

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**JURE BERGLES**

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE BERGLES

**OPTIMIZACIJA METODE MERJENJA VSEBNOSTI HORMONSKIH  
MOTILCEV V POVRŠINSKIH IN ODPADNIH VODAH**

**OPTIMIZATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF  
ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS IN SURFACE AND WASTE WATER**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani in Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan pod mentorstvomizr. prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Ester Heath.

*Mentorici,izr. prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorici dr. Ester Heath se iskreno zahvaljujem za strokovno vodenje in vsestransko pomoč pri izdelavi diplomske naloge.*

*Najlepše se zahvaljujem tudi Silvi Perko, za veliko praktičnih nasvetov in pomoč pri delu v laboratoriju.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvomizr. prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Ester Heath.

Jure Bergles

Ljubljana, marec 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Članica diplomske komisije:izr. prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

## VSEBINA

1. POVZETEK.....	1
2. SEZNAM OKRAJŠAV .....	2
3. UVOD.....	4
3.1. HORMONSKI MOTILCI.....	4
3.1.1. Alkilfenoli.....	7
3.1.2. Bisfenol A.....	10
3.1.3. Steroidni estrogeni.....	11
3.2. ANALIZNI POSTOPEK ZA DOLOČANJE HORMONSKIH MOTILCEV V POVRŠINSKIH IN ODPADNIH VODAH.....	13
3.2.1. Izolacija in koncentriranje vzorcev.....	13
3.2.2. Derivatizacija.....	17
3.2.3. Separacija in identifikacija.....	18
3.2.4. Kvantitativna analiza.....	22
4. NAMEN DELA .....	24
5. MATERIALI IN METODE.....	25
5.1. MATERIALI.....	25
5.2. APARATURA.....	26
5.3. METODE DELA.....	26
5.3.1. Priprava raztopin standardov.....	26
5.3.2. Priprava vzorcev na GC-MSD analizo.....	26
5.3.3. Pogoji meritev.....	27
5.3.4. Analiza okoljskih vzorcev.....	28
6. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	31
6.1. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA.....	31
6.1.1. Izbira ekstrakcijskega nosilca.....	31
6.1.2. Vpliv koncentracije vzorcev na izkoristek ekstrakcije.....	34
6.1.3. Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije.....	35
6.1.4. Izbira topila za elucijo.....	37
6.1.5. Optimizacija volumna topila za elucijo.....	38
6.2. OPTIMIZACIJA DERIVATIZACIJE.....	39
6.2.1. Izbira derivatizacijskega reagenta.....	40
6.2.2. Izbira topila za derivatizacijo.....	42
6.2.3. Optimizacija temperature in časa segrevanja.....	44
6.2.4. Določitev ustreznega volumna derivatizacijskega reagenta.....	44
6.3. OPTIMIZACIJA TEMPERATURNEGA PROGRAMA ZA SEGREVANJE PEČI PLINSKEGA ANALIZATORJA.....	45
6.4. INTERPRETACIJA MASNIH SPEKTROV SPOJIN.....	46
6.5. VALIDACIJA ANALIZNE METODE.....	52
6.5.1. Potrditev identitete.....	53
6.5.2. Linearnost in občutljivost.....	53
6.5.3. Meja zaznavnosti in meja določljivosti.....	56
6.5.4. Natančnost.....	57
6.6. ANALIZA OKOLJSKIH VZORCEV.....	58
6.6.1. Analiza površinskih vod.....	58
6.6.2. Analiza odpadnih vod.....	61

7. SKLEP .....	67
8. LITERATURA .....	69
9. PRILOGA .....	74

## 1. POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo preučevali 7 spojin, ki povzročajo motnje v hormonskem sistemu in katerih prisotnost v okolju predstavlja nevarnost za žive organizme. Preučevane spojine sodijo v 3 različne kemijske skupine, to so alkilfenoli (4-terc-oktilfenol, 4-nonilfenol), hidroksilirani difenilalkani (bisfenol A) in steroidni estrogeni (estron, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinil estradiol, estriol). Vse spojine imajo estrogeno delovanje, njihovo razširjenost v okolju pa so potrdili že v številnih državah.

Glavna naloga diplomskega dela je bila optimizacija analizne metode za merjenje vsebnosti preučevanih hormonskih motilcev v površinskih in odpadnih vodah. Pri tem smo morali upoštevati razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih preučevanih analitov in kompleksnost okoljskih vzorcev.

Analizni postopek določanja preučevanih hormonskih motilcev delimo na 3 dele: ekstrakcijo, derivatizacijo in GC-MSD analizo. V prvi stopnji izoliramo tarčne spojine iz vzorcev. Za to uporabimo ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE), ki poleg izolacije omogoča sočasno koncentriranje vzorca. Za analizo vodnih vzorcev smo izbrali najboljši ekstrakcijski nosilec in topilo za spiranje, določili vpliv pH in koncentracije vzorca ter volumna topila za spiranje na izkoristek ekstrakcije. V postopku derivatizacije smo z ustreznimi reagenti, topili in reakcijskimi pogoji zagotovili optimalen potek reakcije. Zadnja stopnja je GC-MSD analiza, s katero smo kvalitativno in kvantitativno vrednotili dobljene rezultate. Pri tej stopnji smo optimizirali temperaturni program GC-MSD instrumenta, s katerim smo dosegli zadovoljivo kromatografsko ločbo analitov in izbrali fragmentne ione za SIM analizo.

Po končani optimizaciji smo metodo validirali in uporabili za analizo vzorcev površinskih in odpadnih vod. Na osnovi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je optimizirana in validirana analizna metoda primerna za analizo vzorcev površinskih vod in kompleksnih vodnih vzorcev, kot so odpadne vode.

## 2. SEZNAM OKRAJŠAV

AED – atomski emisijski detektor

CI – kemijska ionizacija

CRM – certificirani referenčni material

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DCM – diklormetan

ECD – način detekcije z zajetjem elektronov

EDC – hormonski motilci

EI – ionizacija z elektroni

ER<sub>α</sub> – estrogenski receptor tipa α

ER<sub>β</sub> – estrogenski receptor tipa β

ET. ESTRADIOL – 17α-etinil estradiol

FDP – plamenski fotometrični detektor

FID – plamensko ionizacijski detektor

FSH – folikle stimulirajoči hormon

GC – plinska kromatografija

GC-MSD - plinska kromatografija z masno spektrometrično detekcijo

GC-MS-MS – plinska kromatografija v povezavi s tandemsko masno spektrometrijo

GnRH – gonadotropin sproščujoči hormon

HDL – lipoproteini z visoko gostoto

ILD – meja zaznavnosti instrumenta

ILQ – meja določljivosti instrumenta

IRD – infrardeči spektrometrični detektor

I.S. – interni standard

NO – dušikov oksid

Nu - nukleofil

LC – tekočinska kromatografija

LC-MS-MS – tekočinska kromatografija v povezavi s tandemsko masno spektrometrijo

LH – luteinizirajoči hormon

LLE – ekstrakcija tekoče-tekoče

LOD – meja zaznavnosti

LOQ – meja določljivosti

mRNA – »messenger« ribonukleinska kislina

MDL – meja zaznavnosti metode

MQL – meja določljivosti metode

MSTFA - *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamid

MTBSTFA - *N*-(terc-butildimetilsilil)-*N*-metiltrifluoroacetamid

P 450 scc – »cholesterol side-chain cleavage enzyme« (holesterol dezmolaza)

RRF – relativni faktor odziva

RSD – relativna standardna deviacija

SCAN – masna spektrometrija, merjenje ionov z masnim spektrometrom v določenem masnem območju (npr.  $m/z= 50-550$ )

SIM – masna spektrometrija, merjenje izbranih ionov z masnim spektrometrom

SPE – ekstrakcija na trdnem nosilcu

TBS – terc-butildimetilsilil

TMS – trimetilsilil

$t_R$  – retencijski čas



### 3. UVOD

#### 3.1. HORMONSKI MOTILCI

Endokrini motilci so eksogene snovi, ki motijo sintezo, sekrecijo, transport, vezavo, delovanje in/ali eliminacijo naravnih hormonov v organizmu, ki so odgovorni za vzdrževanje homeostaze, razmnoževanje, rast, razvoj in obnašanje (1). Njihova prisotnost v okolju postaja vse večji problem, saj se te snovi uporabljajo v številnih industrijskih panogah, od koder jih izpuščajo v okolje, kjer se kumulirajo. Številni hormonski motilci sodijo tudi med zdravilne učinkovine, najbolj razširjeni med njimi so peroralni kontraceptivi. Tudi nekateri naravni hormoni, ki v okolje pridejo v konjugirani obliki kot presnovni produkti, se lahko s pomočjo mikroorganizmov spet dekonjugirajo in so kot taki močni hormonski motilci za organizme, ki pridejo z njimi v stik.

Naravni hormoni se sintetizirajo v določenih telesnih žlezah in se nato preko krvi prenašajo do tarčnih organov, kjer sprožijo odziv. Endokrini sistem je zelo natančno uravnan prek pozitivnih in negativnih povratnih zvez, zato lahko eksogene snovi, ki vplivajo na ta sistem, povzročijo mnoge neželene učinke (2).

Receptorji v hormonskem sistemu imajo ponavadi zelo visoko afiniteto do določenih specifičnih hormonov, ki že v zelo nizkih koncentracijah povzročijo odziv. Vendar pa lahko tudi nekatere druge snovi, ki se vežejo na receptor, izzovejo močan odziv ali pa samo zasedejo vezavna mesta za endogene hormone in s tem preprečujejo normalno delovanje hormonskega sistema. V prvem primeru govorimo o agonističnem, v drugem pa o antagonističnem delovanju. To sta najpogostejša mehanizma delovanja hormonskih motilcev, možni pa so še drugi, kot so interakcije v sintezi naravnih hormonov, njihovi eliminaciji ali ekspresiji specifičnih receptorjev (3).

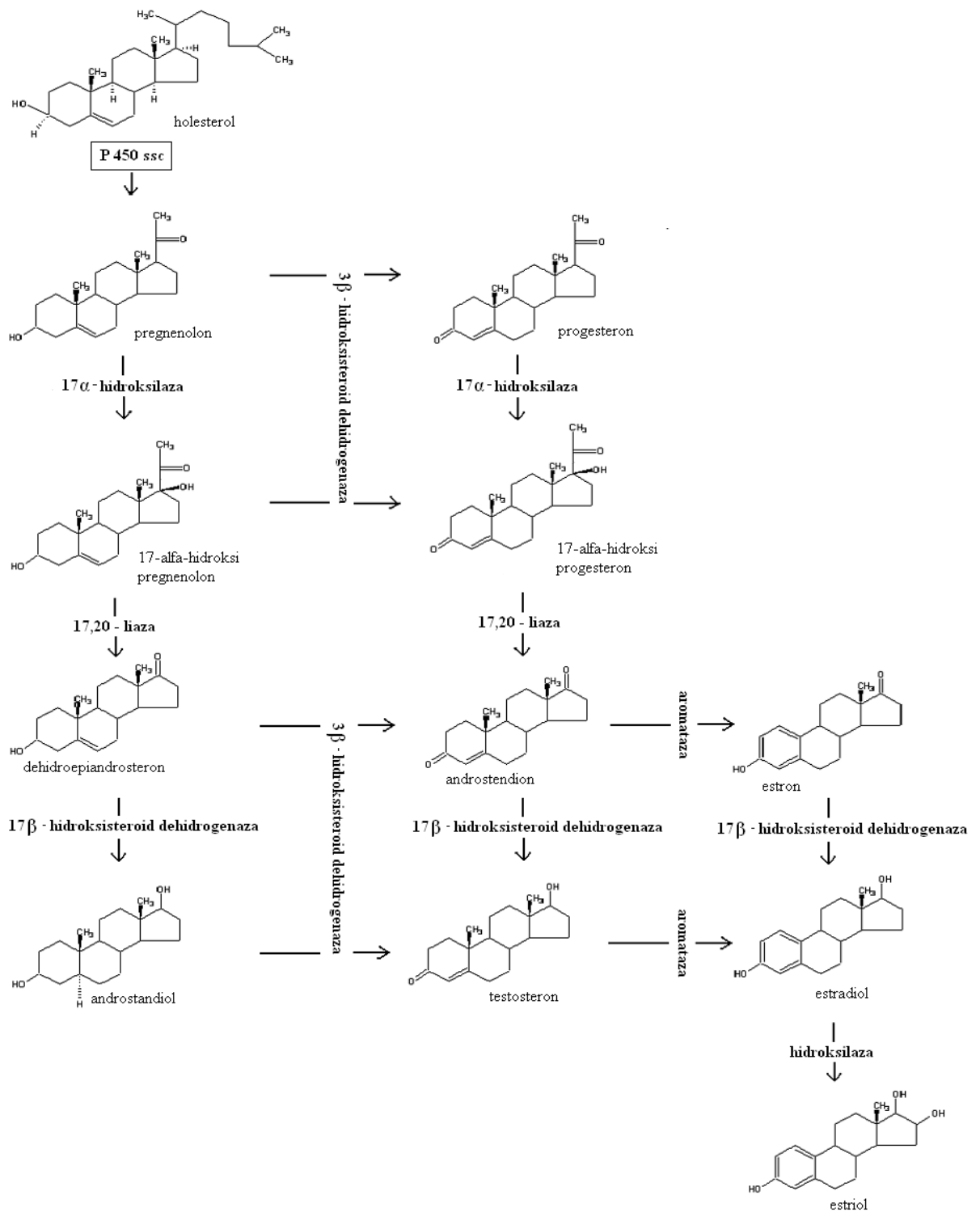
V diplomski nalogi bomo obravnavali 7 hormonskih motilcev, ki se pogosto nahajajo v površinskih in odpadnih vodah. Vsi imajo skupno lastnost, da delujejo kot direktni reverzibilni agonisti na estrogenskih receptorjih. Kemijsko sodijo v 3 različne skupine: 4-terc-oktilfenol in 4-nonilfenol sodita med alkilfenole, bisfenol A med hidroksilirane difenilalkane, estron, estradiol, estriol in etinil estradiol pa med steroidne estrogene. Prvi trije navedeni steroidni estrogene so naravni hormoni, ki jih organizem

sintetizira iz holesterola, saj slednji služi kot prekurzor za biosintezo vseh spolnih hormonov (Slika 1), etinil estradiol pa pridobivamo polsintezno.

Trenutno poznamo 2 tipa intracelularnih estrogenskih receptorjev,  $ER_{\alpha}$  in  $ER_{\beta}$ . Po vezavi ustreznega liganda na ER pride do konformacijske spremembe in nastali kompleks se pomakne v celično jedro, kjer interagira s celično DNA. Rezultat tega je indukcija ali inhibicija transkripcije DNA, ki regulira sintezo določenih proteinov. Novejše študije kažejo na verjetnost, da imajo estrogeni učinek tudi preko transmembranskih receptorjev, ki so odgovorni za hitre učinke estrogenov (4). Dokazano je, da akutno vazodilatacijo estrogeni povzročajo prek indukcije dušikovega oksida (NO) in da določeni fitoestrogeni (npr. genistein), ki so selektivni za  $ER_{\beta}$ , v človeku delujejo preko inhibicije proteinske kinaze C. Dokazano je, da je sposobnost vezave na estrogenske receptorje in delovanje posamezne spojine odvisno od tega, kako uspešno posnema strukturo  $17\beta$ -estradiola, ki je najučinkovitejši naravni estrogen. Pogoj za interakcije z estrogenskimi receptorji je prisotnost najmanj enega fenolnega obroča s prosto hidroksilno funkcionalno skupino. Na fenolni obroč mora biti vezana vsaj 3 ogljikove atome dolga stranska veriga (ali obroč). Jakost delovanja na estrogenskem receptorju je odvisna od dolžine in razvejanosti stranske verige, saj mora ligand s svojo strukturo stabilizirati konformacijsko spremembo receptorja, do katere pride po vezavi liganda. V nasprotnem primeru ima spojina antagonistično delovanje. Najboljši agonisti so spojine s planarno strukturo in para substituiranim fenolnim obročem.

Naravni estrogeni se pri ženskah večinoma sintetizirajo v ovarijih, v času nosečnosti pa tudi v placenti. Njihova koncentracija se tekom mesečnega cikla spreminja in je natančno regulirana preko adenohipofize. Tam pod vplivom iz hipotalamusa sproščenega GnRH (gonadotropin sproščujoči hormon) nastajata FSH (folikle stimulirajoči hormon) in LH (luteinizirajoči hormon), ki v ovarijih spodbujata sproščanje estrogenov. Ti preko negativne povratne zanke zopet zavirajo izločanje FSH in LH iz adenohipofize, progesteron pa poleg tega zavira tudi sproščanje GnRH iz hipotalamusa (2).

Podobno kot pri človeku imajo estrogeni tudi pri živalih ključno vlogo pri njihovem razvoju, razmnoževanju in metabolizmu. Študije dokazujejo številne negativne učinke hormonskih motilcev na organizme, ki so jim stalno izpostavljeni, kot na primer ribe. Posledično pa se preko prehranske verige poveča tudi tveganje za človeka (5).



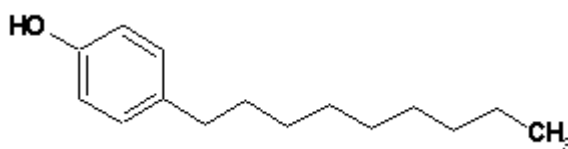
**Slika 1:** Shematski prikaz biosinteze naravnih estrogenov in najpomembnejših intermediatov (2)

### 3.1.1. Alkilfenoli

Alkilfenoli in njihovi metaboliti so lipofilne substance, ki izkazujejo močno estrogeno delovanje, kar je bilo potrjeno tako z *in vitro*, kot tudi *in vivo* testi. Alkilfenole pogosto uporabljamo v industriji kot površinsko aktivne snovi (neionski detergenti, emulzifikatorji, močilci, lubrikanti in sestavine barv), zato postaja njihova navzočnost v površinskih in odpadnih vodah vedno bolj problematična. Študije dokazujejo, da se alkilfenoli lahko kumulirajo v ribah, kar zaradi prehranske verige predstavlja nevarnost tudi za številna druga živa bitja, vključno s človekom (6, 7).

Alkilfenoli kot hormonski motilci predstavljajo skupino organskih spojin, pri katerih je osnovni fenolni obroč substituiran z eno alkilno skupino. Med seboj se razlikujejo glede na dolžino in razvejanost alkilne skupine, najpogostejši pa so oktilfenol, nonilfenol in dodecilfenol. Od položaja alkilne skupine na obroču je odvisna tudi njihova afiniteta do estrogenskih receptorjev. Ta je najvišja pri para- substituiranih, nižja pri meta-, najnižja pa pri orto- substituiranih alkilfenolih. Na njihovo učinkovitost vplivata tudi dolžina in razvejanost alkilne verige. Spojine z verigo krajšo od treh ogljikovih atomov ne delujejo estrogeno. Poleg tega je njihova učinkovitost na estrogenskih receptorjih odvisna od tega, v kolikšni meri s svojo strukturo posnemajo A obroč 17 $\beta$ -estradiola, kar je nujen pogoj za kovalentne interakcije z estrogenskim receptorjem (8).

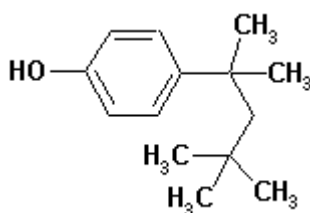
Od predstavnikov alkilfenolov so v naravi najpogostejši derivati nonilfenola, predvsem njegovi etoksilati. Potencialno nevarnost za človeka predstavlja predvsem 4-nonilfenol (Slika 2), ki se je v preteklosti uporabljal tudi v pesticidih in nekaterih dezinficienskih, ki se uporabljajo pri pakiranju hrane. Ta lipofilna spojina ima zelo veliko sposobnost akumulacije v tkivih, kar povečuje njeno kronično toksičnost (9).



**Slika 2:** Strukturna formula 4-nonilfenola

4-terc-oktilfenol (Slika 3) je sicer manj prisoten v okolju kot 4-nonilfenol, vendar ima močnejši učinek na estrogenske receptorje. Izkazuje 5- do 20- krat večjo jakost delovanja kot 4-nonilfenol, kar pomeni, da je najmočnejša poznana estrogenska spojina iz

skupine alkilfenolov. Kljub temu je njena jakost delovanja približno 1000- krat nižja v primerjavi s  $17\beta$ -estradiolom, ki je najmočnejši naravni estrogen (10).



**Slika 3:** Strukturna formula 4-terc-oktilfenola

Učinek alkilfenolov je podobno kot pri naravnih estrogenih pretežno odvisen od vezave na specifične intracelularne receptorje, ki regulirajo transkripcijo mRNA za celo vrsto proteinov. Estrogenski receptorji pri vretenčarjih sodelujejo pri uravnavanju celične homeostaze, proliferacije in diferenciacije, prav tako vplivajo tudi na razvoj živčnega, kardiovaskularnega in reproduktivnega tkiva. Receptorji ne izkazujejo aktivnosti, če nanje ni vezan ustrezen ligand (11).

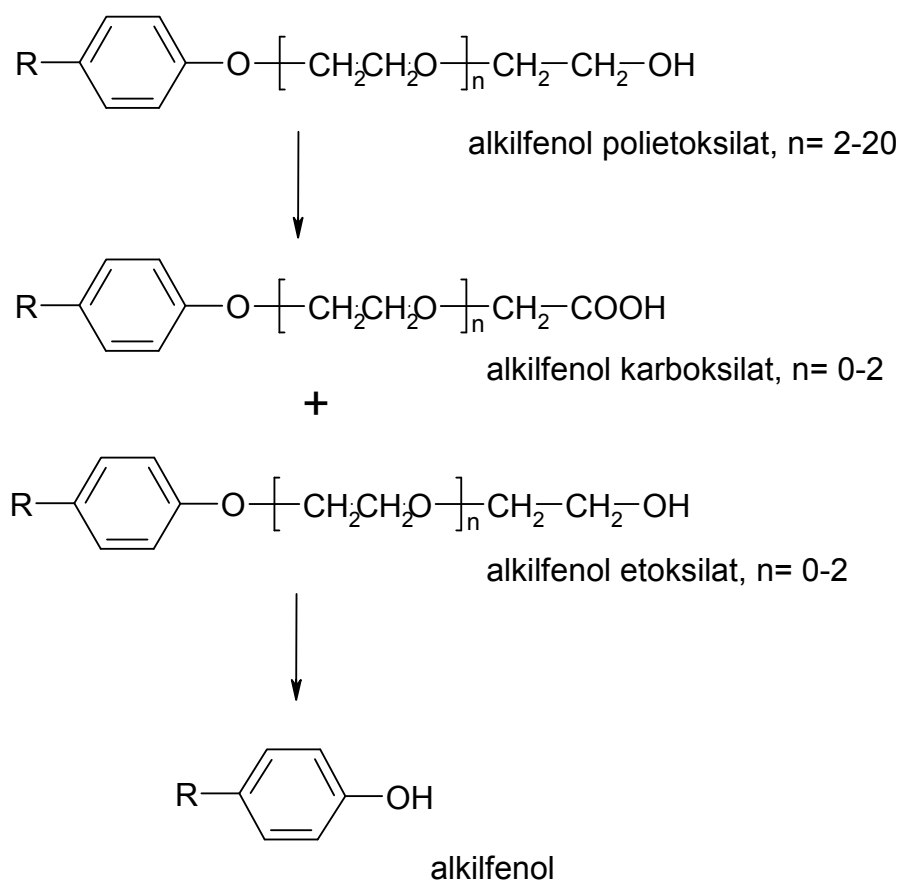
Študije nakazujejo tudi na možnost, da poleg direktnega estrogenskega učinka alkilfenoli povečujejo tudi koncentracijo naravnih estrogenov v organizmu. To naj bi bila posledica inhibicije nekaterih izoform jetrnih encimov, predvsem citokroma CYP1A, preko katerega poteka hidrosilacija  $17\beta$ -estradiola. Ta učinek je bil zaenkrat dokazan le na izoliranih hepatocitih (12, 13).

*In vivo* testi na podganah (moški osebki) kažejo, da prekomerna izpostavljenost alkilfenolom povzroči znižanje koncentracije testosterona, FSH in LH ter hkrati poveča izločanje prolaktina. Zaenkrat so hormonskim motilcem najbolj izpostavljeni vodni organizmi, kar se kaže na mnogih preučevanih ribah. Najbolj značilna pojava sta inhibicija spermatogeneze in indukcija sinteze vitelogenina v ribah moškega spola. Vitelogenin je po svoji strukturi protein in ima pomembno vlogo pri razmnoževanju (najpomembnejši gradnik stene ribjih iker), v normalnih okoliščinah pa je prisoten izključno v ribah ženskega spola. Poleg tega izpostavljenost endokrinim motilcem povzroča tudi številne histološke spremembe (14, 15).

Poleg obravnavanih alkilfenolov je potrebno omeniti še nekatere njihove derivate, ki so zelo razširjeni v okolju. Najpomembnejši med njimi so etoksilati, ki se nahajajo v mnogih neionskih površinsko aktivnih snoveh, ki so pomembna sestavina detergentov,

pesticidov, barv in kozmetičnih izdelkov. Analize okoljskih vzorcev so pokazale njihovo pogosto prisotnost v površinskih in odpadnih vodah ter sedimentih.

