, *Chemosphere*, 2013, 93, 2814–2822
26. Chen P.-J., Linden K.G., Hinton D.E., Kashiwada S., Rosenfeldt E.J., Kullman S.W.: Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation, *Chemosphere*, 2006, 65, 1094–1102
27. Yu X., Xue J., Jao 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
28. Matsushima A., Liu X., Okada H., Shimohigashi M., Shimohigashi Y.: Bisphenol AF is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER α , but a Highly Specific Antagonist for ER β , *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118, 1267–1272
29. Cunha S.C., Fernandes J.O.: Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS), *Talanta*, 2010, 83, 117–125

30. Schmidt J., Kotnik P., Trontelj J., Knez Ž., Peterlin Mašič L.: Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes, *Toxicology in Vitro*, 2013, 27, 1267–1276
31. Sun Q., Wang Y., Li Y., Ashfaq M., Dai L., Xie X., Yu C.-P.: Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City, China, *Environmental Pollution*, 2017, 225, 542–549
32. Erjavec B., Hudoklin P., Perc K., Tišler T., Sollner Dolenc M., Pintar A.: Glass fiber-supported TiO₂ photocatalyst: Efficient mineralization and removal of toxicity/estrogenicity of bisphenol A and its analogs, *Applied Catalysis B: Environmental*, 2016, 183, 149–158
33. Sajiki J.: Decomposition of bisphenol-A (BPA) by radical oxygen, *Environment International*, 2001, 27, 315–320
34. González-Parra E., Herrero J.A., Elewa U., Bosch R.J., Arduána O., Egido J.: Bisphenol A in Chronic Kidney Disease, *International Journal of Nephrology*, 2013, 2013, 9 pages
35. Eid J.I., Eissa S.M., El-Ghor A.A.: Bisphenol A induces oxidative stress and DNA damage in hepatic tissue of female rat offspring, *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 2015, 71, 10–19
36. Özlem Ç.A., Hatice P.: Effects of bisphenol A on the Embryonic Development of Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*), *Environmental Toxicology*, 2008, 23, 387–392
37. Tang Z., Peng S., Hu S., Hong S.: Enhanced removal of bisphenol-AF by activated carbon-alginate beads with cetyltrimethyl ammonium bromide, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 495, 191–199
38. Regueiro J., Breidbach A., Wenzl T.: Derivatization of bisphenol A and its analogues with pyridine-3-sulfonyl chloride: multivariate optimization and fragmentation patterns by liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2015, 29, 1473–1484
39. Ike M., Chen M.-Y., Danzl E., Sei K., Fujita M.: Biodegradation of variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions, *Water Science & Technology*, 2006, 53, 153–159
40. Delfosse V., Grimaldi M., Pons J.-L., Boulahtouf A., le Maire A., Cavailles V., Labesse G., Bourguet W., Balaguer P.: Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A

- substitutes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109, 14930–14935
41. Pivnenko K., Pedersen G. A., Eriksson E., Astrup T.F.: Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper, Waste Management, 2015, 44, 39–47
 42. Fromme H., Kuchler T., Otto T., Pilz K., Müller J., Wenzel A.: Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment, Water Research, 2002, 36, 1429–1438
 43. Chen D., Kannan K., Tan H., Zheng Z., Feng Y.-L., Wu Y., Widelka M.: Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review., Environmental Science & Technology, 2016, 50, 5438–5453
 44. Wang H., Zhao Y.P., Zhu Y.J., Shen J.Y.: Spectral properties of bisphenol F based on quantum chemical calculations, Vacuum, 2016, 128, 198–204
 45. Cao G., Lu J., Wang G.: Photolysis kinetics and influencing factors of bisphenol S in aqueous solutions, Journal of Environmental Sciences, 2012, 24, 846–851
 46. Changkhamchom S., Sirivat A.: Synthesis and properties of sulfonated poly(ether ketone ether sulfone) (S-PEKES) via bisphenol S: Effect of sulfonation, Polymer Bulletin, 2010, 65, 265–281
 47. Gallart-Ayala H., Núñez O., Lucci P.: Recent advances in LC-MS analysis of food-packaging contaminants, Trends in Analytical Chemistry, 2013, 42, 99–124
 48. Kim M.R., Kim H.-S., Park D.-W., Lee J.-K.: Synthesis of cyclic carbonates based on diglycidyl ether of bisphenol S by quaternary ammonium salts, Reaction Kinetics and Catalysis Letters, 2001, 72, 373–381
 49. Rwei S.P., Kao S.C., Liou G.-S., Cheng K.-C., Guo W.: Curing and pyrolysis of epoxy resins containing 2-(6-oxido-6*H*-dibenz(*c,e*)(1,2)oxaphosphorin-6-yl)-1,4-naphthalenediol or bisphenol S, Colloid & Polymer Science, 2003, 281, 407–415
 50. Goyal N., Barman S., Bulasara V.K.: Quaternary ammonium salt assisted removal of genistein and bisphenol S from aqueous solution by nanozeolite NaY: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies, Journal of Molecular Liquids, 2016, 224, 1154–1162
 51. Regueiro J., Wenzl T.: Determination of bisphenols in beverages by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2015, 1422, 230–238

