

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA ZIBELNIK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA ZIBELNIK

**RAZVOJ METODE LC-MS/MS ZA DOLOČANJE
VSEBNOSTI BISFENOLA A V NEBIOLOŠKIH VZORCIH**

DEVELOPEMENT OF LC–MS/MS METHOD FOR
DETERMINATION OF BISPHENOL A IN NONBIOLOGICAL
SAMPLES

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Iskrena hvala somentorju doc. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za strokovno pomoč, trud ter optimizem pri nastajanju diplomskega dela, hkrati pa za razumevanje in prijetno delovno okolje.

Za pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem tudi zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Zahvala gre tudi mami, bratu in Gregorju, ki so tako ali drugače vplivali na ugoden razplet študija, saj mi vedno stojijo ob strani in verjamejo vame.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

Ljubljana, oktober 2010

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
1 UVOD	1
1.1 HORMONSKI MOTILCI	1
1.2 BISFENOL A	3
1.2.1 Farmakokinetika	5
1.2.2 Farmakodinamika	6
1.3 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI, VSEBNOSTI IN AKTIVNOSTI HORMONSKIH MOTILCEV	8
1.3.1 Priprava vzorcev	8
1.3.2 Analiza in detekcija	10
1.3.3 Kvantitativno vrednotenje	13
1.4 ANALIZNI POSTOPEK ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI BISFENOLA A V VZORCIH PITNIH VOD	14
1.4.1 SPE	14
1.4.2 LC-MS/MS	18
2 NAMEN DELA	26
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 MATERIALI	27
3.1.1 Vzorci voda	27
3.1.2 Standard in interni standard	27
3.1.3 Reagenti in topila	27
3.1.4 Naprave in pribor	28
3.2 METODE	29
3.2.1 Razvoj in optimizacija	29
3.2.2 Optimizirana analizna metoda	33
3.2.3 Validacija metode LC-MS/MS	36
3.2.4 Vrednotenje metode	39
3.2.5 LC-MS/MS analiza vzorcev pitnih vod	43
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	45

4.1	RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA	45
4.1.1	SPE	45
4.1.2	LC-MS/MS	53
4.1.3	Težave povezane z analizo BPA	56
4.2	VALIDACIJA METODE LC-MS/MS	60
4.2.1	Validacija na standardnih raztopinah BPA	60
4.2.2	Validacija na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ	65
4.3	LC-MS/MS ANALIZA VZORCEV PITNIH VOD	71
5	SKLEPI	76
6	LITERATURA	78

POVZETEK

Bisfenol A (BPA) je v okolju široko zastopan. V velikem obsegu se uporablja v industriji plastike, posledično lahko preko odpadnih in/ali površinskih vod vstopa v vodni ekosistem. Njegovo prisotnost so potrdili tudi v zraku, hrani (meso, ribe, sadje, zelenjava, med), vodi in pijačah (vino). Ljudje smo BPA izpostavljeni predvsem preko uživanja kontaminirane hrane in vode, kajti le-ta prehaja iz plastičnih vsebnikov/konzerv. Izpostavljenost BPA povezujejo z disfunkcijo ovarijev, hiperplazijo endometrija, ponavljajočimi se splavi, prezgodnjo puberteto, rakom dojke in prostate, kardiovaskularnimi boleznimi in debelostjo.

V okviru diplomske naloge smo razvili, optimizirali in validirali analizno metodo za določanje vsebnosti bisfenola A v negaziranih mineralnih vodah v koncentracijskem območju od 1 do 500 ng/L. Bisfenol A smo iz vodnih vzorcev izolirali s postopkom ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE) in ga kvalitativno ter kvantitativno ovrednotili s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Ciljno koncentracijsko območje smo dosegli s koncentriranjem vzorcev tekom priprave vzorcev ter uporabe sklopljenega sistema, ki ga odlikujeta visoka specifičnost ter občutljivost meritev.

Raziskovalno delo je obsegalo razvoj in optimizacijo ekstrakcije na trdnem nosilcu in tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektrometrijo ter preverjanje analizne metode LC-MS/MS z validacijo na standardnih raztopinah bisfenola A ter ekstrahiranih vzorcih standardov bisfenola A v Mili Q vodi. Pri delu smo se srečali s problematiko določanja bisfenola A, v okviru katere velja izpostaviti kontaminacijo. Popolne odsotnosti bisfenola A nismo uspeli zagotoviti, saj bisfenol A vsebuje Mili Q voda, plastični laboratorijski pribor ter najverjetneje tudi zrak v laboratoriju. Nazadnje smo primernost analizne metode preverili še na vzorcih negaziranih mineralnih vod iz plastenk in vode iz vodomata ter vodovodne vode. Vsebnost BPA smo določili v vseh analiziranih vzorcih. Bisfenol A je v vseh vzorcih, razen v vodi iz vodomata, prisoten v koncentracijskem območju med 1,8 in 12,7 ng/L. V vzorcu vode iz vodomata smo določili koncentracijo 209 ng/L.

SEZNAM OKRAJŠAV

Kratica	Pomen
A	Površina kromatografskega vrha
BPA	Bisfenol A
BPA d-16	Bisfenol A d-16
CE	Kolizijska energija
DAD	Detektor tipa dioda array (ang. <i>Diode array detector</i>)
ELISA	Imunoencimski test na trdni podlagi (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EMV	ang. <i>Electron multiplier voltage</i>
ESI	Elektrozaprševalna ionizacija (ang. <i>Electrospray ionization</i>)
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i>
FR	Fragmentor
FT-ICR	ang. <i>Fourier transform-ion cyclotron resonance</i>
GC	Plinska kromatografija
GC-MS	Plinska kromatografija z masno spektrometrijo
GC-MS/MS	Plinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo
hER	Gen za človeški receptor za estrogen
HLB	ang. <i>Hydrophilic-Lipophilic-Balanced</i>
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPLC-ECD	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s elektrokemičnim detektorjem
HPLC-FLD	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s fluorescenčnim detektorjem
ICH	ang. <i>International Conference on Harmonisation</i>
IS	Interni standard
LC	Tekočinska kromatografija
LC-MS	Tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo
LC-MS/MS	Tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo
LLE	Ekstrakcija tekoče-tekoče (ang. <i>Liquid/liquid extraction</i>)
metanol	100 % metanol
MF	Mobilna faza
MIPs	ang. <i>Molecularly imprinted polymers</i>
MM	Molekulska masa
MQ	Mili Q voda
MRM	ang. <i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Masna spektrometrija
m/z	Razmerje med maso in nabojem
n	Število injiciranj
QC	ang. <i>Quality control</i>
Q2 (R1)	ICH smernica Q2 prva revizija
PC	Polikarbonatna plastika
R ²	Determinacijski koeficient
RSD	Relativni standardni odklon
SD	Standardni odklon
SF	Stacionarna faza
SIM	ang. <i>Single ion monitoring</i>
SPE	Ekstrakcija na trdnem nosilcu (ang. <i>Solid phase extraction</i>)
t _R	Retencijski čas
TM	Telesna masa
YES	ang. <i>Yeast estrogen screen</i>

1 UVOD

1.1 HORMONSKI MOTILCI

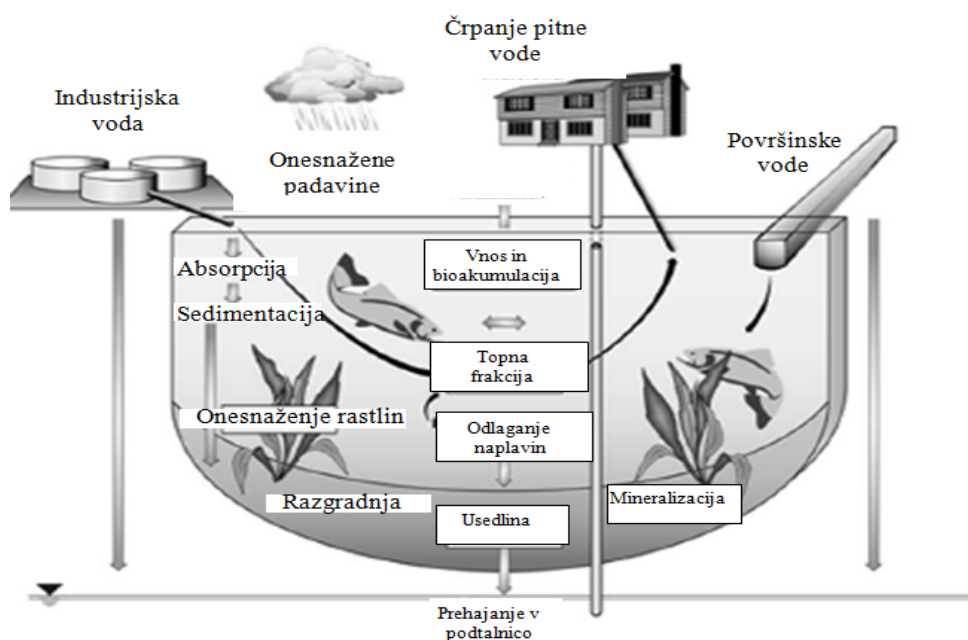
Hormonski motilci so eksogene snovi, ki motijo sintezo, sekrecijo, transport, vezavo, delovanje ali eliminacijo naravnih hormonov v organizmu, ki so odgovorni za vzdrževanje homeostaze, razmnoževanje, rast, razvoj in obnašanje (1-3). V grobem jih razdelimo v več skupin. Poleg hormonov so endokrini motilci (EDCs ang. *Endocrine disrupting compounds*) lahko tudi farmacevtske učinkovine, pesticidi, industrijske spojine, izdelki za osebno nego, itd. (1). V skupini hormonov kot hormonske motilce označujemo naravne in sintezne estrogene, androgene, progestagene, fitoestrogene in mikoestrogene (4-6). Industrijske endokrine hormonske motilce predstavljajo bisfenol A, ftalati, alkilfenoli, itd. Med farmacevtskimi učinkovinami so omenjeni paracetamol, diklofenak, sulfametoksazol, med izdelki za osebno nego pa kofein, oksibenzon (1). Sintezne estrogene uporabljamo za nadomestno terapijo za zdravljenje motenj v menstrualnem ciklusu in postmenopavzalnih motenj ter za kontracepcijo. Sintezni progestageni se uporabljajo za zdravljenje motenj v menstrualnem ciklusu, neplodnosti ter endometrioze. Androgeni so odgovorni za razvoj moških spolnih znakov. Za fitoestrogene velja, da imajo protektiven vpliv proti nastanku raka dojke s podaljšanjem menstrualnega ciklusa, nižanje serumskega holesterola, zmanjševanje kardiovaskularnih obolenj ter ohranjanje kostne gostote pri ženskah v menopavzi (5, 7).

Endokrini sistem skupaj z živčnim in imunskim sistemom predstavlja glavni regulatorni mehanizem, ki nadzoruje različne kjučne funkcije v telesu človeka in živali. Hormoni namreč vplivajo na rastne, razvojne, regulatorne in homeostatske mehanizme organizma, kot so razmnoževanje, vzdrževanje normalne koncentracije glukoze in ionov v krvi, krvni pritisk, itd. Ravnotežje hormonov v organizmu je nujno potrebno za preprečevanje funkcionalnih nepravilnosti. Endokrini sistem ima številne povratne mehanizme, ki uravnavajo spremembe v koncentraciji hormonov, vendar pa je tudi zelo občutljiv na zunanje vplive, ki škodujejo celotnemu razvoju organizma (7, 8).

Hormonski motilci so pri ljudeh in živalih v endokrinem sistemu sposobni izvabiti negativne učinke. Povzročajo lahko feminizacijo ribjih samcev, vplivajo pa lahko tudi na endokrini sistem ptic, plazilcev in sesalcev (9, 10). Hormonski motilci najpogosteje delujejo na receptorje estrogenske vrste, pri čemer govorimo o hormonskih motilcih estrogenske vrste (e-EDCs ang. *Estrogenic endocrine disrupting compounds*) (3,11).

Učinki se izrazijo v različnih tkivih, ki izkazujejo ekspresijo estrogenskih receptorjev vključujoč možgane, imunski sistem, kardiovaskularni sistem, pljuča, jetra, ledvica, mlečne žleze, razmnoževalne organe (jajčnik, testis, maternica, prostata), maščobno tkivo ter kosti (1). Pri moških in ženskah lahko povzročijo prezgodnjo puberteto in abnormalnosti reproduktivnega trakta, pri ženskah spontan splav. Povzročajo tudi rakava obolenja, med katerimi velja izpostaviti raka dojke, endometrija, prostate, itd. (6,7).

Ker veliko spojin prištevamo v skupino hormonskih motilcev, smo tako ljudje kot tudi živali izpostavljeni ne le enemu, temveč mešanici mnogih hormonskih motilcev. Zato je bistvenega pomena spremljati njihov izvor in prisotnost v okolju. V okolje prehajajo preko fekalnih vod iz gospodinjstev, industrijskih obratov in kmetijske dejavnosti. Tako se npr. v človeških izločkih nahajajo naravni in sintezni hormoni ter farmacevtske učinkovine. Številne hormonske motilce namreč uvrščamo med zdravilne učinkovine, najbolj razširjeni med njimi so peroralni kontraceptivi. Bisfenol A se v velikem obsegu uporablja v industriji plastike. Alkilfenol nonilfenol je prisoten v čistilih, ki se uporabljajo v gospodinjstvih in industrijskih procesih. Izvor hormonskih motilcev je iskati tudi v kmetijskih kemikalijah, ki so izdelane na osnovi alkilfenola in alkilfenol etoksilata (3, 12). Ker hormonskih motilcev v procesu čiščenja vod na čistilnih napravah ne odstranimo v celoti, o njihovi risotnosti poročajo v površinskih vodah, odpadnih vodah, podtalnici, pitni vodi. Sproščajo se v ozračje, vsebuje jih tudi deževnica (Slika 1).



Slika 1: Kroženje hormonskih motilcev v okolju.

Že zelo majhne koncentracije hormonskih motilcev lahko posegajo v delovanje hormonskega sistema, kar zahteva uporabo visoko občutljivih detekcijskih metod (2-4, 6, 9, 13, 14, 15).

Med hormonskimi motilci ni veliko strukturnih podobnosti oz. skupnih kemijskih lastnosti (4). Znano je, da sta sposobnost vezave na estrogenske receptorje in delovanje spojine odvisna od tega, kako uspešno posnemajo strukturo 17- β estradiola, ki je najučinkovitejši naravni estrogen. Pogoji za interakcijo z estrogenskimi receptorji je prisotnost vsaj enega fenolnega obroča s prosto hidroksilno funkcionalno skupino. Na fenolni obroč mora biti vezana vsaj tri ogljikove atome dolga stranska veriga ali obroč. Jakost delovanja na estrogenskem receptorju je odvisna od dolžine in razvejanosti stranske verige. Učinke izkazujejo po različnih mehanizmihi. Lahko se vežejo neposredno na hormonske receptorje, lahko pa posredno vplivajo na endokrini sistem na različnih ravneh. Pri neposredni vezavi na hormonske receptorje lahko delujejo kot agonisti oz. antagonisti. Po vezavi na estrogenski receptor pride do konformacijske spremembe in nastali kompleks se pomakne v celično jedro, kjer interagira s celično DNA. Rezultat je indukcija ali inhibicija transkripcije DNA, ki regulira sintezo določenih proteinov. Posredni vpliv hormonskih motilcev na endokrini sistem pa je vpliv na samo koncentracijo hormonov v organizmu. Tako npr. indukcija encimov, ki jih uvrščamo v skupino citokromov P450, vpliva na ravnovesje hormonov. Ti encimi imajo ključno vlogo pri sintezi in razgradnji steroidnih hormonov (8).

1.2 BISFENOL A

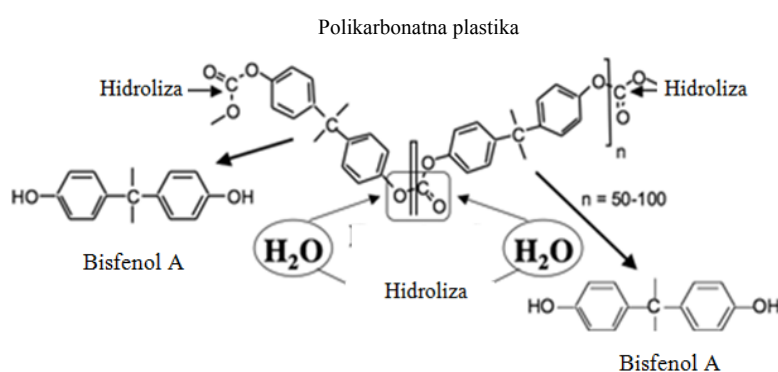
Bisfenol A (BPA) uvrščamo v skupino alkilfenolov. Struktura obsega dva fenolna obroča ter dve metilni skupini vezani na centralni ogljikov atom, kot je prikazano na Sliki 2. Gre za precej hidrofobno spojino ($\log P$ znaša 3,25), ki ima šibko kisle lastnosti (pK_a znaša 9,7) in je v vodi zelo težko topna (topnost v vodi je 89 mg/L) (16).

Ključni dejavniki, ki vplivajo na razgradnjo BPA, so reaktivne kisikove spojine, UV svetloba, prisotnost bakterij in njihovo število ter temperatura (18).

BPA je produkt kondenzacije acetona in fenola, pri čemer se kot katalizator uporablja klorovodikova kislina ali polistirenske sulfonatne smole. Prvič so ga sintetizirali leta 1891, v uporabo pa je prišel kot sintezni estrogen v 30. letih 20. stoletja. O estrogenskih učinkih BPA so prvič poročali leta 1993, pri čemer je bilo ugotovljeno, da deluje v okolju šibko estrogensko (19).

BPA je ključna gradbena enota pri sintezi polikarbonatne plastike. Uporablja se tudi pri proizvodnji epoksi smol, kot antioksidant, stabilizator in inhibitor polimerizacije v procesu izdelave polivinil klorida. Sodeluje pri sintezi poliestrov, polisulfanov, poliakrilatov ter je prisoten v lakiranih premazih v pločevinskih vsebnikih (4, 13, 18, 21). Po obsegu proizvodnje predstavlja eno izmed glavnih spojin v izdelkih s katerimi se dnevno srečujemo. Polikarbonatno plastiko vsebujejo plastenke za pijačo, stekleničke za hranjenje otrok (ang. *baby bottles*), plastični vsebniki za hrano, kuhinjske posode, CD-ji, gramofonske plošče, stekla za očala, itd. (16, 18). Iz polikarbonatne plastike so zgrajeni nekateri pripomočki, ki jih uporabljajo v zobozdravstvu (zobni vsadki in tesnila) (22). BPA je po obsegu eno najbolj proizvajanih spojin, katere poraba se bo v prihodnosti še povečala. V letu 2006 je letna proizvodnja zanašala 3,9 milijonov ton, v letu 2010 pa predvidoma 5 milijonov ton (16). Zaradi široke uporabe se je integriral v okolje in je prisoten v odpadnih vodah, površinskih vodah, podtalnici, sedimentu in zraku (14).

Mehanizmi prenašanja BPA v hrano, krmo in okolje so različni. BPA se v okolje izloča že med samim proizvodnim procesom. Med proizvodnjo se namreč ves BPA ne vključi v strukturo s kemijskimi vezmi, del ostaja prost in lahko prehaja iz materiala. Prehajanje je izrazitejše pri višjih temperaturah (npr. v pomivalnem stroju, v mikrovalovni pečici, vsebniki, ki se sterilizirajo v avtoklavu) in uporabi agresivnejših čistilnih sredstev (14, 19). Odpuščanje BPA iz polikarbonatne plastike, ki je polimer monomernih BPA enot prikazuje Slika 2. Prehajanje BPA v vodni medij je izrazitejše v bolj alkalnem pH območju ter ob prisotnosti višjih koncentracij fosfata (18, 22, 23).



Slika 2: Razgradnja polikarbonatne plastike.

Ker je BPA lipofilna spojina, se posledično akumulira v živalski hrani. Tako ga ljudje največkrat vnesemo pri zaužitju kontaminirane hrane. Višje koncentracije BPA so določili pri organizmih v vodnih okoljih (npr. ribe, race, morska hrana) (14).

Nevarnost za ljudi predstavlja tudi prehajanje BPA iz materiala, s katerim je v stiku hrana/pijača. Posledično BPA prehaja iz plastičnih in kovinskih vsebnikov neposredno v hrano zaradi direktnega kontakta s plastiko, smolo, laki, površinsko aktivnimi snovmi, itd. (24). V Preglednici 1 so podane vrednosti koncentracij BPA v nekaterih vrstah hrane in mineralnih vodah iz PET plastenk iz literature (16).

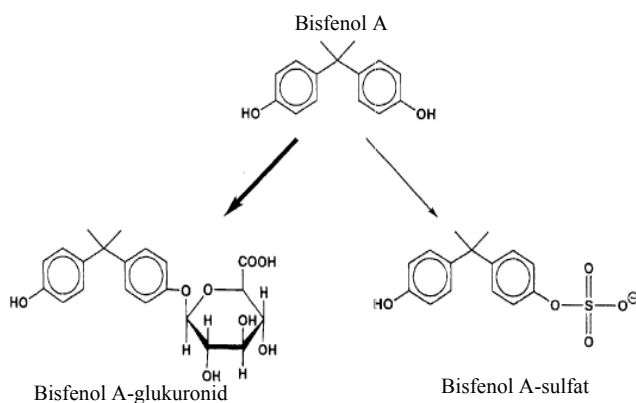
Preglednica 1: Koncentracije BPA v vzorcih hrane in mineralni vodi.

Vzorec	Koncentracija BPA	Število analiziranih vzorcev
sadje in zelenjava	9-48 ng/g	10
ribe	10-43 ng/g	9
morska hrana	13-213 ng/g	5
hrana iz PET vsebnikov	13-206 ng/g	26
mineralna voda iz PET plastenk	3-10 ng/L	9

BPA se ne obnaša kot tradicionalen toksin, saj zanj ne velja običajno pravilo večji odmerek, večji neželeni učinek. Podobno kot za hormone tudi za delovanje estrogena velja, da že izpostavljenost nizkim koncentracijam (delček na trillion ang. *ppt*) lahko povzroči neželene učinke. Mnenja glede varnosti BPA so deljena. American Chemistry Council sicer priznava toksičnost BPA, vendar le pri izpostavljenosti visokim koncentracijam. FDA (ang. *Food and Drug Administration*) je podala smernice v katerih je podana dovoljena dnevna količina BPA (ang. *Acceptable dose oz. Reference dose*), ki znaša 50 µg/kgTM. Ta vrednost temelji na toksikoloških študijah na živalih iz 80. let 20. stoletja (19, 24, 25). Hkrati pa so posamezne raziskovalne skupine z laboratorijskimi poskusi na podganah ugotovile, da že odmerek 20 µg/kgTM/dan vodi do okvar jajčec, problemov pri razmnoževanju, okvar zarodkov, itd. (19, 25). Evropska komisija je v letu 2004 določila vrednost za mejo specifične migracije (SML ang. *Specific migration limit*) za vsebnike, ki so v neposrednem stiku s hrano, 600 ng/g (16).

1.2.1 Farmakokinetika

BPA se tako pri človeku kot tudi pri živalih hitro in učinkovito absorbira iz GIT in je izpostavljen obsežnemu metabolizmu prvega prehoda v steni črevesja in jetrih. Pri podganah in primatih je pglavitni metabolnični presnovek bisfenol A-glukuronid. Pri človeku pa so v urinu poleg bisfenol A-glukuronida zaznali tudi bisfenol A-sulfat, kot je prikazano na Sliki 3 (25). Biološko aktiven je samo nekonjugiran BPA. Le-ta se v večini veže na plazemske proteine (23).



Slika 3: Metabolizem bisfenol-a A.

Glukuronid se tvori pod vplivom jeternih encimov UDP-glukuronosiltransferaz, še posebej aktivna je izoformna oblika UGT2B1 (23). Tvorba glukuronida je hitra in popolna. Zaradi dobre vodotopnosti se nastali glukuronid izloča prek ledvic, pri čemer razpolovni čas znaša manj kot šest ur. Pri podganah se presnovek BPA-glukuronid izloča preko žolča ter kroži v enterohepatičnem ciklusu, pri čemer se večina zaužitega odmerka izloči z blatom v obliki BPA (25).

Ker je metabolizem BPA zelo učinkovit in izločanje BPA-glukuronida hitro, je možnost akumulacije majhna, zaradi česar koncentracije v krvnem obtoku dosežejo majhne vrednosti (26). Zato je kljub dokazani toksičnosti njegova uporaba še vedno dovoljena v prehrambeni industriji, vendar v nizkih koncentracijah. Dnevni vnos naj ne presega mejne vrednosti izpostavljenosti BPA, ki znaša v državah EU 10 $\mu\text{g/kgTM/dan}$, v ZDA pa 50 $\mu\text{g/kgTM/dan}$ (24).

Zaradi hitrega in popolnega izločanja peroralno zaužitega BPA je najprimerneje spremljati prisotnost BPA v urinu. Celokupne vrednosti izpostavljenosti BPA natančneje določimo s pomočjo biomonitoringa (25).

V primerih ko analiziramo biološke vzorce (npr. urin), določevanje BPA lahko motijo komponente hrane. Primer je izoflavon resveratrol, ki ima enako molekulsko maso kot BPA in se izloča v obliki glukuronida, kar lahko daje lažno pozitiven rezultat (26).

1.2.2 Farmakodinamika

O estrogenskih učinkih BPA so prvič poročali leta 1993. Jakost delovanja je 10000 do 100000-krat nižja kot v primeru 17- β estradiola, zaradi česar so določili, da v okolju deluje šibko estrogensko (16). BPA delujejo kot direktni reverzibilni kompetitivni agonisti na estrogenskih receptorjih in ga uvrščajo v skupino selektivnih modulatorjev estrogenskega receptorja (SERM ang. *Selective estrogen receptor modulator*) (27). Zaradi angularne

konfiguracije in OH skupin na para mestu fenolnih obročev namreč lahko tvori vodikove vezi z akceptorskim delom estrogenskega receptorja.

Mehanizem delovanja BPA obsega neposredno delovanje BPA na receptor v jedru oz. receptor na celični membrani ali posredno preko vnosa kalcija, ki vodi do aktivacije encimov v tarčni celici. Nekateri mehanizmi delovanja pa so še vedno neznanka (23, 28).

Učinki BPA v organizmu so odvisni od tega, koliko prostega BPA je na voljo in kako dolgo so mu celice izpostavljene. Tvorba glukuronida sicer zmanjša količino prostega BPA, vendar lahko pride tudi do dekonjugacije glukuronida s pomočjo β -glukuronidaze, encima, ki ga v visokih koncentracijah najdemo predvsem v placentarnih celicah (24, 29).

In vivo študije na sesalcih (miši, podgane) poročajo o naslednjih neželenih učinkih po izpostavljenosti BPA: povečanje incidence hormonsko odvisnih rakov, zlasti raka mlečnih žlez in prostate, nepravilnosti razmnoževalnih organov npr. slabša kvaliteta moških spolnih celic ter zgodnje spolno dozorevanje žensk, metabolične motnje zlasti pri sladkorni bolezni odvisni od insulina, debelost ter vedenjske motnje (19, 18).

