

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA PETEREC

**PRIMERJAVA VSEBNOSTI BISFENOLA A V PITNIH VODAH IZ
VODOMATOV IN RAZLIČNIH VODOVODNIH ZAJETIJ**

COMPARISON OF BISPHENOL A CONCENTRATIONS IN DRINKING WATERS
FROM BOTTLED WATER DISPENSERS AND DIFFERENT DRINKING WATER
SUPPLY PLANTS

Ljubljana, 2011

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farmacije, za nasvete in strokovno pomoč pri nastajanju diplomske naloge, ter doc. dr. Robertu Roškarju, mag. farmacije, za potrpežljivo in izdatno pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Prav tako bi se rada zahvalila družinskim članom in prijateljem za oporo in razumevanje, ki sem ju potrebovala v času izvedbe diplomskega dela, kot tudi v celotnem času mojega študija.

Izjava

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

Andreja Peterec

Ljubljana, april 2011

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farmacije

Član diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farmacije

VSEBINA

POVZETEK	5
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1 UVOD	7
1.1 ONESNAŽEVALA	7
1.2 BISFENOL A	10
1.2.1 UPORABA IN NAČINI VNOSA BPA.....	11
1.2.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI BPA.....	13
1.2.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI BPA	15
1.2.4 DERIVATI BPA	20
1.2.5 ANALIZNO DOLOČANJE BPA	22
1.2.5.1 Zagotavljanje kakovosti analize.....	22
1.2.5.2 Priprava vzorcev in ekstrakcija BPA	23
1.2.5.3 Analizne metode	27
2 NAMEN DELA	33
3 MATERIALI IN METODE	34
3.1 MATERIALI	34
3.1.1 VZORCI.....	34
3.1.2 STANDARDNA SPOJINA BISFENOLA A	35
3.1.3 INTERNI STANDARD (IS)	35
3.1.4 REAGENTI IN TOPILA	35
3.1.5 PRIBOR IN APARATURE.....	35
3.2 METODE	36
3.2.1 METODA SPE	36
3.2.2 METODA LC–MS/MS.....	38
3.2.3 PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN	39
3.2.3.1 Priprava metanolnih raztopin IS	39
3.2.3.2 Priprava metanolnih raztopin BPA	40
3.2.4 PRIPRAVA VODE BREZ BPA.....	40
3.2.4.1 Destilacija prečiščene vode.....	40
3.2.4.2 Filtracija prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre	41
3.2.4.3 Filtracija prečiščene vode skozi SPE kartuše	42
3.2.5 VREDNOTENJE METODE	43
3.2.5.1 Validacija na standardnih raztopinah BPA	43
3.2.5.2 Validacija na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v prečiščeni vodi.....	44
3.2.5.3 Vrednotenje validacijskih parametrov metod SPE in LC–MS/MS	45
3.2.6 ANALIZA VZORCEV	49
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	51
4.1 ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI ANALIZE.....	51
4.2 PRIPRAVA VODE BREZ BPA.....	51
4.2.1 Destilacija prečiščene vode.....	52
4.2.2 Filtracija prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre	52
4.2.3 Filtracija prečiščene vode skozi SPE kartuše	54
4.3 VREDNOTENJE METODE	54
4.3.1 Validacija na standardnih raztopinah BPA	54
4.3.2 Validacija na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v prečiščeni vodi.....	59
4.4 ANALIZA VZORCEV	63
4.4.1 Koncentracija BPA v vzorcih vodovodnih voda	63

4.4.2 Koncentracija BPA v vzorcih voda iz vodomatov.....	66
4.4.3 Koncentracija BPA v ostalih vzorcih.....	68
5 SKLEP	72
6 LITERATURA.....	75

POVZETEK

Bisfenol A je monomer za proizvodnjo polikarbonatne plastike in epoksi smol, ki se najpogosteje uporabljata za izdelavo plasten, embalaže za hrano in prevlek na notranji strani pločevink za hrano ter pijačo. Nahaja se povsod v naravnem okolju in v izdelkih, s katerimi je v stiku. To povzroča kronično izpostavitve človeka in živali nizkim koncentracijam bisfenola A. Uvrščamo ga med motilce endokrinega sistema, saj moti delovanje estrogenskega sistema.

Koncentracijo bisfenola A smo v vodnih vzorcih določali z metodo, ki je bila že vpeljana v okviru predhodno izvedenega diplomskega dela. Ker so se pri tem soočali s kontaminacijo vode z bisfenolom A, smo pri naši diplomski nalogi s postopki destilacije, filtracije skozi celulozno-acetatne filtre in skozi kartuše za ekstrakcijo na trdnem nosilcu poskušali zmanjšati koncentracijo bisfenola A v prečiščeni vodi. Zaradi slabše učinkovitosti vseh treh preskušanih postopkov nismo uporabili nobenega izmed njih. Pri pripravi standardnih raztopin pri validaciji smo uporabili prečiščeno vodo brez predhodnega postopka odstranjevanja bisfenola A.

Bisfenol A smo iz vodnih vzorcev izolirali s postopkom ekstrakcije na trdnem nosilcu in ga kvalitativno ter kvantitativno ovrednotili s tekočinsko kromatografijo s tandemsko spektrometrijo. Z validacijo smo potrdili, da je metoda ustrezna za določanje koncentracije bisfenola A v vodnih vzorcih v koncentracijskem območju od 2 do 300 ng/L, kar je zadostovalo za kvantifikacijo bisfenola A v naših vzorcih.

S potrjeno analizo metodo smo določili koncentracijo bisfenola A v desetih vzorcih voda iz različnih vodovodnih zajetij in desetih vzorcih voda iz vodomatov. Bisfenol A je bil v vodovodnih vodah prisoten v koncentracijskem območju od 2,1 do 23,6 ng/L, v vodah iz vodomatov pa v območju od 10,6 do 290 ng/L. Primerjali smo še koncentracijo bisfenola A v vzorcu gazirane in negazirane mineralne vode. V gazirani mineralni vodi je bila vsebnost bisfenola A za 26 % višja kot v vzorcu negazirane mineralne vode. Z dodatnimi poskusi smo ugotovili, da se pri segrevanju vode v plastičnih gospodinjskih grelnikih v vodo sproščajo zelo visoke količine bisfenola A. Ugotovili smo, da komercialna plastenka iz materiala brez bisfenola A v vodo odpušča manjše količine bisfenola A v primerjavi s plastenko iz polietilentereftalata, in da stik vroče vode s polistirenskimi lončki ne povzroči signifikantnega porasta koncentracije bisfenola A v vodi.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	acetonitril
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku
BPA	bisfenol A
DDT	dikloro difenil trikloroetan
EDC	motilci endokrinega sistema
ELISA	encimsko-immunski test na trdnem nosilcu
ER	estrogenski receptor
ESI	elektrozaprševalna ionizacija
GC	plinska kromatografija
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IS	interni standard
IUPAC	mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
LC	tekočinska kromatografija
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MM	molekulska masa
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
<i>m/z</i>	razmerje med maso in nabojem iona
NOAEL	mejna vrednost odmerka za opaženi neželeni učinek
PBDE	polibromirani difenilni etri
PC	polikarbonaten
PCB	poliklorirani bifenili
PET	polietilentereftalat
PVC	polivinilklorid
R ²	determinacijski koeficient
SF	stacionarna faza
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu
TF	tekoča faza
TM	telesna masa
UV	ultravijoličen

1 UVOD

1.1 ONESNAŽEVALA

Onesnaževala so snovi, ki se pojavljajo v okolju (v podtalnici, površinskih in pitnih vodah, sedimentih, zraku, hrani, itd.) in predstavljajo tveganje za zdravje ljudi in živali ter okolje. Najbolj problematične so relativno inertne snovi, ki se zaradi počasnega razgrajevanja akumulirajo v prehranski verigi (1). Maja 2004 je v svetovnem merilu stopila v veljavo Stockholmska konvencija, katere cilj je zaščita zdravja ljudi in okolja pred obstojnimi organskimi onesnaževali (persistent organic pollutants, v nadaljevanju označeno kot POPs). POPs so strupene in težko razgradljive organske snovi naravnega ali antropogenega izvora, ki se zaradi svoje obstojnosti kopičijo v maščobnem tkivu ljudi in živali ter v okolju. Prenašajo se po zraku in vodi daleč od kraja izpusta (2–4). Razdelimo jih v tri razrede (4):


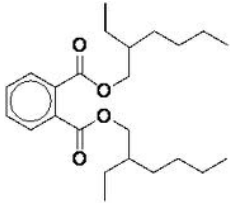
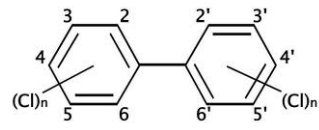
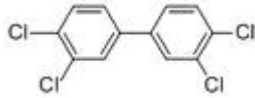
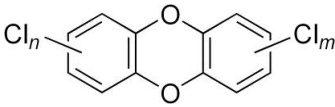
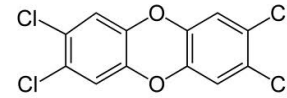
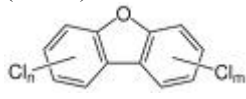
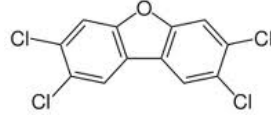
A – snovi, ki so predmet prepovedi,

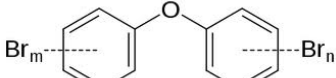
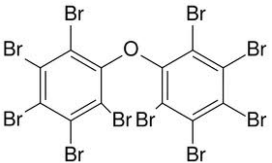
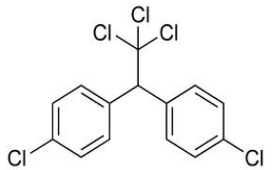
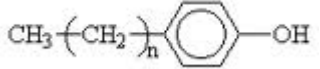
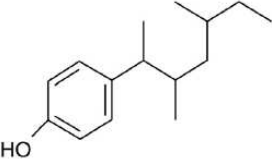

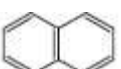
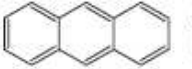
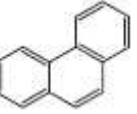
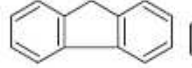

B – snovi, ki so predmet omejitev in

C – snovi, ki nastajajo nenamerno in so predmet nenehnega zmanjševanja.

Med POPs uvrščamo pesticide (DDT, aldrin, endrin, klordan, heksaklorobenzen, mireks, itd.), industrijske snovi (poliklorirani bifenili, polibromirani difenilni etri, perfluorirane spojine, itd.) in stranske produkte pri sežigu (dioksini, poliklorirani bifenili, itd.). Povzročajo raka, poškodbe centralnega in perifernega živčevja, reproduktivne, endokrine in imunske motnje (3). Onesnaževala se lahko v naravo sprostijo preko odtočnih voda iz komunalnih čistilnih naprav, tovarn, elektrarn, toplarn in sežigalnic, odplak iz streh, pločnikov, cest, kmetijskih površin ali pa so njihovi viri zavržena zdravila, odpadki in razlitja kemikalij (1, 2). Iz narave se odstranjujejo z abiotskimi kemijskimi procesi (kemijsko oz. fotokemijsko razgrajevanje) ali z biotskimi procesi razgrajevanja s pomočjo mikroorganizmov. Koncentracija onesnaževal v naravi se lahko zmanjša tudi s fizikalnimi procesi, pri katerih ne pride do kemijskih sprememb v strukturi onesnaževala (disperzija, razredčenje, sorpcija na sediment ali suspendirane delce). V kolikor se ne razgradijo dovolj hitro, lahko prehajajo iz zemlje v podtalnico in površinske vode, od tod pa v pitno vodo. Njihovo obnašanje v naravi je odvisno od fizikalno-kemijskih lastnosti (topnosti v vodi, parnega tlaka, polarnosti) (1). V Preglednici I so opisana onesnaževala, ki se poleg bisfenola A najpogosteje pojavljajo v naravi.

Preglednica I: Onesnaževala in njihova kemijska struktura, uporaba ter učinki na zdravje.

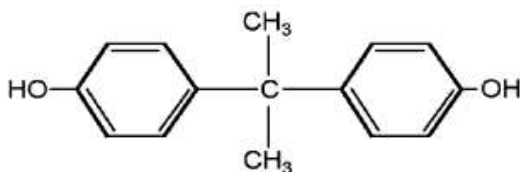
Onesnaževalo	Kemijska struktura	Uporaba in nahajališča	Učinki na zdravje
zdravila (5)	Nevarni predvsem: – citostatiki, imunosupresivi – antibiotiki, razkužila – hormoni – halogenirane spojine – spojine s težkimi kovinami	– zdravilne učinkovine – pomožne snovi – diagnostična sredstva – razkužila – veterinarska zdravila – rastni faktorji	Specifični učinki, npr. karcinogenost, mutagenost in embriotoksičnost (citostatiki, imunosupresivi)
ftalati (6–8)	 *DEHP (di(2-ethylheksil)ftalat): 	Plastifikatorji (PVC): – embalaža za hrano – platenke – igrače – kozmetični izdelki – pesticidi – gradbeni material – pohištvo – adhezivi Vnos: hrana, kozmetični izdelki	– antiandrogensko – motnje imunskega sistema – ščitnične motnje
poliklorirani bifenili (PCB) (7, 8)	 *3,3',4,4'-tetraklorobifenil: 	Industrija: – zaviralci gorenja – barve – plastika – adhezivi – maziva – tesnila Vnos: hrana živalskega izvora, predelana hrana	– estrogensko – nevrotoksičnost – motnje imunskega sistema – kognitivne motnje
dioksini (9)	•poliklorirani dibenzo-p-dioksini (PCDD):  *TCDD (dioksin):  •poliklorirani dibenzofurani (PCDF):  *2,3,7,8-tetraklorodibenzofuran: 	Stranski produkt pri: – sežiganju odpadkov (PVC) – beljenju papirja s klorom – proizvodnji pesticidov – požarih v naravi Vnos: hrana živalskega izvora, ki je bogata z maščobami	– karcinogenost – nevrotoksičnost – motnje imunskega sistema – reproduktivna in razvojna toksičnost

<p>polibromirani difenilni etri (PBDE) (7)</p>	 <p><i>*dekabromo difenilni eter:</i></p> 	<p>Zaviralci gorenja:</p> <ul style="list-style-type: none"> – plastika – tapete – gradbeni material – električne naprave (računalniki, TV-ji) <p>Vnos: hrana, vdihovanje</p>	<ul style="list-style-type: none"> – nevrotoksičnost – ščitnične motnje
<p>pesticidi (2, 7)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • organoklorini (DDT, klordan) • organofosfati (klorpirifos) • karbamati (karbaril) • piretroidi (piretrin, permetrin) <p><i>*DDT:</i></p> 	<p>Kmetijstvo, repelent, razkužilo, up. na domačih živalih:</p> <ul style="list-style-type: none"> – insekticidi – fungicidi – herbicidi <p>Dodatek preprogam, barvam, pohištvu, gradbenem materialu.</p> <p>Vnos: hrana, igrače, preproge (otroci)</p>	<ul style="list-style-type: none"> – antiandrogensko – antiestrogensko – estrogensko – nevrotoksičnost – ščitnične motnje – razvojna toksičnost
<p>alkilfenoli (7, 10)</p>	 <p><i>*nonilfenol:</i></p> 	<p>Plastifikatorji Surfaktanti (etoksilati):</p> <ul style="list-style-type: none"> – detergenti – razkužila – čistila – pesticidi <p>Vnos: hrana, vdihovanje, dermalna absorpcija</p>	<ul style="list-style-type: none"> – antiandrogensko – estrogensko
<p>policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) (1, 2, 11)</p>	<p><i>*benzo[a]piren:</i>  <i>*naftalen:</i> </p> <p><i>*antracen:</i>  <i>*fenantren:</i> </p> <p><i>*fluoren:</i>  <i>*piren:</i> </p> <p>...</p>	<ul style="list-style-type: none"> – nepopolno izgorevanje fosilnih goriv – industrijski procesi pri pomanjkanju kisika – obdelava živil pri visoki T in odsotnosti kisika – cigaretni dim – požari <p>– zdravstvo</p> <p>– proizvodnja barv,</p> <p>– plastike,</p> <p>– pesticidov</p> <p>Vnos: vdihovanje, hrana</p>	<ul style="list-style-type: none"> – karcinogenost – teratogenost
<p>težke kovine (12–14)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • arzen • kadmij • baker • živo srebro • svinec • nikelj • krom • cink 	<ul style="list-style-type: none"> – sestavina kamnin in zemlje – baterije – gospodinjska oprema – plastika – barve – črnilo – kozmetični izdelki – zdravila – pesticidi 	<ul style="list-style-type: none"> – karcinogenost – nevrotoksičnost – razvojna toksičnost – prebavne in – kognitivne motnje – poškodbe ledvic – ateroskleroza – fibroza

* označuje najbolj tipične predstavnike iz posamezne skupine

1.2 BISFENOL A

Bisfenol A (BPA) je industrijska kemikalija, ki je bila prvič sintetizirana leta 1891. Po obsegu proizvodnje spada med najbolj uporabljane snovi na svetu. Leta 2006 so proizvedli 3,9 milijonov ton BPA, uporaba še vedno strmo raste. Zaradi razširjene uporabe prehaja v vodno okolje (52 %), zemljo (25 %) in sedimente (23 %) in je eno izmed najpomembnejših okoljskih onesnaževal (15–17). BPA (2,2-bis(4-hidroksifenil)propan) je organska spojina iz dveh fenolnih obročev, povezanih z metilnim mostom, ki je substituiran z dvema metilnima skupinama (Slika 1). Sintetiziramo ga s kondenzacijo fenola in acetona pri nizkem pH-ju in visoki temperaturi v prisotnosti katalizatorjev. Topnost BPA v vodi (pri pH-ju 7) znaša od 120 do 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (18). Ker ima dve rahlo kisli fenolni skupini (pK_a 9,6 in 10,2), je bolj topen v bazičnem mediju. Lahko se adsorbira na sedimente in je slabo hlapen. Tališče ima pri 150–155°C, vrelišče pa pri 220°C (razgradnja). Nahaja se v obliki lusk, kosmičev ali kristalov (17, 19).



Slika 1: Kemijska struktura bisfenola A (15).

V vodi se BPA hitro biološko razgradi v aerobnih pogojih (razpolovni čas 14,5 dni), medtem ko je v anaerobnih pogojih stabilen. Njegova koncentracija v naravi se zmanjšuje tudi zaradi razredčevanja v vodi, adsorpcije na trdne delce oz. sedimente in fotodegradacije (17, 18). V komunalnih čistilnih napravah ga učinkovito odstranjujemo z biološko degradacijo v aerobnih pogojih z mikroorganizmi in njihovimi encimi (20). Učinkovitost odstranjevanja lahko povečamo s pre-anoksičnimi/anaerobnimi membranskimi bioreaktorji, ki odstranjujejo BPA z biodegradacijo in v manjši meri s sorpcijo. Zaradi podaljšanega zadrževanja blata v bioreaktorjih imajo mikroorganizmi in njihovi encimi na razpolago več časa za razgradnjo (21). Običajno pred izvedbo biodegradacije odpadno vodo oz. blato obdelamo termično, kemijsko ali mehansko. Manjša viskoznost in manjša velikost suspendiranih delcev povečajo dostop kisika in bakterijskih encimov ter adsorpcijo in desorpcijo BPA, kar poveča stopnjo in hitrost razgradnje pri biološki

obdelavi. Najbolj učinkovito odstranjevanje BPA dosežemo s fizikalno-kemijskimi procesi, npr. s svetlobno oksidacijo, Fentonovo oksidacijo in ozonacijo, vendar zahtevajo ti procesi dodatek katalizatorjev in oksidantov, kar poveča stroške ter prispeva k sekundarnemu onesnaženju. Po tem kriteriju so ugodnejše metode adsorpcije, ki BPA odstranijo mehansko (20). Preučevani adsorbentni materiali vključujejo anorganske adsorbente, kot so andezit, diatomejska zemlja, titanov dioksid, aktivirana belilna zemlja, Fe(III)/Cr(III) hidroksid, hidrofobni zeolit tipa Y, in organske adsorbente, ki temeljijo na ogljiku. Med slednje uvrščamo aktivirano oglje in ogljikove nanocevi (22). Za odstranjevanje BPA iz pitne vode je bilo izvedenih le nekaj študij (odstranjevanje z elektrokemijskimi procesi, fotooksidacijo in sorpcijo) zaradi nizkih koncentracij v vodi in posledično težav pri analiznem določanju. Kot obetavni metodi sta se izkazali membranski metodi nanofiltracije in reverzne osmoze (23).

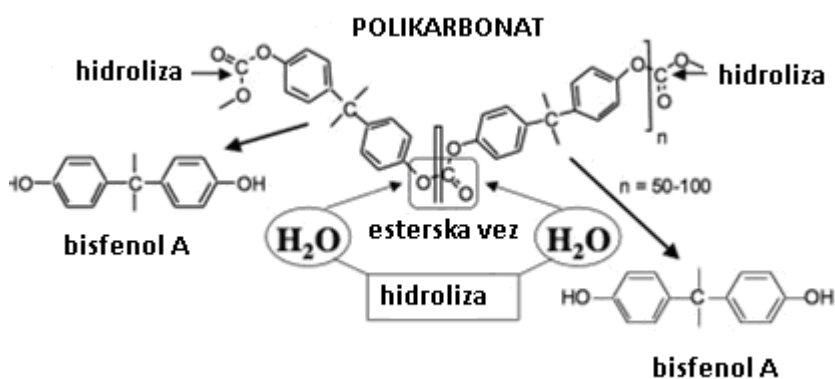
1.2.1 UPORABA IN NAČINI VNOSA BPA

BPA se največ uporablja pri proizvodnji polikarbonatne (PC) plastike in epoksi smol. PC plastika ima mnogo pozitivnih lastnosti, kot so čvrstost, trdnost, prozornost, odpornost na temperature med -40°C in 145°C in odpornost na mnoge baze ter kisline. Uporablja se za izdelavo gospodinjskih pripomočkov, posod za shranjevanje živil, plastenk za vodo, stekleničk za prehrano dojenčkov, namiznega pribora in vodovodnih cevi (16, 18). Epoksi smole, ki so izdelane iz BPA, se zaradi antikorozivnih lastnosti in lepljivosti uporabljajo kot prevleka na notranji strani pločevink za hrano, kot zaščitne prevleke in končni sloji, adhezivi in obloge za polivinilkloridne (PVC) cevi (18). BPA se v manjši meri uporablja pri sintezi zaviralcev gorenja, poliakrilatnih, polieteramidnih, sulfonskih in nenasičenih poliestrskih smol in kot antioksidant ali stabilizator v PVC (16, 24). Najdemo ga tudi v zobnih polnilih, barvah v prahu, avtomobilskih in optičnih lečah, gradbenih materialih, termičnem papirju, CD-jih, DVD-jih, električni ter elektronski opremi (15, 17, 18).

Vdihovanje visokih koncentracij BPA iz zraka in kontaktna izpostavljenost, ki povzroča alergični kontaktni dermatitis, je nevarna predvsem pri delavcih v tovarnah, ki proizvajajo izdelke iz BPA. BPA se nahaja v odpadnih vodah tovarn, v katerih ga proizvajajo, saj ga iz odpadnih voda ne uspejo popolnoma odstraniti. Odpadne vode so eden izmed glavnih virov BPA, ki onesnažujejo okolje, saj iz njih prehaja v podtalnico in površinske vode ter se veže na zemljo in sedimente (18). Iz odpadnih in površinskih vod prehaja tudi v pitno

vodo, ki je poleg kontaminirane hrane in pijače najpomembnejši način vnosa BPA v telo. Izmerjene koncentracije BPA v vodovodnih vodah so v območju od nekaj ng/L do 300 ng/L (25–27). Odvisne so od stopnje industrializacije območja in posledično od koncentracije v površinskih vodah ter učinkovitosti odstranjevanja BPA iz njih (27).

Glavni način vnosa BPA v telo je s hrano in pijačo, ki je v stiku z vsebniki, izdelanimi ali prevlečenimi s polimeri iz BPA. Na migracijo BPA iz vsebnikov vplivajo pogoji pri proizvodnem procesu (temperatura, čas segrevanja) in čas shranjevanja hrane ali pijače v vsebniku, saj se med shranjevanjem akumulira. Estrske vezi v PC plastiki so precej stabilne, vendar lahko pri visoki temperaturi in kislih ali bazičnih pogojih hidrolizirajo (Slika 2). Posledično se migracija BPA iz PC vsebnikov poveča zaradi segrevanja ali sterilizacije vsebnikov in stika s hrano oz. pijačo z bazičnim ali kislim pH-jem. Migracijo pospeši tudi pranje in ščetkanje vsebnikov, večja pa je tudi pri večkrat uporabljenih ali poškodovanih vsebnikih (15, 16, 18).



Slika 2: Hidroliza polikarbonatne plastike (36).

