

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

UROŠ FICKO

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

UROŠ FICKO

**PRIMERJAVA VSEBNOSTI BISFENOLA A V
PLASTENKAH Z GAZIRANO IN NEGAZIRANO VODO**

COMPARISON OF BISPHENOL A CONCENTRATIONS IN
PLASTIC BOTTLES WITH CARBONATED AND NON
CARBONATED WATER

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljal 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, in somentorju doc. dr. Robertu Roškarju, mag. farmacije, za nasvete, strokovno pomoč in potrpežljivost pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvalil bi se tudi vsem bližnjim, ki so me podpirali in tako pripomogli k uspešnemu dokončanju študija.

Izjava

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

Uroš Ficko

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm

Član diplomske komisije: doc.dr. Matjaž Jeras, mag. farm

Ljubljana, april 2012

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA	1
1.2 BISFENOL A	4
1.2.1 FARMAKOKINETIKA BPA	6
1.2.2 FARMAKODINAMIKA BPA.....	7
1.3 METODE EKSTRAKCIJE ZA PRIPRAVO VZORCEV IN KROMATOGRFSKE METODE ZA ANALIZO MOTILCEV ENDOKRINEGA SISTEMA	9
1.3.1 EKSTRACKIJA TEKOČE-TEKOČE	10
1.3.2 EKSTRACIJA NA TRDNEM NOSILCU (SPE).....	11
1.3.3 MIKROEKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU (SPME).....	12
1.3.4 KROMATOGRFSKE ANALIZNE METODE IN DETEKCIJA	13
1.3.4.1 Kromatografske metode	13
1.3.4.2 Detekcija	14
1.4 ANALIZNO DOLOČANJE BPA V VZORCIH GAZIRANIH IN NEGAZIRANIH VOD	14
1.4.1 SPE	14
1.4.2 LC-MS/MS	16
1.4.2.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	16
1.4.2.2 Tandemska masna spektrometrija (MS/MS)	17
2 NAMEN DELA	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 VZORCI	20
3.1.2 STANDARDI.....	20
3.1.3 TOPILA	20

3.1.4	APARATURE IN PRIBOR	21
3.2	METODE	22
3.2.1	PRIPRAVA OSNOVNIH STANDARDNIH RAZTOPIN.....	22
3.2.1.1	Priprava standardnih raztopin BPA	22
3.2.1.2	Priprava raztopin internega standarda BPA d-16.....	23
3.2.2	OPTIMIZACIJA IN PREVERJANJE USTREZNOSTI METODE SPE S KOLONAMI Strata-X™	23
3.2.2.1	Strata-X.....	23
3.2.2.2	Priprava topil	24
3.2.2.3	Uporabljeni postopek.....	25
3.2.2.4	Optimizacija parametrov	26
3.2.3	POSTOPEK SPE Z DISKI Empore®	28
3.2.3.1	Empore SDB-RPS	28
3.2.3.2	Priprava topil	29
3.2.3.3	Uporabljeni postopek.....	29
3.2.3.4	Preverjanje ustreznosti metode	30
3.2.3.5	Možnost večkratne uporabe diskov.....	31
3.2.3.6	Problematika postopka.....	31
3.2.3.7	Priprava vode brez vsebnosti BPA	31
3.2.4	OPTIMIZIRANA METODA SPE S KOLONAMI Strata-X	32
3.2.5	METODA LC-MS/MS.....	32
3.2.5.1	Metoda LC	32
3.2.5.2	Metoda MS/MS	33
3.2.6	PREVERJANJE USTREZNOSTI ANALIZNEGA POSTOPKA.....	33
3.2.6.1	Vrednotenje metode s standardnimi raztopinami BPA	33
3.2.6.2	Vrednotenje metode z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi	34
3.2.7	VREDNOTENJE METODE.....	35
3.2.7.1	Linearnost.....	35
3.2.7.2	Ponovljivost	36
3.2.7.3	Točnost	37
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	38
4.1	OPTIMIZACIJA PARAMETROV SPE-METODE S KOLONAMI Strata-X 38	
4.1.1	DOLOČITEV VOLUMNA TOPILA ZA ELUCIJO.....	38
4.1.2	DOLOČITEV VOLUMNA TOPILA ZA REKONSTITUCIJO	39

4.1.3	ČAS MEŠANJA VZORCA PO REKONSTITUCIJI	40
4.2	METODA SPE Z DISKI Empore®	40
4.2.1	PREVERJANJE USTREZNOSTI METODE	40
4.2.1.1	S slepim vzorcem	40
4.2.1.2	S prečiščeno vodo	41
4.2.1.3	S standardno raztopino BPA.....	41
4.2.2	MOŽNOST VEČKRATNE UPORABE DISKOV	42
4.2.3	PRIPRAVA VODE BREZ BPA	42
4.3	PREVERJANJE USTREZNOSTI ANALIZNEGA POSTOPKA.....	43
4.3.1	VREDNOTENJE METODE S STANDARDNIMI RAZTOPINAMI BPA. 43	
4.3.1.1	Linearnost	43
4.3.1.2	Ponovljivost.....	44
4.3.1.3	Točnost	45
4.3.2	VREDNOTENJE METODE Z EKSTRAHIRANIMI VZORCI STANDARDNIH RAZTOPIN BPA V PREČIŠČENI VODI.....	46
4.3.2.1	Linearnost	46
4.3.2.2	Ponovljivost.....	46
4.3.2.3	Točnost	47
4.3.2.4	Izkoristek ekstrakcije.....	48
4.4	ANALIZA VZORCEV GAZIRANIH IN NEGAZIRANIH VOD.....	49
5	SKLEP.....	54
6	LITERATURA	56

POVZETEK

Bisfenol A (BPA) je pomembna industrijska kemikalija, ki se masovno uporablja v industriji plastičnih mas in epoksidnih smol. Zaradi masovne uporabe je v okolju zelo razširjen. Pri uporabi embalaže za živila iz materialov, ki vsebujejo BPA, ta zaradi nepopolne polimerizacije tekom izdelave, prehaja v hrano in pijačo, ki je v stiku s tako embalažo. Ker izraža šibke estrogenske učinke, predstavlja tveganje za motnje delovanja endokrinega sistema pri ljudeh in živalih. Zaradi tega je pomembno spremljanje njegove koncentracije v hrani in okolju.

Pri izvedbi diplomske naloge smo preverjali ustreznost metode ekstrakcije z diski SPE Empore pri pripravi vodnih vzorcev za analizo BPA. Ker se omenjeni postopek ni izkazal za obetavnega, smo za določanje BPA v vodnih vzorcih uporabili metodo, ki je bila uporabljena pri predhodni diplomski nalogi na Fakulteti za farmacijo (16).

Za pripravo vzorcev smo uporabili metodo ekstrakcije SPE s kolonami Strata-X, katero smo dodatno optimizirali, za analizo pa metodo LC-MS/MS. Ustreznost metode smo potrdili z validacijo na standardnih raztopinah BPA oziroma validacijo z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi.

Z validirano metodo smo analizirali 23 vzorcev gaziranih in negaziranih vod različnih proizvajalcev in primerjali vsebnost BPA med njimi. Preverili smo vpliv vrste plastike, pH in koncentracije CO₂, ter temperature na vsebnost BPA v vodah. Pri negaziranih vodah so se koncentracije nahajale v območju od 1,76 do 33,35 ng/L, pri gaziranih vodah pa od 1,51 ng/L do 24,51 ng/L. Ugotovili smo, da vrsta plastike ni vplivala na vsebnost BPA v vodah. Prav tako nismo ugotovili povezave med vsebnostjo BPA v vzorcih gazirane in negazirane vode oziroma vpliva pH in koncentracije CO₂ na vsebnost BPA v vzorcih. Pri vzorcih, ki smo jih 20 ur izpostavljali temperaturi 40°C, nismo zaznali vpliva temperature na povečano prehajanje BPA iz plastenke v vodo. V vzorcu vode, shranjene v stekleni embalaži, smo določili za 21,4% nižjo koncentracijo BPA v primerjavi z vodo enake blagovne znamke shranjene v plastični embalaži, kar najverjetneje potrjuje prehajanje BPA iz plastične embalaže v vodo.

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is an important industrial chemical material widely used in industry of plastics and epoxy resins.

It is widely present in the environment due to its massive use. The traces of the BPA could be present in food and beverages if materials with presence of the BPA are used as a primary packaging material in food industry. BPA is released from packaging to food due to its incomplete polymerization during manufacture.

The BPA has a weak estrogenic like activity and therefore can influence functionality of endocrine system in humans and animals. For that reason it is important to have control over its concentration in food and environment.

In this thesis we tried to confirm suitability of the extraction method with SPE discs Empore in the process of preparation of water samples for the analysis of the BPA. This procedure did not show real results. Hence, we chose the established method of SPE extraction with Strata-X columns, which was additionally optimized. For the final analysis of the BPA LC-MS/MS method was used.

The suitability of methods was confirmed with validation process on standard BPA solutions and on extracted samples of standard BPA solutions in purified water. For comparison of the BPA content validated analysis on 23 samples of carbonated and still bottled water was performed. We tested the influence of plastic type, pH of water and concentration of CO₂ and temperature on the BPA content in water.

The BPA concentration in still water was in range from 1.76 ng/L to 33.35 ng/L compared to 1.51 ng/L to 24.51 ng/L in carbonated water. Our results do not show that plastic type or pH of water has any significant influence on the BPA concentration in bottled water. When we incubated our samples at 40° C for 20 hours the analysis also showed that temperature has no influence on the increase of the BPA concentration in the bottled water. The analysis of water in glass package showed 21.4 % lower BPA concentration in comparison to the water of the same brand packed in plastic package which showed migration of the BPA from plastic packages to the content.

SEZNAM OKRAJŠAV

Kratica	Pomen
BPA	Bisfenol A
BPA d-16	Bisfenol A d-16
ECD	Elektrokemijski detektor
EDC	Motilci endokrinega sistema (ang. <i>Endocrine disrupting compounds</i>)
e-EDC	Hormonski motilci estrogenske vrste (ang. <i>Estrogenic endocrine disrupting compounds</i>)
EPA	Agencija za varstvo okolja Združenih držav Amerike
ER	Estrogenski receptor
ER α	Estrogenski receptor α
ER β	Estrogenski receptor β
ERR	Estrogenskim podobni receptorji
ERR γ	Estrogenskim podobni receptorji γ (ang. <i>Estrogen related receptor</i>)
ESI	Elektrozaprševalna ionizacija (ang. <i>Electrospray ionization</i>)
FLD	Fluorescenčni detektor
GC	Plinska kromatografija
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IS	Interni standard
LC	Tekočinska kromatografija
LC-MS/MS	Tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LLE	Ekstrakcija tekoče-tekoče (ang. <i>Liquid-liquid extraction</i>)
m/z	Razmerje med maso in nabojem
MF	Mobilna faza
MRM	Spremljanje več produktnih ionov nastalih iz prekursorskega iona (ang. <i>Multiple reaction monitoring</i>)
MS	Masna spektrometrija
MS/MS	Tandemska masna spektrometrija
PET	Polietilentetraftalat
PP	Polipropilen
PV	Prečiščena voda
R²	Determinacijski (Pearsonov) koeficient
RSD	Relativni standardni odklon
SD	Standardni odklon
SERM	Selektivni modulator estrogenskih receptorjev
SF	Stacionarna faza
SFC	Superkritična tekočinska kromatografija
SML	Meja specifične migracije (ang. <i>Specific migration limit</i>)
SPE	Ekstrakcija na trdnem nosilcu (ang. <i>Solid phase extraction</i>)
SPME	Mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (ang. <i>Solid phase microextraction</i>)
SRM	Spremljanje izbranega prekursorskega in produktnega iona (ang. <i>Single reaction monitoring</i>)
TDI	Dovoljen dnevni vnos (ang. <i>Tolerable daily intake</i>)
TLC	Tankoplastna kromatografija
TM	Telesna masa
UHPLC	Tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti

1 UVOD

1.1 MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA

Nekatere naravne in sintetične spojine lahko vplivajo na normalno delovanje endokrinega sistema. Tako lahko vplivajo tudi na reprodukcijo in razvoj pri živalih in ljudeh. Te kemikalije imenujemo motilci endokrinega sistema (EDCs ang. *Endocrine disrupting compounds*) ali hormonski motilci (1). Med spojine, za katere je v literaturi potrjeno ali se zanje domneva, da delujejo kot motilci endokrinega sistema, spadajo pesticidi, farmacevtske učinkovine, industrijske spojine in druge, prikazane v Preglednici I.

Preglednica I: Seznam domnevnih/ znanih motilcev endokrinega sistema. (1)

Klasifikacija	Spojine	
Pesticidi	2,4 diklorofenoksiocetna kislina (2,4-D) atrazin benomil cipermetrin DDT in njegovi metaboliti dieltrin/ aldrin dikofol endosulfan endrin heksaklorobenzen (HCB) heptaklor ipridion karbamil kepon (klordekon)	Klordan (γ -HCH) lindan malation mankozeb metoksiklor metomil mirex paration pentaklorofenol petmetrin simazin toksafen trifluralin vinklozolin
Halogenirani aromatski ogljikovodiki	2,4-diklorofenol dioksini in furani poliklorirani bifenili (PCB)	polibromirani bifenili (PBB) in polibromirani difenilni etri (PBDE)
Alkilfenoli	nonilfenoli oktilfenoli pentafenoli	nonilfenol etoksilati oktilfenol etoksilati butilfenoli
Težke kovine	arzen kadmij	svinec živo srebro
Organotini (organske kositrove spojine)	tributiltin	trifeniltin (TPhT)
Ftalati	dietilheksil ftalat butil benzil ftalat di- <i>n</i> -butil ftalat di- <i>n</i> -pentilf talat	diheksil ftalat dipropil ftalat dicikloheksil ftalat dietil ftalat
Naravni hormoni	17 β - estradiol estron	estriol testosteron

Farmacevtske učinkovine	etinil estradiol mestranol	tamoksifen dietilstilbestrol (DES)
Fitoestrogeni	izoflavonoidi kumestani lignani	zearalenon β -sitosterol
Fenili	bisfenol-A	bisfenol-F
Aromatski ogljikovodiki	benzo(<i>a</i>)piren benza(<i>a</i>)antracen benzo(<i>b/h</i>)fluoranten antracen	piren fenantren <i>n</i> -butil benzen

Motilci endokrinega sistema izražajo svoje učinke tako, da posnemajo strukturo ali inhibirajo delovanje naravnih hormonov (2).

Endokrini sistem imajo skoraj vse živali, in sicer sesalci in nižje razviti vretenčarji (npr. ribe, dvoživke, plazilci, ptiči) ter nevretenčarji (npr. kače, raki, insekti idr.). Poleg endokrinega sistema poznamo še parakrini in avtokrini sistem žlez. Skupaj z živčnim je endokrini sistem eden izmed dveh komunikacijskih mehanizmov, ki nadzoruje in regulira vse odzive in funkcije v telesu. Sestavljen je iz žlez z notranjim izločanjem oz. endokrinih žlez, ki izločajo hormone, pomembne za razvoj, rast, reprodukcijo in obnašanje ljudi in živali. Endokrine žleze se nahajajo v različnih delih telesa in izločajo hormone v krvni obtok ter tako povzročajo odzive v drugih delih telesa. Hormoni torej delujejo kot kemični prenašalci informacij in povzročajo interakcije s specifičnimi receptorji v celicah, da bi sprožili odzive in zagotovili normalne biološke funkcije. Ravnovesje hormonov je uravnavano s pomočjo številnih mehanizmov, vendar je endokrini sistem kljub temu občutljiv na vplive iz okolja, ki lahko povzročijo negativne učinke za organizem.

Da lahko hormonski motilci vplivajo na endokrini sistem, morajo vstopiti v organizem. Do izpostavljenosti pri ljudeh lahko pride preko zaužite hrane in vode, vdihanega zraka, ki vsebuje delce ali pare teh snovi, farmacevtskih učinkovin zaužitih iz terapevtskih razlogov ali zaradi prehoda hormonskih motilcev z matere na plod. Ker delujejo že pri zelo nizkih koncentracijah, je za dokazovanje njihove prisotnosti potrebna uporaba visoko občutljivih detekcijskih metod (5,7,10,11).

Povezujejo jih s številnimi zdravstvenimi težavami pri ljudeh, kot sta povečanje možnosti za nastanek raka na modih, prostati in prsah pri ženskah ter zmanjšanje kakovosti in količine semenske tekočine pri moških. Motnje pa se kažejo tudi kot metabolična disfunkcija, prezgodnja puberteta, anomalije reproduktivnega trakta ter spontani splav

(1,3). Številne napake v razvoju in razmnoževanju živali so pripisali prav izpostavljenosti hormonskim motilcem. Pojavila se je feminizacija ribjih in žabjih samcev, prišlo je do zmanjšanja populacije in njihovih reproduktivnih sposobnosti, porasta števila osebkov z rakavimi obolenji, motena pa sta bila tudi imunski in živčni sistem. Slednje se je po večini izražalo tudi kot spremenjeno obnašanje (1,4). Večina hormonskih motilcev lahko vpliva na delovanje steroidnih ali peptidnih hormonov, medtem ko nekateri lahko vplivajo na sintezo peptidnih hormonov ali prenos informacij po vezavi na njihove receptorje (6).

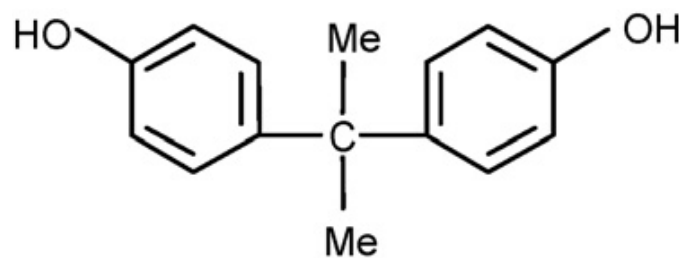
Kadar hormonski motilci delujejo na receptorje za estrogen, govorimo o hormonskih motilcih estrogenske vrste (e-EDCs ang. *Estrogenic endocrine disrupting compounds*) (7). Nekateri manj raziskani mehanizmi delovanja te vrste hormonskih motilcev imajo neposredne vplive na gene. Estrogeni in hormonski motilci z estrogenskim delovanjem na primer povzročajo poškodbe DNA, s čimer spodbujajo maligne spremembe v prizadetih celicah. Zaskrbljujoč pa je tudi njihov epigenetski vpliv (vpliv na izražanje genov) na metilacijo genov, ki se pojavlja zgodaj v življenju, učinki pa lahko imajo velike posledice šele leta kasneje in se celo prenašajo na naslednje generacije. Delujejo bodisi kot agonisti ali antagonist steroidnih spolnih hormonov estrogenov in androgenov (6). Sposobnost vezave na estrogenske receptorje in delovanje spojine je odvisno od uspešnosti posnemanja strukture 17- β estradiola, ki je najučinkovitejši naravni estrogen. Pogoji za vezavo na receptorje je prisotnost vsaj enega fenolnega obroča s prosto hidroksilno skupino. Na fenolni obroč mora biti vezana vsaj tri ogljikove atome dolga stranska veriga ali obroč. Dolžina in razvejanost stranske verige vplivata na jakost delovanja spojine na estrogenskem receptorju (8).

V okolju je prisotnih mnogo hormonskih motilcev, ki izhajajo iz različnih vej industrije, odpadkov, fekalnih vod, kmetijske dejavnosti in številnih drugih virov. Taka spojina je tudi bisfenol A (BPA), ki se na veliko uporablja pri proizvodnji plastike. Alkilfenoli so prisotni v mnogih detergentih, ki se uporabljajo v industriji in gospodinjstvih. V fekalnih vodah se nahajajo naravni in sintezni hormoni ter tudi farmacevtske učinkovine in njihovi metaboliti, med njimi so pogosti peroralni kontraceptivi in nekatere učinkovine za zdravljenje raka. Iz kmetijske dejavnosti izhajajo številne kemikalije, mnoge med njimi tudi starejšega izvora, ki so se ali se še vedno uporabljajo kot pesticidi (1, 6, 8). Motilci endokrinega sistema so prisotni v pitni vodi, površinskih vodah, podtalnih vodah, deževnici, zaradi svojih lipofilnih lastnosti pa se nekatere izmed teh spojin kopičijo v maščobnih tkivih živih organizmov (1,2,7). Zaskrbljujoč je podatek, da so koncentracije

spojin, ki se kopičijo, največje na vrhu prehranjevalne verige, pri vrstah kamor spadamo tudi ljudje (9).