Znano je, da je BPA pri moški postrvi šarenki (ang. *Male rainbowtrout*) sposoben inducirati sintezo proteina vitelogenina (10). Poročali so tudi o morfoloških nepravilnostih v zgodnji življenjski fazi modelne ribe medaka (lat. *Oryzias latipes*) (17).

Pred nedavnim so potrdili tudi antagonistično delovanje BPA proti hormonom ščitnice in androgenemu hormonu. Hkrati pa BPA deluje tudi kot agonist za mutirano obliko androgenega receptorja v nekaterih rakavih celicah prostate, kar povzroča proliferacijo človeških celic raka prostate (13, 28). Učinkuje lahko tudi na razvoj, diferenciacijo in funkcioniranje centralnega živčnega sistema in imunskega sistema (27).

Pri ženskah izpostavljenost BPA povezujejo z disfunkcijo ovarijev, hiperplazijo endometrija ter ponavljajočimi se splavi (25). BPA lahko zmanjša plodnost, spremeni razvoj in je povezan z nastankom raka (30). Ljudje z visoko koncentracijo bisfenola A v urinu imajo večjo možnost za nastanek kardiovaskularne bolezni, diabetesa tipa 2 in spremenjene koncentracije jetrnih encimov (31).

Koncentracije BPA v krvi so odvisne od starosti in izpostavljenosti. Znano je, da je v nosečnosti metabolizem BPA spremenjen. Izpostavljenost BPA med nosečnostjo lahko vodi do zapletov, kot so prezgodnja zrelost, omejitve rasti zarodka, preeklampsija, spontan splav (13, 30). BPA namreč prehaja skozi placento in se akumulira zaradi nizkih koncentracij UDP-glukuronosiltransferaze v zarodku (24). Domnevajo, da imajo

novorojenčki kar trikrat višjo vrednost krvnih koncentracij BPA, kot odrasli, saj še nimajo povsem razvite metabolne kapacitete (29).

Dermalna izpostavljenost BPA-ju je redka, sistemska biorazpoložljivost je omejena, znaša zgolj 10 %. Pri nekaterih ljudeh, predvsem poklicno izpostavljenih, BPA lahko izzove alergični kontaktni dermatitis zlasti na izpostavljenih delih rok, nog in obraza. Z inhalacijo vnesemo zgolj manjši delež celokupne količine BPA, ki smo ji izpostavljeni (24, 25).

1.3 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI, VSEBNOSTI IN AKTIVNOSTI HORMONSKIH MOTILCEV

Razvoj analizne metode vključuje več stopenj. Zbiranju in shranjevanju vzorcev sledi priprava ter izolacija merjenih komponent, nato pa njihova kvalitativna in kvantitativna določitev. Na voljo so nam izpopolnjeni instrumenti, ki omogočajo ločitev in zaznavanje kemijskih spojin. Šibko točko analiznega postopka predstavlja priprava vzorcev. V splošnem je najdalgotrajnejši korak in je hkrati tudi vir mnogih netočnosti in nenatančnosti.

Metode za ugotavljanje prisotnosti in aktivnosti hormonskih motilcev vključujejo tako kemijske, analitske kot tudi biološke metode. Na ta način dobimo informacije o identiteti in koncentraciji hormonskih motilcev, kakor tudi o vplivu le-teh na žive organizme. S kombinacijo omenjenih metod povečamo občutljivost ter selektivnost pri kvantitativnem določanju (9).

1.3.1 Priprava vzorcev

Glavni cilj priprave vzorca za kromatografske analize je izolacija izbranega analita ter odstranitev čim več sočasno prisotnih motečih komponent.

Postopek priprave vzorcev mora biti enostaven, hiter, cenovno sprejemljiv, čim bolj selektiven, pri čemer mora omogočati kvantitativne izkoristke. Zaželeno je, da sočasno z izolacijo analita vzorec tudi koncentriramo (32).

Za izolacijo spojin iz vodnih vzorcev najpogosteje uporabljamo destilacijo, ekstrakcijo, in različne adsorpcijske tehnike. Za izolacijo hormonskih motilcev iz tekočih nebioloških vzorcev (npr. vodni vzorci, vzorci hrane v tekoči obliki) se uporabljajo ekstrakcija tekoče-tekoče, ekstrakcija na trdnem nosilcu ter mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (SPME). SPME je redkeje uporabljena (1, 12, 16).

1.3.1.1 Ekstrakcija tekoče-tekoče

Za izolacijo organskih spojin iz vodnih vzorcev se je v preteklosti najpogosteje uporabljala ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE ang. *Liquid/liquid extraction*). Metoda temelji na porazdeljevanju komponent vzorca med vodnim medijem in organskim topilom, ki se med seboj ne mešata. Če je proučevan analit bolj topen v organskem topilu, se pri ekstrakciji porazdeli v večji meri v organsko fazo. Topilo iz organske faze do suhega odparimo, preostanek pa raztopimo v topilu oz. mobilni fazi in naneseemo na kolono. Izkoristek ekstrakcije je predvsem odvisen od afinitete analitov do organskega topila, 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. Izbrano topilo mora dobro raztapljati spojino, ki jo želimo ekstrahirati, vendar z njo ne sme reagirati. Ravno tako se ne sme mešati s topilom, iz katerega ekstrahiramo in ne sme imeti visokega vrelišča, ker ga lahko le tako odparimo in ločimo od analita. Metoda ima seveda tudi nekaj pomanjkljivosti. Pri velikih volumnih vzorcev je dolgotrajna in zahteva porabo velike količine organskih topil, lahko se tvorijo emulzije, kar vodi do visokih izgub (16, 33)

1.3.1.2 Ekstrakcija na trdnem nosilcu

Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE ang. *Solid phase extraction*) je bila vpeljana v 70. letih prejšnjega stoletja in je delno odpravila pomanjkljivosti LLE. Danes je dobro uveljavljena tehnika. Osnovni princip SPE je podoben tekočinski kromatografiji, gre namreč za porazdeljevanje komponent iz vzorca med trdno in tekočo fazo. Proučevan analit iz tekoče faze prehaja na trdno fazo, kjer se zadrži, speremo pa ga šele v fazi elucije. Eluat posušimo do suhega, uparjen ostanek pa raztopimo v topilu in ga kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo s izbrano kromatografsko metodo.

S SPE analizirani vzorec očistimo interferenčnih komponent, proučevan analit pa izoliramo in lahko tudi koncentriramo. Vse pogosteje se uporablja tudi kot razsoljevalna tehnika (ang. *Desalting procedure*). Omogoča izvršitev reakcije derivatizacije med aktivno skupino analita in tistimi na površini polnila, nato pa sledi elucija. Omogoča pa tudi frakcioniranje vzorca v različne komponente, kot pri klasični kolonski kromatografiji. Pri tem vsako frakcijo eluiramo z drugačno tekočo fazo (1, 11, 34, 35).

Glavne prednosti SPE so bistveno manjša poraba organskih topil, večja selektivnost, visok izkoristek ekstrakcije, krajši čas priprave vzorcev, možnost avtomatizacije procesa in

sklopitve s kromatografijo (1). Zagotavlja dobro ponovljivost. Tehnika je enostavna, omogoča pa dobro optimizacijo tekom razvoja metode. Proces SPE lahko izvedemo on-line ali off-line. Pri off-line izvedbi je priprava vzorcev popolnoma ločena od kromatografske analize, medtem ko on-line izvedba vključuje ekstrakcijsko kolono kot del kromatografske opreme. Za on-line ekstrakcijo BPA iz okoljskih vodnih vzorcev se uporablja imunoafinitetni monolit. BPA se ekstrahira na osnovi reakcije s protitelesi, ki so vezana na površini monolita (16, 33, 34, 36).

1.3.2 Analiza in detekcija

1.3.2.1 Kemijske metode

Kromatografska separacija temelji na osnovi razlik hitrosti potovanja posameznih komponent vzorca pod vplivom mobilne faze (MF) zaradi selektivnega zadrževanja komponent na stacionarni fazi (SF). Mobilna faza je tekočina nizke viskoznosti oz. plin, stacionarno fazo pa predstavlja trdna površina oz. nemobilna tekočina. Komponente vzorca je mogoče ločiti, saj se zaradi različnih fizikalnih in kemijskih lastnosti ter posledično različne afinitete do stacionarne oz. mobilne faze različno porazdeljujejo.

Porazdelitveno kromatografijo delimo na normalno in reverzno fazno kromatografijo. Normalno fazno kromatografijo se uporablja za separacijo polarnih spojin, pri tem je SF polarna in MF nepolarna. V primeru reverzno fazne kromatografije je SF nepolarna, MF pa polarna in na ta način ločimo nepolarne spojine.

Kromatografske metode lahko opredelimo na več načinov. Prvi način opredeli kromatografijo glede na agregatno stanje mobilne faze, in sicer na plinsko (GC), tekočinsko (HPLC) ter superkritično-tekočinsko kromatografijo (SFC). Kromatografske metode pa lahko razvrstimo tudi po nahajališču stacionarne faze. Tako je npr. pri kolonski kromatografiji stacionarna faza vezana na nosilec v koloni, mobilna faza pa teče skozi kolono pod vplivom gravitacije ali tlaka. Pri planarni kromatografiji ločevanje poteka v ravnini, pri čemer je stacionarna faza (t.i. sorbent) nanescena na ravno površino (tankoplastna kromatografija-TLC) ali v porah papirja (papirna kromatografija). Pri tem se mobilna faza (t.i. topilo) pomika skozi ploščo s sorbentom zaradi gravitacije ali pa kapilarnega delovanja (37).

Za določanje vsebnosti BPA v vodnih vzorcih se uporabljata tehniki plinske in tekočinske kromatografije v povezavi z različnimi detektorji.

Najpogosteje se uporabljajo tehnike, ki temeljijo na masni spektrometriji in sicer tekočinska kromatografija masna spektrometrija (LC-MS), plinska kromatografija masna spektrometrija (GC-MS) ter tandemske tehniki LC-MS/MS ter GC-MS/MS (6, 16).

V uporabi pa so tudi tehnike tekočinske kromatografije visoke ločljivosti s elektrokemičnim (HPLC-ECD) ter fluorescenčnim detektorjem (HPLC-FLD). BPA izkazuje fluorescenco, pri čemer je valovna dolžina za eksitacijo enaka 275 nm, za emisijo pa 305 nm. Elektrokemična detekcija temelji na elektroaktivnosti fenolnih skupin prisotnih v molekuli in v primerjavi s fluorescenčnim detektorjem daje večjo občutljivost ter specifičnost (16, 18, 36, 38). S kromatografskimi metodami ločujemo posamezne komponente le po enem parametru. Ker ima večje število molekul lahko enak retencijski čas, verodostojnost rezultata potrdimo s drugo metodo. Če povežemo GC ali LC z masno spektrometrijo, GC-MS ali LC-MS, pridobimo na občutljivosti in specifičnosti. Tehnike, ki temeljijo na masni spektrometriji odlikuje hitrost in visoka zmogljivost (6, 39).

Pri izbiri separacijske tehnike sklopljene z masnim analizatorjem so ključne fizikalno-kemijske lastnosti analita, npr. molekulska masa, hlapnost, polarnost, termična stabilnost. Spojine, ki jih želimo analizirati s plinsko kromatografijo, morajo biti hlapne, termično stabilne in manj polarne. Če osnovni pogoji niso izpolnjeni je spojine potrebno predhodno derivatizirati. Tvorba derivatov podaljša čas analize, hkrati pa lahko pomeni nov vir napak, kar se lahko odraža na kvantitativni določitvi in predstavlja ključne omejitve pri izvedbi plinske kromatografije (5, 6, 9, 34).

Ključna prednost LC-MS pred GC-MS je, da se izognemo derivatizacijskemu koraku. LC-MS združuje dve tehniki, ki se med seboj dopolnjujeta. LC del nam podaja podatke o jakosti signala in času prihoda učinkovine iz kolone. S pomočjo MS izberemo MRM prehode, nato pa merimo odziv izbranega analita, ki ga na kromatogramu opazimo v obliki kromatografskega vrha. Na ta način lahko komponente vzorca identificiramo in kvantitativno ovrednotimo ter določimo čistost vzorca (35).

1.3.2.2 Biološke metode

V skupino bioloških metod uvrščamo imunokemijske metode, bioteste *in vitro* ter bioteste *in vivo*. Biotesti *in vitro* so hitri, ponovljivi in cenovno ugodni, ne podajo pa nam odgovora o učinkih na celoten organizem. Zato je nujna tudi uporaba biotestov *in vivo*, s katerimi proučujemo vplive na celoten endokrini sistem. V primeru določevanja BPA se največkrat uporabljajo imunokemijske metode (1, 8, 9, 16).

Imunokemijske metode

Med imunokemijskimi metodami se največkrat uporablja imunoencimski test na trdi podlagi (ELISA ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), pri čemer opazujemo reakcijo antigena in protitelesa. Površina mikrotiterske ploščice je prekrita s specifičnimi monoklonskimi protitelesi. Princip določevanja temelji na kompetitivni reakciji spojine, ki je encimsko označena, z morebitno prisotno spojino v preiskovanem vzorcu za vezavo na monoklonska protitelesa. Ob dodatku nebarvanega kromogenega substrata se zaradi prisotnosti vezane encimsko označene spojine tvori obarvan produkt, kar zaznamo kot spremembo absorbance (40).

Prednosti ELISA tehnike v primerjavi s kromatografskimi metodami so hitrost ter enostavnost izvedbe, saj so na tržišču seti že pripravljenih reagentov. Slaba stran imunoloških metod je, da ne identificirajo le preiskovane spojine, pač pa lahko vključujejo tudi skupino strukturno podobnih spojin. To lahko vodi do lažno pozitivnega rezultata, zaradi navzkrižne reakcije s protitelesi. Prav zato je v primeru pozitivnega rezultata potrebno dobiti potrditev z drugo referenčno metodo, ki temelji na drugačnem analiznem postopku, npr. kromatografsko metodo (41).

Biotesti *in vivo*

Najpogosteje uporabljena *in vivo* metoda za določanje prisotnosti hormonskih motilcev je metoda, ki temelji na določanju vitelogenina v krvi samcev in mladice rib zebric *Danio rerio*, t.i. **ELISA-Vtg** (ang. *Vtg Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Med spolnim dozorevanjem samice v gonadah sintetizirajo 17- β estradiol. Le-ta se v hepatocitih veže na receptor, kar sproži transkripcijo gena za vitelogenin. Vitelogenin je prekurzor jajčnega rumenjaka, ki se praviloma izraža le pri samicah. Kadar je v vodi prisotna povečana koncentracija estrogensko aktivnih spojin, se vitelogenin tvori tudi pri samcih in mladica. Test temelji na specifični vezavi med vitelogeninom in z markerji označenimi protitelesi. Encimska aktivnost markerja na protitelesu je proporcionalna koncentraciji vitelogenina in jo določamo s spremembo barve spektrofotometrično.

Vitelogenin služi kot enostaven in občutljiv biomarker za določanje prisotnih hormonskih motilcev z estrogenskim delovanjem. Njegova slabost pa je to, da je nestabilen protein katerega koncentracija se v plazmi spreminja.

Biotesti in vitro

V skupino biotestov *in vitro* spadajo tisti, ki vključujejo pomnoževanje in diferenciacijo celic, testi s kompetitivno vezavo ligandov ter testi *in vitro*, ki temeljijo na ekspresiji genov. Ti biotesti so narejeni po enakem principu kot poteka delovanje estrogenov pri vretenčarjih. Hormonski motilci se v krvi vežejo na globuline in z njimi potujejo po organizmu. Prosti hormonski motilci preidejo skozi membrano z difuzijo in se vežejo na estrogenske receptorje v različnih tkivih.

Metode pomnoževanja temeljijo na uporabi človeških celičnih linij, ki se pomnožijo po izpostavitvi hormonskim motilcem. Znan je E-screen test, ki temelji na pomnoževanju rakavih celic MCF-7 celične linije celic raka na prsih.

Med testi *in vitro*, ki temeljijo na ekspresiji genov se uporablja test YES (ang. *Yeast estrogen screen*) z gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Gensko spremenjene celice kvasovke imajo v svoj genom vgrajen gen za človeški receptor za estrogen (hER) in zapis za gen lac Z, ki kodira zapis za encim β -galaktozidazo. V prisotnosti spojin z estrogensko aktivnostjo se le te vežejo na hER in sprožijo serijo reakcij, ki v končni fazi vplivajo na barvo dodanega substrata, ki jo izmerimo spektrofotometrično.

Vse bolj razširjena je tudi kombinacija biološke in kemijske analize. Na ta način namreč povečamo občutljivost in selektivnost pri kvantitativnem določanju. Tako se npr. v primeru proučevanja škodljivih učinkov hormonskih motilcev na zdravje rib uporablja kombinacija YES testa ter analize GC-MS oz. LC-MS (5, 9).

1.3.3 Kvantitativno vrednotenje

Vsebnosti hormonskih motilcev, ki jih določimo s kemijskimi metodami (LC-MS, GC-MS) vrednotimo kvantitativno. Površina in višina vrhov v kromatogramu sta ključna parametra, ki omogočata kvantitativno analizo. V splošnem je višina manj zanesljiv parameter, še posebej kadar kromatografski vrhovi nimajo idealne oblike in so asimetrični. Pri kvantitativni analizi gre torej za primerjavo odziva (površina ali višina) vzorca s odzivom standarda. Ker je to relativna metoda, bo rezultat zanesljiv le toliko kolikor je zanesljiv standard, ki smo ga pri analizi uporabili. Z ozirom na potrebe in možnosti izvedemo kvantitativno analizo na enega od treh načinov: z metodo eksterne standarda, metodo internega standarda in metodo standardnega dodatka.

V primeru uporabe tehnike masne spektrometrije se pogosto uporablja metoda internega standarda (IS). Ta metoda velja za najbolj zanesljivo, saj zajamemo celoten analizni postopek. Zmanjšujemo napake, ki nastanejo med samo pripravo vzorcev, kot tudi možne

spremembe v odzivnosti instrumenta. Na ta način zagotovimo večjo točnost in ponovljivost rezultatov. Metoda temelji na tem, da k vsakemu vzorcu ali standardu dodamo znano količino IS. Kromatografski vrh IS mora biti ločen od kromatografskih vrhov ostalih komponent v vzorcu, obenem pa jim mora biti čim bolj podoben po fizikalno kemijskih lastnostih. Posledično to pomeni tudi podoben retencijski čas. V primeru LC-MS se običajno uporabljajo devterirani analogi IS, pri čemer ločba poteka na osnovi različnih mas na MS delu, zato ni potrebna kromatografska ločba (16, 33, 37, 42).

1.4 ANALIZNI POSTOPEK ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI BISFENOLA A V VZORCIH PITNIH VOD

1.4.1 SPE

V okviru naše diplomske naloge smo vzorce pripravili po SPE postopku. Za izvedbo ekstrakcije potrebujemo primeren nosilec ter aparaturo, ki omogoča SPE.

Učinkovitost SPE metode je odvisna od interakcij med sorbentom in analitom. SPE najpogosteje izvajamo na kolonah (ki so lahko plastične ali steklene) ali na ekstrakcijskih diskih napolnjenih z izbranim adsorbentom. Princip ekstrakcije je v obeh primerih enak, vendar imajo diski večjo površino, kar poveča možnost interakcij med vzorcem in sorbentom. Posledično so primerni za analizo večjih volumnov vzorcev, s čimer lahko dosežemo večje pretoke in boljše izkoristke, hkrati pa se tako lažje izognemo možnosti zamašitve. To se namreč pogosto dogaja pri ekstrakciji iz kompleksnih matrik, kjer so prisotne mnoge nečistote, npr. odpadne vode. Vendar pa so diski v primerjavi s kolonami dražji. Poraba organskih topil tekom ekstrakcije je večja, kar podaljša postopek sušenja in poveča možnost izgub, hkrati pa je mnogokrat potrebno dodatno koncentriranje eluata z namenom kvantitativnega prenosa.

Pogosteje izberemo polnilo tako, da ima visoko afiniteto do proučevanega analita, zato se le-ta na koloni zadrži, neželene komponente vzorca pa prepušča. Polnilo pa lahko izberemo tudi tako, da ima slabo afiniteto do merjene komponente pri čemer jo prepušča, na koloni pa zadrži neželene komponente vzorca.

SPE poteka po treh glavnih mehanizmih. Posledično zato tudi adsorbente razdelimo na normalno fazne (polarne), reverzno fazne (nepolarne) in ionsko izmenjevalne (kationske in anionske). Izbira primerne mehanizma polnila je odvisna od polarnosti analiziranega analita ter od sestave vzorčnega matriksa. Vsako polnilo ima za izbran analit edinstvene

lastnosti selektivnosti in retencije. V praksi najprimernejše polnilo znotraj izbranega ekstrakcijskega mehanizma najlažje določimo s poizkušanjem.

Ekstrakcija na normalno faznem adsorbentu se uporablja za ekstrakcijo polarnih spojin iz nepolarnih vzorcev, pri tem polnilo lahko predstavlja nemodificiran silicijev dioksid, silikagel s kovalentno vezanimi funkcionalnimi skupinami ciano, amino in diol, aluminijev oksid, magnezijev silikat (florisil). Za zadrževanje analita na sorbentu so bistvene hidrofilne polarne interakcije, kot npr. vodikove vezi, interakcije dipol-dipol ter dipol-induciran dipol.

Za izolacijo nepolarnih spojin iz polarnih vzorcev se uporablja ekstrakcija na reverzno faznem adsorbentu. Kot polnilo lahko uporabimo silikagel prekit s hidrofobnim slojem, ki ga predstavljajo različno dolge alifatske verige (najpogostejše C_8 in C_{18}), fenilni obroč ali pa porozni organski polimerni delci. Polimerni adsorbenti so v zadnjih letih vse bolj v veljavi, saj dajejo visoke izkoristke ekstrakcije, hkrati pa pH vzorca na izkoristke ekstrakcije ne vpliva v tolikšni meri. Primer polimera oz. smole predstavlja adsorbent sestavljen iz polistiren-divinilbenzenskih verig. Zadrževanje analita na nepolarni stacionarni fazi temelji na hidrofobnih interakcijah (Van der Waalove sile, π - π interakcije, disperzijske sile), lahko tudi na tvorbi hidrofilnih interakcij (H-vezi).

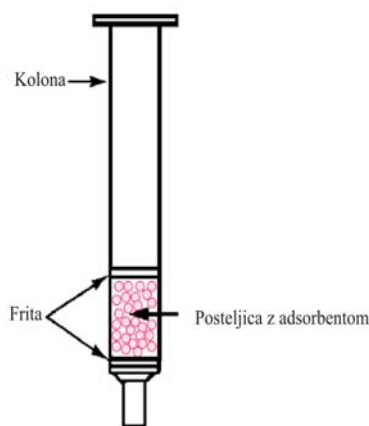
Za komponente z ionskimi lastnostmi so bolj primerni ionsko izmenjevalni adsorbenti. Ključne so elektrostatske interakcije med sorbentom in analitom. Anionski izmenjevalci so kvarterni amini (N^+), amini (NH_2), diamini (NH_2-NH_2), z njimi pa ekstrahiramo kisle in nevtralne komponente. Medtem ko kationski adsorbenti vsebujejo aromatske sulfone ($C_6H_5SO_3H$) in karboksilne skupine ($COOH$) in služijo za ločitev bazičnih in nevtralnih komponent.

Večina uporabljenih sorbentov je neselektivnih, vse bolj pa se uveljavljajo selektivni sorbenti. Predstavniki selektivnih sorbentov so imunosorbenti (36) in MIPs (ang. *Molecularly imprinted polymers*). Tako npr. MIPs sestavljajo navzkrižno prepleteni polimeri s specifično prepoznavnimi mesti z že vnaprej določeno selektivnostjo za izbran analit (43). Ker je njihov razvoj časovno zamuden, kompleksen in drag je njihova uporabnost omejena (1, 9, 16, 33).

V okviru diplomske naloge smo vzorce ekstrahirali na treh v literaturi najpogostejše uporabljenih polimernih nosilcih. Izbrali smo plastične kolone katerih ekstrakcija temelji na reverzno faznem mehanizmu, pri čemer smo primerjali dva polimerna adsorbenta Strata X, Oasis[®] HLB ter primer nepolarnega adsorbenta C18E. Vse omenjene adsorbente

uvrščamo v skupino neselektivnih adsorbentov. Razlikujejo se po strukturi adsorbenta in posledično po lastnostih adsorbenta kot so velikost delcev, povprečen premer por, specifična površina, masa adsorbenta in pH območje stabilnosti (Preglednica 2). Princip ekstrakcije temelji na tem, da se v fazi nanosa vzorca proučevan analit na adsorbentu zadrži, iz adsorbenta ga speremo šele v fazi elucije.

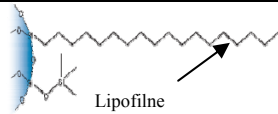
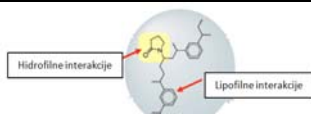
V vseh primerih se adsorbent nahaja med dvema kalciniranimi diskoma v polipropilenski koloni (t.i. kartuša). Na sliki 4 so prikazani ključni sestavni deli kartuše in sicer kolona, posteljica z adsorbentom in friti.



Slika 4: SPE kartuša.

V primeru kolone C18-E sorbent predstavlja silikagel, na katerega so vezane verige z 18 ogljikovimi atomi. Za interakcije z analitom so ključne nepolarne interakcije, pri čemer so zaradi pokritosti silanolnih skupin zmanjšane sekundarne interakcije silanolnih skupin. Polimerna adsorbenta sta sposobna zadržati polarne in nepolarne spojine, ki imajo kisle, bazične ter nevtralne lastnosti. Strata X adsorbent je kopolimer polistiren-divinil bezena, ki je strukturno modificiran. Oasis[®] HLB adsorbent (ang. *Hydrophilic-Lipophilic-Balanced*) je sestavljen iz kopolimera N-vinilpirolidona in divinilbenzena. Retencija temelji na hidrofilnih (H-vez in interakcija dipol-dipol) in lipofilnih interakcijah (Van der Waalsove vezi) s adsorbentom, kot je prikazano v Preglednici 2. Pri Strati X prihaja tudi π - π interakcij (44).

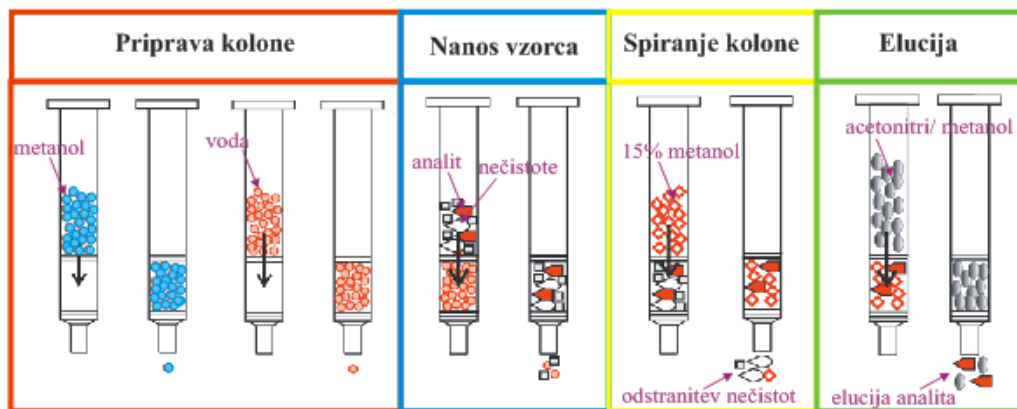
Preglednica 2: Primerjava lastnosti izbranih nosilcev.