V literaturi navedene koncentracije BPA v vodah iz plastenk so praviloma višje kot v vodovodnih vodah. Običajno se koncentracije gibljejo v območju od 2 do 13 ng/L (16, 25), dosežejo pa tudi 300 ng/L (27). Koncentracija BPA je prav tako zvišana v vodi iz vodomatov na javnih mestih (Slika 3). Amiridou in sod. so določili koncentracijo BPA v vodi iz 20-litrskega vsebnika iz PC plastike, ki je znašala 112 ng/L (28), Zibelnik K pa je v vodi iz vodomata izmerila koncentracijo 209 ng/L (25). BPA se sprošča predvsem iz plastičnih vsebnikov, ki so označeni s simbolom 3 (PVC) ali 7 (PC plastika) (29). Pri daljšem shranjevanju vode in izpostavljanju vsebnika zvišanim temperaturam ali sončni svetlobi se koncentracija BPA v vodi zviša, zato je pomembno, da plastenke oz. balone iz

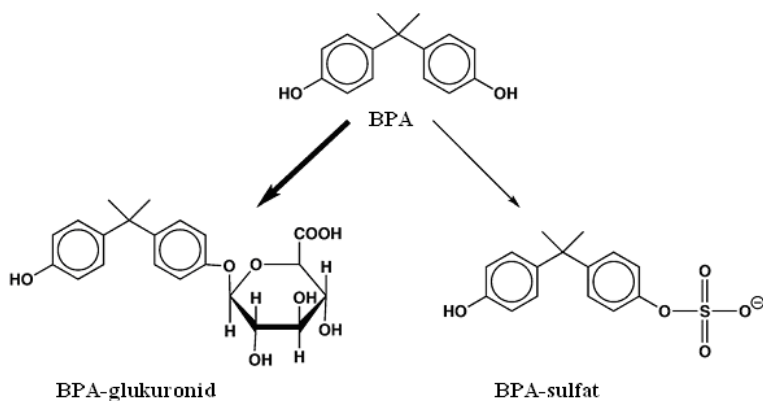
vodomatov pravilno shranjujemo in vzdržujemo (27, 28, 30–32). Veliko pozornosti se posveča otroškim stekleničkam iz PC plastike, v katerih pred uporabo segrejemo vodo ali mleko za pripravo otroške hrane. Segrevanje močno pospeši odpuščanje BPA, kar poveča vnos pri najbolj občutljivi populaciji (otroci do 18-ih mesecev starosti) (27). V Kanadi so marca 2010 že prepovedali uporabo PC otroških stekleničk (33). V Evropski uniji velja prepoved njihove proizvodnje od 1. marca 2011, prepoved uvoza in prodaje pa bo začela veljati junija 2011 (34).



Slika 3: Vodomat s PC zalogovnikom (vsebnikom, balonom), običajne prostornine 18,9 L (35).

1.2.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI BPA

Po peroralni aplikaciji se BPA hitro in učinkovito (več kot 95 % odmerka) absorbira v gastrointestinalnem traktu. V črevesni steni in jetrih sledi obsežen in hiter metabolizem prvega prehoda. Inaktivira se s pomočjo glukuronidacije z encimom uridin glukuronil transferaze (UGT2B15) do BPA-glukuronida in v manjši meri (10 %) s sulfonacijo do BPA-sulfata (Slika 4). Glukuronid in sulfat se izločita v urin, prosti BPA pa v feces. V krvi kot produkt metabolizma najdemo le glukuronid. Nobeden izmed metabolitov nima več estrogenske aktivnosti. V tkivih naj bi se zadržalo manj kot 1 % BPA, bioakumulacija pa je prisotna le v nosečnosti. Ker je BPA-glukuronid kot glavni metabolit dovolj specifičen in stabilen, ga uporabljajo kot biomarker za oceno izpostavljenosti BPA (18, 24, 36, 37).



Slika 4: Biotransformacija BPA do BPA-glukuronida in BPA-sulfata (24).

Posebno nevarna je izpostavljenost BPA na stopnji zarodka in med neonatalnim razvojem, saj endogeni hormoni med razvojem uravnavaajo rast in diferenciacijo celic, kar poveča občutljivost na spremembe nivojev hormonov in posledično tudi na prisotnost endokrinih motilcev (BPA) v njihovi krvi. Po peroralnem zaužitju BPA hitro prehaja posteljico in se porazdeli v matrine organe in plod. BPA se akumulira v posteljici, zato je koncentracija BPA v tkivu posteljice višja kot v materini in plodovi krvi. Ker je koncentracija encima UGT v jetrih ploda petkrat manjša kot v jetrih odraslega človeka, je nizek vnos BPA zaradi manj učinkovitega metabolizma in eliminacije bolj nevaren za plod kot za odraslega človeka (18, 36, 38).

BPA-glukuronid je dobro topen v vodi (njegov razpolovni čas je krajši od 6 ur), zato se hitro izloči iz krvi skozi ledvice z urinom. BPA se po peroralnem zaužitju iz telesa običajno izloči v 24-ih urah. Informacije o vnosu spojine skozi daljše časovno obdobje zaradi tega ne moremo dobiti. Zaradi hitrega metabolizma prvega reda doseže sistemski krvni obtok majhna količina BPA, zato so v krvi pričakovane nizke koncentracije proste spojine. Slednje zahteva uporabo zelo občutljivih metod za določanje BPA v krvi, pri čemer moramo paziti, da ne pride do kontaminacije vzorcev. Ker je koncentracija BPA v urinu višja, izpostavljenost običajno ocenjujemo s pomočjo urinskih vzorcev (biomonitoring). Za oceno dnevnega vnosa se je kot najbolj primeren izkazal pristop določanja celokupne količine izločenega BPA z urinom v časovnem intervalu 24-ih ur. Koncentracija BPA v naključnem urinu je pokazatelj nedavne izpostavljenosti BPA, nanjo pa vpliva tudi pogostost prehranjevanja, hitrost nastajanja urina in čas, ki je pretekel od

zadnjega zaužitja hrane oz. uriniranja do vzorčenja. Običajno znaša koncentracija BPA-glukuronida v urinu od 1 do 3 µg/L (24).

Dnevno izpostavljenost lahko določamo tudi na podlagi podatkov o koncentraciji BPA v posamezni vrsti hrane oz. pijače, količine zaužite le-te in pogostosti prehranjevanja pri posamezni starostni skupini. Na seji Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) in Svetovne zdravstvene organizacije (WHO), ki je novembra 2010 ocenjevala toksikološko in zdravstveno tveganje BPA, so na osnovi najbolj zanesljivih objavljenih ocen izpostavljenosti zaključili, da povprečni dnevni vnos BPA s hrano in pijačo pri odraslih znaša manj kot 0,01 do 0,40 µg/kg telesne mase (TM) in pri otrocih ter najstnikih 0,1 do 0,5 µg/kg TM (39). Takšna izpostavljenost se nahaja močno pod največjim dovoljenim peroralnim vnosom BPA oz. referenčnim odmerkom (RfD), ki ga določa Agencija za zaščito okolja ZDA in prav tako pod mejo največjega dovoljenega dnevnega vnosa (tolerable daily intake, TDI), ki ga v Evropi določa Evropska agencija za varnost hrane. Trenutno veljavni RfD in TDI znašata 50 µg/kg TM/dan (19). Čeprav meje RfD in TDI ter migracije v hrano (0,6 mg/kg oz. 6 ppm) običajno niso presežene, pa se lahko neželeni endokrini vplivi BPA kažejo že pri znatno nižjih odmerkih. Nizki odmerki (0,002–0,2 µg/kg TM/dan) naj bi pri živalih vplivali, predvsem pri izpostavljenosti med zgodnjim razvojem (gestacijo, laktacijo), na hitrost rasti, spolno dozorevanje, funkcijo reproduktivnih organov, razvoj preneoplastičnih sprememb v mlečnih žlezah in prostati, plodnost, encimsko aktivnost, imunsko funkcijo, možgansko strukturo in vedenje. Krivulja odvisnosti učinka od odmerka ima obliko črke 'U', ki je sicer značilna za hormone, zato so nekateri učinki vidni le pri nižjih odmerkih. Tega pri izdelavi ocene tveganja za BPA niso upoštevali, saj so testirali le visoke odmerke. Problem predstavljajo tudi študije, financirane s strani industrije, ki so bile neprimerno izvedene ali pa so napačno interpretirale rezultate. Zaradi teh razlogov so bile predlagane nove raziskave in ponovno ocenjevanje tveganja za BPA (18, 19, 39, 40).

1.2.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI BPA

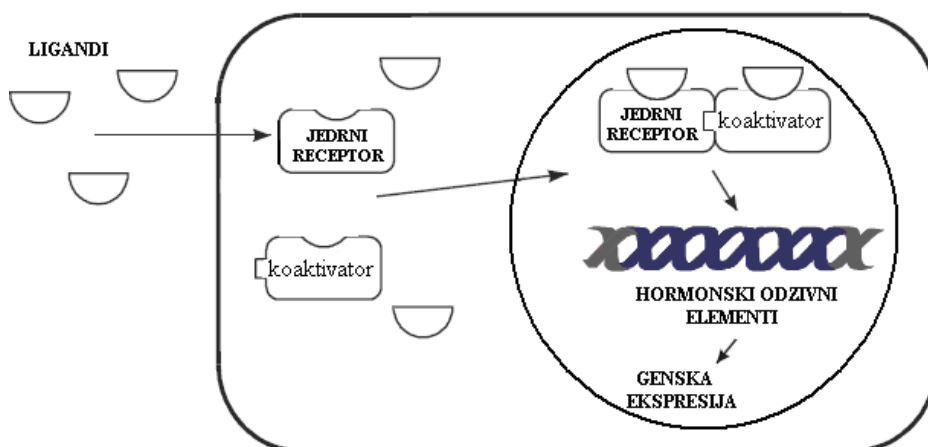
Zvišana koncentracija BPA v človeškem urinu je povezana z ovarijsko disfunkcijo, hiperplazijo endometrija, splavom, zmanjšano kvaliteto semenske tekočine, srčno-žilnimi boleznimi, sladkorno boleznijo tipa 2, debelostjo in zvišano katalitično koncentracijo jetrnih encimov (20, 24, 39, 41). Prenatalna izpostavljenost, predvsem v zgodnji

nosečnosti, lahko povzroči kasnejšo povečano agresivnost in hiperaktivnost pri otrocih (39). Kot antagonist na androgenskih receptorjih moti sintezo testosterona in zato povzroča proliferacijo človeških rakavih celic prostate. Isti učinek povzroča tudi zaradi agonističnih učinkov na mutirani obliki androgenskih receptorjev, ki so prisotni v nekaterih tumorjih prostate. Nasprotuje tudi delovanju ščitničnih hormonov (38, 42). Ima nizko akutno toksičnost (NOAEL pri podganah in miših znaša 5 mg/kg TM/dan), ni genotoksičen niti imunotoksičen, za dokaz karcinogenosti pa ni dovolj zanesljivih podatkov (39).

Najpomembnejši škodljivi učinki BPA so posledica njegove interakcije z estrogenskim sistemom. V nadaljevanju je natančneje opisano delovanje estrogenskega sistema in mehanizem delovanja BPA kot motilca estrogenskega sistema.

Endokrini sistem in jedrni receptorji

Endokrini sistem je nadzorni sistem žlez z notranjim izločanjem (endokrine žleze), ki v kri izloča obveščevalne molekule, imenovane hormone (43). Hormoni po krvi potujejo do tarčnega organa, kjer se vežejo na specifične hormonske receptorje in povzročijo specifični hormonski odziv (42). Naloga endokrinega sistema je vzdrževanje homeostaze, nadzor rasti, razmnoževanja, metabolizma, razvoja in vedenja (43). Ključno vlogo pri delovanju endokrinega sistema imajo jedrni receptorji, ki imajo funkcijo transkripcijskih faktorjev (44). Naddružina jedrnih receptorjev je skupina 48-ih receptorjev, ki so udeleženi pri številnih fizioloških funkcijah pri evkariontih. Ko se specifični ligand veže na jedrni receptor, se spremeni njegova konformacija in z vezanim ligandom (običajno v obliki dimera) potuje v jedro. V jedru se veže na ustrezen element DNA in sproži izražanje genov (Slika 5) (8).



Slika 5: Splošni mehanizem signalne poti jedrnih receptorjev (8).

Jedrne receptorje lahko glede na ligande, ki se vežejo nanje, razdelimo v tri podrazrede (8):

- tip I: vežejo steroidne hormone; progesteronski, estrogenski, androgenski, glukokortikoidni in mineralokortikoidni receptor,
- tip II: receptor za vitamin D, tiroidni, retinoidni, *all-trans*-retinoidni, peroksisom proliferator aktivirani in aril hidrokarbon receptor,
- tip III: receptorji sirote, katerih endogeni ligandi še niso poznani.

Estrogenski sistem

Estrogeni so steroidni hormoni, ki imajo ključno vlogo pri hormonski regulaciji in signaliziranju. Glavni endogeni hormoni so 17β -estradiol, estron in estriol. Sintetizirajo se v celicah jajčnikov, v manjšem obsegu pa tudi v posteljici, skorji nadledvične žleze in perifernih maščobnih tkivih. Odgovorni so za metabolične, vedenjske in morfološke spremembe v različnih stopnjah reprodukcije. Udeleženi so tudi pri kostni tvorbi in uravnavanju homeostaze organizma, kardiovaskularnega sistema ter vedenja. V manjših količinah nastajajo tudi pri moških, pri teh uravnavajo sintezo, transport in koncentracijo semenske tekočine ter anabolično aktivnost androgenov. Sintezo estrogenov uravnava hipotalamus-hipofizna os. Estrogeni se vežejo na estrogenske receptorje (ER). V sesalcih obstajata dva različna podtipa ER (ER α in ER β), ki imata enako afiniteto do estradiola. Nahajajo se pri obeh spolih v številnih tkivih (v dojkah, jajčnikih, možganih, jetrih, kosteh, kardiovaskularnem sistemu, nadledvičnih žlezah, modih, prostati, urogenitalnem in gastrointestinalnem traktu), zato lahko vnos eksogenih snovi, ki imajo estrogenu podobne učinke, tako pri ženskah kot tudi pri moških povzroči širok spekter negativnih učinkov (8).

Motilci endokrinega sistema

Fiziološki ligandi na jedrnih receptorjih so nizkomolekulske molekule (hormoni), ki so strukturno podobne mnogim onesnaževalom, zato so jedrni receptorji zelo dovzetni za modulacijo s ksenobiotiki. Motilci endokrinega sistema (EDC) so naravne ali sintetične snovi, ki oponašajo ali zavirajo delovanje endokrinega sistema živali ali ljudi. Vplivajo na sintezo, izločanje, transport ali vezavo naravnih hormonov, kot so estrogen, testosteron in/ali ščitnični hormoni. Povzročajo številne škodljive učinke, kot so imunosupresija, endokrine motnje, karcinogeneza, razvojne motnje, reproduktivne motnje (8, 43), itd.

Razdelimo jih v več razredov (8, 43, 45):

- hormoni (naravni in sintetični estrogeni in steroidi; estradiol, etinilestradiol),
- zdravila in produkti za osebno nego (acetaminofen, hidrokodon, diklofenak),
- industrijske snovi (BPA, ftalati, PCB, PBDE, nonilfenol, parabeni),
- pesticidi (artrazin, DDT, procimidon),
- stranski produkti pri gorenju (dioksin),
- dodatki v bencinu (dialkil etri, metil 4-butil eter),
- nekatere kovine (arzen, kadmij),
- naravne spojine (fitoestrogeni, mikotoksini).

Na splošno motilci endokrinega sistema delujejo preko receptorskega ali nereceptorskega mehanizma. Po receptorskem mehanizmu se vežejo na receptor, kar povzroči aktivacijo odzivnih elementov jedrne DNA in posledično povečanje ekspresije jedrnih genov (agonistični učinki). Interakcija z receptorji pa lahko povzroči zmanjšano sposobnost vezave receptorjev na DNA in na takšen način zavira receptorsko aktivnost (antagonistični učinki). Kadar snov spremeni nivo tkivnih encimov, ki so udeleženi pri sintezi ali razgradnji naravnega liganda na receptorju, govorimo o nereceptorskem oz. indirektnem mehanizmu delovanja EDC. V to kategorijo uvrščamo tudi interakcije ksenobiotika s proteini, ki vežejo hormone in s tem motijo transport hormonov ter vpliv ksenobiotika na komunikacijo med receptorji. Možna tarča, preko katere ksenobiotiki vplivajo na proizvodnjo steroidnih hormonov, je tudi hipotalamus-hipofizna os (8).

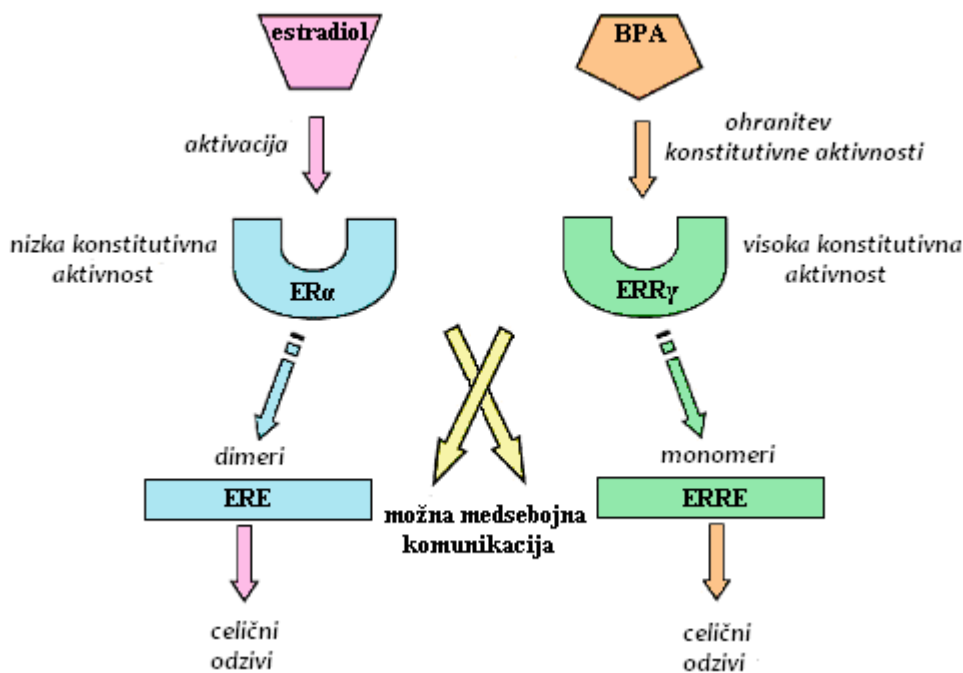
Motilci estrogenskega sistema

Ksenoestrogeni so eksogeni motilci estrogenskega sistema. Razdelimo jih na sintetične spojine in fitoestrogene. Med sintetične ksenoestrogene štejemo dietilstilbestrol, 17 α -etinilestradiol, BPA, poliklorirane bifenile in njihove hidroksilirane metabolite, ftalate, 4-nonilfenol, 4-terc-oktilfenol, steroide in tributilin. Vse našteje spojine so prisotne v rekah ter prav tako v pitnih vodah, saj jih čistilne naprave ne odstranijo popolnoma (44). Fitoestrogeni so naravne spojine, ki so podobne estrogenu in se pojavljajo v številnih rastlinah in gobah. To so izoflavoni iz soje (genistein, daidzein, formononetin, biochanin A), kumestani iz družine križnic (kumestrol) in lignani iz lanenega semena (42).

Ksenobiotiki z estrogensko aktivnostjo se vežejo na ER. Nastali kompleks aktivira na estrogen odzivne elemente DNA (estrogen responsive element, ERE). Ksenobiotiki z antiestrogensko aktivnostjo pa nasprotno motijo vezavo ER na DNA (8). Izpostavljenost

spojinam z estrogensko in antiestrogensko aktivnostjo raziskovalci povezujejo z motnjami reprodukcije, povečano incidenco za raka na dojkah, maternici in testisih, zakasnelo puberteto, zmanjšano kvaliteto in volumnom semenske tekočine, razvojnimi nepravilnostmi moškega reproduktivnega sistema in z moško neplodnostjo (8, 44).

Številne študije kažejo, da je BPA udeležen v kompleksnih biokemijskih in molekularnih interakcijah, ki vključujejo klasične ER in tudi mnogo drugih receptorskih sistemov in molekularnih tarč. Je endokrini motilec s šibko estrogensko aktivnostjo in selektivni modulator estrogenskih receptorjev (selective estrogen receptor modulator, SERM) s tkivno specifičnimi učinki (39). Veže se na človeške estrogenske (agonističen vpliv) in androgenske (antagonističen vpliv) receptorje, vendar je vezava nanje pri nizkih koncentracijah zelo šibka (1.000–10.000-krat šibkejša od naravnih hormonov). V zadnjih nekaj letih so ugotovili, da se BPA močno veže na receptorje, imenovane estrogenskim sorodni receptorji γ (estrogen-related receptor γ , ERR γ). Nanje se veže s kar 80 do 100-krat večjo selektivnostjo kot na ER. ERR so jedrni receptorji sirote, ki so strukturno in funkcionalno sorodni ER. Njihov naravni ligand še ni poznan. Vežejo se na ERE in na ERR odzivne elemente (ERR responsive element, ERRE). Delimo jih v 3 poddružine: ERR α , ERR β in ERR γ . ERR γ so med razvojem prisotni v možganih in posteljici sesalcev, pri odraslih pa v možganih, pljučih in v ostalih tkivih. Delujejo kot konstitutivni aktivator transkripcije z vlogo diferenciacije in zorenja fetalnih možganov. Konstitutivna aktivnost ERR γ (sposobnost receptorja, da sproži biološki odziv v odsotnosti liganda) je zelo visoka in sicer kar 25-krat večja od konstitutivne aktivnosti ER α . Vezava BPA na ERR γ daje dobro korelacijo med odmerkom in učinkom, vendar se po vezavi konstitutivna aktivnost receptorja ne spremeni. Estrogensko aktivnost BPA si zato lahko razložimo na dva načina. Prvi predvideva, da vezava BPA na ERR γ upočasni metabolizem ERR γ in tako podaljša njegovo transkripcijsko aktivnost. Drugi mehanizem pa upošteva komunikacijo med ERR γ in ER α sistemom: BPA se veže na ERR γ in nastali kompleks v monomerni obliki interagira z ERRE in sproži celični odziv, ki pa ni večji kot v odsotnosti BPA. Prav tako se lahko kompleks v dimerni obliki veže na ERE, kjer interagira z dimernim kompleksom estradiol-ER α , pri čemer pa nastali heterodimeri med sabo interferirajo in tako regulirajo (povečajo) celokupni estrogenski odziv (Slika 6) (46).



Slika 6: Eden izmed predvidenih mehanizmov estrogenskega delovanja BPA (46).

1.2.4 DERIVATI BPA

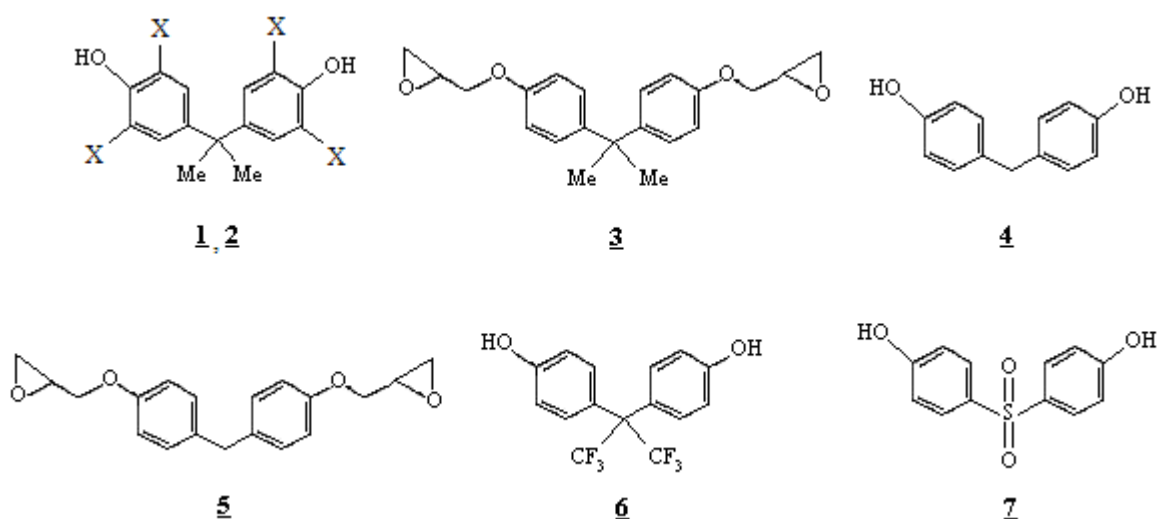
Okolje onesnažujejo tudi derivati BPA. Le-ti so prav tako nevarni za zdravje živali in ljudi ter okolje (Slika 7). Najpomembnejša sta halogenirana derivata BPA, t.j. tetrabromobisfenol A (TBBPA) in tetraklorobisfenol A (TeCBPA), ki se uporabljata kot zaviralca gorenja in se iz različnih polimerov sproščata v okolje. TBBPA in TeCBPA sta bolj toksična kot BPA in prav tako izkazujeta šibko estrogensko delovanje. Na ščitničnih receptorjih delujeta kot agonista ali antagonista. TBBPA, ki je najpogosteje uporabljeni zaviralec gorenja na svetu, se je v *in vitro* študijah izkazal tudi kot imunotoksičen in nevrotoksičen. Pogosto ga najdemo v avtomobilskih delih, embalaži, pohištvu, električnih in elektronskih napravah, gradbenih materialih, športni opremi (47–49).