1.2 BISFENOL A

Bisfenol A (2,2-bis(4-hidroksifenil) propan) uvrščamo v skupino bisfenolov. Spojina je sestavljena iz dveh fenolnih obročev in dveh metilnih skupin, vezanih na centralni ogljikov atom, kot prikazuje Slika 1.



Slika 1: Kemijska struktura bisfenola-A (12)

BPA izraža šibko kisle lastnosti ($pK_a = 9,7$) in je precej hidrofobna spojina ($\log P = 3,25$). V vodi je zelo težko topna (topnost v vodi znaša 89 mg/L) (12). Nastane s kondenzacijo fenola in acetona pri nizkem pH-ju in visokih temperaturah, ob prisotnosti katalizatorjev. BPA je trenutno ena izmed najbolj masovno proizvajanih kemikalij, saj je letna proizvodnja v letu 2010 znašala že več kot 5 milijonov ton, ob tem pa se ga z letno proizvodnjo v okolje spusti več kot 100 ton. Največ BPA se porabi za proizvodnjo polikarbonatne plastike in epoksidnih smol. Uporablja pa se tudi za izdelavo zaviralcev gorenja, nenasičenih poliestrskih smol, polivinilklorida, poliakrilata in polisulfonskih smol. Najdemo ga v številnih izdelkih iz polikarbonata, namenjenih za stik z živili, kot so npr. jedilni pribor, posode za mikrovalovno pečico in shranjevanje, baloni za vodomate, nahaja pa se tudi v epoksi premazih, ki preprečujejo neposreden stik živila s kovino na notranji strani pločevink in konzerv. Iz polikarbonatne plastike so narejeni tudi drugi izdelki za vsakdanjo rabo, med njimi CD-ji, bančne kartice, stekla za očala itd. BPA pa vsebujejo tudi materiali za izdelavo kompozitnih plomb, ki se uporabljajo v dentalni medicini (12,13). Težava je v tem, da zaradi nepopolne polimerizacije tekom proizvodnega procesa preostali BPA kasneje prehaja iz materiala. Ves BPA se namreč ne vključi v strukturo s kemijskimi vezmi, del ostane prost in lahko prehaja iz materiala. Kljub popolni

polimerizaciji BPA pa lahko pride do njegovega sproščanja iz materiala, če je izpostavljen višjim temperaturam in kislim ali bazičnim raztopinam (13).

Pri delavcih v tovarnah, ki proizvajajo izdelke iz BPA, prihaja do vdihovanja BPA preko zraka ali do kontaktne izpostavljenosti, kar lahko povzroča alergični kontaktni dermatitis. BPA se nahaja v odpadnih vodah tovarn, v katerih ga proizvajajo, saj ga iz teh ne uspejo popolnoma odstraniti. To pa predstavlja enega izmed glavnih virov BPA, ki onesnažujejo okolje, saj iz odpadnih voda prehaja v podtalnico in površinske vode ter se veže na zemljo in sedimente (14). V vodi se BPA pri aerobnih pogojih biološko razgradi (razpolovni čas 14,5 dni), medtem ko je v anaerobnih pogojih stabilen. Njegova koncentracija v naravi se zmanjšuje tudi zaradi razredčevanja v vodi. Komunalne čistilne naprave ga učinkovito odstranjujejo z biološko razgradnjo v aerobnih pogojih s pomočjo mikroorganizmov in njihovih encimov. Najbolj učinkovito odstranjevanje BPA dosežemo s fizikalno-kemijskimi procesi, npr. s svetlobno oksidacijo, Fentonovo oksidacijo in ozonacijo, vendar pa ti procesi zahtevajo dodatek katalizatorjev in oksidantov, kar poveča stroške ter prispeva k sekundarnemu onesnaženju (15). Prisotnost BPA v površinskih in odpadnih vodah posledično vpliva tudi na njegovo prisotnost v pitni vodi. Nevarnost za ljudi pa predstavlja tudi prehajanje BPA iz materiala, ki je v stiku s hrano in pijačo.

V vodi iz plastenk so bile izmerjene koncentracije BPA v območju od 1,8 do 12,7 ng/L (16) in so praviloma višje kot v vodovodni vodi (12). V Preglednici II so prikazane koncentracije BPA v različnih vrstah predpakirane hrane in pijače iz pločevinastih vsebnikov.

Preglednica II: Vsebnost BPA v hrani in pijači iz pločevinastih vsebnikov. (19)

Vrsta hrane/pijače iz pločevinke	Povprečna koncentracija BPA ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ali $\mu\text{g}/\text{L}$)	Število vzorcev
Sadje	9,8	70
Zelenjava	32,4	305
Žitarice	42,7	22
Meso	69,6	70
Juhe	49,1	66
Morska hrana	26,6	166
Sladice	26,7	11

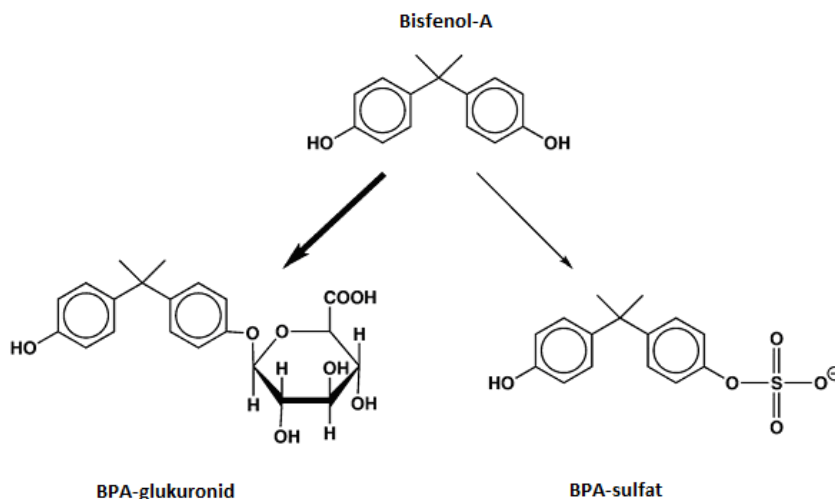
Da se pokažejo estrogenski učinki BPA, ni nujno potrebna velika koncentracija, saj se izražajo že pri zelo nizkih koncentracijah, kot je 1 ng/L (delček na trilijon, ang. *ppt*) (17). Agencija za varstvo okolja Združenih držav Amerike (EPA) je v osemdesetih letih

prejšnjega stoletja določila dovoljeno dnevno količino (TDI) BPA (ang. *Acceptable dose oz. Reference dose*), ki znaša 50 µg/kgTM/dan. Od takrat se je pojavilo že veliko dokazov, da so odmerki, ki vplivajo na endokrini sistem, še veliko manjši (13,18). V letu 2004 je Evropska komisija določila mejo specifične migracije SML (ang. *Specific migration limit*) za vsebnike, ki so v neposrednem stiku z živili pri 600 ng/g (12).

BPA so povezali z različnimi tipi boleznimi. Izpostavljenosti že majhnim koncentracijam povezujejo z rakavimi obolenji, predvsem na prostati in prsih, neplodnostjo, kardiovaskularnimi boleznimi, debelostjo, sladkorno boleznijo, hiperaktivnostjo pri otrocih in različnimi nevrološkimi boleznimi. Največjo grožnjo splošnemu zdravju ljudi pa predstavlja že zelo zgodnja izpostavljenost vplivom BPA, kjer mislimo na izpostavljenost zarodkov, novorojenčkov in dojenčkov (13,19).

1.2.1 FARMAKOKINETIKA BPA

Absorpcija, distribucija, metabolizem in eliminacija BPA so odvisni od načina aplikacije. BPA se po zaužitju pri ljudeh in živalih hitro absorbira v gastrointestinalnem traktu (GIT). Absorbira se ga več kot 95%. Metabolizem prvega prehoda pri sesalcih poteka v jetrnih mikrosomih in črevesni steni po dveh presnovnih poteh, pri katerih nastaneta BPA-glukuronid in v manjši meri BPA-sulfat (Slika 2).



Slika 2: Metabolizem bisfenola-A (23)

Konjugirane oblike BPA ne izražajo estrogenskih učinkov. Biološko aktivna je namreč le nekonjugirana oblika BPA, ki se večinoma veže na plazemske proteine.

Reakcijo konjugacije BPA z glukuronsko kislino katalizirajo jetrni encimi UDP-glukuronoziltransferaze (20). Pri podganah so ugotovili, da je še posebej aktivna izoformna oblika UGT2B1, pri ljudeh pa je za glukuronidacijo v največji meri odgovoren izoencim UGT2B15, ki je prisoten v jetrih, požiralniku in prostati (21,22). Za nastanek BPA-sulfata so odgovorne jetrne sulfottransferaze (20). Konjugirani BPA je v vodi dobro topen. Pri človeku se hitro izloča iz krvi preko ledvic z urinom, pri tem je njegov razpolovni čas krajši od 6 ur, do popolne eliminacije pa pride v 24 urah po zaužitju, medtem ko pri podganah vstopa v enterohepatični cikel in se izloča preko žolča s fecesom (23). Ugotovili so, da prihaja pri podganah tudi do razlik v stopnji glukuronidacije v odvisnosti od spola. Pri izoliranih hepatocitih podgan ženskega spola je prišlo do 100% pretvorbe BPA v BPA-glukuronid, medtem ko je bil delež glukuronidacije pri samčkih le 58%, 30% BPA pa se je pretvorilo v BPA-sulfat. Razlika je verjetno v različnih izoencimih, ki so odgovorni za metabolizem BPA (24). Pri visokih odmerkih BPA nastajajo tudi nekateri drugi metabolični produkti, in sicer 5-hidroksi BPA, 3-hidroksi BPA, BPA-O-kinon. Do njihovega nastanka zaradi nasičenja encimov, ki katalizirajo reakcijo glukuronidacije. Zaradi učinkovitega metabolizma prvega prehoda in dobre topnosti konjugata je možnost akumulacije majhna, zato ne moremo pridobiti informacije o vnosu skozi daljše časovno obdobje. Vrednosti prostega BPA v krvnem obtoku so zaradi tega nizke, kar zahteva uporabo zelo občutljivih metod za določanje koncentracije. Zato je bolj smiselno spremljati koncentracijo metabolitov BPA v urinu, celokupno izpostavljenost pa natančneje določiti s pomočjo biološkega nadzora (23).

1.2.2 FARMAKODINAMIKA BPA

BPA so prvotno odkrili in uporabljali kot umetni estrogen. Ker ima v primerjavi s 17- β estradiolom nizko afiniteto do vezave z jedrnimi estrogenskimi receptorji, so ugotovili, da deluje šibko estrogensko (13,25). Njegove estrogenske učinke so začeli izkoriščati za povečanje hitrosti rasti pri perutnini in govedu, kasneje pa so ga nekaj let uporabljali tudi kot nadomestek za estrogen pri ženskah. BPA je endokrini motilec s šibko estrogensko aktivnostjo in selektivni modulator estrogenskih receptorjev (SERM ang. *Selective estrogen receptor modulator*) (26). Veže se na dva podtipa estrogenskih receptorjev (ER), in sicer ER α in ER β , pri čemer ima do ER β približno 10-krat večjo afiniteto. Njegova jakost delovanja je od 1000- do 10000-krat šibkejša od 17- β estradiola. Kljub temu so rezultati več študij pokazali, da lahko BPA spodbudi hiter celični odziv že pri zelo nizkih

koncentracijah in sodeluje pri številnih kompleksnih biokemijskih reakcijah. Ugotovili so tudi, da so te koncentracije celo nižje od tistih, kjer se od BPA pričakuje vezava na klasične jedrne estrogenske receptorje (27). Veže se lahko tudi na membranske estrogenske receptorje in povzroči negenomske steroidne reakcije z enako učinkovitostjo kot estradiol (13). ER se nahajajo pri obeh spolih v različnih tkivih po telesu, kot so jajčniki, dojke, kardiovaskularni sistem, moda, možgani, jetra, kosti, nadledvične žleze, urogenitalni in gastrointestinalni trakt. Zaradi tega prisotnost BPA v telesu povzroča veliko neželenih učinkov tako pri ženskah kot pri moških. Na ER deluje kot agonist (28). Vpliva tudi na androgenske receptorje, kjer izraža antagonistične učinke in posledično vpliva na sintezo testosterona ter tako povzroča proliferacijo človeških rakavih celic prostate. Enak učinek se pojavi tudi zaradi agonističnih učinkov na mutirani obliki androgenskih receptorjev, ki so prisotni v nekaterih tumorjih prostate. Antagonistično deluje tudi na tiroidne receptorje (29,30).

Predvidevali so, da morajo obstajati še drugi receptorji v jedru, ki so sposobni vezati BPA z večjo afiniteto kot estrogenski in androgenski receptorji. V zadnjem času so to potrdili s študijami in ugotovili, da se BPA močno veže na receptorje, imenovane estrogenskim podobni receptorji ($ERR\gamma$ ang. *estrogene related receptors*). ERR so podskupina jedrnih receptorjev sirot, ki so podobni estrogenskim receptorjem, $ER\alpha$ in $ER\beta$. ERR se delijo na tri podskupine in sicer $ERR\alpha$, $ERR\beta$ ter nedavno odkritega predstavnika $ERR\gamma$. Kljub temu da je $17-\beta$ estradiol naravni ligand ER, se ne veže na noben receptor iz skupine ERR. Njihov naravni ligand tudi še ni poznan. BPA se na $ERR\gamma$ veže s kar 80 do 100-krat večjo afiniteto kot na ER. $ERR\gamma$ so močno izraženi v možganih sesalcev med razvojem, pri odraslih pa se nahajajo v možganih, pljučih, jetrih ledvicah in drugih tkivih.

Negativni vplivi BPA so odvisni predvsem od izpostavljenosti celic njegovi prosti obliki. Ta oblika je sicer v krvnem obtoku prisotna v manjših koncentracijah, vendar so nekatere celice, ki vsebujejo encim β -glukuronidazo, sposobne dekonjugirati BPA-glukuronid, s čimer pride do pojava BPA v prosti obliki. Visoke koncentracije β -glukuronidaz pri podganah so odkrili predvsem v pljučih, tankem črevesu in placenti med brejostjo. Pri človeku je bila prisotnost β -glukuronidaz dokazana v placenti, s tem pa tudi možnost prehajanja proste oblike BPA v popkovnično kri. Ravno prisotnost v placenti je zaskrbljujoč dejavnik, saj obstaja veliko tveganje za izpostavljenost zarodka prosti obliki BPA, kljub temu da je stopnja glukuronidacije v jetrih pri materah še vedno visoka. Tvegana pa je tudi izpostavljenost novorojenčkov in dojenčkov, zaradi občutljivosti

razvijajočih se organov in možganov na eksogene hormone (13,24,31,32). Zaradi majhnih koncentracij UDP-glukuroniltransferaz v zarodku prihaja do akumulacije BPA (33). Pri novorojenčkih naj bi bile koncentracije BPA v krvi kar trikrat višje kot pri odraslih, ker pri novorojenčkih še ni popolnoma razvit mehanizem konjugacije (20). Zaradi nizkih koncentracij UDP-glukuroniltransferaz v jetrih ploda ter nepopolno razvitega metabolizma in sistema eliminacije je tudi izpostavljenost nizkim koncentracijam BPA bolj nevarna za plod kot za odraslega človeka (14,29,33). Tudi med nosečnostjo pride do sprememb v metabolizmu BPA, zato se lahko pri izpostavljenosti nosečnic pojavijo resnejši zapleti, kot so prezgodnja zrelost zarodka, omejitve rasti ploda, preeklampsija in spontan splav (34,35).

1.3 METODE EKSTRAKCIJE ZA PRIPRAVO VZORCEV IN KROMATOGRAFSKE METODE ZA ANALIZO MOTILCEV ENDOKRINEGA SISTEMA

Kljub napredku v razvoju visoko učinkovitih analiznih naprav je običajno potrebna ustrezna priprava vzorcev z namenom izolacije in koncentriranja preiskovane spojine, s tem pa zmanjšanja vpliva matriksa pri analizi. Zaželeno je, da so tehnike priprave vzorcev hitre, čim bolj enostavne za uporabo, poceni in kompatibilne z velikim številom analitičnih instrumentov, ob čim manjši porabi topil tekom priprave vzorca (36).

Vzorci so si med seboj lahko zelo različni, kar zahteva uporabo različnih metod priprave. Tako je biološkim vzorcem pri določenih analizah potrebno dodati encim glukuronidazo ali sulfatazo, da cepimo konjugate in določamo analit v prosti obliki. Zaradi stabilnosti konjugatov je pomemben tudi način shranjevanja bioloških vzorcev. Največkrat jih takoj po odvzemu zamrznemo in zamrznjene shranjujemo do analize.

Nebiološke vzorce iz okolja, kot so razne vode, je potrebno filtrirati ali centrifugirati v primerih, ko vsebujejo trdne delce (umazanija, pesek...). Vzorce trdne hrane moramo predhodno homogenizirati ali liofilizirati, tekoče vzorce hrane pa filtrirati ali centrifugirati. Odvisno od prisotnosti komponent v vzorcu, ki lahko motijo določanje preiskovanega analita, uporabljamo posebne tehnike priprave. Vzorce gaziranih pijač moramo tako razpliniti, v vzorcih z visoko vsebnostjo proteinov pa le-te odstraniti s precipitacijo.

Šele potem sledi izolacija in koncentriranje analita, za kar so se kot najprimernejše izkazale ekstrakcija tekoče-tekoče, ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE *ang. Solid phase extraction*)

in mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (SPME *ang. Solid phase microextraction*), ki se uporablja redkeje (2, 12,23,36).

Po končani ekstrakciji je največkrat potrebno ločiti preiskovani analit od ekstrakcijskega oz. elucijskega topila, kar storimo z odparevanjem topila. Suhi ostanek nato ponovno rekonstituiramo v mobilni fazi, ki je uporabljena pri kromatografski analizi. Najpogosteje uporabljeni metodi kromatografije za določanje motilcev endokrinega sistema v nebioloških vzorcih sta tekočinska kromatografija (LC), ki je sklopljena z masnim (MS), tandemskim masnim (MS-MS), fluorescenčnim (FLD) ali elektrokemijskim detektorjem, ter plinska kromatografija, sklopljena z MS. (1,12)

1.3.1 EKSTRACKIJA TEKOČE-TEKOČE

Ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE *ang. liquid-liquid extraction*), znana tudi kot solventna ekstrakcija, je separacijska metoda, ki temelji na porazdeljevanju ene ali več komponent med dvema tekočinama, ki se med seboj ne mešata. Največkrat je ena izmed obeh tekočin voda oz. vodna raztopina, drugo pa organsko topilo. Je tipična metoda za ekstrakcijo organskih spojin iz vodnih vzorcev. Preučevani analit iz vodne raztopine se na osnovi topnosti porazdeli med vodno fazo in organskim topilom, ob močnem mešanju oz. stresanju. Pri tem je ključna pravilna izbira topila, v katerem mora biti analit zelo dobro topen, ne sme reagirati z njim, hkrati pa je zaželena tudi nizka temperatura vrelišča, saj je potrebno organsko fazo po koncu ekstrakcije odpariti do suhega, ostanek pa rekonstituirati v topilu oz. mobilni fazi in ga nanesti na kolono. Izkoristek ekstrakcije je odvisen od afinitete analita do organskega topila, volumnov obeh faz, števila ponovitev ekstrakcije in časa vzpostavitve ravnotežja med obema fazama. Prednosti LLE predstavlja enostavnost izvedbe in pestra izbira organskih topil, ki jih imamo na voljo glede na fizikalno-kemijske lastnosti preiskovane spojine. Obstaja pa tudi nekaj pomanjkljivosti, npr. veliki volumni topila, ki ga je potrebno odpariti po ekstrakciji. Metoda je draga in časovno zamudna predvsem zaradi več potrebnih ponovitev in odparevanja velikih volumnov topila, hkrati pa zahteva uporabo visoko vnetljivih in toksičnih topil, poleg tega pa za izvedbo LLE potrebujemo razmeroma velike volumne vzorca (1,2,12).