Ime nosilca	C18-E	Strata X	Oasis [®] HLB
Struktura adsorbenta		/	
Velikost delcev [μm]	55	33	30
Povprečen premer por [$\text{\AA}$]	70	85	80
Specifična površina [m^2/g]	500	800	810
Masa adsorbenta [mg]	500	60	60
Volumen kolone [mL]	3	3	3
pH območje	1-14	1-14	0-14

* Oznaka / označuje, da ni dostopnega podatka.

Proces ekstrakcije sestoji iz štirih faz. Priprava kolone obsega kondicioniranje kolone ter njeno ekvibracijo, čemur sledi nanos vzorca, spiranje ter elucija, kot prikazuje Slika 5. V fazi kondicioniranja nosilcev z izbranim topilom (npr. metanol, acetonitril, izopropanol, etilacetat, aceton) aktiviramo funkcionalne skupine adsorbenta, kar omogoča dobro omočitev s hidrofilno raztopino vzorca in poveča možnost interakcij analita ter sorbenta. V tej fazi odstranimo tudi zrak in morebitne nečistote, ki se nahajajo na koloni. Kondicioniranju sledi ekvibracija. Z nanosom topila, ki ima podobno sestavo kot matrika našega preiskovanega vzorca, podobno polarnost, pH in ionsko moč, odstranimo ostanke topila za aktivacijo, hkrati pa kolono pripravimo na nanos vzorca. Običajno za spiranje uporabimo vodo ali pa pufer s primernim pH pri katerem poteka ekstrakcija danega analita. Sledi nanos vzorca, pri čemer se sorbent ne sme posušiti, kajti prišlo bi do dekontondicioniranja nosilca, kar pa vpliva na sposobnost vezave analita. Vzorec spuščamo skozi kolono konstantno s primerno hitrostjo, saj sta od nje odvisna kvantitativnost vezave analita na sorbent ter čas analize. Interferenčne komponente vzorca, ki so se zadržale na koloni odstranimo s spiranjem. Izbrano topilo za spiranje mora odstraniti čimveč sočasno prisotnih neželenih komponent vzorca, ne sme pa izprati iskanega analita. Za spiranje največkrat uporabimo vodo, primeren pufer ali pa vodo v kombinaciji z majhnim deležem organskega topila. Po končanem spiranju pred elucijo je potrebno nosilec dobro posušiti. Odstraniti je potrebno vso topilo ujet v pore stacionarne faze, kar običajno dosežemo z izpostavljenostjo vakuumu za nekaj minut (21). V fazi elucije želimo iz adsorbenta odstraniti izbran analit. Za elucijo analita iz adsorbenta uporabimo primerno organsko topilo oz. kombinacijo topil. Elucijsko topilo mora imeti večjo afiniteto do analita kot do sorbenta, a z njim ne sme intereagirati. Na ta način prekinemo interakcije analita s

stacionarno fazo. Zaželeno je, da uporabimo čim manjši volumen elucijskega topila in z njim odstranimo čim večji delež adsorbiranega analita. Za izkoristek ekstrakcije je bistveno, da elucija poteka počasi.

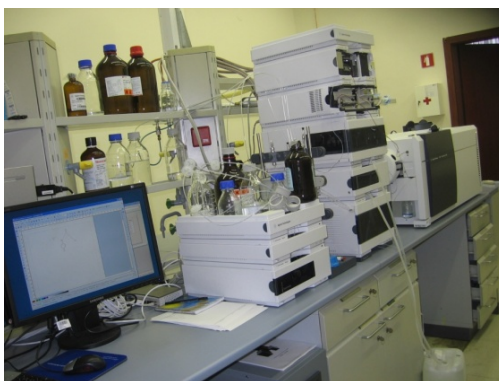


Slika 5: Potek ekstrakcije.

1.4.2 LC-MS/MS

V okviru diplomske naloge smo uporabili tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (UHPLC) sklopljeno z masno spektroskopijo.

Proučevan analit raztopimo in ga pod visokim pritiskom s pomočjo mobilne faze potiskamo skozi kolono. Ob prihodu v masni analizator v razredčeni plinski fazi pod visoko napetostjo poteče ionizacija analita. V osrednjem delu masnega analizatorja se ioni ločijo na osnovi razmerja med maso in nabojem, s pomočjo detektorja pa odziv nastalih izbranih MRM prehodov kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo. V analizatorju je potreben vakuumski sistem, ki omogoča potovanje nastalih ionov znotraj analizatorja ter prepreči njihove morebitne trke z molekulami zraka. Na Sliki 6 je prikazan uporabljen LC-MS/MS sistem (48, 49).



Slika 6: LC-MS/MS sistem 1290 Infinity LC ter 6460 Triple Quadrupole Jetstream® LC/MS, Agilent Technologies.

1.4.2.1 HPLC

Metoda tekočinske kromatografije omogoča, da se komponente vzorca porazdelijo vzdolž kolone, nato pa se ločeno eluirajo, kjer jih zaznamo s specifičnimi detektorji. V nadaljevanju so predstavljeni ključni deli LC sistema.

Mobilne faze so nameščene v rezervoarjih za mobilno fazo. Izbrana mobilna faza ne sme vplivati na lastnosti kolone, topiti mora vzorec, imeti mora nizko viskoznost ter mora biti čim bolj čista. Vse uporabljene mobilne faze je potrebno pred uporabo razpliniti. Kromatografsko separacijo lahko izvedemo pri konstantni sestavi mobilne faze (izokratsko izpiranje), ali pa se sestava med potekom analize spreminja (gradientno izpiranje). Z omenjeno tehniko gradientnega izpiranja s spreminjanjem polarnosti mobilne faze dosežemo krajše čase zadrževanja močno vezanih komponent na koloni in posledično bistveno skrajšamo čas analize. Dosežemo celotno ločljivost komponent v vzorcu, izboljšamo občutljivost ter obliko vrhov.

Črpalka črpa mobilno fazo skozi razplinjevalec, kjer se odstranijo še morebitno prisotni mehurčki. Zagotavljati mora enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono.

Injektor poskrbi, da se v sistem injicira vzorec, injiciranje pa mora biti ponovljivo. Omogočati mora doziranje različnih volumnov, pri tem pa dozirna zanka omejuje volumen. Analizni postopek pričnemo z injiciranjem najnižje koncentracije in postopoma dvigujemo koncentracije, kajti na ta način zmanjšamo verjetnost nastanka »carry-over učinka«. Injektor mora biti dovolj robusten, hkrati pa si želimo, da je čim bolj enostaven za vzdrževanje in servisiranje.

Kolona je bistven del HPLC sistema, saj se v njej dogajajo najpomembnejši separacijski procesi: porazdelitev, adsorpcija, ločitev na osnovi mase in velikosti. Separacija na koloni je odvisna od dimenzij in oblike polnila ter učinkovitosti kolone. Kolona je nameščena v t.i. termostat za kolono. S spreminjanjem temperature kolone lahko uravnavamo hitrost pretoka in tlak v koloni. S povišanjem temperature dosežemo nizko viskoznost mobilne faze, kar povzroči padec tlaka in lahko povečamo pretok. To je za kromatografsko analizo dobro, saj skrajšamo čas analize. Vendar previsoka temperatura ni zaželjena, kajti lahko povzroči nastajanje mehurčkov ali celo razpad komponent vzorca. Kolona je izdelana iz inertnega materiala (nerjaveče jeklo), zaprta, dobro zatesnjena ter napolnjena s stacionarno fazo. Pri naši analizi smo uporabili kolono ZORBAX SB-C18 Rapid Resolution. Gre za nepolarno stacionarno fazo, ki jo predstavlja silikagel prekrit s hidrofobnim slojem C₁₈ verig. Posledično govorimo o reverzno fazni porazdelitveni kromatografiji. Kolona je

primerna tudi za UHPLC analize, ker je sposobna vzdržati tlak do 600 bar, kar označuje oznaka Rapid Resolution. Večjo učinkovitost kolone omogoča manjša velikost delcev kolone, saj se poveča število interakcij med kolono in analitom.

Tik pred analitsko kolono na nosilcu je nameščena predkolona oz. predfilter. Služi kot predfilter za mehanske in kemijske primesi osnovni koloni. Na ta način koloni podaljšamo življenjsko dobo, saj jo zaščitimo pred onesnaževanjem in raztapljanjem stacionarne faze v mobilni fazi. Napolnjena sta s stacionarno fazo istega tipa kot kolona, vendar so delci večjih dimenzij. Ko sta kontaminirana ju zamenjamo z novo, kar je mnogo enostavneje in ceneje.

Iz kolone analit potuje na detektor (37, 42).

1.4.2.2 MS/MS

Ionizacija

Izbira primerne ionizacijske tehnike je odvisna od narave vzorca. V osnovi ločimo dve glavni skupini ionizacijskih tehnik. V prvo skupino (ang. *Gas-phase source*) uvrščamo tiste pri katerih je vzorec uplinjen, nato pa ioniziran. Metoda je primerna za ionizacijo termostabilnih analitov, katerih temperatura vrelišča znaša manj kot 500 °C, molekulska masa pa je nižja od 1000 Da. V to skupno ionizacije uvrščamo ionizacijo z elektroni (EI ang. *Electron impact*), kemično ionizacijo (CI ang. *Chemical ionization*) in ionizacijo v električnem polju (FI ang. *Field ionization*).

Za drugo skupino ionizacijskih tehnik (ang. *Desorption source*) velja, da se analit nahaja v trdnem ali tekočem stanju in se neposredno pretvori v plinski ion. Prednost takega načina ionizacije je njegova uporabnost za ionizacijo nehlapnih in termično nestabilnih analitov (kar pomeni, da ni potreben dodaten korak izhlapevanja) z molekulsko maso celo nad 100000 Da. V to skupino uvrščamo naslednje ionizacijske tehnike: elektrorazprševalna ionizacija (ESI ang. *Electrospray ionization*), laserska desorpcija/ionizacija v matriksu (MALDI ang. *Matrix-assisted laser desorption ionization*), desorpcija v električnem polju (FD ang. *Field desorption*), bombardiranje s hitrimi atomi (FAB ang. *Fast atom bombardment*), elektrorazprševalna ionizacija (TS ang. *Thermospray ionization*) (35, 48-50).

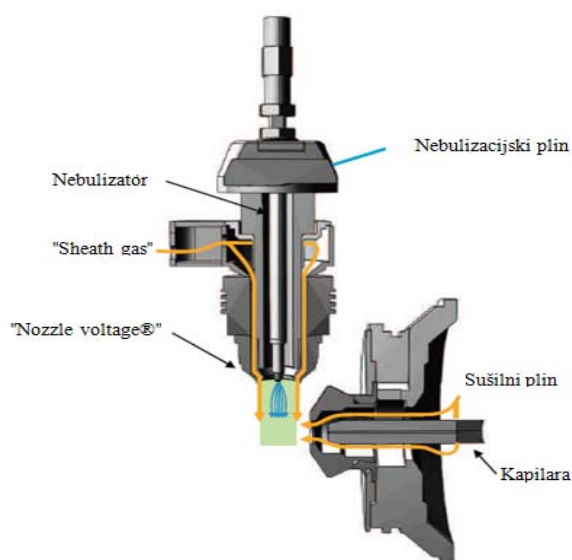
Elektrorazprševalna ionizacija

Je najbolj uporabna ionizacijska metoda, saj se dobro sklapija s separacijskima metodama HPLC in elektroforeze. Pomembna je za detekcijo biomolekul, kot so polipeptidi, proteini, oligonukleotidi z molekulsko maso 10^5 Da ali več ter tudi anorganske spojine, sintezni polimeri in zdravilne učinkovine.

Poznamo pozitivno ESI, kjer nastanejo kationi ter negativno ESI, kjer nastanejo anioni. Funkcionalna skupina analita namreč določa kakšen ion se bo tvoril. Če je prisotna skupina, ki sprejme proton (npr. amino skupina) bo analit pozitivno nabit ion, če funkcionalna skupina analita raje sprejme proton (npr. karboksilna skupina, fenolna OH skupina, alkoholi v saharidih in oligonukleotidih) se tvori negativno nabit ion.

Raztopina vzorca, ki pride iz HPLC kolone potuje vzdolž ozke igle v ionizacijsko komoro, kjer se pod vplivom nebulizacijskega plina dušika tvorijo kapljice. Na konici igle se generira visoka napetost, kar ustvari močno električno polje, tako da razprševanje vzorca tvori aerosol z nabitimi kapljicami. Zaradi toka vročega sušilnega plina dušika topilo izhlapeva, zmanjšuje se površina kapljic, zaradi česar se poveča gostota električnega polja. To povzroči nestabilnost in posledično odcepljanje ionov od površine kapljic. Po popolni odparitvi topila iz kapljic prehajajo ioni preko kapilare do masnega analizatorja.

Uporabljen masni analizator uporablja tehnologijo Jetstream[®] plina (t.i. Sheath gas), ki ga predstavlja dušik. Na ta način se omeji in usmeri tok kapljic po razpršitvi z nebulizacijskim plinom, posledično več ionov vstopi v masni analizator, kar poveča občutljivost instrumenta, npr. Slika 7.



Slika 7: Shema ESI.

Na ionizacijo lahko vplivajo različni dejavniki. Mobilna faza mora imeti pH, ki zagotavlja ionizacijo molekule analita. Če uporabljamo pufre morajo biti hlapni, sicer lahko pride do tekmovanja za ionizacijo med pufrom in analitom. Do tekmovanja za ionizacijo lahko pride tudi kadar vzorec vsebuje visoke koncentracije soli ali prebitek nekega drugega analita, ki v danih pogojih ionizira.

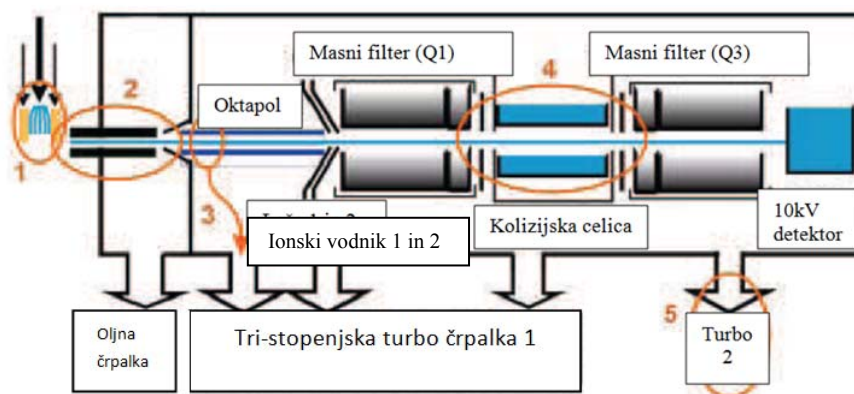
Razvrščanje ionov

Masni analizator predstavlja osrednji del masnega spektrometra. V njem se ioni razvrščajo na osnovi razmerja med maso in nabojem (m/z). Poznamo veliko masnih analizatorjev: kvadrupolni (ang. *Quadrupole*), trojni kvadrupolni masni analizator (ang. *Triple Quadrupole*), analizator z ionsko plastjo (ang. *Ion trap*), na osnovi časa preleta (ang. *Time of flight*), FT-ICR (ang. *Fourier transform-ion cyclotron resonance*), elektrostatsko-magnetni masni analizator.

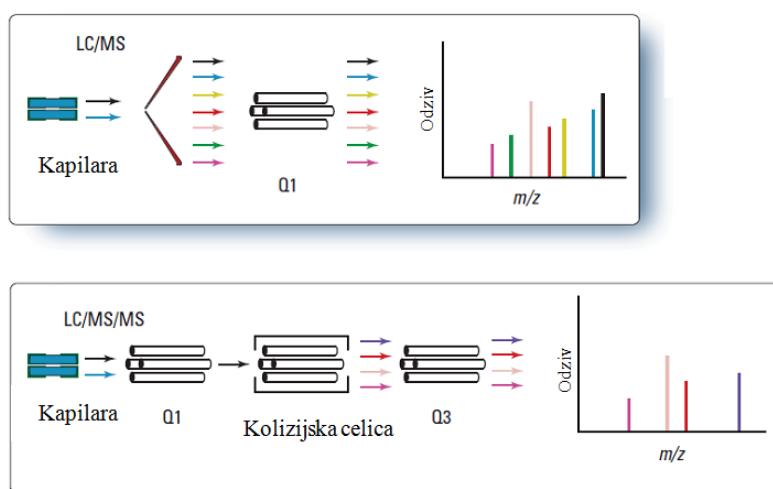
Sklopljeno z LC se najpogosteje uporabljajo naslednji štirje masni analizatorji: kvadrupolni, analizator z ionsko plastjo, na osnovi časa preleta ter FT-ICR (35, 48, 49, 51).

Trojni kvadrupolni masni analizator

Trojni kvadrupolni analizator je zelo široko uporabljan. Omogoča ponovljivo in selektivno kvantitativno analizo spojin v nizkih koncentracijah. Slika 8 prikazuje Agilentov 6460 trojni kvadrupolni masni analizator s ključnimi sestavnimi deli. Najprej v komori poteče ionizacija, sledi kapilara preko katere vzorec vstopi v masni analizator, prvi kvadrupol, kolizijska celica, tretji kvadrupol ter detektor. Kvadrupoli delujejo kot masni filtri, pri potovanju ionov skozi analizator se le-ti selekcionirajo glede na razmerje m/z , pri čemer samo ioni z izbranim m/z razmerjem pridejo skozi kvadrupol. V primerjavi s kvadrupolnim analizatorjem, ki ima zgolj en masni filter pri trojnem kvadrupolnem masnem analizatorju pridobimo na selektivnosti in občutljivosti merjenja, npr. Slika 9.



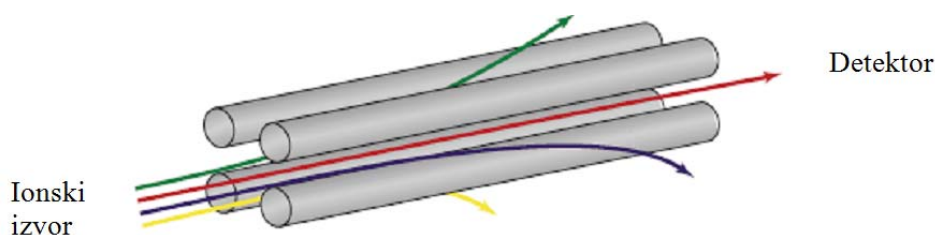
Slika 8: Agilent 6460 trojni kvadrupolni masni analizator.



Slika 9: Shema LC-MS in LC-MS/MS.

Uporabljen masni analizator vsebuje široko kapilaro, ki omogoča prenos ionov iz atmosferskega tlaka v ionizacijski komori v vakuumsko okolje v masnem analizatorju. Da je tok ionov v osrednji del masnega filtra usmerjen in pospešen poskrbijo skimmer, oktapolni predfilter ter dva ionska vodnika (ang. *Lenses 1 in 2*).

Ioni dospejo v prvi masni filter. Sestavljajo ga štiri vzporedne palice izdelane iz nerjaveče zlitine hiperbolične oblike, govorimo o kvadrupolu. Na vseh štirih elektrodah je izmenična napetost, pri čemer sta negativni elektrodi glede na pozitivni elektrodi v zamiku za 180 °, kar ustvarja oscilirajoče električno polje in omogoča potovanje nabitih delcev. Z nastavitvami velikosti električnega potenciala ter frekvence električnega polja dosežemo potovanje izbranih mas ionov. Pri določeni napetosti in frekvenci zgolj ioni izbranih molekulskih mas potujejo iz izvora proti detektorju med štirimi elektrodami (resonančni ioni), medtem ko se ioni ostalih mas (večje oz. manjše m/z) zaletijo v štiripolne palice ali pa odletijo med elektrodami iz štiripola (neresonančni ioni), npr. Slika 10.



Slika 10: Kvadrupolni masni filter.

Sledi postfilter, ki usmerja izbrane ione iz prvega masnega filtra v kolizijsko celico. Kolizijska celica sestoji iz šestih palic in se nahaja v linearni smeri, kar omogoča visoke hitrosti. V njej poteka proces cepitve ionov zaradi trkov (CID ang. *Collision Induced Dissociation*), pri čemer zaradi prisotnosti molekul inertnega, nereaktivnega kolizijskega plina dušika pride do trkov z ioni prisotnimi v kolizijski celici in v odvisnosti od kolizijske energije dobimo MRM prehode s določenim m/z . Ioni imajo namreč translacijsko energijo, ob trku z molekulami plina se le-ta spremeni v molekularne vibracije, kar povzroči fragmentacijo ionov.

Preko pred filtra izbrani ioni nadaljujejo pot do tretjega masnega filtra, ki je po strukturi enak prvemu masnemu filteru. V njem pride do ponovnega filtriranja prepuščenih mas in določitve hčerinskih ionov, ki jih vrednotimo na detektorju.

Da je omogočeno nemoteno potovanje ionov znotraj masnega analizatorja do detektorja je potreben visok vakuum. Vakuum zagotavlja sistem črpalk, kot je prikazano na Sliki 8. Najprej oljna črpalka (ang. *Rough pump*), sledi tri-stopenjska turbo črpalka 1 (ang. *Single 3-stage turbo pump 1*), v področju detektorja je še dodatna turbo črpalka (ang. *Turbo pump 2*), ki omogoča večjo hitrost prenosa ter poveča občutljivost.

Detektor

Visoko energijski dinoda detektor je edinstven pri Agilent instrumentu. Vključuje dve dinodi ter elektronsko pomnoževalko. Dinodi sta nameščeni pravokotno na tok ionov ter nevtrálnih molekul, kar preprečuje verjetnost, da bi nevtralne molekule zadele detektor, medtem ko sočasno privlačita ione z visoko napetostjo. Trčenje ionov s površino prve dinode povzroči izbitje elektronov, ki se pospešeno gibljejo do naslednje dinode, kjer se postopek ponovi. Elektroni so usmerjeni v pomnoževalnik, kjer se njihov tok ojači. Trk ionov na detektor namreč povzroči električni tok, njegova vrednost pove koliko trkov je bilo ob določenem razmerju m/z . Signali so zapisani v analogni obliki kromatograma in jih z računalniškim sistemom spremenimo v digitalno obliko, ki vključuje podatke kot so

retencijski čas (t_R), višina vrhov (h) ter površina vrhov (A). Rezultat je masni spekter, ki prikazuje ione z določenim m/z (48, 49).

Ione lahko merimo v izbranem spektralnem območju (SCAN) ali pri posameznem m/z (SIM). SIM način je občutljivejši v primerjavi s SCAN načinom. Če spremljamo zgolj izbrani prekursorski in hčerinski ion, govorimo o SRM prehodu (ang. *Selected reaction monitoring*). Iz istega prekursorskega iona lahko nastane več hčerinskih ionov. V primeru, ko opazujemo več prehodov hkrati, govorimo o MRM prehodih (ang. *Multiple reaction monitoring*) (48, 49).

2 NAMEN DELA

Bisfenol A je znan hormonski motilec. Zaradi razširjene uporabe predstavlja potencialno nevarnost za številne organizme, tudi za človeka. O njegovi prisotnosti poročajo v površinskih vodah, odpadnih vodah, podtalnici, zraku. Ljudje smo BPA izpostavljeni predvsem preko uživanja kontaminirane hrane in vode, kajti le-ta prehaja iz plastičnih vsebnikov/konzerv. BPA povezujejo s pojavom reproduktivnih motenj, kardiovaskularnih bolezni, rakavih obolenj, itd. Poznavanje vsebnosti BPA v okolju, hrani in vodi je zelo pomembno za oceno potencialnega tveganja za zdravje.

Namen diplomske naloge bo razviti analizno metodo za ugotavljanje vsebnosti BPA v vodi. Razvito metodo bomo uporabili za ugotavljanje vsebnosti BPA v vzorcih negaziranih mineralnih vod iz plastenk.

Razvili in optimizirali bomo metodo SPE, s pomočjo katere bomo analit iz vodnih medijev izolirali ter metodo LC-MS/MS s katero bomo pripravljene vzorce analizirali. Postopek priprave vzorcev bo obsegal tri ključne stopnje. Najprej bomo vodni vzorec nanesti na kolono, adsorbirani BPA pa iz adsorbenta sprali z elucijskim topilom. V nadaljevanju bomo s sušenjem odparili elucijsko topilo. Posušen ostanek pa raztopili v topilu za raztapljanje, ga dobro premešali, kvantitativno prenesli v inserte ter injicirali v LC-MS/MS analitski sistem. V okviru SPE ekstrakcije bomo vzorce skoncentrirali ter očistili sočasno prisotnih interferenc. S LC-MS/MS instrumentom bomo dosegli separacijo sočasno prisotnih komponent vzorca ter detekcijo in kvantifikacijo zelo majhnih koncentracij. Sklopljen sistem bo omogočil večjo specifičnost in občutljivost meritev.

Primernost razvite metode LC-MS/MS bomo najprej preverili z validacijo metode na standardnih raztopinah BPA. Ustreznost ekstrakcijskega postopka ter sledeče LC-MS/MS analize pa z validacijo metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v Mili Q vodi. Vrednotili bomo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, izkoristek ekstrakcije, točnost, ponovljivost ekstrakcije, ionsko supresijo, mejo detekcije in mejo kvantifikacije. Nazadnje bomo analizno metodo preizkusili še na vzorcih negaziranih mineralnih vod, katerih priprava bo potekala po zgoraj opisanem postopku. Na ta način bomo poleg potrditve primernosti vpeljanega analiznega postopka dobili tudi podatke o prisotnosti BPA v različnih vzorcih pitnih vod.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci voda

Analizirali smo osem vzorcev negaziranih mineralnih vod brez okusa ter dva vzorca vod z okusom iz 0,5 L plastičnih vsebnikov različnih proizvajalcev (Vz1-Vz10). Odvzeli smo tudi en vzorec negazirane mineralne vode iz 18,9 L vodomata (Vz11). Analizirali smo še vzorec vode iz vodovodnega omrežja iz vasi Belica pri Polhovem Gradcu (Vz12).

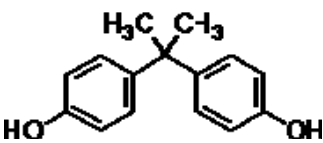
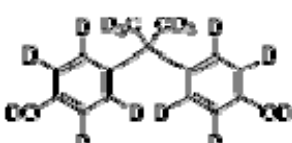
3.1.2 Standard in interni standard

Standard: bisfenol A; stopnja čistosti=97.0 %; Acros Organics, Geel, Belgija (100 g)

Interni standard: bisfenol A d-16 (BPA d-16); Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija (250 mg).

Preglednica 3 prikazuje strukturni formuli, empirični formuli ter molekulski masi (*MM*).

Preglednica 3: Strukturna formula, empirična formula ter molekulska masa.