Bisfenol A diglicidil eter (BADGE) je tekoča snov, ki jo pridobivamo s kondenzacijo dveh molekul epiklorhidrina z eno molekulo BPA. Uporablja se kot prekursorski monomer pri proizvodnji epoksi smol ali pa kot dodatek, stabilizator ali plastifikator v drugih plastičnih materialih (50). Pri visokih temperaturah se začne epoksi smola iz prevlek na notranjih površinah pločevink razgrajevati in prihaja do odpuščanja BPA in BADGE. BADGE je iritant, karcinogen in mutagen, saj so epoksi funkcionalne skupine zelo reaktivni alkilanti in se lahko kovalentno vežejo na DNA molekule. Potencialna tarčna mesta so centralni

živčni sistem, jetra in ledvice. Epoksi smole lahko pridobivamo tudi iz bisfenola F (BPF) in kot stabilizator dodajamo bisfenol F diglicidil eter (BFDGE) (51). BPF se kot monomerna izhodna substanca prav tako uporablja pri proizvodnji PC plastike, obloge na izdelkih pa so lahko izdelane tudi iz kombinacije smol iz BPA in BPF. Koncentracija BPF v okolju je zaradi skromnejše uporabe nižja od koncentracije BPA (6). BPF ima estrogensko delovanje in je genotoksičen, BFDGE pa je zaradi genotoksičnosti od leta 2005 prepovedan (52).

Bisfenol AF (BPAF, heksafluorobisfenol A) se uporablja za sintezo CF₃-vsebujočih polimerov z izboljšanimi kemijskimi, termičnimi in mehanskimi lastnostmi. Je endokrini motilec, saj se 20-krat močneje kot BPA veže na ER α receptorje (agonistično delovanje) in 48-krat močneje na ER β receptorje (antagonistično delovanje). Zaradi močne vezave na ER moti fiziološke procese rasti in razvoja ter gensko regulacijo v tkivih reproduktivnega sistema, centralnega živčnega sistema in okostja (53).

Bisfenol S (BPS) sintetiziramo s kondenzacijo dveh molekul fenola z eno molekuljo žveplove kisline. Uporablja se pri proizvodnji smol in plastike ter termičnega papirja. Je zelo obstojen na visoko temperaturo in sončno svetlobo, zato se njegova uporaba povečuje. Izkazuje estrogensko aktivnost, ki je primerljiva z BPA (54).



Slika 7: Strukture derivatov BPA: tetrabromobisfenol A (X = Br; **1**), tetraklorobisfenol A (X = Cl; **2**), bisfenol A diglicidil eter (**3**), bisfenol F (**4**), bisfenol F diglicidil eter (**5**), bisfenol AF (**6**), bisfenol S (**7**).

1.2.5 ANALIZNO DOLOČANJE BPA

1.2.5.1 Zagotavljanje kakovosti analize

Zaradi izgub analita (BPA) pri pripravi vzorca in nihanja odziva instrumenta je pri določanju koncentracije BPA v vzorcu zelo pomembna uporaba ustreznega internega standarda (IS). Običajno se uporabljajo standardi stabilnih izotopov BPA-d₁₆, ²H-BPA ali ¹³C-BPA, saj imajo enake fizikalno-kemijske lastnosti kot BPA. Ti standardi se lahko uporabljajo samo, kadar se za detekcijo uporablja masni spektrometer. Pri drugih načinih detekcije je potrebno dodatno zagotavljanje kakovosti (24).

Zaradi vseprisotnosti BPA v okolju se pri vzorčenju, shranjevanju, pripravi in analizi vzorca pojavlja kontaminacija z BPA v območju ng/L. Samo SPE kartuše lahko zaradi odpuščanja BPA, ki verjetno izvira iz proizvodnega procesa, povzročijo kontaminacijo s koncentracijo 40 ng/L. Ostali viri vnosa BPA v vzorec so voda za pripravo vzorca, topila, reagenti, kapilarni sistem HPLC, onečiščena steklovina, plastični vsebniki in druga laboratorijska oprema (16). Zaradi tega lahko predvsem pri določanju BPA v vzorcih z nizko vsebnostjo določimo lažno zvišane koncentracije (24). Glavni načini za preprečevanje kontaminacije vzorcev so: segrevanje steklovine 4 ure pri 400°C, spiranje materialov z ustreznimi topili, uporaba steklenih vsebnikov in opreme namesto plastične, čiščenje topil in spiranje SPE kartuš z vsaj 15 mL metanola (16, 24).

Kadar je preiskovani analit v nizkih koncentracijah prisoten vsepovsod v okolju in slepi vzorci matriksa niso na voljo, je težko izvesti kalibracijo instrumenta v nizkem koncentracijskem območju. Koncentracija BPA v mnogih vzorcih je blizu meje detekcije in kvantifikacije, zato je potrebno pripraviti vodo (slepi vzorec), ki ne vsebuje BPA (BPA-free water) in jo lahko uporabimo pri pripravi umeritvene premice v nizkem koncentracijskem območju (24). Raziskovalci so z uporabo zelo občutljivih metod določili, da voda, ki je prečiščena z Milli-Q sistemom, ni ustrezna, saj vsebuje od 10 do 200 ng/L BPA. Viri kontaminacije so plastični deli sistema (16, 25, 47). Tudi demineralizirana, vodovodna in ultračista voda vsebujejo nizke koncentracije BPA v vrednosti približno 2 ng/L (25). V literaturi navedeni način odstranjevanja BPA iz vode je filtracija vode skozi različne filtracijske sisteme (npr. na osnovi ekstrakcije na trdnem nosilcu), navedena pa je tudi uporaba komercialno dostopne vode visoke čistosti (26, 27, 55–57). Z uporabo najlonskih in celuloznih membranskih filtrov z velikostjo por 0,45 µm lahko odstranimo do 90 % BPA (47).

1.2.5.2 Priprava vzorcev in ekstrakcija BPA

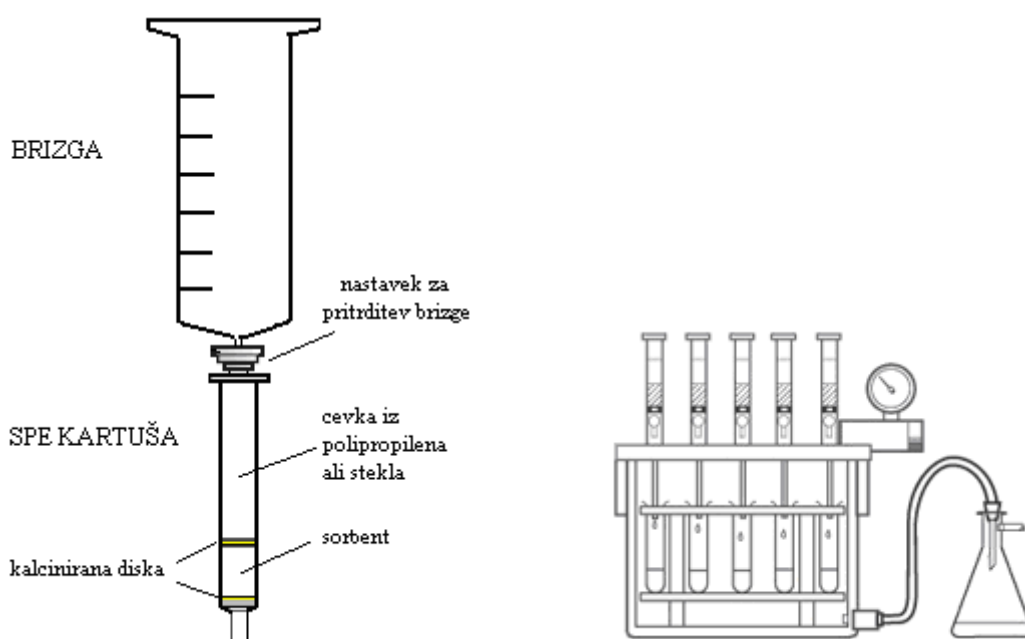
BPA določamo v različnih vzorcih (v hrani, krvi, urinu, tkivih, vodi, okoljskih vzorcih), le-te pa je potrebno pred analizo ustrezno pripraviti. Trdne vzorce hrane je potrebno homogenizirati ali liofilizirati, tekoče pa filtrirati, centrifugirati ali oboriti proteine (16). Biološke vzorce (kri, urin) lahko pred analizo obdelamo z encimom glukuronidazo in/ali sulfatazo, da cepimo metabolite BPA in nato določamo prosti BPA, ki je vsota prostega in konjugiranega BPA. S specifičnimi metodami lahko določamo le BPA-glukuronid ali pa v vzorcu določimo le koncentracijo prostega BPA. Zaradi stabilnosti konjugatov je zelo pomembno tudi ustrezno shranjevanje bioloških vzorcev. Običajno jih je potrebno takoj po odvzemu zamrzniti (24). Če okoljski vzorci vsebujejo suspendirane delce (npr. vzorci odpadnih voda ali rečne vode), jih je potrebno predhodno centrifugirati in/ali filtrirati (58). Sledi izolacija in koncentriranje BPA, kar je prvi korak pri pripravi bistrega vodnega vzorca (59). Najpogosteje se uporabljata ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE) ali mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (SPME) (59), ki sta enostavnejši in zahtevata manjšo količino organskih topil kot standardna tekočinska ekstrakcija (26). Ekstrakciji BPA sledi uparjanje topila in raztapljanje ostanka v ustreznem mediju ter analizo določanje koncentracije BPA (16).

Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)

Priprava vzorca z omenjeno tehniko je hitra in enostavna (59). Temelji na trdnih sorbentih, ki selektivno adsorbirajo analit (43). Analit se porazdeli med tekočo fazo (vzorcem) in trdno fazo zaradi nepolarnih, polarnih ali ionskih interakcij (60). Po vezavi analita z organskim topilom speremo kolono, da odstranimo ostale prisotne snovi, nato pa eluiramo tarčni analit (61, 62). Prednosti SPE pred standardnim postopkom tekočinske ekstrakcije z organskim topilom so: večja ponovljivost in učinkovitost koncentriranja, manjša poraba topil, ni problema penjenja ali nastanka emulzije, krajši čas izvedbe, enostavnost in možnost avtomatizacije procesa (60). Pri uporabi reverznofaznih sorbentov z alkilnimi verigami C₈ ali C₁₈ je pomembno, da se sorbent pred nanosom vzorca ne posuši, sicer lahko pride do nizke in variabilne ponovljivosti metode (26).

Trdni sorbent se običajno nahaja med dvema kalciniranima diskoma (t.i. fritama s porami velikosti 20 µm, ki sta iz polietilena, teflona ali nerjavečega jekla) v majhnih steklenih ali polipropilenskih cevkah, ki so podobne manjšim kromatografskim kolonom, redkeje pa v obliki diskov s filtracijskim aparatom (Empore diski) (43, 62). Pri navadnih trdnih fazah v

cevkah (SPE kartuše) je potrebno analit eluirati z organskim topilom, ga nato upariti do suhega in ostanek raztopiti v HPLC mobilni fazi. Prednost diskov je povečana hitrost pretoka in možnost izvedbe elucije s HPLC mobilno fazo, ki jo direktno injiciramo v HPLC sistem in tako porabimo manj organskega topila (60, 63). Kadar izvajamo ekstrakcijo večjih vzorcev, lahko za zmanjšanje frekvence dovajanja vzorca na kartuše namestimo brizge, ki omogočajo aplikacijo večjega volumna vzorca naenkrat (62). Pretok vzorca uravnavamo z vakuumskimi črpalkami, ki jih priklopimo na kadičke za izvedbo SPE (Slika 8) (43).



Slika 8: SPE kartuša z brizgo za aplikacijo večjega volumna vzorca (levo) in kadička za izvedbo SPE z vakuumsko črpalko za uravnavanje pretoka vzorca (desno) (62, 64).

Pri izvedbi SPE so ključnega pomena izbor primerne trdnega sorbenta, ki specifično veže tarčni analit, in uporaba ustreznih topil za spiranje in elucijo (43). Preglednica II prikazuje tipe sorbentov in interakcije, ki jih z njimi tvorijo analiti (62). Upoštevati je potrebno tudi adsorpcijske parametre, kot sta adsorpcijska kapaciteta in čas stika. Število prostih mest na sorbentu mora biti večje od števila molekul analita v vzorcu, da ne presežemo kapacitete sorbenta. Hitrost pretoka vzorca mora omogočiti minimalni čas stika med analitom in sorbentom (43).

Preglednica II: Tipi SPE sorbentov in interakcije z analiti (62).

Tip sorbenta	Sorbent	Tekoča faza (TF) in analit	Interakcije analit – sorbent
Reverznofazni	<u>Nepolaren:</u> – silikagel z alkilnimi (C ₄ , C ₈ , C ₁₈) ali arilnimi (fenilnimi) verigami – polimerni sorbenti (stiren-divinilbenzen)	– polarna TF (voda) – nepolaren ali srednje polaren analit	<u>Hidrofobne:</u> – nepolarno-nepolarno – van der Waalsove
Normalnofazni	<u>Polaren:</u> – silikagel s polarnimi sk. (CN, NH ₂ , diol) – silikagel – Mg-silikat (Florisil) – Al-oksidi (Alumina)	– nepolarna ali srednje polarna TF (acetona, klorirana topila, heksan) – polaren analit	<u>Hidrofilne:</u> – polarno-polarno – vodikove vezi – π - π – dipol-dipol – dipol-induciran dipol
Ionsko-izmenjevalni	<u>Anionsko-izmenjevalni:</u> – kvarterni amini – amini <u>Kationsko-izmenjevalni:</u> – sulfoni – karboksilne skupine	– TF: vodna raztopina z ustreznim pH-jem – neg. ali poz. nabit analit	<u>Elektrostatske</u>
Adsorpcijski	Nemodificiran sorbent	/	<u>Hidrofobne in hidrofilne</u> (odvisno od vrste sorbenta)

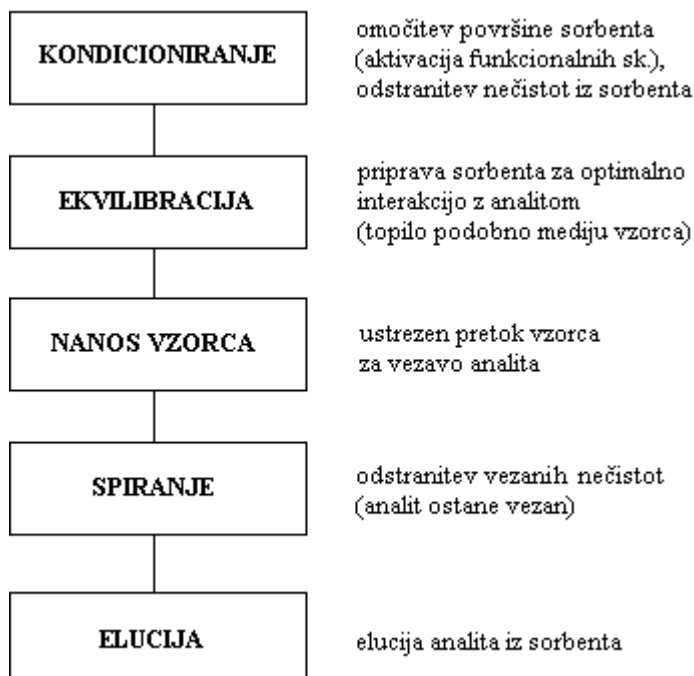
/ – ni podatka

Za določanje BPA so na voljo neselektivni in selektivni sorbenti. Najpogosteje se uporablja neselektivni sorbent divinilbenzen/N-vinilpirolidon kopolimer (Oasis[®] HLB), katerega prednosti so visoka specifična površina, stabilnost v širokem pH-območju in dopuščanje posušitve sorbenta med ekstrakcijo. Ostali neselektivni sorbenti vključujejo površinsko obdelani kopolimer stiren-divinilbenzen (Strata-X), reverznofazni silikatni C18 sorbent in multi-mode SPE sorbent s kationskimi, anionskimi in nepolarnimi funkcionalnimi skupinami. Selektivni sorbenti se uporabljajo za določanje BPA v kompleksnejših vzorcih hrane, v katerih je BPA prisoten v zelo nizkih količinah. To so sorbenti RAM (restricted access materials), katerih pore prekriva reverznofazni sloj iz verig C₄, C₈ ali C₁₈, površina pa je modificirana s hidrofilnimi skupinami (gliceril-propil), ki preprečujejo dostop makromolekulam v notranjost por, imunosorbenti s kovalentno vezanimi protitelesi in sorbenti MIPs (molecularly imprinted polymers), le-ti so sintetični polimeri s sposobnostjo prepoznavanja tarčnega analita (16).

Strata-X je reverznofazni sorbent s površinsko obdelanim kopolimerom stiren-divinilbenzenom, ki ima vezane obroče N-vinilpirolidona. Ti omogočajo tvorbo π - π interakcij, vodikovih vezi, dipol-dipol in hidrofobnih interakcij s polarnim ali nepolarnim analitom, kot kaže Slika 9 (63). Delci sorbenta so veliki 33 μm , pore 85 \AA , specifična površina pa znaša 800 m^2/g . Primeren je za ekstrakcijo kisljih, bazičnih in nevtralnih analitov, saj je stabilen v pH območju od 1 do 14 (65). Faze pri izvedbi SPE na kolonah Strata-X so opisane na Sliki 10 (61, 62).



Slika 9: Ligand kolone Strata-X kopolimer stiren-divinilbenzen z vezanim N-vinilpirolidonom in interakcije, ki jih tvori z analitom (63).



Slika 10: Faze pri izvedbi SPE na reverznofazni koloni Strata-X (61, 62).

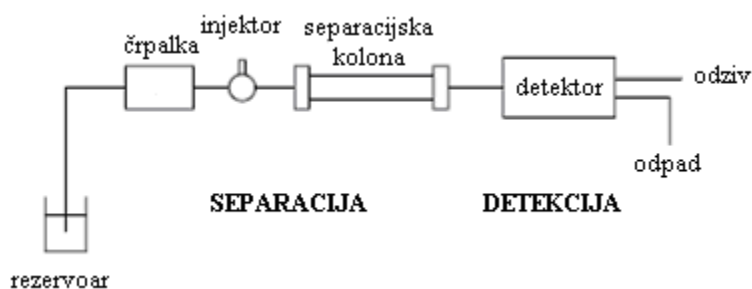
1.2.5.3 Analizne metode

V vzorcih hrane se za določanje BPA najpogosteje uporabljajo plinska kromatografija z masnim detektorjem (GC–MS) ali pa tekočinska kromatografija, sklopljena z MS (LC–MS) ali fluorescenčnim detektorjem (LC–FLD) (16). V bioloških vzorcih se za kvantifikacijo BPA uporabljajo imunokemijske metode (ELISA), GC–MS ali pa LC z detektorji FLD, MS, elektrokemijskim detektorjem ali UV detektorjem (24). Za identifikacijo in kvantifikacijo BPA v vodi se najpogosteje uporabljajo metode na osnovi masne spektrometrije (MS), saj imajo relativno nizko mejo detekcije v primerjavi z ostalimi metodami. To je pomembno zaradi tega, ker je BPA v vodi običajno prisoten v zelo nizkih koncentracijah. Za analizo se uporabljajo različne kombinacije instrumentov in detektorjev, npr. GC–MS, LC–UV in LC–MS (43). Analizne metode morajo biti validirane v skladu z veljavnimi smernicami (npr. IUPAC) in morajo vključevati ovrednotenje vsaj naslednjih parametrov: limite detekcije, limite kvantifikacije, ponovljivosti, izkoristka ekstrakcije, linearnosti in območja linearnosti (39).

Kromatografija je skupno ime za analizne tehnike, pri katerih se snovi ločijo zaradi različnega porazdeljevanja med mobilno fazo (MF) in stacionarno fazo (SF). Prednosti kromatografskih metod so visoka občutljivost, selektivnost in ponovljivost (66). Glede na mehanizem porazdeljevanja prevladujejo trije tipi kromatografskih metod: reverznofazna, ionsko-izmenjevalna in izključitvena kromatografija (67). Glede na vrsto MF ločimo plinsko kromatografijo (GC), pri kateri je MF v plinastem stanju, in tekočinsko kromatografijo (LC). Pri LC je MF tekoča, SF pa sestavljajo organski ali anorganski trdni delci. Glede na obliko nosilca trdne faze jo razdelimo na planarno in kolonsko kromatografijo, glede na polarnost SF pa na normalnofazno in reverznofazno. Pri normalnofazni LC je SF polarna in MF nepolarna, pri reverznofazni LC pa je SF nepolarna in MF polarna (66).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je najpogosteje uporabljena tehnika LC (66). SF v kolonah je sestavljena iz majhnih delcev velikosti 3–20 μm , kar zagotavlja bolj učinkovito ločevanje kot pri konvencionalni LC (67). MF potiskamo preko SF v koloni pod visokim pritiskom (do 400 barov), kar zagotovi konstantno hitrost pretoka (67, 68). HPLC sistemi so sestavljeni iz dveh delov: prvi je namenjen separaciji, drugi pa

detekciji. Separacijski del je sestavljen iz črpalke, injektorja in kolone, detektorski del pa iz enega ali več detektorjev ter programske opreme za vrednotenje odziva (Slika 11) (66).



Slika 11: Shematski prikaz HPLC sistema (66).

Črpalka zagotavlja črpanje MF v separacijski sistem s konstantno, natančno in ponovljivo hitrostjo (66). Injiciranje vzorca v kolono je eden izmed najbolj kritičnih korakov pri HPLC. V idealnem primeru vzorec doseže kolono v obliki majhne kapljice, pri kateri ne pride do difuzije, ki bi razširila kromatografske vrhove in tako poslabšala ločljivost (67). Pred črpanjem MF v sistem degazer iz nje odstrani ostanke plinov, ki bi tvorili mehurčke in s tem motili detekcijo ter zanesljivost analize (66). Prav tako je pomembno filtriranje MF skozi membrane z velikostjo por največ 0,5 μm , z namenom da odstranimo morebitne prisotne delce (67).

Pri reverznofazni HPLC (RP HPLC) se kot SF najpogosteje uporablja silikagel, ki ima na površini kovalentno vezane hidrofobne verige ogljikovodikov, kar zagotavlja visoko ponovljivost (66). Zapakirana je v kolone običajne dolžine 15–25 cm, izdelane iz nerjavečega jekla, plastike ali stekla, ki so opremljene s termostatom ali sistemi za ogrevanje oz. hlajenje kolon (67). RP HPLC zahteva uporabo manj strupenih topil, kar povzroča manjše onesnaženje okolja. Kot MF se najpogosteje uporablja mešanica vode in organskega modifikatorja, ki se meša z njo, običajno metanola ali acetonitrila (66). Do kromatografske separacije pride, ker komponente v vzorcu zaradi različne polarnosti različno interagirajo z MF in/ali SF in tako potrebujejo različno dolge čase, da prepotujejo razdaljo od mesta injiciranja do detektorja. Ker je pri RP HPLC MF bolj polarna kot SF, se bolj polarni analiti eluirajo hitreje kot manj polarni. Na podlagi lastnosti analitov je potrebno prilagoditi lastnosti SF in MF, da dosežemo ustrezno separacijo (68). Elucija je izokraska ali gradientna. Pri izokraski eluciji ima MF stalno sestavo, pri gradientni pa se njena sestava spreminja po vnaprej določenem programu (66). To je pomembno takrat,

kadar vzorec vsebuje analite, ki se močno razlikujejo v polarnosti. Najprej dovajamo topilo, ki zagotavlja ustrezno separacijo bolj polarnih spojin, te se eluirajo hitreje, nato pa topilo, ki omogoči še elucijo manj polarnih spojin, te se v koloni zadržujejo dlje. Pufri se MF dodajajo zaradi nadzora stopnje ionizacije komponent v vzorcu, tako da preprečimo nastanek signalov z repi in zagotovimo ponovljivost analize (68).

V kombinaciji s HPLC se uporabljajo številni detektorji. Izbira temelji na tipu analize, ki jo želimo izvesti (kvalitativna ali kvantitativna) (68). Idealni HPLC detektor je visoko občutljiv, univerzalen in specifičen, ima široko območje linearnega odziva in daje stabilen odziv pri določeni temperaturi in hitrosti pretoka (66). Masni spektrometer se je izkazal kot idealni detektor, saj omogoča tudi določitev strukture komponent v vzorcu (67).