1.3.2 EKSTRACIJA NA TRDNEM NOSILCU (SPE)

Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE *ang. Solid phase extraction*) je dobro uveljavljena tehnika, ki se veliko uporablja kot alternativa potratni in dolgotrajni ekstrakciji tekoče-tekoče. Uporablja se za ekstrakcijo nehlapnih organskih spojin iz tekočih vzorcev, med katere spadajo tudi hormonski motilci. SPE se lahko uporablja neposredno kot ekstrakcijska tehnika za tekoče vzorce ali kot tehnika čiščenja po LLE-ekstrakciji.

SPE temelji na uporabi diskov v filtrirnem aparatu ali kartuš za enkratno uporabo, v katerih se proučevani analit iz tekoče faze veže na trdno fazo. Vzorci, ki jih ekstrahiramo s SPE, morajo biti homogeni in v tekočem stanju. Prisotnost delcev v vzorcu lahko ovira ali zaustavi pretok, kar vodi do slabe ponovljivosti in podaljša čas ekstrakcije. Postopek ekstrakcije največkrat vključuje štiri stopnje: kondicioniranje (omnoženje sorbenta z namenom njegove aktivacije, kar omogoči vezavo analita), nanos vzorca (prehod vzorca skozi trdno fazo in vezava na površino), selektivno spiranje (eliminacija neželenih spojin) in elucijo, (desorpcija analita in njegovo zbiranje za analizo) v primeru ponovne uporabe pa še regeneracijo sorbenta. Ko vzorec potuje skozi aktivirano polnilo, se analit koncentrira na površini, medtem ko druge komponente potujejo skozi. Izbira ustreznega polnila je odvisna od interakcij med analitom in polnilom.

Na voljo je veliko vrst sorbentov, kot so: silicijev dioksid, aluminijev oksid, magnezijev silikat in grafitiziran ogljik. Pogosto se uporablja silicijev dioksid, ki je dovolj reaktiven, da lahko modificiramo njegovo površino s kemijskimi reakcijami, vendar kljub temu dovolj stabilen, da omogoča uporabo širokega spektra topil. Nepolarni sorbenti so lahko izdelani iz funkcionalnih skupin (C8, C18, ciano, amino itd.), ki so vezane na površino silicijevega dioksida, s čimer se spreminjajo retencijske lastnosti. Lahko pa so narejeni tudi iz sintetičnih polimerov stiren-divinilbenzena.

Tekom ekstrakcije omogoča SPE tudi izvršitev reakcije derivatizacije med aktivno skupino analita in tistimi na površini polnila. Temu sledi elucija in uparjanje topila do suhega. Možno pa je tudi frakcioniranje vzorca v različne komponente, kot pri klasični kolonski kromatografiji, s tem, da vsako frakcijo posebej eluiramo z drugačno tekočo fazo.

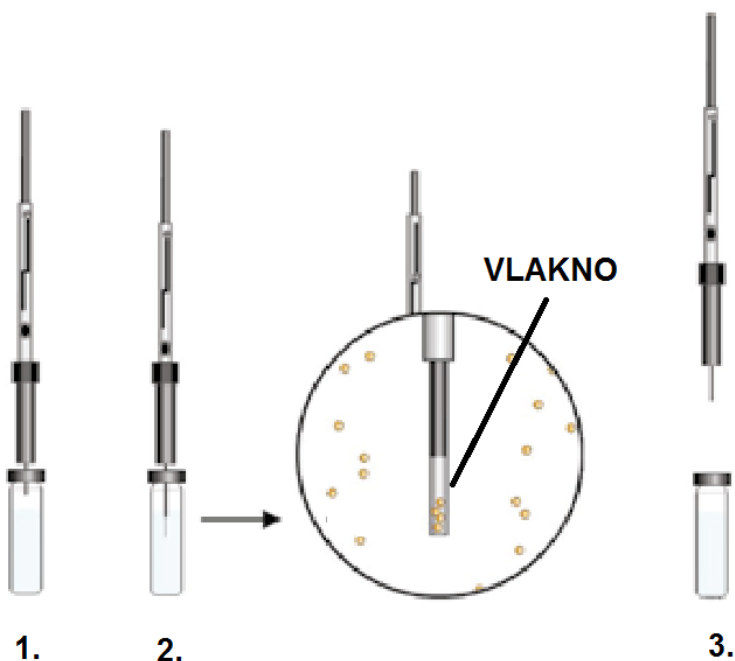
SPE zmanjša čas priprave vzorca, porabo topil, omogoča sočasno odstranitev več interferirajočih snovi in omogoča hkratno pripravo več vzorcev ob uporabi majhne količine topil. Prednost metode je tudi v tem, da ne pride do tvorbe emulzije in da ni potrebe po ponovitvah ekstrakcije ali dodatnem centrifugiranju. Metoda je selektivnejša od LLE, daje

visoke izkoristke ekstrakcije in omogoča dobro ponovljivost, hkrati pa je možna tudi njena avtomatizacija in sklopitev s kromatografskim sistemom (1,2,12).

1.3.3 MIKROEKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU (SPME)

Osnovni del sistema SPME predstavlja vlakno iz staljenega silicijevega dioksida, ki je prekrito s primerno stacionarno fazo in nameščeno znotraj neke vrste mikrobrizge iz kovine. SPME je ekstrakcijska metoda, ki temelji na porazdeljevanju analita med ekstrakcijskim medijem (vlaknom) in matriksom vzorca, tj. na selektivni sorpciji ciljnih analitov v aktivni plasti vlakna in neposredni desorpciji v injektorju kromatografa. Je tehnika, ki omogoča, da se analiti ravnotežno razporedijo med tremi fazami, in sicer vzorcem, plinasto fazo in vlaknom. Pri tem se na vlakno ne adsorbira celokupna količina analita, prisotnega v vzorcu, vendar pa se lahko ob primerni kalibraciji ta tehnika uporablja tudi za kvantitativno analizo.

Postopek SPME je največkrat sestavljen iz nekaj korakov (Slika 3), pri čemer najprej z iglo brizge prebijemo septo vial, v kateri je vzorec. Nato iz igle potisnemo vlakno, ki vzpostavi kontakt z vzorcem, po določenem času pa vlakno z adsorbiranim analitom ponovno potegnemo v iglo brizge in jo na koncu izvlečemo iz vial.



Slika 3: Shema postopka SPME: prebijanje septe vial z iglo (1), potiskanje vlakna iz igle (2), vnos vlakna v iglo in odstranitev igle iz vial (3)

Po vstavitvi igle SPME-brizge v injektor sledi desorpcija adsorbiranega analita, ki je lahko termična v primeru analize s plinsko (GC) ali kemijska s pomočjo topil v primeru analize s tekočinsko kromatografijo (LC).

Metoda je enostavna in učinkovita, pri tem pa ne zahteva uporabe organskih topil. Koraki koncentriranja in čiščenja analita se izvajajo sočasno, kar skrajša čas analize v primerjavi z LLE in SPE, hkrati pa se zmanjša tudi možnost kontaminacije in šumov pri analizi (12, 48).

1.3.4 KROMATOGRAFSKE ANALIZNE METODE IN DETEKCIJA

1.3.4.1 Kromatografske metode

Kromatografija je skupno ime za separacijske tehnike, ki temeljijo na porazdeljevanju analiziranih molekul med mobilno (MF) in stacionarno fazo (SF). Ločitev molekul temelji na različni hitrosti porazdeljevanja komponent vzorca med obema fazama. Spojine iz vzorca potujejo v mobilni fazi in se zaradi afinitete do stacionarne faze na njej zadržujejo. Spojine iz vzorca se zaradi različne afinitete do stacionarne in mobilne faze ter zaradi različnih fizikalnih in kemijskih lastnosti različno porazdeljujejo.

Glede na polarnost stacionarne faze ločimo normalno in reverzno fazno kromatografijo. Pri normalno fazni kromatografiji je SF polarna, MF pa nepolarna, primerna pa je za ločevanje polarnih spojin. Reverzno fazna kromatografija temelji na nepolarni SF ter polarni MF in se uporablja za ločevanje nepolarnih spojin.

Različne vrste kromatografskih metod lahko razdelimo tudi glede na agregatno stanje MF. Tako poznamo plinsko kromatografijo (GC), pri kateri je MF v plinastem stanju, tekočinsko kromatografijo (LC), kjer MF predstavlja tekočina, in superkritično tekočinsko kromatografijo (SFC), kjer je MF superkritični plin. Glede na tlak pri LC, pri katerem MF potuje skozi kolono, poznamo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC *ang. High Pressure Liquid Chromatography*) in tekočinsko kromatografijo ultravisoke ločljivosti (UHPLC *ang. Ultra High Pressure Liquid Chromatography*). Pri HPLC dosežajo tlaki vrednosti do 400 barov, pri UHPLC pa do 1000 barov in več.

Odvisno od oblike nosilca stacionarne faze poznamo kolonsko in planarno kromatografijo. Pri kolonski kromatografiji se stacionarna faza nahaja v notranjosti kolone vezana na nosilec, MF pa teče skozi kolono pod vplivom gravitacije ali tlaka, ki ga ustvarja črpalka. Pri planarni kromatografiji je SF vezana na ravni površini (TLC-tankoplastna

kromatografija) ali v porah papirja. Ločevanje poteka v ravnini, MF pa se pomika skozi stacionarno fazo pod vplivom gravitacije ali zaradi kapilarnega delovanja.

Prednosti kromatografskih metod so visoka občutljivost, selektivnost in ponovljivost (37, 38).

1.3.4.2 Detekcija

Po separaciji spojin s pomočjo kromatografije je potrebno frakcije še detektirati in dobljene signale ovrednotiti. Poznamo številne vrste detektorjev, izbira pa je odvisna od tipa analize, ki jo želimo izvesti in fizikalno-kemijskih lastnosti preiskovane spojine. Pri določanju motilcev endokrinega sistema se pogosto uporabljajo elektrokemijski detektorji (ECD), fluorescenčni detektorji (FLD) ter masni spektrometri (MS) in tandemski masni spektrometri (MS/MS). ECD se odziva na snovi, ki so bodisi oksidanti ali reducenti, njihove reakcije na površini elektrod pa generirajo električni tok, ki ga vrednotimo. Za detekcijo s FLD so primerne spojine, fluorescirajo. V detektorju spojino ekscitiramo s svetlobo določene valovne dolžine, največkrat iz UV-spektra, ta pa nato oddaja svetlobo druge valovne dolžine, ki jo izmeri fotocelica (12). MS temelji na osnovi potovanja ionov v električnem ali magnetnem polju zaradi različnega razmerja med maso in nabojem (m/z). Pomembni deli MS-sistema so: ionski izvor (povzroči nastanek ionov), masni analizator (razvrščanje ionov glede na razmerje m/z), detektor (zazna količino posameznih ionov) in programska oprema. Tandemska masna spektrometrija (MS/MS) pa pomeni sklop dveh masnih analizatorjev v eni napravi (39).

1.4 ANALIZNO DOLOČANJE BPA V VZORCIH GAZIRANIH IN NEGAZIRANIH VOD

1.4.1 SPE

Ekstrakcije na trdnem nosilcu se izvajajo s kolonami in diski, za kar sta potrebni ustrezni aparaturi, ki omogočata izvedbo postopka. Kot primerni nosilci so se izkazale kolone Oasis HLB, Strata-X, C18-E, Florisil 60 in diski Empore (12, 16). Kolone oz. diski so napolnjeni s trdnimi sorbenti, ki selektivno vežejo analit, uspešnost ekstrakcije pa je odvisna od interakcij med njima.

V kolonah se sorbent v večini primerov nahaja v polipropilenski cevki (kartuši) med dvema kalciniranima diskoma (fritama). Diske za SPE moramo vpeti v ustrezno filtracijsko

aparaturu. Princip ekstrakcije je v obeh primerih enak, pri čemer pa imajo diski večjo površino, kar omogoča ekstrakcijo večjih volumnov vzorcev zaradi večjega pretoka in manjše možnosti zamašitve por, hkrati pa večja površina pomeni tudi večjo možnost interakcij med analitom in sorbentom, kar omogoča boljše izkoristke. V primerjavi s kartušami je poraba topil med postopkom ekstrakcije z diski večja, kar posledično močno podaljša čas sušenja, zaradi velike površine aparature pa je večja tudi možnost izgub. Pri izvedbi SPE je ključna izbira sorbenta in topil za spiranje in elucijo. Upoštevati pa moramo tudi adsorpcijsko kapaciteto sorbenta, da količina analita ne bi preseгла števila prostih vezavnih mest na sorbentu.

Poznamo tri osnovne mehanizme interakcij, s katerimi tudi ločujemo sorbente na normalno fazne (polarne), reverzno fazne (nepolarne) in ionsko izmenjevalne (anionske in kationske). Izbira sorbenta je odvisna od polarnosti proučevane spojine in od drugih komponent, prisotnih v vzorcu. Največkrat izberemo tak sorbent, ki ima visoko afiniteto do proučevane spojine in nizko afiniteto do neželenih komponent vzorca, tako da jih prepušča. Lahko pa izberemo sorbent, ki ima nizko afiniteto do proučevane spojine, tako da jo prepušča, zadrži pa le neželene komponente.

Ker je BPA precej nepolarna molekula, so za ekstrakcijo iz vodnih vzorcev primerni reverzno fazni sorbenti. Sestavljeni so lahko iz molekul silicijevega dioksida, katerega površina je kemijsko modificirana s hidrofobnimi skupinami. Največkrat so to alifatske verige C₈ in C₁₈ ali fenilne skupine. Kot zelo primerni pa so se izkazali tudi polimerni sorbenti, ki temeljijo na smolah stiren-divinilbenzena. Njihova površina pa je lahko še dodatno modificirana. Zadrževanje analitov temelji na hidrofobnih interakcijah, π - π -interakcijah, Van der Waalsovih silah, lahko pa tudi na tvorbi hidrofilnih interakcij (H-vezi). Uporaba takih sorbentov omogoča visoke izkoristke ekstrakcije, pri širokem razponu pH (1, 2, 12, 40).

Ekstrakcija poteka največkrat v štirih stopnjah ter zajema kondicioniranje in ekvilibracijo nosilca, nanos vzorca in njegovo ekstrakcijo, nato pa spiranje matriksa in elucijo analita. V stopnji kondicioniranja sorbent omočimo z ustreznim topilom ali kombinacijo topil. Izbira topila je odvisna od lastnosti sorbenta in pa pogosto predpiše proizvajalec kolone ali diska. Pogosto se v ta namen uporabljajo metanol, etilacetat, acetonitril, aceton in izopropanol. Ta korak je zelo pomemben za izkoristek ekstrakcije. Z organskimi topili aktiviramo funkcionalne skupine sorbenta in s tem povečamo možnost interakcij z analitom, odstranimo pa morebiti prisotne nečistoče in zrak. Z ekvilibracijo odstranimo ostanke

topila za kondicioniranje, in sicer z uporabo topila, ki ima približno enak pH, ionsko moč in polarnost kot matrika vzorca. Največkrat uporabljamo vodo ali pufre z ustreznimi vrednostmi pH. Sledi nanos vzorca, medtem pa se sorbent ne sme posušiti, saj bi prišlo do njegovega dekondicioniranja in bi morali kondicioniranje ponoviti. Pretok vzorca moramo uravnati na primerno hitrost, pri kateri so interakcije med sorbentom in analitom optimalne in zato tudi čas analize primeren (41,42). Prednost zaradi velike površine predstavljajo diski, ki omogočajo visoke pretoke vzorca, medtem ko taki pretoki skozi kolone povzročijo slabše izkoristke ekstrakcije (40). V nadaljnji stopnji spiranja s primernim topilom odstranimo čim več, med nanosom vzorca vezanih nečistot iz sorbenta, pri čemer pa ne smemo odstraniti analita. Kot ustrezna topila so se izkazali pufri, voda ali pa raztopine z nizko koncentracijo organskega topila v vodi. V končni stopnji elucije z izbranim ustreznim topilom ali kombinacijo topil prekinemo interakcije med analitom in stacionarno fazo ter ga odstranimo iz slednje. Smotno je, da izberemo čim manjši volumen topila, ki sprosti čim večji delež analita ter si tako prihranimo čas pri nadaljnjih postopkih koncentracije.

1.4.2 LC-MS/MS

1.4.2.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

HPLC je najpogosteje uporabljana tehnika tekočinske kromatografije (37). Izvajamo jo z uporabo tekoče mobilne in trdne stacionarne faze, s katero je napolnjena kolona. Mobilna faza z vzorcem potuje pod tlakom skozi kolono, pri čemer se sestavine vzorca ločijo na posamezne frakcije.

HPLC je sestavljena iz sistema za dovajanje mobilne faze, naprave za injiciranje in kolone. Izbira mobilne faze je odvisna od vzorca in vrste kolone, pri čemer je zaželena čim večja stopnja čistote in čim manjša viskoznost. Kot MF za analizo BPA je primerna mešanica vode in metanola ali acetonitrila.

Sistem za dovajanje mobilne faze vključuje črpalko s filtrom, razplinjevalec in cevke za povezavo. Črpalka mora črpati mobilno fazo v sistem s konstantnim, natančnim in ponovljivim pretokom. Uporabljata se izokratski in gradientni način izvedbe HPLC. Pri načinu je sestava mobilne faze tekom kromatografske ločbe ves čas konstantna, pri gradientnem načinu pa se njena sestava med ločbo spreminja po vnaprej določenem programu. Razplinjevalec odstrani morebitne preostale pline iz mobilne faze, v kolikor so ti prisotni kljub razplinjevanju med njeno pripravo. Plini bi namreč lahko tvorili mehurčke

v mobilni fazi ter tako vplivali na separacijo kot tudi na zanesljivost detekcije in končne analize.

Naprava za injiciranje poskrbi, da se v sistem aplicira točen in ponovljivo odmerjen volumen vzorca, ki ga lahko spreminjamo.

Kolone so bistven del sistema HPLC, saj se v njih nahajajo stacionarne faze. Običajno so narejene iz nerjavečega jekla, plastike ali stekla in merijo 15–25cm v dolžino. Njihov notranji premer je med 2 do 5 mm, delci stacionarne faze, ki jo vsebujejo pa so po navadi veliki od 3–5 μm . Nameščene so v sistem, ki omogoča hlajenje ali ogrevanje kolone. Za analizo BPA je primerna reverzo-fazna HPLC, pri čemer uporabljamo kolone z nepolarno SF. Do ločevanja komponent v vzorcu pride zato, ker zaradi polarnosti različno interagirajo s SF in MF, kar ima za posledico različne čase retencije (37,38).

