

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DARJA GRAMEC

# **DIPLOMSKA NALOGA**

Univerzitetni program farmacije

Ljubljana, 2012

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



DARJA GRAMEC

**DOLOČANJE BISFENOLA A IN TRIKLOSANA V URINU S PLINSKO  
KROMATOGRAFIJO Z MASNO SELEKTIVNIM DETEKTORJEM**

**DETERMINATION OF BISPHENOL A AND TRICLOSAN IN URINE WITH GAS  
CHROMATOGRAPHY WITH MASS SELECTIVE DETECTOR**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, ter na Institutu Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Ester Heath.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farmacije in somentorici izr. prof. dr. Ester Heath za nasvete in pomoč pri nastajanju diplomske naloge, ter Mihu Avberšku za nasvete in vsestransko pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela. Najlepše se zahvaljujem tudi Silvi Perko za vso pomoč pri delu v laboratoriju ter vsem zaposlenim na Odseku za znanosti o okolju na IJS, za prijetno vzdušje ter spodbude.

### **Izjava**

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

Ljubljana, avgust 2012

**Predsednik diplomske komisije:** prof. dr. Vojko Kmetec

**Član diplomske komisije:** asist. dr. Matevž Prijatelj

## KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	VI
KAZALO TABEL.....	VIII
POVZETEK .....	X
ABSTRACT .....	XII
SEZNAM OKRAJŠAV .....	XIV
1. UVOD .....	1
1.1 Humani "biomonitoring" .....	1
1.2 Urin kot biološki material .....	3
1.3 Bisfenol A .....	3
1.3.1 Lastnosti bisfenola A .....	3
1.3.2 Viri bisfenola A .....	4
1.3.3 Toksikokinetika bisfenola A.....	7
1.3.4 Toksikodinamika bisfenola A.....	8
1.3.5 Določanje bisfenola A .....	9
1.4 Triklosan .....	12
1.4.1 Lastnosti triklosana.....	12
1.4.2 Viri triklosana .....	13
1.4.3 Toksikokinetika triklosana .....	14
1.4.4 Toksikodinamika triklosana .....	14
1.4.5 Določanje triklosana .....	15
1.5 Analizna metoda .....	16
1.5.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu .....	17
1.5.2 Plinska kromatografija.....	19
1.5.3 Masna spektrometrija .....	21
2. NAMEN DELA.....	23
3. MATERIALI.....	24
3.1 Standardi .....	24
3.2 Reagenti in topila .....	24
3.3 Pribor in aparature .....	25
3.3.1 Sistem za ekstrakcijo na trdnem nosilcu.....	25
3.3.2 Plinski kromatograf z masno selektivnim detektorjem .....	26
4. METODE .....	27

4.1	Vzorčenje .....	27
4.2	Priprava raztopin standardov .....	27
4.3	Priprava raztopin standardov za validacijo .....	27
4.4	Priprava raztopin internih standardov .....	28
4.5	Derivatizacija .....	29
4.6	Ekstrakcija na trdnem nosilcu .....	29
4.7	Dekonjugacija .....	30
4.8	Instrumentalna analiza .....	31
4.9	Validacija .....	32
4.10	Določanje koncentracije bisfenola A in triklosana v realnih vzorcih .....	37
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	38
5.1	Derivatizacija bisfenola A in triklosana.....	38
5.1.1	Optimizacija izbora derivatizacijskega topila.....	39
5.1.2	Optimizacija časa derivatizacije .....	39
5.2	Optimizacija ekstrakcije na trdnem nosilcu .....	40
5.2.1	Ekstrakcijski nosilec .....	40
5.2.2	Optimizacija priprave vzorca.....	43
5.2.3	Optimizacija čiščenja vzorca .....	44
5.2.4	Optimizacija elucije .....	47
5.3	Opis optimiziranih pogojev ekstrakcije .....	49
5.3.1	Učinkovitost ekstrakcije .....	50
5.4	Optimizacija dekonjugacije bisfenola A .....	51
5.5	Izbira pogojev instrumentalne analize .....	52
5.6	Določanje vira kontaminacije .....	56
5.7	Validacija metode .....	58
5.7.1	Selektivnost .....	58
5.7.2	Linearnost .....	59
5.7.3	Meja detekcije in meja kvantifikacije.....	60
5.7.4	Točnost in natančnost .....	60
5.8	Določanje koncentracije v realnih urinskih vzorcih .....	61
6.	SKLEP.....	63
7.	LITERATURA.....	65