Ime spojine	BPA	BPA d-16
Strukturna formula		
Empirična formula	$C_{15}H_{16}O_2$	$C_{15}D_{16}O_2$
MM [g/mol]	228,29	244,42

3.1.3 Reagenti in topila

- Mili Q voda (MQ) s specifično upornostjo 18,2 MΩcm; FFA
- Ultračista voda, voda Honeywell za plinsko kromatografijo, HPLC ter spektrometrijo; Burdick & Jackson, USA; *MM*=18,02 g/mol
- Metanol kromatografske čistote, CH₃OH; Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; *MM*=32,04 g/mol
- Metanol LC-MS čistote, CH₃OH; Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; *MM*=32,04 g/mol
- Acetonitril kromatografske čistote, CH₃CN; Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija; *MM*=41,05 g/mol
- Amonijev acetat, CH₃COONH₃; Merck, Darmstadt, Nemčija; *MM*=77,08 g/mol
- Amonijak 25 %, NH₃; Merck, Darmstadt, Nemčija; *MM*=17,03 g/mol
- Stisnjen dušik; Messer, Ruše, Slovenija

3.1.4 Naprave in pribor

- Sistem za pripravo Mili Q vode 30 L; Millipore, Billerica, Massachusetts, ZDA
- Ultrazvočni čistilnik Sonis 4; Iskra, Šentjernej, Slovenija
- Tehnica AG 245; Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
- Hladilnik; LTH, Škofja Loka, Slovenija
- Mešalnik Vibromix 114 EV; Tehnica, Železniki, Slovenija
- pH meter MA 5736; Metrel, Horjul, Slovenija
- Magnetno mešalo; Hanna Instruments, Povoja de Varzim, Portugalska
- Avtomatske pipete 20-200 μL , 100-1000 μL in 1000-5000 μL ; Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Staklovina: čolniček za tehtanje, čaše, merilne bučke, epruvete, polnilne pipete, viala, inserti
- Ostali inventar: nastavki za pipete, epice (1,5 mL), kovinske spatule, Parafilm M, puhalke, plastične kapalke, zamaški za viala, stoparica Hanhart, pribor za filtriranje mobilne faze: stekleni lij, filter papir, filter mrežica, gumijast zamašek, prižema, erlenmajerica, vodna črpalka
- Sistem za SPE ekstrakcijo:
 - Kadička: VisiprepTM Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, ZDA).
 - Oljna vakuumška črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)
 - SPE kolone: Strata-X (Phenomenex, Torrance, California, ZDA), C18-E (Phenomenex, Torrance, California, ZDA), Oasis[®] HLB (Waters, Milford, Massachusetts, ZDA)
 - SUŠILEC: Caliper Turbo Vap LV (Zymark, Portland, Oregon, ZDA)
- Analitski sistem HPLC: Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ZDA)
 - Agilent 1100 Series vključuje razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor (gre za detektor tipa dioda array-DAD ang. *Diode array detector*) ter fluorescenčni detektor.
 - Kromatografska kolona: Luna C₁₈ (2); 50 × 2,0 mm, 3 μm (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)
 - Predkolona: Luna C₁₈ (2); 4 × 3 mm (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)

- Analitski sistem LC/MS-MS: Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream® LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ZDA)
 - o 1290 Infinity LC vključuje razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV- VIS detektor (DAD).
 - o 6460 Triple Quadrupole Jetstream LC/MS vključuje ESI in APCI ionski izvor.
 - o Kromatografska kolona: ZORBAX SB-C18 Rapid Resolution HT Agilent Technologies; $50 \times 2,1$ mm, $1,8 \mu\text{m}$
 - o Prefilter: Krudkatcher Ultra HPLC In-line filter $0,5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)
 - o Program za obdelavo podatkov: MassHunter Workstation software B.03.01

3.2 METODE

3.2.1 Razvoj in optimizacija

3.2.1.1 SPE

Priprava raztopin

Priprava raztopin standardov BPA

Osnovno raztopino standarda BPA s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili tako, da smo natehtali $25,0 \text{ mg}$ BPA, jo kvantitativno prenesli v 25 mL merilno bučko in raztopili v 100% metanolu (metanol) (52). Za pripravo standardne raztopine s koncentracijo $1000 \mu\text{g/L}$ smo v 25 mL bučko odpipetirali $25 \mu\text{L}$ osnovne raztopine in jo redčili z metanolom.

Priprava raztopin standardov BPA za HPLC-FLD

Za razvoj HPLC-FLD metode smo pripravili šest različnih koncentracij standardnih raztopin BPA. Koncentracije od 25 do $500 \mu\text{g/L}$ smo pripravili iz standardne raztopine BPA s koncentracijo $1000 \mu\text{g/L}$, koncentracijo $10 \mu\text{g/L}$ pa iz standardne raztopine s koncentracijo $100 \mu\text{g/L}$, pri čemer smo kot topilo za redčenje uporabili 50% metanol. V vijali smo pripravili 1 mL raztopine. Postopek priprave prikazuje Preglednica 4.

Preglednica 4: Priprava standardnih raztopin BPA za HPLC-FLD.

Koncentracija standardnih raztopin BPA [$\mu\text{g/L}$]	Volumen standardne raztopine BPA [μL]	Volumen 50 % metanola [μL]
500	500	500
250	250	750
100	100	900
50	50	950
25	25	975
10	100	900

Priprava raztopin standardov BPA v MQ

Za razvoj in optimizacijo ekstrakcijskega postopka smo pripravili več raztopin standardov BPA v MQ (St11-St31 ter St34). Pri pripravi smo izhajali iz standardne raztopine BPA s koncentracijo $1000\mu\text{g/L}$, ki smo jo do ustreznega volumna redčili z MQ, kot je prikazano v Preglednici 5. Zgolj raztopino St34 smo pripravili iz standardne raztopine BPA s koncentracijo 1mg/mL . Raztopini St32 in St33 smo pripravili v acetonitril/metanolu (1:1).

Preglednica 5: Priprava standardnih raztopin BPA v MQ.

Oznaka	Volumen standardne raztopine BPA [μL]	Končni volumen raztopin standarda BPA v MQ [mL]	Koncentracija BPA v MQ oz. acetonitril/metanolu [$\mu\text{g/L}$]	Koncentracija BPA v ekstrahiranem vzorcu [$\mu\text{g/L}$]
St11	25	10	2,5	50
St12	50	10	5	100
St13	125	10	12,5	250
St14	250	10	25	500
St21	1250	100	12,5	250
St22	625	500	1,25	250
St23	625	50	12,5	250
St31	1000	10	100	500
St32	1,25	25	50	200
St33	625	25	25	100-500
St34	250	10	2500	500000

Na HPLC-FLD instrumentu smo opazovali odzive ekstrahiranih SPE vzorcev v koncentracijskem območju med 100 in $500\mu\text{g/L}$.

Analizna metoda HPLC-FLDKromatografski pogoji

Kromatografska separacija je potekala na koloni Luna C_{18} (2). Kolona je bila termostatisirana na temperaturo $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avtomatski vzorčevalnik je na kolono apliciral vsakič $10\mu\text{L}$ vzorca. Mobilna faza (MF) se je črpala na kolono po sistemu binarnih črpalk. Uporabili smo metodo izokratskega izpiranja s sestavo 65 % MQ ter 35 % acetonitrila pri

pretoku 0,4 mL/min. Odzive na fluorescenčnem detektorju smo merili pri nastavitvi valovnih dolžin 275 nm za ekscitacijo ter 315 nm za emisijo. UV detektor je meril signale pri nastavitvi valovnih dolžin 210 nm in 275 nm.

Vrednotenje metode

V okviru validacije HPLC-FLD metode na standardnih raztopinah BPA smo vrednotili linearnost, točnost in ponovljivost injiciranja.

Postopek dela

Za razvoj in optimizacijo SPE smo uporabili Strata X kolono. Za izhodišče ekstrakcijskega postopka smo privzeli osnovno shemo, ki jo glede na naravo analita predlaga proizvajalec kolon, npr. Preglednica 6.

Preglednica 6: Osnovna shema SPE.

Korak	Reagent
Kondicioniranje	Metanol
Ekvilibracija	Voda
Nanos vzorca	Vzorec
Spiranje	5-60 % metanol
Sušenje	1 min
Elucija	acetonitril/metanol (1:1)

Preverili smo izkoristek ekstrakcije v odvisnosti od nanosa različnih koncentracij in različnih volumnov raztopin standardov BPA v MQ. Preverili smo, če je kapaciteta kolone presežena ob nanosu koncentracije 2 mg/L. Izbrali smo topilo za spiranje ter določili volumen in način nanosa elucijskega topila. Poiskali smo najbolj optimalno temperaturo sušenja eluata ter proučevali vpliv različnih volumnov topila za raztapljanje na izkoristek ekstrakcije. Optimiziran SPE postopek smo v nadaljevanju preizkusili še na dveh drugih nosilcih.

3.2.1.2 LC-MS/MS

Priprava raztopin

Priprava raztopine internega standarda (IS)

Osnovno raztopino IS s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili tako, da smo natehtali 10,0 mg BPA d-16, ga kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko in raztopili v metanolu.

Raztopino s koncentracijo 1 mg/L smo pripravili v 10 mL bučki, pri čemer smo potrebovali 10 µL osnovne raztopine IS ter redčili z metanolom.

*Raztopino standarda BPA (poglavje 3.2.1.1) in raztopino IS (poglavje 3.2.1.2) smo uporabili za pripravo standardnih raztopin nižjih koncentracij. Vse pripravljene raztopine smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Priprava raztopine BPA in IS za LC-MS/MS

Za pripravo 1 mL standardne raztopine BPA s koncentracijo 1 mg/L smo v vijalo odpipetirali 0,5 mL raztopine BPA s koncentracijo 2 mg/L (pripravljena iz standarda BPA s koncentracijo 1 mg/mL, glej poglavje 3.2.1.1) ter 0,5 mL metanola. Na enak način smo pripravili tudi raztopino IS s koncentracijo, pri čemer smo izhajali iz raztopine BPA d-16 s koncentracijo 2 mg/L (pripravljena iz BPA d-16 s koncentracijo 1 mg/mL, poglavje 3.2.1.2.). Za pripravo raztopine, ki je vsebovala standard BPA in IS v koncentraciji 1 mg/L smo potrebovali 0,5 mL raztopine BPA s koncentracijo 2 mg/L ter 0,5 mL raztopine BPA d-16 enake koncentracije.

Priprava 2 mM raztopine amonijevega acetata

V 0,5 L MQ smo raztopili 77,5 mg amonijevega acetata. Pripravljeno raztopino smo naalkalili z 1 % raztopino amonijaka na pH vrednost 6,80, jo filtrirali ter razplinili v ultrazvočni kadički.

Optimizacija parametrov LC-MS/MS

MS/MS

Pripravljene raztopine standardov BPA in IS smo analizirali pod pogoji izokratske elucije, pri čemer je MF A predstavljal 2 mM amonijev acetat s 20 % deležem, MF B pa acetonitril s 80 % deležem. Izbrali smo ESI ionski izvor v negativnem stanju.

Optimizacija je potekala v treh ključnih korakih, pri čemer smo nekatere parametre določili brez kolone (direktno dovajanje vzorcev v MS del), druge pa smo optimizirali s pomočjo kolone. Pri analizi brez kolone smo za BPA in BPA d-16 določili naslednje parametre: MRM prehode, vrednost fragmentorja in kolizijske energije, najbolj optimalno temperaturo sušilnega plina, temperaturo pretoka Jetstream® plina, napetost na kapilari ter nozzle voltage®. Z analizo s kolono pa naslednje parametre: pretok nebulizacijskega plina, pretok

sušilnega plina, pretok Jetstream[®] plina, širina masne ločljivosti na prvem in tretjem kvadrupolu in razdelilni čas (ang. *Dwell time*).

LC

Metodo tekočinske kromatografije smo razvili s pomočjo standardne raztopine BPA s koncentracijo 1 mg/L. Pri izbrani kromatografski koloni smo določili najustreznejšo sestavo mobilne faze, določili pretok mobilne faze, gradientni program in temperaturo kolone.

3.2.2 Optimizirana analizna metoda

3.2.2.1 SPE

Vzorci za LC-MS/MS analizo smo pripravili po postopku ekstrakcije na trdnem nosilcu, ki je podrobneje predstavljen v Preglednici 7.

Optimizirana SPE metoda je vključevala uporabo Strata X kolon. Ekstrahirali smo 200 mL vzorce. Sočasno smo analizirali štiri vzorce, vsakega na svoji koloni (Slika 11). Na vsako posamezno kolono smo nanесли štiri 200 mL vzorce, nato pa smo kolono zamenjali.

Postopek ekstrakcije se je pričel s nanosom metanola. Novo, še neuporabljeno kolono smo omočili z 20 mL metanola, medtem ko smo na že uporabljeno kolono nanесли zgolj 2 mL metanola. Sledil je nanos topila za ekvilibracijo, ki ga je predstavljala MQ. 200 mL vzorec smo na kolono nanесли preko 60 mL brizge. Zadosten pretok vzorca preko kolone smo dosegli s podtlakom, ki ga je ustvarila oljna vakuumaska črpalka. Za spiranje smo uporabili 15 % metanol. Kolono smo pred nanosom elucijskega topila dobro posušili. Pred elucijo smo topilo pustili na nosilcu učinkovati eno minuto.

Eluirane frakcije smo zbirali v epruveto in jih v nadaljevanju posušili s prepihanjem z dušikom pri temperaturi 45 °C. Posušene ekstrahirane vzorce smo raztopili v 200 µL topila za raztapljanje, jih 90 sekund mešali na mešalniku Vibromix ter kvantitativno prenesli v 200 µL inserte v vialo.

Preglednica 7: Potek SPE.

Korak	Reagent	Volumen nanosa [mL]	Pretok [mL/min]	Čas sušenja, podtlak
NOVA KOLONA- spiranje in kondicioniranje	metanol	20	4,4	0 mmHg
UPORABLJENA KOLONA- kondicioniranje	metanol	2	4	0 mmHg
Ekvilibracija	MQ	2	4	0 mmHg
Nanos vzorca	vzorec	200	3	Spreminjanje vrednosti podtlaka (0-125 mmHg)
Spiranje	15 % metanol	2	3	Spreminjanje vrednosti podtlaka (0-63,5 mmHg)
Sušenje kolone	/	/	/	3,5 min pri 254 mmHg
Nanos elucijskega topila	acetonitril/ metanol (1:1)	2	/	/
Delovanje elucijskega topila	/	/	/	1 min pri atmosferskem tlaku
Elucija	/	/	3	Spreminjanje vrednosti podtlaka (0-63,5 mmHg)
Sušenje kolone	/	/	/	3,5 min pri 127 mmHg



Slika 11: Prikaz nanosa vzorca na SPE kolone.

3.2.2.2 LC-MS/MS

Metoda MS/MS

Za analizo in detekcijo smo uporabili masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Kot vir ionizacije smo uporabili negativni ESI.

Nastavitve masnega analizatorja so podane v Preglednici 8.

Preglednica 8: Nastavitve masnega analizatorja

Sušilni plin	275 °C, 10 L/min
Nebulizacijski plin	30 psi
Jetstream® plin	320 °C, 11 L/min
Napetost na kapilari	4000 V
Nozzle voltage®	1000 V
EMV	300 V
BPA: MRM prehod, Kolizijska energija (CE), Fragmentor (FR)	<u>227,1-212</u> ; CE: 12 mV, FR: 130 227,1-133; CE: 20 mV, FR: 130
BPA d-16: MRM prehod, Kolizijska energija (CE), Fragmentor (FR)	<u>241,2-223</u> ; CE: 12 mV; FR: 130 241,2-142,1; CE: 20 mV; FR: 130
Širina masne ločljivosti na prvem kvadrupolu	ang. <i>widest</i>
Širina masne ločljivosti na tretjem kvadrupolu	ang. <i>wide</i>
Razdelilni čas (ang. <i>Dwell time</i>)	50 ms

* Podčrtana MRM prehoda služita za kvantitativno določevanje BPA in BPA d-16.

Metoda LC

LC metodo smo izvajali na koloni ZORBAX SB-C18 Rapid Resolution HT s predfiltrom, ki je namenjen UHPLC analizam. Kolona je bila temostatirana na temperaturo 50 °C. Pred injiciranjem vsakega vzorca smo vedno injicirali 20 µL ultračiste vode. Avtomatski vzorčevalnik je na kolono apliciral 5 µL vzorca. Metoda je vključevala spiranje igle 10 sekund s topilom mešane sestave in sicer: 50 % izopropanol, 25 % acetonitril, 15 % cikloheksan, 10% diklorometan. Mobilno fazo smo prečrpavali na kolono iz dveh rezervoarjev po sistemu binarnih črpalk. MF A je predstavljala ultračista voda, ki je bila prehodno razplinjena v ultrazvočni kadički. MF B je predstavljal metanol LC-MS čistote. Izvajanje analize je temeljilo na metodi gradientnega izpiranja po shemi:

- 0 - 3 min pri hitrosti pretoka 0,3 mL/min: 50 - 90 % MF B
- 3,1 - 3,5 min pri hitrosti pretoka 0,5 mL/min: 50 % MF B

Čas reekvilibracije je znašal 0,2 minute, celoten čas analize pa je bil 3,7 minute.

3.2.3 Validacija metode LC-MS/MS

3.2.3.1 Validacija na standardnih raztopinah BPA

Priprava raztopin

Priprava raztopin standardov BPA

Za pripravo 25 mL raztopine standarda BPA s koncentracijo 50 µg/L smo potrebovali 1,25 mL raztopine BPA s koncentracijo 1000 µg/L (poglavje 3.2.1.1), ki smo jo raztopili v metanolu. Standardno raztopino BPA s koncentracijo 20 µg/L smo pripravili iz 2 mL raztopine BPA koncentracije 1000 µg/L, ki smo jo do 100 mL redčili z metanolom.

Priprava standardnih raztopin BPA za validacijo metode

Za validacijo metode na standardnih raztopinah BPA smo pripravili devet različnih koncentracij standardnih raztopin ter dva slepa vzorca, kot je prikazano v Preglednici 9. Za pripravo koncentracij 500, 200, 100 in 50 µg/L smo uporabili standardno raztopino koncentracije 1000 µg/L. Nižje koncentracije, in sicer 25, 10, 5, 2 in 1 µg/L, pa smo pripravili iz raztopine standarda BPA s koncentracijo 50 µg/L. V vsako raztopino smo dodali tudi IS s koncentracijo 50 µg/L, pri čemer smo izhajali iz raztopine IS s koncentracijo 1000 µg/L (poglavje 3.2.1.2).

Preglednica 9: Priprava standardnih raztopin BPA in slepih vzorcev.

Koncentracija validacijskih standardnih raztopin BPA [µg/L]	Volumen standardne raztopine BPA [µL]	Volumen raztopine IS s 1000 µg/L [µL]	Volumen 100 % metanola [µL]
500	500	50	450
200	200	50	750
100	100	50	850
50	50	50	900
25	500	50	450
10	200	50	750
5	100	50	850
2	40	50	910
1	20	50	930
IS	/	50	950
MeOH	/	/	1000

Slepa vzorca (IS ter MeOH) nista vsebovala dodatka standardne raztopine BPA. V vijali smo pripravili 1 mL raztopine, kot topilo za redčenje smo uporabili metanol. Standardne raztopine BPA s koncentracijo 5, 50, 500 µg/L so služili tudi kot QC vzorci.

Postopek dela

Validacijo metode LC-MS/MS na standardnih raztopinah BPA smo izvedli v treh dneh. Pripravili smo devet različnih koncentracij standardnih raztopin BPA na koncentracijskem nivoju od 1 do 500 µg/L ter dva slepa vzorca, kot je predstavljeno v poglavju 3.2.3.1. Po analizi slepih vzorcev smo analizirali še pripravljene standardne raztopine BPA od najnižje proti najvišji koncentraciji. Standardne raztopine s koncentracijo 5, 50 in 500 µg/L smo šestkrat injicirali, ostale pripravljene raztopine pa trikrat. Raztopine BPA s koncentracijami 5, 50 in 500 µg/L smo izbrali za meddnevno vrednotenje točnosti in ponovljivosti ter smo jih ponovno analizirali drugi in tretji dan, pri čemer smo vsak vzorec trikrat injicirali (n-število injiciranj). V okviru validacijskih parametrov smo vrednotili selektivnost, linearnost, območje linearnosti, točnost, ponovljivost injiciranja, meddnevno ponovljivost, stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku ter mejo detekcije in mejo kvantifikacije.

3.2.3.2 Validacija na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ

Priprava raztopin

Priprava raztopin standardov BPA v MQ

Za validacijo metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA smo pripravili 200 mL vzorce devetih različnih koncentracij BPA v MQ v koncentracijskem območju med 1 in 500 ng/L. Raztopine smo pripravili iz standardne raztopine BPA s koncentracijo 20 µg/L, pri čemer smo kot topilo za redčenje uporabili MQ. Pripravo raztopin standardov BPA v MQ prikazuje Preglednica 10.

Preglednica 10: Priprava raztopin standardov BPA v MQ.

Koncentracija BPA v MQ [ng/L]	Volumen standardne raztopine BPA s 20 µg/L [µL]
500	5000
200	2000
100	1000
50	500
25	250
10	100
5	50
2	20
1	10

Priprava topil za SPE

V postopku ekstrakcije smo uporabili štiri topila in sicer metanol, MQ, 15 % metanol in acetonitril/metanol v razmerju 1:1. Za pripravo 200 mL 15 % metanola smo potrebovali 30 mL metanola ter 170 mL MQ. 200 mL elucijskega topila smo pripravili iz 100 mL acetonitrila in 100 mL metanola.

Priprava topila za raztapljanje

Posušene ekstrahirane vzorce smo raztopili v topilu, ki je vsebovalo IS s koncentracijo 50 µg/L v metanolu. Za pripravo 50 mL raztopine smo uporabili 2,5 mL raztopine IS s koncentracijo 1 mg/L, ki smo ga raztopili v metanolu.

Priprava raztopin za preverjanje ionske supresije

Za vrednotenje ionske supresije smo pripravili dve raztopini, pri čemer je prva raztopina vsebovala BPA s koncentracijo 50 µg/L ter BPA d-16 s koncentracijo 50 µg/L, druga pa BPA s koncentracijo 500 µg/L ter BPA d-16 s koncentracijo 50 µg/L. Za pripravo 5 mL prve raztopine smo potrebovali 250 µL standardne raztopine BPA s koncentracijo 1 mg/L in enak volumen IS enake koncentracije, ki smo ju v bučki redčili z metanolom. Drugo raztopino pa smo pripravili tako, da smo v 5 mL bučko dodali 2,5 mL BPA s koncentracijo 1 mg/L, 250 µL BPA d-16 s koncentracijo 1 mg/L ter do oznake dopolnili z metanolom.

Postopek dela

Raztopine standardov BPA v MQ, reagente za SPE ter topilo za raztapljanje smo pripravili po postopku, ki je podrobno opisan v poglavju 3.2.3.2. Vzorce za LC-MS/MS analizo smo pripravljali pet dni, pri čemer smo postopali po postopku, ki je prikazan v poglavju 3.2.2.1. Prve tri dni smo pripravili ekstrahirane vzorce pri vseh devetih koncentracijskih točkah, četrty in peti dan pa še vzorce, s katerimi smo vrednotili meddnevno ponovljivost in točnost.

Za pripravo ekstrahiranih vzorcev standardov BPA v MQ devetih različnih koncentracij smo potrebovali tri sete SPE kolon. Vsak set kolon je vseboval štiri kolone. Vsako koncentracijo smo pripravili v štirih paralelkah sočasno. Na vsako novo kolono smo najprej nanесли 200 mL vzorec MQ (t.i. slepi vzorec), nato pa še tri koncentracije standardnov BPA v MQ. Tako smo na prvi set kolon nanесли standardne raztopine s koncentracijo 1, 2 in 5 ng/L, na drugi set koncentracije 10, 25 in 50 ng/L in na tretji set koncentracije 100, 200 in 500 ng/L.

Četrty dan smo iz sistema za pripravo MQ na novo odvzeli MQ, pripravili topila ter nov set štirih SPE kolon s pomočjo katerih smo pripravili vzorce za vrednotenje meddnevne ponovljivosti. Pripravili smo raztopine standardov BPA s koncentracijami 5, 50 in 500 ng/L vsako v dveh paralelkah. Peti dan smo ponovno pripravili SPE vzorce in sicer po dve paralelki vsake od treh koncentracij.

Eluirane frakcije smo posušili vsak dan, sočasno s prepihavanjem v toku dušika pri 45 °C in jih končno pripravljene analizirali z LC-MS/MS. Najprej smo analizirali slepe vzorce, nato pa še standardne vzorce od najnižje proti najvišji koncentraciji, pri čemer smo vsako paralelko trikrat injicirali.

V okviru validacijskih parametrov smo vrednotili selektivnost, linearnost, območje linearnosti, točnost, ponovljivost ekstrakcije, meja kvantifikacije oz. mejo detekcije. Izračunali smo izkoristek ekstrakcije in prisotnost ionske supresije.

3.2.4 Vrednotenje metode

Validacija je zaključek razvoja analizne metode, s katero potrdimo primernost in zanesljivost metode za predvideno analitsko uporabo. Pri vrednotenju metode smo uporabili ICH smernico Q2 (R1) ter FDA smernico. Proučevali smo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, območje linearnosti, točnost, ponovljivost, mejo detekcije, mejo kvantifikacije, robustnost, učinek matriksa ter izkoristek ekstrakcije. V okviru robustnosti smo spremljali stabilnost (37, 53, 54).

3.2.4.1 Selektivnost

Selektivnost je sposobnost analizne metode, da loči in kvantificira analit od ostalih komponent v vzorcu. Metoda je selektivna, kadar se kromatografski vrhovi na kromatogramu analiziranih komponent vzorca jasno ločeni, oz. se ne prekrivajo in med komponentami ne prihaja do interferenc. Da bi potrdili selektivnost, smo analizirali topilo za pripravo topila za raztapljanje (metanol), topilo za raztapljanje (raztopino IS v metanolu) ter raztopino standarda BPA.

Selektivnost smo ovrednotili tudi kvantitativno. Vsebnost BPA pri treh različnih koncentracijah skozi celotno koncentracijsko območje smo vrednotili pri dveh MRM prehodih (227,1-212 in 227,1-133), pri čemer MRM prehod 227,1-212 služi za kvantitativno vrednotenje BPA. Na osnovi rezultatov za odziv smo izračunali razmerje

med njima, rezultat pa podali kot povprečno vrednost in relativni standardni odklon (RSD). Kot kriterij za selektivnost metode smo si postavili mejo $RSD \leq 5\%$.

3.2.4.2 Linearnost

Metoda je linearna, če sta koncentracija preiskovane snovi v vzorcu in njen odziv linearno povezana. Linearnost razmerja med obema spremenljivkama preverimo s pomočjo regresijske premice, ki je dobljena na osnovi metode najmanjših kvadratov. Rezultat regresijske analize eksperimentalnih podatkov je umeritvena premica z enačbo

$$y = bx + a, \quad (1)$$

pri čemer je y odziv (površina ali višina kromatografskih vrhov), a odsek na ordinati in b naklon premice. V primeru uporabe internega standarda y podamo kot razmerje odzivov med analitom in IS. Korelacijo med odzivom in koncentracijo podajamo s Pearsonovim koeficientom R oz. determinacijskim koeficientom R^2 , ki ima pri popolni linearni povezavi vrednost 1. Za ugotavljanje linearnost ICH smernica priporoča najmanj pet koncentracij, FDA smernica pa pet do osem koncentracij.