1.4.2.2 Tandemska masna spektrometrija (MS/MS)

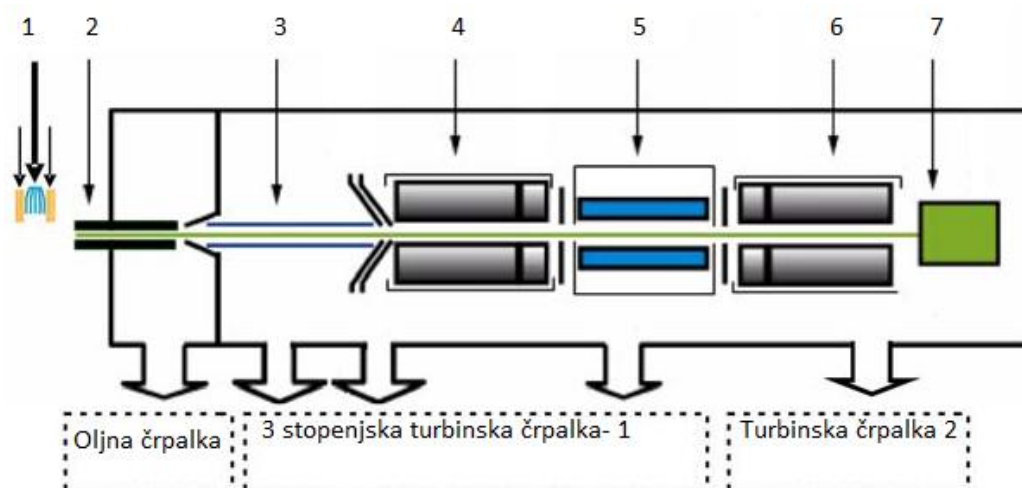
Tandemska masna spektrometrija je visoko občutljiva in selektivna metoda za kvalitativno in kvantitativno detekcijo pri LC. Deluje na principu potovanja nabitih delcev v električnem ali magnetnem polju zaradi različnih razmerij med masami in naboji (m/z). V osnovi so vsi masni spektrometri sestavljeni iz ionizacijskega dela, masnega analizatorja ter detektorja, ki se nahajajo pod visokim vakuumom, ter programske opreme za obdelavo podatkov. Razlikujejo pa se glede na različne mehanizme ionizacije, razvrščanja elektronov v masnem analizatorju in detekcije (39).

Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS je tandemski masni spektrometer, katerega ionizacijski del temelji na patentirani Jetstream[®] elektrorazprševalni ionizaciji (ESI ang. *Electrospray ionization*). Masni analizator predstavlja trojni kvadrupol, sestavljen iz dveh masnih filtrov (kvadrupolov) in kolizijske celice, ki je nameščena med njima. Detektor je sestavljen iz dveh visoko energijskih dinod in elektronske fotopomnoževalke.

ESI je ionizacijska tehnika, ki temelji na neposredni ionizaciji analita iz tekočega matriksa. Raztopino z analitom, ki izstopi iz HPLC, dovajamo v ionizacijsko komoro, pri atmosferskem tlaku. Tu se v kapilari pod vplivom nebulizatorja in visoke napetosti tvorijo nabite kapljice. Sušilni plin izsušuje in zmanjšuje nabite kapljice, kar povzroči odcepljanje ioniziranih molekul analita iz njih. Te nato potujejo skozi kapilaro do vakuumskega dela instrumenta z masnim analizatorjem, in sicer čez oktapolni predfilter na prvi kvadrupol. Visok vakuum v sistemu preprečuje trke ionov z molekulami zraka in nevtralizacijo ionov.

Kvadrupol je zgrajen iz štirih vzporednih elektrod hiperbolične oblike, ki so pod izmenično napetostjo, tako da ustvarjajo oscilirajoče električno polje. To predstavlja masni filter, ki pri potovanju ionov vzdolž njega prepušča le tiste z določeno molekulsko maso in nabojem, preostali pa trčijo v elektrode ali pa odletijo iz kvadrupola. Selektivnost je odvisna od napetosti na elektrodah in frekvence električnega polja. Izbrani (prekurzorski) ioni potujejo na kolizijsko celico, ki je napolnjena z inertnim plinom (dušikom). V njej trčijo z molekulami dušika, pri čemer ioni razpadejo na fragmente oz. produktne ione. Ti potujejo vzdolž kolizijske celice do tretjega kvadrupola, ki tako kot prvi prepušča le ione z ustreznim razmerjem m/z . Izbrani fragment nato potuje do detektorja (39,47).

Dinodi na detektorju sta pod visoko napetostjo (10 kV) in privlačita elektrone. Trki elektronov z dinodama povzročijo nastanek šibkega električnega toka, ki se ojači na pomnoževalki. Programska oprema zazna signale in jih prikaže v obliki kromatogramov. Osnovna zgradba masnega analizatorja je prikazana na Sliki 4 (47).



Slika 4: Shematski prikaz zgradbe masnega analizatorja Agilent 6460 Jetstream: ionski izvor ESI (1), kapilara (2), oktapolni predfilter (3), prvi kvadrupolni masni filter Q1 (4), kolizijska celica Q2 (5), drugi kvadrupolni masni filter Q3 (6), detektor(7) (47)

Kadar spremljamo samo izbrani prekurzorski in produktni ion, govorimo o prehodih SRM (ang. *Selected Reaction Monitorig*), če pa spremljamo več produktnih ionov, nastalih iz prekurzorskega iona, pa govorimo o prehodih MRM (ang. *Multiple Reaction Monitoring*). Za kvantitativno določanje uporabimo produktne ione, ki jih je nastalo največ, ostali pa določajo analit kvalitativno (47).

2 NAMEN DELA

BPA je zaradi masovne industrijske proizvodnje v okolju pogosto zastopana snov. Kot izhodna surovina se uporablja za proizvodnjo polikarbonatne plastike in epoksi smol, kot katalizator pa ga uporabljajo tudi pri izdelavi drugih vrst plastike. Najpogostejši vir onesnaženja okolja z BPA predstavljajo industrijski izpusti in odpuščanje iz materialov zaradi nepopolne polimerizacije tekom proizvodnje. Ljudje smo največkrat izpostavljeni BPA preko kontaminirane hrane in pijače, ki je bila v stiku z materialom, ki ga vsebuje. Ker mu pripisujejo številne negativne učinke že pri zelo nizkih koncentracijah, je zaradi zmanjšanja zdravstvenega tveganja zelo pomembno spremljanje njegove prisotnosti v okolju in živilih.

V okviru diplomske naloge bomo določali in primerjali vsebnost bisfenola A v gaziranih in negaziranih vodah iz plastenk. Ker kljub skrbni pripravi voda, ki se uporablja v reagentih pri analinem postopku, še vedno vsebuje BPA, bomo preverjali uspešnost njegovega odstranjevanja iz prečiščene vode z diski SPE Empore. Ker ti omogočajo ekstrakcijo pri mnogo večjih pretokih kot SPE-kartuše, bomo preverili tudi ustreznost te metode za pripravo vzorcev pri določanju BPA iz vzorčenih vod, saj bi to pomenilo korenito skrajšanje postopka. Za določanje vsebnosti BPA bomo uporabljali že vpeljano in validirano metodo, ki jo bomo poskušali še dodatno optimizirati. Celoten postopek bomo preverili z ekstrakcijo različnih koncentracij standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi in z analizo z LC-MS/MS. Analizno metodo bomo še dodatno preverili tako da bomo vrednotili s standardnimi raztopinami BPA in ovrednotili validacijske parametre.

Metodo bomo uporabili za določanje vsebnosti BPA v vzorcih gaziranih in negaziranih vod iz plastenk. Analizirali bomo 10 vzorcev gaziranih in 10 vzorcev negaziranih vod iz plastične embalaže enakega para blagovnih znamk oziroma proizvajalcev, shranjenih v enaki embalaži. Preverili bomo še vpliv temperature shranjevanja na odpuščanje BPA iz plastične embalaže in vsebnost BPA v vodi, ki je shranjena v steklenici.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 VZORCI

Analizirali smo 20 vzorcev vod iz plastičnih vsebnikov, za katere smo predvideli, da so bili v trgovini shranjeni pod normalnimi pogoji. Izbirali smo znamke, pod katerimi ponujajo tako gazirano kot negazirano vodo v identični embalaži, po možnosti polnjeno iz istega izvira. Dva dodatna plastična vsebnika z vodo znamke, ki je bila analizirana pod normalnimi pogoji shranjevanja, smo izpostavili temperaturi 40°C za 20 ur, 1 vzorec enake blagovne znamke pa je predstavljala voda iz steklene embalaže, prav tako shranjene pod normalnimi pogoji.

Za normalne pogoje skladiščenja, štejemo tiste, ki so predpisani na embalaži, oziroma pogoje, kakršnim je voda v plastenkah izpostavljena na poti od proizvajalca do potrošnika.

3.1.2 STANDARDI

- Standard: bisfenol A, čistost > 99 %, molska masa: 228,29 g/mol, Sigma-Aldrich
- Interni standard: bisfenol A d₁₆, 98 atom % D, molska masa: 244,42 g/mol, Sigma-Aldrich

3.1.3 TOPILA

- Prečiščena voda, FFA, Ljubljana
- Metanol, HPLC čistoče, (brez BPA) MM= 32,04 g/mol, Sigma-Aldrich
- Metanol, LC-MS čistoče, (brez BPA) MM= 32,04 g/mol, Sigma-Aldrich
- Acetonitril, HPLC čistoče, MM= 41,05 g/mol, Sigma-Aldrich
- Aceton, HPLC čistoče, MM= 58,08 g/mol, Sigma-Aldrich
- Izopropanol, HPLC čistoče, MM= 60,1 g/mol, Sigma-Aldrich
- Ultra čista voda za LC-MS, MM =18,02 g/mol, JT Baker
- Dušik v jeklenki, čistost > 99,9995%, Messer

3.1.4 APARATURE IN PRIBOR

- Polavtomatske pipete: 2–20 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl, 1000–5000 µl, Eppendorf
- Tehnica AG 245, Mettler Toledo
- pH meter MA 5736, Iskra Metrel
- Ultrazvočni čistilnik Sonis 4, Iskra
- Sistem za filtracijo Sartorius, Sartorius
- Diski za SPE Empore SDB-RPS 45 mm, 3M
- Vodna kopel WB-30 E, Kambič
- Vodna vakuumska črpalka, Brand
- Vibracijski mešalnik Vibromix 114 EV, Tehnica
- Sušilnik Turbo Vap LV, Caliper Life Sciences
- Steklovina: steklenice s plastičnimi pokrovčki (100 ml), merilne bučke (5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml), čaše, epruvete, presesalna buča (50 ml, 2000 ml), erlenmajerice s steklenim zamaškom (100 ml), natehtalke, lij, vialo, inserti, steklene kapalke
- Ostalo: nastavki za pipete, spatula, vzmeti za inserte, zamaški za vialo, Parafilm M, stojalo za epruvete, štoparica

Sistem za SPE:

- Oljna vakuumska črpalka, Gast Manufacturing Inc.
- Kadička Visiprep™ Solid Phase Extraction Vacuum Manifold, Supelco
- Kolone Strata-X polymeric reversed phase, 50 mg/3 ml, Phenomenex
- Plastične brizge 60 ml, BD Plastipak
- Adapterski nastavki za brizge, BD Plastipak

Sistem za LC-MS/MS:

- Agilent 1290 Infinity LC (sestavljeno iz razplinjevalca, binarne črpalke, avtomatskega vzorčevalnika, termostata za kolono in UV-VIS detektorja (DAD)) , Agilent Technologies
- Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream® LC/MS z ESI ionskim izvorom, Agilent Technologies
- Kolona ZORBAX SB-C18 Rapid Resolution HT, 50×2,1 mm, 1,8 µm, Agilent Technologies

- Prefilter Krudkatcher Ultra HPLC In-line filter 0,5 μm , Phenomenex
- Program za obdelavo podatkov MassHunter Workstation software B.03.01

3.2 METODE

3.2.1 PRIPRAVA OSNOVNIH STANDARDNIH RAZTOPIN

3.2.1.1 Priprava standardnih raztopin BPA

Osnovna standardna raztopina BPA (1 g/L)

Osnovno standardno raztopino BPA s koncentracijo 1 g/L smo pripravili tako, da smo na tehtalni čolniček natehtali 10 mg standarda, ga prenesli v 10-ml bučko, z metanolom, dopolnili do oznake in premešali, da se je BPA raztopil.

Standardna raztopina BPA (1 mg/L)

V 100-ml bučko smo odpipetirali 100 μl osnovne standardne raztopine BPA s koncentracijo 1 g/L ter do oznake dopolnili z metanolom in premešali.

Standardna raztopina BPA (100 $\mu\text{g/L}$)

V 50-ml bučko smo odpipetirali 5 ml standardne raztopine BPA s koncentracijo 1 mg/L ter z metanolom dopolnili do oznake in premešali.

Standardna raztopina BPA (50 $\mu\text{g/L}$)

V 50-ml bučko smo odpipetirali 2,5 ml standardne raztopine BPA s koncentracijo 1 mg/L ter z metanolom dopolnili do oznake in premešali.

Standardna raztopina BPA (20 $\mu\text{g/L}$)

V 50-ml bučko smo odpipetirali 10 ml standardne raztopine BPA s koncentracijo 100 $\mu\text{g/L}$ ter z metanolom dopolnili do oznake in premešali.

Vse standardne raztopine BPA smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi 4°C

3.2.1.2 Priprava raztopin internega standarda BPA d-16

Osnovna raztopina internega standarda BPA d-16 (1 g/L)

Na tehtalni čolniček smo natehtali 5 mg internega standarda BPA d-16, kateri je imel vodikove atome zamenjane z devterijem, ga prenesli v 5-ml bučko, dopolnili do oznake z metanolom in premešali, da se je IS raztopil.

Raztopina internega standarda BPA d-16 (1 mg/L)

V 100-ml bučko smo odpipetirali 100 µl osnovne raztopine IS BPA d-16 s koncentracijo 1 g/L ter do oznake dopolnili z metanolom in premešali.

Raztopina internega standarda BPA d-16 (100 µg/L)

V 50-ml bučko smo odpipetirali 5 ml raztopine IS BPA d-16 s koncentracijo 1 mg/L ter z metanolom dopolnili do oznake in premešali.

Raztopina internega standarda BPA d-16 (50 µg/L)

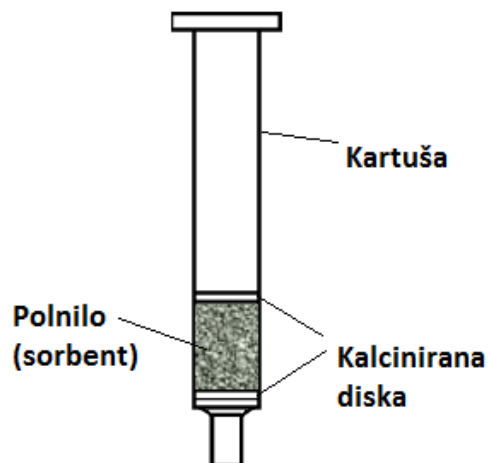
V 50-ml bučko smo odpipetirali 2,5 ml raztopine IS BPA d-16 s koncentracijo 1 mg/L ter z metanolom dopolnili do oznake in premešali.

Vse raztopine internega standarda BPA d-16 smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi 4°C.

3.2.2 OPTIMIZACIJA IN PREVERJANJE USTREZNOSTI METODE SPE S KOLONAMI Strata-X™

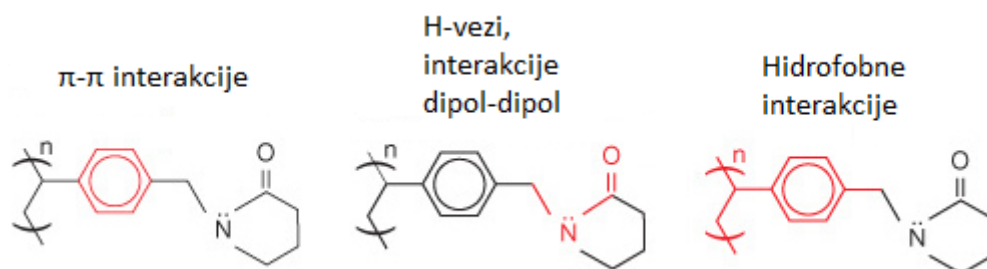
3.2.2.1 Strata-X

Strata-X so kolone za SPE-ekstracijo, sestavljene iz polipropilenskih cevk, napolnjenih s polimernim, reverzno-faznim sorbentom, nameščenim med dva kalcinirana diska, kot je prikazano na Sliki 5.



Slika 5: Shematski prikaz kolone za SPE

Sorbent je površinsko obdelan kopolimer stiren-divinilbenzena z vezanimi obroči N-vinilpirolidona. Sestavljajo ga delci velikosti 33 μm , s povprečnim premerom por 85 Å in specifično površino 800 m^2/g . Kemijska sestava sorbenta omogoča tvorbo Van der Waalsovih vezi, H-vezi, interakcij dipol-dipol in π - π interakcij, kar prikazuje Slika 6. (45)



Slika 6: Funkcionalne skupine sorbenta, ki tvorijo interakcije z analitom (označene z rdečo) (45)

Sorbent je primeren za ekstrakcijo aromatskih in nevtralnih komponent vzorca, stabilen pa je v območju pH od 1 do 14 (45).

3.2.2.2 Priprava topil

Za samo izvedbo SPE smo uporabljali topila za kondicioniranje, ekvilibracijo, spiranje in elucijo ter topilo za raztapljanje posušenega ostanka. Pripravljali smo manjše količine topil (30 ml), ki smo jih uporabljali največ tri dni, razen topila za raztapljanje, ki smo ga ves čas

hranili v hladilniku. Shranjevali smo jih v 100-ml stekleničkah s plastičnim zamaškom pri sobni temperaturi v pokončnem položaju, da smo preprečili stik topila s plastiko.

Topilo za kondicioniranje je bil 100-% metanol, topilo za ekvibracijo pa prečiščena voda.

Topilo za spiranje je bilo sestavljeno iz 15% metanola v prečiščeni vodi, elucijsko topilo pa iz metanola in acetonitrila v razmerju 1:1.

Postopek priprave:

- 15% metanol: 4,5 ml metanola + 25,5 ml prečiščene vode
- Metanol/ acetonitril v razmerju 1:1 : 15 ml metanola + 15 ml acetonitrila

Topilo za raztapljanje je bila raztopina internega standarda BPA d-16 v metanolu s koncentracijo 50 µg/L (glej poglavje 3.2.1.2.).

3.2.2.3 Uporabljeni postopek

Postopek SPE-ekstrakcije je temeljil na metodi uporabljeni v diplomski nalogi Zibelnik K. (16), ki smo jo dodatno optimizirali. Ekstrakcija je potekala na štirih kolonah istočasno. Vsako kolono pa se lahko uporabi šestkrat. Pred prvo uporabo kolone kondicioniramo z 20 ml metanola pri pretoku 4,4 ml/min, pri nadaljnjih treh ekstrakcijah pa s 3 ml metanola pri pretoku 4 ml/ min. Pretok uravnavamo s podtlakom, ki ga ustvarja oljna vakuumaska črpalka. Ekvibracija izvedemo s 3 ml prečiščene vode pri pretoku 4 ml/ min. Sledi nanos 200 ml vzorca pri pretoku 3–6 ml/min, in sicer v 60–ml brizge, ki jih namestimo po ekvibraciji, pri čemer pazimo, da v njih ne zmanjka vzorca. V naslednjem koraku s 3 ml topila za spiranje (15% metanol) pri pretoku 3 ml/min speremo morebitne nečistoče iz sorbenta, nato pa kolono sušimo 3,5 minute pri podtlaku 254 mm Hg. Pred elucijo pod kolone podstavimo epruvete, v katere bomo zbirali eluat, in vanje naneseemo 2 ml topila za elucijo, (metanol/acetonitril) ki ga pustimo delovati 1 minuto pri atmosferskem tlaku. Vzorec eluiramo pri pretoku 3 ml/min, po eluciji pa kolono sušimo 3,5 minute pri podtlaku 127 mm Hg.

Sledi sušenje eluatov s prepihovanjem z dušikom v sušilniku pri 45°C, nato pa rekonstituiranje suhih ostankov v 200 µl topila za raztapljanje ter mešanje 90 s na vibracijskem mešalniku. Rekonstituirane ostanke kvantitativno prenesemo v 200 µl inserte, te pa s pomočjo vzmeti vstavimo v vialo.