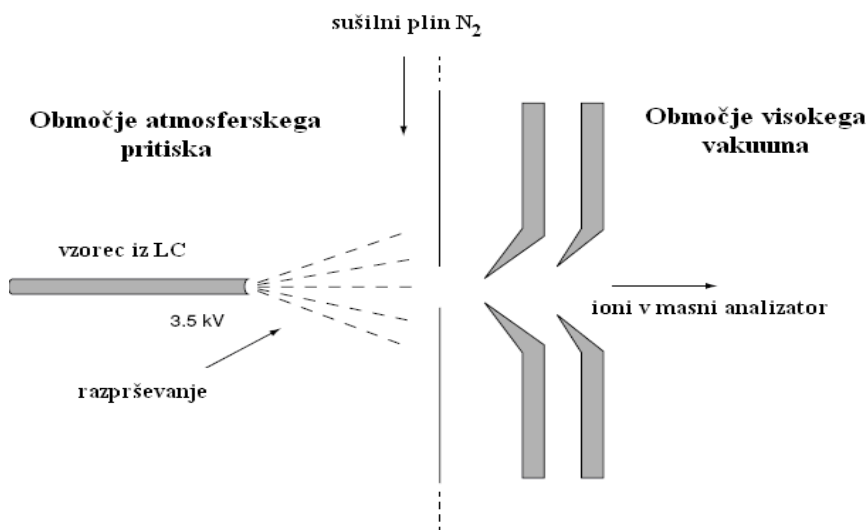
Masna spektrometrija (MS) je zelo občutljiva in specifična analitska tehnika, ki je primerna za kvalitativno in kvantitativno analizo vzorcev (69). Temelji na različni hitrosti potovanja ionov v električnem ali magnetnem polju zaradi različnega razmerja med maso in nabojem (m/z) (70). Masni spektrometer sestavljajo ionski izvor, masni analizator, detektor in programska oprema za obdelavo podatkov (69). Pomemben del masnega spektrometra je vakuumski sistem, ki vzdržuje visok vakuum v sistemu in s tem preprečuje trke ionov z zrakom in nevtralizacijo ionov (70). Ionski izvor povzroči nastanek ionov, ki se v masnem analizatorju ločijo glede na m/z . Detektor izmeri količine posameznih ionov kot električni signal, ki jih zaznamo kot signale v masnem spektru (69).

Poznamo več vrst ionizacijskih tehnik (69, 71):

- ionizacija z elektroni (EI),
- kemijska ionizacija (CI),
- bombardiranje s hitrimi atomi (FAB),
- elektrorazprševalna ionizacija (ESI),
- kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku (APCI),
- fotoionizacija pri atmosferskem pritisku (APPI),
- ionizacija z desorpcijo ionov iz trdnega matriksa z laserjem (MALDI).

Ionizacijska energija je pomembna, ker vpliva na obseg fragmentacije v masnem spektru (70). ESI, APCI in novejša APPI ionizirajo vzorec pri atmosferskem pritisku in omogočajo hitro, robustno in občutljivo kvantifikacijo polarnih in nepolarnih spojin z nizko ali visoko molekulsko maso. ESI za razliko od APCI in APPI za ionizacijo ne uporablja visokih temperatur, zato je primerna tudi za določanje labilnih spojin, npr. proteinov (71). Pri ESI

raztopljeni vzorec iz HPLC kolone dovajamo skozi ozko kapilaro z napetostjo 1–4 kV, pri čemer nastanejo nabite kapljice. Sledi uvajanje sušilnega plina (običajno dušika), ki povzroči izhlapevanje topila iz površine nabitih kapljic in posledično ionizacijo molekul analita (Slika 12) (69).



Slika 12: Ionizacija vzorca s tehniko ESI (69).

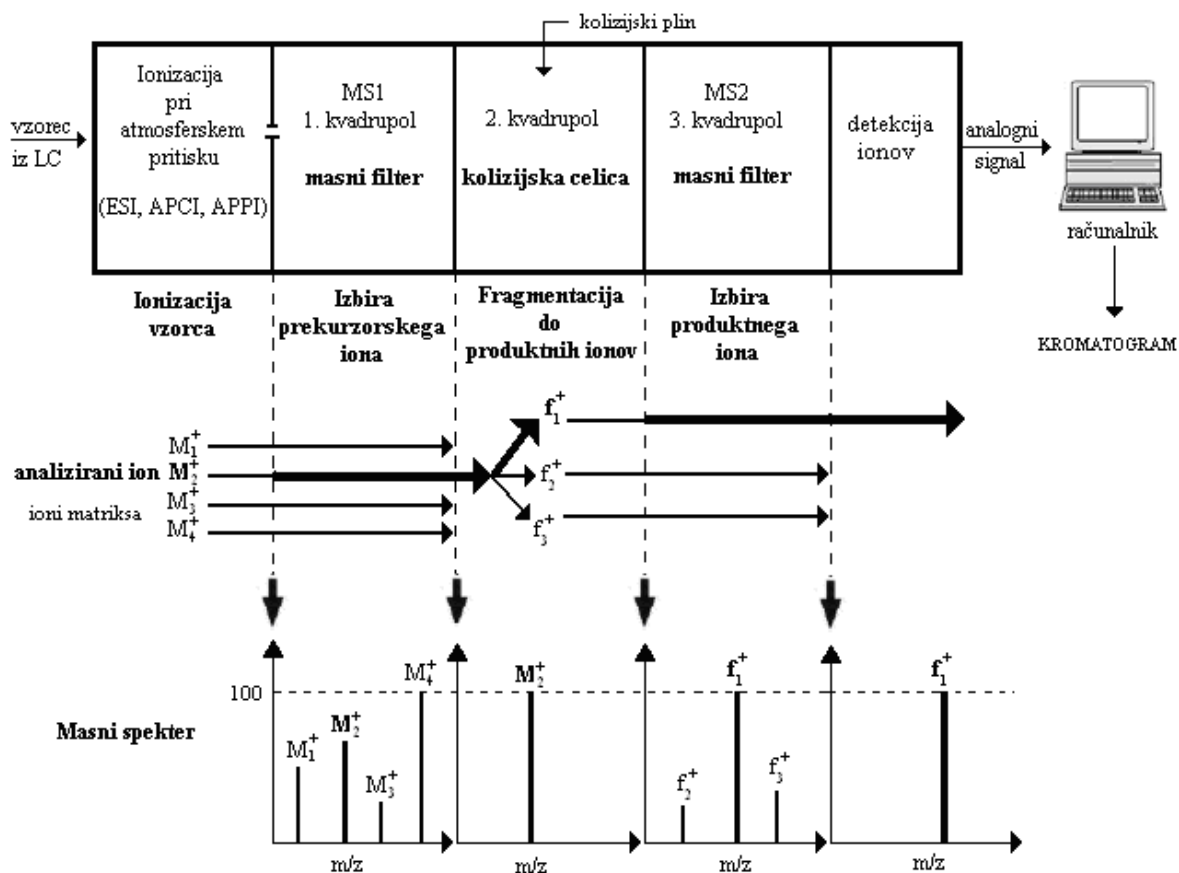
Nastali ioni potujejo v vakuumski del masnega analizatorja, kjer se razvrstijo glede na razmerje m/z . Na voljo je več različnih tipov masnih analizatorjev (69):

- kvadrupolni analizator,
- analizator z ionsko pastjo,
- FTICR analizator (Fourier transform ion cyclotron resonance),
- analizator na osnovi časa preleta (TOF).

Kvadrupolni masni analizator je sestavljen iz štirih vzporednih palic z napetostjo, ki ustvarja oscilirajoče električno polje (70). Ioni se med potovanjem skozi kvadrupol zaradi električnega polja razvrstijo glede na razmerje m/z in posamično dosežejo detektor (69). Z izbiro napetosti na kvadrupolnih palicah omogočimo, da detektor dosežejo le ioni z določenim razmerjem m/z , ostali pa se med potovanjem izgubijo zaradi trkov v palice (70).

Tandemska masna spektrometrija (MS/MS) je sklopitev dveh masnih analizatorjev v enem instrumentu (69). Najpogosteje se uporablja trojni kvadrupol, ki je sestavljen iz dveh kvadrupolov (masna filtra) in tretjo kvadrupolno kolizijsko celico, ki je med njima (71). V prvem kvadrupolu vzorec filtriramo in iz masnega spektra izberemo enega ali več

prekurzorskih ionov z določenim razmerjem m/z , ki jih usmerimo v kolizijsko celico (69). Kolizijska celica ima vlogo vmesnega kvadrupola in vsebuje nevtralni (kolizijski) plin pod visokim pritiskom (argon, helij, dušik), ki povzroči kolizijsko aktivirano disociacijo oz. fragmentacijo prekurzorskih ionov do produktnih ionov oz. fragmentov (69, 71). Ti se nato v tretjem kvadrupolu podobno kot v prvem razvrstijo glede na m/z (69). Izberemo fragment, ki ga je nastalo največ in le njemu skozi izhodno režo omogočimo pot do detektorja, ki je običajno elektronska fotopomnoževalka. Kadar spremljamo samo izbrani prekurzorski in produktni ion, govorimo o SRM prehodu (single reaction monitoring). Kadar pa iz prekurzorskega iona nastane več produktnih ionov, spremljamo več prehodov, ki jih imenujemo MRM prehodi (multiple reaction monitoring) (70, 71). Produktni ion z najvišjim razmerjem med signalom in šumom uporabimo za kvantifikacijo (angl. quantifier), ostali produktni ioni pa potrjujejo identiteto analita (angl. qualifiers) (Slika 13) (71).



Slika 13: Princip delovanja trojnega kvadrupola (71).

Tandemska MS je metoda izbire za kvantifikacijo pri LC, saj je visoko občutljiva in selektivna. To je pomembno predvsem pri analizi kompleksnih vzorcev (kri, tkiva, zemlja, sedimenti, odpadne vode, itd.), saj se zmanjša potreba po zahtevni pripravi vzorca (71).

Tekočinsko kromatografijo BPA običajno izvajamo na reverznofaznih C18 kolonah. Izbira mobilne faze je odvisna od detektorja, ki ga uporabljamo. Kadar uporabljamo fluorescenčno detekcijo, običajno uporabimo mešanico vode in acetonitrila, pri uporabi ESI–MS ali APCI–MS pa mešanico vode in metanola. Kadar istočasno z BPA določamo še druge analite, uporabimo gradientno elucijo. LC običajno izvajamo pri sobni temperaturi, zvišano temperaturo do 40°C pa uporabimo, če želimo skrajšati čas analize in povečati ponovljivost. LC–MS ionizacijo BPA izvajamo pri atmosferskem tlaku z uporabo ionizacije ESI ali APCI. Pri obeh detektiramo negativne ione. Pogosteje se uporablja ESI, ker zagotavlja večjo občutljivost kot APCI. Za kvantifikacijo BPA se zaradi visoke občutljivosti najpogosteje uporablja tandemska MS. Pri kvantitativnem vrednotenju običajno spremljamo MRM prehod 227–212, pri kvalitativnem vrednotenju pa MRM prehod 227–133. Fragmenti, ki jih vidimo v masnem spektru, so navedeni v Preglednici III (16).

Preglednica III: Fragmenti v masnem spektru BPA (16).

Fragment	Razmerje <i>m/z</i>
[M–H] [–]	227
[M–H–O] [–]	211
[M–H–CH ₃] ^{•–}	212
[M–2H] ^{2–}	113
[M–H–C ₆ H ₅ OH] [–]	133
[M–H–C ₉ H ₁₀ O] [–]	93

2 NAMEN DELA

Bisfenol A je izhodna spojina za proizvodnjo polikarbonatne plastike in epoksi smol, ki se najpogosteje uporabljata za izdelavo plastenk, embalaže za hrano in prevlek na notranji strani pločevink za hrano ter pijačo. Zaradi odpuščanja iz materialov in izpustov iz proizvodnih obratov se nahaja povsod v naravnem okolju, prav tako pa v izdelkih, s katerimi je v stiku. To povzroča kronično izpostavitve človeka in živali, kar lahko povzroča številna zdravstvena obolenja. Bisfenol A v zelo nizkih koncentracijah moti delovanje estrogenskega sistema in povzroča številne motnje, ki so povezane predvsem z delovanjem razmnoževalnega sistema. Za ocenjevanje tveganja izpostavljenosti bisfenolu A na zdravje je potrebno poznavanje vsebnosti te kemikalije v različnih virih, preko katerih smo mu izpostavljeni, npr. v okolju, hrani in pijači.

Namen diplomske naloge bo določiti in primerjati vsebnost bisfenola A v vodah iz različnih vodovodnih zajetij in vodomatov. Najprej bomo iz prečiščene vode poskušali odstraniti ali zmanjšati količino bisfenola A z metodami destilacije in filtracije skozi celulozno-acetatne filtre ter skozi SPE kartuše. Uspešnost postopkov bomo preverili tako, da bomo koncentracijo bisfenola A v tako pripravljenih vzorcih vode primerjali s koncentracijo bisfenola A v prečiščeni vodi. Za določevanje koncentracije bisfenola A v vodnih vzorcih bomo uporabili metodo, ki je že bila vpeljana.

Ustreznost metode LC–MS/MS za določanje bisfenola A bomo potrdili z validacijo na standardnih raztopinah bisfenola A. Določili bomo validacijske parametre: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost injiciranja, mejo detekcije in mejo kvantifikacije. Ustreznost celotnega postopka določanja bisfenola A v vodnih vzorcih (metode SPE in sledeče metode LC–MS/MS) bomo potrdili s pomočjo validacije z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin bisfenola A v vodi, za katero bomo predhodno pokazali, da vsebuje najnižjo koncentracijo bisfenola A. Vrednotili bomo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, točnost, izkoristek ekstrakcije, ponovljivost in mejo kvantifikacije. Določili bomo koncentracijo bisfenola A v desetih vzorcih vodovodnih voda in desetih vzorcih voda iz vodomatov. Vsak vzorec bomo analizirali v štirih paralelkah. Primerjali bomo tudi vsebnost bisfenola A v vzorcu negazirane in gazirane mineralne vode ter ovrednotili izločanje bisfenola A iz plastičnih gospodinjskih grelnikov vode in polistirenskih lončkov. Preverili bomo, ali komercialna plastenka z nazivom 'BPA-free' res ne odpušča bisfenola A, kakor trdi njen proizvajalec.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 VZORCI

Zbrali smo 10 vzorcev voda po 1 L iz različnih vodovodnih zajetij. Odvzeli smo jih v naslednjih mestih: Ljubljana Rudnik, Ljubljana Rožna dolina, Novo mesto, Brežice, Krško, Trebnje, Ivančna Gorica in Sevnica. Dva vzorca smo odvzeli v vaseh Raka (občina Krško) in Krmelj (občina Sevnica).

Odvzeli smo 10 vzorcev voda po 1 L iz vodomatov z baloni volumna 18,9 L iz polikarbonatne plastike na javnih mestih (zdravstveni domovi, knjižnica, optika, banka, urgentna ambulanta, trgovski center).

Steklenice volumna 1 L smo predhodno temeljito sprali z metanolom kromatografske čistote in jih posušili. Pred vzorčenjem v steklenice smo zavrgli približno 200 mL vode. Med prenosom in shranjevanjem vzorcev do analize smo pazili, da steklenice niso bile izpostavljene sončni svetlobi in da so bile v pokončnem položaju, tako da vzorec vode ni prišel v stik s plastičnim zamaškom steklenice. Do analize smo jih shranjevali pri sobni temperaturi na temnem mestu.

Analizirali smo še naslednje vzorce:

- Negazirana mineralna voda v plastenki volumna 0,5 L.
- Gazirana mineralna voda v plastenki volumna 0,5 L.
- Prečiščena voda, ki smo jo 1 mesec shranjevali na temnem mestu in pri sobni temperaturi v komercialni plastenki, za katero proizvajalec trdi, da ne vsebuje BPA.
- Prečiščena voda, ki smo jo 1 mesec shranjevali na temnem mestu in pri sobni temperaturi v uporabljeni 0,5 L plastenki za vodo iz polietilentereftalata.
- Prečiščena voda, ki smo jo segreli do vrenja v plastičnem grelniku vode.
- Prečiščena voda, ki smo jo vročo nalili v nove polistirenske lončke iz avtomata za tople napitke in jo v njih pustili 10 minut.

Z izrazom »steklenice« označujemo vsebnike iz stekla, z izrazom »plastenka« pa vsebnike, ki so izdelani iz plastičnih materialov.

3.1.2 STANDARDNA SPOJINA BISFENOLA A

Bisfenol A, čistost 97 %, MM 228,29, 100 g (Acrōs Organics, Geel, Belgija)

3.1.3 INTERNI STANDARD (IS)

Bisfenol A-d₁₆, 98 atom % D, MM 244,42, 250 mg (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

3.1.4 REAGENTI IN TOPILA

- Metanol CHROMASOLV, MM 32,04 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Metanol LC–MS čistote, MM 32,04 (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Acetonitril CHROMASOLV, MM 41,05 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija)
- Ultračista voda JT Baker za analize LC–MS, MM 18,02 (JT Baker, Deventer, Nizozemska)
- Amonijev acetat, MM 77,08 (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Amoniak 25 %, MM 17,03 (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Stisnjen dušik (Messer, Ruše, Slovenija)

3.1.5 PRIBOR IN APARATURE

- Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, erlenmajerice, epruvete, natehtalke, viala, inserti, destilacijska buča, destilacijski hladilnik, destilacijski nastavki
- Polavtomatske pipete: 20–200 μL, 100–1000 μL, 500–5000 μL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Sistem za filtriranje Sartorius
- Celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,2 in 0,45 μm (Sartorius)
- Termometer (Lauda Dr. R. Wobser gmbh & Co. KG, Nemčija)
- Grelna blazina (kalota) z regulacijo gretja (ThermoFisher Scientific, Rochford, Essex, Velika Britanija)
- Ultrazvočni čistilnik Sonis 4 (Iskra, Šentjernej, Slovenija)
- Hladilnik (LTH, Škofja Loka, Slovenija)
- Sušilnik TurboVap[®] LV (Caliper LifeSciences, Zimark, Portland, ZDA)
- Konično mešalo (vorteks) Vibromix 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Tehtnica AG245 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica)

- Ostalo: nastavki za pipete, vzmeti za inserte, plastična kapalka, vrelni kamenčki, škarje, Parafilm M, spatula, štoparica Hanhart

Sistem za SPE:

- SPE kolone: Strata-X, 33 μm polymeric reversed phase, 60 mg/3 mL (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Kadička VisiprepTM Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, Pensilvanija, ZDA)
- Oljna vakuumska črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)
- Plastične brizge volumna 60 mL z nastavki (BD Plastipak)

Analitski sistem LC–MS/MS:

- Agilent 1290 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA):
 - vključuje razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV–VIS detektor (DAD)
- Agilent 6460 Triple Quadropole Jetstream[®] LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA):
 - vključuje ionski izvir ESI
- Kromatografska kolona ZORBAX SB-C18 Rapid Resolution HT Agilent Technologies, 50 \times 2,1 mm, 1,8 μm
- Prefilter Krudkatcher Ultra HPLC In-line filter 0,5 μm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Program za obdelavo podatkov MassHunter Workstation software B.03.01

3.2 METODE

3.2.1 METODA SPE

Priprava topil

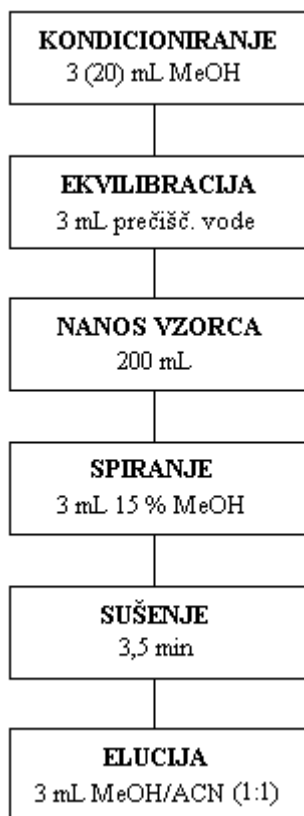
Pri metodi SPE smo uporabljali 4 topila: 100 % metanol, prečiščeno vodo, 15 % metanol v prečiščeni vodi in topilo metanol/acetonitril (razmerje 1:1). Uporabljali smo sveže pripravljena topila (stara največ tri dni), zato smo sproti pripravljali manjše volumne topil:

- 15 % raztopina metanola: 4,5 mL metanola smo dodali 25,5 mL prečiščene vode
- Raztopina metanola in acetonitrila (razmerje 1:1): 15 mL metanola smo dodali 15 mL acetonitrila

Shranjevali smo jih v stekleničkah pri sobni temperaturi.

Izvedba SPE

Nove SPE kolone (Strata-X, 3 mL, 60 mg) smo kondicionirali z 20 mL metanola, pri nadaljnjih treh ekstrakcijah pa s 3 mL (isto kolono smo uporabili štirikrat). Sledila je ekvilibracija s 3 mL prečiščene vode in nato nanos 200 mL vzorca. Pri aplikaciji vzorca smo si pomagali z brizgami, ki smo jih s pomočjo nastavkov namestili na SPE kolone. Pretok vzorcev smo z oljno vakuumsko črpalko uravnali na 3–6 mL/min. Sledilo je spiranje nečistot s 3 mL 15 % metanola in sušenje sorbenta 3,5 minute pri podtlaku 35 kPa (254 mm Hg). Zatem smo na sorbent nalili 3 mL elucijskega topila metanol/acetonitril (1:1) in ga pustili na njem 1 minuto. Sledila je elucija v čiste epruvete, nato pa smo sorbent sušili še 3 minute pri podtlaku 18 kPa (127 mm Hg). Hkrati smo izvajali SPE štirih vzorcev. Faze poteka SPE in uporabljeni volumni posameznih topil so prikazani na Sliki 14. Izbira topil in izvedba SPE je temeljila na diplomski nalogi Zibelnik K (25).



Slika 14: Faze pri izvedbi SPE.

Sušenje vzorcev in raztapljanje posušenih ostankov

Vzorci, ki smo jih pridobili z izvedbo SPE, smo posušili do suhega s prepihanjem z dušikom pri temperaturi 45°C, kar je trajalo približno 20 minut. Posušeni ostankom smo dodali v 200 µL topila za raztapljanje (metanolna raztopina IS s koncentracijo 50 µg/L, točka 3.2.3.1) in s koničnim mešalom mešali 90 sekund. Nastale raztopine smo s pipeto prenesli v 200 µL inserte, ki smo jih vstavili v vialo za HPLC analizo (točka 3.2.2).

3.2.2 METODA LC–MS/MS

Metoda HPLC

Za izvedbo HPLC smo uporabili kolone ZORBAX SB-C18 Rapid Resolution HT s predfiltrom za UHPLC analize, ki smo jih termostatirali na 50°C. Ostali pogoji in nastavitve so sledeči:

- *Mobilna faza (MF):*
 - MF A: ultračista voda (predhodno razplinjena v ultrazvočni kadički)
 - MF B: metanol kromatografske (LC–MS) čistote
- *Gradientni program MF:*
 - 0–3 min: 50–90 % MF B, hitrost pretoka 0,3 mL/min
 - 3,1–3,5 min: 50 % MF B, hitrost pretoka 0,5 mL/min
- *Volumen injiciranja:* 5 µL
(pred injiciranjem vsakega vzorca smo vedno injicirali 20 µL ultračiste vode)
- *Spiranje igle:* topilo s sestavo: 50 % izopropanol, 25 % acetonitril, 15 % cikloheksan, 10 % diklorometan
- *Čas reekvilibracije:* 0,2 minute
- *Celoten čas analize:* 3,7 minute

Metoda MS/MS

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

Nastavitve masnega analizatorja:

- *Nebulizacijski plin* (povzroči nastanek kapljic iz raztopine vzorca): 30 psi
- *Sušilni plin* (povzroči izhlapevanje topila): 275°C, 10 L/min
- *Jetstream[®] plin* (omeji in usmeri tok kapljic po razpršitvi): 320°C, 11 L/min
- *Napetost na kapilari:* 4000 V

- *Nozzle voltage*[®]: 1000 V
- *EMV*: 300 V
- *BPA: MRM prehoda; kolizijska energija (CE), fragmentor (FR):*
 227,1–212; CE: 12 eV, FR: 130 (uporaba za kvantitativno določanje)
 227,1–133; CE: 20 eV, FR: 130
- *BPA-d₁₆: MRM prehoda; kolizijska energija (CE), fragmentor (FR):*
 241,2–223; CE: 12 eV, FR: 130 (uporaba za kvantitativno določanje)
 241,2–142,1; CE: 20 eV, FR: 130
- *Širina masne ločljivosti na prvem kvadrupolu: angl. widest*
- *Širina masne ločljivosti na tretjem kvadrupolu: angl. wide*
- *Razdelilni čas (angl. dwell time): 50 ms*

3.2.3 PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN

3.2.3.1 Priprava metanolnih raztopin IS

Raztopina IS s koncentracijo 1 mg/mL

Na tehtnici smo natehtali 5,0 mg standarda IS, ga kvantitativno prenesli v 5 mL merilno bučko, dopolnili do oznake z metanolom in premešali, da se je spojina raztopila.

Raztopina IS s koncentracijo 100 µg/L

1 mL osnovne raztopine IS s koncentracijo 1 mg/mL smo odpipetirali v 100 mL merilno bučko, dopolnili z metanolom do oznake in premešali. Nastala raztopina je imela koncentracijo 10 mg/L. Od te raztopine smo odpipetirali 1 mL in prenesli v 100 mL merilno bučko, dopolnili z metanolom do oznake in premešali.