Alkilfenolni etoksilati izkazujejo nizko estrogenu delovanje in ne predstavljajo neposredne nevarnosti, vendar v aerobnih pogojih sledi hitra razgradnja etoksilatov, najprej do krajših etoksilatov in karboksilatov, nato pa do ustreznih alkilfenolov (Slika 4). Le-ti so zaradi prisotnosti fenilnega obroča in lipofilnosti veliko bolj stabilni v vodnem mediju. Nekatere študije potrjujejo, da oksidativni razkroj alkilfenolnih etoksilatov povzročajo bakterije. Zato ne presenečajo rezultati, ki poročajo višje izmerjene koncentracije alkilfenolov v iztokih čistilnih naprav kot v dotokih (6, 16).



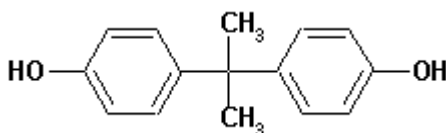
**Slika 4:** Shematski prikaz razgradnje alkilfenol etoksilatov (17)

### 3.1.2. Bisfenol A

Kemijsko je bisfenol A hidroksiliran difenilalkan in je sestavljen iz dveh fenolnih obročev, ki sta vezana na centralni ogljikov atom (Slika 5). Zaradi svoje angularne konfiguracije in OH skupin na para poziciji fenilnih obročev lahko bisfenol A tvori vodikove vezi z akceptorskim delom estrogenskega receptorja. Učinkovitost bisfenolov na estrogenskem receptorju je odvisna predvsem od substituentov na centralnem ogljikovem atomu. Bisfenol A deluje šibko estrogeno, njegova jakost delovanja je 10000- do 1000000- krat manjša od  $17\beta$ -estradiola. Poleg tega novejša študija opozarjajo tudi na šibko antiandrogeno delovanje (18, 19).

Bisfenol A se pogosto uporablja v industriji, od tega se ga več kot 90 % uporablja pri proizvodnji plastike, predvsem pri izdelavi polikarbonatnih, epoksi in nenasičenih polistirenskih umetnih mas. Pri proizvodnji plastičnih mas ga dodajamo tudi kot antioksidant, plastifikator in inhibitor polimerizacije (20). Za človeka predstavlja nevarnost tudi zato, ker lahko prehaja iz plastičnih zabojnikov in konzerv v hrano in se tam akumulira. Dolgotrajna izpostavljenost bisfenolu A poveča možnosti za nastanek določenih oblik raka, v višjih koncentracijah pa je spojina tudi nevrotoksična (21, 22).

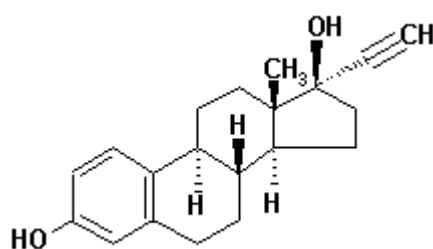
V nasprotju z alkilfenoli se bisfenol A ne akumulira v telesu, ampak se po konjugaciji z glukuronsko kislino, večinoma v obliki monoglukuronata, preko ledvic hitro izloči iz telesa. Zato je, kljub dokazani toksičnosti, še vedno dovoljena njegova uporaba v nizkih koncentracijah, tudi v prehranski industriji. Mejna vrednost izpostavljenosti bisfenolu A v državah EU znaša 13  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$ , v ZDA pa ta vrednost znaša 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$  (23).



**Slika 5:** Strukturna formula bisfenola A

### 3.1.3. Steroidni estrogeni

Steroidni estrogeni imajo podobno strukturo kot holesterol, ki je tudi prekurzor za sintezo naravnih estrogenov v organizmu. Osnovni skelet sestavljajo trije šestčlenski in en petčlenski obroč. Vsi naravni estrogeni imajo v svoji strukturi po 18 ogljikovih atomov. Spojine so pretežno lipofilne in so slabo topne v vodi. Sintezni  $17\alpha$ -etinilestradiol (Slika 6) ima poleg osnovnih ogljikovih atomov na mestu 17 pripeto še etinilno skupino, ki zmanjša učinek prvega prehoda in s tem poveča njegovo učinkovitost po peroralni aplikaciji (24).



**Slika 6:** Strukturna formula  $17\alpha$ -etinil estradiola

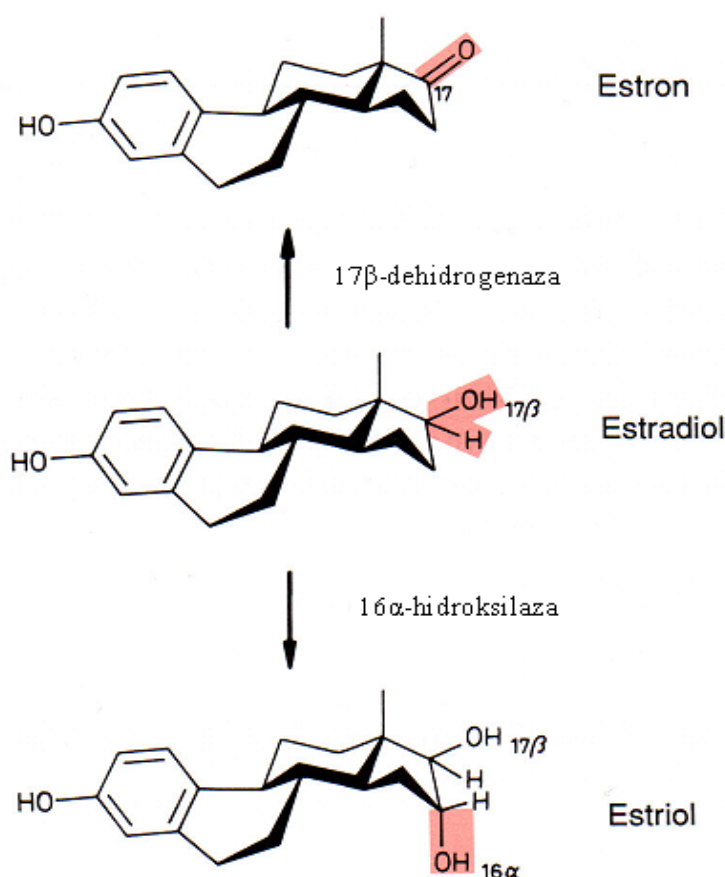
Za vezavo na estrogenske receptorje, ki se nahajajo intracelularno v tarčnih tkivih, je ključen obroč A (fenolni obroč), ki je popolnoma nenasičen in ima na mestu 3 hidroksilno skupino. Za aktivacijo estrogenskega receptorja je pomembna tudi konformacija molekule, ki se veže na receptor, saj mora stabilizirati spremenjeno konformacijo celotnega kompleksa, ki nastane. V nasprotnem primeru spojine delujejo antagonistično (25). Naravni estrogeni nastajajo v ovarijih, placenti in v majhnih količinah tudi v testisih ter skorji nadledvične žleze. Prekurzorja sta androgeni spojini testosteron in androstendion, ki nastaneta iz holesterola (Slika 1). Največji učinek med njimi ima  $17\beta$ -estradiol, estron ima še 30 % njegovega učinka, estriol pa 10 % (Slika 7). Slednji v konjugirani obliki predstavlja najpomembnejši estrogenski metabolni produkt v ženskem urinu (24).

Naravni estrogeni so tako pri človeku, kot tudi živalih, ključnega pomena za njihovo rast in ustrezen razvoj, prav tako pa imajo tudi številne metabolne učinke. Med pomembnejše sodi mineralokortikoidni učinek, ki se kaže kot povečana retencija vode in soli v telesu, zvišanje koncentracije HDL (lipoproteinov z visoko gostoto) v plazmi, spodbujanje mineralizacije kosti in anabolen učinek, ki se kaže predvsem v povečanju



subkutane maščobe, visoke koncentracije estrogenov pa tudi povečajo možnost nastanka tromboembolije (2, 24).

V preteklosti je bila uporaba steroidnih estrogenov precej razširjena v živalih, od leta 1989 pa je uporaba v državah EU prepovedana. Kljub temu so še vedno prisotni v številnih površinskih in predvsem odpadnih vodah (25). Estriol, estradiol in etinilestradiol so pomembne zdravilne učinkovine in predstavljajo potencialen vir kontaminacije. Na voljo so v številnih pripravkih in se uporabljajo v nadomestni hormonski terapiji, pri Turnerjevem sindromu in pri ženskah po menopavzi, kot kontraceptivi in za obravnavo nekaterih tipov rakavih obolenj na prostati in dojkah. Njihova uporaba je močno odvisna od odmerka, saj se lahko ista učinkovina uporablja za več različnih terapevtskih indikacij (2). Naravni estrogeni se hitro absorbirajo v gastrointestinalnem traktu in v jetih tudi hitro metabolizirajo. Po konjugaciji se iz telesa izločijo predvsem v obliki glukuronidov in sulfatov. Kot taki niso nevarni za okolje, vendar pa imajo nekatere bakterije sposobnost dekonjugacije teh spojin, ki spet preidejo v svojo aktivno obliko (27).



Slika 7: Biotransformacija 17β-estradiola (24)

## **3.2. ANALIZNI POSTOPEK ZA DOLOČANJE HORMONSKIH MOTILCEV V POVRŠINSKIH IN ODPADNIH VODAH**

Sodobne kromatografske metode omogočajo sočasno separacijo, identifikacijo in kvantitativno analizo številnih spojin. Za določitev vsebnosti organskih spojin v vzorcih iz okolja najpogosteje uporabljamo plinsko in tekočinsko kromatografijo v povezavi z različnimi detektorji.

Kljub velikemu napredku v razvoju kromatografskih tehnik v zadnjih letih, je pogosto še vedno nujna obsežna priprava vzorcev pred analizo. Razlogi za to so različni. Kot prvo moramo upoštevati fizikalno-kemijske lastnosti spojin, ki jih določamo in njihovo primernost za analizne tehnike, ki jih uporabljamo. Poleg tega so pri analizi okoljskih vzorcev analiti pogosto prisotni v zelo nizkih koncentracijah, ki jih instrument ne zazna, zato je potrebno predhodno koncentrirati vzorce. V zelo kompleksnih medijih, kot so odpadne vode, predstavlja veliko težavo tudi prisotnost številnih dodatnih spojin, ki motijo analizo tarčnih spojin. Temu se poskušamo izogniti s predhodnim čiščenjem vzorcev, pri čemer se moramo zavedati tudi nevarnosti izgube spojin, ki jih določamo (28).

### **3.2.1. Izolacija in koncentriranje vzorcev**

Za izolacijo organskih spojin iz vodnih vzorcev najpogosteje uporabljamo destilacijo, ekstrakcijo in različne adsorpcijske metode. Pri teh metodah je pomembno, da so enostavne, hitre in poceni ter da omogočajo kvantitativne izkoristke izbranih analitov. Najbolje je izbrati postopek izolacije, ki je selektiven za spojine, ki jih določamo. V praksi tega pogosto ne moremo zagotoviti, sploh pri ekstrakciji iz zelo kompleksnih medijev, kar okoljski vzorci so. Zaželeno je, da istočasno z ekstrakcijo spojine tudi koncentriramo in se tako izognemo nepotrebni izgubam, dodatnim laboratorijskim odpadkom in daljši pripravi vzorcev. Slednje je še posebej pomembno pri vzorcih, ki niso stabilni pri sobni temperaturi.

Za izolacijo organskih spojin iz vodnih vzorcev se je v preteklosti najpogosteje uporabljala ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE). Ta metoda temelji na porazdeljevanju organskih komponent med vodnim medijem in organskim topilom, ki se med seboj ne mešata. Izkoristek ekstrakcije je predvsem odvisen od afinitete analitov do organskega

topila, ki ga uporabimo. To afiniteto podajamo kot porazdelitveni koeficient. Poleg tega je izkoristek odvisen tudi od volumnov obeh faz (vodne in organske), števila ponovitev ekstrakcije in časa vzpostavitve ravnotežja med obema fazama. Glavna prednost metode je širok nabor organskih topil, ki jih glede na fizikalno-kemijske lastnosti analitov lahko uporabimo v tem postopku. Vendar ima metoda tudi številne pomanjkljivosti, predvsem je pri velikih volumnih vzorcih dolgotrajna in zahteva porabo velike količine organskih topil. Težavo lahko predstavlja tudi tvorba emulzij, ki povzroči relativno visoke izgube, zato ta metoda redko zadosti zahtevam modernih analiznih postopkov (29).

Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE) v zadnjem desetletju izpodriva LLE. Pri SPE (Slika 8) se analiti vežejo na sorbent, ki ga izberemo glede na fizikalno-kemijske lastnosti preučevanih analitov. Ti imajo navadno večjo afiniteto do izbranega sorbenta, kot pa do vodnega medija, v katerem se nahajajo. SPE je še posebej primerna metoda za ekstrakcijo razredčenih vzorcev, saj lahko ekstrahiramo velike volumne vzorcev in hkrati z elucijo z majhnimi količinami organskih topil vzorec tudi koncentriramo. S to metodo vzorce istočasno ekstrahiramo, koncentriramo in čistimo. Prednosti pred ostalimi ekstrakcijskimi metodami so:

- večja selektivnost
- visoki izkoristki
- možnost odstranjevanja motečih spojin
- prihranek časa
- izognemo se nestabilnim stanjem, kot npr. emulzijam
- manjša poraba organskih topil
- koncentriranje tarčnih analitov
- široka možnost optimizacije (adsorbenti, topila, volumni vzorca in topil, hitrost pretoka)
- možnost avtomatizacije.

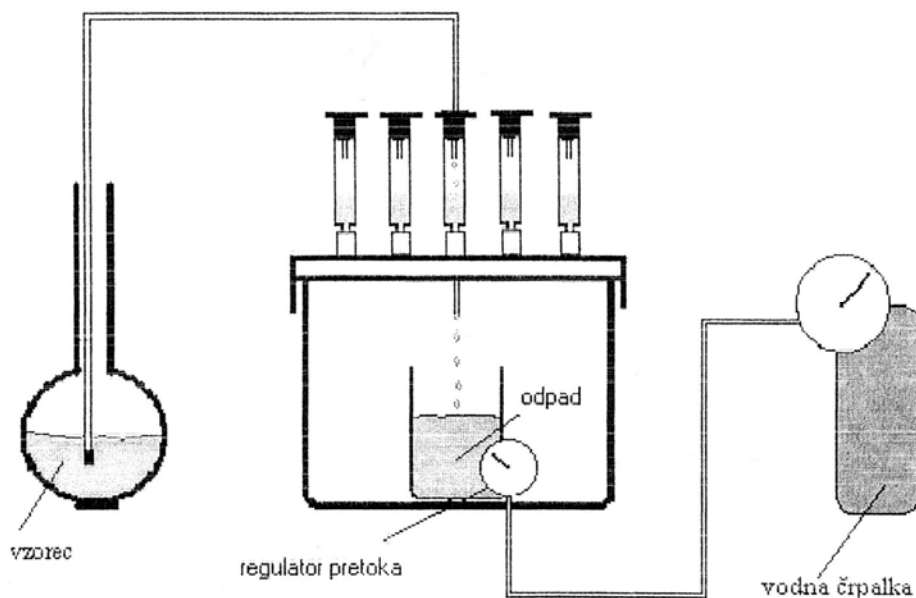
Za adsorbente najpogosteje uporabljamo kemično obdelani silicijev dioksid s kovalentno vezanimi funkcionalnimi skupinami, lahko pa uporabimo tudi polimere, oziroma smole, ki so sestavljene iz polistiren-divinilbenzenskih verig. Učinkovitost SPE metode je odvisna od interakcij med sorbentom in analitom. Glede na vrsto interakcij delimo SPE na normalno, reverzno-fazno in ionsko izmenjevalno. Polnila pri ekstrakciji na normalno-faznem adsorbentu imajo anorgansko osnovo (silicijev dioksid, aluminijev

oksid, magnezijev silikat) in se uporabljajo za ekstrakcijo polarnih komponent iz nepolarnih topil. Ekstrakcija na reverzno-faznem adsorbentu, kjer je stacionarna faza sestavljena iz različno dolgih alifatskih ogljikovodikov (najpogosteje C<sub>8</sub> in C<sub>18</sub>), vezanih na silanolne –OH skupine, je pogostejša in jo lahko uporabljamo za ekstrakcijo okoljskih vzorcev, kjer želimo običajno izolirati lipofilne spojine iz vode. V zadnjem času za analizo organskih spojin iz vodnih vzorcev namesto reverzno-fazne SPE vedno bolj uporabljamo polimerne adsorbente, ki so prav tako primerni za ekstrakcijo lipofilnih in tudi delno hidrofilnih spojin iz vode. Poleg visokih izkoristkov, je za to vrsto adsorbenta značilno tudi, da pH vzorca ne vpliva v tolikšni meri na izkoristke. To je pomembno, saj okoljske vzorce pogosto nakisamo, s čimer poskušamo zagotoviti njihovo mikrobiološko stabilnost. Zadnja vrsta SPE sorbentov, ki jih še želimo omeniti, so ionsko-izmenjevalni, ki jih delimo na kationske (sulfonska ali karboksilna skupina) in anionske (različne amino skupine) sorbente (30).

Običajno izvajamo SPE ekstrakcijo na kolonah, napolnjenih z izbranim adsorbentom ali na ekstrakcijskih diskih. Princip je v obeh primerih enak, vendar imajo diski večjo površino, s čimer se poveča možnost interakcij med vzorcem in sorbentom. Zato omogočajo analizo večjih volumnov vzorcev, večji pretok in boljše izkoristke, poleg tega pa se z uporabo diskov lažje izognemo možnosti zamašitve, kar se pogosto dogaja pri ekstrakciji iz kompleksnih matrik, kot so odpadne vode, kjer so prisotne mnoge nečistote. Slaba stran ekstrakcijskih diskov je, da za elucijo potrebujemo večji volumen organskih topil, da zagotovimo kvantitativni prenos in zato je posledično potrebno dodatno koncentriranje eluata. Poleg tega je tudi cena ekstrakcijskih diskov višja v primerjavi s ceno kolon (31).

Slika 8 predstavlja shemo sistema za SPE. Sestavljen je iz rezervoarja, v katerem je preiskovani vzorec, kadičke s SPE kolonami, posode, v katero se odteka odpadni vzorec ter vodne črpalke. Vsi naštetni elementi so med seboj povezani s teflonsko cevjo. S pomočjo vodne črpalke, ki ustvarja podtlak v kadički, nanašamo vzorec na SPE nosilec s hitrostjo, ki jo nadzorujemo z regulatorjem pretoka (reguliramo podtlak v kadički, od katerega je odvisna hitrost pretoka). SPE poteka v sledečih korakih:

1. kondicioniranje nosilcev
2. nanos vzorca
3. eluiranje.



**Slika 8:** Shematski prikaz sistema za SPE

V prvi stopnji SPE postopka, imenovanem kondicioniranje nosilcev, omočimo sorbent z ustrezno kombinacijo organskih topil, ki se razlikuje glede na lastnosti sorbenta. Večinoma uporabljamo topila srednje polarosti, kot so metanol, etilacetat, aceton in izopropanol. Ta stopnja je zelo pomembna za izkoristek ekstrakcije, saj z organskimi topili odstranimo zrak in morebitne nečistote iz kolone ter aktiviramo funkcionalne skupine sorbenta tako, da povečamo možnost interakcij z analiti. Ostanek topila odstranimo iz kolone s topilom, ki ima podobno polarnost, pH in ionsko moč kot matrika vzorca. Kondicioniranju takoj sledi nanos vzorca, saj se sorbent ne sme posušiti, v nasprotnem primeru pride do dekontinuiranja nosilca, kar vpliva na sposobnost vezave analitov. Vzorec nanašamo s primerno hitrostjo, ki omogoča optimalne interakcije med stacionarno fazo in analitom ter čim krajši analizni postopek. Ekstrakcijski diski zaradi svoje velike specifične površine dopuščajo veliko hitrost nanosa vzorca, medtem ko klasične SPE kolone tega ne dovoljujejo, saj načeloma višji pretoki povzročijo nižje izkoristke ekstrakcije. Zadnja stopnja SPE postopka je eluiranje, kjer z izbranim topilom ali kombinacijo različnih topil prekinemo vezi med analiti in stacionarno fazo. Volumen topila za elucijo izberemo tako, da kvantitativno sprostimo zadovoljivo množino iskanih analitov ter zmanjšamo nujnost nadaljnjega koncentriranja vzorcev. Pogosto pred elucijo uvedemo spiranje SPE kolon. V tej stopnji želimo z izbranim topilom odstraniti čim večje

število nečistot. Pri tem postopku moramo biti zelo previdni, saj lahko odstranimo tudi večjo količino iskanih analitov, še posebej, če imajo podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot prisotne nečistote (32).

### 3.2.2. Derivatizacija

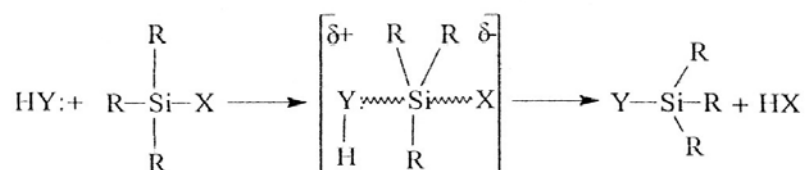
Plinsko kromatografijo uporabljamo za analizo termično stabilnih, hlapnih organskih spojin. Spojine, ki jih zaradi nehlapnosti in termične nestabilnosti ne moremo neposredno analizirati s plinsko kromatografijo, predhodno derivatiziramo. Z derivatizacijo pretvorimo tarčne spojine v nepolarne in inertne derivate, ki preidejo v plinasto stanje pri nižjih temperaturah in brez razpadanja. Za derivatizacijski reagent je značilen nepolarni skelet in reaktivna skupina, ki reagira z izbrano funkcionalno skupino. Nepolarna veriga ogljikovodikov vpliva na hlapnost nastalega derivata, zaradi steričnih in elektronskih efektov pa vpliva tudi na obseg derivatizacije. Izkoristek derivatizacije je odvisen od številnih dejavnikov, med njimi so najpomembnejši izbira reagenta, topila, temperature, pri kateri poteka reakcija in čas segrevanja. Dodatek topila pri nekaterih derivatizacijskih sredstvih ni potreben, vendar lahko odločilno vpliva na tvorbo produktov (33).

Najpomembnejša vrsta derivatizacije je siliranje. Uporablja se za derivatizacijo organskih spojin z nukleofilnimi funkcionalnimi skupinami (-OH, -SH, =NH, -NH<sub>2</sub>, -COOH), pri čemer tvorimo sililne etre in estre. Za siliranje najpogosteje uporabljamo:

- *N, O*-bis-(trimetilsilil)-acetamid (BSA)
- *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamid (MSTFA)
- *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)acetamid (MSTA)
- *N, O*-bis-(trimetilsilil)- trifluoroacetamid (BSTFA)
- *N*-(terc-butildimetilsilil)-*N*-metiltrifluoroacetamid (MTBSTFA)
- *N*-trimetilsilildietilamin (TMSDEA)

Poleg naštetih reagentov imajo pomembno vlogo pri derivatizaciji tudi katalizatorji, ki v posameznih primerih lahko izboljšajo njen izkoristek. Mednje sodijo trimetilklorosilan (TMCS), trimetilsilimidazol (TMSI), terc-butildimetilsililklorosilan (TBCS) in terc-butildimetilsilimidazol (TBCI) (34).

Zgoraj našete reagente uporabljamo za tvorbo trimetilsililnih (TMS) in terc-butildimetilsililnih (TBS) etrov ali estrov. Želene lastnosti izstopajoče skupine so nizka bazičnost, sposobnost stabilizacije negativno nabitega intermedija v prehodnem stanju in čim manjša sposobnost vezave s silicijevim atomom. Reakcija siliranja mora nujno potekati brez prisotnosti vode, ker že majhne količine vode lahko privedejo do hidrolize nastalih derivatov. Reakcija poteka preko prehodnega stanja, kot je prikazano na Sliki 9:



**Slika 9:** Shematski prikaz reakcije siliranja preko prehodnega stanja (X, Y= Nu)

Kljub veliki razširjenosti derivatizacije s silnimi reagenti, ima postopek tudi številne pomanjkljivosti. Poleg že prej omenjene možnosti hidrolize, sta glavni težavi nestabilnost derivatov v ekstremnih pogojih, kot je segrevanje med GC analizo in možnost številnih stranskih reakcij med samim postopkom derivatizacije, kar lahko vodi tudi do popolne izgube iskanega analita. Temu se poskušamo izogniti z izbiro ustreznih reakcijskih pogojev in topil (35). Pri delu z derivatizacijskimi reagenti se moramo zavedati, da so derivatizacijski reagenti zelo reaktivni in da bodo poleg tarčnih spojin derivatizirali tudi številne prisotne nečistote z ustreznimi funkcionalnimi spojinami. Z izbiro derivatizacijskega reagenta lahko delno omejimo vrsto nečistot, ki jih derivatiziramo, kar je še posebej pomembno pri analizi kompleksnih vzorcev, kot so odpadne vode, kjer je zaradi povečanega ozadja in možnega prekrivanja posameznih kromatografskih vrhov oteženo vrednotenje rezultatov (34).