52. Cacho J.I., Campillo N., Viñas P., Hernández-Córdoba M.: Stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of bisphenols in canned beverages and filling liquids of canned vegetables, *Journal of Chromatography A*, 2012, 1247, 146–153
53. Wie der Plastikmüll Umwelt & Natur zerstört, <https://www.careelite.de/plastikmuell-umwelt-meer/> (dostopano: 12. 5. 2018)
54. When the Mermaids Cry: The Great Plastic Tide, <http://plastic-pollution.org> (dostopano: 12. 5. 2018)
55. Corrales J., Kristofco L.A., Steele W.B., Yates B.S., Breed C.S., Williams E.S., Brooks B.W.: Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation, Dose-Response, 2015, 13(3), 1–29
56. Alidina M., Hoppe-Jones C., Yoon M., Hamadeh A.F., Li D., Drewes J.E.: The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia, *Science of the Total Environment*, 2014, 478, 152–162
57. Ballesteros-Gómez A., Ruiz F.-J., Rubio S., Pérez-Bendito D.: Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coextractive extraction and liquid chromatography-fluorimetry, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 603, 51–59
58. Moral A., Sicilia M.D., Rubio S., Pérez-Bendito D.: Determination of bisphenols in sewage, based on supramolecular solid-phase extraction/liquid chromatography/fluorimetry, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1100, 8–14
59. Ruiz F.-J., Rubio S., Pérez-Bendito D.: Vesicular coextractive extraction of bisphenols and their diglycidyl ethers from sewage and river water, *Journal of Chromatography A*, 2007, 1163, 269–276
60. Lee S., Liao C., Song G.-J., Ra K., Kannan K., Moon H.-B.: Emission of bisphenol analogues including bisphenol A and bisphenol F from wastewater treatment plants in Korea, *Chemosphere*, 2015, 119, 1000–1006
61. Song S., Song M., Zeng L., Wang T., Liu R., Ruan T., Jiang G.: Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China, *Environmental Pollution*, 2014, 186, 14–19
62. Kassotis C.D., Alvarez D.A., Taylor J.A., vom Saal F.S., Nagel S.C., Tillitt D.E.: Characterization of Missouri surface waters near point sources of pollution reveals

- potential novel atmospheric route of exposure for bisphenol A and wastewater hormonal activity pattern, *Science of the Total Environment*, 2015, 524-525, 384–393
63. Stachel B., Ehrhorn U., Heemken O.-P., Lepom P., Reincke H., Sawald G., Theobald N.: Xenoestrogens in the river Elbe and its tributaries, *Environmental Pollution*, 2003, 124, 497–507
 64. 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
 65. Yamazaki E., Yamashita N., Taniyasu S., Lam J., Lam P.K.S., Moon H.-B., Jeong Y., Kannan 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
 66. Guart A., Bono-Blay F., Borrell A., Lacorte S.: Effect of bottling and storage on the migration of plastic constituents in Spanish bottled waters, *Food Chemistry*, 2014, 156, 73–80
 67. Deceuninck Y., Bichon E., Durand S., Bemrah N., Zendong Z., Morvan M.L., Marchand P., Dervilly-Pinel G., Antignac J.P., Leblanc J.C., Le Bizec B.: Development and validation of a specific gas chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of bisphenol A residues in large set of food items, *Journal of Chromatography A*, 2014, 1362, 241–249
 68. Grumetto L., Montesano D., Seccia S., Albrizio S., Barbato F.: Determination of Bisphenol A and Bisphenol B Residues in Canned Peeled Tomatoes by Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 10633–10637
 69. Česen M., Lambropoulou D., Laimou-Geraniou M., Kosjek T., Blaznik U., Heath D., Heath E.: Determination of Bisphenols and Related Compounds in Honey and Their Migration from Selected Food Contact Materials, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64, 8866–8875
 70. Larsson K., Björklund K.L., Palm B., Wennberg M., Kaj L., Lindh C.H., Jönsson B., Berglund M.: Exposure determinants of phthalates, parabens, bisphenol A and triclosan in Swedish mothers and their children, *Environment International*, 2014, 73, 323–333