Pri validaciji metode HPLC-FLD na standardnih raztopinah BPA smo preverjali linearno odvisnost površine od koncentracije BPA.

Pri validaciji metode LC-MS/MS smo linearnost razmerja površin kromatografskih vrhov standarda in internega standarda (kar označujemo s pojmom »vsebnost BPA«) v odvisnosti od koncentracije standarda BPA preverjali pri devetih različnih koncentracijah. Pri validaciji metode na standardnih raztopinah BPA je koncentracijsko območje obsegalo koncentracije od 1 do 500 $\mu\text{g/L}$. Pri validaciji metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ pa koncentracije od 1 do 500 ng/L . »Vsebnost BPA« smo izračunali na podlagi izmerjenih odzivov MRM prehodov za kvantifikacijo standarda (227,1-212) in IS (241,2-223) in ga označujemo tudi kot razmerje BPA/IS.

Po metodi najmanjših kvadratov smo na podlagi površin oz. povprečnih vrednosti »vsebnosti BPA« dobili enačbo umeritvene premice in izračunali vrednost R^2 . Za mejo, ki še zagotavlja ustrezno linearnost, smo izbrali vrednost $R^2 \geq 0,99$.

3.2.4.3 Območje linearnosti

Območje linearnosti analizne metode je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo, v katerem predpisana metoda ustreza pogojem linearnosti, točnosti in natančnosti. V našem primeru smo vrednotili linearnost analizne metode v koncentracijskem območju od 1 do

500 µg/L pri validaciji metode na standardnih raztopinah BPA, oz. od 1 do 500 ng/L pri validaciji metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ.

3.2.4.4 Točnost

Točnost pomeni ujemanje izmerjenih rezultatov z deklariranimi vrednostmi. Iz enačbe umeritvene premice analizirane spojine izračunamo koncentracijo, ki ustreza izmerjenemu odzivu (površini ali višini). Točnost največkrat podamo v obliki relativne napake, pri čemer upoštevamo razliko med znano količino analizirane spojine in količino izračunano iz umeritvene premice. Smernica Q2 (R1) priporoča oceno točnosti pri treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo specificirano območje, rezultat pa predstavimo v obliki relativne napake.

Na podlagi rezultatov za »vsebnost BPA« smo s pomočjo enačbe umeritvene premice izračunali pripadajočo koncentracijo. Točnost smo podali absolutno, pri čemer smo pri izračunu uporabili enačbo

$$\text{točnost [\%]} = (C_i / C_d) \cdot 100, \quad (2)$$

pri čemer je C_i deklarirana koncentracija in C_d izračunana koncentracija. Vrednotili smo točnosti skozi celotno koncentracijsko območje ter meddnevno točnost. Pri validaciji na standardnih raztopinah BPA smo kot zadovoljivo točnost injiciranja določili mejo 100 ± 5 %. Pri validaciji na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ smo za točnost ekstrakcije uporabili kriterij 100 ± 15 %.

3.2.4.5 Ponovljivost

Stopnjo ponovljivosti injiciranja predstavlja skladanje med posameznimi odzivi pri večkratni ponovitvi analize istega vzorca. Stopnja ponovljivosti metode je definirana kot stopnja skladanja med posameznimi odzivi pri večkratni pripravi enakih vzorcev. Ponovljivost smo vrednotili znotraj dneva ter med dnevi.

Merilo za ponovljivost predstavlja standardni odklon SD in relativni standardni odklon RSD

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 = \frac{1}{100} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (4)$$

pri čemer je x_i odziv (višina ali površina), $\bar{x}$ povprečna vrednost odziva in n število meritev. ICH smernica priporoča oceno ponovljivosti pri treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo specificirano območje, ali pri izbrani koncentraciji, kjer naredimo najmanj šest ponovitev.

V okviru diplomske naloge smo ponovljivost injiciranja preverili tako, da smo pripravljene standardne raztopine večkrat injicirali ter izračunali relativni standardni odklon. Kot kriterij za ponovljivost injiciranja in meddnevno ponovljivost pri validaciji metode na standardnih raztopinah smo izbrali $RSD \leq 5\%$. V okviru validacije na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ smo vrednotili ponovljivost ekstrakcije. Sočasno smo pripravili več paralelk vsake od koncentracij znotraj koncentracijskega območja in rezultat podali v obliki RSD, pri čemer smo upoštevali kriterij $RSD \leq 15\%$.

3.2.4.6 Meja detekcije in meja kvantifikacije

Meja detekcije (LOD ang. *Limit of detection*) je najnižja koncentracija preučevane spojine v vzorcu, ki jo lahko zanesljivo zaznamo ločeno od ozadja, a jo običajno ne moremo kvantitativno ovrednotiti.

Meja kvantifikacije (LOQ ang. *Limit of quantification*) je definirana kot najmanjša koncentracija analita v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno ovrednotimo s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo.

Mejo kvantifikacije smo praktično določili na osnovi rezultatov linearnosti, točnosti in natančnosti vzorcev standardov znanih koncentracij. Mejo detekcije in mejo kvantifikacije smo tudi izračunali, v skladu z ICH smernico, upoštevajoč razmerje signal/šum. Koncentracija, pri kateri je razmerje signal/šum vsaj 10, predstavlja mejo kvantifikacije, medtem ko mora biti razmerje signal/šum pri meji detekcije vsaj 3.

Razmerje signal/šum smo v našem primeru določili s pomočjo programske opreme MassHunter, pri čemer smo uporabili metodo »peak to peak« na osnovi višine kromatografskih vrhov.

3.2.4.7 Robustnost

Metoda je robustna kadar daje ponovljive rezultate, če iste vzorce izpostavimo različnim pogojem analize. Različne pogoje lahko predstavljajo sprememba sestave mobilne faze, pH mobilne faze, hitrosti pretoka, zamenjava kolone, sprememba temperature kolone, pa tudi stabilnost raztopin ter čas ekstrakcije.

V našem primeru večjih sprememb tekom analiznega postopka nismo izvedli. Preverjali smo stabilnost pripravljene standardne raztopine analita v avtomatskem vzorčevalniku skladno z FDA smernico, pri treh koncentracijah v intervalu treh dni. Kot kriterij ustreznosti smo opredelili odstopanje v območju 100 ± 5 %, pri čemer smo kot 100 % stabilnost povzeli vrednost povprečne »vsebnosti BPA« prvega dne.

3.2.4.8 Uspešnost ekstrakcije

Literatura kot kriterij za točnost metode navaja uspešnost ekstrakcije (ang. *recovery*), ki je odvisna od sestave in priprave vzorca ter koncentracije analita. Pri validaciji metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ smo uspešnost ekstrakcije podali v obliki izkoristka ekstrakcije. Izračunali smo ga na osnovi primerjave povprečne »vsebnosti BPA« ekstrahiranega vzorca BPA s povprečno »vsebnostjo BPA« neekstrahiranega vzorca standarda enake koncentracije. FDA smernica priporoča določanje izkoristka pri treh koncentracijah čez celotno koncentracijsko območje, pri čemer dodajajo da izkoristek ni nujno 100 %, rezultati pa morajo biti konsistentni, natančni in ponovljivi.

V okviru diplomske naloge smo izračunali izkoristek ekstrakcije pri vseh koncentracijskih točkah, pri čemer smo si kot kriterij za ponovljivost ekstrakcije postavili mejo $RSD \leq 15$ %.

3.2.4.9 Učinek matriksa

Pri validaciji metode LC-MS/MS na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ smo vrednotili tudi učinek matriksa, natančneje prisotnost ionske supresije. Morebitno sočasno prisotne komponente v vzorcu, ki predstavljajo matriks, lahko vplivajo na določevanje izbranega analita. Ekstrahiranemu slepemu vzorcu (MQ brez dodatka BPA) smo dodali standardno raztopino BPA v topilu za raztapljanje. Izračunano »vsebnost BPA« pa primerjali z »vsebnostjo BPA« standardne raztopine BPA v topilu za raztapljanje. Uporabili smo kriterij, ki znaša 100 ± 5 %.

3.2.5 LC-MS/MS analiza vzorcev pitnih vod

Vsebnost BPA smo določali v negaziranih mineralnih vodah iz plastičnih vsebnikov ter vodi iz vodovodnega omrežja. V analizo smo vključili deset ustekleničenih vod iz 0,5 L plastenk (brez okusa (Vz1-Vz8) in z okusom (Vz9,Vz10)), vzorec vode iz 18,9 L vodomata (Vz11) ter vzorec vode iz vodovodnega omrežja (Vz12). Slednja smo od mesta odvzema pa do laboratorija shranjevali v steklenem vsebniku.

Priprava in analiza vzorcev je potekala na enak način kot v primeru validacije metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ, kot je podrobneje predstavljeno v poglavju 3.2.2. Za pripravo vzorcev pitnih vod smo potrebovali tri sete SPE kolon. Po pripravi treh 200 mL vzorcev smo kolono zamenjali. Vsak vzorec smo pripravili v dveh paralelkah. Vsak pripravljen vzorec smo trikrat injicirali na LC-MS/MS.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA

S postopnim spreminjanjem posameznega parametra ekstrakcijskega postopka in parametrov sklopljenega sistema za separacijo in detekcijo smo poskušali razviti in optimizirati metodo SPE ter metodo LC-MS/MS. Z optimizirano analizno metodo smo v nadaljevanju analizirali različne vzorce pitnih vod.

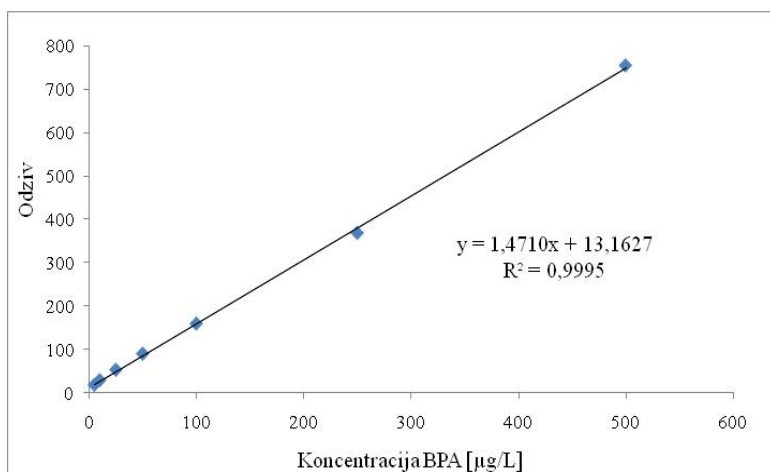
Za vrednotenje ekstrakcijskega postopka je potrebno imeti razvito primerno analizno metodo. V začetni fazi eksperimentalnega dela diplomske naloge smo imeli težave pri razvoju metode LC-MS/MS na standardnih raztopinah BPA z LC-MS/MS instrumentom Varian 1200L, na nov LC-MS/MS instrument Agilent serije 6460 pa je bilo potrebno počakati še nekaj mesecev. Poleg LC-MS obstajajo tudi druge analizne metode za določanje BPA, kot npr. HPLC-FLD in HPLC-ECD, ki pa niso tako občutljive (16). Posledično smo si pri razvoju SPE pomagali tudi s HPLC instrumentom s fluorescenčnim detektorjem. Razvili smo metodo HPLC-FLD, pri čemer smo večino ekstrakcijskih parametrov določili na osnovi te metode. Metoda je bila za optimizacijo SPE parametrov primerna, saj smo opazovali višje koncentracije BPA. Končno potrditev ustreznosti metode ekstrakcije za določevanje vsebnosti BPA je potekala na instrumentu Agilent serije 6460.

4.1.1 SPE

4.1.1.1 Validacija metode HPLC-FLD

Metodo HPLC-FLD za določanje vsebnosti BPA smo vrednotili s pomočjo standardnih raztopin v koncentracijskem območju med 10 in 500 µg/L (poglavje 3.2.1.1). Linearnost, točnost in ponovljivost smo izračunali skladno s postopkom opisanim v poglavju 3.2.4.

Metoda HPLC-FLD je linearna (Slika 12), točna in ponovljiva (Preglednica 11) v celotnem koncentracijskem območju, saj je zadoščeno postavljenemu kriteriju linearnosti $R^2 \geq 0,99$ ter kriteriju točnosti ($\leq 100 \pm 5 \%$) in ponovljivosti ($RSD \leq 5 \%$).



Slika 12: Odvisnost odziva od koncentracije BPA.

Preglednica 11: HPLC-FLD analiza standardnih raztopin BPA.

Deklarirana koncentracija BPA [µg/L]	Odziv (n=3)	Izračunana koncentracija BPA [µg/L]	Točnost [%]	Ponovljivost RSD [%]
10	29,1	10,43	104,3	2,72
25	51,4	25,73	102,9	3,34
50	89,2	51,65	103,3	1,19
100	159,9	100,13	100,1	1,01
250	368,7	243,32	97,3	0,49
500	747,3	502,96	100,6	0,17

Razvita metoda HPLC-FLD je primerna za optimizacijo parametrov ekstrakcijskega postopka. Odziv pri koncentraciji BPA 500 µg/L je bil še v območju linearnosti, medtem ko se je pri koncentraciji 1000 µg/L izrazito zmanjšal. Pri nanosu še večjih koncentracij pa se je namesto kromatografskega vrha v obliki Gaussove krivulje pojavil vrh z obliko platoja.

Metodo LC-MS/MS odlikuje večja selektivnost in občutljivost v primerjavi s HPLC-FLD, saj analiziramo zgolj komponente vzorca s izbrano molekulsko maso. Analizno metodo HPLC-FLD lahko motijo tudi druge sočasno prisotne komponente v vzorcu, kar lahko posledično otežuje določanje BPA v nižjem koncentracijskem območju (5-25 µg/L). Zato smo na detektorju spremljali odzive ekstrahiranih koncentriranih vzorcev v koncentracijskem območju 50-500 µg/L.

Pri uporabi HPLC-FLD je bolj problematična tudi izbira IS. Devteriranega standarda namreč ne moremo izbrati. Kromatografsko se BPA in devteriran analog BPA ne ločita. Kot IS bi nam služil predstavnik skupine alkilfenolov, npr. nonilfenol, kot je navedeno v literaturi (16). V nadaljevanju se je pokazalo, da smo visoke izkoristke ekstrakcije dosegli

že z dobrim manualnim delom, posledično IS nismo uporabili. Da smo eliminirali meddnevna nihanja v odzivnosti instrumenta, smo iz standardne raztopine BPA s koncentracijo 1000 µg/L vsak dan posebej pripravili standardne raztopine nižjih koncentracij, jih analizirali in uporabili pri izračunu izkoristka ekstrakcije.

Kot vodo smo v vseh primerih uporabili MQ, saj se le-ta v vsakdanji praksi najpogosteje uporablja. Zavedali smo se problematike kontaminacije BPA v MQ, vendar s metodo HPLC-FLD vsebnosti BPA nismo mogli kvantitativno ovrednotiti.

4.1.1.2 OPTIMIZIRANI PARAMETRI SPE POSTOPKA

Za izvedbo ekstrakcije je ključna razpoložljiva oprema ter izkušnost raziskovalca. Namen optimizacije ekstrakcijskega postopka je bilo doseči čim večji izkoristek in dobro ponovljivost ekstrakcije BPA iz vodne matrike, pri čim krajšem času analize. V nadaljevanju so predstavljeni rezultati optimizacije.

Izbira vakuumske črpalke

Za ustvarjanje podtlaka v SPE kadički smo uporabili oljno črpalko. Izkazalo se je, da je vodna črpalka manj primerna, saj je podtlak odvisen od pretoka v vodovodnem omrežju. V omenjenem primeru je zaradi vpliva številnih dejavnikov težje zagotoviti ponovljivost. Hkrati pa bi z uporabo vodne črpalke porabili tudi velike količine vode, saj je postopek ekstrakcije dolgotrajen.

Vpliv koncentracije vzorca na izkoristek ekstrakcije

V okviru validacije LC-MS/MS metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ smo preverjali vpliv koncentracije standardov BPA v MQ na izkoristek ekstrakcije. Uporabili smo raztopine St11-St14, katerih priprava je prikazana v poglavju 3.2.1.1. Iz Preglednice 12 je razvidno, da so izkoristki visoki in ponovljivi pri vseh štirih proučevanih koncentracijah.

Preglednica 12: Nanos različnih koncentracij standarda BPA v MQ.

Koncentracija standarda BPA v MQ [µg/L]	Izkoristek ekstrakcije [%] (n=3)	Število analiziranih vzorcev
50	97,1	3
100	95,7	1
250	98,9	1
500	104,8	1

Preverjanje kapacitete kolone

Na kolono Strata X smo nanesti visoko koncentracijo raztopine standarda BPA v MQ. Zanimalo nas je, če je pri tej koncentraciji že presežena kapaciteta kolone. Uporabili smo raztopino St31, pri čemer smo na detektorju opazovali odziv pri koncentraciji 500 µg/L, ki predstavlja tudi zgornjo mejo linearnosti HPLC-FLD metode. Da smo odziv lahko kvantitativno ovrednotili smo vzorec koncentrirali zgolj 5-krat. Če bi uporabili enak faktor koncentriranja kot v ostalih primerih (20-krat), bi pravzaprav določali koncentracijo 2000 µg/L. Izkoristek ekstrakcije pripravljenega vzorca je znašal 97,4 %, na osnovi česar zaključimo, da kapaciteta kolone pri nanosu standarda BPA v MQ s koncentracijo 2000 µg/L še ni presežena.

Vpliv volumna vzorca na izkoristek ekstrakcije

Volumen vzorca je eden od ključnih parametrov s katerim dosežemo primeren faktor koncentriranja. V splošnem je nanos večjega volumna časovno zamuden, hkrati pa se poveča verjetnost, da bo v vzorcu sočasno prisotnih več motečih komponent.

V našem primeru smo pripravili štiri različne volumne raztopin BPA v MQ, in sicer 10, 50, 100 ter 200 mL, pri čemer smo v vseh štirih primerih dodali isto maso standardne raztopine BPA (0,125 µg). Z analizo metodo smo opazovali odzive, ki so ekvivalentni koncentraciji 250 µg/L. Iz rezultatov za izkoristek v Preglednici 13 je razvidno, da je ekstrakcija ponovljiva ne glede na volumen vzorca, ki ga naneseemo na kolono.

Preglednica 13: Nanos različnih volumnov vzorca.

Volumen vzorca [mL]	Izkoristek ekstrakcije [%] (n=3)	Število analiziranih vzorcev
10	103,8	4
50	98,7	1
100	97,9	1
200	100,4	1

Izbira topila za spiranje

Morebitno prisotne nečistoče smo iz nosilca sprali z izbranim topilom za spiranje. Proizvajalec za fazo spiranja priporoča 5-60 % metanol. Pri našem delu smo uporabili 15 % metanol. Pri določanju primernosti izbranega elucijskega topila smo na nosilec nanesti 10 mL raztopine standarda BPA s koncentracijo 2,50 mg/L v MQ (St34), zbrali eluat po nanosu 2 mL 15 % metanola, ga posušili, raztopili v 50 % metanolu in analizirali. Prepričali smo se, da se ob danem deležu metanola iz kolone sperejo moteče kontaminante, ne pride pa do elucije BPA.

Izbira elucijskega topila

Dobro topilo za elucijo ne reagira z analitom, prekine pa interakcije analita s stacionarno fazo. Volumen topila mora biti dovolj velik, da zagotovimo kvantitativno elucijo analita.

Kot elucijsko topilo smo uporabili kombinacijo topil acetonitril/metanol v razmerju 1:1, kot to predlaga splošna shema. Izbrana kombinacija ter delež topil je optimalen. Acetonitril ima večjo elucijsko moč, zato prispeva k hitrejšemu in močnejšemu spiranju analita iz adsorbenta, metanol pa ima nižje vrelišče, kar je ugodno pri sušenju saj topilo prej odpari.

Proizvajalec kolone v fazi elucije priporoča nanos 2 mL elucijskega topila. Zanimalo nas je, kakšen bo izkoristek ekstrakcije, če zmanjšamo volumen elucijskega topila oz. če topilo namesto v enem koraku nanesemo v dveh korakih (52). V ta namen smo na isti koloni drugo za drugim ekstrahirali 10 mL vzorce, pri čemer smo izhajali iz raztopine St23. Vse faze analiznega postopka smo izvedli enako, zgolj elucijo smo izvedli na štiri različne načine, kot je prikazano v Preglednici 14. V primeru, ko smo elucijo izvedli v dveh korakih smo elucijsko topilo dodali po eno minutnem vmesnem postanku. Koncentracija BPA v skoncentriranih vzorcih je znašala 250 µg/L.

Iz Preglednice 14 je razvidno, da analit iz adsorbenta odstranimo že z dodatkom enega mililitra elucijskega topila. Ni bistvene razlike, če topilo nanesemo v dveh stopnjah z vmesnim eno minutnim postankom oz. v eni stopnji v celoti.

Pri rutinskem delu smo v fazi elucije na posamezno kolono v enkratnem nanosu nanesli 2 mL acetonitril/metanola. Na ta način je elucija analita popolna, tudi če se je le-ta na adsorbentu zadržal v visokih koncentracijah. Hkrati je enkraten nanos elucijskega topila enostavnejši, še zlasti ko sočasno pripravljamo več vzorcev.

Preglednica 14: Izkoristki ekstrakcije pri izbiri elucijskega topila.

Način elucije	Izkoristek ekstrakcije [%] (n=3)
2 × 1 mL (1 min presledek)	103,6
1 × 2 mL	105,3
2 × 0,5 mL (1 min presledek)	103,2
1 × 1 mL	102,8

Izbira temperature sušenja

Ker je postopek ekstrakcije vključeval tudi preprihavanje v toku dušika pri povišani temperaturi, je bilo potrebno preveriti kako se BPA obnaša pri različnih temperaturah sušenja. V literaturi smo namreč zasledili, da temperatura sušenja lahko vpliva na izkoristek ekstrakcije (10).

Optimalno temperaturo smo izbrali na osnovi rezultatov spodaj opisanega postopka. Pripravili smo standardno raztopino BPA s koncentracijo 50 µg/L v izbranem elucijskem topilu (St32). 2 mL pripravljene raztopine smo odpipetirali v vsako od dvanajstih epruvet. Vzorce smo posušili pri štirih različnih temperaturah, in sicer 40, 45, 50 in 55 °C, pri čemer smo pri vsaki temperaturi sušili tri vzorce. Posušene vzorce smo raztopili v 50 % metanolu in jih analizirali. Opazovali smo odzive pri koncentraciji BPA 200 µg/L. Pri vsaki temperaturi smo izračunali povprečno vrednost površine kromatografskih vrhov in jih primerjali s odzivom standarda enake koncentracije pripravljenega in analiziranega isti dan. Pri iskanju najbolj optimalne temperature sušenja nismo opazili pomembnega zmanjšanja vsebnosti BPA. BPA je stabilen pri vseh temperaturah sušenja in ni hlapna spojina, zato je smiselno odstraniti topilo s sušenjem. Kot najbolj optimalno temperaturo sušenja smo izbrali temperaturo 45 °C, saj je vrednost odziva tu največja (Preglednica 15), v primerjavi s 40 °C pa se ključno skrajša čas sušenja. Do enakega zaključka smo prišli v dveh neodvisnih eksperimentih.

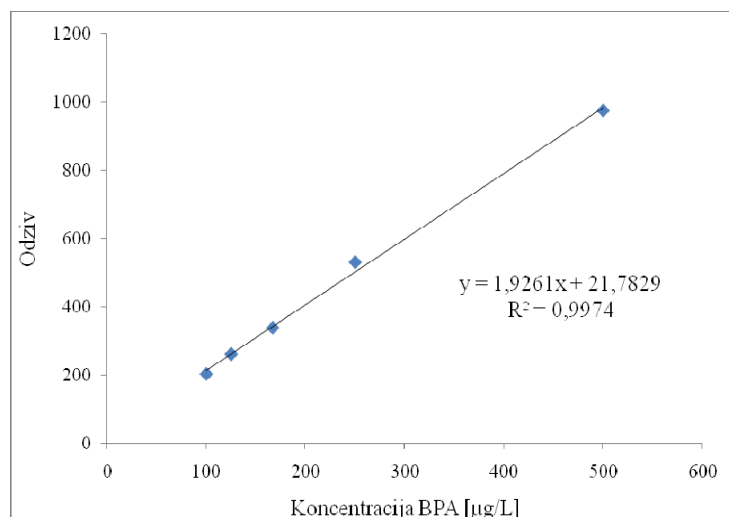
Preglednica 15: Povprečen odziv pri različnih temperaturah sušenja.

Temperatura sušenja [°C]	Povprečen odziv (n=3)	Število analiziranih vzorcev
40	408,3	3
45	418,7	3
50	408,1	3
55	399,6	3

Vpliv volumna topila za raztapljanje na izkoristek ekstrakcije ter določitev časa mešanja vzorcev

Volumen topila je poleg volumna vzorca in volumna injiciranja v LC del parameter s katerim določimo primeren faktor koncentriranja. Za preverjanje vpliva različnih volumnov topila za raztapljanje suhega preostanka po sušenju eluata na izkoristek ekstrakcije smo pripravili standardno raztopino BPA v elucijskem topilu s koncentracijo 25 µg/L (St33). V vsako od petih epruvet smo odpipetirali 2 mL raztopine, topilo pa odparili s prepihanjem v toku dušika. Posušene vzorce smo raztopili v petih različnih volumnih in sicer 100, 200, 300, 400 ter 500 µL ter jih analizirali na HPLC-FLD.

Izkoristek ekstrakcije smo izračunali upoštevajoč volumen topila za raztapljanje in začetno koncentracijo BPA ter koncentracijo standardne raztopine BPA enake koncentracije. Ugotovili smo, da volumen raztapljanja ne vpliva pomembno na izkoristek ekstrakcije, saj gre za linearno zvezo med odzivom in koncentracijo BPA (Slika 13).



Slika 13: Odvisnost odziva od koncentracije BPA.

Izbrali bi lahko katerikoli volumen raztapljanja. Po naši oceni ni najprimerneje uporabiti 100 µL, kajti posušili smo 2 mL raztopine, zato se nekaj BPA zagotovo nahaja tudi na stenah epruvete. Volumen topila mora biti dovolj velik, da speremo BPA iz celotne površine epruvete.

Za čas mešanja raztopljenih vzorcev smo določili 90 sekund. Izbrani čas mešanja je ustrezen, saj je izkoristek BPA po sušenju in raztapljanju visok, praktično popoln.

Izbira ekstrakcijskega nosilca

Po optimizaciji ekstrakcijskega postopka na Strati X koloni smo SPE izvedli še na dveh nosilcih. Uporabili smo polimerni nosilec Oasis® HLB ter reverzno fazno kolono C18E. Za vse tri nosilce velja, da so sposobni zadržati polarne in nepolarne spojine, ki imajo kisle, bazične ali nevtralne lastnosti in se v literaturi tudi najpogosteje uporabljajo (5, 10, 21, 55). Preglednica 16 predstavlja splošno shemo poteka SPE za vse tri nosilce. Sheme smo privzeli iz poznanih protokolov proizvajalcev, pri čemer smo nove kolone sprali z 20 mL metanola. Pripravili smo raztopino St21, nato pa ekstrahirali 10 mL vzorce po znanem postopku na vseh treh obravnavanih kolonah, pri čemer smo vrednotili odzive pri koncentraciji 250 µg/L. Na istem nosilcu smo pripravili več paralelk. V skladu s poglavjem 3.2.4.8 smo izračunali uspešnost ekstrakcije. Rezultate za izkoristek podaja Preglednica 16. C18E kolona v primerjavi s polimernima nosilcema daje nižjo vrednost izkoristka ekstrakcije. Zahteva večjo porabo topil, kar ključno podaljša čas analize. Ker je potrebno odpariti večji volumen topila, je tudi verjetnost izgub večja. Izkazalo se je, da je uspešnost ekstrakcije visoko ponovljiva.