### 3.2.3. Separacija in identifikacija

Kromatografija je analizna metoda, ki jo pogosto uporabljamo za separacijo, identifikacijo in kvantifikacijo organskih komponent iz okoljskih vzorcev. Osnovni princip kromatografije je različna afiniteta preiskovanih spojin do stacionarne in mobilne

faze. Vzorec potuje z mobilno fazo po koloni, na katero je nanešana stacionarna faza. Glede na fizikalno-kemijske lastnosti analitov in s tem povezano afiniteto do stacionarne in mobilne faze, potujejo posamezne komponente vzorca različno hitro skozi kolono, kar privede do ločitve zmesi (36).

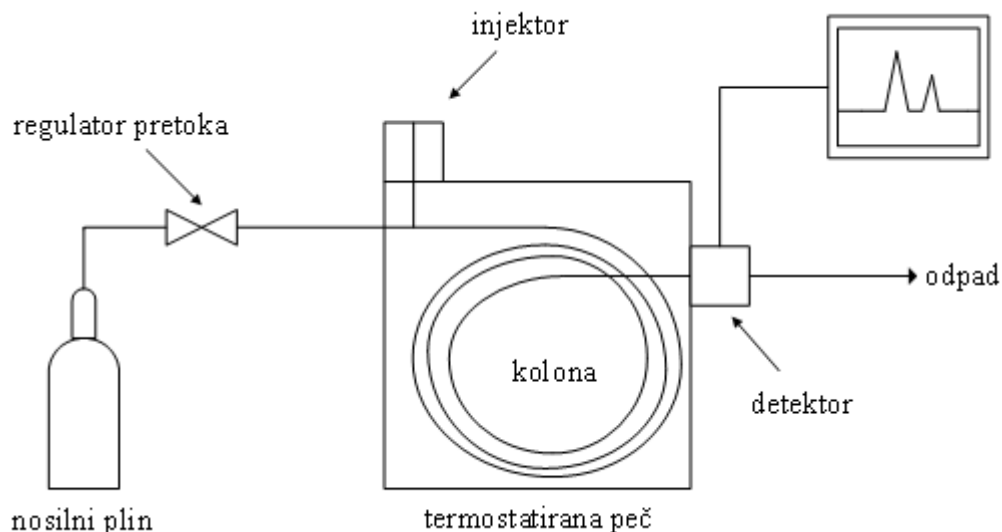
Na osnovi različnih mobilnih faz delimo kromatografske metode na:

- plinsko kromatografijo
- tekočinsko kromatografijo
- superkritično tekočinsko kromatografijo.

### Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je ena najbolj razširjenih in učinkovitih separacijskih metod za analizo organskih spojin. Spojine, primerne za GC analizo, morajo biti dovolj hlapne in termično stabilne. Ko spojina preide v plinasto stanje, jo mobilna faza nosi skozi kolono. Kot mobilno fazo uporabljamo različne pline, najpogosteje helij, dušik in argon. Nosilni plin mora biti inerten in ne sme reagirati niti z vzorcem, niti s stacionarno fazo. Poleg tega je zaželeno, da je plin čist, varen, poceni in da ne reagira z materiali injektorja, kolone in detektorja. Glede na lastnosti stacionarne faze lahko plinsko kromatografijo razdelimo še na dva podtipa. Pri GSC (gas solid chromatography- plinsko/trdna kromatografija) je stacionarna faza trdna in je v tanki plasti nanešana na nosilec oziroma polnilo (pri polnjenih kolonah) ali na steno kolone (pri kapilarnih kolonah). Bolj pogosto se uporablja GLC (gas liquid chromatography- plinsko/tekoča kromatografija), pri kateri je stacionarna faza tekoča in imobilizirana na površino trdnega inertnega nosilca.





**Slika 10:** Poenostavljena shema plinskega kromatografa

Aparaturo za plinsko kromatografijo sestavljajo:

- **INJEKTOR**, ki služi za vnos vzorca v plinski kromatograf. Temperatura injektorja mora biti najmanj 50 °C višja od temperature vrelišča najmanj hlapnega analita v vzorcu. Injiciran volumen vzorca za analizo je odvisen od tipa kolone in injektorja ter znaša od 10 nL do 20 µL. Možnih je več načinov vnosa vzorca (»split«, »splitless«, »on column«, »cool on column«). Od tipa injektorja je odvisna tudi relativna napaka pri injiciranju vzorca, ki znaša od 0,5 % do 10 %. Ta podatek je pomemben za kvantitativno analizo.
- **KOLONA** je namenjena selektivni ločbi posameznih komponent vzorca. Poznamo polnjene in kapilarne kolone. Slednje so daljše in tanjše, zato omogočajo boljšo separacijo. Kolone so narejene iz različnih materialov, od katerih se najpogosteje uporabljajo obdelani silikati (»fused silica«), poleg tega pa so v preteklosti pogosto uporabljali tudi steklo, nerjaveče jeklo, in teflon. Kolona je nameščena v termostatirani peči, s pomočjo katere reguliramo temperaturo GC kolone, od katere je odvisna uspešnost separacije iskanih komponent.
- **DETEKTOR** je nameščen na izhodu kromatografske kolone. Z njim zaznamo spojine, ki jih eluiramo mobilno fazo. Lastnosti idealnega detektorja so: zadostna občutljivost, dobra ponovljivost rezultatov, linearni odziv v širokem koncentracijskem območju, kratek čas odzivnosti, ki je

neodvisen od hitrosti pretoka nosilnega plina, točnost, nedestruktivnost in podobnost odzivov za širok spekter analitov. Idealni detektor, ki ustreza vsem navedenim zahtevam, ne obstaja. Na tržišču je na voljo veliko specifičnih detektorjev, ki omogočajo dobro analizo za določeno vrsto spojin, kar prispeva k široki uporabnosti plinske kromatografije. Med najbolj razširjene detektorje sodijo: plamensko ionizacijski detektor (FID), detektor na termično prevodnost (TCD), detektor na zajetje elektronov (ECD), atomski emisijski detektor (AED), plamenski fotometrični detektor (FPD), masno spektrometrični detektor (MSD) in infrardeči spektrometrični detektor (IRD). Slednja omogočata, poleg kvantitativne analize, tudi identifikacijo analitov (36).

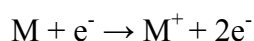
Čas zadrževanja oziroma retencijski čas ( $t_R$ ) spojine je čas od vnosa vzorca v injektor plinskega kromatografa do trenutka, ko detektor zazna maksimum kromatografskega vrha. Retencijski čas je značilen za posamezno spojino ob enakih pogojih in je odvisen od interakcij spojine s stacionarno fazo, kjer izmenično potekata adsorpcija in desorpcija in je torej določen s fizikalno-kemijskimi lastnostmi tako analita kot stacionarne faze. Med pogoji, pri katerih poteka plinska kromatografija, sta najpomembnejša hitrost pretoka nosilnega plina in temperaturni program peči plinskega kromatografa. S spreminjanjem navedenih pogojev lahko vplivamo na retencijske čase posameznih spojin in s tem dosežemo optimalno ločbo. Temperaturni program odločilno vpliva na čas analize in uspešnost separacije. Hitrost naraščanja temperature je kompromis med kvaliteto ločbe komponent v vzorcu in časom analize, zato se pri kompleksnejših vzorcih manjša hitrost segrevanja izkaže za učinkovitejšo. Končna temperatura mora biti vsaj za nekaj stopinj višja od temperature, pri kateri se eluira zadnja komponenta vzorca, s čimer zagotovimo, da se vsi analiti v celoti eluirajo iz kolone (37).

#### Plinska kromatografija z masno spektrometrično detekcijo (GC-MSD)

Sklopitev plinskega kromatografa z masnim spektrometrom omogoča sočasno identifikacijo spojin, ki jih ločimo s kromatografijo. To nam dovoljuje ločbo strukturno podobnih spojin v sledovih, saj nam masno spektrometrični detektor za vsako ločeno

komponento poda fragmentacijo, ki je za posamezno spojino značilna in služi za njeno identifikacijo.

Masna spektrometrija je metoda, ki loči ione v plinski fazi glede na maso in naboj iona ( $m/z$ ). Z dovajanjem energije molekulam vzorca, ki so v plinskem, tekočem ali trdnem stanju, dobimo ionizirano spojino. Obstajajo različne metode ionizacije. Za spojine v plinski fazi sta najprimernejši kemijska ionizacija (CI) in ionizacija z elektroni (EI), ki je zaradi enostavnosti in široke uporabnosti tudi najpogostejši postopek ionizacije. Pri EI dovedemo energijo molekuli na ta način, da trči z elektronom:



Če je prenesena energija dovolj velika, se po elektronskem vzbujanju en elektron oddalji od molekulske orbitale in dobimo radikalski kation, ki ga v masni spektrometriji običajno imenujemo molekulski ion in ga označimo z  $M^{+}$ . Za ionizacijo organskih molekul ponavadi uporabljamo energijo 70 eV. Zaradi velike energije ionizacije molekulski ion tudi delno razpade in dobimo fragmentne ione.

Pri masni spektrometriji izmerimo jakost ionov in določimo položaj na masni skali. Takšen zapis imenujemo masni spekter. Posreduje nam dva podatka, masno število posamezne ionske zvrsti in jakost delnega curka posamezne ionske zvrsti. Vsak spekter je karakterističen za posamezno spojino.

Detekcija mas ločenih ionov lahko poteka na dva načina. SCAN pomeni snemanje čez celotno masno območje ( $m/z= 50$  do  $550$ ) in nam omogoča neposredno identifikacijo spojine. Slaba lastnost tega načina merjenja je, da meri v celotnem masnem območju, zato sta meja detekcije (LOD) in meja kvantifikacije (LOQ) za isto spojino in v istem vzorcu občutno višji, kot pri SIM načinu, kjer merimo zgolj intenziteto izbranih ionov, zaradi česar se močno poveča občutljivost metode, vendar ne omogoča potrditve identitete spojine (38).

#### **3.2.4. Kvantitativna analiza**

Poleg separacije in identifikacije analitov GC-MSD analiza omogoča tudi kvantitativno določitev vsebnosti izbranih spojin. Kvantitativna analiza lahko temelji na višini ali površini kromatografskih vrhov. Na splošno je višina manj zanesljiv parameter,

še posebno, če kromatografski vrhovi nimajo idealne oblike in so asimetrični. Metoda je relativna, za izračun koncentracije iskanih analitov pa uporabimo eno naslednjih metod:

- normalizacija
- metoda eksternega standarda
- metoda internega standarda
- metoda standardnega dodatka.

Pri normalizaciji seštejemo površine vseh kromatografskih vrhov v kromatogramu. Površino vsakega analita se izrazi kot delež vsote vseh površin. Metoda je za analizo realnih vzorcev manj primerna, saj nam ne poda absolutne vrednosti.

Metoda eksternega standarda se uporablja pogosteje. Koncentracijo iskanega analita določimo s primerjavo površine kromatografskega vrha s površino kromatografskega vrha eksternega standarda, katerega koncentracijo poznamo. Pri uporabi metode eksternega standarda je pomembno, da sta koncentraciji preiskovanega analita in eksternega standarda v primerljivem koncentracijskem območju. To je pri okoljskih vzorcih zelo problematično, saj predhodno ne vemo, kolikšno koncentracijo posameznega analita lahko pričakujemo v vzorcu.

Pri metodi internega standarda dodamo točno znano količino internega standarda vsakemu standardu in vzorcu. Kromatografski vrh internega standarda mora biti ločen od kromatografskih vrhov ostalih komponent v vzorcu, obenem pa jim mora biti čim bolj podoben po svojih fizikalno-kemijskih lastnostih, kar posredno pomeni tudi podoben retencijski čas. Razmerje površin kromatografskih vrhov analita in internega standarda, pri izbranih koncentracijah, imenujemo relativni faktor odziva (RRF). Interni standard je primeren za analizo izbranih spojin, če je RRF v določenem kalibracijskem območju konstanten ( $RSD < 15\%$ ). Ta metoda velja za najbolj zanesljivo, saj upošteva tudi možne spremembe v pogojih merjenja med posameznimi analizami in tako zagotavlja večjo točnost in ponovljivost rezultatov.

Pri metodi standardnega dodatka dodajamo znano količino posameznih analitov vzorcu pred analizo, na osnovi česar določimo razmerje med odzivom in koncentracijo analita. Metoda standardnega dodatka je najmanj razširjena med navedenimi štirimi metodami, saj je najbolj zamudna in zahteva večje število kromatografskih meritev za pridobitev zanesljivih rezultatov (36, 37).

## 4. NAMEN DELA

Spojine, ki povzročajo motnje v hormonskem sistemu, so prisotne tako v odpadnih, kot tudi v površinskih vodah in predstavljajo potencialno nevarnost za številne organizme, tudi za človeka. Obstajajo študije, ki dokazujejo negativne učinke teh spojin, tudi če so prisotne v zelo nizkih koncentracijah ( $\text{ng L}^{-1}$ ), ki jih tudi z modernimi analiznimi metodami težko določamo (39, 40).

V okviru diplomske naloge smo želeli optimizirati analizno metodo za merjenje vsebnosti izbranih spojin, za katere je dokazano estrogeno delovanje tako pri živalih, kot tudi pri ljudeh. Izbrane spojine se med seboj razlikujejo po svojih fizikalno-kemijskih lastnostih, kar je potrebno upoštevati pri optimizaciji večstopenjskega analiznega postopka.

Za izolacijo spojin iz kompleksnih vodnih medijev bomo uporabili ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE). Pri postopku ekstrakcije se bomo osredotočili na izbiro ustreznega nosilca in potrebnega volumna vzorca za kvantitativno analizo. Sledi elucija, kjer je najpomembnejša izbira ustreznega topila in določitev volumna topila za elucijo. Naslednji korak je derivatizacija, s katero bomo privedli izbrane analite v obliko, ki bo bolj primerna za nadaljnjo ločbo s plinsko kromatografijo. Za uspešno derivatizacijo so potrebni tako ustrezni reagenti, kot tudi ustrezni reakcijski pogoji. Zadnji korak je analiza z GC-MSD, kjer se bomo osredotočili predvsem na iskanje ustreznega temperaturnega programa za ločbo izbranih komponent in na izbiro ionov za snemanje na SIM način. Slednje pomembno vpliva tako na selektivnost analize, kot tudi na mejo zaznavnosti. Optimizirano metodo bomo validirali.

Po opravljeni optimizaciji bomo analizno metodo preizkusili na okoljskih vzorcih, s čimer bomo, poleg potrditve primernosti vpeljanega analiznega postopka, dobili tudi podatke o prisotnosti hormonskih motilcev v površinskih in odpadnih vodah v Sloveniji. Do sedaj tovrstni podatki še ne obstajajo, vendar glede na to, da so med izbranimi analiti tako endogeni hormoni, kot tudi zdravilne učinkovine in spojine, ki se pogosto uporabljajo v različnih industrijskih procesih predvidevamo, da so ti prisotni tudi v slovenskem okolju.

## 5. MATERIALI IN METODE

### 5.1. MATERIALI

- 4-nonilfenol (Riedel de Haën, Hannover, Nemčija)
- 4-terc-oktilfenol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- bisfenol A (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 17 $\alpha$ -etinilestradiol (Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija)
- estron (Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija)
- 17 $\beta$ -estradiol (Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija)
- estriol (Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija)
- bisfenol A-d16 (Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija)
- N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamid (Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija)
- N-(terc-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamid (Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija)
- ekstrakcijske kolone Oasis HLB 60 mg (Waters, Milford, ZDA)
- Empore ekstrakcijski diski 47mm (3M, St.Paul, ZDA)
- klorovodikova kislina 37 % (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- piridin 99,5 % (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- metanol 99,8 % (J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA)
- etilacetat 99,6 % (J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA)
- acetonitril 99,8 % (J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA)
- diklormetan 99,8 % (J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA)
- n-heksan 99,5 % (J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA)
- aceton 99,4 % (J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA)
- izopropanol 99,5 % (J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA)
- n-heptan 99,0 % (Riedel de Haën, Hannover, Nemčija)
- deionizirana voda (Milli Q)
- nitrozo-celulozni filtri s premerom por 5,0  $\mu$ m (Sartorius AG, Göttingen, Nemčija)
- nitrozo-celulozni filtri s premerom por 1,2  $\mu$ m (Sartorius AG, Göttingen, Nemčija)

- najlonski filtri s premerom por 0,45  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, ZDA)

## 5.2. APARATURA

- sistem za SPE (Supelco, Bellefonte, ZDA)
- GC-MSD instrument HP 6890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, ZDA)

## 5.3. METODE DELA

### 5.3.1. Priprava raztopin standardov

Za optimizacijo analizne metode in določitev posameznih statističnih parametrov smo pripravili ustrezne standarde preiskovanih analitov in internega standarda. Na analizni tehtnici (Mettler Toledo, AT 201) smo natančno natehtali 2 mg vsake od 7 preučevanih spojin v 20 mL merilno bučko in nato bučko dopolnili do oznake z metanolom. To raztopino smo nato z metanolom redčili 10-, 100- in 1000-krat. Na enak način smo ločeno pripravili še standardne raztopine za vsako preučevano spojino (4-terc-oktilfenol, 4-nonilfenol, bisfenol A, estron, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinil estradiol, estriol). Enak postopek smo ponovili tudi pri izbranem internem standardu (bisfenol A-d16). 2 mg bisfenola A-d16 smo zatehtali v posebno 20 mL bučko in raztopino redčili. Devterirani bisfenol A-d16 smo izbrali za interni standard zato, ker v naravi ni prisoten in ima podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot preučevani analiti. Pripravljene raztopine standardov smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

### 5.3.2. Priprava vzorcev na GC-MSD analizo

#### Izolacija

Za optimizacijo ekstrakcije smo raztopino standardov v metanolu prenesli v ustrezen volumen destilirane vode (200 mL- 1000 mL). Ekstrakciji na izbranem nosilcu je sledila elucija z izbranimi topili in derivatizacija ter GC-MSD analiza. Pri optimizaciji ekstrakcije smo preučevali naslednje parametre, ki so v nadaljevanju podrobno opisani:

- vpliv ekstrakcijskega nosilca

- vpliv pH-ja vzorca
- vpliv koncentracije raztopine
- izbor topila za elucijo
- volumen topila za elucijo.

Vse vzorce, ki so služili optimizaciji metode, smo pripravili in analizirali v najmanj treh paralelkah.

### Derivatizacija

Za optimizacijo postopka derivatizacije preučevanih spojin smo raztopino standardov prenesli v 1,5 mL vialo, v katero smo dodali še izbrane reagente in topila. Dobljeno reakcijsko zmes smo nato segrevali in po končani derivatizaciji vzorce analizirali z GC-MSD. Pri optimizaciji postopka smo se osredotočili na naslednje parametre:

- izbira derivatizacijskega reagenta
- izbira topila
- določitev reakcijske temperature
- čas segrevanja

### **5.3.3. Pogoji meritev**

Trimetilsililne derivate iskanih spojin smo kvalitativno in kvantitativno določili s GC-MSD. Separacijo smo izvedli s plinskim kromatografom HP 6890 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija) s kapilarno kolono HP-5 MS dolžine 30 m, z notranjim premerom 0,25 mm in debelino stacionarne faze (fenilmetil silikon) 0,25  $\mu\text{m}$ . GC ločba je potekala pod naslednjimi pogoji:

- nosilni plin: helij
- hitrost nosilnega plina (»velocity«): 37 cm/s pri 100 °C
- temperatura injektorja: 250 °C
- način injiciranja: splitless
- temperatura vmesnika: 285 °C
- volumen vzorca: 1  $\mu\text{L}$
- izbrani temperaturni program je prikazan v Preglednici I.



**Preglednica I:** Optimizirani temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa

T začetna ( $T_z$ ) (°C)	Hitrost naraščanja T (°C min <sup>-1</sup> )	T končna ( $T_k$ ) (°C)	Trajanje $T_k$ («hold«) (min)
50	-	50	1
50	30	120	1
120	10	220	0
220	7	250	5
250	6	275	5

Skupni čas optimizirane analize s plinskim kromatografom znaša 32,79 min.

Spojine smo v postopku GC-MSD analize ionizirali z elektroni (EI) z energijo 70 eV. Detekcija masnih fragmentov je potekala v območju od 50 do 550 enot pri snemanju v celotnem masnem območju (SCAN:  $m/z= 50-550$ ) oziroma pri izbranih fragmentnih ionih za posamezno spojino (SIM).

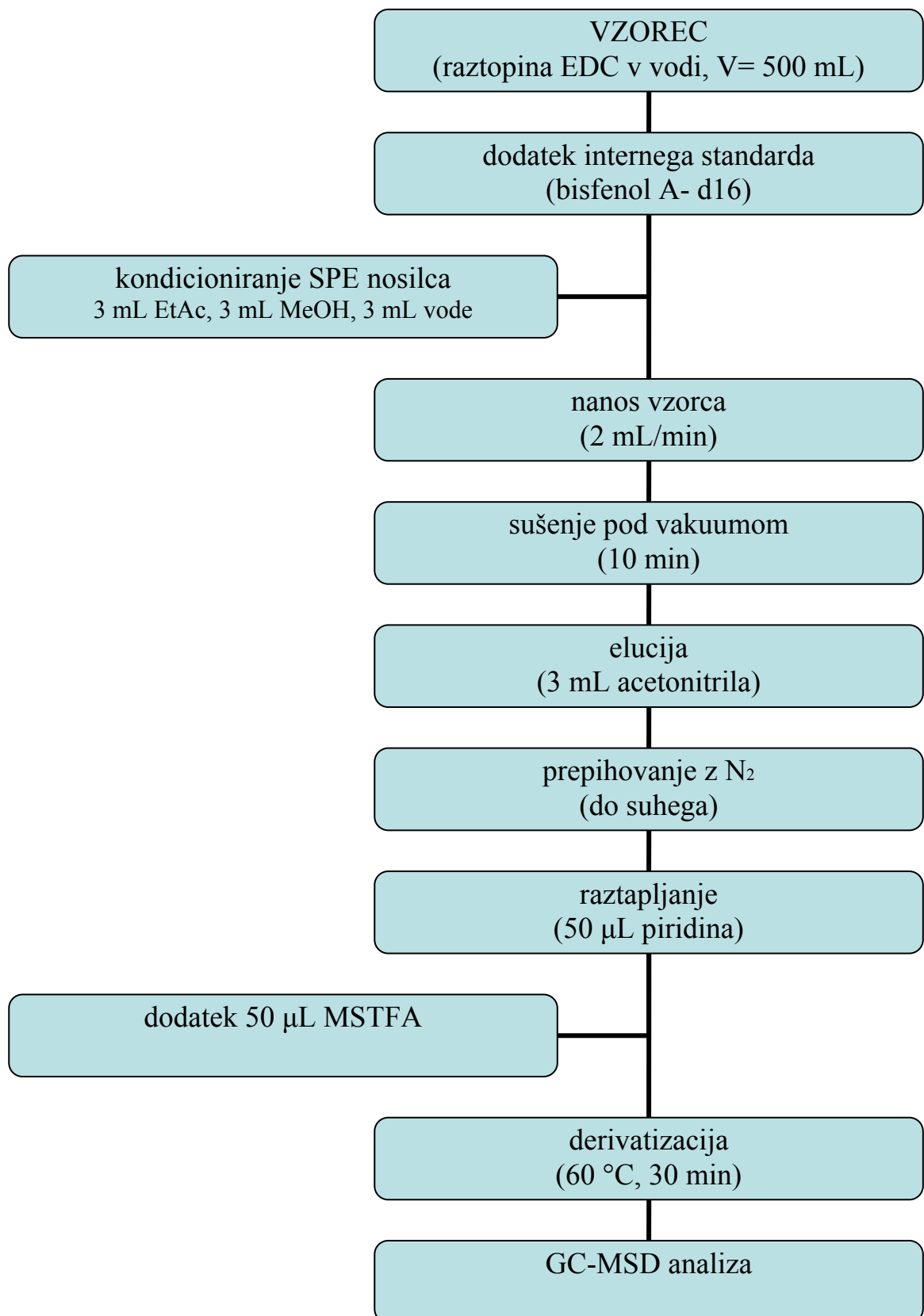
#### 5.3.4. Analiza okoljskih vzorcev

Po končani optimizaciji analiznega postopka smo njegovo primernost preizkusili pri analizi vzorcev odpadnih in vzorcev površinskih vod. Umeritveno krivuljo smo izdelali s pomočjo standardnih raztopin preiskovanih analitov.

Pri izdelavi umeritvene krivulje smo za matriko uporabili vodovodno vodo, kateri smo dodali ustrezno količino standardne raztopine analitov in internega standarda. Koncentracija internega standarda je bila v vseh vzorcih enaka  $c=100 \text{ ng L}^{-1}$ , koncentracija preučevanih analitov pa je znašala  $20 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $50 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $100 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $250 \text{ ng L}^{-1}$  in  $500 \text{ ng L}^{-1}$ . Vzorce smo pripravili v dveh paralelkah, poleg tega pa še tri paralelke brez dodanih standardov (slepi vzorec). 500 mL vzorca smo ekstrahirali s pomočjo Visiprep<sup>TM</sup> Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, ZDA, Slika 8). Kolono smo najprej omočili s 3 mL etilacetata, 3 mL metanola in 3 mL vodovodne vode. Sledil je nanos vodne raztopine standardov s hitrostjo  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Po končanem nanosu smo kolono pri podtlaku  $-25 \text{ mm Hg}$  posušili do suhega. Sledila je elucija s 3 mL acetonitrila. Eluat smo delno posušili in ga nato kvantitativno prinesli v 1,5 mL vialo in ga nato v toku dušika koncentrirali do suhega. Suhemu ekstraktu smo dodali 50  $\mu\text{L}$  piridina

in 50  $\mu\text{L}$  MSTFA in ga segrevali 30 min pri 60  $^{\circ}\text{C}$ . Temu je sledila GC-MSD analiza. Enak postopek, kot je bil sedaj opisan za analizo standardnih raztopin, smo uporabili tudi za analizo vzorcev površinskih vod, le da smo 500 mL vzorca dodali 500  $\mu\text{L}$  raztopine internega standarda s koncentracijo 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Slika 11).