3.2.2.4 Optimizacija parametrov

Določitev volumna topila za elucijo

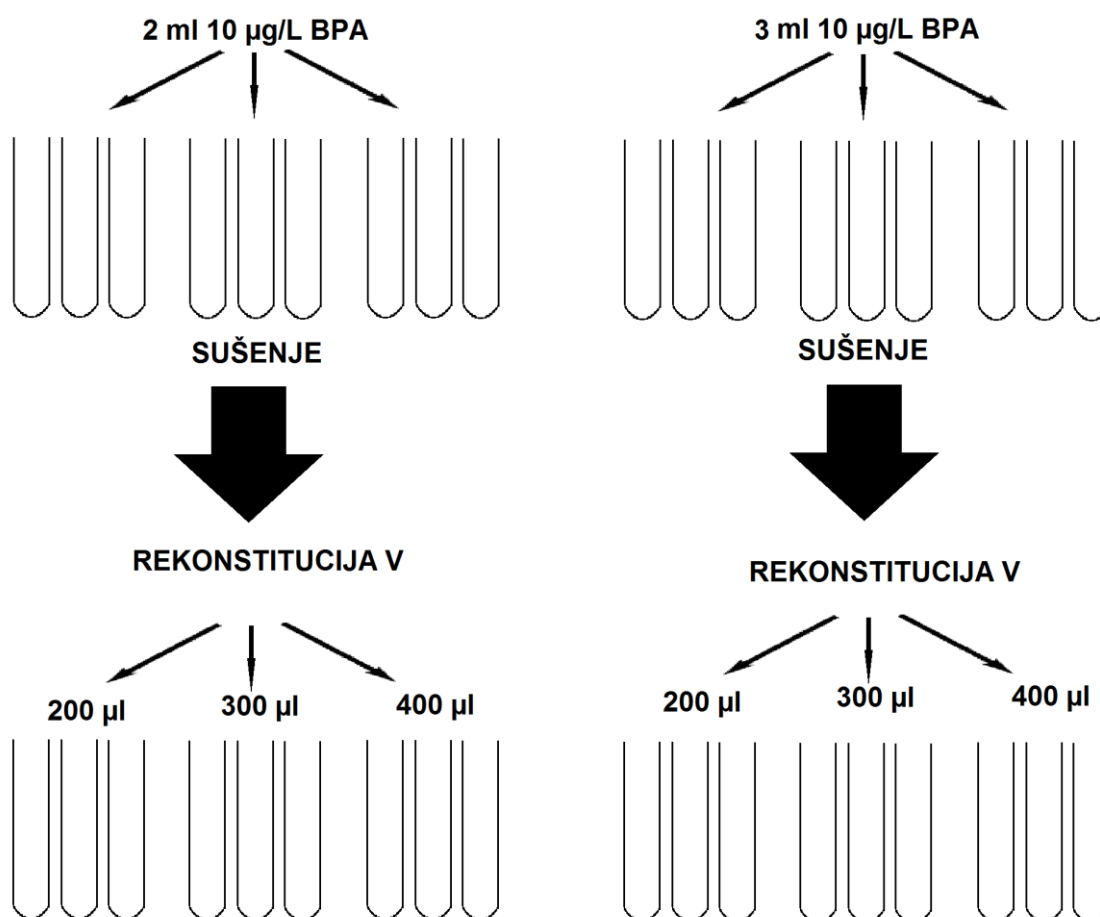
Ugotavljali smo vpliv različnih volumnov eluata na uspešnost rekonstitucije in kvantitativni prenos raztopljenega ostanka.

Pripravili smo raztopino BPA v topilu za elucijo s koncentracijo 10 µg/L tako, da smo v 50-ml bučko odpipetirali 25 ml standardne raztopine BPA v metanolu s koncentracijo 20 µg/L in do oznake dopolnili z acetonitrilom ter premešali. Nato smo v tri epruvete odpipetirali po 2 ml te raztopine, v tri pa po 3 ml. Topilo smo kasneje odparili, posušene ostanke pa rekonstituirali v 200 µl topila za raztapljanje, prenesli v inserte vial in analizirali na LC-MS/MS.

Določitev volumna topila za rekonstitucijo

Ugotavljali smo kateri volumen topila je ustrezen za rekonstitucijo in proučevali njegov vpliv na uspešnost rekonstitucije.

Topilo za raztapljanje (rekonstitucijo) je predstavljala raztopina internega standarda s koncentracijo 50 µg/L, pripravljena po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.2, čas mešanja pa je znašal 90 sekund. Eksperiment smo izvedli hkrati z izbiro ustreznega volumna topila za elucijo, v treh paralelkah za vsako različno kombinacijo. Postopek priprave vzorcev prikazuje Slika 7.



Slika 7: Shema priprave raztopin

Čas mešanja vzorca po rekonstituciji

Določali smo tudi optimalni čas mešanja vzorca na vibracijskem mešalniku po rekonstituciji. S tem smo poskušali skrajšati čas mešanja, kar bi pomembno vplivalo na skrajšanje celotnega postopka in zmanjšanje obremenitve operaterja pri večjih količinah vzorcev.

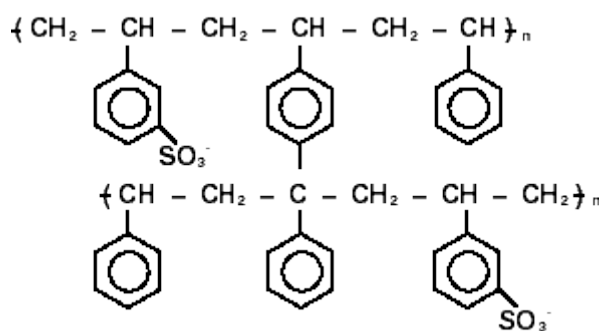
V epruvete smo odpipetirali 3 ml raztopine BPA v topilu za elucijo s koncentracijo 10 µg/L in jih posušili do suhega. Nato smo posušene ostanke rekonstituirali v 200 µl topila za raztapljanje ter jih mešali 15, 30, 60 in 90 sekund, vsak poskus pa smo izvedli v treh paralelkah. Raztopine smo prenesli v 200 µl inserte vial in analizirali na LC-MS/MS, kjer smo vsak vzorec injicirali trikrat.

3.2.3 POSTOPEK SPE Z DISKI Empore®

3.2.3.1 Empore SDB-RPS

Empore SDB-RPS (ang. Styrene Divinylbenzene- Reversed Phase Sulfonate) so diski za SPE, sestavljeni iz delcev sorbenta, ujetega v mrežo inertnega teflona, ki daje mehansko stabilno obliko sorbentnemu disku. Uporabljajo se za čiščenje in koncentracijo analitov iz vodnih vzorcev. Predstavljajo učinkovito rešitev za pripravo vzorcev velikih volumnov, diski pa imajo veliko površino za stik vzorca s sorbentom, omogočajo velike pretoke ter dobro prepustnost.

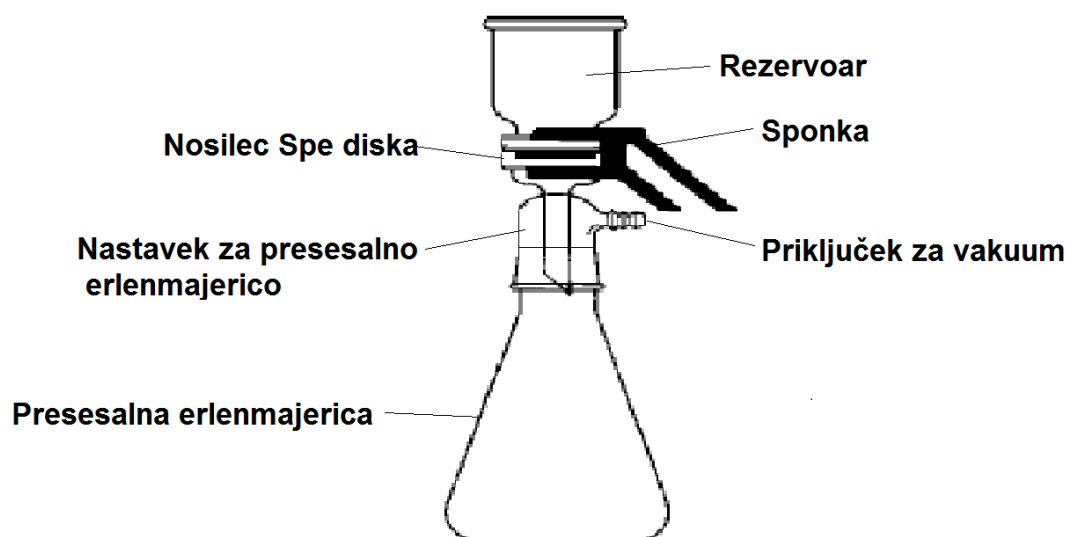
Sorbent v disku predstavlja smola stiren-divinilbenzena, ki je kemijsko modificirana s sulfonsko kislino (SDB-RPS), kar jo naredi hidrofilno (Slika 8) (43).



Slika 8: Kemijska struktura SDB-RPS

Sorbent je kopolimer, ki ga sestavljajo navzkrižno povezani porozni delci sferične oblike, velikosti 12 μm . Velikost por znaša 80 \AA , površina pa 450 m^2/g . SDB-RPS tvori reverzno-fazne in ionsko izmenjevalne interakcije, kar upoštevamo pri načrtovanju selektivnih ekstraktij. Membrana je pri normalnih pogojih uporabe stabilna v obsegu pH vrednosti od 1 do 14. Struktura SDB-RPS dovoljuje ekstrakcijo veliko različnih vrst analitov hkrati. Aromatična struktura stiren-divinilbenzena omogoča π - π interakcije z analiti, ki vsebujejo aromatske funkcionalne skupine, sulfonska skupina pa pripomore k interakcijam s pozitivno nabitimi skupinami (44).

Hitrost pretoka skozi disk uravnavamo z vakuumsko črpalko, ki jo priključimo na aparaturu za izvedbo SPE z diski, kot je prikazano na Sliki 9.



Slika 9: Shematski prikaz aparature za izvedbo SPE z diski

3.2.3.2 Priprava topil

Manjšo količino acetona in izopropanola smo prenesli v 100-ml erlenmajerice s steklenimi zamaški in jih hranili pri sobni temperaturi. Topilo za elucijo je bilo sestavljeno iz metanola in acetonitrila v razmerju 1:1, topilo za raztapljanje pa iz 50 $\mu\text{g/L}$ metanolne raztopine IS BPA d-16. Topili za elucijo in raztapljanje sta bili enake sestave kot pri ekstrakciji s kolonami Strata-X. Postopek priprave prvega je opisan v poglavju 3.2.2.2, priprava slednjega pa v poglavju 3.2.1.2.

3.2.3.3 Uporabljeni postopek

Osnovni postopek, ki smo ga uporabljali za SPE z diski Empore, je predpisan v navodilih proizvajalca (44). Ves pribor moramo predhodno sprati s prečiščeno vodo in metanolom, nato pa vstavimo disk in sestavimo aparaturo ter jo namestimo na 2000-ml presesalno bučo. Podtlak za uravnavanje hitrosti pretoka ustvarjamo z vodno črpalko. Postopek se začne s kondicioniranjem, ko z 10 ml acetona speremo disk in uporabimo vakuum, da ta steče skozi disk in ga osuši. Nanesemo še 10 ml izopropanola, ki ga prav tako spustimo skozi sistem in disk posušimo z vakuumom. Sledi nanos 10 ml metanola, od katerih 1 ml spustimo skozi disk in pustimo, da se ta namaka 30 s. Preostanek spustimo skozi, na koncu pa pazimo, da ostane disk omočen, saj bi drugače prišlo do dekontinuiranja in bi morali postopek ponoviti. Sledi kondicioniranje z 10 ml vode, ki jo spustimo skozi disk in prav

tako pazimo, da se disk ne posuši, saj je v nasprotnem primeru potrebno celoten postopek kondicioniranja ponoviti.

V naslednji fazi naneseemo 1000 ml vodnega vzorca in uravnamo hitrost pretoka na 100 ml/min, po končanem nanosu pa z vakuumom 5 min sušimo disk, da odstranimo preostalo vodo. Po sušenju aparatu namestimo na 50 ml presesalno bučo in eluiramo z dvakrat po 10 ml topila za elucijo (metanol/acetoneitril), pri tem pa je pomembno, da topilo naneseemo tako, da speremo tudi stene rezervoarja aparature.

Skozi disk spustimo približno 1 ml topila in pustimo namakati 30 s, preden spustimo preostanek in posušimo disk. Postopek ponovimo še z drugim delom 10 ml topila za elucijo.

Eluat kvantitativno prenesemo v epruvete in posušimo s postopkom preprihovanja z dušikom ter rekonstituiramo v topilu za raztapljanje po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2.3.

3.2.3.4 Preverjanje ustreznosti metode

S slepim vzorcem

Ugotoviti smo želeli, ali je BPA prisoten že v samih diskih za ekstrakcijo, kar bi pri analizi pomenilo lažno zvišane vrednosti. Izvedli smo vse korake kot pri ekstrakciji iz vodnih vzorcev, s tem da nismo izvedli faze nanosa vzorca.

S prečiščeno vodo

Ugotavljali smo uspešnost ekstrakcije BPA iz 1000 ml prečiščene vode. Eluat smo pripravili za analizo z LC-MS/MS, filtrat 800 ml prečiščene vode pa zbrali in analizirali v štirih paralelkah po 200 ml, s postopkom SPE na kolonah in z LC-MS/MS. Filtrat smo zbrali ločeno od topil za kondicioniranje in elucijo.

S standardno raztopino BPA

Preverjali smo uspešnost ekstrakcije BPA iz 500 ml standardne raztopine BPA v prečiščeni vodi s koncentracijo 10 ng/L. Pripravili smo jo tako, da smo v 500 ml bučko odpipetirali 100 µl standardne metanolne raztopine BPA s koncentracijo 50 µg/L in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Eluat smo posušili ter pripravili za analizo z LC-MS/MS, filtrat standardne raztopina pa smo zbrali ločeno od topil za kondicioniranje in elucijo ter s

postopkom SPE na kolonah v dveh paralelkah analizirali 400 ml. Po SPE pa smo vzorce filtrata analizirali na LC-MS/MS.

3.2.3.5 Možnost večkratne uporabe diskov

Ugotavljali smo možnost ponovne uporabe diskov in preučevali vpliv na izkoristek ekstrakcije. Izvedli smo ekstrakcijo z novim in enkrat uporabljenim diskom, s katerim smo predhodno že ekstrahirali 1000 ml prečiščene vode. Na oba smo nanесли 500 ml standardne raztopine BPA v prečiščeni vodi, s koncentracijo 10 ng/L, katere pripravo smo opisali v zadnji alineji prejšnjega podpoglavja. Eluat smo pripravili za analizo z LC-MS/MS, filtrat standardne raztopine pa zbrali ločeno od topil za kondicioniranje in elucijo (topila smo zavrgli). S postopkom SPE na kolonah smo v dveh paralelkah, analizirali 400 ml in določili vsebnost BPA z LC-MS/MS analizo.

3.2.3.6 Problematika postopka

Izgube volumna pri eluciji

Zaradi velike površine diskov in aparature za ekstrakcijo v erlenmajerici nismo uspeli zbrati predvidenega volumna eluata (20 ml). Zaradi tega smo iz erlenmajerice v dve epruveti kvantitativno prenesli dvakrat po 8 ml eluata, ki smo ga posušili s prepihovanjem z dušikom in rekonstituirali s 300 µl metanola. Nato smo obe raztopni združili, ponovno posušili in rekonstituirali v 200 µl metanola, to pa kvantitativno prenesli v 200 µl inserte in vstavili v vialo.

Prisotnost vode v eluatu

Zaradi velike površine diska in porozne frite nosilca diska je bilo kljub predpisanemu času sušenja po nanosu vzorca v eluatu prisotne precej vode. To je povzročalo težave pri sušenju eluata in ga v določenih primerih podaljšalo na več kot eno uro.

3.2.3.7 Priprava vode brez vsebnosti BPA

S filtracijo prečiščene vode skozi diske Empore smo ugotavljali njihovo primernost za pripravo vode brez vsebnosti BPA. Disk smo pred filtracijo kondicionirali enako kot za izvedbo SPE (poglavje 3.2.3.1), nato pa smo ločeno od topil za kondicioniranje v

erlenmajerico zbrali filtrat prečiščene vode. Koncentracijo BPA v filtratu smo določali z uporabo SPE na kolonah in LC-MS/MS.

3.2.4 OPTIMIZIRANA METODA SPE S KOLONAMI Strata-X

Vsi parametri metode so bili enaki, kot je opisano v poglavju 3.2.2.3, razen volumna topila za elucijo, ki smo ga po optimizaciji povečali z 2 ml na 3 ml, in spremembe časa mešanja po rekonstituciji, ki je po optimizaciji znašal 30 namesto 90 sekund.

3.2.5 METODA LC-MS/MS

Uporabili smo metodo z nastavitvami, ki so se izkazale kot najprimernejše tekom optimizacije metode LC-MS/MS in so opisane v diplomski nalogi Zibelnik K. (16). Uporabili smo tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (UHPLC) kot separacijski del LC in tandemsko masno spektrometrijo (MS/MS) kot visoko občutljivo in selektivno metodo za detekcijo BPA. Analiza je potekala na sistemu Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS.

3.2.5.1 Metoda LC

LC smo izvajali na analizatorju Agilent 1290 Infinity LC s kolono ZORBAX SB-C18 Rapid Resolution HT, ki je zasnovana za uporabo na UHPLC-sistemih, saj vzdrži tlake do 800 bar. Vsebujejo delce SF velikosti $3,5\mu\text{m}$ z velikostjo por 80\AA , nanešene v kolono iz nerjavečega jekla. Napolarno SF predstavlja silicijev dioksid, na katerega so vezane verige C18.

Za podaljšanje življenjske dobe kolone smo namestili predkolono oz. predfilter Krudkatcher Ultra HPLC In-line filter, ki zadrži delce večje od $0,5\mu\text{m}$ in se jo enostavno in poceni zamenja, kadar je zamašena. Oba sta bila termostatirana na 50°C .

Kolona je še posebej primerna za aplikacije, pri katerih uporabljamo visoko občutljive detektorje, kakršni so masni spektrometri (46).

Spiranje igle za odvzem vzorca je potekalo 10 sekund, in sicer s topilom, sestavljenim iz 50% izopropanola, 25% acetonitrila, 15% cikloheksana in 10% diklorometana.

Uporabili smo mobilno fazo sestavljeno iz MF A in MF B. MF A je bila razplinjena ultračista voda, MF B pa metanol LC- MS/MS čistoče.

Vedno smo najprej injicirali $20\mu\text{l}$ MF A, za tem pa $5\mu\text{l}$ vzorca. Analiza vzorcev je potekala z gradientno elucijo, in sicer:

- 50–90% MF B, 0–3 minute, pri pretoku 0,3 ml/min
- 50% MF B, 3,1–3,5 minute, pri pretoku 0,5 ml/min

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

3.2.5.2 Metoda MS/MS

Uporabili smo masni analizator Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Kot vir ionizacije smo uporabljali negativni ESI. Nastavitve analizatorja so prikazane v Preglednici III.

Preglednica III: Nastavitve masnega analizatorja

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

3.2.6 PREVERJANJE USTREZNOSTI ANALIZNEGA POSTOPKA

3.2.6.1 Vrednotenje metode s standardnimi raztopinami BPA

Priprava standardnih raztopin BPA za vrednotenje metode

Za vrednotenje metode smo uporabili šest standardnih raztopin BPA, s koncentracijami 1, 2, 5, 10, 25 in 50 µg/L in slepi vzorec. Vse raztopine smo pripravili v vialah po 1 ml.

Za pripravo standardnih raztopin BPA za vrednotenje metode smo izhajali iz standardne raztopine BPA s koncentracijo 100 µg/L (poglavje 3.2.1.1), v vsako izmed vial pa smo odpipetirali tudi po 500 µl standardne raztopine IS BPA d-16 s koncentracijo 100 µg/L

(poglavje 3.2.1.2) tako, da smo dosegli koncentracijo IS, 50 µg/L. Preostanek volumna do 1 ml smo dopolnili z metanolom in 5 s mešali na vibracijskem mešalniku. Slepí vzorec je predstavljal metanol.