## KAZALO SLIK

Slika 1: Sinteza BPA polikarbonata .....	5
Slika 2: Shematski prikaz reakcije hidrolize polikarbonata (Prirejeno po 12) .....	6
Slika 3: BPA glukuronid (a) in BPA sulfat (b).....	7
Slika 4: Redukcija tioestra do acilne oblike ob prisotnosti katalizatorja enoil reduktaze ...	13
Slika 5: Postopek SPE (○- analit, ki ga določamo, Δ- neželjene sestavine vzorca, □- neželjene komponente vzorca, ki se niso vezale na sorbent ali so se vezale šibkeje od iskanega analita) .....	19
Slika 6: Shema plinskega kromatografa .....	21
Slika 7: GC-MS instrument .....	22
Slika 8: Aparatura za SPE .....	26
Slika 9: Sušenje ekstraktov v toku dušika .....	30
Slika 10: Plinski kromatograf z masno selektivnim detektorjem .....	31
Slika 11: Derivatizacija BPA (a) in TCS (b) z MSTFA .....	38
Slika 12: Optimizacija časa derivatizacije.....	40
Slika 13: Struktura polimernega sorbenta iz polistirena/divinilbenzena.....	40
Slika 14: Določanje primernosti ekstrakcijskega nosilca Evolute ABN za hkratno elucijo TCS in BPA.....	41
Slika 15: Določanje primernosti ekstrakcijskega nosilca Evolute ABN za ekstrakcijo urinskih vzorcev .....	42
Slika 16: Razlike v učinkovitosti ekstrakcije med urinskim in vodnim vzorcem .....	43
Slika 17: Vpliv redčitve vzorca na izkoristek ekstrakcije .....	43
Slika 18: Določanje optimalne koncentracije metanola v vodi za spiranje ekstrakcijskega nosilca.....	45
Slika 19: Določanje optimalnega volumna 40 % vodne raztopine metanola za spiranje ekstrakcijskega nosilca .....	46
Slika 20: Določanje optimalne koncentracije acetonitrila v vodi za spiranje ekstrakcijskega nosilca.....	46
Slika 21: Grafični prikaz poteka SPE .....	50
Slika 22: Uspešnost dekonjugacije pri različnih časih inkubacije.....	52
Slika 23: Kromatogram standardnih raztopin BPA in TCS .....	53
Slika 24: Masni spekter BPA (SIM).....	53
Slika 25: Masni spekter TCS (SIM) .....	54

Slika 26: Kvantifikacijski ion za BPA (m/z 357) .....	54
Slika 27: Molekulski ion BPA (m/z 372) .....	55
Slika 28: Fragmentacija TCS.....	55
Slika 29: Kvantifikacijski ion (m/z 347) in potrditveni ion (m/z 200) za TCS .....	56
Slika 30: Določanje prisotnosti BPA in TCS v viali z MSTFA in piridinom .....	57
Slika 31: Določanje prisotnosti BPA in TCS v ekstrakcijskem nosilcu.....	58
Slika 32: Umeritvena premica za BPA.....	59
Slika 33: Umeritvena premica za TCS .....	59