71. Lee Y.J., Ryu H.-Y., Kim H.-K., Min C.S., Lee J.H., Kim E., Nam B.H., Park J.H., Jung J.Y., Jang D.D., Park E.Y., Lee K.-H., Ma J.-Y., Won H.-S., Im M.-W., Leem J.-H., Hong Y.-C., Yoon H.-S.: Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea, *Reproductive Toxicology*, 2008, 25, 413–419
72. Liao C., Liu F., Alomirah H., Loi V.D., Mohd M.A., Moon H.-B., Nakata H., Kannan K.: Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures, *Environmental Science and Technology*, 2012, 46, 6860–6866
73. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) Information, <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html> (dostopano: 12. 5. 2018)
74. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS), <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gcms.html> (dostopano: 12. 5. 2018)
75. Mathias J.: How Stuff Works: GC/MS Analysis, 2014, <https://www.innovatechlabs.com/newsroom/642/stuff-works-gcms-analysis/> (dostopano: 12. 5. 2018)
76. Dr. Bhanot D.: Benefits of Split/Splitless Injection, 2014, <http://lab-training.com/2014/02/06/benefits-of-split-splitless-injection-in-capillary-gas-chromatography/> (dostopano: 12. 5. 2018)
77. The CHROMacademy Essential Guide to Understanding Electron Ionization for GC-MS, 2011, https://www.chromacademy.com/Electron_Ionization_for_GC-MS_Essential_Guide.html?tpm=1_2 (dostopano: 12. 5. 2018)
78. Zemljevidi Republike Slovenije, http://www.hervardi.com/zemljevidi/slovenija_relief.jpg (dostopano: 12. 5. 2018)
79. Česen M., Lenarčič K., Mislej V., Levstek M., Kovačič A., Cimrmančič A., Uranjek N., Kosjek T., Heath D., Sollner Dolenc M., Heath E.: The occurrence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters, *Science of The Total Environment*, 2018, 616–617, 744–752
80. Česen M., Lenarčič K., Mislej V., Stražar M., Sollner Dolenc M., Kovačič A., Gys C., Lambropoulou D.A., Laimou-Geraniou M., Blaznik U., Snoj Tratnik J., Mazej D., Horvat M., Covaci A., Heath D.J., Kosjek T., Heath E.: BPA and its alternatives in environment, food and biological fluids. V: Program book and abstracts, 46th