Za analizo vzorcev odpadnih vod zaradi kompleksnosti matrike ekstrahiramo le 200 mL vzorca. Vzorce odpadnih vod predhodno filtriramo, najprej preko nitrozo-celuloznih filtrov z velikostjo por 5  $\mu\text{m}$ , nato preko nitrozo-celuloznih filtrov z velikostjo por 1,2  $\mu\text{m}$  in na koncu še skozi najlonske filtre z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$ . Za izdelavo umeritvene krivulje smo predhodno filtriranim vzorcem odpadne vode z odtoka čistilne naprave (ČN) dodali standardno količino preučevanih analitov, tako da smo dobili vodne raztopine s koncentracijo 20  $\text{ng L}^{-1}$ , 40  $\text{ng L}^{-1}$ , 50  $\text{ng L}^{-1}$ , 60  $\text{ng L}^{-1}$ , 70  $\text{ng L}^{-1}$ , 80  $\text{ng L}^{-1}$  in 100  $\text{ng L}^{-1}$ . Koncentracija internega standarda je v vseh vzorcih znašala  $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$ .



**Slika 11:** Shematski prikaz optimiziranega poteka analiznega postopka za merjenje vsebnosti izbranih hormonskih motilcev (EDC) v površinskih vodah

## 6. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 6.1. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA

Za optimizacijo ekstrakcijskega postopka smo pripravili standardne raztopine v deionizirani (MilliQ) vodi z znano koncentracijo analitov. Ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE- solid phase extraction) smo preizkusili na dveh različnih nosilcih in z več različnimi topili za elucijo. Določali smo tudi vpliv pH vrednosti in koncentracije raztopine na izkoristek ekstrakcije in vpliv volumna topila za elucijo na uspešnost spiranja. Namen optimizacije ekstrakcijskega postopka je bil čim večji izkoristek ekstrakcije iz vodne matrike za vse preučevane spojine.

#### 6.1.1. Izbira ekstrakcijskega nosilca

Za ekstrakcijo smo uporabili dva različna ekstrakcijska nosilca, to so SPE kolone in ekstrakcijski diski. Sistem za HLB Oasis (Waters) ekstrakcijske kolone je prikazan na Sliki 8, za Empore (3M) ekstrakcijske diske pa smo uporabili sistem, ki je prikazan na Sliki 12.



Slika 12: Sistem za SPE na ekstrakcijskih diskih

Kot adsorbente za ekstrakcijske kolone in diske smo uporabili polimere, ki so primerni za adsorpcijo srednje polarnih kislih, bazičnih in nevtralnih spojin. Mednje sodijo tudi preučevani hormonski motilci. Najpomembnejše lastnosti obeh nosilcev (Oasis HLB in Empore) so prikazane v Preglednici II. Adsorbent v ekstrakcijskih diskih ima v primerjavi z adsorbentom, s katerim so napolnjene ekstrakcijske kolone, manjšo velikost delcev in večjo specifično površino. Posledica tega je večja kapaciteta vezave analitov in tudi prisotnih nečistot.

**Preglednica II:** Primerjava lastnosti uporabljenih adsorbentov

	OASIS HLB	EMPORE
SESTAVA	poli(stirendivinilbenzen) sulfonat	N-vinilpirolidon, divinilbenzen
SPECIFIČNA POVRŠINA (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	450	810
POVPREČNI PREMER POR (Å)	80	80
VELIKOST DELCEV (µm)	30 do 60	16

6 paralelk 500 mL vodnih raztopin analitov, s koncentracijo  $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$  smo ekstrahirali na ekstrakcijskih diskih, 6 enako pripravljenih paralelk pa na ekstrakcijskih kolonah. Za elucijo smo uporabili dve različni topili, acetonitril za 6 paralelk in etilacetat za 6 paralelk. Dobljeni eluat smo s prepihanjem v toku dušika koncentrirali do suhega. Suhi preostanek smo derivatizirali in analizirali z GC-MSD. Površino kromatografskih vrhov tako pripravljenih spojin smo primerjali s površino kromatografskih vrhov spojin, ki so bile derivatizirane brez predhodne ekstrakcije. S tem postopkom smo določili izkoristke ekstrakcije za posamezne analite.

Iz izkoristkov ekstrakcij, ki so prikazani v Preglednicah III in IV je razvidno, da so izkoristki v obeh primerih visoki (80 % do 162 % za diske in 40 % do 125 % za kolone). V nekaterih primerih izkoristki ekstrakcije presegajo 100 %. Najverjetnejši vzrok za to je napaka instrumenta, možen pa je tudi razpad TMS derivatov preučevanih spojin, česar v SIM načinu snemanja ne zaznamo, SCAN snemanje pa zaradi prenizkih koncentracij analitov ni mogoče.

**Preglednica III: Izkoristki ekstrakcije na Empore ekstrakcijskih diskih**

	ACETONITRIL	ETILACETAT
t-OKTILFENOL	106 %	72 %
4-NONILFENOL	80 %	67 %
BISFENOL A	126 %	133 %
ESTRON	162 %	105 %
ESTRADIOL	118 %	93 %
ET. ESTRADIOL	111 %	118 %
ESTRIOL	105 %	85 %

**Preglednica IV: Izkoristki ekstrakcije na HLB Oasis ekstrakcijskih kolonah**

	ACETONITRIL	ETILACETAT
t-OKTILFENOL	81 %	56 %
4-NONILFENOL	40 %	49 %
BISFENOL A	67 %	103 %
ESTRON	100 %	67 %
ESTRADIOL	75 %	72 %
ET. ESTRADIOL	89 %	125 %
ESTRIOL	78 %	102 %

Načeloma smo dobili z ekstrakcijskimi diski boljše izkoristke za večino preučevanih spojin. Kljub temu imajo Empore diski v primerjavi s HLB Oasis kolonami tudi pomanjkljivosti. Največji sta zagotovo visoka cena in večja poraba organskih topil, tako za kondicioniranje diskov, kot za elucijo. Diske smo kondicionirali s po 5 mL izopropanola, acetona, metanola in destilirane vode, medtem ko smo za kolone porabili le po 3 mL etilacetata, metanola in destilirane vode. Podobno je tudi pri eluciji, saj ob uporabi diskov potrebujemo večje volumne topil. Četudi proizvajalec diskov priporoča 2×10 mL topila za elucijo, smo v okviru diplomske naloge z uporabo 2×5 mL topila dobili še vedno dobre izkoristke ekstrakcije. Kljub temu je poraba topila pri eluciji z diskov skoraj enkrat večja, kar poleg višjih stroškov tudi dodatno podaljša postopek sušenja in poveča možnosti izgub med njim. Pomanjkljivost pri uporabi diskov je tudi nenatančna regulacija pretoka, ki je pomembna za izkoristek in dobro ponovljivost ekstrakcije. Iz navedenih razlogov smo se odločili za nadaljnje delo z Oasis HLB kolonami (Waters). Kljub temu želimo poudariti, da ekstrakcijski diski zaradi manjše velikosti delcev in večje specifične površine omogočajo hitrejši pretok in zato krajši čas analize. Zato so primerni za ekstrakcijo večjih volumnov in bolj kompleksnih vzorcev, kot so odpadne vode.

### 6.1.2. Vpliv koncentracije vzorcev na izkoristek ekstrakcije

Za preučevanje vpliva koncentracije vzorcev na izkoristek ekstrakcije smo vzorce pripravili na enak način kot pod točko 6.1.1. Vzorce smo ekstrahirali s HLB Oasis nosilci. S tem poskusom smo želeli dokazati, da se izkoristki ekstrakcije ne spreminjajo v koncentracijskem območju, v katerem pričakujemo, da se bodo nahajali tudi okoljski vzorci (20 ng L<sup>-1</sup> in 100 ng L<sup>-1</sup>). Okoljski vzorci pogosto vsebujejo preučevane spojine v koncentracijah blizu meje zaznavnosti. Ker smo morali zagotoviti, da bodo izmerjene vrednosti vseh 7 spojin nad mejo zaznavnosti, smo kot najnižjo koncentracijo izbrali 20 ng L<sup>-1</sup>. Kot najvišjo smo izbrali koncentracijo 100 ng L<sup>-1</sup>, kar je največja pričakovana koncentracija analitov v okoljskih vzorcih. Izkoristke smo vrednotili na enak način kot pod točko 6.1.1. Za elucijo smo tokrat uporabili 3 topila v 3 paralelkah. Rezultati so zbrani v Preglednicah V in VI.

**Preglednica V:** Izkoristek ekstrakcije vzorcev s koncentracijo  $c = 20 \text{ ng L}^{-1}$

	ACETONITRIL	METANOL	DCM
t-OKTILFENOL	98 %	82 %	61 %
4-NONILFENOL	42 %	37 %	47 %
BISFENOL A	89 %	157 %	24 %
ESTRON	107 %	94 %	99 %
ESTRADIOL	104 %	100 %	110 %
ET. ESTRADIOL	107 %	108 %	102 %
ESTRIOL	90 %	88 %	6 %

**Preglednica VI:** Izkoristek ekstrakcije vzorcev s koncentracijo  $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$

	ACETONITRIL	METANOL	DCM
T-OKTILFENOL	81 %	83 %	78 %
4-NONILFENOL	40 %	47 %	72 %
BISFENOL A	67 %	157 %	30 %
ESTRON	100 %	98 %	115 %
ESTRADIOL	75 %	83 %	89 %
ET. ESTRADIOL	89 %	96 %	103 %
ESTRIOL	78 %	87 %	10 %

Rezultati ne kažejo bistvenih razlik v izkoristkih ekstrakcije vzorcev pri spodnji (Preglednica V) in zgornji (Preglednica VI) koncentraciji. Pri acetonitrilu in metanolu so izkoristki pri nižji koncentraciji celo nekoliko višji, pri diklormetanu (DCM) pa nekoliko

nižji. To je pogost pojav pri koncentracijah, ki so blizu meje zaznavnosti, kjer izgube analitov med postopkom analize in napaka instrumenta bistveno vplivajo na rezultate in v najslabšem primeru privedejo do tega, da tarčnih spojin sploh ne detektiramo.

Možno je tudi, da so izkoristki pri višji koncentraciji analitov nižji, saj lahko pride do nasičenja nosilca, vendar tega nismo preizkušali, saj nas zanimajo okoljske koncentracije, ki so razmeroma nizke in običajno ne presežejo vezalne kapacitete adsorbenta.

### **6.1.3. Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije**

Iz literature je razvidno, da lahko pH vzorca bistveno vpliva na sposobnost vezave posameznih analitov na adsorbent, predvsem pri lipofilnih nosilcih, kot sta C8 in C18, vezana na silikone (41). Slednje so v preteklosti pogosto uporabljali za ekstrakcijo lipofilnih spojin iz okoljskih vzorcev. Ker so načeloma polimerni nosilci manj občutljivi na pH vzorca (42), smo se v sklopu diplomske naloge odločili preveriti vpliv kislega pH na izkoristek ekstrakcije na polimernih nosilcih. Za optimizacijo analizne metode smo uporabili vzorce, pripravljene v destilirani vodi z nevtralnimi pH, vendar realne vzorce pogosto nakisamo (do pH= 2-3) že takoj po vzorčenju, s čimer zagotovimo mikrobiološko stabilnost, kar je pomembno predvsem za vzorce odpadnih vod. Nakisane vzorce lahko pred ekstrakcijo nevtraliziramo in s tem zagotovimo pH, pri katerem smo optimizirali postopek, vendar bi s tem spremenili ionsko moč vzorca, kar vpliva na izkoristek ekstrakcije. Zato smo se odločili preveriti vpliv pH na izkoristek ekstrakcije in tako eksperimentalno ovrednotiti izkoristek ekstrakcije preučevanih spojin iz nakisanih vzorcev (pH= 2,5) v primerjavi z nenakisanimi (pH= 7).

Za ekstrakcijo vzorcev, ki so bili pripravljene, kot je opisano pod točko 6.1.1., smo uporabili Oasis HLB polimerne nosilce. Koncentracija vsakega od analitov je bila 100 ng L<sup>-1</sup>. 6 od 12 vzorcev smo dodatno nakisali s 3,2 M HCl do pH= 2,5. Za elucijo smo uporabili acetonitril in etilacetat. Rezultati so prikazani v Preglednicah VII in VIII.



**Preglednica VII:** Izkoristek ekstrakcije vzorcev s pH= 2,5

	ACETONITRIL	ETILACETAT
t-OKTILFENOL	83 %	82 %
4-NONILFENOL	49 %	54 %
BISFENOL A	78 %	97 %
ESTRON	82 %	90 %
ESTRADIOL	97 %	103 %
ET. ESTRADIOL	149 %	140 %
ESTRIOL	96 %	96 %

**Preglednica VIII:** Izkoristek ekstrakcije vzorcev s pH= 7,0

	ACETONITRIL	ETILACETAT
t-OKTILFENOL	81 %	56 %
4-NONILFENOL	40 %	49 %
BISFENOL A	67 %	103 %
ESTRON	100 %	67 %
ESTRADIOL	75 %	72 %
ET. ESTRADIOL	89 %	125 %
ESTRIOL	78 %	102 %

Iz rezultatov je razvidno, da pH v manjši meri vpliva na izkoristek ekstrakcije. Izkoristki ekstrakcije predhodno nakisanih vzorcev (Preglednica VII: 49 % do 149 %) so večinoma višji od izkoristkov ekstrakcije nenakisanih vzorcev (Preglednica VIII: 40 % do 125 %). Pri določenih spojinah (estron, estriol) ugotovimo, da pH ne vpliva na izkoristek ekstrakcije rezultata in je slednji odvisen od topila, s katerim eluiramo ekstrakcijske nosilce. Verjetno pride pri dolgotrajni izpostavljenosti kislemu mediju do določenih sprememb v strukturi adsorbenta in/ali analitov, kar posledično vpliva na spremenjeno afiniteto spojin do adsorbenta in topila za elucijo. Visoki izkoristki etinil estradiola iz kislega medija so najverjetneje posledica odcepa alkilne –OH skupine in nastanka karbokationa (na mestu 17 steroidnega skeleta), ki lahko reagira z derivatizacijskim reagentom.

Topilo, ki ga uporabimo za elucijo, mora prekiniti vezi med adsorbentom in analitom. Pri acetonitrilu, ki je bolj polaren kot etilacetat, opazimo večji vpliv pH na izkoristek ekstrakcije, vendar smo ugotovili, da v splošnem vpliv pH na izkoristek ekstrakcije ni ključen.

#### 6.1.4. Izbira topila za elucijo

Ena pomembnejših stopenj postopka optimizacije metode je izbor ustreznega topila za elucijo preučevanih analitov z SPE nosilca. Dobro topilo za elucijo ne reagira z analiti, ampak prekine vezi med analiti in adsorbentom. Pogoj za to je ustrezna afiniteta topila do spojin, ki jih želimo sprati z nosilca. Ker se preučevanih 7 spojin med seboj razlikuje po svojih fizikalno-kemijskih lastnostih, smo preučevali 5 topil različne polarnosti in na osnovi dobljenih izbrali topilo, ki zagotavlja zadovoljive izkoristke za vsako od preučevanih spojin.

Vzorci smo pripravili v koncentraciji  $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$  po enakem postopku, kot je opisano pod točko 6.1.1. in jih ekstrahirali na HLB Oasis nosilcih. Rezultati so prikazani v Preglednici IX, v kateri so topila razvrščena po padajoči polarnosti od acetonitrila do n-heksana.

**Preglednica IX:** Izkoristek ekstrakcije po eluciji z različnimi topili

	acetonitril	metanol	DCM	etilacetat	n-heksan
t-OKTILFENOL	81 %	87 %	78 %	56 %	0 %
4-NONILFENOL	40 %	43 %	72 %	49 %	0 %
BISFENOL A	67 %	157 %	30 %	103 %	0 %
ESTRON	100 %	98 %	115 %	67 %	0 %
ESTRADIOL	75 %	83 %	89 %	72 %	0 %
ET. ESTRADIOL	89 %	96 %	103 %	125 %	0 %
ESTRIOL	78 %	87 %	10 %	102 %	0 %

Rezultati kažejo, da so za elucijo preučevanih analitov iz HLB Oasis ekstrakcijskih kolon najprimernejša srednje do bolj polarna topila (etilacetat, DCM, metanol, acetonitril). Izkoristek ekstrakcije je za 4-nonilfenol, ki je med preučevanimi spojinami najmanj polarna spojina, v primerjavi z ostalimi spojinami večinoma nižji (razen v DCM). To lahko razložimo z visoko lipofilnostjo spojine, vendar za to spojino ne dosežemo višjih izkoristkov niti z uporabo heksana, ki je izrazito nepolarno topilo. Ker je bil slednji popolnoma neprimeren za elucijo vseh preučevanih spojin, smo ga izključili iz nadaljnjih raziskav. Najbolj verjetno je, da se 4-nonilfenol ne veže v celoti na izbrani ekstrakcijski nosilec, najboljši izkoristek zanj pa smo dobili po eluciji z DCM (72 %). DCM je sicer v splošnem primeren za elucijo večine analitov, vendar da izrazito slabe izkoristke za bolj polarne spojine, kot sta estriol in bisfenol A. Acetonitril, metanol in etilacetat smo

uporabili še v nadaljnjih poskusih in večinoma smo dosegli najboljše rezultate z acetonitrilom, s katerim smo dobili tudi najbolj ponovljive rezultate. Metanol ni primeren za elucijo bisfenola A, saj smo zanj večkrat dobili previsoke izkoristke. Poleg tega morebitni ostanki metanola reagirajo z derivatizacijskim sredstvom, kar zmanjša izkoristek derivatizacije in vpliva na točnost analize. Pri eluciji z etilacetatom je bila ponovljivost rezultatov slaba, vzrok za to pa je lahko nekoliko manjša čistost etilacetata v primerjavi z ostalimi uporabljenimi topili, saj že najmanjše količine vode ali očetne kisline, ki je kot nečistota pogosto prisotna v etilacetatu, lahko povzročijo hidrolizo trimetilsililnih etrov, ki jih tvorimo pred GC-MSD analizo.

### 6.1.5. Optimizacija volumna topila za elucijo

Pri optimizaciji volumna topila za elucijo analitov z SPE kolon smo upoštevali, da mora biti dovolj velik, da zagotovimo kvantitativno elucijo analitov. Ker pa želimo sočasno z ekstrakcijo tudi koncentrirati naš vzorec, želimo uporabiti čim manjši volumen topila, s čimer bi se izognili nepotrebnemu dodatnemu koncentriranju vzorcev. S tem skrajšamo skupni čas analize, zmanjšamo možnost izgub in porabo organskih topil. Pri vseh opravljenih poizkusih na HLB Oasis nosilcih smo eluirali s 3 mL topila, kar tudi priporoča proizvajalec. Ker je iz literature razvidno, da so nekateri uporabljali tudi večje volumne topila (do 10 mL), smo nekatere nosilce po eluciji (rezultati so v Preglednici X) ponovno eluirali s 3 mL enakega topila kot pri prvi eluciji. Delež analita, dobljenega pri drugi eluciji glede na rezultat prve, je prikazan v Preglednici XI.

**Preglednica X:** Izkoristek ekstrakcije vzorcev s koncentracijo  $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$  po prvi eluciji

	METANOL	ETILACETAT	DCM
t-OKTILFENOL	43%	56%	78%
4-NONILFENOL	87%	49%	72%
BISFENOL A	157%	103%	30%
ESTRON	98%	67%	115%
ESTRADIOL	83%	72%	89%
ET. ESTRADIOL	96%	125%	103%
ESTRIOL	87%	102%	10%

**Preglednica XI:** Delež eluiranega analita pri drugi eluciji v primerjavi z deležem dobljenih analitov po prvi eluciji

	METANOL	ETILACETAT	DCM
t-OKTILFENOL	1,8 %	3,4 %	2,2 %
4-NONILFENOL	0,8 %	3,2 %	3,2 %
BISFENOL A	1,4 %	10,1 %	14,0 %
ESTRON	2,5 %	3,7 %	1,2 %
ESTRADIOL	2,8 %	6,8 %	4,2 %
ET. ESTRADIOL	1,6 %	1,5 %	2,3 %
ESTRIOL	1,0 %	2,2 %	146,0 %

Rezultati (Preglednica X) kažejo, da povečanje volumna topila ni potrebno, ker spiranje z dodatnimi 3 mL topila minimalno doprinese le celokupnemu deležu eluirane spojine (cca 5 %), hkrati pa bistveno podaljša čas analize. Veliko smo z drugim spiranjem doprinesli le k ekstrakcijskemu izkoristku estriola z diklormetanom (146 %), kar je posledica nizkega izkoristka po prvem spiranju. Na osnovi rezultatov smo ugotovili, da DCM ni primeren za eluiranje bolj polarnih spojin, kot sta estriol (10 %) in bisfenol A (30 %). Tudi po drugem spiranju smo z DCM skupno eluirali le 25 % estriola in 42 % bisfenola A. Na osnovi rezultatov spiranja z metanolom in etilacetatom smo se odločili, da povečanje volumna topila ni potrebno, saj dodatno spiranje ne izboljša izkoristkov ekstrakcije v tolikšni meri, da bi opravičilo daljši čas analize in večjo porabo organskih topil. Dokazali smo tudi, da po eluciji ostane majhen delež analitov vezan na nosilec. Ker se vse izgube tekom procesa analize seštevajo in se v končni fazi odražajo v meji zaznavnosti, smo sklenili, da volumna topila za elucijo tudi ne bomo zmanjševali.

## 6.2. OPTIMIZACIJA DERIVATIZACIJE

Derivatizacija je postopek, s katerim pretvorimo polarne nehlapne spojine v hlapne derivate. V primeru sedmih preučevanih hormonskih motilcev smo polarne hidroksilne skupine pretvorili v nepolarne sililne etre. S tem smo povečali hlapnost spojinam, posledica česar so boljši odzivi pri GC-MSD analizi.

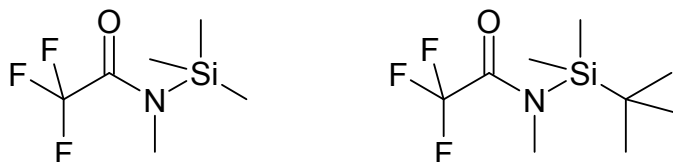
Za optimizacijo derivatizacije smo pripravili raztopino analitov v metanolu s koncentracijo 100 mg L<sup>-1</sup>. Z redčenjam v metanolu smo pripravili raztopine s koncentracijami 10 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup> in 0,1 mg L<sup>-1</sup>. 500 µL metanolne raztopine analitov

smo prenesli v 1,5 mL vialo in v toku dušika posušili vzorec do suhega. Suhi preostanek smo raztopili v izbranem topilu in dodali derivatizacijski reagent. Po končani reakciji derivatizacije smo hranili vzorec v zamrzovalniku do GC-MSD analize.

Preizkušali smo dva različna derivatizacijska reagentna, 4 različna topila, vpliv količine dodatka derivatizacijskega sredstva, vpliv temperature, pri kateri poteka reakcija in optimizirali čas segrevanja reakcijske zmesi. S tem smo želeli doseči čim višji izkoristek derivatizacije. Ker standardi trimetilsililnih in terc-butildimetilsililnih derivatov naših analitov niso komercialno dostopni, smo uspešnost derivatizacijskega postopka vrednotili na osnovi odzivov posameznih derivatov, dobljenih z GC-MSD analizo (SCAN način snemanja).

### 6.2.1. Izbira derivatizacijskega reagenta

Derivatizacijski postopek smo izvedli z 2 reagentoma, to sta MSTFA (*N*-metil-*N*-trifluoroacetamid) in MTBSTFA (*N*-metil-*N*-[terc-butildimetil-silil]trifluoroacetamid). Reagenta se razlikujeta po strukturi (Slika 13) in po vrsti sililnih etrov, ki jih tvorita. Z MSTFA tvorimo na tarčnih hidroksilnih skupinah trimetilsililne etre, z MTBSTFA pa terc-butildimetilsililne etre. Slednji so glede na podatke v literaturi bolj obstojni (42, 43).



**Slika 13:** Strukturni formuli MSTFA (levo) in MTBSTFA (desno)

Z uporabljenima derivatizacijskima reagentoma smo tvorili strukturno različne derivate, ki imajo različne retencijske čase. Retencijski časi in molekularni ioni ter najpomembnejši fragmentni ioni preučevanih spojin so prikazani v Preglednicah XII in XIII. Strukturo spojin smo potrdili GC-MSD analizo.