Preglednica 16: SPE ekstrakcija na treh nosilcih.

IME NOSILCA	Strata X	Oasis® HLB	C18E
KONDICIONIRANJE nova kolona (metanol) [mL]	20	20	20
KONDICIONIRANJE med analizami (metanol) [mL]	2	2	6
EKVILIBRACIJA (MQ) [mL]	2	2	6
NANOS VZORCA [mL]	10, pri pretoku 3 mL/min	10, pri pretoku 3 mL/min	10, pri pretoku 1,5 mL/min
SPIRANJE (15 % metanol) [mL]	2	2	6
ELUCIJA (acetonitril/metanol (1:1)) [mL]	2	2	6
IZKORISTEK EKSTRAKCIJE	103,8 (4 paralelke)	100,6 (4 paralelke)	94,9 (3 paralelke)
RSD [%]	1,10	1,58	0,85

Na osnovi rezultatov za izkoristek ekstrakcije in ponovljivost ekstrakcije je razvidno, da je smiselno uporabiti kateregakoli od obravnavanih polimernih nosilcev. Vrednosti izkoristkov so namreč visoke in ponovljive. Glede na to, da je ponovljivost pri štirikratni pripravi vzorcev boljša pri koloni Strata X, smo pri nadaljnjem delu uporabili ta nosilec.

Sočasna analiza večjega števila vzorcev

Aparatura za SPE ekstrakcijo je konstruirana tako, da omogoča sočasno pripravo večjega števila vzorcev, pri čemer ključno pridobimo na hitrosti priprave vzorcev. V našem primeru je sočasno mogoče pripraviti maksimalno dvanajst vzorcev.

Za preverjanje sočasne priprave vzorcev smo uporabili raztopino St22. Sočasno smo pripravili štiri 100 mL vzorce, pri čemer smo s HPLC-FLD vrednotili odzive pri koncentraciji 250 µg/L in izračunali ponovljivost in izkoristek ekstrakcije.

Sočasna ekstrakcija je dala visoke in ponovljive vrednosti za izkoristek ekstrakcije. Vrednost izkoristka je znašala $105,4 \pm 0,4$, RSD vrednost pa 0,38 %.

Izkazalo se je, da je na vsaki novi koloni aktivacijo in ekvilibracijo bolj smiselno narediti posebej, nadaljnji postopek pa lahko poteka na večjem številu kolon hkrati. To je sicer časovno zamudno. Praktično pa lažje izvedljivo, saj zaradi omejitve volumna SPE kolone v enkratnem nanosu na kolono lahko nanesemo zgolj 3 mL topila. Če bi topilo na kolono nanesli preko brizge, bi lahko sočasno aktivirali in ekvilibrirali vse štiri kolone.

Večino parametrov ekstrakcijskega postopka smo optimizirali s pomočjo metode HPLC-FLD. S pomočjo metode LC-MS/MS smo v nadaljevanju določili končne parametre priprave vzorca in sicer volumen nanosa vzorca ter volumen topila za raztapljanje. V želji, da določimo vsebnost BPA v vodnih vzorcih v koncentracijskem območju med 1 in 500 ng/L smo določili faktor koncentriranja 1000-krat. Glede na to, da smo želeli določiti

vsebnost BPA v negaziranih mineralnih vodah iz 500 mL plastenk, smo izbrali tak volumen, ki bo omogočal analizo več paralelk iz iste plastenke. Posledično smo za nanos vzorca izbrali volumen 200 mL, kot volumen topila za raztapljanje pa smo določili 200 μ L.

4.1.2 LC-MS/MS

Metodo LC-MS/MS za določevanje vsebnosti BPA v vodnih vzorcih smo razvili na UHPLC instrumentu, Agilent 6460 Triple Quadrupole LC-MS. Cilj razvoja analizne metode je bil učinkovita kromatografska separacija komponent vzorca in občutljiva ter specifična detekcija izbranega analita.

Pri razvoju metode LC-MS/MS smo postopali po ustaljeni praksi. Najprej smo razvili detekcijski del (MS/MS), nato pa še kromatografski del (LC). Pri razvoju MS/MS dela smo nekatere parametre določili z direktnim vodenjem vzorca na MS/MS, druge pa s pomočjo kolone. Pri analizi brez kolone smo uporabili zgolj masno detekcijo, s čimer smo ključno pridobili na hitrosti analize.

4.1.2.1 Metoda MS/MS

Iskanje MRM prehodov

S pomočjo softwarskega programa Optimizer ter programske opreme, ki program krmili (MassHunter), smo določili MRM prehode za standard BPA in IS. Monoizotropna masa BPA znaša 228,12 g/mol. Ob injiciranju standarda BPA je instrument določil hčerinska iona, ki v največjem obsegu nastaneta po fragmentaciji iz prekursorskega iona $[M-H]^-$ m/z 227,1. Ion $[M-H-CH_3]^+$ m/z 212 je nastal v večjem deležu in smo ga uporabili za kvantitativno vrednotenje BPA. Drugi ion $[M-H-C_6H_5O]^-$ m/z 133, pa nam je služil za kvalitativno vrednotenje, saj smo z njim dodatno potrdili prisotnost BPA v vzorcu. Pri določevanju BPA smo torej spremljali dva MRM prehoda, 227-212 ter 227-133, kar je skladno tudi z literaturnimi podatki (10, 16, 26).

S pomočjo avtomatske optimizacije smo pridobili podatke o vrednosti fragmentorja (FR) in kolizijske energije (CE). Vrednost za fragmentor predstavlja razliko v napetosti med začetkom masnega spektrometra, kjer ioni nastanejo ter kolizijsko celico. Namen tega je, da čim več osnovnega iona pride v kolizijsko celico, zato imata oba MRM prehoda enako vrednost za fragmentor. Vrednost je znašala 130. Vrednost kolizijske energije se je razlikovala, glede na to kateri MRM prehod je nastal. Za prehod 227,1-212 je znašala 12 mV, za prehod 227,1-133 pa 20 mV.

Na enak način, kot je opisano za standard, smo postopali tudi v primeru vzorca IS. Vrednost monoizotropne mase za IS je znašala 244,22 g/mol, pri čemer je instrument v masnem spektrometru zaznal ion m/z 241,2. V strukturi IS je vseh šestnajst vodikov zamenjanih z devterijem. Pri določanju IS pride do zamenjave –OD skupine z –OH na obeh fenolnih obročih. V nadaljevanju se v negativnem ESI iz ene od –OH skupin odcepi H in posledično določamo ion s m/z 241,2. Za BPA d-16 značilna MRM prehoda sta bila 241,2-223 ter 241,2-142,1 kar je skladno tudi z literaturnimi podatki (16, 26). MRM prehod 241,2-223 smo uporabili za kvantitativno vrednotenje, MRM prehod 242,1-142,1 pa za kvalitativno vrednotenje. Vrednost za fragmentor je znašala 130, vrednosti kolizijske energije za 241,2-223 je znašala 12 mV, za 241,2-142,1 pa 20 mV. Razvidno je, da so vrednost za fragmentor in vrednost kolizijskih energij enaki za BPA in BPA d-16. Razlog je v tem, da gre za molekuli z enako strukturo, ki fragmentirata na podoben način.

Za BPA smo poleg prehodov 227,1-212 ter 227,1-133 spremljali tudi prehod 227,1-227,1, za BPA d-16 pa poleg prehodov 241,2-223 in 241,2-142,1 tudi prehod 241,2-241,2. Določili smo ustrezno vrednost razdelilnega časa, ki je omogočalo spremljanje vseh šestih prehodov. Izkazalo se je, da večina BPA ostaja nefragmentiranega (227,1-227,1), odstotek fragmentacije je namreč znašal zgolj 11,73 % (227,1-212 in 227,1-133). BPA d-16 fragmentira še v manjšem deležu, odstotek fragmentacije je znašal 9,95 % (241,2-223 in 241,2-142,1). Manjši obseg MRM prehoda 227,1-212 pomeni zmanjšano občutljivosti za določanje BPA.

Optimizacija pogojev, ki pomembno prispevajo k ionizaciji v masnem analizatorju.

Z manualno optimizacijo smo poiskali najbolj optimalno temperaturo sušilnega plina, temperaturo pretoka Jetstream[®] plina, napetost na kapilari ter nozzle voltage[®]. Preglednica 17 prikazuje spreminjanje vrednosti posameznega parametra ter podaja izbrano optimalno vrednost za posamezen parameter. Pri optimizaciji parametrov smo odzivnost vrednotili pri MRM prehodu 227,1-212. Cilj optimizacije je bil izbrati parametre, ki dajejo najvišjo odzivnost pri opazovanem prehodu.

Izbira ionskega izvora

V literaturi BPA za določanje BPA navajajo tako ESI kot tudi APCI ionski izvor, pri čemer se ESI uporablja pogosteje, ker je bolj občutljiv (16). Posledično smo tudi pri našem razvoju namestili tudi APCI ionski izvor ter odzivnost BPA primerjali s ESI načinom

ionizacije. Izkazalo se je, da je ESI primernejši za analizo BPA, saj je bila odzivnost v primeru uporabe APCI za 30 % nižja kot pri ESI.

Preverili smo tudi odzivnost BPA v pozitivnem načinu ESI, vendar odziva nismo dobili.

Optimizacija parametrov masnega analizatorja v povezavi z LC

Vključujoč predhodno kromatografsko separacijo na izbrani koloni smo s manualno optimizacijo določili optimalne vrednosti naslednjih parametrov: pretok nebulizacijskega plina, pretok sušilnega plina, pretok Jetstream® plina, širino masne ločljivosti na prvem in tretjem kvadrupolu in razdelilni čas. Spreminjanje vrednosti posameznega parametra in končna vrednost so prikazani v Preglednici 17.

Preglednica 17: Nastavitve masnega analizatorja.

Parameter	Spreminjanje vrednosti	Izbrana vrednost
Temperatura sušilnega plina	250/275/300/325/350	275 °C
Temperatura pretoka Jetstream® plina	300/320/340/360/380/400	320 °C
Napetost na kapilari	1000/2000/3000/4000/5000	4000 V
Nozzle voltage®	0/500/1000/1500/2000	1000 V
Pretok nebulizacijskega plina	15/30/45/60	30 psi
Pretok sušilnega plina	4/5/6/7/8/9/10/11/12/13	10 L/min
Pretok Jetstream® plina	4/5/6/7/8/9/10/11/12	11 L/min
Širina masne ločljivosti na prvem kvadrupolu	unit (0,7)/ wide (1,2)/ widest (2,5)	ang. <i>widest</i>
Širina masne ločljivosti na tretjem kvadrupolu	unit (0,7)/ wide (1,2)/ widest (2,5)	ang. <i>wide</i>
Razdelilni čas	20/50/100	50 ms

4.1.2.2 Metoda LC

Izbira mobilne faze

V literaturi za določanje vsebnosti BPA z metodo LC-MS/MS za mobilno fazo navajajo uporabo kombinacij acetonitril/voda oz. metanol/voda (10, 15, 16). Vodna faza pogostokrat vsebuje aditive z namenom povečanja ionizacije proučevanega analita, kar se odraža kot povečanje odzivnosti tarčnega analita. Pri določanju v negativnem ionizacijskem načinu se uporablja dodatek amonijevega acetata (0,2,5/5/10 mM) oz. amonijaka (0,01 % in 0,5 %). V pozitivnem načinu pa je znan dodatek očetne kisline (0,01 %) oz. formične kisline (0,1 %) (16).

Za vodno fazo smo preizkusili čisto vodo ter različne koncentracije amonijevega acetata in sicer 2,5/5/10/15 mM. Organsko fazo smo izbrali med metanolom ter acetonitrilom. Preizkusili smo vse možne kombinacije vodne in organske faze.

Največjo odzivnost smo dosegli s kombinacijo ultračista voda (MF A) in metanol (MF B). Metanol je primernejši v primerjavi z acetonitrilom, ker zaradi nižjega vrelišča omogoča

lažjo odstranitev kapljic iz površine ionov, kar olajša nastanek ionov. S puferno raztopino amonijevega acetata smo sicer povečali ionizacijo BPA, vendar je prišlo do močne supresije ionizacije, kar je zmanjšalo odziv BPA (16).

Optimizacija ostalih kromatografskih pogojev

Uporabili smo kolono ZORBAX SB C-18 Rapid Resolution. Gradientni program smo spreminjali. Pri razvoju metode smo pričeli s klasičnim načinom. Uporabili smo gradient od 10 % B (metanol) do 90 % B v petih minutah ob pretoku 0,2 mL/min in nekontrolirano temperaturo kolone (10,14). Da smo lahko povečali pretok, ne da bi se ob tem značilno povečal tlak v sistemu, smo najprej povečali temperaturo na 50 °C, nato pa še pretok na 0,3 mL/min. Optimalen pretok MF za ustrezno MS detekcijo na našem instrumentu je namreč znašal 0,3-0,4 mL/min.

S povečanjem začetnega deleža B smo skrajšali retencijski čas, hkrati smo se z ostrejšim gradientnim programom izognili problemu »carry-overja« (poglavje 4.1.3.3). Posledično je razvita metoda vključevala 50 % začetni delež metanola (26).

4.1.3 Težave povezane z analizo BPA

S problematiko določanja BPA smo se seznanili že v literaturi. S problemi smo se srečali tudi pri praktičnem delu. Vsebnosti BPA ne moremo pravilno določiti, če predhodno ne eliminiramo kontaminacije na vrednost, ki je nižja od limite detekcije (57).

Vir kontaminacije je predstavljal predvsem postopek priprave vzorcev. BPA se namreč odpušča iz materialov, ki jih uporabljamo pri odvzemu vzorcev in njihovi pripravi. Zlasti izrazito je odpuščanje iz plastičnih materialov npr. kapalka, nastavek za pipete, injekcijska brizga, itd. Pomembna je tudi izbira topil, reagentov ter čistilnih sredstev. O odpuščanju BPA poročajo tudi pri uporabi SPE kartuš in HPLC kolon. V primeru HPLC kolon je znano odpuščanje BPA v primeru uporabe ročnih brizg s spojeno iglo (ang. *Cemented needle*), kjer prihaja do odpuščanja BPA iz adheziva. Odpuščanje BPA je izrazitejše pri višji temperaturi (npr. HPLC kolone), oz. po uporabi agresivnejših čistilnih sredstev (10, 14, 56).

Pomembno h kontaminaciji prispeva tudi prisotnost BPA v MQ, s pomočjo katere smo pripravili raztopine za validacijo metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ.

Pri optimizaciji SPE postopka s metodo HPLC-FLD kontaminacije nismo mogli določati, saj metoda ni bila dovolj občutljiva. Kontaminacijo smo podrobneje proučili z LC-MS/MS instrumentom.

4.1.3.1 Kontaminacija

Pomembno je bilo uporabiti čist laboratorijski pribor, ki je bil, če je bilo le mogoče, steklen. Za čiščenje smo uporabili metanol. Etanol za čiščenje ni primeren, saj vsebuje BPA v visokih koncentracijah (30 µg/L). Razlog je najverjetneje v tem, da se etanol nahaja v plastičnem vsebniku, metanol pa je shranjen v steklenici. Ker so tako injekcijske brizge kot tudi nastavki prek katerih smo brizge namestili na SPE kolone iz plastičnih materialov in bi lahko prispevali prebitek BPA, smo jih pred uporabo štiriindvajset ur izpostavili metanolu. Brizge smo napolnili z metanolom, nastavke pa smo v metanolu namakali.

Za opazovanje odpuščanja BPA iz SPE kartuše literatura navaja migracijski test sestavin kolon in sicer iz kolone za filtracijo, posteljice s sorbentom in frite. Odpuščanje BPA so potrdili v koloni in friti. V našem primeru smo vsako novo kolono spirali z 20 mL metanola, pri čemer smo zbirali frakcije po 3 mL. BPA smo določili v prvi in drugi frakciji, kar potrjuje literaturne podatke (38). Če bi uporabili steklene SPE kartuše, bi do odpuščanja BPA najverjetneje prišlo v manjšem obsegu.

Prisotnost BPA v MQ pripisujemo odpuščanju BPA iz filtrov v sistemu za pridobivanje vode (smolnat material). Razlogi so natančneje podani v poglavju 4.2.2.5. Z namenom, da bi vsebnost BPA lažje kvantitativno ovrednotili, smo v okviru validacije metode LC-MS/MS na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ na novih kolonah najprej pripravili slepi vzorec. Za MF smo namesto MQ uporabili ultračisto vodo.

4.1.3.2 Zmanjšana odzivnost instrumenta

Ob začetku delovnega dne ali ob menjavi aplikacije je instrument dajal manjše odzive za BPA. Signali so se izboljšali, če smo instrument več ur spirali s MF metanol/voda. Izogibali smo se uporabi pufra (amonijev acetat) in kislin (formična kislina). Izboljšanje signala smo dosegli, če smo pred injiciranjem vsakega vzorca injicirali vodo. S povečevanjem volumna vode se je povečal tudi odziv. Izbrali smo 20 µL ultračiste vode, kar predstavlja tudi maksimalni dovoljen volumen injiciranja.

Z namenom, da bi povečali občutljivost, smo določili še maksimalen volumen injiciranega vzorca. Maksimalen volumen vzorca, ki ga lahko nanesemo na kolono, znaša 5 µL. Ob nanosu 10 µL smo dobili nepravilno obliko kromatografskih vrhov.

Za potrditev ustrezne odzivnosti instrumenta med samo validacijo metode in tudi analizo pitnih vod smo uporabili t.i. QC vzorce treh različnih koncentracij BPA skozi celotno koncentracijsko območje (5, 50, 500 µg/L). Pojavil se je tudi problem nihanja signala, zato

je bilo nujno potrebna uporaba IS. Posledično smo za odziv beležili razmerje BPA/IS, ki je bil konstanten.

4.1.3.3 »Carry-over« učinek

»Carry-over učinek« je definiran kot prenos med vzorci. V primeru analize vzorca analita, ki ostaja v sistemu zaradi predhodne analize, instrument določi večji odziv BPA, kar daje lažno pozitiven rezultat.

Problem prenosa med vzorci se je pojavil iz različnih razlogov. Na začetku razvoja metode LC-MS/MS smo uporabili visoke koncentracije standardnih raztopin BPA. Uporabili smo tudi gradientni program, ki je vključeval manjši delež metanola. V literaturi smo zasledili, da v primeru, ko je v MF le majhen delež organskega topila BPA, najverjetneje ostaja na kromatografski koloni (26). Pojavili so se tudi sistemski problemi z avtomatskim vzorčevalnikom.

»Carry-over« smo odpravili tako, da smo se izogibali nanosu velikih koncentracij standarda BPA. Ključno pa smo prenos med vzorci odstranili s povečanjem začetnega deleža metanola na 50 % pri metodi gradientnega izpiranja. Večji delež organskega topila za elucijo (metanola) namreč spodbudi elucijo BPA iz kolone v sistem za detekcijo (26). Najprej smo analizirali vzorce, katerim nismo dodali BPA (t.i.slepa raztopina), nato pa standardne raztopine BPA od najnižje proti najvišji koncentraciji. Odpravili smo težave z avtomatskim vzorčevalnikom. Razvita metoda je ob injiciranju vsakega vzorca vključevala tudi 10 sekund trajajoče spiranje zunanosti igle s topilom mešane sestave in sicer 50 % izopropanol, 25 % acetonitril, 15 % cikloheksan, 10 % diklorometan. Po injiciranju vsakega od vzorcev smo injicirali vodni vzorec, s čimer smo zmanjšali prenos med vzorci, hkrati pa dodatno potrdili odsotnost BPA.

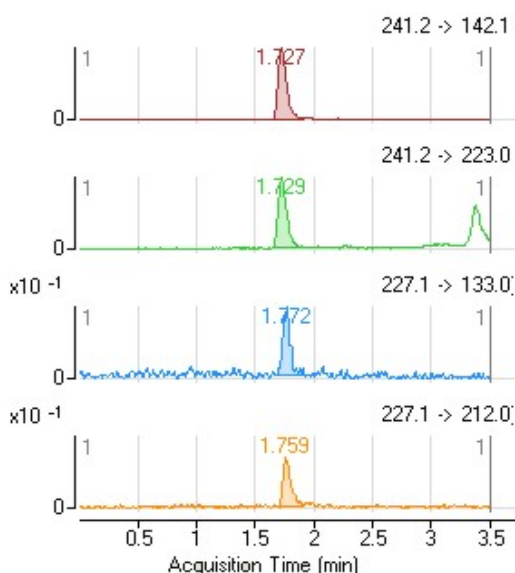
4.1.3.4 Prisotnost BPA v IS

Vsebnosti BPA z LC-MS/MS metodo smo določali z metodo internega standarda. V literaturi kot IS največkrat uporabljajo devteriran homolog bisfenol A in sicer BPA d-8, BPA d-14 ter BPA d-16, izotop ogljika $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA ter 4-n-nonilfenol (1, 16, 56).

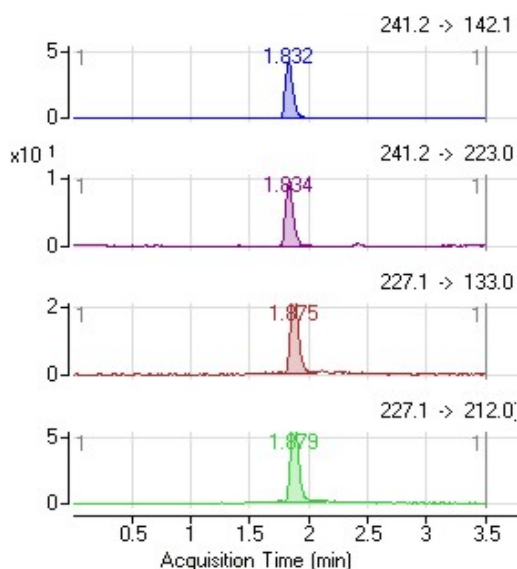
V našem primeru smo izbrali BPA d-16, ker je od devteriranih IS po literaturnih podatkih najpogosteje uporabljan, hkrati pa tudi najlažje dostopen. BPA d-16 v naravi ni prisoten, ima pa podobne fizikalno kemijske lastnosti kot proučevan analit, kar nam omogoča, da se bo tekom analiznega postopka obnašal podobno kot analit.

Prednost uporabe IS je povečanje ponovljivosti analiznega postopka. Vsebnost BPA smo določili na osnovi »vsebnosti BPA«, ki vključuje odziv IS. IS naj ne bi vseboval BPA. V vzorcu IS s koncentracijo 25 µg/L pripravljenem v 50 % metanolu smo določili sočasno prisotnost BPA. Odstotek BPA (227,1-212) v raztopini IS (241,2-223) je znašal 6,3 % in se je s časom še povečeval (8-11 %), npr. Slika 14. Če smo kot topilo za redčenje uporabili metanol, smo BPA določili v majšem deležu in sicer 0,3 %. V literaturi tega problema nismo zasledili.

Prisotnosti BPA smo se izognili tako, da smo raztopino IS pripravili v metanolu. Vendar pa smo s tem dobili nepravilno obliko kromatografskih vrhov. Kromatografski vrhovi v 50% metanolu so bili ožji, višji in bolj simetrični. To je razvidno iz Slik 15 in 18, ki prikazujeta kromatograma standarda BPA in IS v 50 % metanolu oz. 100 % metanolu. Za celovito spremljanje analiznega postopka je IS potrebno dodati k začetni vodni raztopini standarda pred ekstrakcijo. V našem primeru smo ga dodali k že ekstrahiranemu vzorcu, v topilo za raztapljanje. Čeprav nismo zajeli celotnega ekstrakcijskega postopka, to ni bistveno vplivalo na rezultat za izkoristek in ponovljivost ekstrakcije. Visok izkoristek ter ponovljivost ekstrakcije smo dosegli z dobrim manualnim delom. Uporaba IS je bila ključna z namenom zmanjšati nihanja za odziv analita med analizo vzorcev zaradi sprememb v odzivnosti instrumenta.



Slika 14: Kromatogram IS s 25 µg/L v 50 % metanolu.



Slika 15: Kromatogram standarda BPA s 50 µg/L in IS s 50 µg/L v 50 % metanolu.

4.2 VALIDACIJA METODE LC-MS/MS

4.2.1 Validacija na standardnih raztopinah BPA

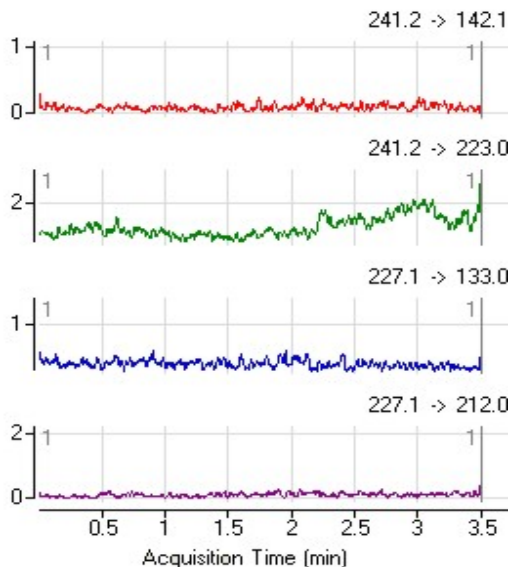
4.2.1.1 Selektivnost

Selektivnost metode smo potrdili že v okviru razvoja LC-MS/MS metode. Da je metoda selektivna, ponazarjajo spodaj prikazani kromatogrami (Slike 16-18). Ker sta BPA in BPA d-16 strukturno zelo podobni spojini, se tudi kromatografsko zelo podobno obnašata, imata podoben retencijski čas. Ločitev komponent vzorca smo dosegli z nastavitvami izbranih mas na masnem analizatorju. Tako smo omogočili prehod samo izbranim MRM prehodom. Za BPA smo opazovali prehoda 227,1-212 in 227,1-133, medtem ko sta za BPA d-16 značilna prehoda 241,2-223 in 241,2-142.

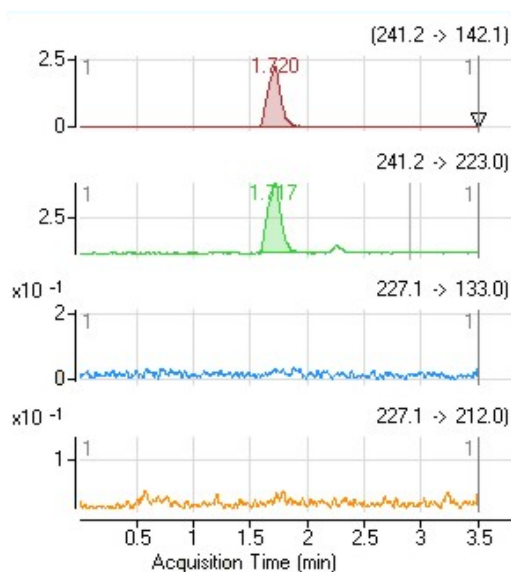
V kromatogramu metanola (Slika 16) ni vidnih interferenc pri retencijskem času značilnem za BPA. Kromatogram IS koncentracije 50 µg/L v metanolu (Slika 17), ki služi kot topilo za raztapljanje, pa kaže zgolj kromatografski vrh pri MRM prehodih IS. Slika 18 prikazuje kromatogram standarda BPA s koncentracijo 50 µg/L v topilu za raztapljanje. Vidni so odzivi za oba analita, pri čemer znaša retencijski čas BPA 1,76 min retencijski čas BPA d-16 pa 1,72 min.