Priprava standardnih raztopin za vrednotenje metode je prikazana v preglednici IV.

Preglednica IV: Priprava standardnih raztopin BPA/BPA d-16 za vrednotenje metode

Koncentracija standardne raztopine BPA (µg/L)	Volumen standardne raztopine s koncentracijo 100 µg/L (µl)	Volumen standardne raztopine BPA d-16 s koncentracijo 100 µg/L (µl)	Volumen dodanega metanola (µl)
50	500	500	0
25	250	500	250
10	100	500	400
5	50	500	450
2	20	500	480
1	10	500	490
Metanol (slepa)	0	0	1000

Potek vrednotenja metode

Vrednotenje LC-MS/MS metode smo izvedli s pomočjo standardnih raztopin BPA v koncentracijah 1, 2, 5, 10, 25 in 50 µg/L in slepega vzorca. Najprej smo analizirali slepi vzorec, nato pa smo po trikrat injicirali vsako izmed standardnih raztopin, ki so si sledile od najnižje proti najvišji koncentraciji. Vrednotili smo linearnost, ponovljivost in točnost analizne metode.

3.2.6.2 Vrednotenje metode z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi

Priprava raztopin standardov BPA v prečiščeni vodi

V 200-ml bučkah smo pripravili raztopine standardov BPA s koncentracijami 2, 5, 10, 25 in 50 ng/L. Izhajali smo iz standardne raztopine BPA s koncentracijo 50 µg/L (poglavje 3.2.1.1), pri čemer smo potrebni volumen odpipetirali v 200-ml bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Volumni standardov za pripravo raztopin so podani v Preglednici V.

Preglednica V: Priprava raztopin standardov BPA v prečiščeni vodi

Koncentracija BPA v PV (ng/L)	Volumen standardne raztopine BPA s koncentracijo 50 µg/L (µl)
2	8
5	20
10	40
25	100
50	200

Potek vrednotenja metode

Vrednotenje metode smo izvedli s štirimi paralelkami 200 ml raztopine standarda v 5 različnih koncentracijah in s prečiščeno vodo. Raztopine smo ekstrahirali na SPE-kolonah Strata-X, ki smo jih uporabili 6-krat, preden smo jih zavrgli. Ekstrakcijo smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2.3, nato pa vzorce analizirali z LC-MS/MS.

Vsak vzorec, vključno s prečiščeno vodo, smo injicirali trikrat. Najprej smo analizirali vzorec s prečiščeno vodo, nato pa so si sledile raztopine standardov BPA v PV, in sicer od najnižje proti najvišji koncentraciji. Vrednotili smo linearnost, ponovljivost in točnost analizne metode.

3.2.7 VREDNOTENJE METODE

3.2.7.1 Linearnost

Linearnost metode pomeni linearno povezavo med koncentracijo preiskovanega analita v vzorcu in odzivom na instrumentu. Povezavo med odzivom in koncentracijo izračunamo s pomočjo regresijske premice z metodo najmanjših kvadratov, pri čemer dobimo umeritveno premico z enačbo $y = bx + a$ (Enačba 1). Y predstavlja odziv (površino ali višino kromatografskih vrhov), b predstavlja naklon premice, x koncentracijo analita in a odsek na ordinati. Pri uporabi internega standarda predstavlja y razmerje med odzivom analita in internega standarda. Korelacijo med odzivom in koncentracijo podajamo s Pearsonovim koeficientom R oz. determinacijskim koeficientom R^2 , ki ima pri popolni linearnosti vrednost 1.

Linearnost metode LC-MS/MS smo vrednotili s šestimi standardnimi raztopinami BPA v metanolu, s koncentracijami od 1 do 50 µg/L (Preglednica IV) ter s petimi ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi s koncentracijami od 2 do 50 ng/L (Preglednica V). Ugotavljali smo linearnost razmerja odzivov MRM prehodov BPA in IS

BPA d-16 (razmerje BPA/IS). Za zadovoljivo mejo linearnosti smo si določili vrednost $R^2 \geq 0,99$.

3.2.7.2 Ponovljivost

Ponovljivost analizne metode

Ponovljivost je lastnost metode, da pri analizi enakega vzorca daje odzive, ki medsebojno ne odstopajo kljub večkratnim ponovitvam analize. Ovrednotimo jo s standardnim odklonom (SD) in relativnim standardnim odklonom (RSD), ki ju izračunamo s pomočjo *Enačbe 2* in *Enačbe 3*.

Enačba 2: Enačba za izračun standardnega odklona

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

Enačba 3: Enačba za izračun relativnega standardnega odklona

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

Spremenljivka X_i v obeh enačbah je odziv (višina ali površina kromatografskih vrhov), \bar{x} predstavlja aritmetično sredino vrednosti odziva, N pa število meritev.

Ponovljivost analizne metode smo ugotavljali tako, da smo standardne raztopine BPA s koncentracijo od 1 do 50 $\mu\text{g/L}$ (Preglednica IV) trikrat injicirali in izračunali RSD. Za zadovoljivo mejo ponovljivosti smo določili vrednosti $RSD \leq 5\%$.

Ponovljivost ekstrakcije

Ponovljivost ekstrakcije smo ugotavljali z ekstrakcijo vzorcev standardnih raztopin s koncentracijo od 2 do 50 ng/L (Preglednica V), ki smo jo izvedli v štirih paralelkah in analizirali z LC-MS/MS. Iz rezultatov smo izračunali RSD, za zadovoljivo mejo ponovljivosti pa izbrali vrednosti $RSD \leq 15\%$.

3.2.7.3 Točnost

Točnost metode pomeni, da metoda daje rezultate, ki kar najmanj odstopajo od dejanske oz. deklarirane vrednosti. Določamo jo z analizo standardnih raztopin znanih koncentracij. Koncentracijo analita izračunamo iz odzivov z enačbo umeritvene premice, nato pa jih primerjamo s pravimi vrednostmi. Odstopanja med izmerjeno in dejansko vrednostjo prikažemo v obliki relativne napake, ki jo izračunamo z *Enačbo 4*.

Enačba 4: Enačba za izračun relativne napake

$$\text{Relativna napaka (\%)} = C_i/C_d * 100\%$$

Spremenljivka C_i predstavlja izračunano koncentracijo, C_d pa dejansko oz. deklarirano koncentracijo.

Za zadovoljivo mejo točnosti analize smo izbrali mejo $100 \pm 5 \%$, za mejo točnosti analize z metodo ekstrakcije pa $100 \pm 15 \%$.

3.2.7.4 Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije, ki je merilo uspešnosti ekstrakcije smo izračunali na način, da smo povprečno vrednost koncentracij BPA, določenih v ekstrahiranih vzorcih standardnih raztopin primerjali z deklariranimi koncentracijami raztopine standarda v prečiščeni vodi pri enaki koncentraciji.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA PARAMETROV SPE-METODE S KOLONAMI Strata-X

4.1.1 DOLOČITEV VOLUMNA TOPILA ZA ELUCIJO

Topilo za elucijo prekine interakcije med sorbentom v koloni in vezanim analitom ter omogoči prenos analita v epruveto. Za elucijsko topilo smo uporabili raztopino metanola in acetonitrila v razmerju 1:1. Kombinacija teh dveh topil je primerna zaradi večje elucijske moči acetonitrila, ki pripomore k boljši eluciji analita s sorbenta in nizke temperature vrelišča metanola, ki pripomore k hitrejšemu odparevanju topila pri sušenju. Za kvantitativni prenos analita je pomemben tudi uporabljeni volumen topila za elucijo, ki mora biti dovolj velik, da zagotovi popolno elucijo, hkrati pa dovolj majhen, da odparevanje topila ne traja predolgo. Za zagotovitev čim popolnejše elucije smo se odločili za elucijo s 3 ml topila, čeprav proizvajalec priporoča uporabo 2 ml.

Ker smo eluate zbirali v 3-ml epruветah, so bile te po eluciji napolnjene do 1 cm pod robom. Želeli smo preveriti, ali to pomembno vpliva na uspešnost rekonstitucije po odparevanju topila, saj se zaradi stika eluata z veliko površino epruvete nekaj analita verjetno nahaja tudi na njenih stenah in jih majhni volumni topila za rekonstitucijo pri mešanju na vibracijskem mešalniku ne bi dosegli. Pripravili smo raztopino BPA v topilu za elucijo s koncentracijo 10 µg/L (poglavje 3.2.2.4) in nato v tri epruvete odpipetirali po 2 ml te raztopine, v tri pa po 3 ml. Topilo smo kasneje odparili, posušene ostanke pa rekonstituirali v po 200 µl topila za raztapljanje, vzorce prenesli v inserte vial in analizirali z LC-MS/MS.

Glede na rezultate meritev, prikazane v Preglednici VI, sklepamo, da volumen topila za elucijo v epruveti nima bistvenega vpliva na zmanjšanje uspešnosti rekonstitucije oziroma na stenah epruvete ni ostanka analita, ki ga topilo za raztapljanje ne bi doseglo.

Preglednica VI: Koncentracije BPA pri različnih volumnih topila za elucijo (n=3)

Volumen topila za elucijo	Izmerjene koncentracije BPA (µg/L)	Točnost (%)	\bar{x} (povprečna vrednost)
2ml	10,43	104,3	102,7
	10,06	100,6	
	10,32	103,2	
3ml	10,13	101,3	101,1
	9,96	99,6	
	10,23	102,3	

4.1.2 DOLOČITEV VOLUMNA TOPILA ZA REKONSTITUCIJO

V topilu za rekonstitucijo raztopimo suhi ostanek po sušenju eluata. Volumen topila za rekonstitucijo pa poleg volumna vzorca in volumna injiciranja v LC, vpliva na faktor koncentriranja. V njem želimo popolnoma raztopiti analit in ga kvantitativno prenesti v insert oz. vialo. Z izbiro primerne volumna topila za rekonstitucijo želimo ugotoviti morebiten vpliv različnih volumnov na uspešnost rekonstitucije oz. uspešnost ekstrakcije. Pri manjših volumnih topila namreč obstaja možnost, da topilo ne bi doseglo sten epruvete, kjer bi načeloma lahko bil prisoten posušen ostanek. Preverjali smo vpliv različnih volumnov topil za rekonstitucijo, in sicer 200, 300 in 400 µl, rekonstituirali pa smo posušene ostanke 2 in 3 ml 10 µg/L raztopine BPA v topilu za elucijo (poglavje 4.1.1). Topilo za raztapljanje je bila raztopina internega standarda s koncentracijo 50 µg/L, pripravljena po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.2. Eksperiment smo izvedli hkrati z izbiro ustreznega volumna topila za elucijo, v treh paralelkah za vsako različno kombinacijo.

Ugotovili smo, da volumen topila za rekonstitucijo ni vplival na izkoristek ekstrakcije, kar potrjujejo rezultati, predstavljeni v preglednici VII. Zaradi tega bi lahko uporabili katerikoli volumen topila, odločili pa smo se za 200 µl, ker so bili vzorci pri tem volumnu najbolj koncentrirani.

Preglednica VII: Koncentracije BPA pri različnih volumnih topila za rekonstitucijo (n=3)

Volumen topila za elucijo	Volumen topila za rekonstitucijo (µg/L)	Koncentracija BPA (µg/L)	Točnost (%)
2 ml	200	10,27	102,7± 1,9
	300	9,57	95,7± 5,0
	400	9,99	99,9± 2,3
3 ml	200	10,10	101,0± 1,4
	300	10,13	101,3± 1,1
	400	9,94	99,4± 0,8

4.1.3 ČAS MEŠANJA VZORCA PO REKONSTITUCIJI

Po dodatku topila za rekonstitucijo k posušenemu ostanku eluata je potrebno epruvete dovolj časa močno stresati na vibracijskem mešalniku, da zagotovimo popolno raztapljanje. Ker je bil pri povzetem postopku (16) čas mešanja 90 s, je bil pri pripravi večjega števila vzorcev ta korak zelo zamuden, hkrati pa naporen za delo, zato smo želeli ta čas ustrezno prilagoditi. Ugotoviti smo želeli, ali bi skrajšanje časa mešanja vplivalo na izkoristek ekstrakcije. Vzorce smo pripravili v treh paralelkah po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.4, jih mešali 15, 30, 60 in 90 sekund in analizirali na LC-MS/MS, kjer smo vsak vzorec injicirali trikrat.

Iz rezultatov, prikazanih v Preglednici VIII, smo ugotovili, da čas mešanja vzorca po rekonstituciji ne vpliva signifikantno na izkoristek ekstrakcije, zato bi lahko izbrali kateregakoli izmed časov mešanja, odločili pa smo se za 30 sekund, s čimer smo pomembno skrajšali čas priprave vzorcev.

Preglednica VIII: Vpliv časa mešanja po rekonstituciji na izkoristek ekstrakcije (n=3)

Čas mešanja vzorca po rekonstituciji (s)	RSD (%)	Točnost(%)
15	4,37	116,2± 0,6
30	3,11	113,6± 0,4
60	3,52	116,1± 0,4
90	3,80	113,2± 0,5

4.2 METODA SPE Z DISKI Empore®

4.2.1 PREVERJANJE USTREZNOSTI METODE

4.2.1.1 S slepim vzorcem

Ugotoviti smo želeli, ali je v diskih za ekstrakcijo prisoten BPA, ki bi ga pri eluciji sprali in s tem dobili lažno zvišane rezultate. Izvedli smo vse faze postopka (poglavje 3.2.3.3) razen nanosa vzorca, nato pa smo vzorec analizirali z LC-MS/MS.

Rezultati so potrdili naše domneve, saj je slepi vzorec vseboval 2,78 ng/L BPA, kar bi lahko pri analizi vzorcev vod predstavljalo skoraj dvakratno vrednost vsebnosti BPA v primerjavi z rezultati analize gaziranih in negaziranih vod.

4.2.1.2 S prečiščeno vodo

S prečiščeno vodo, v kateri smo z analizo metodo s SPE-kolonami (poglavje 3.2.2.3) določili povprečje vsebnosti BPA, in sicer 0,96 ng/L, smo preverili ustreznost metode SPE z diski Empore. S postopkom SPE z diski, opisanem v poglavju 3.2.3.3, smo izvedli ekstrakcijo 1000 ml prečiščene vode, nato pa ločeno zbrali filtrat prečiščene vode in eluat ter v obeh določili vsebnost BPA. Eluat smo pripravili za analizo in ga analizirali z LC-MS/MS (3.2.3.3), filtrat prečiščene vode, pa smo zbrali v presesalno bučo, ga razdelili v merilne bučke, in sicer 4 krat po 200 ml in izvedli ekstrakcijo s kolonami SPE (3.2.2.3) ter vzorce nato analizirali z analizo LC-MS/MS in določili vsebnost BPA v filtratu. V eluatu prečiščene vode smo določili koncentracijo BPA 1,98 µg/L, kar ob upoštevanju faktorja koncentriranja (5000-krat) in izgubi volumna eluata (poglavje 3.2.3.6) pomeni koncentracijo 0,50 ng/L BPA. Nižjo vrednost od določene koncentracije 0,96 ng/L lahko pripišemo izgubam tekom ekstrakcije. V tem primeru bi izkoristek ekstrakcije znašal 52,1%.

V filtratu smo določili koncentracijo BPA 0,68 ng/L, kar nakazuje na nepopolno vezavo BPA na sorbent tekom ekstrakcije oz. na onesnaženost diskov z BPA.

4.2.1.3 S standardno raztopino BPA

Ustreznost postopka za ekstrakcijo BPA iz vode smo preverjali tudi s standardno raztopino BPA v prečiščeni vodi s koncentracijo 10 ng/L, ki smo jo pripravili tako, da smo v 500 ml bučko odpipetirali 100 µl standardne metanolne raztopine BPA s koncentracijo 50 µg/L in jo dopolnili do oznake s prečiščeno vodo. Uspešnost ekstrakcije smo preverjali z analizo eluata in filtrata standardne raztopine, ki smo ga ekstrahirali s SPE-kolonami (poglavje 3.2.2.3).

Glede na rezultate analize smo v eluatu določili vsebnost BPA 44,2 µg/L, kar ob upoštevanju faktorja koncentriranja (2500-krat) in izgubi volumna eluata (poglavje 3.2.3.6) pomeni koncentracijo 22,1 ng/L, ta pa je višja od vsebovanih 10 ng/L v standardu. Povišano vrednost lahko najverjetneje pripišemo onesnaženosti diskov za ekstrakcijo z BPA, ki se je eluiral skupaj z vezanim BPA iz standardne raztopine in daje lažno povišane vrednosti.

Izmerjena koncentracija BPA v filtratu standardne raztopine je bila 3,77 ng/L, to pa zopet kaže na nepopolno vezavo BPA na sorbent tekom ekstrakcije oz. naključno onesnaženost diskov z BPA.

4.2.2 MOŽNOST VEČKRATNE UPORABE DISKOV

Glede na visoke stroške, ki jih predstavljajo diski za SPE, smo preučevali možnost racionalizacije postopka z večkratno uporabo diskov. V ta namen smo ugotavljali vpliv večkratne uporabe diskov na izkoristek ekstrakcije. Za primerjavo smo vzeli nov in enkrat uporabljen disk, na katerem smo predhodno ekstrahirali 1000 ml prečiščene vode. Nato smo z obema ekstrahirali 500 ml standardne raztopine BPA v prečiščeni vodi s koncentracijo 10 ng/L (poglavje 3.2.3.2). Eluata obeh smo pripravili za analizo z LC-MS/MS, filtrata pa zbrali ločeno od topil za kondicioniranje in elucijo ter s postopkom SPE na kolonah vsakega od njih ekstrahirali v dveh paralelkah po 200 ml in analizirali z LC-MS/MS.

Primerjava rezultatov koncentracije BPA v eluatu ($n=1$) kaže, da je izkoristek ekstrakcije z novim diskom z izračunano koncentracijo 22,1 ng/L višji za 121% glede na standardno raztopino, izkoristek ekstrakcije z uporabljenim diskom pa z rezultatom 8,57 ng/L predstavlja 14% nižjo koncentracijo BPA glede na standardno raztopino.

Razlog za povišano vrednost pri novem disku gre najverjetneje pripisati prisotnosti BPA v diskih za ekstrakcijo oziroma naključni onesnaženosti filtrov z BPA. Razlog za znižano vrednost pri uporabljenem disku pa bi lahko pripisali izgubam pri ekstrakciji.

V filtratu iz novega diska je koncentracija BPA znašala 3,77 ng/L, v filtratu iz uporabljenega diska pa 2,35 ng/L. Izmerjene koncentracije BPA v obeh filtratih kažejo na nepopolne izkoristke ekstrakcije. Višja koncentracija BPA v filtratu iz novega diska pa kaže na vsebnost BPA v novih filtrih.

Glede na dobljene rezultate koncentracije BPA v eluatu novega (22,1ng/L) in uporabljenega diska (8,57 ng/L) lahko sklepamo, da bi bila možna ponovna uporaba diskov. Pri ponovni uporabi diska je namreč prišlo do manjšega lažnega zvišanja rezultatov kot pri novem disku. Pred ekstrakcijo na novih diskih bi bilo verjetno potrebno predhodno izvesti dodatno spiranje, da bi odstranili prisotni BPA v diskih

4.2.3 PRIPRAVA VODE BREZ BPA

Preverjali smo učinkovitost SPE-diskov Empore za pripravo vode brez BPA, ki bi jo nato uporabljali tekom analiznega postopka. Pomembno je, da voda, ki jo uporabimo pri analizi, ne vsebuje snovi, ki jo preučujemo in jo tako uporabimo za pripravo standardnih raztopin, kot slepi vzorec ter za pripravo topil. Težko je namreč najti vodo, ki ne bi vsebovala BPA,

saj tudi prečiščena voda vsebuje BPA, to pa povzroča težave pri validaciji predvsem v nizkem koncentracijskem območju.