**Preglednica XII:** Retencijski časi ( $t_R$ ) posameznih trimetilsililnih (TMS) in terc-butildimetilsililnih (TBS) derivatov

	Retencijski čas TMS derivatov (min)	Retencijski čas TBS derivatov (min)
t-OKTILFENOL	11,53	14,07
4-NONILFENOL	14,48	16,97
BISFENOL A	17,60	24,68
BISFENOL A-d16 (I.S.)	17,51	24,50
ESTRON	23,40	28,23
ESTRADIOL	24,42	28,53
ET. ESTRADIOL	26,57	29,81
ESTRIOL	28,24	-

**Preglednica XIII:** Rezultati MS analize za posamezne trimetilsililnih (TMS) in terc-butildimetilsililnih (TBS) derivate

	Molekulski ion (m/z) za TMS derivate	Potrditveni fragmentni ioni (m/z) za TMS derivate	Molekulski ion (m/z) za TBS derivate	Potrditveni fragmentni ioni (m/z) za TBS derivate
t-OKTILFENOL	278	207	320	249
4-NONILFENOL	292	179	334	221, 277
BISFENOL A	372	357	456	207, 441
BISFENOL A-d16 (I.S.)	386	368	470	217, 452
ESTRON	342	218, 257	384	327, 369
ESTRADIOL	416	285, 401	386	329, 371
ET. ESTRADIOL	440	285, 425	410	327, 353
ESTRIOL	504	311, 505	-	-

Na kromatogramu preučevanih spojin ne vidimo vrha za TBS derivat estriola. To je pričakovano, saj z GC-MSD instrumentom, ki smo ga imeli na razpolago, lahko snemamo le v območju od  $m/z = 50$  do  $550$ , popolnoma derivatiziran estriol pa ima molekulske

maso  $M_R = 630$ . Kljub temu je to nepričakovano, saj derivatizacija pri estradiolu in etinil estradiolu ni potekla na obeh, ampak samo na arilni hidroksilni skupini. Razlog za to so sterične ovire, saj je terc-butilna skupina mnogo večja od metilne. Mogoče je tudi, da derivatizacija estriola sploh ni potekla, vendar je malo verjetno, da v nobeni od paralelk in v prisotnosti treh različnih topil derivatizacija estriola ne bi potekla.

Ker je derivatizacija z MSTFA potekla pri vseh spojinah in na vseh hidroksilnih skupinah, kar smo potrdili z GC-MSD analizo, smo za nadaljnje delo uporabili samo ta derivatizacijski reagent.

Kot topilo pri postopku derivatizacije smo uporabili etilacetat, toluen in piridin v 3 paralelkah. Rezultati kažejo, da derivatizacijski reagent ne vpliva bistveno na površino kromatografskih vrhov, medtem ko ima izbira topila večji vpliv.

### **6.2.2. Izbira topila za derivatizacijo**

Izbira topila za derivatizacijo ima velik vpliv na potek reakcije. Derivatizacijski reagent MSTFA je pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju in lahko prevzame vlogo topila, vendar lahko dodatek nekaterih organskih topil vpliva na tvorbo končnega produkta reakcije.

Za izbiro topila smo 500  $\mu\text{L}$  predhodno pripravljene metanolne raztopine (poglavje 5.2.1) z izbrano koncentracijo analitov ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  in  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) prenesli v 1,5 mL vialo in preprihovali v toku dušika do suhega. Suhemu ostanku smo dodali 450  $\mu\text{L}$  izbranega topila in 50  $\mu\text{L}$  derivatizacijskega sredstva (MSTFA). Sledilo je segrevanje 30 minut pri  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  in GC-MSD analiza. Raztopine s koncentracijama 10 mg/L in 1 mg/L smo analizirali s SCAN metodo, raztopine s koncentracijama 1 mg/L in 100  $\mu\text{g/L}$  pa s SIM metodo. Vse preizkuse smo opravili v 3 paralelkah.

Rezultati derivatizacije v metanolu so pokazali, da derivatizacija preučevanih spojin ni potekla. To smo pričakovali, saj je metanol v presežku in je reagiral z MSTFA. Tako se je večina derivatizacijskega reagenta porabila za derivatizacijo hidroksilnih skupin molekul metanola. Analiza je pokazala nederivatizirane spojine in potrdila nujnost derivatizacije zaradi nizkega odziva nederivatiziranih spojin. Za večino preučevanih spojin tudi pri koncentraciji 10 mg/L nismo dobili vidnega odziva. Dobili smo le kromatografske vrhove za estron, 4-terc-oktilfenol in 4-nonilfenol. Slednji sta tudi najbolj

lipofilni spojini od vseh naših analitov in sta tudi v derivatizirani obliki dajali višji odziv kot ostali proučevani analiti.

V primeru uporabe etilacetata je derivatizacija vseh spojin uspešno potekla, kar smo potrdili z GC-MSD analizo. Težave smo imeli samo z derivatizacijo etinil estradiola ob dodatku etilacetata, saj je bil produkt derivatizacije 90 % TMS-estron in samo 10 % di-TMS-etinil estradiol. Da bi izključili možnost kontaminacije vzorcev med njihovo pripravo in analiznim postopkom ter potrdili razmerje nastalih derivatov, smo pripravili standardno raztopino etinil estradiola in jo derivatizirali, kot že predhodno opisano. Za izključitev možnosti podobnih pretvorb in potrditev retencijskih časov smo ločeno derivatizirali in analizirali tudi ostale preučevane spojine, vendar rezultati niso pokazali podobnih nepravilnosti. Mehanizem odcepa etinilne skupine iz etinil estradiola, ki vodi do nastanka TMS-estrona, v literaturi ni opisan, čeprav že obstajajo članki, ki opozarjajo na ta problem (43-46). Zato na osnovi rezultatov zaključujemo, da etilacetat kot topilo ni primeren.

Enak poskus smo izvedli v toluenu in dobili podobne rezultate kot z etilacetatom. Odziv derivatiziranih analitov pri enakih koncentracijah ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  in  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) je bil nekoliko boljši kot pri dodatku etilacetata. Kot produkt derivatizacije etinil estradiola smo dobili 75 % TMS-estron in 25 % di-TMS-etinil estradiol. Poleg tega smo opazili, da sta kromatografska vrhova za TMS-4-terc-oktilfenol in TMS-4-nonilfenol asimetrična. Zato smo sklenili, da tudi toluen ni primerno topilo za naš analizni postopek.

Rezultati derivatizacije v piridinu kažejo, da je piridin primeren kot topilo pri reakciji derivatizacije. Dobljeni produkt derivatizacije etinil estradiola v piridnu je 100% di-TMS-etinil estradiol. Prav tako je potekla tudi popolna derivatizacija ostalih analitov. Kljub dobrim rezultatom delo s piridinom prinaša določene slabosti, ki pa se jim z ustreznim načinom dela lahko izognemo. Opazili smo, da trimetilsililni derivati v piridinu, kljub hranjenju v zamrzovalniku do GC-MSD analize, niso stabilni (44). Po določenem času (7-10 dni) se pojavijo dvojni vrhovi za TMS-4-terc-oktilfenol, TMS-4-nonilfenol in v manjši meri tudi za di-TMS-bisfenol A, kar literaturni podatki pripisujejo izomerizaciji produktov. Tako za 4-nonilfenol navajajo 15 različnih izomerov (47). Stabilnost derivatov smo izboljšali, ko smo 50  $\mu\text{L}$  derivatizacijskega sredstva dodali le 50  $\mu\text{L}$  topila in ne 450  $\mu\text{L}$  kot na začetku optimizacije postopka. Da bi se izognili opisanim težavam, smo eksperimentalno dokazali, da se izomerizaciji alkilfenolnih derivatov izognemo v kolikor GC-MSD analizo opravimo v 1 tednu od derivatizacije vzorcev. K



težavam pri delu s piridinom doprinese tudi velika higroskopsnost piridina. Temu se izognemo z ustreznim shranjevanjem in ravnanjem s piridinom in vzorci med postopkom priprave vzorcev. Predvsem moramo uporabiti svež piridin, ki ne vsebuje vode ali drugih nečistot, saj že majhna prisotnost vode v piridinu povzroči hidrolizo nastalih etrov.

### **6.2.3. Optimizacija temperature in časa segrevanja**

Z optimizacijo temperature in časa segrevanja želimo zagotoviti pogoje, ki omogočajo hitro in učinkovito derivatizacijo. Vzorce smo pripravili na enak način, kot je opisano pod točko 6.2. Za topilo smo uporabili etilacetat, toluen in piridin, kot derivatizacijski reagent pa MSTFA.

Preizkus derivatizacije smo pričeli s segrevanjem vzorcev pri 60 °C za 40, 70 in 100 minut. Vzoredno smo vzorce segrevali pri 90 °C in enakih časih (40, 70 in 100 minut). Po ohlavitvi in GC-MSD analizi smo ugotovili, da med vzorci derivatiziranimi pri 60 °C in 90 °C ni bilo opaznih razlik. Zato smo reakcijo derivatizacije ponovili pri istih temperaturah (60 °C in 90 °C), vendar smo čas segrevanja skrajšali na 15, 30 in 60 minut. Po opravljeni GC-MSD analizi smo ugotovili, da je 15 minut prekratek čas za popoln potek derivatizacije pri obeh preizkušanih temperaturah (60 °C in 90 °C), medtem ko se je 30 minut izkazalo kot zadosten čas za potek reakcije.

Ker smo vse poskuse opravili pri dveh temperaturah, 60 °C in 90 °C, smo ugotovili, da temperatura bistveno ne vpliva na potek reakcije. Zato smo preizkusili tudi, če je segrevanje sploh potrebno. Reakcijsko zmes, pripravljeno v etilacetatu, toluenu in piridinu, smo pri sobni temperaturi (25 °C) pustili 0,5 h, 1 h, 2 h in 24 h. Rezultati GC-MSD analize so pokazali, da derivatizacija pri sobni temperaturi niti v 24 h ne poteče popolnoma, zato je segrevanje nujno potrebno. Zato smo kot optimalne pogoje derivatizacije določili segrevanje 30 minut pri 60 °C.

### **6.2.4. Določitev ustreznega volumna derivatizacijskega reagenta**

Določitev volumna derivatizacijskega reagenta (MSTFA) ne sodi med glavne optimizacijske parametre, saj je za uspešnost derivatizacije pomembno le, da je derivatizacijski reagent v prebitku. Kljub temu smo zaradi želje po znižanju stroškov

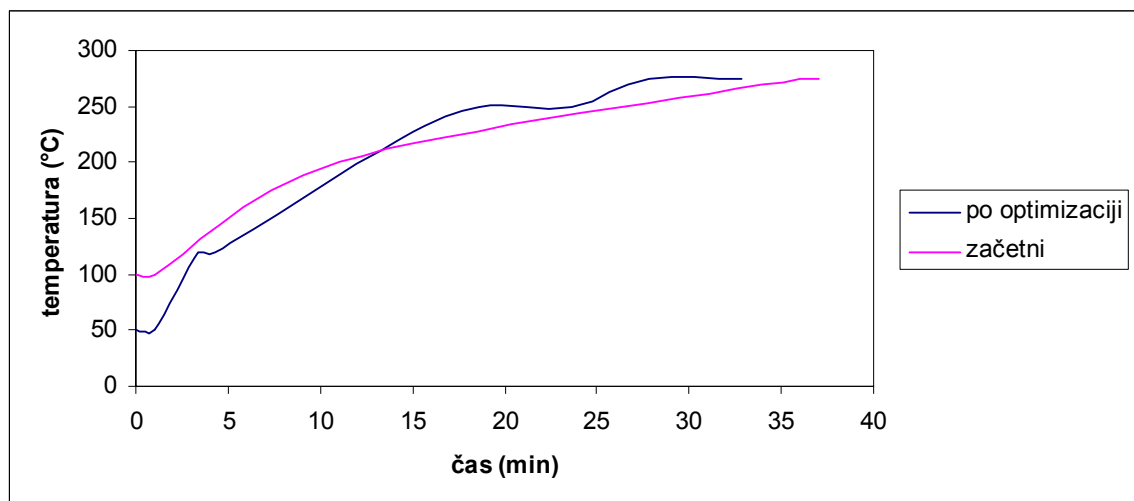
analiznega postopka preizkusili uspešnost postopka derivatizacije ob dodatku 10  $\mu\text{L}$  do 100  $\mu\text{L}$  MSTFA.

500  $\mu\text{L}$  standardne metanolne raztopine analitov s koncentracijo 10  $\text{mg L}^{-1}$  in 1  $\text{mg L}^{-1}$  smo prenesli v 1,5 mL vialo ter posušili do suhega. Suhemu preostanku smo dodali 10  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  in 100  $\mu\text{L}$  MSTFA ter piridin do končnega volumna (100  $\mu\text{L}$  oziroma 500  $\mu\text{L}$ ). Vzorce smo nato segrevali 30 minut pri 60  $^{\circ}\text{C}$  in analizirali z GC-MSD. Rezultati so pokazali, da samo ob dodatku 10  $\mu\text{L}$  MSTFA derivatizacija steroidnih spojin z več hidroksilnimi skupinami ni potekla popolnoma. Ker je potrebno upoštevati tudi prisotnost raznih nečistot v realnih vzorcih, ki prav tako reagirajo z MSTFA in ker razmerje med MSTFA in piridinom vpliva na stabilnost nastalih derivatov, smo za nadaljnji postopek uporabili 50  $\mu\text{L}$  MSTFA.

### **6.3. OPTIMIZACIJA TEMPERATURNEGA PROGRAMA ZA SEGREVANJE PEČI PLINSKEGA ANALIZATORJA**

Za kromatografsko ločbo izbranih analitov smo uporabili temperaturni program segrevanja peči, ki so ga Hernando in sodelavci uporabili za ločbo trimetilsililnih etrov 4-terc-oktilfenola, bisfenola A, estrona, 17 $\beta$ -estradiola in etinil estradiola (48).

Temperaturni program se je sicer izkazal kot primeren za ločbo večine analitov. Nezadostna je bila zgolj ločba bisfenola A in devteriranega bisfenola A-d16 (interni standard), kar smo pričakovali glede na zelo podobne fizikalno-kemijske lastnosti obeh spojin. Poleg tega smo želeli izboljšati elucijo estriola, ki se je eluiral pri 36 minutah, to je malo pred zaključkom analize. Zato smo se odločili izboljšati temperaturni program. Slika 14 prikazuje začetni (rožnata črta) in optimizirani (modra črta) temperaturni program.



**Slika 14:** Primerjava temperaturnega programa iz literature (rožnata črta) in izboljššanega temperaturnega programa (modra črta)

Izboljšani temperaturni program smo skrajšali iz 38 min na 32,79 min. Za nadaljnje skrajševanje programa se nismo odločili, saj bi s tem vplivali na kvaliteto ločbe posameznih analitov. Zaradi instrumenta smo za začetno temperaturo izbrali 50 °C namesto 100 °C. Končna temperatura je enaka, razlika med obema programoma pa je predvsem v tem, da v začetnem delu bolj zvišujemo temperaturo, medtem ko do končne temperature ( $T = 275$  °C) pridemo že po 27,79 min in nato le še vzdržujemo končno temperaturo 5 minut, da eluiramo tudi morebitne nečistote.

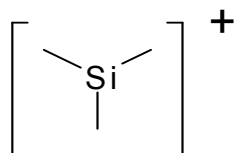
#### 6.4. INTERPRETACIJA MASNIH SPEKTROV SPOJIN

Z GC-MSD analizo z izboljšanim temperaturnim programom smo dosegli kromatografsko ločbo TMS etrov preučevanih analitov. Za vsako preučevano spojino oziroma njen TMS eter smo dobili ločen kromatografski vrh pri določenem retencijskem času. Z masno selektivno detekcijo smo tudi kvalitativno ovrednotili kromatografske vrhove na podlagi značilnih fragmentnih ionov TMS derivatov, ki so prikazani v Preglednici XIV. Masni spektri TMS derivatov preučevanih analitov so prikazani v prilogi.

**Preglednica XIV:** Retencijski časi ( $t_R$ ) trimetilsililnih derivatov izbranih analitov, njihove molekulske mase in značilni molekulski in fragmentni ioni

	Retencijski čas TMS derivatov (min)	Molekulska masa analitov	Molekulski ion (m/z) TMS derivatov	Pomembni fragmentni ioni (m/z) TMS derivatov
t-OKTILFENOL	11,53	206	278	73, 207
4-NONILFENOL	14,48	220	292	73, 179
BISFENOL A	17,60	228	372	73, 191, 207, 357
ESTRON	23,40	270	342	73, 218, 244, 257
ESTRADIOL	24,42	272	416	73, 231, 285, 401
ET. ESTRADIOL	26,57	296	440	73, 232, 285, 425
ESTRIOL	28,24	288	504	73, 147, 311, 505

Iz Preglednice XIV je razvidno, da vsi analizirani derivati vsebujejo molekulske in fragmentne ione, ki so značilni za produkte derivatizacije proučevanih spojin z MSTFA. Fragmentni ion  $m/z=73$  (Slika 15) je značilen ion TMS-derivatov in prevladuje v vseh spektrih.



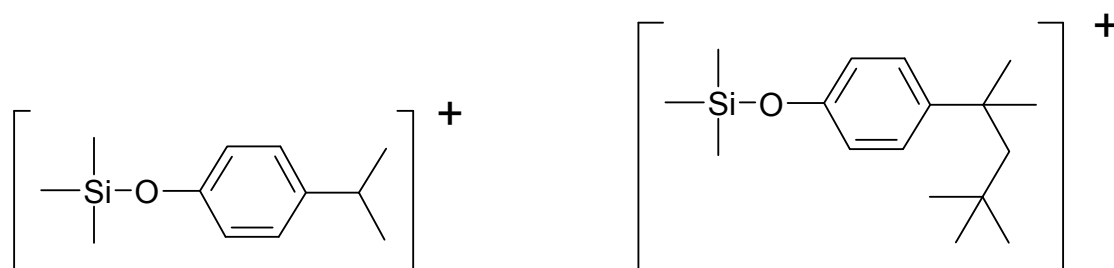
**Slika 15:** Značilni fragmentni ion TMS derivatov

Molekulski ion TMS derivatov ima običajno manjšo intenziteto, bolj izrazit je navadno ion  $[M-15]^+$ , ki ga dobimo s cepitvijo vezi metil-silicij. Tvorba ostalih fragmentnih ionov je odvisna od strukture posameznega analita, kar pogojuje razpad molekule na manjše fragmente.

Za GC-MSD analizo v SIM-u smo za posamezne spojine izbrali snemanje zgolj značilnih molekulskih in fragmentnih ionov. S tem smo povečali občutljivost instrumenta in omogočili analizo nižjih vsebnosti analitov. Fragmentne ione smo izbrali tako, da so čim bolj specifični za posamezno spojino, kar so navadno ioni z višjo molekulsko maso.

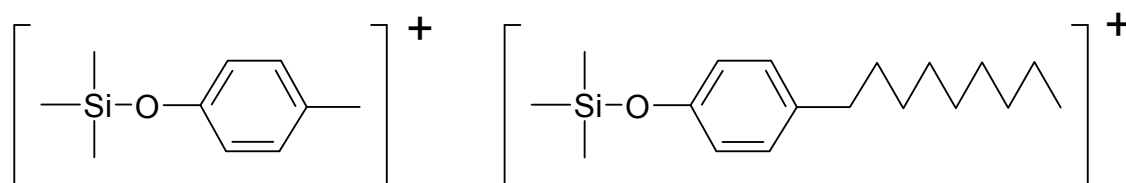
Splošno velja, da s snemanjem v SIM načinu večje število izbranih ionov zmanjša občutljivost metode, zato smo za vsako spojino izbrali 2-3 fragmentne ione.

Masni spekter TMS-4-terc-oktilfenola ima dobro izražen ion  $m/z=207$ , ki nastane z odcepitevijo terc-butilmetilnega dela alkilne verige. Za potrditev strukture smo izbrali tudi molekulski ion  $m/z=278$ , ki ima nižjo intenziteto. Oba iona sta prikazana na Sliki 16.



**Slika 16:** Fragmentni in molekulski ion TMS-4-terc-oktilfenola (levo: fragmentni ion  $m/z=207$  in desno: molekulski ion  $m/z=278$ )

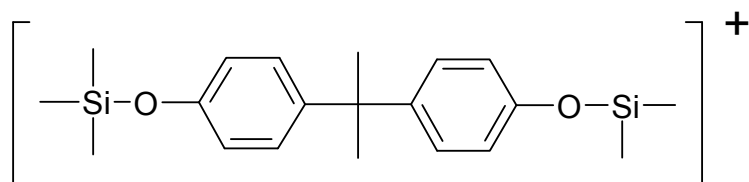
Masni spekter TMS-4-nonilfenola kaže približno enako intenziteto ionov  $m/z=179$  in  $m/z=292$ . Slednji je molekulski ion za to spojino. Ion  $m/z=179$  dobimo z odcepom oktila s stranske verige. Ker je prva metilna skupina močno vezana na fenilni obroč, ne pride do popolnega odcepa stranske verige. Tak fragment je sicer viden na spektru ( $m/z=165$ ), vendar ima nizko intenziteto in sodi med manj pomembne fragmentne ione. Zato smo za analizo TMS-4-nonilfenola v SIM izbrali iona z  $m/z=179$  in  $m/z=292$ , ki sta prikazana na Sliki 17.



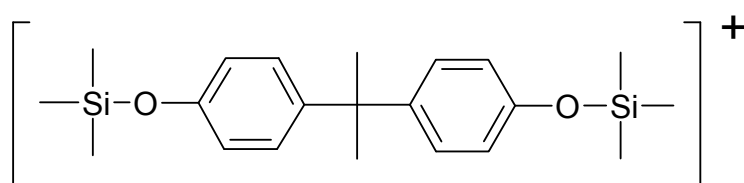
**Slika 17:** Fragmentni in molekulski ion TMS-4-nonilfenola (levo: fragmentni ion  $m/z=179$  in desno: molekulski ion  $m/z=292$ )

Masni spekter di-TMS-bisfenola A ima najbolj intenziven odziv za ion  $m/z=357$  (Slika 18), ki nastane po odcepu metilne skupine s silicija. Dober odziv ima tudi

molekulski ion  $m/z=372$  (Slika 19). Ostali ioni so manj specifični za to spojino, zato smo izbrali omenjena iona za SIM analizo.

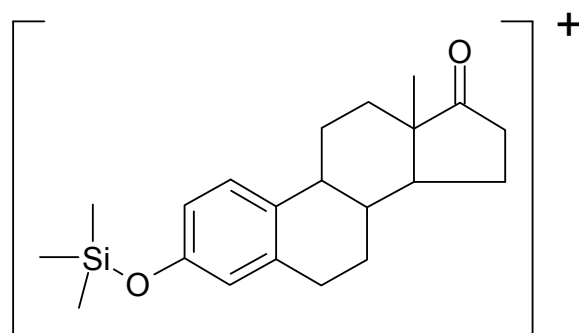


**Slika 18:** Ion  $m/z=357$ , ki nastane pri fragmentaciji di-TMS-bisfenola A

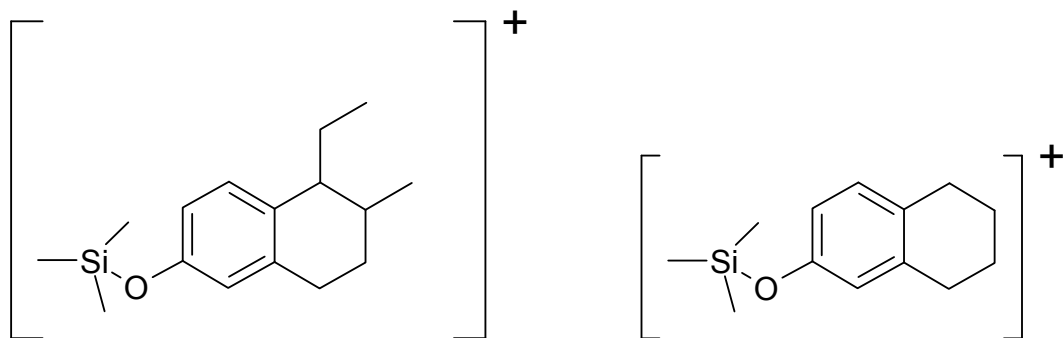


**Slika 19:** Molekulski ion  $m/z=372$  za di-TMS-bisfenol A

V masnem spektru TMS-estrona je najpomembnejši molekulski ion  $m/z=342$  (Slika 20). Poleg tega iona so pomembni fragmentni ioni tudi  $m/z=327$ , ki nastane po odcepu metilne skupine s silicija,  $m/z=257$ , ki nastane po delnem razpadu C obroča steroidnega skeleta (C obroč je nasičen 6-členski obroč, ki leži poleg edinega 5-členskega obroča),  $m/z=244$ , ki je prav tako rezultat razpada C obroča in  $m/z=218$ , ki nastane po popolnem odcepu vseh C-atomov razpadlega C obroča steroidnega skeleta. Najvišji odziv ima molekulski ion, sledita pa mu fragmentna iona  $m/z=257$  in  $m/z=218$  (Slika 21), zato smo te 3 ione izbrali za SIM analizo.