Selektivnost metode smo potrdili tudi na osnovi rezultatov za razmerje odzivov MRM prehodov (BPA₂₁₂/BPA₁₃₃). Razmerje odzivov in ponovljivost injiciranja (RSD) za standardne raztopine BPA s koncentracijami 5, 50 in 500 µg/L je izračunano kot povprečje

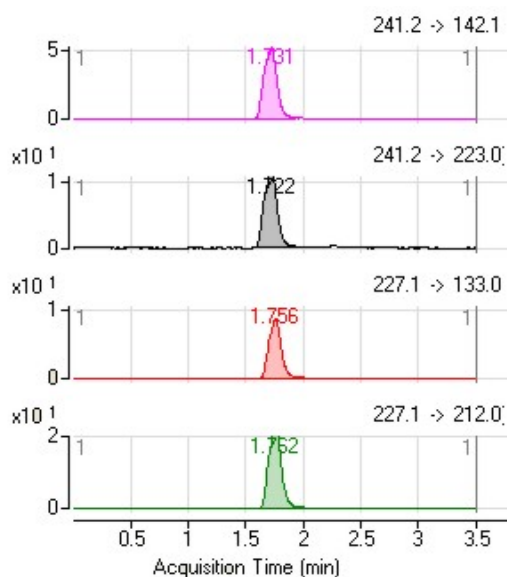
šestih meritev in podano v Preglednici 18. Komulativno merilo selektivnosti vključno s RSD, prikazani na koncu tabele, sta izračunani na podlagi meritev pri vseh treh koncentracijah. Izkazalo se je, da je razmerje MRM prehodov konstantno znotraj intervala $2,58 \pm 0,06$. Vrednost RSD je enaka 2,41 % in tako ne presega 5 % kriterija.



Slika 16: Kromatogram metanola.



Slika 17: Kromatogram topila za raztapljanje.



Slika 18: Kromatogram standarda BPA s 50 µg/L v topilu za raztapljanje.

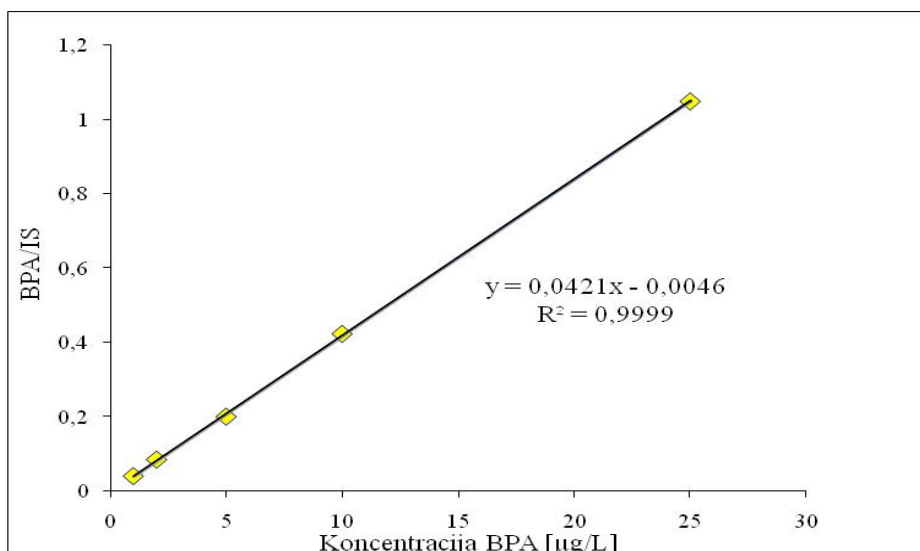
Preglednica 18: Kvantitativno vrednotenje selektivnosti.

Deklarirana koncentracija BPA [µg/L]	Razmerje BPA ₂₁₂ /BPA ₁₃₃ (n=6)	RSD [%]
5	2,52	2,49
50	2,62	0,92
500	2,61	0,58
Kumulativno	2,58	2,41

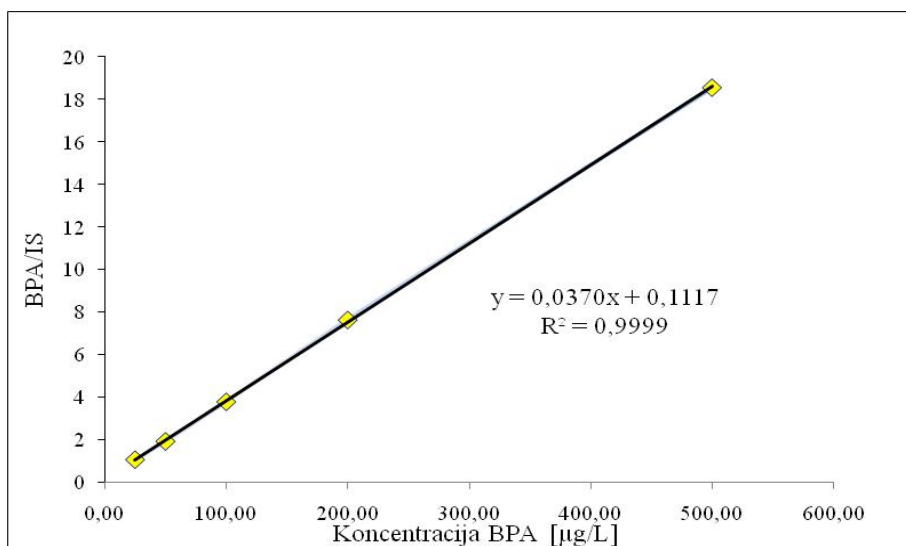
4.2.1.2 Linearnost in območje linearnosti

Pri vrednotenju linearnosti smo izbrano koncentracijsko območje razdelili na dva ločena dela. Prvo območje je obsegalo koncentracije od 1 do 25 µg/L, drugo pa koncentracije od 25 do 500 µg/L. V vsakem območju smo obravnavali pet koncentracij, pri čemer je stično točko med obema območjema predstavljala koncentracija 25 µg/L. Celotno območje smo razdelili na dva dela, kar nam je omogočalo za vsako območje posebej definirati regresijsko premico. Dve območji smo izbrali zaradi boljše linearnosti, kar je pogost primer pri LC-MS/MS analizah.

Na Slikah 19 in 20 sta prikazani regresijski premici skupaj s pripadajočo enačbo umeritvene premice ter vrednostjo R^2 . Razvidno je, da je zadoščeno pogoju linearnosti v obeh koncentracijskih območjih ($R^2 \geq 0,99$).



Slika 19: Odvisnost razmerja BPA/IS od koncentracije BPA v koncentracijskem območju 1-25 µg/L.



Slika 20: Odvisnost razmerja BPA/IS od koncentracije BPA v koncentracijskem območju 25-500 µg/L.

4.2.1.3 Točnost in ponovljivost

Točnost in ponovljivost injiciranja smo izračunali skladno s postopkom opisanim v poglavju 3.2.4. V Preglednici 19 so podani rezultati točnosti in stopnje ponovljivosti injiciranja skozi celotno območje linearnosti. V Preglednici 20 je prikazana meddnevna točnost in ponovljivost injiciranja v intervalu treh dni pri treh obravnavanih koncentracijah analita, koncentracije 5, 50 in 500 µg/L. Rezultati znotrajdnevne in meddnevne točnosti ter ponovljivosti so znotraj izbranih meja. Ugotovimo, da je LC/MS-MS analizna metoda za standard BPA točna in ponovljiva.

Preglednica 19: Točnosti in ponovljivosti injiciranja.

Deklarirana koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]	Povprečno razmerje BPA/IS	Izračunana koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]	Točnost [%]	Ponovljivost injiciranja RSD [%]	Število injiciranj [n]
1	0,03813	1,015	101,5	4,09	3
2	0,08253	2,070	103,5	2,93	3
5	0,19806	4,814	96,3	1,74	6
10	0,42093	10,108	101,1	1,52	3
25	1,04680	24,974	99,9	1,30	3
25	1,04680	25,273	101,1	1,30	3
50	1,90549	48,481	97,0	1,19	6
100	3,76994	98,871	98,9	0,80	3
200	7,62332	203,017	101,5	0,15	3
500	18,56388	498,708	99,7	1,16	6

Preglednica 20: Točnost in ponovljivosti injiciranja med dnevi.

Deklarirana koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]	Razmerje BPA/IS				Izračunana koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]	Točnost [%]	RSD [%]
	1.dan (n=6)	2.dan (n=3)	3.dan (n=3)	Povprečno			
5	0,19806	0,20194	0,19687	0,19893	4,863	96,7	1,35
50	1,90549	1,92520	1,84096	1,89055	50,582	96,2	2,33
500	18,56389	19,09175	18,3230	18,65954	503,798	100,3	2,11

4.2.1.4 Meja detekcije in meja kvantifikacije

Praktično določena meja kvantifikacije je znašala 1 $\mu\text{g/L}$, saj smo pri tej koncentraciji odziv še lahko kvantitativno ovrednotili s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo. Teoretično smo mejo kvantifikacije in mejo detekcije izračunali na osnovi razmerja signal/šum MRM prehoda 227,1-212 standardnih raztopin BPA s koncentracijo 1, 2, 5 in 10 $\mu\text{g/L}$, Preglednica 21. Meji detekcije in kvantifikacije predstavljata povprečni izračunanih vrednosti pri štirih koncentracijah in sta podani na koncu preglednice. Izračunana meja detekcije znaša 0,07 $\mu\text{g/L}$, meja kvantifikacije pa 0,22 $\mu\text{g/L}$.

Preglednica 21: Meja detekcije in meja kvantifikacije.

Deklarirana koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]	Razmerje signal/šum (227,1-212)	Izračunana meja detekcije [$\mu\text{g/L}$]	Izračunana meja kvantifikacije [$\mu\text{g/L}$]
1	45,0	0,067	0,222
2	95,4	0,063	0,210
5	160,0	0,094	0,313
10	771,9	0,039	0,130
Povprečna vrednost	/	0,07	0,22

4.2.1.5 Stabilnost

Preglednica 22 prikazuje rezultate stabilnosti pripravljenih standardnih raztopin BPA s koncentracijami 5, 50 in 500 µg/L. Vzorce smo v obdobju treh dni hranili v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 4 °C. Vrednotenje stabilnosti smo predstavili v odstotkih analita glede na prvi dan. Pri izračunu smo uporabili vrednosti razmerja BPA/IS, kot je prikazano v Preglednici 20. Ker so vsa odstopanja znotraj intervala 100 ± 5 % lahko zaključimo, da so pripravljene raztopine pri omenjenih pogojih stabilne. Analiza vzorcev lahko tako poteka vsaj tri dni.

Preglednica 22: Stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku.

Deklarirana koncentracija BPA [µg/L]	Stabilnost 1.dan [%]	Stabilnost 2.dan [%]	Stabilnost 3.dan [%]
5	100,0	102,0	99,4
50	100,0	101,0	96,6
500	100,0	102,8	98,7

4.2.2 Validacija na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ

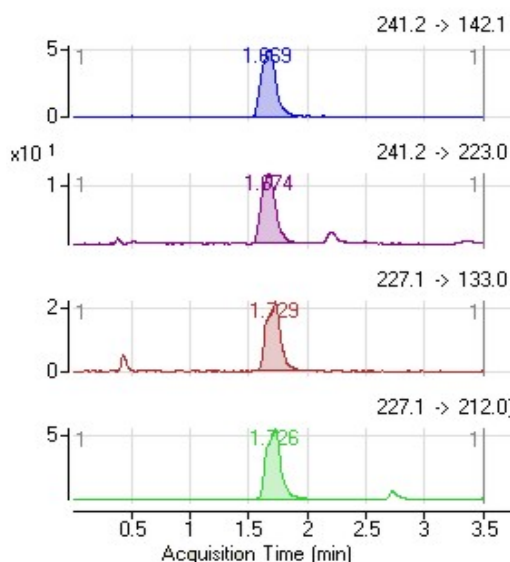
Po validaciji metode na standardnih raztopinah BPA, katere namen je bil potrditev ustreznosti razvite LC-MS/MS metode, smo naredili še validacijo na vzorcih, ki smo jih predhodno pripravili po postopku ekstrakcije na trdnem nosilcu.

4.2.2.1 Selektivnost

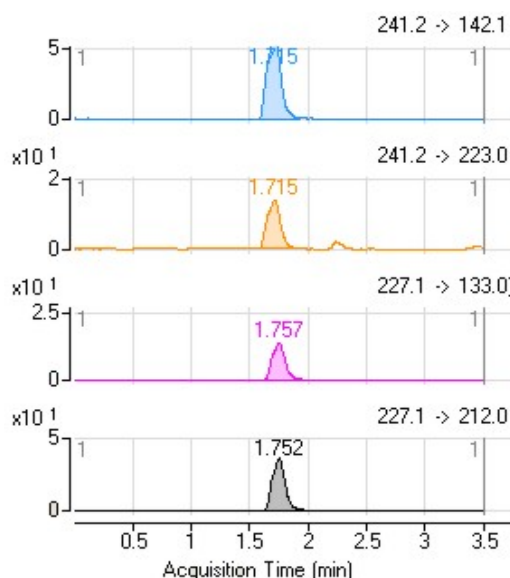
Pri validaciji metode na standardnih raztopinah BPA (poglavje 4.2.1.1) smo potrdili odsotnost BPA in morebitnih interferenc v metanolu ter topilu za raztapljanje (Sliki 16 in 17). Slika 21 prikazuje kromatogram ekstrahiranega vzorca MQ. Razvidno je, da je BPA prisoten v MQ, zaradi česar je kvantitativno določevanje prisotnosti BPA oteženo.

Iz kromatograma ekstrahiranega vzorca standarda BPA s koncentracijo 50 ng/L v MQ (Slika 22) lahko razberemo, da ni sočasno prisotnih interferenc ki bi motile analizo. Kromatografski vrh s retencijskim časom 1,75 min, ki pripada BPA, je jasno ločen od ostalih komponent vzorca.

Selektivnost smo preverili tudi računsko, kot je predstavljeno v poglavju 3.2.4.1. Rezultati za selektivnost BPA so skladni z rezultati predstavljenimi v poglavju 4.2.1.1. Razmerje MRM prehodov je konstantno znotraj intervala $2,61 \pm 0,03$ ter RSD ne presega zgornje meje 5 % (RSD= 1,06%), npr. Preglednica 23.



Slika 21: Kromatogram ekstrahiranega vzorca MQ.



Slika 22: Kromatogram ekstrahiranega vzorca standarda BPA s 50 ng/L v MQ.

Preglednica 23: Kvantitativno vrednotenje selektivnosti.

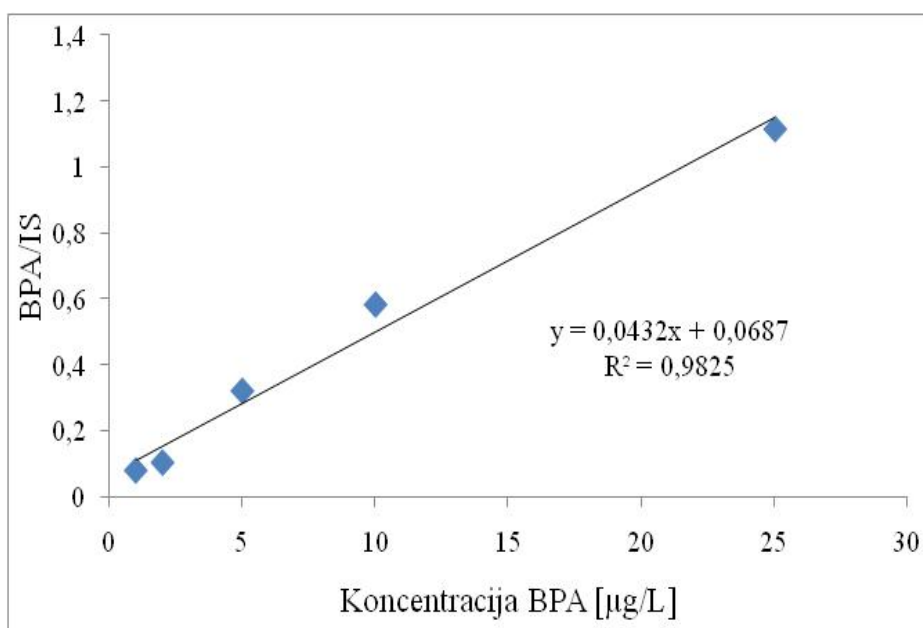
Koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]	Razmerje BPA ₂₁₂ /BPA ₁₃₃ (n=6)	RSD [%]
5	2,58	0,64
50	2,61	1,00
500	2,63	0,40
Kumulativno	2,61	1,06

4.2.2.2 Linearnost in območje linearnosti

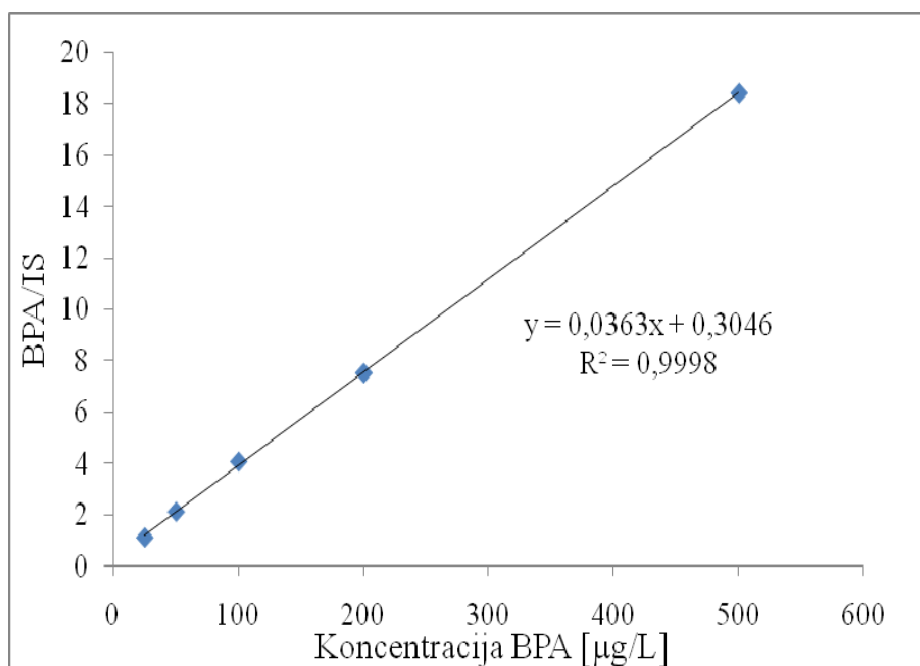
Linearnost smo vrednotili na enak način kot v primeru validacije metode na standardnih raztopinah BPA. Koncentracijsko območje raztopin standardov BPA v MQ je obsegalo koncentracije v območju od 1 do 500 ng/L. Ker smo vzorce pri pripravi 1000-krat

skoncentrirali, smo na detektorju pravzaprav opazovali odzive pri koncentracijah v koncentracijskem območju od 1 do 500 µg/L. Preverjali smo linearnost v območju od 1 do 25 ng/L ter v območju od 25 do 500 ng/L, kot prikazujeta Sliki 23 in 24.

Metoda je linearna v koncentracijskem območju 25-500 ng/L. V nizkem koncentracijskem območju ni zadoščeno kriteriju $R^2 \geq 0.99$. Razlog je prisotnost BPA v MQ.



Slika 23: Odvisnost razmerja BPA/IS od koncentracije BPA v koncentracijskem območju 1-25 µg/L.



Slika 24: Odvisnost razmerja BPA/IS od koncentracije BPA v koncentracijskem območju 25-500 µg/L.

4.2.2.3 Točnost in ponovljivost ekstrakcije

Točnost in ponovljivost ekstrakcije skozi celotno koncentracijsko območje prikazuje Preglednica 25. Meddnevna točnost in ponovljivost metode pri treh koncentracijah (5, 50 in 500 µg/L) v intervalu treh dni sta podani v Preglednici 24.

Metoda ekstrakcije je ponovljiva, saj RSD ne presega mejne vrednosti 15 %. Metoda je netočna v nizkem koncentracijskem območju (koncentracija 5 µg/L), saj presega postavljen kriterij 100 ± 15 %. Razlog je uporabljena MQ.

Preglednica 24: Točnost in ponovljivost ekstrakcije med dnevi (n=3).

Deklarirana koncentracija BPA [µg/L]	Razmerje BPA/IS				Izračunana koncentracija BPA [µg/L]	Točnost [%]	RSD [%]
	1.dan (4 paralelke)	2.dan (2 paralelki)	3.dan (2 paralelki)	Povprečno (korigirano)			
5	0,917	1,112	0,893	0,36786	6,925	138,5	8,95
50	2,724	3,002	2,816	2,24084	53,340	106,7	4,94
500	19,037	20,145	19,310	18,89148	512,035	102,4	2,96

4.2.2.4 Meja detekcije in meja kvantifikacije

Kljub nekoliko slabši linearnosti in odstopanju v točnosti v nizkem koncentracijskem območju, smo z izbrano analizno metodo v ekstrahiranem vzorcu uspeli kvantitativno določiti BPA s koncentracijo 1 µg/L. Meja kvantifikacije za BPA pogojno znaša 1 ng/L.

4.2.2.5 Izkoristek ekstrakcije

Preglednica 25 prikazuje izkoristke ekstrakcije pri vseh devetih koncentracijskih točkah. Pri izračunu izkoristka ekstrakcije smo uporabili vrednosti za razmerje BPA/IS iz Preglednice 19. Rezultat za povprečno razmerje BPA/IS ekstrahiranega vzorca (Preglednica 25) je ustrezno korigiran. Razvidno je, da je pri dveh najvišjih koncentracijah (koncentracija 200 in 500 µg/L) izkoristek ekstrakcije blizu 100 %, pri ostalih koncentracijskih točkah pa presega 100 %. Še posebej izrazito je odstopanje v nižjem koncentracijskem območju pri koncentracijah od 1 do 25 µg/L.

Prebitek koncentracije BPA se namreč najbolj pozna pri najnižjih koncentracijah, zato je tudi napaka v območju od 1 do 25 µg/L največja. Posledično je v tem koncentracijskem območju težko vrednotiti validacijske parametre, kot so linearnost, območje linearnosti, točnost in ponovljivost ekstrakcije, meja detekcije in meja kvantifikacije.

Preglednica 25: Izkoristek ekstrakcije, točnost in ponovljivost ekstrakcije.

Deklarirana koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]	Razmerje BPA/IS (korigirano)	Izkoristek ekstrakcije [%]	Izračunana koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]	Točnost [%]	Ponovljivost ekstrakcije RSD [%]
1	0,07985	209,4	0,258	25,8	8,83
2	0,10385	125,8	0,814	40,7	4,59
5	0,32085	162,0	5,837	116,7	7,58
10	0,58285	138,5	11,902	119,0	12,44
25	1,11485	106,5	24,216	96,9	5,10
25	1,11485	106,5	22,321	89,3	5,10
50	2,11785	111,1	49,952	99,9	4,94
100	4,07285	108,0	103,809	103,8	2,54
200	7,52385	98,7	198,877	99,4	3,13
500	18,43085	99,3	499,346	99,9	1,57

Poznamo več virov, ki prispevajo h kontaminaciji BPA. Ključni vir BPA predstavlja uporabljena MQ. Pri našem delu je bilo problematično predvsem to, da vsebnosti BPA nismo mogli kontrolirati. Zanimivo je, da se je vsebnost BPA v MQ spreminjala med dnevi (ponedeljek/petek) in celo znotraj dneva (ponedeljek zjutraj ob sedmih/ opoldan/ popoldan ob štirih/ zvečer ob sedmih). Ker so se vrednosti za »vsebnost BPA« slepih raztopin razlikovale, smo za korigirano vrednost določili povprečno vrednost dveh odvzemov. Glavni razlog za prisotnost BPA v MQ predstavlja proces priprave MQ. Do odpuščanja BPA prihaja iz sistema za pripravo vode (56). Na spreminjanje koncentracij BPA v MQ pri različnih odvzemih najverjetneje vplivata dva dejavnika. Pomemben je čas kako dolgo voda stoji v rezervoarju ter napolnjenosti rezervoarja z vodo glede na lego cevke iz katere MQ izteka. Vredno je omeniti, da je MQ na voljo osebju celotne fakultete, zato je težko spremljati napolnjenost, kljub temu, da se beleži odzem. Glede na naše analize smo večjo vsebnost BPA določili v primeru manjše količine vode v rezervoarju.

V manjšem obsegu prispeva k kontaminaciji BPA tudi njego prisotnost v različnih prostorih, kot je navedeno v literaturi (31). Če to problematiko prenesemo konkretno na naš primer je jasno, da analizni postopek poteka v prostoru, kjer je veliko raznovrstnih aparatov in instrumentov. Hkrati pa je sam postopek dolgotrajen, kar poveča možnost za privzem analita iz zraka. BPA bi v prebitku lahko vnesli tudi med analizo z LC-MS/MS instrumentom, saj so nekatere cevke s katerim vzorec prihaja v stik iz plastičnih materialov. Vendar na sam izkoristek ekstrakcije ta dodatek ne bi vplival, saj smo tako standarde kot tudi ekstrahirane vzorce standardov analizirali pod enakimi pogoji, kar pomeni da bi se morebitno prisoten prebitek poznal pri obeh, napaka pa bi se izničila.

Da bi lažje prikazali spreminjanje vsebnosti BPA v vodi ob različnih odvzemih MQ, bi bilo za vsak primer odvzete vode smiselno narediti ekstrakcijo slepega vzorca (MQ) v večih paralelkah.

Problemu prisotnosti BPA v MQ bi se izognili z uporabo vode, ki ne vsebuje BPA (t.i. BPA free-water). Pridobimo jo s filtriranjem MQ skozi hidrofofno membrano (t.i. Empore disk), pri čemer disk zadrži bisfenol A, filtrat pa ne vsebuje BPA. Čeprav Empore disk zadrži BPA že pri nizkih koncentracijah 1 ng/L, to ne izključuje kontaminacije BPA v nadaljnjem analiznem postopku med spiranjem, elucijo, rekonstitucijo, ob prenosu vzorca v vijalo (56).

4.2.2.6 Učinek matriksa

Z ESI ionizacijskim načinom sicer dosežemo visoko občutljivost, vendar je v primeru kompleksnih vzorcev pogosto izrazit pojav supresije ionov, kar omejuje njegovo uporabnost (9, 11). Vplive matriksa smo vrednotili po postopku opisanem v poglavju 3.2.4.9. V Preglednici 26 so prikazani rezultati preverjanja prisotnosti ionske supresije pri dveh izbranih koncentracijah analita, koncentraciji 50 in 500 µg/L.

Preglednica 26: Učinek matriksa.