Raztopina IS s koncentracijo 1000 µg/L

1 mL raztopine IS s koncentracijo 10 mg/L iz prejšnje alineje smo prenesli v 10 mL merilno bučko in z metanolom dopolnili do oznake ter premešali.

Raztopina IS s koncentracijo 50 µg/L

V 50 mL merilno bučko smo odpipetirali 25 mL metanolne raztopine IS s koncentracijo 100 µg/L, z metanolom dopolnili do oznake in premešali.

3.2.3.2 Priprava metanolnih raztopin BPA

Raztopina BPA s koncentracijo 1 mg/mL

Na tehtnici smo natehtali 10,2 mg standarda BPA, ga kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, dopolnili do oznake z metanolom in premešali, da se je spojina raztopila.

Raztopina BPA s koncentracijo 100 µg/L

1 mL osnovne raztopine BPA s koncentracijo 1 mg/mL smo odpipetirali v 100 mL merilno bučko, dopolnili z metanolom do oznake in premešali. Nastala raztopina je imela koncentracijo 10 mg/L. Od te raztopine smo odpipetirali 1 mL in prenesli v 100 mL merilno bučko, dopolnili z metanolom do oznake in premešali.

Raztopina BPA s koncentracijo 1000 µg/L

1 mL raztopine BPA s koncentracijo 10 mg/L iz prejšnje alineje smo prenesli v 10 mL merilno bučko in z metanolom dopolnili do oznake ter premešali.

Raztopina BPA s koncentracijo 50 µg/L

V 50 mL merilno bučko smo odpipetirali 25 mL metanolne raztopine BPA s koncentracijo 100 µg/L, z metanolom dopolnili do oznake in premešali.

Raztopina BPA s koncentracijo 20 µg/L

V 100 mL merilno bučko smo odpipetirali 2 mL metanolne raztopine BPA s koncentracijo 1000 µg/L, z metanolom dopolnili do oznake in premešali.

3.2.4 PRIPRAVA VODE BREZ BPA

Z metodami destilacije in filtracije skozi celulozno-acetatne filtre ter SPE kartuše smo pripravili vzorce voda in jim določili koncentracijo BPA, tako da smo najprej izvedli ekstrakcijo SPE (točka 3.2.1), nato pa jim z metodo LC-MS/MS (točka 3.2.2) določili koncentracijo BPA.

3.2.4.1 Destilacija prečiščene vode

Bučo in vse steklene dele aparature za destilacijo smo temeljito sprali z metanolom in posušili. V 1-litrsko bučo smo nalili približno 1 liter prečiščene vode, jo namestili na aparaturo za destilacijo in pričeli z destilacijo. Prvih 150 mL destilata smo zavrgli,

nadaljnji destilat pa smo zbirali v čisto steklenico volumna 1 L. Pripravili smo 4 paralelke destilirane vode po 200 mL, iz katerih smo z metodo SPE ekstrahirali BPA. Hkrati smo izvedli še ekstrakcijo SPE dveh paralelk prečiščene vode po 200 mL. Posušene ekstrakte smo raztopili v topilu za raztapljanje in z metodo LC–MS/MS določili koncentracijo BPA.

3.2.4.2 Filtracija prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre

Pred vsako filtracijo smo sistem za filtriranje Sartorius temeljito sprali z metanolom in ga posušili. Po pričetku filtracije smo prvih nekaj 10 mL filtrata vedno zavrgli.

Filtracija prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre (0,2 in 0,45 µm)

Skozi celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,2 µm smo prefiltrirali približno 700 mL prečiščene vode in pripravili 3 paralelke po 200 mL. Postopek smo ponovili s celulozno-acetatnim filtrom z velikostjo por 0,45 µm. Vse pripravljene vzorce prefiltrirane vode in 6 paralelk prečiščene vode smo ekstrahirali z metodo SPE. Kot topilo za raztapljanje posušenih ostankov vzorcev prefiltrirane vode in 3 paralelk prečiščene vode uporabili metanol brez dodatka IS. Posušene ostanke preostalih treh paralelk prečiščene vode smo raztopili v običajnem topilu za raztapljanje z dodatkom IS. Nato smo vzorcem z metodo LC–MS/MS določili koncentracijo BPA.

Štirikratna filtracija prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre (0,2 µm)

Približno 1 liter prečiščene vode smo širikrat prefiltrirali skozi celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,2 µm in po vsaki filtraciji filter nadomestili z novim, tako da smo skupno uporabili 4 filtre. Pripravili smo 4 paralelke po 200 mL in jim določili koncentracijo BPA.

Filtracija raztopin BPA skozi celulozno-acetatni filter (0,2 µm)

Izvedli smo dve ločeni filtraciji raztopin BPA z nazivnima koncentracijama 10 in 20 ng/L, ki smo ju pripravili po naslednjem postopku:

Vodno raztopino BPA s koncentracijo 10 ng/L smo pripravili tako, da smo v 1-litrsko bučo odpipetirali 100 µL metanolne raztopine BPA s koncentracijo 100 µg/L (točka 3.2.3.2) in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Pri pripravi vodne raztopine BPA s koncentracijo 20 ng/L pa smo v 1-litrsko bučo odpipetirali 200 µL metanolne raztopine BPA s koncentracijo 100 µg/L (točka 3.2.3.2) in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

1 liter raztopine BPA s koncentracijo 10 ng/L smo prefiltrirali skozi celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,2 μm . Pripravili smo 4 paralelke po 200 mL. Po enakem postopku smo prefiltrirali še pripravljeno raztopino BPA s koncentracijo 20 ng/L in pripravili 4 paralelke po 200 mL.

Vsem osmim paralelkam prefiltriranih raztopin smo določili koncentracijo BPA po predhodni ekstrakciji s SPE in s pomočjo *Enačbe 1* izračunali učinkovitost filtracije vsake izmed raztopin.

Enačba 1: Izračun učinkovitosti filtracije (%).

$$\text{učinkovitost filtracije} = \frac{C_t + C_v - C_f}{C_t + C_v} \times 100 \%$$

C_t – nazivna koncentracija BPA raztopine

C_v – koncentracija BPA v prečiščeni vodi

C_f – koncentracija BPA v filtratu

Spiranje filtrov

Oba filtra, skozi katera smo filtrirali raztopini BPA (koncentracija 10 ng/L oz. 20 ng/L), ter en neuporabljen filter smo sprali z 10 mL metanola v 3 ločene epruvete. Sledilo je uparjanje do suhega pri temperaturi 45°C. Ostanke smo raztopili v 200 μL metanolne raztopine IS (50 $\mu\text{g/L}$, točka 3.2.3.1), jih 90 sekund mešali na koničnem mešalu in raztopine prenesli v vialo. S pomočjo LC/MS–MS metode (točka 3.2.2) smo vsem trem vzorcem določili koncentracijo BPA, pri čemer smo upoštevali, da smo vzorce koncentrirali za faktor 50.

3.2.4.3 Filtracija prečiščene vode skozi SPE kartuše

Izvedli smo 4 SPE ekstrakcije (točka 3.2.1) prečiščene vode in v čiste čaše lovili filtrate ekstrakcije SPE. Pridobljeni filtrat smo razdelili na 4 paralelke po 200 mL in jim s SPE ekstrakcijo in metodo LC–MS/MS določili koncentracijo BPA. Tudi v tej stopnji smo zbirali filtrat SPE in mu v 4-ih paralelkah določili koncentracijo BPA z nadaljnjo izvedbo SPE in metodo LC–MS/MS.

3.2.5 VREDNOTENJE METODE

3.2.5.1 Validacija na standardnih raztopinah BPA

Priprava standardnih raztopin BPA

Pripravili smo 8 standardnih metanolnih raztopin po 1 mL s koncentracijo BPA 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 in 300 µg/L ter dva slepa vzorca (raztopino IS s koncentracijo 50 µg/L in metanol). Pri pripravi raztopin z nizkimi koncentracijami BPA (2, 5, 10 in 25 µg/L) in raztopine IS smo izhajali iz standardne raztopine BPA s koncentracijo 100 µg/L (točka 3.2.3.2), pri pripravi raztopin z visokimi koncentracijami BPA (50, 100, 200 in 300 µg/L) pa iz standardne raztopine BPA s koncentracijo 1000 µg/L (točka 3.2.3.2). V vsako izmed vial (razen v vialo s slepim vzorcem metanola) smo dodali še 500 µL standardne raztopine IS s koncentracijo 100 µg/L (točka 3.2.3.1), tako da je bila končna koncentracija IS v vialah 50 µg/L. Uporabljeni volumni posameznih raztopin oz. metanola za pripravo standardnih raztopin so navedeni v Preglednici IV.

Preglednica IV: Priprava standardnih raztopin BPA in slepih vzorcev.

Koncentracija standardne raztopine BPA (µg/L)	Volumen (µL) standardne raztopine BPA s 100 ali 1000 µg/L	Volumen (µL) standardne raztopine IS s 100 µg/L	Volumen (µL) 100 % metanola
MeOH	0	0	1000
IS	0	500	500
2	20	500	480
5	50	500	450
10	100	500	400
25	250	500	250
50	50	500	450
100	100	500	400
200	200	500	300
300	300	500	200

Postopek dela

Pri validaciji LC–MS/MS metode na standardnih raztopinah BPA smo pripravili standardne raztopine BPA v koncentracijskem območju 2–300 µg/L in dva slepa vzorca (metanol in standardno raztopino IS s koncentracijo 50 µg/L), kakor je opisano v točki 3.2.5.1. Z metodo LC–MS/MS smo najprej analizirali slepa vzorca, nato pa še standardne raztopine od najnižje proti najvišji koncentraciji. Vse standardne raztopine in slepa vzorca smo injicirali trikrat. Vrednotili smo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost injiciranja, mejo detekcije in mejo kvantifikacije, ki so podrobneje opisani v točki 3.2.5.3.

3.2.5.2 Validacija na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v prečiščeni vodi

Priprava standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi

Pripravili smo 8 standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi po 200 mL s koncentracijo 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 in 300 ng/L. V 200 mL bučko smo odpipetirali ustrezen volumen (Preglednica V) metanolne raztopine BPA s koncentracijo 20 µg/L (točka 3.2.3.2) in do oznake dopolnili s prečiščeno vodo.

Preglednica V: Priprava standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi.

Koncentracija standardne raztopine BPA v prečiščeni vodi (ng/L)	Volumen (µL) standardne raztopine BPA z 20 µg/L
2	20
5	50
10	100
25	250
50	500
100	1000
200	2000
300	3000

Postopek dela

Pripravili smo po štiri paralelke vsake izmed 8-ih standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi, kot je opisano v točki 3.2.5.2, in 4 paralelke prečiščene vode (slepi vzorec) po 200 mL. Po postopku, ki je opisan v točki 3.2.1, smo izvedli ekstrakcijo SPE vseh pripravljenih raztopin in slepih vzorcev. Vsako standardno raztopino smo s SPE sočasno ekstrahirali v štirih paralelkah na 4-ih kolonah Strata-X. Po štirih izvedbah ekstrakcije na posamezni koloni smo uporabili nove.

Po sušenju in raztapljanju ostankov smo izmerili koncentracijo BPA v vseh pripravljenih vzorcih z metodo LC–MS/MS (točka 3.2.2). Najprej smo analizirali slepe vzorce, nato pa še vzorce standardnih raztopin od najnižje do najvišje koncentracije. Vsako raztopino smo injicirali dvakrat.

Vrednotili smo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, izkoristek ekstrakcije in mejo kvantifikacije, ki so opisani v točki 3.2.5.3.

3.2.5.3 Vrednotenje validacijskih parametrov metod SPE in LC–MS/MS

Za potrditev ustreznosti metode SPE in metode LC–MS/MS smo po ICH (Q2 (R1)) (72) in FDA (73) smernicah ovrednotili naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, mejo detekcije, mejo kvantifikacije in izkoristek ekstrakcije. Parametri meddnevne točnosti in ponovljivosti, robustnosti (stabilnosti standardnih raztopin BPA v avtomatskem vzorčevalniku), meddnevne točnosti in ponovljivosti ekstrakcije ter odsotnosti učinka matriksa (ionske supresije) so bili potrjeni v diplomski nalogi Zibelnik K (25).

Selektivnost

Selektivnost je sposobnost analitske metode, da loči in kvantitativno ovrednoti analit v prisotnosti ostalih komponent v vzorcu, npr. nečistot, razgradnih komponent, matriksa. Metoda je selektivna takrat, kadar so vrhovi na kromatogramu analiziranih komponent vzorca jasno ločeni oz. se ne prekrivajo in ne prihaja do interferenc med komponentami.

Pri vrednotenju selektivnosti metode LC–MS/MS smo analizirali metanol (topilo za pripravo topila za raztapljanje), metanolno raztopino IS s koncentracijo 50 µg/L (topilo za raztapljanje) in standardno raztopino BPA s koncentracijo 25 µg/L v topilu za raztapljanje.

Pri vrednotenju metode SPE smo analizirali vzorec ekstrahirane prečiščene vode in vzorec ekstrahirane standardne raztopine BPA s koncentracijo 25 ng/L v prečiščeni vodi.

Linearnost

Metoda je linearna takrat, kadar so rezultati znotraj določenega intervala premosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Linearnost preverimo z regresijsko premico najmanjših kvadratov, ki podaja odvisnost testnih rezultatov od koncentracije analita. Z regresijsko analizo eksperimentalnih podatkov dobimo umeritveno premico z enačbo $y = bx + a$, pri čemer je y odziv (višina ali površina kromatografskega vrha), b naklon premice, x koncentracija analita in a odsek na ordinatni osi. Kadar uporabljamo interni standard, y podamo kot razmerje med odzivom analita in internega standarda. Korelacijo med odzivom in koncentracijo podajamo s Pearsonovim koeficientom (R) oz. determinacijskim koeficientom (R^2), slednji pri popolni linearnosti doseže vrednost 1. ICH smernice za določanje linearnosti priporočajo uporabo vsaj pet koncentracij standardnih raztopin.

Pri validaciji metode na standardnih raztopinah BPA smo vrednotili raztopine v koncentracijskem območju od 2 do 300 $\mu\text{g/L}$, pri validaciji na ekstrahiranih vzorcih standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi pa v območju od 2 do 300 ng/L. Preverjali smo linearnost razmerja površin kromatografskih vrhov standarda (MRM prehod 227,1–212) in internega standarda (MRM prehod 241,2–223), kar označujemo kot razmerje BPA/IS, v odvisnosti od koncentracije standardne raztopine pri osmih različnih koncentracijah. Po metodi najmanjših kvadratov smo iz povprečnih vrednosti razmerij BPA/IS pri posamezni koncentraciji določili regresijsko premico in R^2 . Za ustrezno linearnost metode smo si postavili mejo $R^2 \geq 0,99$.

Točnost

Točnost je sposobnost metode, da določi pravo vrednost oz. da izmerjena vrednost ne odstopa signifikantno od dejanske. Poimenujemo jo tudi pravilnost metode. Ugotavljamo jo s preverjanjem odzivov standardnih raztopin oz. vzorcev znanih koncentracij. Iz odzivov standardnih raztopin s pomočjo enačbe umeritvene premice izračunamo koncentracijo in jo primerjamo z deklarirano vrednostjo. Običajno točnost podamo v obliki relativne napake, ki upošteva razliko med deklarirano vrednostjo in vrednostjo, izračunano iz umeritvene premice. ICH smernice priporočajo določanje točnosti pri vsaj treh različnih

koncentracijah, ki pokrivajo specificirano območje (tri ponovitve ocene točnosti pri vsaki od treh koncentracij), in podajanje rezultata v obliki relativne napake.

Točnost smo vrednotili skozi celotno koncentracijsko območje. Iz povprečnih vrednosti BPA/IS pri posamezni deklarirani koncentraciji BPA (C_t) smo iz ustrezne umeritvene premice izračunali koncentracijo BPA (C_i) in s pomočjo *Enačbe 2* izračunali točnost. Pri validaciji na standardnih raztopinah BPA smo kot ustrezno točnost izbrali mejo $100 \pm 5 \%$, pri validaciji na ekstrahiranih vzorcih standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi pa smo za zadovoljivo točnost metode postavili kriterij $100 \pm 15 \%$.

Enačba 2: Izračun točnosti (%).

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

C_i – izračunana koncentracija

C_t – deklarirana koncentracija

Ponovljivost

Ponovljivost metode je stopnja skladanja med posameznimi odzivi pri večkratnem injiciranju oz. pripravi enakih vzorcev. Podajamo jo s standardnim odklonom (SD) in relativnim standardnim odklonom (RSD), ki ju izračunamo po *Enačbah 3* in *4*. ICH smernice priporočajo določanje ponovljivosti pri treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo specificirano območje (tri ponovitve ocene ponovljivosti pri vsaki od treh koncentracij), ali pri izbrani koncentraciji, pri kateri naredimo vsaj 6 meritev.

Enačba 3: Izračun standardnega odklona (SD).

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

x_i – odziv (višina ali površina)

\bar{x} – povprečna vrednost odziva

n – število meritev

Enačba 4: Izračun relativnega standardnega odklona (RSD, %).

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

x_i – odziv (višina ali površina)

\bar{x} – povprečna vrednost odziva

n – število meritev

Pri vrednotenju ponovljivosti injiciranja smo vsako od pripravljenih standardnih raztopin injicirali trikrat ($n = 3$) in izračunali RSD s pomočjo *Enačbe 4*, pri čemer smo kot odziv upoštevali razmerje med površino kromatografskega vrha standarda in IS (BPA/IS). Kot ustrezno ponovljivost injiciranja smo določili mejo $\text{RSD} \leq 5 \%$. Ponovljivost ekstrakcije smo vrednotili z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi. Vsako standardno raztopino BPA v prečiščeni vodi znotraj koncentracijskega območja smo ekstrahirali v štirih paralelkah ($n = 4$), jim določili koncentracijo in izračunali RSD s pomočjo *Enačbe 4*. Kot kriterij za zadovoljivo ponovljivost ekstrakcije smo določili kriterij $\text{RSD} \leq 15 \%$.

Izkoristek ekstrakcije

Uspešnost ekstrakcije se določa s pomočjo vrednotenja točnosti metode (angl. recovery). Določimo jo z izračunom izkoristka ekstrakcije, tako da odziv ekstrahirane standardne raztopine primerjamo z odzivom standardne raztopine pri isti koncentraciji (*Enačba 5*). FDA smernica priporoča določanje uspešnosti ekstrakcije pri treh koncentracijah ekstrahiranih vzorcev (pri nizki, srednji in visoki koncentraciji). Rezultati izkoristka ekstrakcije analita in internega standarda morajo biti konsistentni, natančni in reproducibilni, ni pa nujno, da znašajo 100 %.

Enačba 5: Izračun izkoristka ekstrakcije (%).

$$\text{izkoristek ekstrakcije} = \frac{X_{\text{eks.st.r.}}}{X_{\text{st.r.}}} \times 100 \%$$

$X_{\text{eks.st.r.}}$ – odziv (višina ali površina) ekstrahirane standardne raztopine

$X_{\text{st.r.}}$ – odziv (višina ali površina) standardne raztopine pri isti koncentraciji

Izkoristek ekstrakcije smo določili s pomočjo *Enačbe 5* iz rezultatov pri ekstrakciji standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi pri vseh koncentracijskih točkah.

Meja detekcije in meja kvantifikacije

Meja detekcije (limit of detection, LOD) analiznega postopka je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo lahko razločimo od šuma, vendar je običajno ne moremo kvantitativno ovrednotiti. Meja kvantifikacije (limit of quantification, LOQ) analiznega postopka je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno določimo z ustrezno natančnostjo in točnostjo. LOD je tista koncentracija analita, pri kateri je razmerje med signalom in šumom 3, pri LOQ pa to razmerje znaša 10. LOQ lahko določimo tudi z analizo standardnih raztopin analita in sicer ugotavljamo, pri kateri koncentraciji standarda nam metoda še daje natančne in točne rezultate.

Pri vrednotenju LOD in LOQ smo pri nižjih koncentracijah standardnih raztopin BPA (2, 5 in 10 µg/L) s pomočjo funkcije »peak to peak« programske opreme MassHunter na osnovi višine kromatografskih vrhov določili razmerje signal/šum in izračunali pripadajoče LOD in LOQ. LOQ smo določili tudi na osnovi rezultatov pri validaciji, pri čemer smo ugotavljali, katera je najnižja koncentracija standardne raztopine, pri kateri so naši rezultati še vedno dovolj natančni ($RSD \leq 5\%$ pri vrednotenju ponovljivosti injiciranja oz. $RSD \leq 15\%$ pri vrednotenju ponovljivosti ekstrakcije) in točni (točnost pri validaciji na standardnih raztopinah BPA v mejah $100 \pm 5\%$ oz. v mejah $100 \pm 15\%$ pri validaciji na ekstrahiranih vzorcih standardnih raztopin BPA).

3.2.6 ANALIZA VZORCEV

Vse vodne vzorce smo s SPE ekstrahirali v štirih paralelkah po 200 mL (točka 3.2.1) in jim z metodo LC–MS/MS (točka 3.2.2) določili koncentracijo BPA. Vsak vzorec smo injicirali dvakrat.

Določitev koncentracije BPA v vzorcih vodovodnih voda

Analizirali smo 10 vzorcev voda iz različnih vodovodnih omrežij po Sloveniji.

Določitev koncentracije BPA v vzorcih voda iz vodomatov

Analizirali smo 10 vzorcev voda iz vodomatov na javnih mestih.

Po enakem postopku smo določili koncentracijo BPA še v nekaj dodatnih vzorcih. Vsakega smo analizirali v dveh paralelkah po 200 mL.

Primerjava vsebnosti BPA v negazirani in gazirani mineralni vodi

Analizirali smo vzorec negazirane in vzorec gazirane mineralne vode iz 0,5 L plastenk izdelanih iz polietilentereftalata. Iz gazirane mineralne vode smo pred ekstrakcijo z intenzivnim mešanjem izgnali ogljikov dioksid.

Preizkušanje odpuščanja BPA iz plastičnega grelnika

500 mL prečiščene vode smo do vrenja segreti v plastičnem grelniku za segrevanje vode v gospodinjske namene in jo prelili v steklenico. Tako pripravljenemu vzorcu vode smo določili koncentracijo BPA, ko se je le-ta popolnoma ohladil.

Preizkušanje odpuščanja BPA iz polistirenskih lončkov

500 mL prečiščene vode smo v čaši segreti do vrenja in počakali 5 minut, da se je nekoliko ohladila. Nato smo jo nalili v 3 nove plastične lončke iz polistirena. Po desetih minutah smo jo nalili v steklenico in počakali, da se je popolnoma ohladila, ter ji nato določili koncentracijo BPA.

Preizkušanje odpuščanja BPA iz platenke brez BPA

Določili smo koncentracijo BPA v prečiščeni vodi, ki smo jo en mesec shranjevali v komercialni platenki, za katero proizvajalec trdi, da ne vsebuje BPA. Hkrati smo določili še koncentracijo BPA v prečiščeni vodi, ki smo jo v enakih pogojih en mesec shranjevali v že večkrat uporabljeni 0,5 L platenki za vodo iz polietilentereftalata.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI ANALIZE

Zmanjševanje kontaminacije vzorcev z BPA

BPA se nahaja povsod v okolju, zato je pred delom zelo pomembno temeljito pranje steklovine (bučk, čaš, epruвет, vial...), da odstranimo morebitne ostanke BPA in tako zmanjšamo kontaminacijo vzorcev (16). Uporabili smo metanol LC-MS čistote v steklenicah, ki ne vsebuje BPA. Pri delu nismo uporabljali nobenih plastičnih vsebnikov, ki bi v raztopine odpuščali BPA. Za nekatere pripomočke nismo imeli na voljo steklenih zamenjav in smo uporabili plastične pripomočke, npr. brizge in nastavki za SPE ekstrakcijo, kapalke, nastavki za pipete. To je verjetno nekoliko prispevalo h kontaminaciji z BPA. Da bi zmanjšali privzem BPA iz zraka (18), smo raztopine v bučkah, reagente in kolone za SPE ter epruvete z eluati zamašili z zamaški, s pokrovčki oz. parafilmom, kadar je bilo to možno.

Nove SPE kartuše smo zaradi odpuščanja BPA, ki verjetno izvira iz proizvodnega procesa (16), kondicionirali z 20 mL metanola, pri nadaljnjih ekstrahiranjih pa s 3 mL.

Uporaba internega standarda

Zaradi nihanja odziva instrumenta LC-MS/MS za BPA smo za raztapljanje vzorcev uporabili metanolno raztopino internega standarda BPA-d₁₆ (IS) s koncentracijo 50 µg/L in za kvantifikacijo uporabili razmerje med odzivoma (površinama) za BPA in IS, ki daje linearni odziv v odvisnosti od koncentracije BPA, kar smo potrdili pri validaciji metode. Kromatografski vrhovi so pravilnejših oblik, če je vzorec raztopljen v topilu mešane sestave (npr. v 50 % metanolu), vendar je v takšnem topilu prehajanje IS v BPA hitrejše (25), zato smo kot topilo za IS uporabili čisti metanol.