- International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2017, November 5–9, 2017, Jeju, Korea
81. Česen M., Lenarčič K., Mislej V., Stražar M., Sollner Dolenc M., Kovačič A., Heath D.J., David John, Gys C., Lambropoulo D.A., Laimou-Geraniou M., Blaznik U., Covaci A., Heath E.: The occurrence and fate of bisphenols in the environment and food. V: 10th Micropol & Ecohazard Conference 2017, 17–20 September, 2017, Vienna, Austria
 82. Kosjek T., Česen M., Lenarčič K., Mislej V., Stražar M., Sollner Dolenc M., Kovačič A., Heath D.J., Druškovič J., Prosen H., Gys C., Covaci A., Heath E.: The occurrence and fate of bisphenols in the environment and food. V: Sollner Dolenc M. (ur.), Peterlin-Mašič L. (ur.): Okoljska onesnažila in komunikacija tveganja = Environmental pollutants and risk communication : [zbornik povzetkov], 3. kongres Slovenskega toksikološkega društva, Ljubljana, 28. 9. 2017
 83. Kosjek T., Česen M., Lenarčič K., Mislej V., Stražar M., Sollner Dolenc M., Kovačič A., Heath D.J., Druškovič J., Prosen H., Gys C., Covaci A., Heath E.: Pojavnost in kroženje bisfenolov med čiščenjem odpadnih vod = Occurrence and fate of bisphenols during wastewater treatment. V: Sollner Dolenc M. (ur.), Peterlin-Mašič L. (ur.): Okoljska onesnažila in komunikacija tveganja = Environmental pollutants and risk communication : [zbornik povzetkov], 3. kongres Slovenskega toksikološkega društva, Ljubljana, 28. 9. 2017
 84. <https://www.linscottsdirectory.com/products/covachem-llc/MTBSTFA-with-1-TBDMCS-3529118> (dostopano: 31. 7. 2018)
 85. APPENDIX 1 – ORA Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Methods, <https://www.fda.gov/downloads/scienceresearch/fieldscience/laboratorymanual/ucm292774.pdf> (dostopano: 16. 8. 2018)
 86. Nordic Council of Ministers, Recommendations for Intake Calculations of Food Additives and Contaminants, TemaNord, 2001, 574, Nordic Council of Ministers, Copenhagen (dostopano: 12. 5. 2018)

87. Ballesteros O., Zafra A., Navalón A., Vílchez J.-L.: Sensitive gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples, *Journal of Chromatography A*, 2006, 1121, 154–162
88. U.S. National Library for Biotechnology Information 2001, PubChem (Open Chemistry Database), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (dostopano: 7. 3. 2018)
89. 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

PRILOGA 1

FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI BISFENOLOV

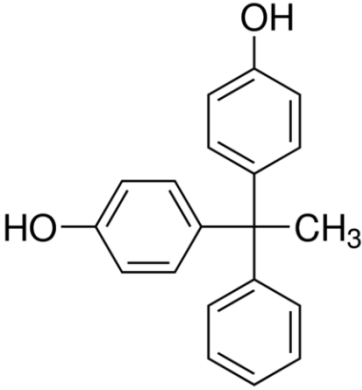
Preglednica XXXI: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPA

| BPA | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|-----|------------------------------|---------|------------|
| | molska masa (g/mol) | 228.29 | 43 |
| | pKa | 9.7 | 43 |
| | topnost v vodi (mg/L) | 120–300 | 87, 12, 88 |
| | logKow (mL/g) | 3.43 | 43 |
| | logKoc (mg/L) | 3.8 | 88 |
| | AOt1/2 (dni) | 0.067 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 172.7 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 172.8 | 43 |

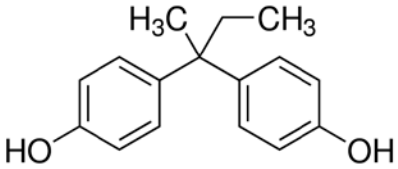
Preglednica XXXII: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPAF

| BPAF | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|------|------------------------------|-------------|------|
| | molska masa (g/mol) | 336.23 | 43 |
| | pKa | 8.74 | 43 |
| | topnost v vodi (mg/L) | ni na voljo | / |
| | logKow (mL/g) | 4.47 | 43 |
| | logKoc (mg/L) | 3.7 | 88 |
| | AOt1/2 (dni) | 0.067 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 639 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 643 | 43 |

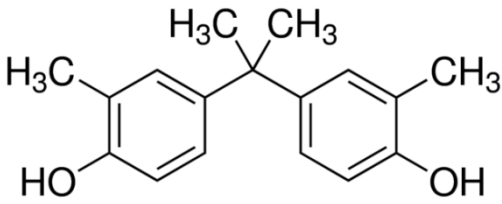
Preglednica XXXIII: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPAP

| BPAP | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|---|------------------------------|-------------|------|
|  | molska masa (g/mol) | 290.36 | 43 |
| | pKa | 10.2 | 43 |
| | topnost v vodi (mg/L) | ni na voljo | / |
| | logKow (mL/g) | 4.86 | 43 |
| | logKoc (mg/L) | 4.6 | 88 |
| | AOt1/2 (dni) | 0.063 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 250 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 250 | 43 |