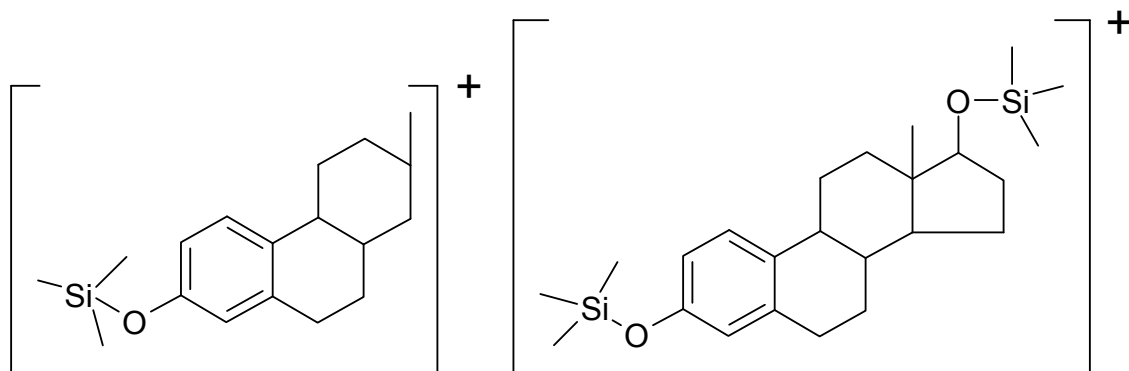
**Slika 20:** Molekulski ion  $m/z=342$  za TMS-estron



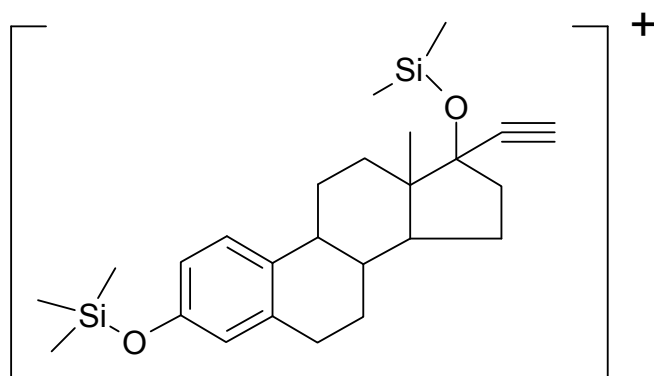
**Slika 21:** Iona  $m/z=257$  (levo) in  $m/z=218$  (desno), ki sta glavna fragmentna iona pri razpadu TMS-estrona

Pri fragmentaciji di-TMS-17 $\beta$ -estradiola je glavni produkt ion  $m/z=285$ , ki nastane po popolnem razpadu D obroča steroidnega skeleta (5-členski obroč) in odcepu vseh pripadajočih strukturnih elementov tega obroča. Dober odziv smo dobili tudi za molekularni ion  $m/z=416$ . Poleg teh dveh sta pomembna iona tudi  $m/z=401$ , ki nastane po odcepu metilne skupine s silicija in  $m/z=231$ , ki nastane po delnem razpadu C obroča steroidnega skeleta (odcepijo se 3 C-atomi). Za SIM analizo di-TMS-17 $\beta$ -estradiola smo izbrali iona  $m/z=285$  in  $m/z=416$ , katerih struktura je prikazana na Sliki 22.

Tudi pri fragmentaciji di-TMS-17 $\alpha$ -etinil estradiola je glavni fragmentni ion  $m/z=285$ , ki je po strukturi enak kot ion z enako  $m/z$ , ki nastane pri fragmentaciji TMS-17 $\beta$ -estradiola (Slika 22, levo). To smo pričakovali, saj sta si spojini strukturno podobni. Razlikuje jih le etinilna skupina na mestu 17 steroidnega skeleta. Tudi fragment  $m/z=232$  je protonirani analog iona  $m/z=231$ , ki smo ga opisali pri fragmentaciji TMS-17 $\beta$ -estradiola. Za SIM analizo te spojine smo poleg iona  $m/z=285$  izbrali tudi ion  $m/z=425$  (Slika 23), ki nastane z demetiliranjem molekularnega iona  $m/z=440$ . Slednjega smo zaradi prenizkega odziva izločili iz SIM analize.



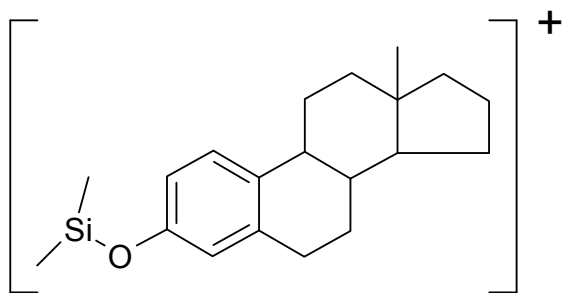
**Slika 22:** Glavna fragmentna iona di-TMS-17 $\beta$ -estradiola (levo je prikazan ion  $m/z=285$  in desno molekularni ion  $m/z=416$ )



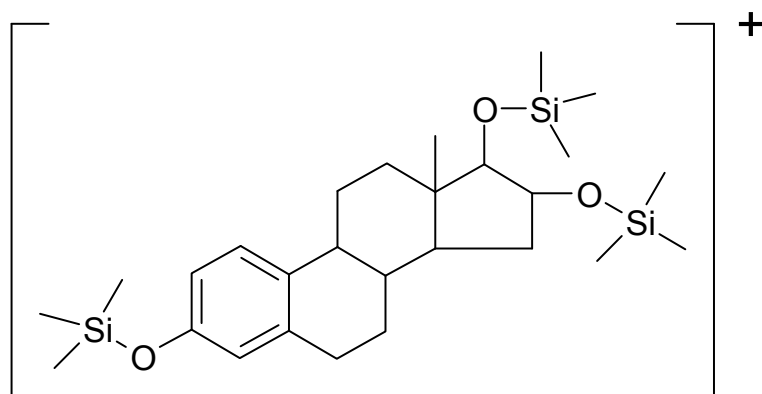
**Slika 23:** Fragmentni ion  $m/z=425$ , ki nastane pri fragmentaciji di-TMS-17 $\alpha$ -etinil estradiola

Pri fragmentaciji tri-TMS-estriola ne dobimo fragmentov, ki bi po svojem odzivu izstopali, zato je bila izbira ionov za snemanje v SIM težja kot pri ostalih analitih. Odločili smo se za ion  $m/z=311$  (Slika 24), ki daje najvišji odziv in nastane po odcepu obeh  $-OTMS$  skupin z D obroča in odcepu ene metilne skupine s preostalega silicijevega atoma, ion  $m/z=504$  (Slika 25), ki je molekularni ion, in  $m/z=505$ , ki je protonirana oblika molekulskega iona. Poleg tega so pomembni fragmentni ioni še  $m/z=489$ , ki nastane po odcepu metilne skupine iz silicija, vezanega na fenolni obroč,  $m/z=386$ , ki nastane po razpadu D obroča in odcepu C-atoma na mestu 17 v steroidnem skeletu in  $m/z=231$ , ki je enak kot pri fragmentaciji TMS-17 $\beta$ -estradiola in di-TMS-17 $\alpha$ -etinil estradiola. Zaradi velikosti molekule so v spektru prisotni še številni drugi fragmenti, ki pa zaradi nizke intenzitete ali nespecifičnosti niso primerni za SIM analizo.





**Slika 24:** Ion  $m/z= 311$ , ki je najpomembnejši produkt fragmentacije tri-TMS-estriola



**Slika 25:** Molekulski ion  $m/z= 504$  za spojino tri-TMS-estriol

## 6.5. VALIDACIJA ANALIZNE METODE

Validacija je postopek potrditve s preverjanjem in z zagotovitvijo objektivnih dokazov, da so izpolnjene posamezne zahteve za jasno opredeljene namene uporabe. V praksi je to niz testov, s katerimi z različnih vidikov ugotavljamo primernost metode za določen namen oziroma analizni problem. Validacijo analizne metode lahko interpretiramo tudi kot proces določitve analitskih zahtev za jasno opredeljene namene uporabe.

Na splošno moramo analizne metode validirati pred rutinsko uporabo in vsakokrat po spremembi merskih parametrov. Običajni elementi validacije analizne metode so:

- potrditev identitete
- linearnost
- občutljivost

- meja zaznavnosti (LOD)
- meja določljivosti (LOQ)
- točnost
- natančnost
- robustnost.

Vseh navedenih elementov za analizno metodo nismo validirali, ker to ni bilo mogoče oziroma smiselno. Slednje velja za robustnost, saj smo analizo vedno opravljali na istem instrumentu, v istem laboratoriju in pod enakimi pogoji. Za testiranje robustnosti bi morali vse naštetu spremeniti, kar ni bilo mogoče.

Tudi validacije točnosti na predpisan način nismo mogli opraviti, ker certificirani referenčni material (CRM) preučevanih analitov v obliki TMS derivatov ni komercialno dostopen. Dobljene rezultate analize smo zato vrednotili s pripravljenimi standardnimi raztopinami z znano vsebnostjo preučevanih spojin v različnih vodnih matrikah.

Ostale elemente validacije (potrditev identitete, linearnost, občutljivost, meja zaznavnosti, meja določljivosti, natančnost) smo določili.

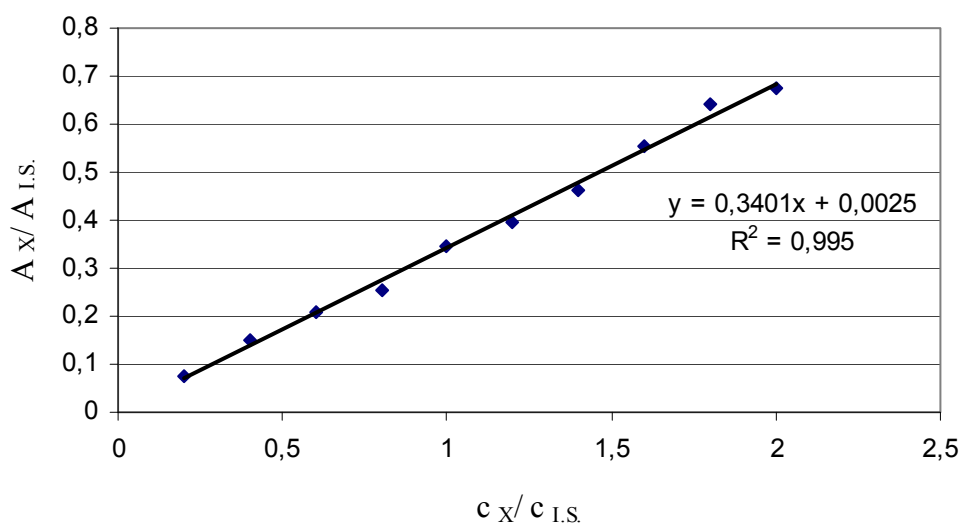
### **6.5.1. Potrditev identitete**

Identiteto derivatiziranih analitov smo potrdili z GC-MSD analizo na SCAN način, kar je opisano v podpoglavju 6.4. Pri analizi okoljskih vzorcev v SIM-u pa smo identiteto potrjevali s pomočjo retencijskega časa in razmerja med izbranimi snemanimi ioni (Preglednica XIV). Ker SIM analiza ni zadostna za potrditev identitete, smo uporabili tudi metodo standardnega dodatka. Pri tem smo spremljali spremembo površine kromatografskega vrha tarčne spojine in intenziteto snemanih ionov ter razmerje med njimi. V primeru potrditve identitete izbrane spojine smo morali dobiti ustrezno povečanje kromatografskega vrha pri retencijskem času, specifičnem za preučevano spojino, snemani ioni pa so morali ohraniti prvotno razmerje.

### **6.5.2. Linearnost in občutljivost**

Linearnost analizne metode smo preučevali ločeno za vsako izbrano spojino v koncentracijskem območju od 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  do 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . To območje smo izbrali na osnovi

podatkov o koncentracijah preučevanih spojin v okolju. Raztopine standardov analitov v metanolu smo pripravili v 10 različnih koncentracijah v dveh paralelkah. Vsaki raztopini smo dodali interni standard bisfenol A-d16 s koncentracijo  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Sledil je postopek derivatizacije in GC-MSD analiza. Rezultate analize smo grafično obdelali in določili umeritveno krivuljo po metodi linearne regresije. Na ordinati je prikazano razmerje površin kromatografskih vrhov tarčnega analita in internega standarda ( $A_x/A_{I.S.}$ ), na abscisi pa razmerje med koncentracijama tarčnega analita in internega standarda ( $c_x/c_{I.S.}$ ). Primer umeritvene krivulje di-TMS-estradiola je prikazan na Sliki 26.



**Slika 26:** Umeritvena krivulja za di-TMS-estradiol

Iz Slike 26 je razvidno, da razmerje površin pod krivuljo premo sorazmerno narašča z naraščanjem koncentracije. Linearnost potrjuje tudi visok Pearsonov koeficient ( $r^2=0,995$ ). Postopek smo ponovili za ostalih 6 spojin in dobili zadovoljivo korelacijo za vse preučevane analite ( $r^2$  med 0,9907 in 0,9970). Rezultati so zbrani v Preglednici XV.

**Preglednica XV:** Enačbe umeritvenih krivulj in korelacijski koeficienti za TMS derivate vseh analitov

	Enačba umeritvene krivulje	Pearsonov (korelacijski) koeficient
t-OKTILFENOL	$y = 2,1164x - 0,1975$	$R^2 = 0,9952$
4-NONILFENOL	$y = 5,2225x - 0,7864$	$R^2 = 0,9933$
BISFENOL A	$y = 2,0711x - 0,2898$	$R^2 = 0,9949$
ESTRON	$y = 0,301x + 0,0244$	$R^2 = 0,9907$
ESTRADIOL	$y = 0,3401x + 0,0025$	$R^2 = 0,9950$
ET. ESTRADIOL	$y = 0,1348x - 0,0053$	$R^2 = 0,9965$
ESTRIOL	$y = 0,1473x + 0,008$	$R^2 = 0,9970$

Občutljivost instrumenta je definirana kot razlika v koncentraciji, ki ustreza najmanjši z metodo še zaznavni spremembi signala instrumenta. Za posamezno spojino smo jo določili s pomočjo naklona umeritvene krivulje. Najnižja še zaznavna sprememba signala instrumenta je 1 enota. Rezultati za preučevane analite so zbrani v Preglednici XVI.

**Preglednica XVI:** Občutljivost instrumenta za TMS derivate preučevanih analitov

	Občutljivost ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
t-OKTILFENOL	0,002
4-NONILFENOL	0,001
BISFENOL A	0,002
ESTRON	0,012
ESTRADIOL	0,011
ET. ESTRADIOL	0,028
ESTRIOL	0,025

Rezultati kažejo veliko razliko v občutljivosti med posameznimi spojinami. Tako je metoda za TMS derivat 4-nonilfenola 28-krat bolj občutljiva kot za di-TMS-17 $\alpha$ -etinil estradiol. Poleg tega, da je metoda bolj občutljiva za alkilfenole kot za steroidne

hormonske motilce, so slednji običajno prisotni v okolju v manjših količinah, kar še dodatno oteži analizo.

### 6.5.3. Meja zaznavnosti in meja določljivosti

Meja zaznavnosti je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo še lahko izmerimo, meja določljivosti pa je najnižja koncentracija analita, ki jo še lahko kvantitativno določimo s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo. Mejo zaznavnosti (ILD) in določljivosti (ILQ) instrumenta smo določili z merjenjem šuma v slepem vzorcu pri točno določenem retencijskem času, značilnem za vsako preučevano spojino, v 3 paralelkah. ILD je tista koncentracija preiskovanega analita, katere signal je enak vsoti povprečnega signala slepega vzorca in trikratni vrednosti standardne deviacije slepega vzorca. ILQ je določen na enak način, vendar namesto trikratne vrednosti vzamemo desetkratno vrednost standardne deviacije slepe raztopine. Rezultati so zbrani v Preglednici XVII.

**Preglednica XVII:** Meja zaznavnosti (ILD) in meja določljivosti (ILQ) instrumenta za TMS derivate preučevanih analitov

	ILD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	ILQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
t-OKTILFENOL	9,8	10,9
4-NONILFENOL	15,3	15,8
BISFENOL A	14,6	16,0
ESTRON	1,0	13,3
ESTRADIOL	1,0	5,1
ET. ESTRADIOL	12,6	32,8
ESTRIOL	1,1	4,4

Navedene vrednosti v Preglednici XVII predstavljajo meje zaznavnosti in določljivosti instrumenta in ne metode v celoti. Ker pred GC-MSD analizo poteka tudi ekstrakcija in koncentriranje vzorca, ki znaša za odpadne vode 2000 $\times$  in za površinske vode 5000 $\times$ , določamo tudi mejo zaznavnosti (MDL) in mejo določljivosti (MQL) za celotno analizno metodo.

#### 6.5.4. Natančnost

Natančnost metode opisuje medsebojno skladnost posameznih testnih rezultatov neodvisnih meritev istega analita, če analizni postopek ponovimo večkrat zaporedoma na različnih podvzorcih preiskovanega materiala. Natančnost delimo na ponovljivost in obnovljivost. Če analizo opravi isti operater po isti metodi v istem laboratoriju, na istem instrumentu in pod enakimi pogoji, govorimo o ponovljivosti, če pa pride do sprememb naštetih dejavnikov, govorimo o obnovljivosti.

V okviru diplomske naloge smo validirali le ponovljivost. Pripravili smo raztopino standardov preučevanih spojin v deionizirani vodi ( $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$ ). Vsakemu vzorcu smo dodali interni standard. Koncentracija slednjega je bila enaka koncentraciji ostalih analitov ( $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$ ). Vse vzorce smo analizirali po optimiziranem postopku (Slika 11). Po končani GC-MSD analizi smo vseh 7 paralelk shranili v zamrzovalniku in iste vzorce ponovno analizirali še tekom 4 zaporednih dni. Rezultati so prikazani v Preglednici XVIII, kjer je ponovljivost izražena kot relativna standardna deviacija (RSD).

**Preglednica XVIII:** Ponovljivost analize znotraj 24h ( $n = 7$ ) in tekom 5 zaporednih dni ( $n = 5$ )

	RSD (med vzorci)	RSD (med dnevi)
t-OKTILFENOL	11,2 %	12,4 %
4-NONILFENOL	9,1 %	10,7 %
BISFENOL A	3,4 %	5,9 %
ESTRON	9,7 %	6,8 %
ESTRADIOL	11,4 %	4,4 %
ET. ESTRADIOL	3,8 %	12,3 %
ESTRIOL	13,7 %	9,5 %

Rezultati kažejo, da je metoda ponovljiva, tako med posameznimi vzorci, kot tudi v daljšem časovnem obdobju (do 5 dni). Vse vrednosti RSD so manjše od 15 %, kar pomeni, da je metoda ustrezna (49). Dobro ponovljivost smo dokazali tudi med posameznimi dnevi. Teoretično bi lahko prišlo do odstopanj zaradi nestabilnosti TMS

derivatov, vendar do tega ni prišlo niti pri alkilfenolih, kjer po določenem času običajno pride do izomerizacije, kar otežuje vrednotenje dobljenih kromatografskih vrhov.

## **6.6. ANALIZA OKOLJSKIH VZORCEV**

Optimizirano metodo smo preizkusili tudi na realnih okoljskih vzorcih in ocenili njeno primernost za analizo posameznih vzorcev. Za analizo površinskih vod smo uporabili vzorce nekaterih slovenskih rek, za analizo odpadnih vod pa dotoke in odtoke čistilnih naprav in bolnišnic v Sloveniji. Za vsako izbrano matriko smo ovrednotili izkoristek ekstrakcije, mejo zaznavnosti in mejo določanja analizne metode ter linearnost odziva.

### **6.6.1. Analiza površinskih vod**

Za vrednotenje izkoristka ekstrakcije smo pripravili 3 paralelke raztopin preučevanih analitov z znano koncentracijo ( $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$ ) v vodovodni vodi, ki jo uporabimo za posnemanje matrike površinske vode. Vzorcem smo nato dodali interni standard, jih ekstrahirali in eluirali. Sledilo je sušenje do suhega, derivatizacija in GC-MSD analiza. Vzoredno smo pripravili tudi 3 paralelke raztopin ustrezne koncentracije, katerim smo brez predhodne ekstrakcije dodali interni standard, jih sušili, derivatizirali in analizirali z GC-MSD. Iz primerjave rezultatov smo določili izkoristek ekstrakcije (Preglednica XIX). Ugotovljeni izkoristki ekstrakcije so v splošnem visoki, razen za 4-nonilfenol, za katerega smo že predhodno ugotovili, da se na izbrani sorbent ne veže v celoti. Ker smo predhodno dokazali, da je občutljivost instrumenta ravno za derivat te spojine najboljša, nam tudi nižji izkoristek ekstrakcije ne otežuje vrednotenja vsebnosti te spojine v vzorcih.

Umeritveno krivuljo smo pripravili z analizo raztopin standardov analitov v vodovodni vodi. 500 mL raztopin standardov smo pripravili v petih različnih koncentracijah v koncentracijskem območju od  $20 \text{ ng L}^{-1}$  do  $500 \text{ ng L}^{-1}$  v dveh paralelkah. Poleg tega smo pripravili še tri slepe vzorce. V ta namen vzorce pripravimo po istem postopku kot ostale, vendar brez dodatka standardne raztopine analitov. Nadaljevali smo z analizo po optimiziranem postopku, kot je predstavljen na Sliki 11.

**Preglednica XIX:** Izkoristki ekstrakcije analitov iz vodovodne vode

	VZOREC 1	VZOREC 2	VZOREC 3	POVPREČJE	RSD
t-OKTILFENOL	79 %	113 %	107 %	100 %	15,3 %
4-NONILFENOL	29 %	35 %	37 %	34 %	10,0 %
BISFENOL A	77 %	85 %	89 %	84 %	5,7 %
ESTRON	99 %	103 %	95 %	99 %	3,6 %
ESTRADIOL	92 %	93 %	85 %	90 %	4,2 %
ET. ESTRADIOL	111 %	119 %	108 %	113 %	4,1 %
ESTRIOL	86 %	92 %	78 %	85 %	6,7 %

Dobljene rezultate (Preglednica XX) smo uporabili za izdelavo umeritvenih krivulj za posamezne analite. S pomočjo umeritvenih krivulj in rezultatov slepih vzorcev smo določili še mejo zaznavnosti in mejo določljivosti analize metode (Preglednica XXI).

Skupno smo analizirali 9 vzorcev 4 slovenskih rek. 500 mL vzorca smo dodali interni standard. Slednji je bil v vzorcu prisoten v enaki koncentraciji kot predhodno v standardnih raztopinah, to je  $100 \text{ ng L}^{-1}$ . V nadaljevanju smo uporabili enak postopek kot predhodno za standardne raztopine (Slika11). Rezultati analize so prikazani v Preglednici XXII.

**Preglednica XX:** Enačbe umeritvenih krivulj za analizo vzorcev površinskih vod in pripadajoči korelacijski koeficienti

	Enačba umeritvene krivulje	Pearsonov (korelacijski) koeficient
t-OKTILFENOL	$y = 2,5915x - 0,0949$	$R^2 = 0,9983$
4-NONILFENOL	$y = 2,5179x + 0,2408$	$R^2 = 0,9908$
BISFENOL A	$y = 1,558x + 0,3031$	$R^2 = 0,9929$
ESTRON	$y = 0,9198x - 0,1048$	$R^2 = 0,9977$
ESTRADIOL	$y = 0,5524x - 0,0993$	$R^2 = 0,9847$
ET. ESTRADIOL	$y = 0,2421x - 0,0654$	$R^2 = 0,9837$
ESTRIOL	$y = 0,248x - 0,0493$	$R^2 = 0,9844$



**Preglednica XXI:** Meja zaznavnosti (MDL) in meja določljivosti (MQL) metode za analizo vzorcev površinskih vod

	MDL (ng L <sup>-1</sup> )	MQL (ng L <sup>-1</sup> )
t-OKTILFENOL	3,5	5,6
4-NONILFENOL	3,6	6,8
BISFENOL A	5,4	7,0
ESTRON	0,6	0,8
ESTRADIOL	0,9	3,9
ET. ESTRADIOL	1,0	6,2
ESTRIOL	1,5	4,7

**Preglednica XXII:** Koncentracija analitov (ng L<sup>-1</sup>) v nekaterih slovenskih rekah

	Reka 1	Reka 2	Krka 1	Krka 2	Sava 1	Sava 2
t-OKTILFENOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
4-NONILFENOL	14	14	22	34	21	10
BISFENOL A	16	p.m.z.	374	19	67	38
ESTRON	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
ESTRADIOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
ET. ESTRADIOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
ESTRIOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.

p.m.z.: pod mejo zaznavnosti

**Preglednica XXII (nadaljevanje):**

	Sava 3	Ljubljana 1	Ljubljana 2
t-OKTILFENOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
4-NONILFENOL	p.m.z.	p.m.z.	11
BISFENOL A	54	p.m.z.	16
ESTRON	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
ESTRADIOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
ET. ESTRADIOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
ESTRIOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.

p.m.z.: pod mejo zaznavnosti

Rezultati kažejo na majhno vsebnost preučevanih analitov (do  $67 \text{ ng L}^{-1}$ ) v analiziranih rekah. Med preučevanimi spojinami smo ugotovili največjo prisotnost bisfenola A, kar smo pričakovali, saj se uporablja v številnih industrijskih panogah, predvsem v prehrambeni industriji in industriji umetnih mas. Med analiziranimi vzorci rek izstopa visoka koncentracija bisfenola A ( $374 \text{ ng L}^{-1}$ ) v vzorcu Krke, odvzetim pred Novim mestom. V vzorcu Krke, ki je bil odvzet po Novem mestu, smo določili nižjo koncentracijo bisfenola A ( $19 \text{ ng L}^{-1}$ ). Razlog za to je, da smo analizirali trenutne vzorce in da se koncentracija analitov v rekah hitro spreminja, ker je odvisna od izpustov iz industrijskih obratov in čistilnih naprav. Pojavljanje 4-nonilfenola v nizkih koncentracijah je pričakovano, saj je bila uporaba te spojine v preteklosti zelo pogosta, predvsem v detergentih. Kasneje so uporabo te spojine močno omejili, ker so potrdili njene vplive na hormonski sistem. Zaradi velike lipofilnosti in posledično sposobnosti kumuliranja, bo ta spojina v okolju prisotna tudi še v prihodnosti. Glavni vir 4-nonilfenola danes so njegovi etoksilati, ki se s pomočjo bakterij v aerobnih pogojih pretvorijo v 4-nonilfenol (Slika 4).