	Razmerje BPA/IS (n=3) (BPA s 50 µg/L in IS s 50 µg/L)	Razmerje BPA/IS (n=3) (BPA s 500 µg/L in IS s 50 µg/L)
BPA v topilu za raztapljanje	1,79200	18,84500
Ekstrahirani vzorec MQ (korigirano razmerje)	1,80842	18,63199
Učinek matriksa [%]	100,90	98,87

Razvidno je, da ionska supresija ni prisotna v trenutku, ko na detektorju dobimo signal, s katerim potrdimo prisotnost BPA. Izračunani vrednosti pri obeh koncentracijah sta v okviru eksperimentalne napake in ustrezata postavljenemu kriteriju $RSD \leq 5\%$. Zaključimo lahko, da je vpliv koeluirajočih spojin zanemarljiv.

Na osnovi rezultatov podanih v poglavjih 4.2.1 in 4.2.2 lahko potrdimo ustreznost razvite LC-MS/MS metode za določitev vsebnosti BPA v vodnih vzorcih. Validirano optimizirano LC-MS/MS metodo, smo zato v nadaljevanju uporabili za analizo različnih vzorcev pitnih vod.

V okviru validacije metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ je bilo pravilno koncentracijo BPA v nizkem koncentracijskem območju težko določili. Posledično smo v nadaljevanju pri ugotavljanju vsebnosti BPA v pitnih vodah uporabili

enačbi umeritvenih premic, kateri smo določili v okviru validacije metode na standardnih raztopinah BPA (Sliki 19 in 20).

Da bi metoda popolnoma ustrezala postavljenim kriterijem, bi bilo potrebno validacijo metode na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA pri nizkih koncentracijah narediti še enkrat v vodi, ki ne vsebuje BPA. Izkazalo se je namreč, da je od vseh razpoložljivih vodnih vzorcev, ki bi jih lahko uporabili kot matriko za pripravo standardnih raztopin vsebnost BPA najvišja prav v MQ. Preglednica 27 prikazuje koncentracijo BPA v 200 mL vzorcih demineralizirane vode, vodovodne vode, ultračiste vode ter MQ. Vse vzorce razen demineralizirane vode smo odvzeli, pripravili in analizirali dvakrat v razmaku enega tedna, pri čemer posamezen rezultat predstavlja povprečje dveh paralelk. Tudi v literaturi so primerjali vsebnost BPA v MQ in vodovodni vodi. Za MQ so določili vsebnost BPA 20 ng/L, za vodovodno vodo pa 10 ng/L (38).

Preglednica 27: Vsebnost BPA v različnih vodnih vzorcih.

Vrsta vode [200 mL]	Razmerje BPA/IS (n=3)	Izračunana koncentracija BPA [$\mu\text{g/L}$]
Demineralizirana	0,07369	1,86
Vodovodna	0,08258	2,07
	0,08655	2,17
Ultračista	0,11001	2,72
	0,06438	1,63
MQ	0,86207	20,58
	0,47068	11,29

4.3 LC-MS/MS ANALIZA VZORCEV PITNIH VOD

Zaradi razširjene pojavnosti BPA in možnih posledic, ki jih povzroči dolgoročna izpostavljenost, se vsebnost BPA določa v različnih medijih (hrana, pitna voda, površinske vode, odpadne vode, zrak...) (14).

Namen diplomskega dela je bil določiti vsebnost BPA v negaziranih mineralnih vodah iz plastičnih vsebnikov. Vsebnost BPA smo določili v desetih vzorcih negaziranih mineralnih vod, pri čemer smo za primerjavo mineralnim vodam brez okusa (Vz1-Vz8), pripravili tudi dva vzorca vod z okusom (Vz9 in Vz10). Dodatno smo pregledali tudi vzorec vode iz vodomata (Vz11) ter vzorec vode iz vodovodnega omrežja (Vz12).

Poraba mineralnih vod v plastenkah je velika. Gre za enostaven matriks, ki ne vsebuje endogenih hormonov, kot npr. mlečni izdelki, odpadne vode. Pri vrednotenju rezultatov vsebnosti BPA v mineralnih vodah smo pozornost namenili tudi razredu plastike. Trikotnik na posamezni plastenki nam pove, iz kakšne plastike je le-ta narejena. V splošnem plastične mase razdelimo v sedem razredov. Prvi razred vsebuje polietilentereftalat (PET,

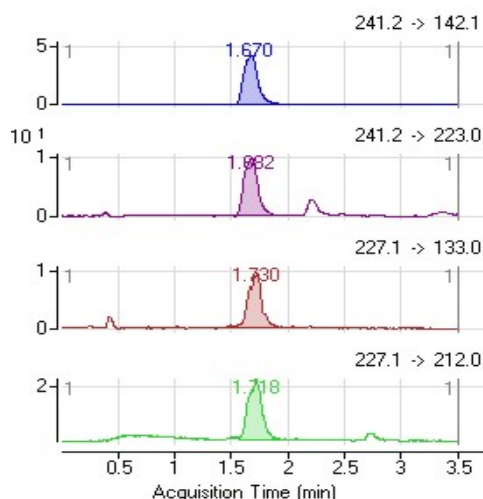
PETE), drugi razred visokotlačni polietilen (HDPE), tretji razred polivinilklorid (PVC), četrti razred nizkotlačni polietilen (LDPE), peti razred polipropilen (PP), šesti razred polistiren (PS). V sedmi razred uvrščamo plastične mase, ki najpogosteje vsebujejo polikarbonatno plastiko (PC) (58). BPA se pogostokrat uporablja kot plastifikator. Za PC pa velja, da je sestavljena iz BPA. PC je namreč polimer monomernih BPA enot. Med proizvodnjo plastičnih vsebnikov se ves BPA ne vključi v strukturo s kemijskimi vezmi, del ostaja prost in lahko prehaja v okoliški medij. Prehajanje je izrazitejše, ko je plastika segreta. Za plastične mase 3 in 7 razreda je znano, da vsebujejo BPA (59).

Prisotnost BPA v mineralnih vodah posledično pojasnjujemo na dva načina. Znano je, da se BPA iz vodnega medija ne očisti popolnoma pri procesih na čistilni napravi. V nekaterih primerih podtalnico uporabljajo kot vir pitne vode (52). Drugi vir BPA predstavlja odpuščanje BPA iz plastičnih vsebnikov, s katerimi v stiku je voda (59).

Preglednica 28: Vsebnost BPA v pitnih vodah.

Oznaka vode	Razmerje BPA/IS	Ugotovljena koncentracija BPA [ng/L]	Izvor vode	Razred plastike	Cena [€] dne 29.5.2010
Vz1	0,17402	4,1	Kolpa	1	0,32
	0,54579	12,7			
Vz2	0,39077	9,1	Francoske Alpe	1	0,60
	0,42084	9,8			
Vz3	0,10718	2,6	Radenci	1,5	0,30
	0,12494	3,0			
Vz4	0,09357	2,3	Radenci	1,5	0,14
	0,11402	2,7			
Vz5	0,17307	4,1	Mirna	1,5	0,29
	0,10843	2,6			
Vz6	0,07454	1,8	Mirna	1,5	0,22
	0,10869	2,6			
Vz7	0,37764	8,8	Radomlje	Ni podano	0,27
	0,08977	2,2			
Vz8	0,28649	6,7	Izvir Zala, Ljubljana	1	0,30
	0,11494	2,8			
Vz9	0,07224	1,8	Kolpa	1	0,50
	0,08919	2,2			
Vz10	0,13045	3,1	Izvir Zala, Ljubljana	1	0,43
	0,15511	2,6			
Vz11	8,23354	212,9	Izvir Zala, Ljubljana	7	0
	7,94492	205,4			
Vz12	0,20444	4,8	Belica, Polhov Gradec	/	0
	0,14240	3,4			

Preglednica 28 prikazuje nabor analiziranih pitnih vod skupaj z njihovim izvorom ter koncentracijami BPA za vsako od paralelk. Za negazirane mineralne vode so dodani še dodatni razredi, ki definirajo razred plastike ter ceno plastenke. Koncentracijo BPA smo izračunali upoštevajoč stopnjo čistosti standarda BPA, ki je znašala 97 %. Posledično smo izračunane koncentracije pomnožili s t.i. faktorjem čistosti 0,97. Primer določitve BPA v vzorcu vode Vz5 prikazuje Slika 25.



Slika 25: Kromatogram vzorca vode Vz5.

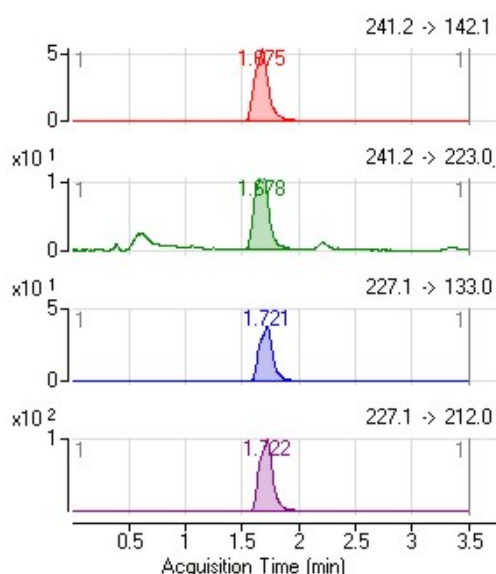
Plastenke vod Vz1, Vz9, Vz8, Vz10 ter Vz2 so izdelane iz PET, pri ostalih pa je uporabljena kombinacija PET in PP. Na osnovi rezultatov za vsebnost BPA in razred plastike plastenke pri analizi negaziranih mineralnih vod ni mogoče opaziti koleracije med opazovanima spremenljivkama. Zanimivo je, da je zgolj pri vzorcu Vz8 podano, kdaj je bila plastenka napolnjena in do kdaj je uporabna. Če bi imeli ta podatek še za ostale vode, bi razlike med vzorci najverjetneje lažje pojasnili..

Vsebnost BPA v negaziranih mineralnih vodah smo določili v koncentracijskem območju med 1,8 in 12,7 ng/L (Preglednica 28). To je skladno z literaturnimi podatki, kjer za mineralno vodo iz PET plastenk navajajo vsebnost BPA v koncentracijskem območju od 3 do 10 ng/L (16). Rezultati dveh paralelk so primerljivi, razen v treh primerih, kjer smo določili koncentraciji, ki se bistveno razlikujeta (Vz1, Vz7 in Vz8). Vsebnost BPA najverjetneje najbolje prikazuje nižja določena vrednost. Možni razlogi za odstopanja so navedeni v poglavju 4.2.2.5. Zgolj na osnovi analize dveh paralelk je nemogoče podati bistvene zaključke glede vsebnosti BPA. Preden rezultatom damo večji pomen, bi bilo potrebno izbrane vodne vzorce pripraviti v več paralelkah večkrat. Smiselno bi bilo

uporabiti vodo večjih volumnov, npr. 1,5 L, saj bi tako iz enega vsebnika dobili kar sedem 200 mL vzorcev in ne zgolj dva kot v našem primeru. Določevanje BPA v negaziranih mineralnih vodah z okusom (Vz9 in Vz10) je bilo kompleksnejše in zahtevnejše, saj so analizo motile sočasno prisotne komponente (dodatki kot npr. citronska kislina, L-askorbinska kislina, vitamin B6 itd.). V primerjavi z vodami brez okusa smo določili nižje koncentracije BPA. V primeru vod z okusom bi bilo potrebno optimizirati tudi kromatografsko ločbo, na ta način bi se izognili morebitni ionski supresiji.

Vzorec vode iz vodovodnega omrežja iz vasi Belica pri Polhovem Gradcu (Vz12) smo analizirali, ker gre za razmeroma majhno privatno vodovodno omrežje, ki je precej odmaknjeno od mestnega okolja. S prisotnostjo BPA v danem vzorcu smo potrdili njegovo razširjenost v okolju, kar je navedno tudi v dostopni literaturi.

Mnogo višjo vsebnost BPA smo določili v vzorcu vode iz vodomata (Vz11). Povprečen rezultat dveh paralelek znaša 209 ng/L. Če človek s telesno maso 70 kg dnevno popije 2 L vode iz vodomata, zaužije 0,00597 μg BPA, kar ne presega mejne vrednosti izpostavljenosti BPA, ki znaša v državah EU 10 $\mu\text{g/kgTM/dan}$, v ZDA pa 50 $\mu\text{g/kgTM/dan}$. Kromatogram BPA v vzorcu vode iz vodomata prikazuje Slika 26.



Slika 26: Kromatogram vode iz vodomata.

Razlog za prisotnost BPA v omenjenem vodnem vzorcu je najverjetneje neposredni stik vode s sestavnimi deli plastičnega vsebnika. Aparati za vodo so zgrajeni iz PC (npr. Slika 27), ki je polimer BPA enot.



Slika 27: Prikaz vodomata.

Rezultat za vsebnost BPA v vodomatu nas je presenetil, čeprav smo problematiko prisotnosti BPA v omenjenem vsebniku predhodno zasledili v javnosti. Da je taka voda vseeno v uporabi, je kriva predvsem nepopolna in nedorečena zakonodaja, saj določa kakovost vode v plastenki in ne v samem aparatu. Vodomati bi sicer morali biti redno vzdrževani, uporabnikom pa bi morale biti dostopne informacije, kdaj so bili vodomati očiščeni in preverjeni. V prihodnosti bi bilo smiselno analizirati še več vzorcev vod iz različnih vodomatov.

Ljudje pogostokrat raje kupimo ustekleničeno vodo, kot bi pili vodo iz vodovodnega omrežja. Zanimivo je, da zanjo velja enak pravilnik o kakovosti vodo kot za vodo iz pipe. Če je voda shranjena v plastenki, so ji dodani tudi različni dodatki, kar pa postopno tudi prehaja v vodo. Znano je, da popolnoma varne plastike ni. So pa razredi z oznako 2, 4 in 5 varnejši za uporabo, kot razredi z oznako 1, 3, 6, 7. Vnos BPA lahko zmanjšamo tako, da se izogibamo uporabi plastičnega pribora/krožnikov, gretju hrane v plastiki in ne kupujemo pripravljene hrane, ki je pakirana v plastiko. Svetuje se tudi zamenjava PVC stanovanjske opreme (talne obloge, zavese za tuširanje, okna, itd.) z zdravju prijaznejšimi alternativami. Da postaja tudi zakonodaja na tem področju vedno strožja, potrjuje tudi podatek, da je Kanada prva država na svetu, ki je prepovedala uvoz, prodajo in oglaševanje polikarbonatnih stekleničk za otroke (19).

5 SKLEPI

V diplomski nalogi smo razvili metodo tekočinske kromatografije v kombinaciji s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) za določanje vsebnosti BPA v pitnih vodah.

Naše raziskovalno delo je obsegalo razvoj in optimizacijo načina priprave vzorca, razvoj LC-MS/MS analizne metode, preverjanje analizne metode z validacijo in nazadnje analizo negaziranih mineralnih vod iz plastenk in vode iz vodomata ter vodovodne vode.

Vzorci smo pripravili po postopku ekstrakcije na trdnem nosilcu. Za vrednotenje uspešnosti ekstrakcije so pomembni visoki izkoristki ekstrakcije ter ponovljivost ekstrakcije. SPE ekstrakcijo smo izvedli s pomočjo oljne črpalke. V okviru optimizacije SPE ekstrakcije smo izbrali najprimernejši nosilec (Strata X), primeren volumen nanosa vzorca (200 mL), topilo za spiranje (15 % metanol) ter elucijsko topilo (acetonitril/metanol (1:1)). Poiskali smo najbolj optimalno temperaturo sušenja eluata (45 °C), določili volumen topila za raztapljanje (200 µL) ter čas mešanja vzorcev (90 s). Sočasno smo analizirali štiri vzorce. Tekom ekstrakcije smo vzorce 1000-krat skoncentrirali.

Razvili smo metodo LC-MS/MS s pomočjo standardnih raztopin BPA in raztopin IS (BPA d-16) in sicer najprej MS/MS del, nato pa še LC del. V okviru metode MS/MS smo poiskali MRM prehode za BPA ter BPA d-16, vrednost kolizijske energije, vrednost za fragmentor ter določili naslednje parametre: ionski izvor (ESI), temperaturo in pretok sušilnega plina, nebulizacijskega plina, Jetstream® plina, napetost na kapilari, Nozzle voltage®, EMV, širino masne ločljivosti na prvem in tretjem kvadrupolu ter razdelilni čas. V okviru metode LC smo izbrali primerno mobilno fazo in ustrezne kromatografske pogoje.

Ker je BPA problematična spojina, smo se pri delu srečali s težavami kot so kontaminacija, zmanjšana odzivnost instrumenta, prenos med vzorci ter prisotnost BPA v raztopini IS. Omenjene težave smo uspešno odpravili.

Z validacijo na standardnih raztopinah BPA na koncentracijskem nivoju od 1 do 500 µg/L smo dokazali, da je analizna metoda selektivna, linearna, točna, ponovljiva. Potrdili smo stabilnost v intervalu treh dni, določili mejo detekcije ter mejo kvantifikacije.

Pri validaciji LC-MS/MS na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v MQ, pri čemer na detektorju opazujemo odzive pri koncentracijah v koncentracijskem območju med 1 in 500 µg/L, so se pri določanju BPA v nizkem koncentracijskem območju (1-25 µg/L) pojavila odstopanja. Razlog je prisotnosti BPA v sami MQ. Analizna metoda je selektivna in

ponovljiva, posledično pa nekoliko slabše linearna in točna. Vpliv koeluirajočih spojin je zanemarljiv. Ker smo pripravljene vodne raztopine standarda tekom priprave vzorca 1000-krat skoncentrirali, meja kvantifikacije pogojno znaša 1 ng/L. Celotno koncentracijsko območje pripravljenih raztopin standardov BPA v MQ je obsegalo koncentracije v koncentracijskem območju od 1 do 500 ng/L.

Zaradi prisotnosti BPA v MQ smo za ugotavljanje vsebnosti BPA v pitnih vodah uporabili enačbi umeritvenih premic, kateri smo določili v okviru validacije metode na standardnih raztopinah BPA. Posledično bi bilo smiselno narediti validacijo LC-MS/MS v nizkem koncentracijskem območju še enkrat z uporabo vode, ki ne vsebuje BPA (BPA free-water). Optimizirano analizno metodo smo uporabili za analizo 10 vzorcev negaziranih mineralnih vod iz 0,5 L plastenk, vzorca vode iz vodomata ter vzorca vode iz vodovodnega omrežja. Analizirali smo osem negaziranih mineralnih vod brez okusa in dve mineralni vodi z okusom. Vsebnost BPA smo določili v vseh vzorcih, s čimer smo potrdili njegovo razširjeno prisotnost. V večini vzorcev se BPA nahaja v koncentracijskem območju od 1,8 do 12,7 ng/L, odstopa zgolj voda iz vodomata, kjer smo določili koncentracijo 209 ng/L (Vz11). Glavni razlog za odstopanja v vsebnosti BPA v vzorcih vode iz plastenke (Vz8) in vodomata (Vz11) istega proizvajalca predstavlja razred plastike. Voda iz vodomata je namreč shranjena v vsebniku iz PC, ki je sestavljena iz BPA. Posledično BPA v večjem obsegu prehaja v vodno okolje. Ker smo analizirali zgolj en vzorec vode iz vodomata, bi bilo v prihodnje smiselno pregledati vodo iz večjega števila vodomatov.

Glede negaziranih mineralnih vod brez okusa bi bilo nekatere vzorce smiselno ponovno pripraviti. Predlagamo uporabo vode iz 1,5 L plastenke, kar bi omogočilo analizo večjega števila vzorcev iz iste plastenke. V primeru vod z okusom pa bi bilo predhodno potrebno optimizirati tudi kromatografsko ločbo.

Analizna metoda je primerna za ugotavljanje vsebnosti BPA v vzorcih pitnih vod. Prednost metode je v tem, da je visoko specifična in občutljiva, kar kljub omenjenim omejitvam omogoča merjenje nizkih koncentracij BPA.

6 LITERATURA

1. Chang H.S, Choo K.H, Lee B, Choi S.J: The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs). *J. hazard. mater.* 2009; 172: 1-12
2. Liu Z, Kanjo Y, Mizutani S: Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Sci. total environ.* 2008; 731-744
3. Campbell C.G, Borglin S.E, Green F.B, Grayson A, Wozel E, Stringfellow W.T: Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere* 2006; 65: 1265-1280
4. Laganá A, Bacaloni A, De Lava I, Faberi A, Fago G, Marino A: Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal. chim. acta* 2004; 501: 79-88
5. Streck G: Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *Trends anal. chem.* 2009; 28: 635-651
6. Grover D.P, Zhang Z.L, Readman J.W, Zhou J.L: A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. *Talanta* 2008; 78: 1204-1210
7. <http://www.medenosrce.net/tiskaj.asp?id=1029>, april 2010
8. Levart K: Določevanje estrogenske aktivnosti na vtokih in iztokih čistilnih naprav, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2009
9. Gomes R.L, Schrimshaw M.D, Lester J.N: Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *Trends anal. chem.* 2003; 22: 697-705
10. Shao B, Han H, Hu J, Zhao J, Wu G, Xue Y, Ma Y, Zhang S: Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. chim. acta* 2005; 530: 245-252
11. Chen H.C, Kuo H-W, Ding W.H: Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting procedures. *Chemosphere* 2009; 74: 508-514
12. Cerabias-Martinez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P: Determination of endocrine-disrupting compounds in cereals by pressurized liquid extraction and liquid

- chromatography-mass spectrometry Study of background contamination. J. chromatogr., A 2006; 1137: 207-215
13. Dash C, Marcus M, Terry P.D: Bisphenol A: Do recent studies of health effects among humans inform the long-standing debate?. Mutat. res. 2006; 613: 68-75
 14. Shao B, Han H, Li D, Ma Y, Tu X, Wu Y: Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Food chem. 2007; 105: 1236-1241
 15. Beck I.C, Bruhn R, Gandrass J, Ruck W: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea; J. chromatogr., A 2005; 1090: 98-106
 16. Ballesteros-Gomez A, Rubio S, Perez-Bendito D: Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. J. chromatogr., A 2008; 1216: 449-469
 17. Pastva S.D, Villalobos S.A, Kannan K, Giesy J.P: Morphological effects of Bisphenol-A on the early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) Chemosphere 2001; 45: 535-541
 18. Kang J.H, Kondo F: Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water. Chemosphere 2005; 60: 1288-1292
 19. Hinterthuer A: Safety dance over plastic. Insights toxicology 2008; 108-111
 20. Maia J, Cruz J.M, Sendon R, Bustos J, Sanchez J.J, Paseiro P: Effects of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles, Food Res. Int. 2009; 42: 1410-1414
 21. Shao B, Han H, Tu X, Huang L: Analysis of alkylphenol and bisphenol A in eggs and milk by matrix solid phase dispersion extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry; J. chromatogr., B, Biomed. sci. appl. 2007; 850: 412-416
 22. Sajiki J, Yonekubo J: Leaching of bisphenol A (BPA) from polycarbonate plastic to water containing amino acids and its degradation by radical oxygen species. Chemosphere 2004; 55: 861-867
 23. Welshons W, Nagel S.C., Vom Saal F.S: Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. Endocrinology 2006; 147: 56-69
 24. Kang J.H, Kondo F, Katayama Y: Human exposure to bisphenol A. Toxicology 2006; 226: 79-89

25. Dekant W, Völkel W: Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessments of environmental exposures. *Toxicol. appl. pharmacol.* 2008; 228: 114-134
26. Völkel W, Bittner N, Dekant W: Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug metab. dispos.* 2005; 33: 1748-1757
27. Wetherill Y.B, Akingbemi B.T, Kanno J, McLachlan J.A, Nadal A, Sonnenschein C, Watson C.S, Zoeller R.T, Belcher S.M: *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. toxicol.* 2007; 24: 178-198
28. Vom Saal F.S, Welshons W.V: Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ. Res.* 2006; 100: 50-76
29. Mielke H, Gundert-Remy U: Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol. lett.* 2009; 190: 32-40
30. Benachour N, Aris A: Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol. appl. pharmacol.* 2009; 241: 322-328
31. Geens T, Roosens L, Neels H, Covaci A: Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere* 2009; 76: 755-760
32. Kataoka H: New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends anal. chem.* 2003; 22: 232-244
33. Brodnjak Vončina D: Analizna kemija II Zbirno gradivo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 2006
34. Toyooka T, Oshige Y: Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with coulometric detection. *Anal. sci.* 2000; 16: 1071-1076
35. Skoog D.A: Principles of instrumental analysis 1998; 5.izdaja: 281-302,550-588, 798-874
36. Li L, Wang J, Zhou S, Zhao M: Developement and characterization of an immunoaffinity monolith for selective on-line extraction of bisphenol A from environmental water samples. *Anal. chim. acta* 2008; 620: 1-7
37. Žorž M: HPLC, Samozaložba, Ljubljana, 1991: 5-154

38. Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H: Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *J. chromatogr., B, Biomed. sci. appl* 2000; 749: 17-23
39. Kümmerer K: *Pharmaceuticals in the Environment*, Springer, 2003
40. <http://www.biosense.com/comweb.asp?articulo=41&segment=3> , marec 2010
41. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo 2007, 178-183
42. Skoog D.A: *Fundamentals of analytical chemistry*, Souders Collage Publishing Orlando 1997; 8.izdaja: 973-985
43. Herrero H.E, Carabias M.R, Rodríguez G.E: Use of a bisphenol-A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with dioda array and tandem mass spectrometry. *Anal. chim. acta* 2009; 650: 195-201
44. <http://www.nxtbook.com/nxtbooks/phenomenex/2010catalog-us/index.php?startid=322#/20> , maj 2010
45. <http://www.phenomenex.com/cms400min/product.aspx?id=448>, maj 2010
46. <http://www.phenomenex.com/cms400min/product.aspx?id=429>, maj 2010
47. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209>, maj 2010
48. Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS System, Concepts Guide, Agilent Technologies, Maj 2009
49. Ion optics innovations for increased sensitivity in hybrid MS systems, Technical Overview, Agilent Technologies, Oktober 2007
50. http://www.jeolusa.com/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?EntryId=284&Command=Core_Download&PortalId=2&TabId=337, april 2010
51. http://www.jeolusa.com/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?Command=Core_Download&EntryId=282&PortalId=2&TabId=337, april 2010
52. Rodriguez M. S., López A.M.J, Barceló D: Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. chromatogr., A* 2004; 1045: 85-92
53. Ich harmonised tripartite guideline: Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), November 2005

54. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, maj 2001
55. Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Grenier-Loustalot M. F: Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. chromatogr., A* 2008; 1210: 84-91
56. Watabe Y, Kondo T, Morita M, Tanaka N, Haginaka J, Hosoya K: Determination of bisphenol A in environmental water samples at ultra-low levels by high-performance liquid chromatography with an effective on-line pretreatment device. *J. chromatogr. A* 2004; 1032: 45-49
57. Watabe Y, Kondo T, Imai H, Morita M, Tanaka N, Hosoya K: Reducing bisphenol A contamination from analytical procedures to determine ultralow levels in environmental samples using automated HPLC microanalysis. *J. anal. chem.* 2004; 76: 105-109
58. <http://www.diet-and-exercise-for-health.com/plastic-containers.html>, maj 2010
59. Wagner M, Oehlmann J: Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ. sci. pollut. res. int.* 2009; 16: 278-286