4.2 PRIPRAVA VODE BREZ BPA

Za analizo je pomembno, da pripravimo vodo, ki ne vsebuje preiskovane snovi in tako služi kot slepi vzorec za pripravo standardnih raztopin za umeritveno premico. To je pomembno predvsem pri izvedbi validacije pri nizkih koncentracijah analita. Prečiščena, vodovodna in Mili Q voda vsebujejo BPA, kar otežuje validacijo analizne metode v nizkem koncentracijskem območju (25). V okviru diplomske naloge smo poskušali

odstraniti BPA iz prečiščene vode oz. pripraviti vodo brez BPA (t.i. BPA-free water). Kot metodo za odstranjevanje BPA iz prečiščene vode smo izbrali postopek destilacije, saj smo predvidevali, da zaradi visoke temperature vrelišča (220°C; 17) BPA pri pogojih destilacije ne bo izpareval. Kot uspešen način odstranjevanja BPA se v literaturi navaja tudi filtracija skozi celulozne membranske filtre z velikostjo por 0,45 µm (47) in skozi SPE sisteme (26,55), zato smo preverili učinkovitost celuložno-acetatnih filtrov z velikostjo por 0,2 in 0,45 µm ter filtracije skozi SPE kartuše Strata-X.

4.2.1 Destilacija prečiščene vode

Destilacija se ni izkazala kot primerna metoda za odstranjevanje BPA iz vode, saj se koncentracija BPA v destilirani prečiščeni vodi ni bistveno zmanjšala glede na prečiščeno vodo. Povprečna koncentracija BPA v štirih paralelkah destilirane vode je bila za 4 % nižja kot povprečna koncentracija dveh paralelk prečiščene vode. Razloga za neučinkovitost destilacije ne poznamo. BPA pri vrelišču vode ne izhlapeva, zato praviloma z vodno paro ne prehaja v destilat. BPA bi lahko v destilat prehajal iz notranjih sten hladilnika destilacijske aparature, saj le-tega nismo mogli očistiti enako temeljito kakor ostale dele aparature. Morebitni ostanki BPA na njegovih stenah bi lahko predstavljali vir za onesnaženje destilirane vode z BPA. Drugi možni vir za onesnaženje je plastični zamašek steklenice, v katero smo zbirali destilirano vodo. Ker destilirana voda ni bila popolnoma hladna, ko smo jo nalili v steklenico in jo zaprli s plastičnim zamaškom, je v zaprti steklenici nekoliko izhlapevala in nato na plastičnem zamašku kondenzirala. Predvidevamo, da je kondenzat, ki je raztopil BPA iz plastičnega zamaška, padal nazaj v steklenico in onesnažil destilirano vodo z BPA. Predlagamo, da se učinkovitost destilacije preveri ponovno ob upoštevanju možnih napak. Destilirano vodo bi bilo smiselno popolnoma ohladiti, preden bi jo nalili v steklenico, hladilnik pa čez noč pustiti v metanolu, da bi z večjo gotovostjo odstranili morebitne ostanke BPA.

4.2.2 Filtracija prečiščene vode skozi celuložno-acetatne filtre

Filtracija prečiščene vode skozi celuložno-acetatne filtre (0,2 in 0,45 µm)

Pri vrednotenju učinkovitosti filtracije skozi celuložno-acetatne filtre smo najprej želeli primerjati učinkovitost filtrov z velikostjo por 0,2 µm oz. 0,45 µm. Ker IS v manjši meri prehaja v BPA, smo posušene ostanke pridobljene po izvedbi SPE in sušenju raztopili v čistem metanolu, tako da vzorcev nismo dodatno onesnažili z BPA. Na ta način smo

ovrednotili vpliv IS v topilu za raztapljanje na zvišanje koncentracije BPA v vzorcu. Koncentracija BPA v vzorcih prečiščene vode, ki smo jih pripravili po običajnem postopku z uporabo topila za raztapljanje z IS, je znašala 5,2 ng/L. Ko smo kot topilo za raztapljanje posušenih ostankov po SPE prečiščene vode uporabili čisti metanol, smo izmerili koncentracijo BPA 3,4 ng/L. Dodatek IS v topilu za raztapljanje je torej zaradi prehajanja v BPA povečal koncentracijo BPA v raztopljenem vzorcu za 35 %.

Koncentracija BPA v vzorcu prečiščene vode, ki smo jo prefiltrirali skozi filter z velikostjo por 0,2 µm, je znašala 3,0 ng/L. S filtracijo smo tako znižali koncentracijo BPA za 12 %. V vzorcu prečiščene vode, prefiltrirane skozi filter z velikostjo por 0,45 µm, smo izmerili koncentracijo BPA 5,9 ng/L, kar pomeni 74 % zvišanje koncentracije napram prečiščeni vodi. Predvidevamo, da je razlog za takšno zvišanje koncentracije BPA naključna onesnaženost filtrov z BPA.

Štirikratna filtracija prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre (0,2 µm)

Da bi eliminirali vpliv morebitne onesnaženosti filtrov z BPA, smo izvedli štirikratno filtracijo prečiščene vode skozi 4 filtre z velikostjo por 0,2 µm. Izmerjena koncentracija BPA v tako pripravljenem vzorcu je bila za 2 % višja v primerjavi s prečiščeno vodo in torej ni prišlo do bistvene razlike v primerjavi s filtracijo skozi en filter. Predvidevamo, da je bil verjetno vsaj en filter onesnažen z BPA.

Filtracija raztopin BPA skozi celulozno-acetatni filter (0,2 µm)

Izmerjena koncentracija BPA v filtratu prefiltrirane raztopine s koncentracijo 10 ng/L skozi celulozno-acetatni filter (velikost por 0,2 µm) je bila 9,4 ng/L. V filtratu po filtraciji raztopine BPA s koncentracijo 20 ng/L smo izmerili koncentracijo 13,2 ng/L. Ob upoštevanju koncentracije BPA v prečiščeni vodi, ki smo jo določili v istem eksperimentu (5,2 ng/L), smo po *Enačbi 1* izračunali, da celulozno-acetatni filtri zadržijo 38–48 % BPA.

Spiranje filtrov

Koncentracija BPA v raztopini, ki smo jo pripravili s spiranjem filtra, skozi katerega smo filtrirali raztopino s koncentracijo 10 ng/L, je bila 128 ng/L. Po spiranju filtra, skozi katerega smo filtrirali raztopino s koncentracijo 20 ng/L, smo dobili raztopino s koncentracijo 324 ng/L. Koncentracija BPA v raztopini, ki je nastala po spiranju novega filtra, je bila 100 ng/L, kar potrjuje onesnaženost filtrov z BPA.

Zaradi relativno nizke učinkovitosti celulozno-acetatnih filtrov, ki je verjetno posledica onesnaženosti filtrov z BPA, se za ta način odstranjevanja BPA iz vode nismo odločili.

4.2.3 Filtracija prečiščene vode skozi SPE kartuše

Koncentracija BPA v prečiščeni vodi, ki smo jo filtrirali skozi SPE kartušo Strata-X, je bila za 10 % nižja v primerjavi s prečiščeno vodo. Dvakrat prefiltrirana voda skozi SPE sistem je imela koncentracijo BPA za 19 % nižjo v primerjavi s prečiščeno vodo. SPE sorbenti pri ustreznih pogojih izvedbe vežejo BPA iz vzorca (v našem primeru vode), zato ga v filtratu ne pričakujemo. Razloga za slabšo uspešnost SPE filtracije pri odstranjevanju BPA iz vode ne poznamo. Ker je postopek filtracije skozi sistem SPE dolgotrajen, potraten z vidika SPE kolon in relativno neučinkovit, se tudi za ta način odstranjevanja BPA iz vode nismo odločili. Predlagamo uporabo diskov Empore, ki so primernejši za filtracijo večjih volumnov vzorcev in se v praksi pogosto uporabljajo v namene pridobivanja BPA-free vode.

Glede na slabšo učinkovitost vseh preizkušenih načinov odstranjevanja BPA iz prečiščene vode, ki bi lahko bila tudi posledica kontaminacije vzorcev tekom njihove priprave, se nismo odločili za nobenega od njih. Kot slepi vzorec za pripravo standardnih raztopin smo zato pri validaciji uporabili prečiščeno vodo.

4.3 VREDNOTENJE METODE

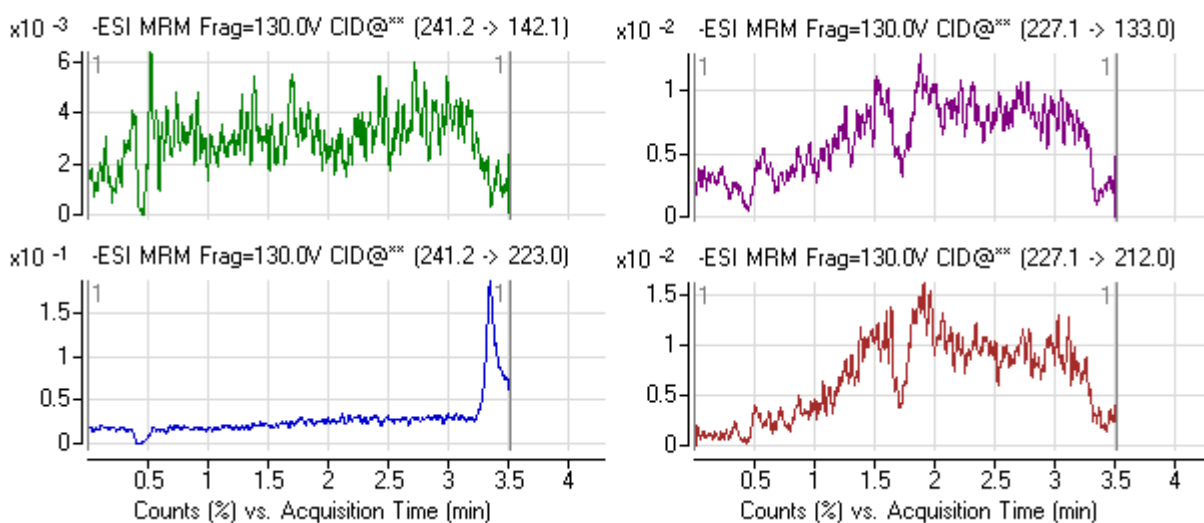
4.3.1 Validacija na standardnih raztopinah BPA

Selektivnost

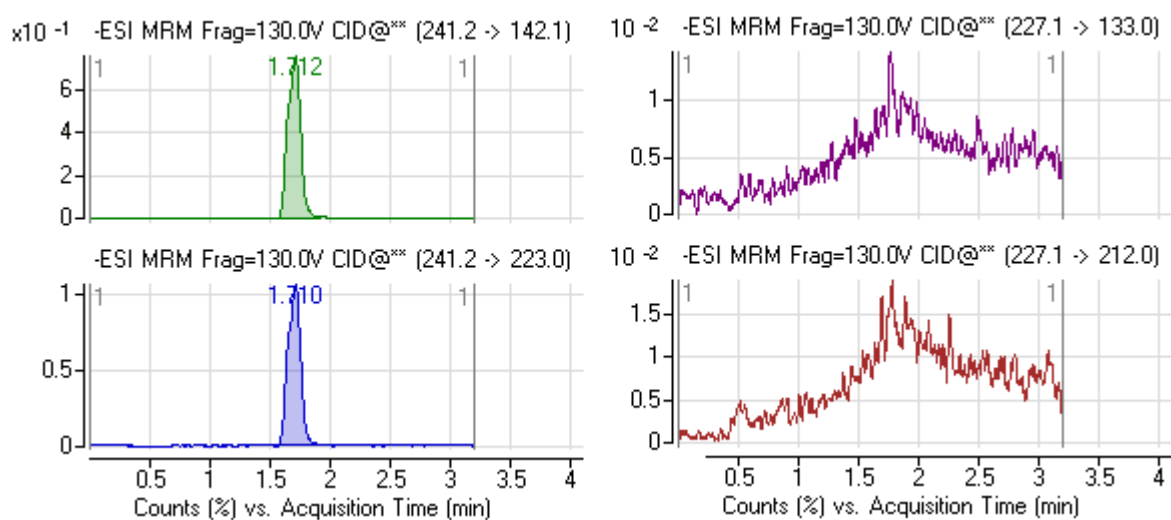
Ločitev komponent vzorca smo dosegli z nastavitvijo izbranih mas na masnem analizatorju, tako da smo omogočili prehod le izbranim MRM prehodom. Za BPA smo opazovali prehoda 227,1–212 in 227,1–133, za IS pa prehoda 241,2–223 in 241,2–142. Ker sta BPA in IS strukturno sorodni spojini, imata podobne kromatografske lastnosti in se eluirata pri podobnem retencijskem času: BPA pri 1,732 min (Slika 17), IS pa pri 1,710 min (Slika 16).

Iz kromatogramov metanola, raztopine IS in standardne raztopine BPA je razvidno, da je metoda selektivna. Na kromatogramu metanola (Slika 15) vidimo, da pri prehodih

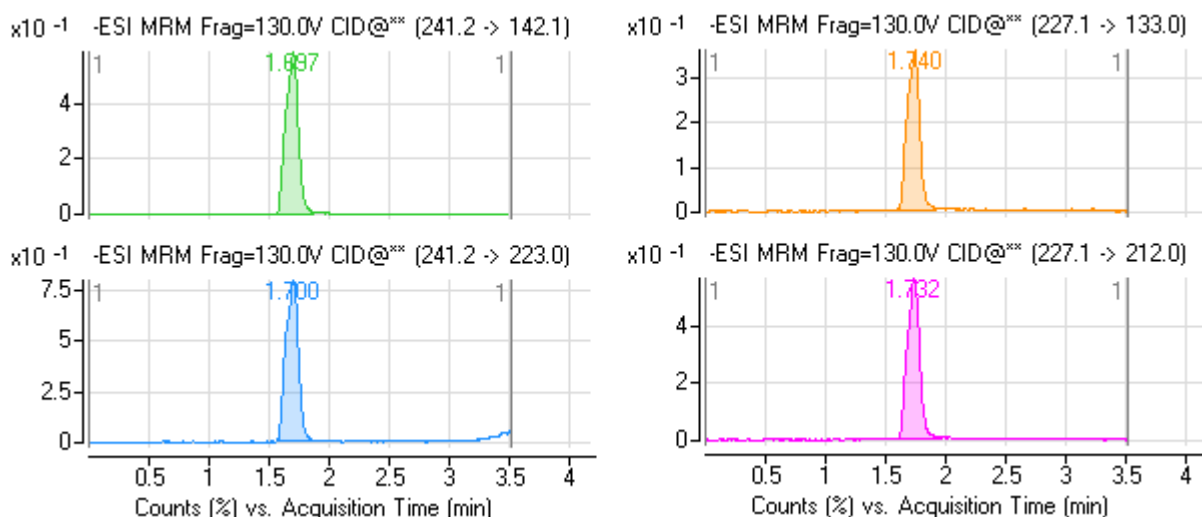
značilnih za BPA in IS ni značilnih vrhov, torej BPA in IS v metanolu nista prisotna. Na Sliki 16 je prikazan kromatogram raztopine IS v metanolu s koncentracijo 50 $\mu\text{g/L}$, ki nam je služila kot topilo za raztapljanje posušenih vzorcev. Opažamo vrhova pri prehodih, ki sta značilna za IS, ne pa tudi pri prehodih značilnih za BPA, kar potrjuje odsotnost BPA v topilu za raztapljanje. Slika 17 prikazuje kromatogram standardne raztopine BPA s koncentracijo 25 $\mu\text{g/L}$ v topilu za raztapljanje, v katerem pričakovano opažamo odzive za BPA in IS.



Slika 15: Kromatogram metanola. Na levi strani sta prikazana MRM prehoda za IS (241,2–142,1 in 241,2–223,0), na desni pa MRM prehoda za BPA (227,1–133,0 in 227,1–212,0).



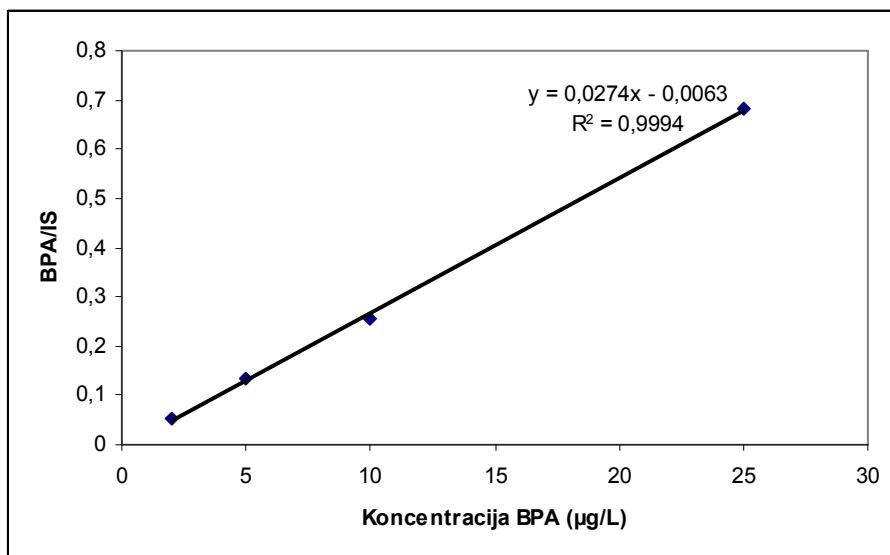
Slika 16: Kromatogram raztopine IS v metanolu (topilo za raztapljanje).



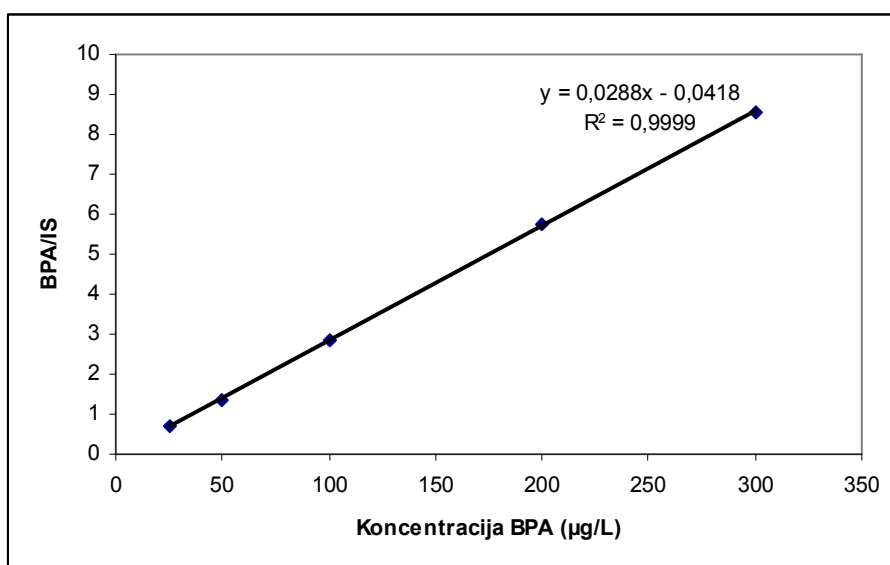
Slika 17: Kromatogram standardne raztopine BPA s koncentracijo 25 µg/L v topilu za raztapljanje.

Linearnost

Pri LC–MS/MS analizah se pogosto zgodi, da boljšo linearnost dosežemo, če koncentracijsko območje razdelimo na več delov in za vsakega posebej določimo regresijsko premico. Pri vrednotenju linearnosti smo izbrano koncentracijsko območje razdelili na dva dela. Območje nizkih koncentracij je obsegalo koncentracije od 2 do 25 µg/L, območje visokih koncentracij pa koncentracije od 25 do 300 µg/L. Koncentracijsko točko pri 25 µg/L smo upoštevali pri obeh območjih. Iz povprečnih vrednosti BPA/IS treh injiciranj pri vsaki izmed koncentracij standardnih raztopin smo po metodi najmanjših kvadratov izračunali regresijski premici za obe koncentracijski območji ter določili pripadajoča R^2 . Grafični predstavitvi in enačbi regresijskih premic ter njuna R^2 so predstavljeni na Slikah 18 in 19. V nizkem koncentracijskem območju znaša R^2 0,9994, v visokem pa 0,9999. Oba R^2 zadoščata kriteriju za linearnost metode ($R^2 \geq 0,99$), torej je metoda linearna v koncentracijskem območju 2–300 µg/L.



Slika 18: Odvisnost BPA/IS od koncentracije standardne raztopine v nizkem koncentracijskem območju (2–25 µg/L).



Slika 19: Odvisnost BPA/IS od koncentracije standardne raztopine v visokem koncentracijskem območju (25–300 µg/L).

Točnost in ponovljivost injiciranja

Iz povprečnega odziva 3 injiciranj pri posamezni deklarirani koncentraciji BPA v celotnem koncentracijskem območju (C_t) smo iz ustreznih regresijskih premic izračunali pripadajoče koncentracije BPA (C_i). S pomočjo *Enačb 2 in 4* smo izračunali točnost in ponovljivost injiciranja pri vsaki koncentraciji (Preglednica VI). Ugotovili smo, da je metoda v območju 2–300 $\mu\text{g/L}$ točna (točnost znotraj intervala $100 \pm 5 \%$) in ponovljiva ($\text{RSD} \leq 5 \%$).

Preglednica VI: Točnost in ponovljivost injiciranja.

Deklarirana koncentracija BPA, C_t ($\mu\text{g/L}$)	Razmerje BPA/IS	Izračunana koncentracija BPA, C_i ($\mu\text{g/L}$)	Točnost (%)	Ponovljivost injiciranja, RSD (%)
2	0,05103	2,092	104,6	3,68
5	0,13504	5,158	103,2	3,12
10	0,25709	9,613	96,1	1,11
25	0,68040	25,06	100,2	4,71
25	0,68040	25,08	100,3	4,71
50	1,36588	48,88	97,8	0,63
100	2,85223	100,5	100,5	0,35
200	5,75169	201,2	100,6	0,96
300	8,56585	298,9	99,6	0,64

Meja detekcije in meja kvantifikacije

Praktično določena meja kvantifikacije znaša 2 $\mu\text{g/L}$, saj je metoda pri tej koncentraciji zadovoljivo točna in ponovljiva.

Iz razmerij med signalom in šumom MRM prehodov za kvantifikacijo (227,1–212) standardnih raztopin BPA s koncentracijami 2, 5 in 10 $\mu\text{g/L}$ smo izračunali LOD in LOQ pri vsaki izmed teh koncentracijskih točk. Kot rezultat LOD in LOQ smo podali povprečje izračunanih vrednosti. LOD znaša 0,11 $\mu\text{g/L}$, LOQ pa 0,37 $\mu\text{g/L}$ (Preglednica VII).

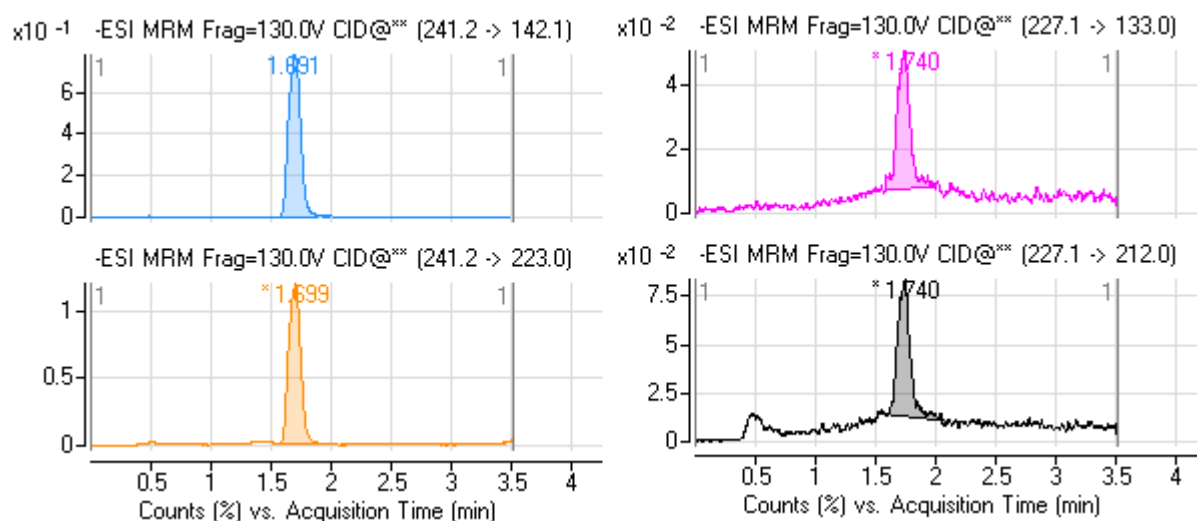
Preglednica VII: Meja detekcije in meja kvantifikacije, izračunani na podlagi razmerij signal/šum.