Optimizirana metoda se je izkazala kot primerna za analizo vzorcev površinskih vod, saj smo z optimiziranim postopkom dobili ustrezne izkoristke ekstrakcije, mejo zaznavnosti in mejo določljivosti. Ostale prisotne spojine v vzorcih niso motile analize, saj smo jih nekaj že med samim procesom ekstrakcije izločili iz vzorca, preostale pa niso motile GC-MSD analize. Da bi izboljšali mejo zaznavnosti smo preizkusili povečati volumen vzorca na 1000 mL, vendar se je to izkazalo kot tvegano. Poleg tega, da smo z analizo 1000 mL vzorca podaljšali čas ekstrakcije na skoraj 9 ur, je zelo kritična zadnja faza ekstrakcije, saj se lahko sorbent kljub svoji veliki specifični površini nasiti s prisotnimi analiti in predvsem ostalimi spojinami iz vzorca, kar dodatno upočasni zadnji del ekstrakcije in predvsem onemogoča kvantitativno vezavo tarčnih analitov na sorbent. Zato smo ocenili, da je 500 mL optimalen volumen vzorca za analizo površinskih vod.

### **6.6.2. Analiza odpadnih vod**

V splošnem ločimo dve vrsti odpadnih vod s čistilnih naprav (ČN) in sicer dotoke in odtoke. Odpadne vode vzorčene z odtoka čistilnih naprav imajo praviloma manj prisotnih komponent, saj ČN delno ali popolno odstranijo določene spojine iz odpadnih vod, zato smo za posnemanje matrike za analizo vzorcev odpadnih vod uporabili odtok iz ČN. Za vrednotenje izkoristka ekstrakcije smo pripravili 3 paralelke raztopin preučevanih analitov

z znano koncentracijo ( $c = 100 \text{ ng L}^{-1}$ ), ki smo jih filtrirali skozi nitrozo-celulozne filtre s premerom por  $5 \mu\text{m}$  in  $1,2 \mu\text{m}$  ter na koncu še skozi nylonske filtre s premerom  $0,45 \mu\text{m}$ . Po filtraciji smo vzorce ekstrahirali in eluirali. Nato smo jim dodali interni standard (bisfenol A-d16), čemur je sledilo sušenje, derivatizacija in GC-MSD analiza. Vzoredno smo pripravili tudi 3 paralelke raztopin ustrezne koncentracije, ki smo jim dodali interni standard, čemur je sledilo sušenje, derivatizacija in GC-MSD analiza. Iz primerjave rezultatov smo izračunali izkoristek ekstrakcije (Preglednica XXIII).

**Preglednica XXIII:** Izkoristki ekstrakcije analitov iz odpadne vode

	VZOREC 1	VZOREC 2	VZOREC 3	POVPREČJE	RSD
t-OKTILFENOL	94 %	75 %	99 %	89 %	14,5 %
4-NONILFENOL	55 %	48 %	56 %	53 %	8,3 %
BISFENOL A	98 %	97 %	93 %	96 %	2,7 %
ESTRON	103 %	83 %	95 %	94 %	10,7 %
ESTRADIOL	109 %	93 %	114 %	105 %	10,7 %
ET. ESTRADIOL	121 %	100 %	106 %	109 %	10,2 %
ESTRIOL	105 %	90 %	117 %	104 %	13,0 %

Ker vzorce odpadnih vod zaradi stabilizacije vzorcev nakisamo po vzorčenju, smo preverili tudi vpliv kislega pH na izkoristek ekstrakcije. Za proučevane analite vemo, da se v naravi pogosto nahajajo v konjugirani obliki, vendar se v kislem dekonjugirajo. Za vrednotenje vpliva kislega pH smo predhodno opisan postopek ponovili, poleg tega pa smo pred filtracijo vse vzorce nakisali s 3,2 M klorovodikovo kislino do  $\text{pH} = 2,5$ . Izkoristek ekstrakcije iz nakisanih vzorcev odpadnih vod je prikazan v Preglednici XXIV.

**Preglednica XXIV:** Izkoristki ekstrakcije analitov iz odpadne vode s  $\text{pH} = 2,5$

	VZOREC 1	VZOREC 2	VZOREC 3	POVPREČJE	RSD
t-OKTILFENOL	95 %	77 %	95 %	89 %	11,6 %
4-NONILFENOL	48 %	40 %	43 %	44 %	9,9 %
BISFENOL A	85 %	87 %	72 %	81 %	10,0 %
ESTRON	102 %	84 %	103 %	96 %	11,2 %
ESTRADIOL	107 %	85 %	108 %	100 %	13,0 %
ET. ESTRADIOL	119 %	99 %	128 %	115 %	13,2 %
ESTRIOL	88 %	72 %	88 %	83 %	11,1 %

Rezultati kažejo, da pH vpliva na izkoristek ekstrakcije nekaterih spojin, predvsem na bisfenol A, 4-nonilfenol in estriol. Če upoštevamo dejstvo, da so pri  $\text{pH} = 2,5$  vsi analiti v nekonjugirani obliki, kar pri  $\text{pH} = 7$  ni verjetno, je presenetljivo, da so izkoristki iz

nakisanih vzorcev nižji. Splošno velja, da prihaja pri analizi vzorcev odpadnih vod do večjih razlik med posameznimi vzorci kot pri vzorcih površinskih vod, kar je razvidno iz relativne standardne deviacije (RSD). Vzrok za to je kompleksnost matrice, torej prisotnost ostalih komponent vzorca, ki vplivajo na ekstrakcijo tarčnih analitov.

Umeritveno krivuljo smo pripravili z analizo standardnih raztopin analitov v odpadni vodi (odtok ČN). Po 200 mL standardnih raztopin smo pripravili v sedmih različnih koncentracijah v koncentracijskem območju od 20 ng L<sup>-1</sup> do 100 ng L<sup>-1</sup> v dveh paralelkah. Hkrati smo pripravili tri slepe vzorce. Vzorcem smo dodali interni standard v koncentraciji 100 ng L<sup>-1</sup>. pH medija je bil nevtralen, saj smo kalibracijsko krivuljo potrebovali za analizo nenakisanih vzorcev. Vse vzorce smo filtrirali skozi nitrozo-celulozne filtre s premerom por 5 µm in 1,2 µm ter nato še skozi najlonske filtre s premerom 0,45 µm. Nadaljnja analiza je potekala po optimiziranem postopku, kot je predstavljen na Sliki 11 in je bil že uporabljen za analizo površinskih vod (podpoglavje 6.6.1.). Dobljene rezultate (Preglednica XXV) smo uporabili za izdelavo umeritvenih krivulj za posamezne analite. S pomočjo kalibracijskih krivulj in rezultatov slepih vzorcev smo določili še mejo zaznavnosti in mejo določljivosti (Preglednica XXVI).

Skupno smo analizirali 9 vzorcev iz slovenskih čistilnih naprav in bolnišnic. Odmerili smo 200 mL vsakega vzorca in dodali interni standard (c=100 ng L<sup>-1</sup>). V nadaljevanju smo uporabili enak postopek kot predhodno za standardne raztopine. Rezultati analize so prikazani v Preglednici XXVII.

**Preglednica XXV:** Enačbe umeritvenih krivulj za analizo vzorcev odpadnih vod in pripadajoči korelacijski koeficienti

	Enačba umeritvene krivulje	Pearsonov (korelacijski) koeficient
t-OKTILFENOL	$y = 2,5539x - 0,3600$	$R^2 = 0,9768$
4-NONILFENOL	$y = 1,9752x - 0,0836$	$R^2 = 0,9852$
BISFENOL A	$y = 1,4833x - 0,5367$	$R^2 = 0,9901$
ESTRON	$y = 0,5836x - 0,0503$	$R^2 = 0,9788$
ESTRADIOL	$y = 0,2998x - 0,0112$	$R^2 = 0,9707$
ET. ESTRADIOL	$y = 0,1625x - 0,0043$	$R^2 = 0,9657$
ESTRIOL	$y = 0,1985x - 0,0189$	$R^2 = 0,9801$

**Preglednica XXVI:** Meja zaznavnosti (MDL) in meja določljivosti (MQL) metode za analizi vzorcev odpadnih vod

	MDL (ng L <sup>-1</sup> )	MQL (ng L <sup>-1</sup> )
t-OKTILFENOL	17,4	25,2
4-NONILFENOL	13,7	35,9
BISFENOL A	22,8	39,9
ESTRON	9,3	15,3
ESTRADIOL	7,1	15,1
ET. ESTRADIOL	14,9	33,5
ESTRIOL	14,8	27,2

Občutno višje MDL in MQL vrednosti (MDL= 7,1-22,8 ng L<sup>-1</sup> in MQL= 15,1-39,9 ng L<sup>-1</sup>) pri metodi za analizo vzorcev odpadnih vod v primerjavi z metodo za analizo vzorcev površinskih vod (MDL= 0,6-5,4 ng L<sup>-1</sup> in MQL= 0,8-7,0 ng L<sup>-1</sup>) so delno posledica manjših analiziranih volumnov vzorca (200 mL namesto 500 mL), delno pa je to rezultat višjega ozadja, kar je posledica številnih spojin, ki so poleg preučevanih analitov prisotne v vzorcih odpadnih vod. Tudi korelacijski koeficienti so nižji, kar je posledica visoke standardne deviacije med vzorci in ni pogojena z linearnostjo odziva instrumenta, ki smo jo v tem območju že predhodno dokazali s standardnimi raztopinami analitov. Za manjši volumen vzorca smo se odločili, da bi preprečili nasičenje sorbenta med ekstrakcijo, saj z večjim volumnom vzorca poleg povečanja količine analitov povečamo tudi količino ekstrahiranih nečistot iz vzorca, ki motijo kromatografsko analizo.

**Preglednica XXVII: Koncentracija analitov (ng L<sup>-1</sup>) v analiziranih odpadnih vodah**

	Bolnišnica 1	ČN 1 dotok	ČN 1 odtok	Bolnišnica 2	Vzorec industrijskega iztoka
datum vzorčenja	11.01.07	12.01.07	12.01.07	06.07.07	15.12.06
t-OKTILFENOL	18	p.m.z.	24	21	p.m.z.
4-NONILFENOL	p.m.z.	p.m.z.	30	146*	p.m.z.
BISFENOL A	278*	p.m.z.	78	331*	p.m.z.
ESTRON	p.m.z.	29	30	28	437*
ESTRADIOL	32	28	11	46	p.m.z.
ET. ESTRADIOL	p.m.z.	19	p.m.z.	16	p.m.z.
ESTRIOL	353*	85	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.

\* izven območja kalibracijske krivulje ( $c > 100 \text{ ng L}^{-1}$ ), p.m.z.: pod mejo zaznavnosti

**Preglednica XXVII (nadaljevanje):**

	ČN 2 dotok	ČN 2 odtok	ČN 1 dotok	ČN 1 odtok
datum vzorčenja	09.01.07	09.01.07	13.01.07	13.01.07
t-OKTILFENOL	205*	21	p.m.z.	27
4-NONILFENOL	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.	33
BISFENOL A	235*	127*	p.m.z.	72
ESTRON	45	p.m.z.	p.m.z.	p.m.z.
ESTRADIOL	15	p.m.z.	40	25
ET. ESTRADIOL	p.m.z.	p.m.z.	94	p.m.z.
ESTRIOL	98	p.m.z.	85	p.m.z.

\*izven območja kalibracijske krivulje ( $c > 100 \text{ ng L}^{-1}$ ), p.m.z.: pod mejo zaznavnosti

Rezultati analize vzorcev odpadnih vod kažejo na relativno visoke vsebnosti preučevanih spojin glede na literaturne podatke (31). Vsebnosti izbranih analitov, označenih z zvezdico (\*), so samo okvirne, saj so bile vrednosti izven območja umeritvene krivulje. Zato so te vrednosti navedene zgolj informativno. Analize nismo ponavljali, saj nismo imeli na razpolago zadostne količine vzorcev, poleg tega pa nas je

zanimala predvsem ustreznost optimizirane analizne metode za analizo vzorcev odpadnih vod. Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je metoda primerna, čeprav obstajajo nekatere možnosti za nadaljnjo optimizacijo metode, s čimer bi znižali MDL in MQL. Možno je dodatno čiščenje vzorcev ali menjava ekstrakcijskega nosilca, vendar s tem ne bi pridobili veliko, saj imajo na vrednotenje rezultatov analize največji vpliv spojine, ki se iz kromatografske kolone eluirajo sočasno s tarčnimi analiti. Iz tega sklepamo, da imajo tudi podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot preučevani analiti in da bi se njihova odstranitev iz vzorcev odražala v pomembnih izgubah preučevanih analitov. Pri optimizaciji metode bi več pridobili z uporabo bolj kompleksnega instrumenta za analizo, to je GC-MS-MS ali LC-MS-MS (50) ali pa z uvedbo ločenih analiznih postopkov za alkilfenole in steroidne estrogene.

## 7. SKLEP

V diplomskem delu smo optimizirali analizni postopek za določanje izbranih hormonskih motilcev v vzorcih površinskih in odpadnih vod. Pri optimizaciji večstopenjske analizne metode smo se osredotočili na najpomembnejše stopnje, to so ekstrakcija, derivatizacija in GC-MSD analiza. Za vrednotenje uspešnosti ekstrakcije so pomembni visoki izkoristki tarčnih analitov, ponovljivost in selektivnost ekstrakcije. Med preučevanimi ekstrakcijskimi nosilci smo dobili najboljše rezultate s HLB Oasis ekstrakcijskimi kolonami. Pri eluciji spojin z ekstrakcijskih nosilcev smo najboljše rezultate dobili z acetonitrilom. Za kvantitativno elucijo analitov z izbranega nosilca smo dokazali, da zadostuje 3 mL topila. Ugotovili smo tudi, da v preučevanem koncentracijskem območju ( $c = 20 \text{ ng L}^{-1}$ - $100 \text{ ng L}^{-1}$ ) ne prihaja do odstopanj v izkoristkih ekstrakcije in da pH vzorcev v primeru uporabe polimernega adsorbenta ne vpliva na izkoristke ekstrakcije.

Pri optimizaciji derivatizacijskega postopka smo potrdili, da je MSTFA (*N*-metil-*N*-trifluoroacetamid) ustrezen derivatizacijski reagent. Z njim tvorimo TMS (trimetilsililne) etre vseh tarčnih analitov. Za tvorbo di-TMS-17 $\alpha$ -etinil estradiola je, poleg derivatizacijskega reagenta, potreben tudi dodatek piridina, ki smo ga izbrali za najboljše topilo. Ostala preučevana topila vodijo do nastanka TMS-estrone (do 90 %) iz etinil estradiola, kar ni primerno za kvantitativno določanje estrone in etinil estradiola. Dokazali smo, da je za potek reakcije derivatizacije nujno segrevanje reakcijske zmesi in kot optimalno smo določili 30 minutno segrevanje pri 60 °C.

Zadnja stopnja analiznega postopka je GC-MSD analiza. Za optimalno ločbo vseh preučevanih analitov in internega standarda smo izboljšali temperaturni program kromatografske ločbe. Na osnovi rezultatov MS analize (SCAN) smo za posamezne analite izbrali fragmentne ione za SIM analizo. S snemanjem izbranih ionov (SIM) smo izboljšali selektivnost in občutljivost GC-MSD analize in znižali mejo zaznavnosti (MDL) in mejo določljivosti (MQL) analizne metode.

Optimizirano analizno metodo smo uporabili za analizo 9 vzorcev površinskih in 9 vzorcev odpadnih vod. Na osnovi pridobljenih rezultatov ugotavljamo, da je vpeljana analizna metoda primerna za analizo vzorcev kompleksnih vodnih medijev. Hkrati smo dokazali prisotnost vseh preučevanih spojin v vzorcih odpadnih vod iz bolnišnic in



čistilnih naprav v Sloveniji in majhno prisotnost izbranih hormonskih motilcev v preučevanih slovenskih rekah.

## 8. LITERATURA

- (1) U.S. Environmental Protection Agency, Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington D.C., 1997: 111
- (2) Rang H.P. et al.: Pharmacology, Fifth Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003: 415-440
- (3) Sumpter J.P.: Xenoendocrine disrupters- environmental impacts, Toxicol. Letts., 1998, 337: 102-103
- (4) Norman A.W., Mizwicki M.T., Norman D.P.G.: Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model, Nature Reviews: Drug Discovery, 2004, 3: 27-41
- (5) Jobling S. et al.: Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent, Aquatic Toxicology, 2004, 66: 207-222
- (6) Jobling S., Sumpter J.P.: Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, Aquatic Toxicology, 1993, 27: 361
- (7) Nimrod, A.C., Benson, W.H.: Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates, Crit. Rev. Toxicology, 1996, 335: 26-31
- (8) Routledge E.J., Sumpter J.P.: Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity, J. Biol. Chemistry, 1997, 272: 3280
- (9) Isidori M. et al.: Toxicity on crustaceans and endocrine disrupting activity on *Saccharomyces cerevisiae* of eight alkylphenols, Chemosphere, 2006, 64: 135-143
- (10) Bian Q. et al.: The toxic effects of 4-tert-octylphenol on the reproductive system of male rats, Food and Chemical Toxicology, 2006, 44: 1355-1361
- (11) Roepke T.A., Snyder M.J., Cherr G.N.: Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations, Aquatic Toxicology, 2005, 71: 155-173
- (12) Navas J.M., Segner H.: Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol, Marine Environmental Research, 2000, 50: 157-162
- (13) Jurgella G.F. et al.: Effects of xenobiotics and steroids on renal and hepatic estrogen metabolism in lake trout, General and Comparative Endocrinology, 2006, 148: 273-281

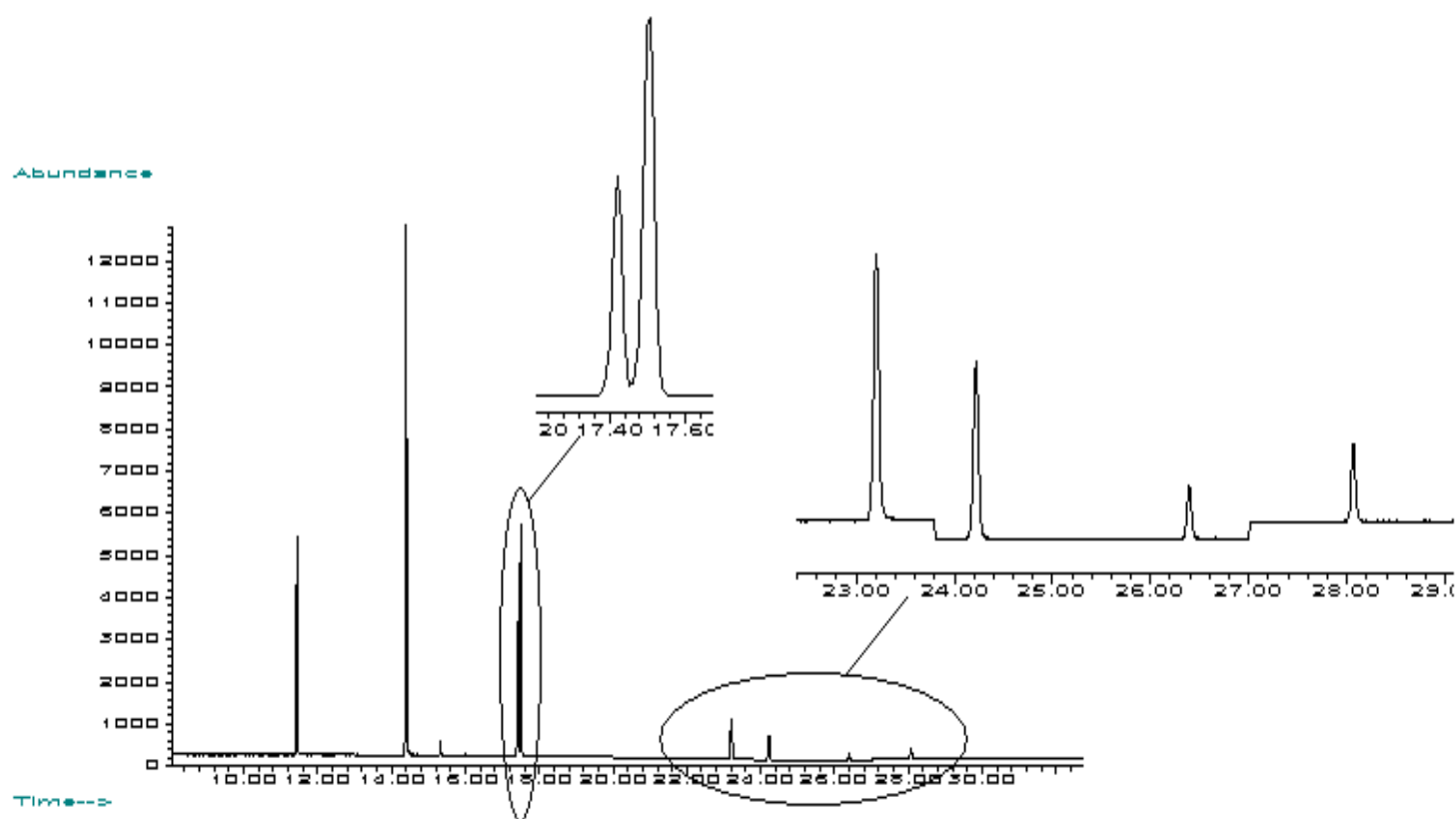
- (14) Hossaini A. et al.: Male reproductive effects of octylphenol and estradiol in Fischer and Wistar rats, *Reproductive Toxicology*, 2003, 17: 607-615
- (15) Rasmussen T.H. et al.: Anti-estrogen prevents xenoestrogen-induced testicular pathology of eelpout (*Zoarces viviparus*), *Aquatic Toxicology*, 2005, 72: 177-194
- (16) Lee H.B., Peart T.E.: Occurrence and elimination of nonylphenol ethoxylates and metabolites in municipal wastewater and effluents, *Water Qual. Res. J. Canada*, 1998, 33: 389
- (17) Birkett J.W., Lester J.N.: *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*, Lewis Publishers, London, 2003: 120
- (18) Perez P. et al.: The estrogenicity of bisphenol A- related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups, *Environ. Health Perspect.*, 1998, 106: 167
- (19) Sohoni P., Sumpter J.P.: Several Environmental oestrogens are also anti-androgens, *J. Endocrinology*, 1998, 158: 327
- (20) Furhacker M., Scharf S., Weber H.: Bisphenol A: emissions from point sources, *Chemosphere*, 2000, 41: 751
- (21) Murray T.J. et al.: Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma *in situ* following fetal bisphenol A exposure, *Reproductive Toxicology*, 2007, 23 (3): 383-390
- (22) Lee Y.M. et al.: Estrogen receptor independent neurotoxic mechanism of bisphenol A, an environmental estrogen, *Journal of veterinary science*, 2007, 8 (1): 27-38
- (23) Howe S.R., Borodinsky L., Lyon R.S.: Potential exposure to Bisphenol A from food-contact use of epoxy coated cans, *J. Coatings Technology*, 1998, 70: 69
- (24) Auterhoff H., Knabe J., Hölting H.-D.: *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, 14. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 1999: 482-486
- (25) Daux W.L., Griffin J.F.: Structural features which distinguish estrogen agonists from antagonists, *J. Steroid Biochemistry*, 1987, 27: 271
- (26) Andersson A.M., Skakkebaek N.E.: Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health, *Eur. J. Endocrinol.*, 1999, 140: 477-485
- (27) Ternes T.A. et al.: Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, *Sci. Total Environment*, 1999, 225: 81-90

- (28) Poole C.F., Poole S.K.: Chromatography today, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991: 601-648
- (29) Dean J.R.: Extraction Methods for Environmental Analysis, University of Northumbria at Newcastle, UK, 1998: 54-72
- (30) Barcelo D. et al.: Environmental analysis; Techniques, applications and quality assurance, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1993: 23-77
- (31) Ingerslev F., Halling-Sørensen B.: Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment, Working Report No. 44, Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen, 2003: 24-25
- (32) Supelco®: Solid Phase Extraction; Reference manual and users guide, 2007
- (33) Jeannot et al.: Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry, Journal of Chromatography, 2002, 974: 143-159
- (34) Gomes R.L., Scrimshaw M.D., Lester J.N.: Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters, Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22 (10): 697-707
- (35) Ballesteros O., Zafra A., Navalón A., Vilchez 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, 2006, 1121: 154-162
- (36) Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Fundamentals of Analytical Chemistry, Seventh Edition, Saunders College Publishing, Orlando, 1997: 660-700
- (37) Poole C.F., Poole S.K.: Chromatography today, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991: 1-103
- (38) Gatidou G. et al.: Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography, 2007, 1138: 32-41
- (39) Tan B.L.L. et al.: Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia, Environment International, 2007, 33: 654-669
- (40) Choi D.W. et al.: Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punica granatum*) using HPLC and GC–mass spectrometry, Food Chemistry, 2006, 96: 562-571