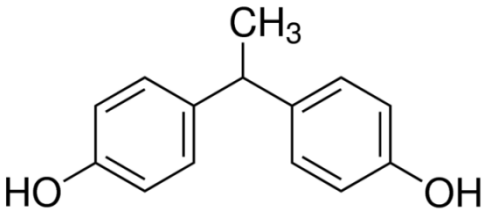
Preglednica XXXIV: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPB

| BPB | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|---|------------------------------|-------------|------|
|  | molska masa (g/mol) | 242.31 | 43 |
| | pKa | 10.3 | 43 |
| | topnost v vodi (mg/L) | ni na voljo | / |
| | logKow (mL/g) | 4.13 | 43 |
| | logKoc (mg/L) | ni na voljo | / |
| | AOt1/2 (dni) | 0.066 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 170 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 170 | 43 |

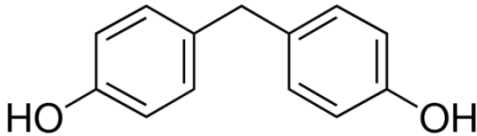
Preglednica XXXV: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPC

| BPC | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|---|------------------------------|-------------|------|
|  | molska masa (g/mol) | 256.34 | 43 |
| | pKa | ni na voljo | / |
| | topnost v vodi (mg/L) | ni na voljo | / |
| | logK _{ow} (mL/g) | 4.74 | 43 |
| | logK _{oc} (mg/L) | ni na voljo | / |
| | AO _{t1/2} (dni) | 0.054 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 113 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 113 | 43 |

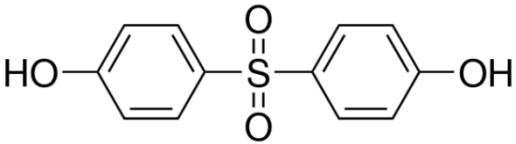
Preglednica XXXVI: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPE

| BPE | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|---|------------------------------|-------------|------|
|  | molska masa (g/mol) | 214.26 | 43 |
| | pKa | 10.1 | 43 |
| | topnost v vodi (mg/L) | ni na voljo | / |
| | logK _{ow} (mL/g) | 3.19 | 43 |
| | logK _{oc} (mg/L) | 4.7 | 88 |
| | AO _{t1/2} (dni) | 0.065 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 45.6 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 45.6 | 43 |

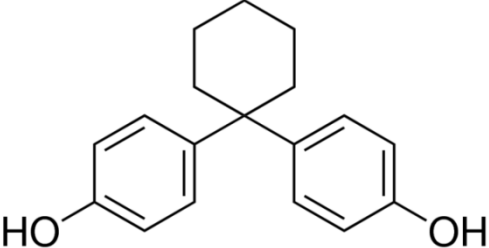
Preglednica XXXVII: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPF

| BPF | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|---|------------------------------|-------------|------------|
|  | molska masa (g/mol) | 200.23 | 43 |
| | pKa | 9.91 | 43 |
| | topnost v vodi (mg/L) | 190–360 | 87, 12, 88 |
| | logK _{ow} (mL/g) | 3.06 | 43 |
| | logK _{oc} (mg/L) | ni na voljo | / |
| | AO _{t1/2} (dni) | 0.065 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 28.0 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 28.0 | 43 |

Preglednica XXXVIII: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPS

| BPS | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|---|------------------------------|-----------|------------|
|  | molska masa (g/mol) | 250.27 | 43 |
| | pKa | 7.64 | 43 |
| | topnost v vodi (mg/L) | 1000–1100 | 87, 12, 88 |
| | logK _{ow} (mL/g) | 1.65 | 43 |
| | logK _{oc} (mg/L) | 3.5 | 88 |
| | AO _{t1/2} (dni) | 0.368 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 3.54 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 3.35 | 43 |

Preglednica XXXIX: Strukturna formula in fizikalno-kemijske lastnosti BPZ

| BPZ | FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI | | VIRI |
|---|------------------------------|-------------|------|
|  | molska masa (g/mol) | 268.35 | 43 |
| | pKa | 9.97 | 43 |
| | topnost v vodi (mg/L) | ni na voljo | / |
| | logK _{ow} (mL/g) | 5.00 | 43 |
| | logK _{oc} (mg/L) | ni na voljo | / |
| | AO _{t1/2} (dni) | 0.062 | 43 |
| | BCF (kg/L) | 271 | 43 |
| | BAF (kg/L) | 271 | 43 |