Koncentracija standardne raztopine BPA ($\mu\text{g/L}$)	Razmerje signal/šum	Meja detekcije ($\mu\text{g/L}$)	Meja kvantifikacije ($\mu\text{g/L}$)
2	97,7	0,061	0,205
5	149,2	0,101	0,335
10	178,4	0,168	0,561
Povprečna vrednost	/	0,11	0,37

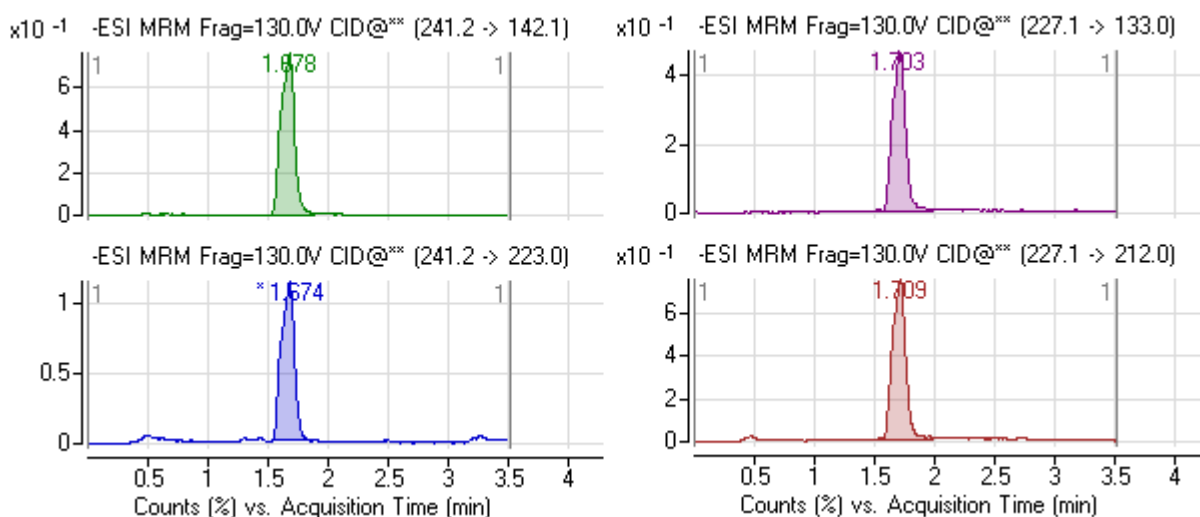
4.3.2 Validacija na ekstrahiranih vzorcih standardov BPA v prečiščeni vodi

Selektivnost

Slika 20 prikazuje kromatogram ekstrahirane prečiščene vode (slepi vzorec, ki nam je služil za pripravo standardnih raztopin za izvedbo ekstrakcije SPE), katerega posušeni ostanek smo raztopili v raztopini IS. Poleg kromatografskega vrha IS (retencijski čas 1,699 min) opazimo tudi kromatografski vrh, ki pripada BPA (retencijski čas 1,740 min). Prečiščena voda namreč vsebuje manjšo koncentracijo BPA in zaradi tega ni idealna za pripravo standardnih raztopin. Na Sliki 21 je prikazan kromatogram ekstrahirane standardne raztopine BPA v prečiščeni vodi s koncentracijo 25 ng/L. Kromatografski vrh z retencijskim časom 1,709 min pripada BPA, druge komponente pa v vzorcu niso prisotne.



Slika 20: Kromatogram ekstrahiranega vzorca prečiščene vode.

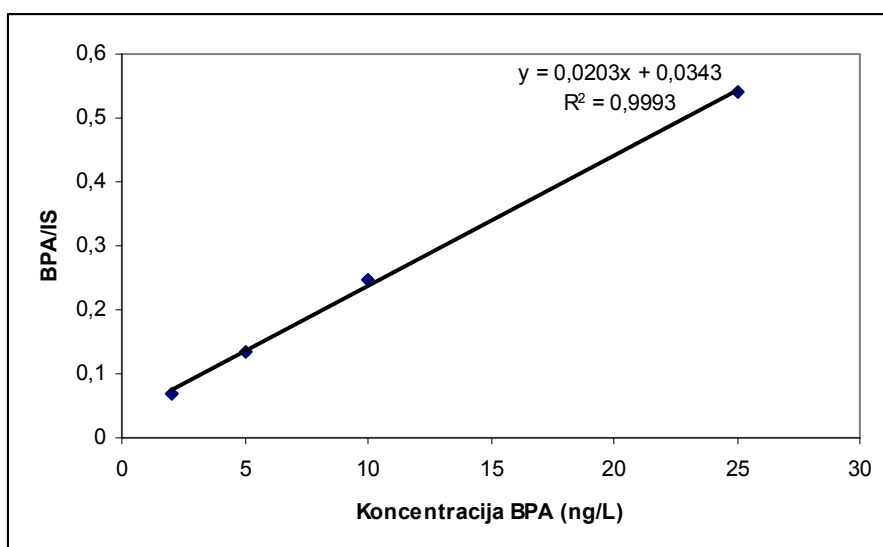


Slika 21: Kromatogram ekstrahirane vzorca standardne raztopine BPA v prečiščeni vodi s koncentracijo 25 ng/L.

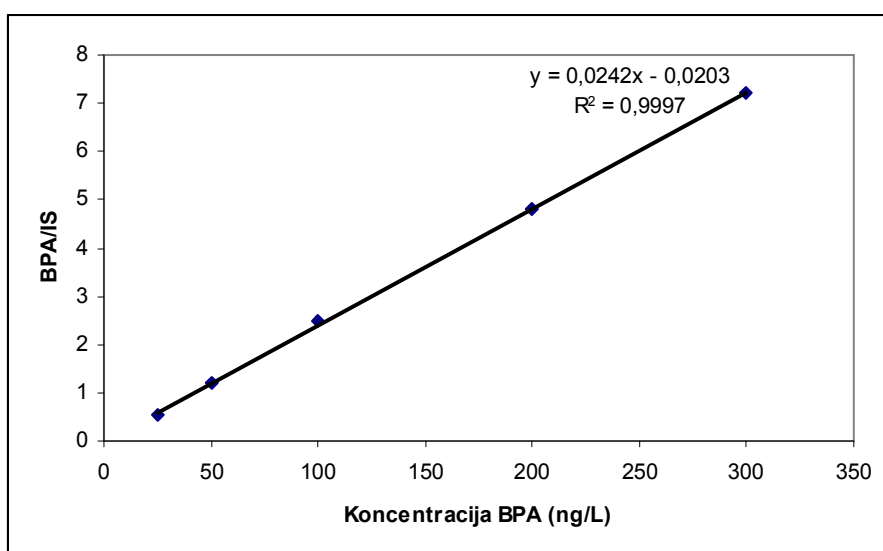
Linearnost

Vzorci standardnih raztopin smo koncentrirali 1000-krat. Iz 200 mL vzorcev standardnih raztopin koncentracij 2–300 ng/L smo ekstrahirali BPA in ostanek raztopili v 200 μ L topila za raztapljanje, tako da smo instrumentalno merili koncentracije BPA v intervalu 2–300 μ g/L. Od izmerjenih razmerij BPA/IS smo odšteli vrednost 0,08686, kolikor je znašal prispevek prečiščene vode (slepega vzorca) h koncentraciji BPA v začetnih standardnih raztopinah.

Pri določanju linearnosti smo koncentracijsko območje ponovno razdelili na dva dela in za vsako območje po metodi najmanjših kvadratov izračunali regresijski premici in pripadajoča R^2 . Nizko koncentracijsko območje je obsegalo koncentracije od 2 do 25 ng/L, visoko pa od 25 do 300 ng/L. Na Slikah 22 in 23 sta prikazani regresijski premici in njuna R^2 . Ugotovili smo, da je kriteriju za linearnost metode ($R^2 \geq 0,99$) zadoščeno v celotnem koncentracijskem območju (2–300 ng/L). V nizkem koncentracijskem območju R^2 znaša 0,9993, v visokem pa 0,9997.



Slika 22: Odvisnost BPA/IS od koncentracije ekstrahirane standardne raztopine BPA v nizkem koncentracijskem območju (2–25 ng/L).



Slika 23: Odvisnost BPA/IS od koncentracije ekstrahirane standardne raztopine BPA v visokem koncentracijskem območju (25–300 ng/L).

Točnost, izkoristek in ponovljivost ekstrakcije

Rezultati validacije točnosti, izkoristka in ponovljivosti ekstrakcije so podani v Preglednici VIII. Iz ustreznih umeritvenih premic (Sliki 22 in 23) in korigiranih razmerij BPA/IS smo izračunali koncentracijo BPA (C_i) pri vsaki koncentracijski točki ter s pomočjo *Enačbe 2* izračunali točnost ekstrakcije. Metoda je točna v celotnem koncentracijskem območju 2–300 ng/L, saj je točnost v intervalu $100 \pm 15 \%$.

S pomočjo *Enačbe 5* smo izračunali izkoristke ekstrakcije pri vsaki izmed koncentracijskih točk. Kot odziv ekstrahiranih standardnih raztopin smo upoštevali korigirana razmerja BPA/IS, kot odziv standardne raztopine pa vrednosti, izračunane iz umeritvenih premic pri validaciji na standardnih raztopinah BPA (Sliki 18 in 19). Ugotovili smo, da je izkoristek najvišji pri standardni raztopini z najnižjo koncentracijo (2 ng/L) in sicer znaša 144,7 %. Razlog za to je verjetno vpliv vsebnosti BPA v prečiščeni vodi. Pri višjih koncentracijah (5–300 ng/L) se je izkoristek ekstrakcije nekoliko znižal in bolj približal 100 % in sicer je v povprečju znašal 86,7 %.

Ekstrakcija je bila uspešna v območju od 2 do 300 ng/L, saj je tedaj RSD (*Enačba 4*) ustrežal kriteriju $RSD \leq 15\%$.

Preglednica VIII: Točnost, izkoristek in ponovljivost ekstrakcije.

Deklarirana koncentracija BPA, C_t (ng/L)	Korigirano razmerje BPA/IS	Razmerje BPA/IS standardne raztopine	Izračunana koncentracija BPA, C_i (ng/L)	Točnost ekstrakcije (%)	Izkoristek ekstrakcije (%)	Ponovljivost ekstrakcije, RSD (%)
2	0,07020	0,0485	1,768	88,4	144,7	13,73
5	0,13538	0,1307	4,980	99,6	103,6	11,45
10	0,24555	0,2677	10,41	104,1	91,7	6,34
25	0,53953	0,6787	24,89	99,6	79,5	5,71
25	0,53953	0,6782	23,13	92,5	79,6	5,71
50	1,18177	1,3982	49,67	99,3	84,5	1,91
100	2,47588	2,8382	103,2	103,1	87,2	0,78
200	4,79503	5,7182	199,0	99,5	83,9	3,33
300	7,22272	8,5982	299,3	99,8	84,0	6,67

Meja kvantifikacije

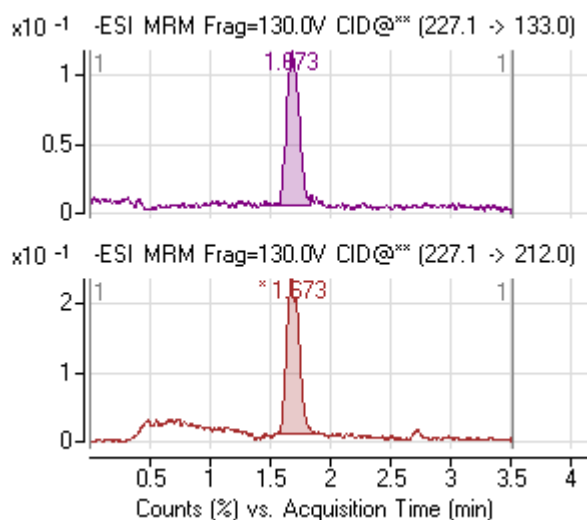
V vzorcu ekstrahirane standardne raztopine s koncentracijo 2 ng/L smo z izbrano analizno metodo kvantitativno določili BPA z ustrezno točnostjo in ponovljivostjo. Meja kvantifikacije tako znaša 2 ng/L.

4.4 ANALIZA VZORCEV

Koncentracijo BPA v posamezni paralelki smo izračunali iz povprečne vrednosti razmerja BPA/IS dveh injiciranj vzorca ob upoštevanju stopnje čistosti standardne spojine BPA (97 %). Če je povprečno razmerje BPA/IS ekstrahiranega vzorca znašalo 0,54 ali manj (kar ustreza koncentraciji BPA 25 ng/L), smo za izračun uporabili regresijsko premico pri nizkih koncentracijah (Slika 22), če pa je bilo to razmerje večje, smo uporabili regresijsko premico pri visokih koncentracijah (Slika 23). Kadar je koncentracija ene od paralelek močno odstopala od ostalih treh, je pri izračunu povprečne koncentracije nismo upoštevali. Predvidevamo, da je v primeru odstopanja pri procesu ekstrakcije, sušenja, raztapljanja ali prenosu raztopljenega vzorca v vialo prišlo do kontaminacije vzorca z BPA. Možni viri so prisotnost BPA v laboratorijskem zraku in plastični pripomočki, ki smo jih uporabljali pri delu (brizge in nastavki za SPE ekstrakcijo, kapalke, nastavki za pipete). Ker so v vzorcih prisotne zelo nizke količine BPA v ng območju, lahko že zelo majhen vnos BPA pomeni relativno veliko zvišanje koncentracije BPA v vzorcu.

4.4.1 Koncentracija BPA v vzorcih vodovodnih voda

Na Sliki 24 je prikazan kromatogram ene izmed vodovodnih voda s kromatografskim vrhom (retencijski čas 1,673 min), ki pripada BPA. Izmerjene koncentracije BPA v vzorcih vodovodnih voda so bile v območju od 2,1 do 23,6 ng/L, povprečna koncentracija pa je znašala 8,8 ng/L (Preglednica IX). Dobljeni rezultati se skladajo z literaturnimi podatki, kjer navajajo, da znaša koncentracija BPA v vodovodnih vodah od nekaj ng/L in v najslabšem primeru do 300 ng/L (25–27).



Slika 24: Kromatogram vodovodne vode s koncentracijo 11,3 ng/L.

Preglednica IX: Koncentracija BPA v vzorcih vodovodnih voda.

Vzorec	Koncentracija BPA (ng/L)	Št. prebivalcev/km ² v občini (74)
Ljubljana Rudnik	23,6	1004
Ljubljana Rožna dolina	5,0	1004
Novo mesto*	2,1	151
Brežice	18,5	90
Krško	4,8	89
Raka	5,3	89
Trebnje	3,4	74
Ivančna Gorica	2,4	66
Sevnica	11,6	65
Krmelj	11,3	65
Povprečna koncentracija	8,8	/

* vodovodna voda je bila priključena na sistem za filtracijo vode (Aqua Sistemi)

BPA prehaja v naravno okolje iz tovarn, v katerih proizvajajo izdelke iz BPA, saj ga iz odpadnih voda ne uspejo popolnoma odstraniti. Odpadne vode onesnažijo podtalnico in površinske vode, od tod pa BPA prehaja v vodovodne vode (18). Vir za sproščanje BPA v naravo so tudi gospodinjski in komunalni odpadki (1). Prisoten je v hrani in pijači, ki je zapakirana v embalažo iz BPA (18). Okolje lahko z BPA onesnaži sama odvržena embalaža, hrana oz. pijača ali pa BPA, ki nastane po razpadu BPA-glukuronida izločenega iz človeškega telesa (24). Koncentracija BPA v vodah iz različnih vodovodnih zajetij je tako odvisna od industrializacije območja, gostote poseljenosti in uspešnosti odstranjevanja BPA iz industrijskih odpadnih voda (27). Najvišjo koncentracijo BPA (23,6 ng/L) smo po pričakovanjih določili prav v vodi iz območja, ki je najbolj industrializirano (Ljubljana Rudnik). V manj industrializiranem predelu Ljubljane (Ljubljana Rožna dolina) je bila izmerjena koncentracija precej nižja (5,0 ng/L). Če primerjamo koncentracijo v vodi iz mesta Sevnica in bližnje vasi Krmelj, opazimo, da se koncentraciji le malo razlikujeta (11,6 oz. 11,3 ng/L), vsebnost v vodi iz vasi pa je bila nekoliko nižja kot v vodi iz mesta. Podobni vrednosti koncentracij BPA smo izmerili tudi v mestu Krško in bližnji vasi Raka, kjer sta bili določeni koncentraciji 4,8 oz. 5,3 ng/L. V tem primeru je bila koncentracija BPA v vodi iz vasi nekoliko višja kot v vodi iz mesta.

Ker zagotavljanje pitne vode brez vsebnosti BPA zaenkrat še ni mogoče, je smiselno namenjati pozornost razvoju dodatnih načinov za čiščenje vode. Na tržišču se pojavljajo različni sistemi za filtracijo vode za hišno, javno in industrijsko uporabo, ki bi lahko bili

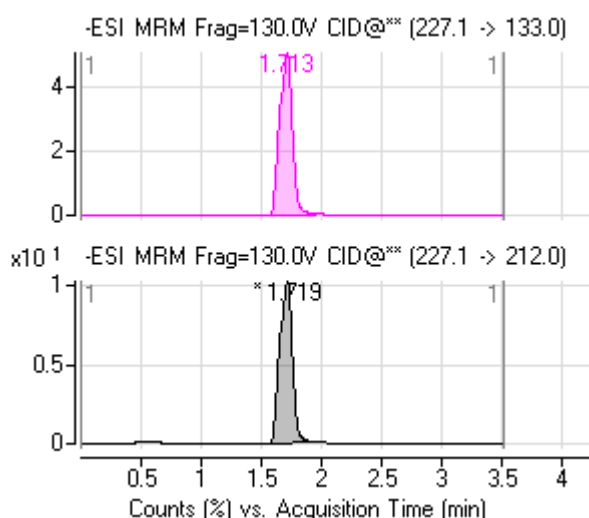
učinkoviti pri odstranjevanju BPA. Namenjeni so odstranjevanju širokega spektra kontaminantov iz vode, npr. bakterij, težkih kovin, klora, zdravil in ostalih kemikalij, ki se pojavljajo v vodovodnih vodah. Ena izmed vodovodnih voda (iz Novega mesta) je bila na javnem mestu priklopljena na filtracijski sistem, ki kontaminante iz vode odstranjuje s pomočjo tehnologije z aktivnim ogljem in UV tehnologijo (t.i. vodni bar, Slika 25). Po navedbah proizvajalca filter z aktivnim ogljem odstrani ali zmanjša vsebnost klora, nečistot, pesticidov in odstrani neprijeten vonj ter okus vode, z UV tehnologijo pa se zagotovi mikrobiološka varnost vode (75). Prav v tem vzorcu vodovodne vode smo izmerili najnižjo koncentracijo BPA (2,1 ng/L), kar potrjuje domnevo, da so filtracijski sistemi učinkoviti tudi pri odstranjevanju BPA. Znano je namreč, da aktivno oglje adsorbira BPA (22). Vodni bari zaradi številnih prednosti (prihranek denarja, ni dvigovanja težkih balonov, zaščita plastičnih površin pred razvojem mikroorganizmov) počasi nadomeščajo vodomate z baloni na javnih mestih. Ena izmed prednosti je verjetno tudi manjša vsebnost BPA v primerjavi z vodami iz balonskih vodomatov in z vodovodnimi vodami, kar smo nakazali z našo diplomsko nalogo. Predlagamo, da se analizira še več vzorcev vod, ki so filtrirane s podobnimi filtracijskimi sistemi in ob tem tudi določi koncentracijo BPA v vstopni vodi v sistem, tako da se omogoči izračun učinkovitosti filtracijskih sistemov.



Slika 25: Vodni bar (75).

4.4.2 Koncentracija BPA v vzorcih voda iz vodomatov

Slika 26 prikazuje kromatogram ene izmed voda iz vodomata. Kromatografski vrh pri retencijskem času 1,719 min pripada BPA. V vodah iz vodomatov je bil razpon izmerjenih koncentracij BPA precej višji kot v primeru vodovodnih voda. Najnižja izmerjena koncentracija je bila 10,6 ng/L, najvišja pa 290 ng/L (Preglednica X). Povprečna koncentracija vseh desetih vzorcev je znašala 92,7 ng/L. V literaturi sta navedeni koncentraciji BPA v vodah iz vodomata 112 ng/L (25) in 209 ng/L (28) in sta torej znotraj koncentracijskega območja, ki smo ga eksperimentalno določili mi.



Slika 26: Kromatogram vode iz vodomata s koncentracijo 290 ng/L.

Preglednica X: Koncentracija BPA v vzorcih voda iz vodomatov.

Vzorec	Koncentracija BPA (ng/L)	Napolnjenost balona*	Proizvajalec
ZD** Aškerčeva Ljubljana	191	polna	Dana
Knjižnica Vič	50,3	polna	Aqa
ZD Ivančna Gorica	37,5	polna	Aqa
Optika v Ljubljani	26,9	polna	Zala
Banka v Ljubljani	21,9	polna	Dana
ZD Krško	290	polovična	Dana
Urgenca Novo mesto	179	polovična	Radenska
Trgovski center Ljubljana	107	polovična	Dana
ZD Trebnje	10,6	polovična	Radenska
ZD Brežice	12,8	polovična	Zala
Povprečna koncentracija	92,7	polna: 65,5; polovična: 120	/

* polna napolnjenost pomeni, da je bil balon napolnjen vsaj do polovice volumna

* polovična napolnjenost pomeni, da je bil balon napolnjen največ do polovice volumna

** ZD – zdravstveni dom

Vsi vsebniki (baloni) so bili izdelani iz polikarbonatne plastike, ta pa zaradi hidrolize estrskih vezi in stika s plastičnimi deli sistema v vodo odpušča BPA (29). Ker se BPA med shranjevanjem v vodi akumulira (28, 30, 32), smo predvidevali, da je koncentracija BPA višja v balonih, v katerih je voda stala dalj časa. Žal nobeden izmed vodomatov, iz katerih smo vzorčili, ni imel navedenih podatkov o vzdrževanju vodomata in zadnji menjavi balona. Pri odvzemu smo si zabeležili, kakšna je bila polnost balona. Pet balonov je bilo skoraj popolnoma napolnjenih, preostalih pet pa je bilo napolnjenih največ do polovice balona. Povprečna koncentracija BPA v vodah iz polnih balonov je znašala 65,5 ng/L, v preostalih petih pa 120 ng/L. Ob predpostavki, da je bil poln balon napolnjen pred nedavnim, v manj napolnjenem pa je voda stala dalj časa, naši rezultati potrjujejo dejstvo, da se BPA pri daljšem shranjevanju akumulira in je koncentracija BPA v vodi iz manj napolnjenih balonov višja. Iz rezultatov sklepamo, da z vodo iz polnih balonov vnesemo v telo manjšo količino BPA kot z vodo iz manj napolnjenih balonov. To seveda ni pravilo, saj je polnost balona odvisna tudi od rednosti menjave balonov in hitrosti porabe vode na različnih javnih mestih. Koncentracija BPA v vodi zavisi tudi od kvalitete polnjene vode in od starosti balonov. Izpraznjene balone proizvajalci namreč po pregledu (potrditvi odsotnosti mehanskih poškodb z vizualno oceno) in pranju ter dezinfekciji ponovno napolnijo, pri čemer dobavitelji balonov priporočajo do 50 polnitev posameznega balona. V praksi običajno isti balon uporabijo 10–15-krat. Ker je hidroliza BPA iz starejših vsebnikov večja, je lahko povišana vsebnost BPA v vodi posledica uporabe preveč starih balonov. Hidroliza PC plastike je večja pri zvišani temperaturi in pod vplivom sončne svetlobe, zato se lastnikom in dobaviteljem vodomatov ter balonov priporoča, da vodomate postavijo vsaj 0,5 metra stran od grelnih teles in zaščiteno pred sončno svetlobo. Enaka priporočila veljajo tudi za shranjevanje balonov. V kolikor se tega ne držijo, je lahko zvišana vsebnost BPA v vodi iz balona posledica neustreznih pogojev med prevozom, shranjevanjem in porabo vode na javnem mestu (15, 16, 18, 76).

Preveriti smo hoteli tudi, ali se vode različnih proizvajalcev razlikujejo po vsebnosti BPA. Štiri izmed vzorčenih voda so bile blagovne znamke Dana, po dva vzorca pa blagovnih znamk Aqa, Zala in Radenska. Kar tri izmed štirih voda znamke Dana so presegle vsebnost BPA 100 ng/L, povprečna koncentracija BPA v vseh štirih vzorcih je znašala 152 ng/L. Vodi, ki jih polni Radenska, sta imeli vsebnosti BPA 179 in 10,6 ng/L (povprečno 94,8 ng/L). Vode znamk Aqa in Zala so vsebovale nižje koncentracije BPA in sicer povprečno 43,9 ng/L (Aqa) oz. 19,9 ng/L (Zala). Če ne upoštevamo napolnjenosti balonov, lahko

zaključimo, da višje koncentracije BPA vsebujejo vode proizvajalcev Dana in Radenska, nižje pa vode blagovnih znamk Zala in Aqa.

4.4.3 Koncentracija BPA v ostalih vzorcih

Plastične materiale razdelimo v sedem razredov (29):

- polietilentereftalat (PET, oznaka 1),
- polietilen visoke gostote (HDPE, oznaka 2),
- polivinilklorid (PVC, oznaka 3),
- polietilen nizke gostote (LDPE, oznaka 4),
- polipropilen (PP, oznaka 5),
- polistiren (PS, oznaka 6),
- ostalo (oznaka 7): polikarbonatna plastika in ostali plastični materiali, ki jih ne moremo uvrstiti v noben drug razred plastike.