- (41) Quintana J.B. et al.: Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography*, 2004, 1024: 177-185
- (42) Liu R., Zhou J.L., Wilding A.: Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 2004, 1022:179-189
- (43) Shareef A., Angove M.J., Wells J.D.: Optimization of silylation using *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, *N,O*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 2006, 1108: 121-128
- (44) Zhang Z.L., Hibberd A., Zhou J.L.: Optimization of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography–mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 577: 52-61
- (45) Zhang K., Zuo Y.: Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 554: 190-196
- (46) Zhang K., Zuo Y.: Suitability of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide as derivatization reagent for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 2005, 1095: 201-202
- (47) Kim Y.-S. et al.: Estrogen equivalent concentration of individual isomer-specific 4-nonylphenol in Ariake sea water, Japan, *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 51: 850-856
- (48) Hernando M.D. et al.: Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters, *Journal of Chromatography*, 2004, 1047: 129-135
- (49) Donell S.F. et al.: Quantitative determination of butyltins using gas chromatography/flame photometric detection, *Organic Contaminant Analytical Methods of the National Status and Trends Program: 2000-2006*, NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 30, 2007: 49-57

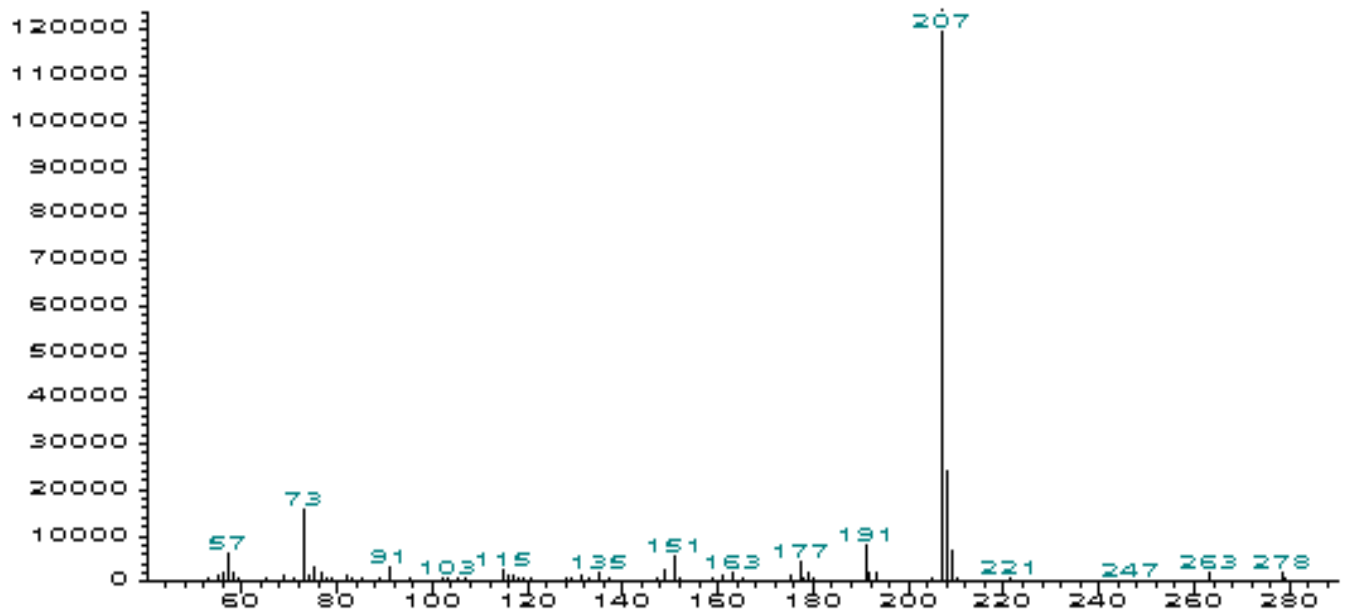
(50) Gabet V. et al.: Analysis of estrogens in environmental matrices, Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26 (11): 1113-1131

## 9. PRILOGA



**Slika 27:** Kromatogram TMS derivatov preučevanih analitov; najprej se eluira TMS-4-terc-oktilfenol, ki mu sledijo TMS-4-nonilfenol, di-TMS-bisfenol A-d16 (I.S.), di-TMS-bisfenol A, TMS-estron, di-TMS-17 $\beta$ -estradiol, di-TMS-17 $\alpha$ -etinil estradiol in tri-TMS-estriol (retencijski časi so navedeni v Preglednici XIV)

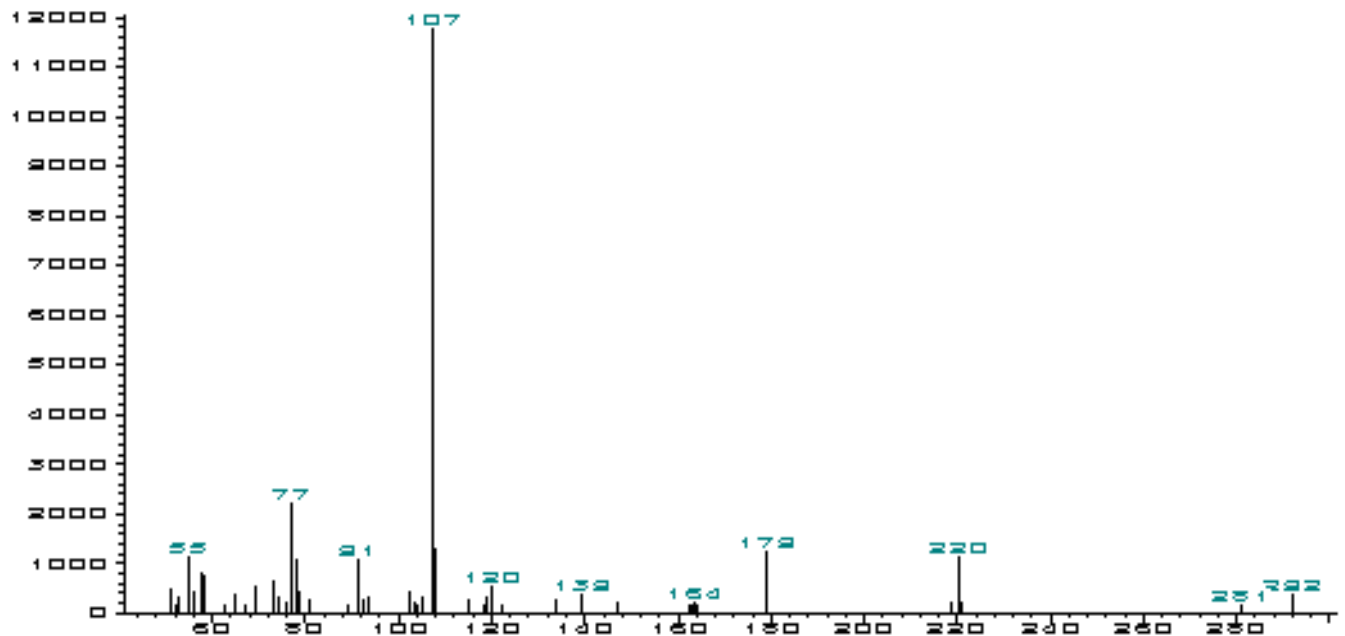
Abundance



m/z-->

Slika 28: Masni spekter TMS-4-terc-oktilfenola ( $t_R=11,53$ )

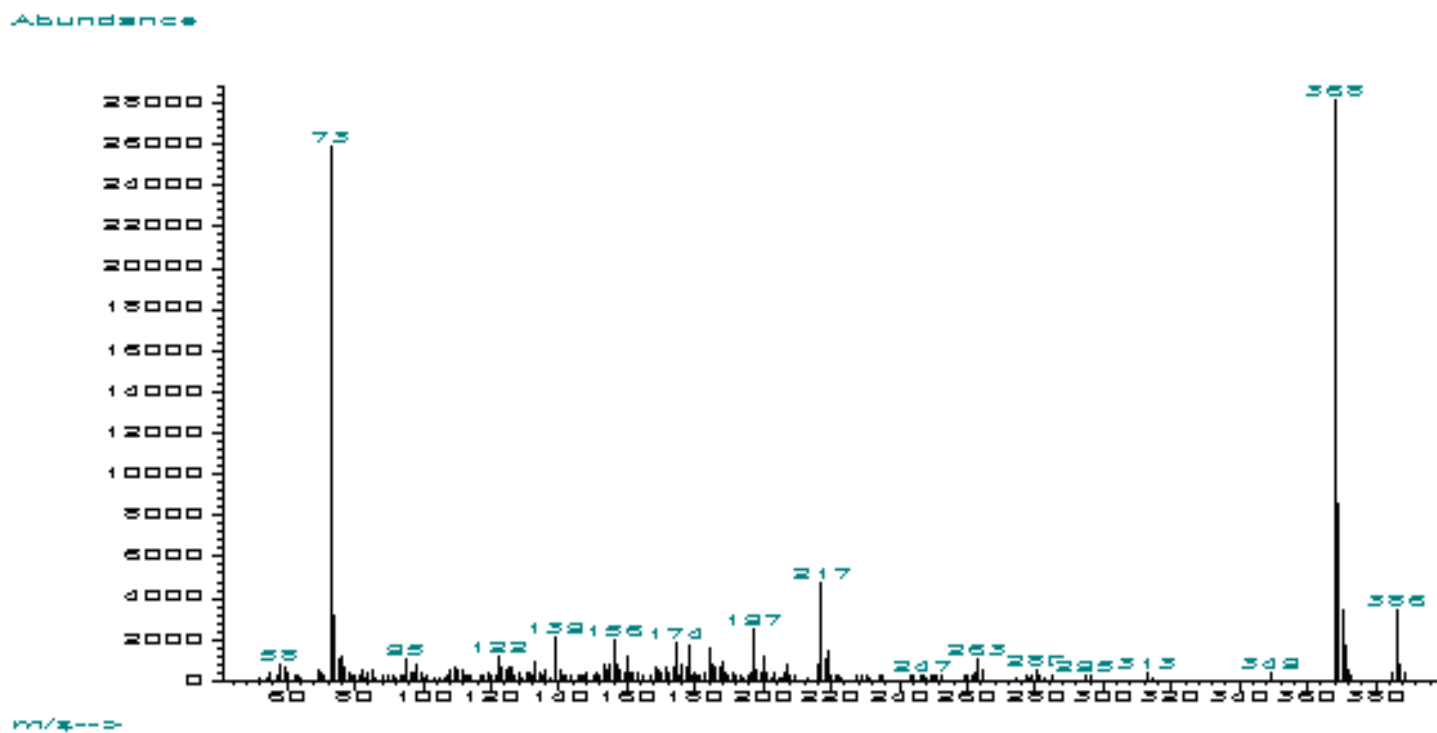
Abundance



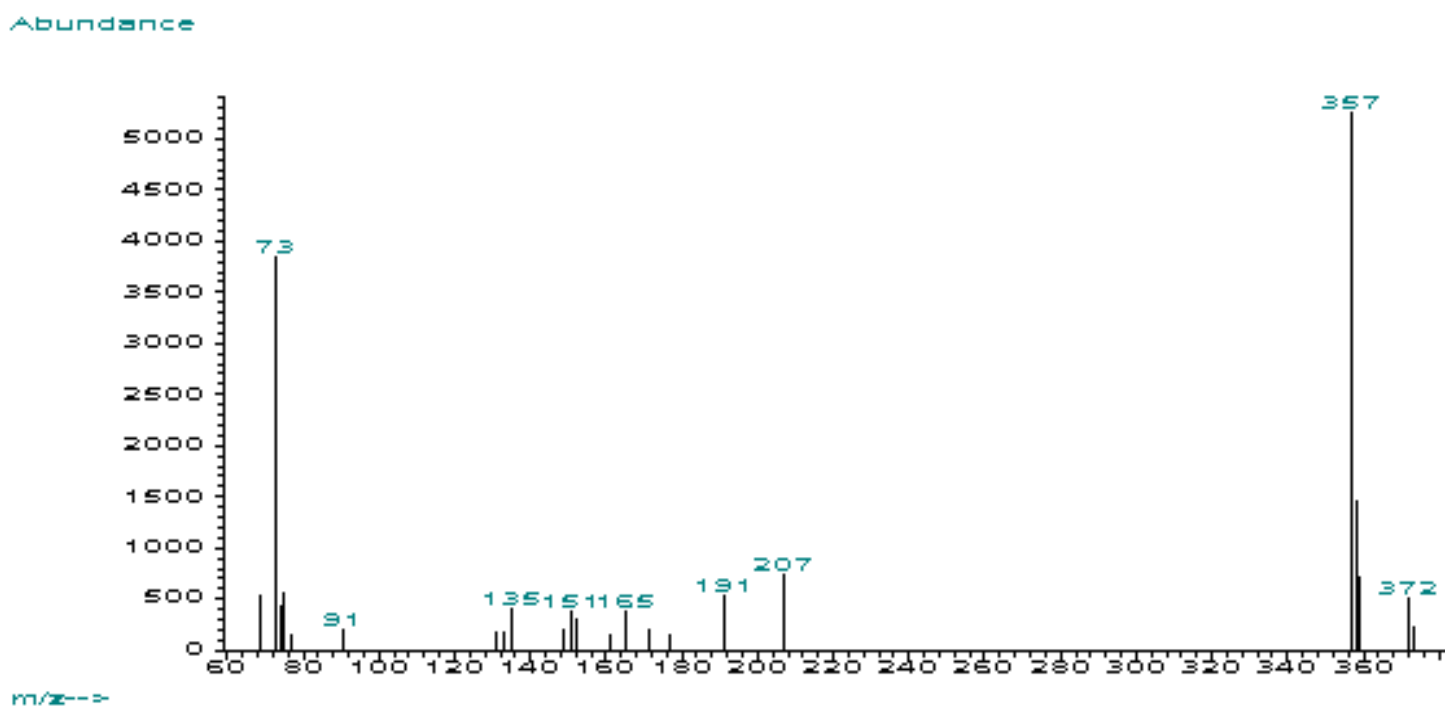
m/z-->

Slika 29: Masni spekter TMS-4-nonilfenola ( $t_R=14,48$ )



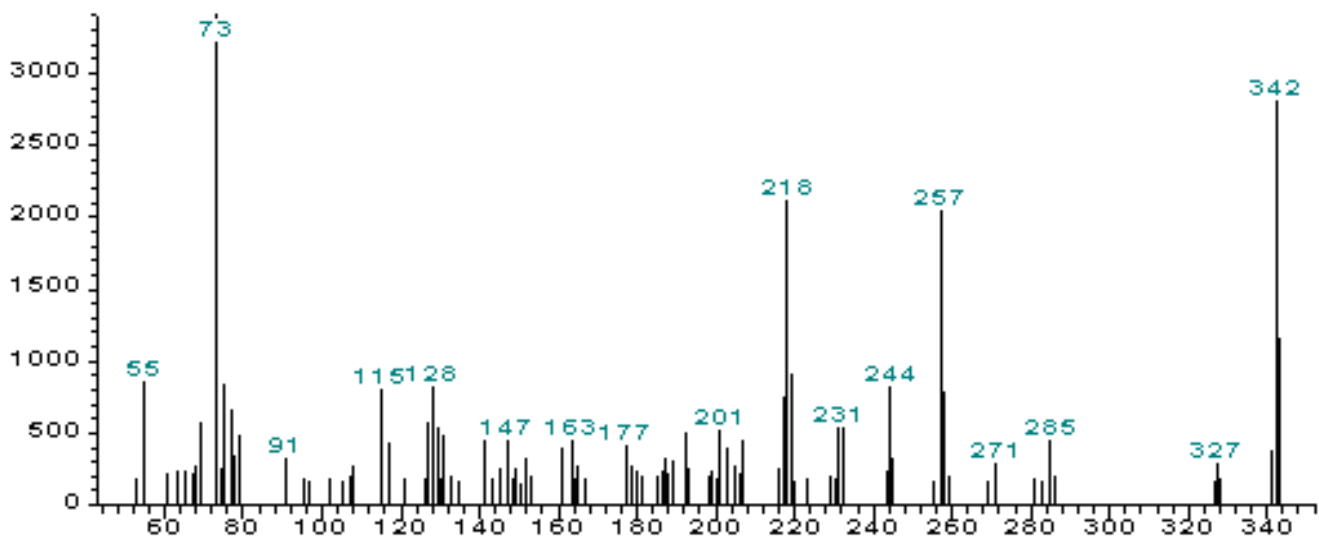


**Slika 30:** Masni spekter di-TMS-devteriranega bisfenola A-d16 ( $t_R=17,45$ )



**Slika 31:** Masni spekter di-TMS-bisfenola A ( $t_R=17,60$ )

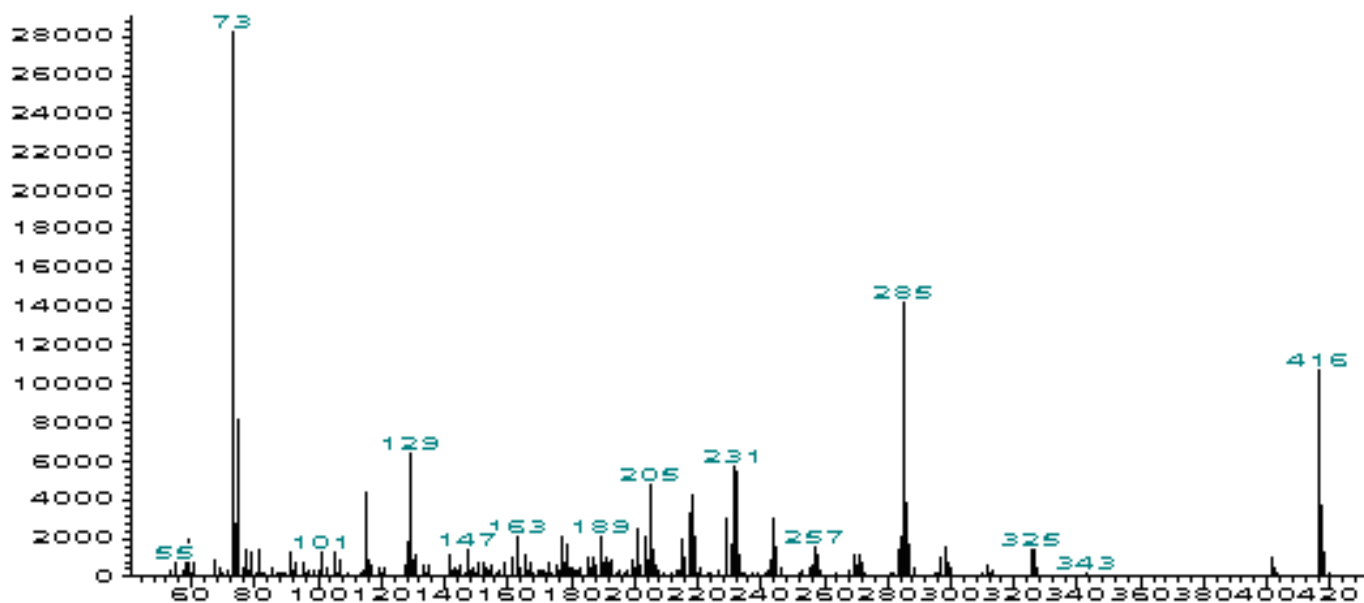
Abundance



m/z-->

Slika 32: Masni spekter TMS-estrone ( $t_R=23,40$ )

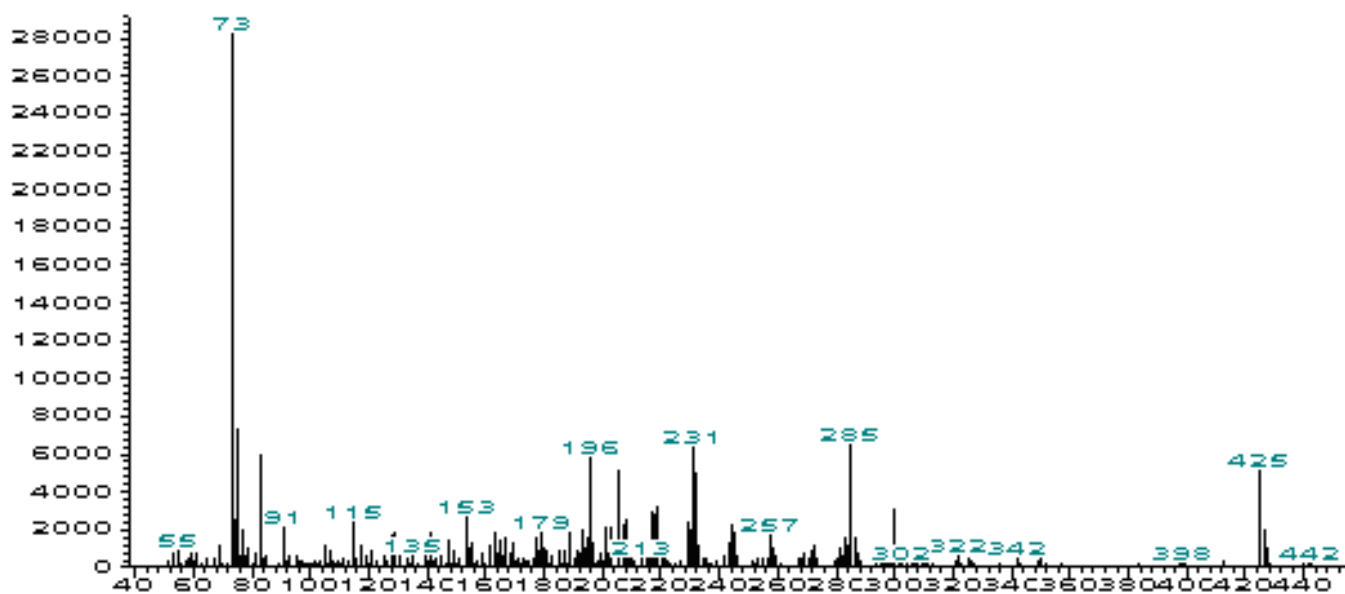
Abundance



m/z-->

Slika 33: Masni spekter di-TMS-17β-estradiola ( $t_R=24,42$ )

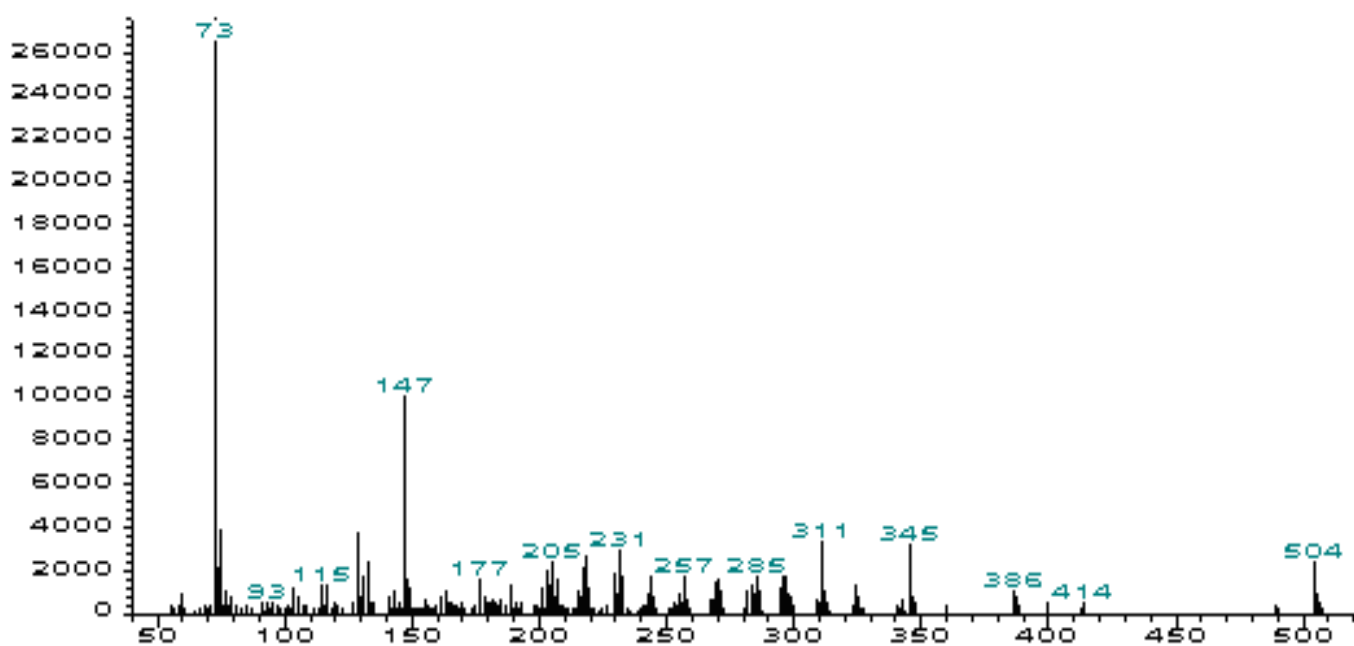
Abundance



m/z-->

Slika 34: Masni spekter di-TMS-17 $\alpha$ -etinil estradiola ( $t_R=26,57$ )

Abundance



m/z-->