Tekom postopka smo z diskom Empore filtrirali 1000 ml prečiščene vode. Disk smo predhodno kondicionirali enako kot pri postopku izvedbe SPE (poglavje 3.2.3.3), nato pa smo ločeno od topil za kondicioniranje v presesalno bučo zbrali filtrat prečiščene vode.

Učinkovitost filtracije smo preverili s postopkom SPE na kolonah Strata-X in analizo na LC-MS/MS (poglavje 3.2.2.3).

V filtratu smo določili koncentracijo BPA 0,68 ng/L, kar pomeni, da se je s filtracijo vsebnost BPA v prečiščeni vodi zmanjšala za 29 %. Za dodatno zmanjšanje vsebnosti BPA pa bi bilo potrebno postopek filtracije večkrat ponoviti. Kljub temu da se je koncentracija BPA po filtraciji znižala, se nismo odločili za uporabo na ta način filtrirane vode, saj bi lahko bila zaradi naključne kontaminacije katerega izmed diskov z BPA vsebnost BPA v filtratu prečiščene vode tudi močno zvišana. Tako bi bilo potrebno vsebnost BPA v vsakem filtratu preveriti z analizo, to pa bi otežilo in podaljšalo čas priprave vode brez vsebnosti BPA.

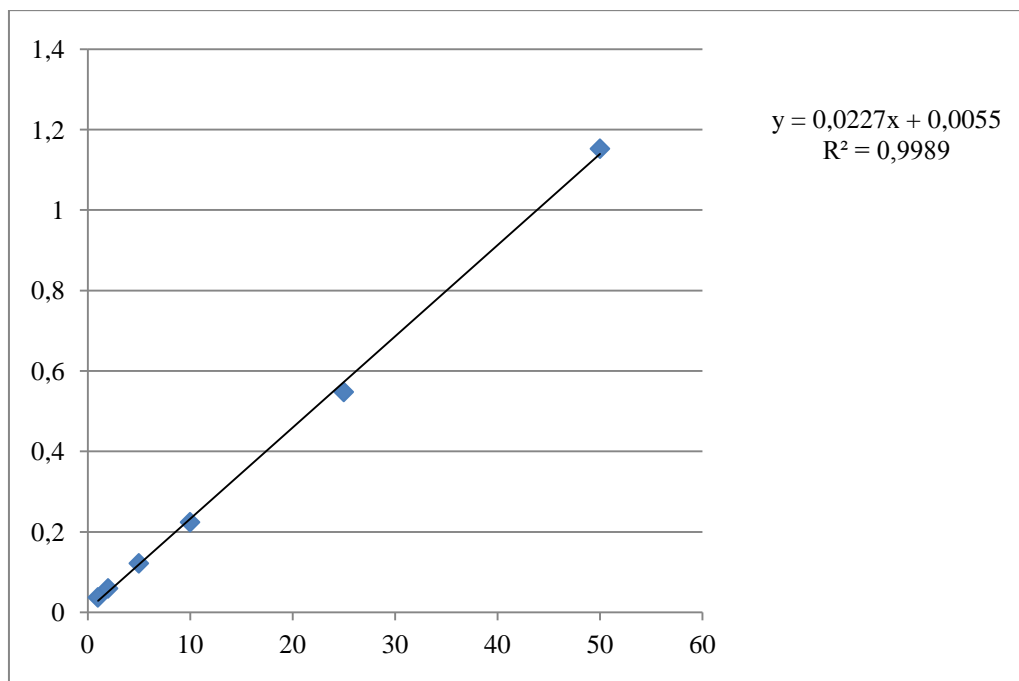
4.3 PREVERJANJE USTREZNOSTI ANALIZNEGA POSTOPKA

4.3.1 VREDNOTENJE METODE S STANDARDNIMI RAZTOPINAMI BPA

4.3.1.1 Linearnost

Linearnost analizne metode smo ugotavljali v koncentracijskem območju od 1 do 50 µg/L. Injicirali smo 6 različnih koncentracij standardnih raztopin BPA, in sicer vsako trikrat. Nato smo za vsako koncentracijo izračunali povprečno vrednost razmerja odzivov BPA/BPA d-16 in z metodo najmanjših kvadratov določili regresijsko premico ter izračunali R^2 .

Regresijsko premico skupaj z enačbo premice in vrednostjo R^2 prikazuje na Slika 10. R^2 z vrednostjo 0,9989 je višji od mejne vrednosti za linearnost metode ($R^2 \geq 0,99$), kar pomeni, da je metoda linearna v območju od 1 do 50 µg/L.



Slika 10: Odvisnost razmerja BPA/BPA d-16 od koncentracij BPA v standardnih raztopinah

4.3.1.2 Ponovljivost

Ponovljivost smo izračunali s pomočjo *Enačbe 3*, opisane v poglavju 3.2.7.2. Ponovljivost smo ugotavljali v koncentracijskem območju od 1 do 50 µg/L s šestimi standardih BPA različnih koncentracij. Za vsako koncentracijo smo iz razmerja odzivov treh injiciranj izračunali povprečno vrednost in standardni odklon, s pomočjo katerega smo določili RSD. Iz povprečne vrednost odzivov pa smo nato s pomočjo regresijske premice določili koncentracijo BPA v standardu. Na podlagi rezultatov (Preglednica IX) lahko trdimo, da je metoda ponovljiva ($RSD \leq 5\%$) v koncentracijskem območju od 2 do 50 µg/L, pri koncentraciji 1 µg/L pa je ponovljivost slabša ($RSD = 19,1\%$).

Preglednica IX: Ponovljivost metode (n=3)

Deklarirana konc. standarda BPA ($\mu\text{g/L}$)	Povprečna vrednost razmerja odziva BPA/BPA d-16	Izračunana koncentracija BPA ($\mu\text{g/L}$)	Ponovljivost injiciranja RSD (%)
1	0,036864	1,382	19,1
2	0,059280	2,369	2,53
5	0,121582	5,114	2,56
10	0,223858	9,619	3,59
25	0,547678	23,884	1,53
50	1,152541	50,530	3,75

4.3.1.3 Točnost

Točnost smo izračunali s pomočjo *Enačbe 4*, opisane v poglavju 3.2.7.3. Ugotavljali smo jo v koncentracijskem območju od 1 do 50 $\mu\text{g/L}$ s pomočjo šestih standardov BPA različnih koncentracij. Za vsako izmed koncentracij smo izračunali povprečno vrednost razmerja odzivov treh injiciranj in s pomočjo enačbe regresijske premice določili koncentracije. Z *Enačbo 4* smo iz izračunanih in deklariranih koncentracij standarda BPA izračunali relativno napako, ki predstavlja točnost (Preglednica X). Kot vidimo iz rezultatov, je meja točnosti $100 \pm 5 \%$ presežena v dveh primerih, še zlasti pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/L}$, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da je metoda točna.

Preglednica X: Točnost metode (n=3)

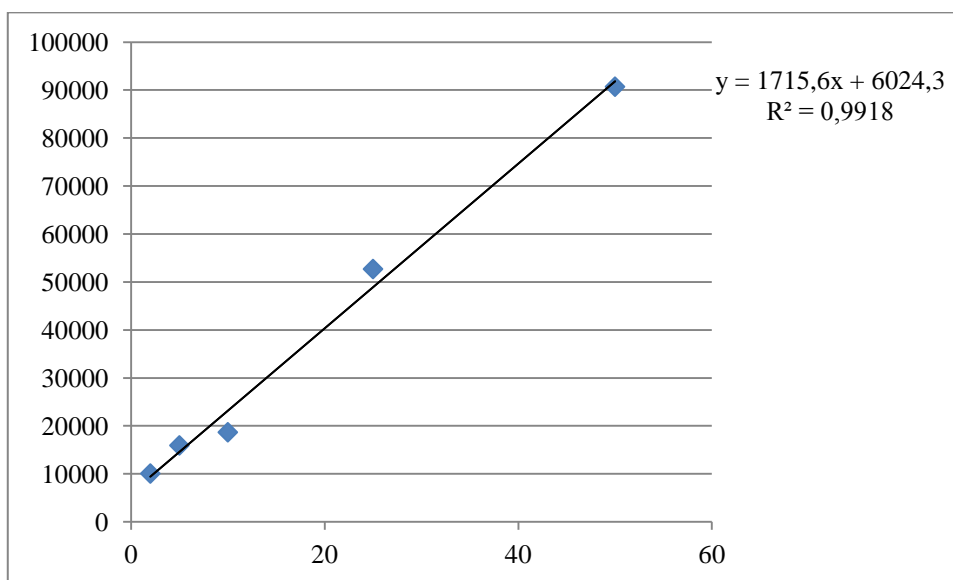
Deklarirana konc. standarda BPA ($\mu\text{g/L}$)	Povprečna vrednost razmerja odziva BPA/BPA d-16	Izračunana koncentracija BPA ($\mu\text{g/L}$)	Točnost (%)
1	0,036864	1,382	138,2 \pm 31,0
2	0,05928	2,369	118,5 \pm 3,3
5	0,121582	5,114	102,3 \pm 2,7
10	0,223858	9,619	96,2 \pm 3,5
25	0,547678	23,884	95,5 \pm 1,5
50	1,15251	50,530	101,1 \pm 3,8

4.3.2 VREDNOTENJE METODE Z EKSTRAHIRANIMI VZORCI STANDARDNIH RAZTOPIN BPA V PREČIŠČENI VODI

4.3.2.1 Linearnost

Linearnost smo ugotavljali v koncentracijskem območju od 2 do 50 ng/L. Injicirali smo 5 ekstrahiranih vzorcev različnih koncentracij standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi. Ekstrakcijo vsakega vzorca smo izvedli v štirih paralelkah po 200 ml, vsako paralelko pa smo injicirali trikrat.

Za vsako koncentracijo smo določili povprečno vrednost odzivov in z metodo najmanjših kvadratov določili regresijsko premico ter pripadajoči R^2 . Regresijska premica, enačba premice ter vrednost R^2 so prikazane na Sliki 11. Vrednost R^2 0,9918 je višja od mejne vrednosti za linearnost metode ($R^2 \geq 0,99$), kar pomeni, da je metoda linearna v preučevanem območju od 2 do 50 ng/L.



Slika 11: Odvisnost odzivov od koncentracij BPA v ekstrahiranih vzorcih standardnih raztopin

4.3.2.2 Ponovljivost

Ponovljivost smo izračunali s pomočjo *Enačbe 3*, opisane v poglavju 3.2.7.2. Ugotavljali smo jo v koncentracijskem območju od 2 do 50 ng/L, in sicer s petimi vzorci standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi. Za vsako koncentracijo smo izvedli ekstrakcijo v štirih

paralelkah in vsako izmed njih injicirali trikrat. Izračunali smo povprečne vrednosti odzivov vsake izmed paralelek ter standardni odklon in RSD.

Na podlagi rezultatov prikazanih v Preglednici XI lahko trdimo, da je metoda ekstrakcije ponovljiva v koncentracijskem območju od 2 do 50 ng/L, saj je zadoščeno kriteriju za ponovljivost ($RSD \leq 15\%$).

Preglednica XI: Ponovljivost ekstrakcije (n=4)

Deklarirana koncentracija raztopine standarda BPA v PV (ng/L)	Povprečna vrednost odziva	Standardni odklon	Ponovljivost ekstrakcije RSD (%)
2	10049	1147	11,4
5	16481	2059	12,5
10	20611	964	4,68
25	52673	1928	3,66
50	90679	5531	6,10

4.3.2.3 Točnost

Točnost smo izračunali s pomočjo *Enačbe 4*, opisane v poglavju 3.2.7.3. Ugotavljali smo jo v koncentracijskem območju od 2 do 50 ng/L, in sicer s pomočjo na petih vzorcih standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi. Pri vsaki koncentraciji smo izvedli ekstrakcijo v štirih paralelkah in vsako izmed njih injicirali trikrat. Izračunali smo povprečno vrednost izmerjenih odzivov za vsako izmed koncentracij in jih primerjali z deklariranimi koncentracijami ter tako z *Enačbo 4* izračunali relativno napako, ki predstavlja točnost. Iz rezultatov v Preglednici XII vidimo, da metoda ni točna v nizkem koncentracijskem območju, saj pri koncentraciji 2 in 5 ng/L ni bilo zadoščeno kriteriju točnosti $100 \pm 15\%$. Razlog za povišane vrednosti v nizkem koncentracijskem območju lahko pripišemo prisotnosti BPA v prečiščeni vodi.

Preglednica XII: Točnost ekstrakcije (n=4)

Deklarirana koncentracija raztopine standarda BPA v PV (ng/L)	Povprečna vrednost odziva	Koncentracija (ng/L)	Točnost (%)
2	10049	2,35	117,3± 11,1
5	16481	6,10	121,9± 7,0
10	20611	8,50	85,0± 5,6
25	52673	27,2	108,8± 4,5
50	90679	49,3	98,7± 6,4

4.3.2.4 Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije smo določili s pomočjo petih različnih koncentracijah bpa v območju od 2 do 50 ng/L. S pomočjo umeritvene premice, ki smo jo določili s standardnimi raztopinami BPA v območju od 1 do 50 µg/L, smo iz povprečja odzivov ekstrahiranih vzorcev izračunali koncentracije BPA, jih primerjali z deklariranimi koncentracijami raztopine standarda v PV in tako izračunali izkoristek ekstrakcije, ki je podan v Preglednici XIII. Kot je razvidno iz rezultatov, je bil izkoristek pri nižjih koncentracijah (2 in 5 ng/L) večji od 100 %, razlog za to pa je prisotnost BPA v PV. Pri višjih koncentracijah (10, 25 in 50 ng/L) je izkoristek manjši od 100 %, kar je posledica izgub zaradi nepopolne ekstrakcije in elucije. Izračunali smo povprečno vrednost izkoristka v nizkem koncentracijskem območju (2 in 5 ng/L), ki je bila 132,7 %, ter povprečno vrednost v visokem koncentracijskem območju (10, 25 in 50 ng/L) in sicer 62,3 %.

Izkoristek ekstrakcije smo upoštevali tudi pri analizi vzorcev tako, da smo izračunane vrednosti koncentracij delili z deležem povprečne vrednosti izkoristka ekstrakcij. Izračunane koncentracije do vključno 5 ng/L smo torej delili z vrednostjo 1,327, izračunane koncentracije nad 5 ng/L pa z vrednostjo 0,623.

Preglednica XIII: Izkoristek ekstrakcij

Deklarirana koncentracija raztopine standarda BPA v PV (ng/L)	Izračunana koncentracija BPA (ng/L)	Izkoristek ekstrakcije (%)
2	3,200	160,0
5	5,270	105,4
10	6,031	60,3
25	16,995	67,0
50	29,241	58,5

4.4 ANALIZA VZORCEV GAZIRANIH IN NEGAZIRANIH VOD

Vsebnost BPA smo določali v vzorcih gaziranih in negaziranih vod pakiranih v plastenke. Skupno smo analizirali 23 vzorcev vod. V 10-ih primerih je šlo za analizo negaziranih (Vzorci 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19), v 10 pa za analizo gaziranih vod istega proizvajalca shranjenih v enaki vrsti plastike kot pri ekvivalentu (enaka znamka) negazirane vode (Vzorci 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20). V sedmih primerih je bil par obeh vrst vod polnjen tudi iz istega izvira, pri čemer je bil gazirani vodi naknadno dodan ogljikov dioksid. Dva analizirana vzorca smo v plastenki predhodno izpostavili temperaturi 40°C za 20 ur (Vz 21 in Vz 22), s čimer smo želeli ugotoviti vpliv shranjevanja pri povišani temperaturi na izločanje BPA iz plastike. En analiziran vzorec negazirane vode pa je bil odvzet iz steklene embalaže enake blagovne znamke, ki smo jo že analizirali pri analizah vode iz plastenk (Vz 23), s čimer smo želeli preveriti, ali je BPA prisoten tudi v vodi shranjeni v stekleni embalaži. Pri vrednotenju rezultatov smo upoštevali tudi izmerjen pH vode, ki bi lahko vplival na izločanje BPA iz plastike. Zaradi vpliva na pH smo upoštevali tudi podatek na deklaraciji za koncentracijo ogljikovega dioksida, raztopljenega v gazirani vodi, prav tako pa smo upoštevali tudi vrsto plastike, iz katere sta bila narejena plastenka in zamašek. Podatki o vrsti plastike se nahajajo na oznaki trikotnika na embalaži, razdeljeni pa so na 7 vrst (Preglednica XIV). Pri izdelavi različnih vrst plastike se namreč BPA uporablja v različnih količinah, zato je od tega odvisno tudi prehajanje BPA v vodo. Koncentracijo BPA v vzorcih smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.2.4 oz. 3.2.2.1 v štirih paralelkah.

Preglednica XIV: Oznake različnih vrst plastike

Oznaka	Vrsta plastike
1- PET, PETE	polietilentetraftalat
2- HDPE	polietilen visoke gostote
3- PVC	polivinil klorid
4- LDPE	polietilen nizke gostote
5- PP	polipropilen
6- PS	polistiren
7- PC	druge vrste, ki pogosto vsebujejo polikarbonatno (PC) plastiko

Pri izračunu koncentracij BPA v vzorcih smo upoštevali izkoristek ekstrakcije (poglavje 4.3.2.4). Tako smo izračunane koncentracije do vključno 5 ng/L, kot smo že omenili, delili z vrednostjo 1,327, ki predstavlja delež povprečne vrednosti izkoristka ekstrakcij v nizkem koncentracijskem območju, izračunane koncentracije nad 5 ng/L pa z vrednostjo 0,623, ki predstavlja delež povprečne vrednosti izkoristka ekstrakcij v visokem koncentracijskem območju.

Podatki o analiziranih vzorcih vod so skupaj z rezultati meritev zbrani v Preglednici XV.

Preglednica XV: Koncentracije BPA v vzorcih negaziranih in gaziranih vod

Vzorec	Blagovna znamka	Vrsta plastike-embalaža/zamašek	Izvir/kraj	Koncentracija BPA (ng/L)	pH	Konc. CO ₂ (g/L)
Vz 1	S-Budget negazirana	PP(5), PET (1)/PE(2)	Ni podatka/Mirna	1,76	6,50	/
Vz 2	S-Budget gazirana	PP (5), PET(1)/PE(2)	Ni podatka/Mirna	2,26	5,06	4,9
Vz 3	Radenska naturelle negazirana	PP (5), PET (1)/PE(2)	Radenska naturelle, Radenci	2,43	7,14	/
Vz 4	Radenska classic gazirana	PP (5), PET (1)/PE(2)	Kraljevi vrec, Radenci	13,97	5,77	3,5
Vz 5	Saguaro pannon aqua negazirana	PET (1)/ ni podatka	Sashalmi Dúló pannon aqua Kút / Csany (HUN)	17,87	6,37	/

Vz 6	Saguaro pannon aqua gazirana	PET (1)/ ni podatka	Sashalmi Dúló pannon aqua Kút / Csany (HUN)	3,30	5,28	4
Vz 7	Blues naturale negazirana	PET (1)/ PE-HD (2)	S. Antonio/ Caslino al piano (ITA)	11,61	7,70	/
Vz 8	Blues frizzante gazirana	PET (1)/ ni podatka	S. Antonio/ Caslino al piano	3,27	4,60	Ni podatka
Vz 9	Fonte Guizza negazirana	PET (1)/ PE-HD (2)	Guizza/Scorze (ITA)	2,69	7,54	/
Vz 10	Ginerva frizzante	PET (1)/ PE-HD (2)	Guizza Luogo/ Scorze (ITA)	1,82	5,02	Ni podatka
Vz 11	Voda izvirska, Mercator negazirana	PP (5),PET (1)/ PE (2)	D2/05 / Mirna	2,04	7,40	
Vz 12	Gazirana voda Mercator generik gazirana	PP (5),PET (1)/ PE (2)	Ni podatka/ Mirna	2,46	4,99	4,9
Vz13	Vöslauer ohne negazirana	PET (1)/ PE (2)	Ursprungsquelle VI/ Bad Vöslau (AUT)	1,91	7,23	/
Vz 14	Vöslauer prickelnd gazirana	PET (1)/ PE (2)	Ursprungsquelle VI/ Bad Vöslau (AUT)	2,02	4,75	5-6
Vz 15	Gasteiner natur negazirana	PET (1)/ ni podatka	Kristalquelle/ Bad Gastein (AUT)	2,84	6,99	/
Vz 16	Gasteiner sparkling gazirana	PET (1)/ ni podatka	Kristalquelle/ Bad Gastein (AUT)	2,44	4,36	Ni podatka
Vz 17	Sorgente di Fleons negazirana	PET (1)/ ni podatka	Sorgente di Fleons/ Udine (ITA)	33,35	8,05	/
Vz 18	Sorgente di fleons gazirana	PET (1)/ ni podatka	Sorgente di Fleons/ Udine (ITA)	24,51	4,31	Ni podatka
Vz 19	Güssinger still negazirana	PET (1)/ ni podatka	Güssinger Brunnen I, II, III/ Gerersdorf Sulz (AUT)	3,54	7,11	/
V z20	Güssinger perlfrisch gazirana	PET (1)/ ni podatka	Güssinger Brunnen I, II, III/ Gerersdorf Sulz (AUT)	1,51	5,34	Ni podatka
Vz 21	Radenska naturelle	PP (5), PET (1)/ PE(2)	Radenska naturelle,	2,55	7,49	/

	negazirana		Radenci			
Vz 22	Radenska classic gazirana	PP (5), PET (1)/ PE(2)	Kraljevi vrelec, Radenci	13,84	5,70	3,5
Vz 23	Radenska naturelle negazirana	steklo/ PE(2)	Radenska naturelle, Radenci	1,91	7,14	/

Embalaža pri vzorcih Vz1, Vz2, Vz3, Vz4, Vz11 in Vz12 je narejena iz kombinacije PET in PP, pri ostalih pa je iz PET. Glede na vrsto uporabljene plastike in izmerjene koncentracije BPA v vzorcih gaziranih in negaziranih vod nismo mogli zaznati povezave med spremenljivkama.