Znano je, da se BPA sprošča iz PC plastike (oznaka 7), saj je njen osnovni gradnik, in iz PVC plastike (oznaka 3), ker se pri proizvodnji le-te uporablja kot antioksidant. Vendar pa tudi nekateri drugi tipi plastičnih mas niso popolnoma varni in lahko odpuščajo BPA ali druge nevarne snovi. V okviru ocenjevanja varnosti posameznih vrst plastične embalaže je med drugim pomembno, da se določa hitrost in obseg odpuščanja nevarnih kemikalij iz materialov. Na manjših vzorcih smo želeli primerjati vsebnost BPA v gazirani in negazirani mineralni vodi iz PET plasten in oceniti, kakšno je odpuščanje BPA iz plastičnih grelnikov vode in polistirenskih lončkov. Preveriti smo hoteli, ali plaste iz materiala, ki naj ne bi vseboval BPA, res ne odpuščajo BPA.

Primerjava vsebnosti BPA v negazirani in gazirani mineralni vodi

V dveh paralelkah smo analizirali vzorca negazirane in gazirane mineralne vode. Obe plaste sta bili izdelani iz PET-a. V literaturi navedene koncentracije BPA v negaziranih vodah iz PET plasten so v območju 2–13 ng/L (16, 25, 32). V vzorcu negazirane mineralne vode smo izmerili koncentracijo BPA 6,6 ng/L, kar se ujema z literaturnimi podatki. Izmerjena koncentracija BPA v gazirani mineralni vodi je bila za 26 % višja in sicer je znašala 8,3 ng/L. Gazirana mineralna voda ima zaradi vsebujočega ogljikovega dioksida nižji pH, kar bi lahko povzročilo večje izločanje BPA v vodo med procesi polnjenja in shranjevanja. Zaradi nižjega pH-ja vode pride do hitrejšega izluževanja snovi iz plastičnih materialov, npr. rezervoarjev, vodovodnih cevi, zamaškov in tesnil (77).

Predlagamo, da se analizira še več vzorcev mineralnih vod z dodanim ogljikovim dioksidom, da se zaključek potrdi.

Preizkušanje odpuščanja BPA iz plastičnega grelnika

Hidroliza estrskih vezi v PC plastiki je močno pospešena pri zvišani temperaturi (27, 28, 31), zato smo predvidevali, da prihaja pri segrevanju vode s plastičnimi gospodinjskimi grelniki (Slika 27) do odpuščanja BPA v segreto vodo. Prečiščeni vodi, ki smo jo segreti v plastičnem grelniku, smo želeli določiti koncentracijo BPA, vendar zaradi prevelikega odziva instrumenta za BPA to ni bilo mogoče. Povprečno razmerje BPA/IS v pripravljem vzorcu je namreč znašalo 34,6 in je tako 4,8-krat presežlo razmerje BPA/IS ekstrahirane vzorca standardne raztopine z najvišjo koncentracijo (300 ng/L), ki je znašalo 7,22. Eksperiment bi bilo smiselno ponoviti ob upoštevanju, da je koncentracija BPA v tako pripravljem vzorcu zelo visoka (vzorec skoncentrirati za manjši faktor). Čeprav koncentracije ne moremo določiti, pa lahko vsekakor potrdimo, da je BPA v vodi segreti s plastičnim grelnikom prisoten v zelo visoki koncentraciji.

Preizkušanje odpuščanja BPA iz polistirenskih lončkov

Do stika vročega napitka s plastičnim lončkom pride tudi uporabi avtomatov za tople napitke na javnih mestih (Slika 27). Lončki, ki se običajno uporabljajo pri teh avtomatih, so izdelani iz plastike tipa 6 (polistiren). Po 10-minutnem stiku vroče prečiščene vode z lončki tega tipa ni prišlo do signifikantnega porasta koncentracije BPA v vodi v primerjavi s koncentracijo BPA v prečiščeni vodi, saj je bila izmerjena koncentracija BPA v primerjavi s prečiščeno vodo višja le za 7 %. Sklepamo, da plastika tipa 6 ne odpušča BPA, ne moremo pa zagotovo trditi, da je uživanje toplih napitkov iz avtomatov iz vidika zaužitja BPA varno. V avtomatu bi lahko vroča voda ali napitek prišla v stik z morebitnimi deli iz PC plastike, kar bi povzročilo porast količine BPA v napitku. Da bi se prepričali o odsotnosti BPA, bi bila potrebna analiza samega napitka.



Slika 27: Avtomat za tople napitke s plastičnim lončkom (levo) in grelnik vode (desno).

Preizkušanje odpuščanja BPA iz platenke brez BPA

Vsebnost BPA v vodi je zadnja leta aktualna tema po celem svetu. Na tržišču se pojavljajo platenke, za katere proizvajalci trdijo, da ne vsebujejo BPA (t.i. BPA-free platenke). Želeli smo preveriti, ali je shranjevanje vode v takšnih platenkah res boljše z vidika manjšega odpuščanja BPA v primerjavi z navadnimi platenkami, katere pogosto večkrat uporabimo. V novo BPA-free platenko z volumnom 0,5 L smo nalili prečiščeno vodo in jo shranili na temnem mestu pri sobni temperaturi. Pod istimi pogoji smo shranjevali tudi prečiščeno vodo, ki smo jo nalili v že večkrat uporabljeno navadno platenko volumna 0,5 L z oznako 1 (PET). Po enem mesecu smo v dveh paralelkah določili koncentracijo BPA v obeh vzorcih. Koncentracija BPA v vodi iz BPA-free platenke je bila za 34 % nižja in sicer je znašala 2,9 ng/L, v vodi iz PET platenke pa 4,4 ng/L. Na osnovi teh meritev lahko potrdimo, da je naziv BPA-free platenk upravičen, saj je koncentracija BPA v vodi, ki smo jo shranjevali v njih, manjša v primerjavi s PET platenkami. Predlagamo, da se izvedejo podobne meritve z BPA-free platenkami različnih proizvajalcev. Smiselno bi bilo tudi oceniti odpuščanje BPA iz BPA-free platenk pri temperaturah, višjih od sobne, saj je uporaba platenk bolj aktualna v toplejših mesecih, ko zunanje temperature precej presežejo sobne.

Ugotovili smo torej, da je koncentracija BPA v vodovodnih vodah veliko nižja kakor v vodah iz vodomatov. Če bi odrasel moški s telesno težo 70 kg dnevno spil 3 litre z BPA najbolj obremenjene vode (vode iz vodomata s koncentracijo 290 ng/L), bi na ta način v

telo dnevno vnesel 12 ng/kg TM oz. 0,012 µg/kg TM BPA. Takšen vnos je močno pod največjim dovoljenim peroralnim vnosom BPA, ki znaša 50 µg/kg TM/dan (19). Številne študije pa kažejo, da naj bi imeli škodljive posledice, predvsem med zgodnjimi fazami razvoja, že veliko nižji odmerki (0,002–0,2 µg/kg TM/dan). Predlagano je ponovno ocenjevanje tveganja za BPA, ki bi verjetno zelo znižalo mejo dovoljenega vnosa (18, 19, 39, 40). Pitje vode iz vodomatov zato odsvetujemo, še posebej pri populaciji, ki je najbolj občutljiva na škodljive učinke BPA (dojenčki, otroci, nosečnice). Zarodki, dojenčki in otroci so zaradi intenzivne rasti in manj učinkovitega metabolizma ter eliminacije BPA najbolj občutljivi na BPA (18, 36, 38). Če je možno, na javnem mestu raje izberimo vodo iz vodnih barov s filtracijskimi sistemi ali vodovodno vodo. Če je pitje vode iz vodomata neizogibno, raje posezimo po vodi iz bolj napolnjenih balonov, saj je v njih vsebnost BPA verjetno nižja. Odsvetujemo tudi segrevanje vode v plastičnih grelnikih, saj se iz njih izločajo velike količine BPA.

Škodljivost BPA je v zadnjih letih postala aktualna tema po celem svetu. V medijih lahko zasledimo veliko nasvetov, kako se čim bolj izogniti vnosu te škodljive snovi v telo. Ker se BPA sprošča predvsem iz plastike z oznako 7 (polikarbonatna plastika), se je nakupu le-te potrebno izogibati. Boljša izbira je material, ki je označen z napisom 'BPA-free'. Ker se hidroliza polikarbonatne plastike pospeši pri zvišani temperaturi, se odsvetuje segrevanje hrane v plastični embalaži v mikrovalovni pečici. Prav tako je odsvetovano pranje plastične embalaže v pomivalnem stroju in uporaba detergentov. Za vročo hrano in pijačo je primernejša uporaba steklene, porcelanaste ali jeklene posode. Odsvetuje se tudi uporaba poškodovanih in motnih plastičnih vsebnikov ter večkratna uporaba embalaže za enkratno uporabo. Zaradi akumulacije BPA ni priporočljivo predolgo shranjevanje hrane ali pijače v plastični embalaži. Kadar ima hrana ali pijača nenavaden okus, je bolj varno, da je ne uživamo. Ker so notranje površine pločevink s hrano in pijačo običajno prevlečene s slojem epoksi smole, ki v medij odpušča BPA, je smotrno izogibanje uživanja hrane oz. pijače v pločevinkah v večjih količinah.

5 SKLEP

Pri diplomski nalogi smo preverili učinkovitost odstranjevanja bisfenola A (BPA) iz prečiščene vode s postopki destilacije, filtracije skozi celulozno-acetatne filtre in kartuše SPE ter določili koncentracijo BPA v vzorcih pitnih voda iz vodomatov in različnih vodovodnih zajetij. Z validacijo smo potrdili ustreznost že predhodno vpeljane metode za določanje koncentracije BPA v vodnih vzorcih z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) in metodo LC-MS/MS.

Destilacija se pri zmanjševanju koncentracije BPA iz prečiščene vode ni izkazala kot učinkovita metoda. Vsebnost BPA v destilirani vodi je bila za 4 % nižja v primerjavi s prečiščeno vodo. Možen razlog za slabo učinkovitost je z BPA onesnažen destilacijski hladilnik, zato bi bilo pred destilacijo smiselno hladilnik čez noč namakati v metanolu. Drugi možni razlog je kondenzacija nepopolno ohlajene destilirane vode na plastičnih zamaških steklenic, kar bi lahko povzročilo kontaminacijo destilirane vode z BPA iz zamaška. Predlagamo, da se pri ponovnem preverjanju učinkovitosti destilacije destilirano vodo popolnoma ohladi, preden se jo nalije v steklenice.

Filtracija prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre z velikostjo por 0,2 μm je znižala koncentracijo BPA za 12 % napram prečiščeni vodi, filtracija prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre z velikostjo por 0,45 μm pa je povzročila zvišanje koncentracije BPA v filtratu za 74 %. Pri štirikratni filtraciji prečiščene vode skozi celulozno-acetatne filtre z velikostjo por 0,2 μm se je koncentracija BPA v filtratu zvišala za 2 %. Predvidevamo, da je razlog za variabilno učinkovitost filtracije onesnaženost filtrov z BPA. Le-to smo potrdili tudi s spiranjem novega celulozno-acetatnega filtra z 10 mL metanola. S filtracijo raztopin BPA z nazivno koncentracijo 10 oz. 20 ng/L skozi celulozno-acetatne filtre z velikostjo por 0,2 μm smo ugotovili, da filtri zadržijo od 38 do 48 % raztopljenega BPA.

S filtracijo prečiščene vode skozi kartuše SPE (Strata-X) smo v filtratu znižali koncentracijo BPA za 10 %. Pri ponovni filtraciji filtrata skozi omenjeni sistem se je koncentracija BPA znižala za 19 % napram prečiščeni vodi. Razloga za slabšo učinkovitost sistema SPE ne poznamo. Predlagamo, da se pri nadaljnjem delu uporabijo diski s filtracijskim aparatom (Empore diski), ki se v praksi pogosto uporabljajo pri pripravi vode brez BPA.

Glede na slabšo učinkovitost vseh preizkušenih načinov odstranjevanja BPA iz prečiščene vode, smo kot slepi vzorec za pripravo standardnih raztopin pri validaciji uporabili prečiščeno vodo.

Z validacijo na standardnih raztopinah BPA smo potrdili, da je metoda LC–MS/MS selektivna, linearna, točna in ponovljiva ter da ima ustrezno mejo detekcije in mejo kvantifikacije za določanje koncentracije BPA v vzorcih v koncentracijskem območju od 2 do 300 µg/L. Validacija na ekstrahiranih vzorcih standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi je potrdila ustreznost celotnega analiznega postopka (ekstrakcije SPE in metode LC–MS/MS) pri določanju koncentracije BPA v vzorcih vode v koncentracijskem območju od 2 do 300 ng/L. Potrdili smo selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost in določili izkoristek ekstrakcije ter mejo kvantifikacije.

Po potrditvi ustreznosti analizne metode smo določili koncentracijo BPA v desetih vzorcih voda iz različnih vodovodnih zajetij in v desetih vzorcih voda iz vodomatov.

Koncentracije BPA v vodovodnih vodah so bile v območju od 2,1 do 23,6 ng/L, povprečna koncentracija je znašala 8,8 ng/L. Meritve se skladajo z literaturnimi podatki, kjer navajajo, da se koncentracije BPA v vodovodnih vodah gibljejo v območju od nekaj ng/L do 300 ng/L. Potrdili smo tudi predpostavko, da je v vodah iz bolj industrializiranih območij koncentracija BPA zvišana. Najvišjo vrednost BPA smo namreč izmerili prav v vodovodni vodi iz industrijske cone. Najnižjo vsebnost BPA je imela voda, ki je bila filtrirana s filtracijskim sistemom na osnovi aktivnega oglja (t.i. vodni bar). Predlagamo, da se analizira še več voda, ki so filtrirane z različnimi filtracijskimi sistemi in primerja njihova učinkovitost.

V vodah iz vodomatov smo izmerili koncentracijo BPA v območju od 10,6 do 290 ng/L. Povprečna koncentracija je znašala 92,7 ng/L. V literaturi sta navedeni koncentraciji BPA v vodah iz vodomatov 112 in 209 ng/L in sta torej znotraj območja, ki smo ga določili pri naši diplomski nalogi. Ugotovili smo, da je koncentracija BPA v balonih, ki so bolj napolnjeni, nižja (povprečna koncentracija 65,5 ng/L) kakor v manj napolnjenih balonih (120 ng/L). Predpostavljamo, da je v manj napolnjenih balonih voda stala dlje časa in se je tako v njih BPA akumuliral dalj časa, kar je povzročilo višjo vsebnost BPA.

Primerjali smo vsebnost BPA v negazirani in gazirani mineralni vodi iz plastenk z oznako 1 (PET). Koncentracija BPA v gazirani mineralni vodi je bila za 26 % višja kot v vzorcu negazirane mineralne vode. Dodan ogljikov dioksid zniža pH mineralne vode, kar lahko

pospeši odpuščanje BPA iz plastičnih materialov med procesi polnjenja in shranjevanja. Predlagamo analizo še več gaziranih mineralnih voda.

Ugotovili smo, da se pri segrevanju vode v plastičnih grelnikih vode za gospodinjске namene v vodo sproščajo zelo velike količine BPA. Razmerje BPA/IS v vodi segreti v takšnem grelniku je 4,8-krat preseglo razmerje BPA/IS ekstrahirane standardne raztopine BPA s koncentracijo 300 ng/L. Predlagamo, da se analiza ponovi, pri čemer se vzorec skoncentrira za manjši faktor, tako da bo možna kvantitativna določitev BPA.

Stik vroče vode z lončki iz plastike tipa 6 (polistiren), ki se uporabljajo v avtomatih za tople napitke, ni povzročil signifikantnega porasta koncentracije BPA.

Ugotovili smo, da komercialna plastenka, za katero proizvajalec trdi, da ne vsebuje BPA, v vodo odpušča manjše količine BPA v primerjavi z navadnimi plastenkami. Po enem mesecu shranjevanja prečiščene vode v takšni plastenki pri sobni temperaturi je bila vsebnost BPA za 34 % nižja kakor v vodi, ki smo jo shranjevali v običajni plastenki iz PET-a. Predlagamo še preskus ostalih podobnih plastenk, ki so na voljo na tržišču, in določevanje porasta vsebnosti BPA pri zvišanih temperaturah.

6 LITERATURA

1. la Farré M, Pérez S, Kantiani L, Barceló D: Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry* 2008; 27: 991–1007.
2. El-Shahawi MS, Hamza A, Bashammakh AS, Al-Saggaf WT: An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 2010; 80: 1587–1597.
3. <http://chm.pops.int/Home/tabid/36/language/en-US/Default.aspx>. Dostop: avgust 2010.
4. http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/obstojna_organska_onesnazevala/stockholm_ska_konvencija_o_obstojnih_organskih_onesnazevalih/. Dostop: avgust 2010.
5. Kümmerer K: Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 2001; 45: 957–969.
6. Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A: Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water research* 2002; 36: 1429–1438.
7. Rudel RA, Perovich LJ: Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmospheric Environment* 2009; 43: 170–181.
8. Janošek J, Hilscherová K, Bláha L, Holoubek I: Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro* 2006; 20: 18–37.
9. Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CAM: Dioxins sources and current remediation technologies — A review. *Environment International* 2008; 34: 139–153.
10. Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN: Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 2008; 34: 1033–1049.
11. Ravindra K, Sokhi R, Van Grieken R: Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* 2008; 42: 2895–2921.

12. Haynes D, Johnson JE: Organochlorine, Heavy Metal and Polyaromatic Hydrocarbon Pollutant Concentrations in the Great Barrier Reef (Australia) Environment: a Review. *Marine Pollution Bulletin* 2000; 41: 267–278.
13. Smith SR: A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment International* 2009; 35: 142–156.
14. Castro-González MI, Méndez-Armenta M: Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008; 26: 263–271.
15. Rubin BS, Soto AM: Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 304: 55–62.
16. Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D: Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216: 449–469.
17. Staples CA, Dom PB, Klecka GM, O’Block ST, Harris LR: A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 1998; 36: 2149–2173.
18. Kang JH, Kondo F, Katayama Y: Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006; 226: 79–89.
19. Willhite CC, Ball GL, McLellan CJ: Derivation of a Bisphenol a Oral Reference Dose (RfD) and Drinking-Water Equivalent Concentration. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 2008; 11: 69–146.
20. Mohapatra DP, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY: Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge – Fate of bisphenol A. *Chemosphere* 2010; 78: 923–941.
21. Kim KP, Ahmed Z, Ahn KH, Paeng KJ: Biodegradation of two model estrogenic compounds in a preanoxic/anaerobic nutrient removing membrane bioreactor. *Desalination* 2009; 243: 265–272.
22. Dong Y, Wu D, Chen X, Lin Y: Adsorption of bisphenol A from water by surfactant-modified zeolite. *Journal of Colloid and Interface Science* 2010; 1–10.
23. Zhang Y, Causserand C, Aimar P, Cravedi JP: Removal of bisphenol A by a nanofiltration membrane in view of drinking water production. *Water research* 2006; 40: 3793–3799.

24. Dekant W, Völkel W: Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 228: 114–134.
25. Zibelnik K: Razvoj metode LC-MS/MS za določanje vsebnosti bisfenola A v nebioloških vzorcih. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2010.
26. 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. *Journal of Chromatography B* 2000; 749: 17–23.
27. Li X, Ying GG, Su HC, Yang XB, Wang L: Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International* 2010; 36: 557–562.
28. Amiridou D, Voutsas D: Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Materials* 2010; 1–6.
29. http://www.wrap.org.uk/recycling_industry/information_by_material/plastics/types_of_plastic.html. Dostop: avgust 2010.
30. Maduka Ignatius C, Ezeonu Francis C, Neboh Emeka E, Shu Elvis N: Preponderance of Bisphenol-A in Harvested Rain Water in Enugu Municipality, South East, Nigeria. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences* 2010; 2(1): 36–38.
31. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM: Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters* 2008; 176: 149–156.
32. Casajuana N, Lacorte S: Presence and Release of Phthalic Esters and Other Endocrine Disrupting Compounds in Drinking Water. *Chromatographia* 2003; 5: 649–655.
33. <http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2010/2010-03-31/html/sor-dors53-eng.html>. Dostop: december 2010.
34. <http://www.euractiv.com/en/food/eu-ban-bisphenol-a-baby-bottles-2011-news-500052>. Dostop: december 2010.
35. <http://www.sdzv-drustvo.si/si/VD%2010%20Referati/04%20Kompare.pdf>. Dostop: november 2010.

36. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS: Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology* 2006; 147 (Supplement): 56–69.
37. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S: Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 2008; 74: 33–36.
38. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS: Large Effects from Small Exposures. I. Mechanisms for Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111: 994–1006.
39. Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A, Summary report, Ottawa, Kanada, 1.–5. nov. 2010.
40. vom Saal FS, Hughes C: An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113: 926–933.
41. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A: Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults. *JAMA* 2008; 300: 1303–1310.
42. Eertmans F, Dhooge W, Stuyvaert S, Comhaire F: Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicology in Vitro* 2003; 17: 515–524.
43. Chang HS, Choo KH, Lee B, Choi SJ: The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 172: 1–12.
44. Park K, Kwak IS: Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* 2010; 79: 934–941.
45. Herreros MA, Gonzalez-Bulnes A, Iñigo-Nuñez S, Letelier C, Contreras-Solis I, Ros-Rodriguez JM, Encinas T: Pregnancy-associated changes in plasma concentration of the endocrine disruptor di(2-ethylhexyl) phthalate in a sheep model. *Theriogenology* 2010; 73: 141–146.
46. Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y: Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. *Toxicology Letters* 2006; 167: 95–105.

47. Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT: On-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217: 3511–3518.
48. Covaci A, Voorspoels S, Abdallah MAE, Geens T, Harrad S, Law RJ: Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216: 346–363.
49. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc172.htm#PartNumber:1>. Dostop: avgust 2010.
50. Sueiro RA, Araujo M, Suárez S, Garrido MJ: Mutagenic potential of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its hydrolysis-derived products in the Ames Salmonella assay. *Mutagenesis* 2001; 16: 303–307.
51. Jordáková I, Dobiáš J, Voldřich M, Poustka J: Determination of Bisphenol A, Bisphenol F, Bisphenol A Diglycidyl Ether and Bisphenol F Diglycidyl Ether Migrated from Food Cans using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Czech J. Food Sci.* 2003; 21: 85–90.
52. Cabatona N, Dumont C, Severin I, Perdu E, Zalko D, Cherkaoui-Malki M, Chagnon MC: Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology* 2009; 255: 15–24.
53. Matsushima A, Liu X, Okada H, Shimohigashi M, Shimohigashi Y: Bisphenol AF Is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER α but a Highly Specific Antagonist for ER β . *Environmental Health Perspectives* 2010; 118: 1267–1272.
54. Kuruto-Niwa R, Nozawa R, Miyakoshi T, Shiozawa T, Terao Y: Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005; 19: 121–130.
55. Sajiki J, Yonekubo J: Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species. *Chemosphere* 2003; 51: 55–62.
56. Carabias-Martínez 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. *Journal of Chromatography A* 2006; 1137: 207–215.
57. Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P: Determination of weakly acidic endocrine-disrupting compounds by liquid chromatography–mass spectrometry with post-column base addition. *Journal of Chromatography A* 2004; 1056: 131–138.
 58. Rodríguez-Mozaz S, López de Alda MJ, 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. *Journal of Chromatography A* 2004; 1045: 85–92.
 59. Rykowska I, Wasiak W: Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives. *Acta Chromatographica* 2006; 16: 7–27.
 60. Kataoka H: New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22: 232–244.
 61. Poole CF, Gunatilleka AD, Sethuraman R: Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 2000; 885: 17–39.
 62. Bulletin 910 – Guide to Solid Phase Extraction, Sigma-Aldrich Co. 1998.
 63. <http://www.phenomenex.com/cms400min/product.aspx?id=448#x>. Dostop: avgust 2010.
 64. <http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=49597>. Dostop: avgust 2010
 65. HPLC, GC, SPE chromatography product guide PO/11, Phenomenex.
 66. Forgács E, Cserhádi T: *Chromatography/Principles*, Elsevier Science Ltd, Budimpešta, 2003: 1259–1267.
 67. Moreno-Arribas MV, Polo MC: *Chromatography/High-performance Liquid Chromatography*, Elsevier Science Ltd, Madrid, 2003: 1274–1280.
 68. Ardrey RE: *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*, Wiley, Chichester, 2003: 7–31.
 69. Mellon FA: *Mass spectrometry/Principles and Instrumentation*, Elsevier Science Ltd, Norwich, 2003: 3739–3749.
 70. Van Bramer SE: *An Introduction to Mass Spectrometry*, Widener University, Chester, 1997: 1–38.

71. Zimmer D: Introduction to Quantitative Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS). *Chromatographia Supplement* 2003; 57: 325–332.
72. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
73. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM: Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.
74. <http://www.stat.si/TematskaKartografija/Maplist.aspx?field=5>. Dostop: december 2010.
75. http://www.aqua.si/ContentPage.aspx?page_id=47. Dostop: december 2010.
76. http://www.zzv-lj.si/nimages/static/zzv_static/493/files/avtomati%20za%20vodo.pdf. Dostop: marec 2011.
77. Drev D: Problematika embalirane vode. Slovensko društvo za zaščito voda, Zbornik referatov 2005; 128–138.