Pri vzorcih Vz5, Vz6, Vz7, Vz8, Vz9, Vz10, Vz13, Vz14, Vz15, Vz16, Vz17, Vz18, Vz19 in Vz20 sta bili obe izmed paralelk negazirane in gazirane vode polnjeni iz istega izvira, kar pomeni enako začetno kontaminacijo vode z BPA pred polnjenjem v plastenke. Razlike med koncentracijami BPA v teh vzorcih bi lahko pripisali različnim pogojem shranjevanja oz. različnim časom skladiščenja. Na nobeni izmed plastenk namreč ni bilo mogoče zaslediti datuma polnjenja, s čimer bi lahko lažje pojasnili razlike v koncentracijah.

Izmerjeni obseg vsebnosti BPA v vzorcih je bil od 1,76 do 33,35 ng/L pri negaziranih in od 1,51 ng/L do 24,51 ng/L pri gaziranih vodah, kar je skladno tudi s podatki v literaturi (16). Najvišje izmerjene vrednosti BPA sta vsebovala vzorca negazirane in gazirane vode Sorgente di Fleons (Vz 17, Vz 18). Možne razloge za tako povišane vrednosti v primerjavi z ostalimi vzorci bi lahko pripisali kontaminaciji vode z BPA na samem izviru, slabi kvaliteti uporabljene plastične embalaže ali neustreznemu skladiščenju (drugačno skladiščenje od predpisanega na embalaži).

Glede na rezultate nismo mogli zaznati korelacije med vsebnostjo BPA v vzorcih gaziranih in negaziranih vod.

Izmerjene pH vrednosti pri negaziranih vodah so se gibale med 6,37 in 8,05, pri gaziranih pa med 5,77 in 4,31 in so bile neposredno povezane z deklarirano koncentracijo CO₂ v vodi, pri čemer je višja koncentracija CO₂ pomenila nižje vrednosti pH. Najvišji in najnižji vrednosti pH smo izmerili v vzorcih negazirane in gazirane vode Sorgente di Fleons (Vz17, Vz18). V prvem je bil pH 8,05, slednjem pa 4,31. V omenjenih vzorcih smo izmerili tudi najvišje koncentracije BPA v vodi, kljub temu pa nismo mogli potrditi povezave med pH vrednostmi in izmerjenimi koncentracijami BPA v vzorcih.

V vzorcih, ki smo jih za 20 ur izpostavili temperaturi 40°C (Vz21, Vz22) v vodni kopeli, je bila koncentracija BPA 2,55 ng/L v vzorcu negazirane in 13,84 ng/L v vzorcu gazirane vode. V prvem primeru to pomeni za 4,9 % višjo koncentracijo BPA v primerjavi z izmerjeno koncentracijo v enaki znamki vode, ki je bila shranjena pri normalnih pogojih (Vz3). V drugem primeru pa je bila koncentracija za 0,9 % v primerjavi s tisto izmerjeno v enaki znamki vode (Vz4). Glede na rezultate ne moremo trditi, da je 20-urna izpostavljenost temperaturi 40°C vplivala na povečano odpuščanje BPA iz plastenke, saj so bila izmerjena odstopanja med rezultati znotraj intervala $\pm 5\%$, ki določa točnost metode. Za potrditev vpliva temperature na povečano prehajanje BPA iz plastenk v vodo bi bilo potrebno analizirati več vzorcev in jih izpostavljati povišani temperaturi za več kot 20 ur.

V vzorcu vode, shranjene v stekleni embalaži (Vz23), smo določili koncentracijo BPA 1,91 ng/L, kar je za 21,4 % nižje v primerjavi z vodo enake blagovne znamke, shranjene v plastični embalaži (Vz3). Višja koncentracija BPA v vodi, shranjeni v plastenkah, potrjuje prehajanje BPA iz plastike v vodo (13). Kljub temu pa tudi voda, shranjena v steklenici, vsebuje BPA, kar potrjuje splošno razširjenost BPA v okolju in posledično njegovo prehajanje v podtalnico ter pitno vodo oziroma na kontaminacijo tekom polnjenja in shranjevanja.

Če bi dnevno zaužili 2L vode, v kateri smo izmerili najvišjo koncentracijo BPA 33,35 ng/L, bi to za povprečnega človeka z maso 70 kg pomenilo vnos 0,000953 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{TM}/\text{dan}$, kar pa ne bi presegalo mejne vrednosti v EU, ki znaša 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{TM}/\text{dan}$. Vseeno pa je pri uživanju vode iz plastenk potrebna previdnost, saj študije kažejo, da so lahko odmerki, ki imajo negativne posledice, že veliko nižji od tistih, ki smo jih izmerili v preiskovanih vzorcih. (13,18).

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo preverjali primernost SPE-diskov Empore za ekstrakcijo bisfenola A (BPA) iz vodnih vzorcev ter za filtracijo pri pripravi vode brez BPA. Preverjali smo ustreznost metode s slepim vzorcem, prečiščeno vodo in standardno raztopino BPA ter preučevali možnost večkratne uporabe diskov. Pri delu smo se soočili tudi s problematiko povezano s postopkom, kot je onesnaženost diskov z BPA, izguba volumna topila pri eluciji in prisotnost vode v eluatu.

Rezultati preverjanja ustreznosti metode SPE z diski Empore s slepim vzorcem so pokazali prisotnost BPA v diskih za ekstrakcijo, tovrstna onesnaženost diskov pa se je razlikovala od diska do diska, kar pomeni, da je kontaminacija naključna najverjetneje tekom izdelave diska.

Pri preverjanju metode s prečiščeno vodo smo ugotovili, da je prišlo do izgub pri ekstrakciji zaradi nepopolne vezave BPA na sorbent.

Pri preverjanju metode s standardno raztopino smo potrdili kontaminacijo diska z BPA, hkrati pa tudi ugotovili, da je pri ekstrakciji prišlo do nepopolne vezave BPA na sorbent.

Potrdili smo možnost večkratne uporabe diskov za ekstrakcijo.

Problem izgube volumna topila pri eluciji smo rešili s prenosom manjšega volumna eluata ob upoštevanju ustreznega faktorja. Prisotnosti vode v eluatu pa nam ni uspelo odpraviti, zato smo si pomagali z daljšim časom sušenja.

Ker so se SPE diski Empore izkazali kot neprimerni za pripravo vzorcev pri določanju vsebnosti BPA, se nismo odločili za pripravo vzorcev z omenjenimi diski.

Predhodno vpeljano metodo za določanje BPA v vodnih vzorcih z ekstrakcijo s kartušami SPE in analizo LC-MS/MS smo poskušali dodatno optimizirati. Ustreznost metode smo potrdili z vrednotenjem metode s standardnimi raztopinami BPA in z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi. Na koncu pa smo analizirali tudi vzorce negaziranih in gaziranih vod ter primerjali vsebnosti BPA v njih.

Predhodno vpeljani metodi za določanje BPA v vodnih vzorcih z ekstrakcijo s kartušami SPE in z analizo LC-MS/MS smo na stopnji priprave vzorca poskušali optimizirati parametre z izbiro volumna topila za elucijo, izbiro volumna topila za rekonstitucijo in s časom mešanja vzorca po rekonstituciji. Različni volumni topila za elucijo in rekonstitucijo niso pomembno vplivali na izkoristek ekstrakcije, zato smo uporabili enake volumne kot pri povzeti metodi. Prav tako čas mešanja vzorca po rekonstituciji ni pomembno vplival na

izkoristek ekstrakcije, zato smo ga skrajšali z 90 na 30 sekund, to pa je pomembno vplivalo na skrajšanje postopka in zmanjšanje obremenitve pri delu.

Z validacijo metode s pomočjo standardnih raztopin BPA smo potrdili linearnost v koncentracijskem območju od 1 do 50 $\mu\text{g/L}$ in ponovljivost v koncentracijskem območju od 2 do 50 $\mu\text{g/L}$. Točnost metode, ki smo jo določali v koncentracijskem območju od 1 do 50 $\mu\text{g/L}$, pa ni zadoščala kriteriju za točnost $100 \pm 5 \%$ pri vseh primerih, zato ne moremo trditi, da je metoda točna oziroma je manj točna.

Z validacijo metode z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin BPA v prečiščeni vodi smo potrdili linearnost in ponovljivost metode v koncentracijskem območju od 2 do 50 ng/L . Točnost metode v koncentracijskem območju od 2 do 50 ng/L ni v celoti ustrezala kriteriju za točnost $100 \pm 15 \%$ v nizkem koncentracijskem območju, saj je odstopala v dveh primerih, in sicer pri koncentraciji 2 in 5 ng/L .

Z validirano metodo smo analizirali 23 vzorcev gaziranih in negaziranih vod ter primerjali vsebnost BPA med njimi. Izmerjene koncentracije BPA pri negaziranih vodah so se nahajale v območju med 1,76 in 33,35 ng/L , pri gaziranih pa med 1,51 ng/L in 24,51 ng/L . Glede na dobljene rezultate nismo zaznali povezave med vrstami plastike in vsebnostjo BPA v analiziranih vodah. Prav tako nismo zaznali vpliva pH na koncentracijo BPA v gaziranih in negaziranih vodah. Razlike med izmerjenimi koncentracijami BPA v vzorcih, pri katerih sta bili paralelki polnjeni iz istega izvira (Vz5, Vz6, Vz7, Vz8, Vz9, Vz10, Vz13, Vz14, Vz15, Vz16, Vz17, Vz18, Vz19, Vz20), lahko pripišemo različnim pogojem shranjevanja oz. različnim časom skladiščenja.

Za vzorce, ki smo jih za 20 ur izpostavili temperaturi 40°C (Vz21, Vz22), ne moremo trditi, da je povišana temperatura vplivala na povečano prehajanje BPA iz plastike v vodo, saj so bila odstopanja med rezultati znotraj intervala $\pm 5\%$, ki določa točnost metode.

Za dokaz vpliva temperature na povečano prehajanje BPA iz plastenk v vodo bi bilo zato potrebno analizirati več vzorcev in jih izpostavljati povišani temperaturi za več kot 20 ur.

V vzorcu vode, shranjene v stekleni embalaži (Vz23), smo določili za 21,4 % nižjo vrednost BPA v primerjavi z vodo enake blagovne znamke, shranjene v plastični embalaži (Vz3). Višja koncentracija BPA v vodi, shranjeni v plastenki, potrjuje, da BPA prehaja iz plastike v vodo. Ugotovili pa smo, da tudi voda, shranjena v steklenici, vsebuje BPA, kar kaže na različne vire kontaminacije z BPA(13).

6 LITERATURA

1. L. M. L. Nollet.: Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food, 1 izdaja, Wiley-Blackwell, Iowa, 2011: 19-49
2. H.S. Changa, K.H. Choa, B. Leeb, S.J. Choia: The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, *Journal of Hazardous Materials* 2009; 172: 1–12
3. E. D.Kandarakis, J.P. Bourguignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller, A. C. Gore: Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement 2009; 293-342
4. T.Hayes, K. Haston, M. Tsui, A. Hoang, C. Haeffele, A. Yonk: Feminization of male frogs in the wild: water-borne herbicide threatens amphibian populations in parts of the United States: *Nature* 2002; 419: 895–896
5. C.G.Campbell, S.E. Borglin, F.B. Green, A. Grayson, E. Wozel, W.T. Stringfellow: Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: *Chemosphere* 2006; 65: 1265- 1280
6. W.Wuttke, H. Jarry, D. Seidlova-Wuttke: Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals: *Hormones* 2010; 9: 9-15
7. H. C. Chen, H-W. Kuo, W-H. Ding: Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting procedures: *Chemosphere* 2009; 74: 508-514
8. J. Lintelmann, A. Katayama, N. Kurihara, L. Shore, A. Wenzel: Endocrine disruptors in the environment: (IUPAC technical Report), *Pure and Applied Chemistry* 2003; 75: 631- 681
9. D. M. Walker, A. C. Gore: Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction, *Nature Reviews Endocrinology* 2011; 7: 197- 207
10. G. Streck: Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment, *Trends anal. chem.* 2009; 28: 635-651
11. H.C.Chen, H-W. Kuo, W-H. Ding: Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting procedures, *Chemosphere* 2009; 74: 508-514

12. A. Ballesteros-Gomez, S. Rubio, D. Perez-Bendito: Analytical methods for the determination of bisphenol A in food, *Journal of Chromatography* 2008; 1216: 449-469
13. L. N. Vandenberg, I. Chahou, J. Jerrold Heindel, V. Padmanabhan, J.R. Francisco Paumgarten, G. Schoenfelder: Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A, *Environmental Health Perspect* 2010; 118(8): 1055–1070
14. J.H. Kang, F.Kondo, Y. Katayama: Human exposure to bisphenol A, *Toxicology* 2006; 226: 79–89
15. D.P. Mohapatra, S.K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli: Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge – Fate of bisphenol A, *Chemosphere* 2010; 78: 923–941
16. 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
17. Y. Watabe, T. Kondo, H. Imai, M. Morita, N. Tanaka, J. Haginaka, K. Hosoya: Improved Detectability with a Polymer-based Trapping Device in Rapid HPLC Analysis for Ultra-low Levels of Bisphenol A (BPA) in Environmental Samples, *Analytical Sciences* 2004; 20 (1):133-137
18. P. Alonso-Magdalena, A. B. Ropero, S. Soriano, I. Quesada, A.I Nadal: Bisphenol-A: a new diabetogenic factor?, *Hormones* 2010; 9 (2): 118-126
19. Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A. Summary report, Ottawa, Kanada, 2010
20. J-H. Kanga, Y. Katayama, F. Kondo: Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals: *Toxicology* 2006; 217: 81–90
21. N.Hanioka, T. Naito, S. Narimatsu: Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation: *Chemosphere* 2008; 74:33-36
22. N. Hanioka, H. Oka, K. Nagaoka, S. Ikushiro, S. Narimatsu: Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation: *Archives of Toxicology* 2011; 85:1373–1381
23. W. Dekant, W. Völkel: Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures: *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 228: 114–134

24. H. Inoue, A. Tsuruta, S. Kudo, T. Ishii, Y. Fukushima, H. Iwano, H. Yokota, S. Kato: Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats: *Drug Metabolism and Disposal* 2005; 33:55-59
25. S. Singh, S. S-L. Li: Bisphenol A and phthalates exhibit similar toxicogenomics and health effects, *Gene* 2011; 494: 85-91
26. Y.B. Wetherill, B.T. Akingbemi, J. Kanno, J.A. McLachlan, A. Nadal, C. Sonnenschein, C.S. Watson, R.T. Zoeller, S.M. Belcher: In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action, *Reproductive toxicology* 2007; 24: 178-198
27. S. Takayanagi, T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, Y. Shimohigashi: Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity: *Toxicology Letters* 2006; 167: 95-105
28. J. Janošek, K. Hilscherová, L. Bláha, I. Holoubek: Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment, *Toxicology in Vitro* 2006; 20: 18–37
29. W.V. Welshons, K.A. Thayer, B.M. Judy, J.A. Taylor, E.M. Curran, F.S. vom Saal: Large Effects from Small Exposures. I. Mechanisms for Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity, *Environmental Health Perspectives* 2003; 111: 994–1006
30. F. Eertmans, W. Dhooge, S. Stuyvaert, F. Comhaire: Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment, *Toxicology in Vitro* 2003; 17: 515–524
31. H. Yokota, H. Iwano, M. Endo, T. Kobayashi, H. Inoue, S. Ikushiro, A. Yuasa: Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver, *Biochemical Journal* 1999; 34: 405-409
32. G. Ginsberg, D.C. Rice: Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A?: *Environmental Health Perspectives* 2009; 117: 1639-1643
33. W. V. Welshons, S. C. Nagel, F. S. vom Saal: Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure, *Endocrinology* 2010; 147(6): 56–69
34. C. Dash, M. Marcus, P. D. Terry: Bisphenol A: Do recent studies of health effects among humans inform the long-standing debate?. *Mutation research* 2006; 613: 68-75

35. N. Benachour, A. Aris: Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; 241: 322-328
36. H. Kataoka: New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22: 232-244
37. E. Forgács, T. Cserhádi: *Chromatography/Principles*, Elsevier Science Ltd, Budapest, 2003: 1259–1267
38. M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo: *Chromatography/High-performance Liquid Chromatography*, Elsevier Science Ltd, Madrid, 2003: 1274–1280
39. F. A. Mellon: *Mass spectrometry/Principles and Instrumentation*, Elsevier Science Ltd, Norwich, 2003: 3739–3749
40. R. L. Gomes, M. D. Schrimshaw, J. N. Lester: Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters, *Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22: 697-705
41. Empore[®] Solid Phase Extraction Disks: Technical Information: 3M , 3130 Lexington Ave. S. Eagan, 2009
42. Bisphenol A from Water using Strata[™]-X:
<https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/1285c130-c17f-43a7-838c-c230535afc48.pdf?returnURL=/Search> :dostop: januar 2012
43. Sorbent Information for SDB-RPS:
http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/center/sorbents/sdb-rps/ dostop: januar 2012
44. Empore[®] Solid Phase Extraction Disks: SDB-RPS (Styrene Divinylbenzene-Reversed Phase Sulfonate), Technical information: 3M , 3130 Lexington Ave. S. Eagan, 2009
45. <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/b50e7828-7b9b-431f-9490-fd9e4498a660.pdf> dostop: januar 2012
46. Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition SB-C18 Threaded Column: Data Sheet: Agilent Technologies, Inc., ZDA, 2009
<http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/820210-002.pdf>
dostop: januar 2012
47. Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS System, Concepts Guide, Agilent Technologies Inc., ZDA, 2009

http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G3335-90069_QQQ_Concepts.pdf dostop: januar 2012

48. R. Đurović: Mikroekstrakcija u čvrstoj fazi (SPME) u određivanju ostataka pesticida u uzorcima zemljišta, *Pestic. Fitomed.* 2011; 26(3):177–184