## KAZALO TABEL

Tabela I: Lastnosti BPA .....	4
Tabela II: Lastnosti TCS .....	12
Tabela III: Urinski vzorci .....	27
Tabela IV: Tabela standardnih spojin.....	24
Tabela V: Tabela reagentov in topil .....	24
Tabela VI: Priprava raztopin standardov za validacijo .....	28
Tabela VII: Kromatografski pogoji .....	31
Tabela VIII: Izbrani ioni pri MS detekciji.....	32
Tabela IX: Optimizacija izbora derivatizacijskega topila .....	39
Tabela X: Vpliv pH na učinkovitost ekstrakcije .....	44
Tabela XI: Primerjava elucijskih topil pri nizki koncentraciji .....	48
Tabela XII: Primerjava elucijskih topil pri visoki koncentraciji .....	48
Tabela XIII: Vpliv volumna elucijskega topila na uspešnost elucije .....	49
Tabela XIV: Učinkovitost ekstrakcije .....	51
Tabela XV: LOD in LOQ za vpeljano metodo.....	60
Tabela XVI: Točnost in natančnost .....	61
Tabela XVII: Vrednosti BPA in TCS izmerjene v realnih vzorcih.....	62

## KAZALO ENAČB

Enačba 1: Korelacijski koeficient.....	33
Enačba 2: Enačba za določanje točnosti.....	34
Enačba 3: Enačba za določanje koeficienta variacije.....	35
Enačba 4: Enačba za določanje LOD .....	35
Enačba 5: Enačba za določanje LOQ .....	36
Enačba 6: Izkoristek ekstrakcije za BPA (a) in TCS (b) .....	37

## POVZETEK

Bisfenol A (BPA) in triklosan (TCS) sta spojini, ki ju zelo pogosto najdemo v izdelkih za vsakdanjo uporabo. BPA se zaradi ugodnih lastnosti uporablja predvsem za izdelavo polikarbonatne plastike in epoksidnih smol, TCS pa se zaradi protimikrobnih lastnosti uporablja kot sestavina izdelkov za osebno nego, kot so mila in šamponi. Zaradi izredno široke uporabe smo jima v nizkih koncentracijah izpostavljeni v vsakdanjem življenju. Izkazalo se je, da imajo lahko že zelo nizke koncentracije BPA in TCS vpliv na naše zdravje. BPA deluje kot šibak estrogen in kot tak povzroča motnje v hormonskem ravnovesju. Tudi TCS deluje kot hormonski motilec, povzroča pa tudi odpornost bakterij na antibiotike. Zato je pomembno, da imamo zanesljivo in občutljivo metodo, s katero ju lahko določimo v nizkih koncentracijah, v katerih sta prisotna v bioloških vzorcih.

Glavna naloga diplomskega dela je bila optimizacija in validacija metode za določanje BPA in TCS v urinu, pri čemer smo izhajali iz metode, ki je bila razvita za določanje teh dveh spojin v vodnih vzorcih. Ker sta tako BPA kot tudi TCS v urinu prisotna predvsem v konjugirani obliki, je bil prvi korak dekonjugacija z  $\beta$ -glukuronidazo in sulfatazo. Sledila je ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE). Kot ekstrakcijski nosilec smo uporabili Evolute ABN<sup>TM</sup>. Ekstrakcijo smo izvajali pri nevtralnem pH. Čistost ekstraktov smo zagotovili s spiranjem kolone po nanosu vzorca s 3 mL vode in 6 mL 40 % metanola v vodi. Pri optimizaciji elucije smo izbrali za uporabo 5 mL diklorometana (DCM), saj je uspešno eluiral oba analita. Po ekstrakciji je sledila derivatizacija, kjer smo kot reagent izbrali N-metil(N-trimetilsilil)trifluoroacetamid (MSTFA) v etilacetatu. Vzorce smo nato analizirali s plinsko kromatografijo sklopljeno z masno selektivnim detektorjem (GC-MS).

Sledila je validacija metode. Linarnost smo za BPA potrdili v območju 0,5-50,0 ng/mL, za TCS pa v območju 0,5-250,0 ng/mL. Določili smo mejo detekcije (LOD), ki je za BPA znašala 0,21 ng/mL, za TCS 0,16 ng/mL in mejo kvantifikacije (LOQ). Ta je za BPA znašala 0,70 ng/mL, za TCS pa 0,54 ng/mL. Točnost in natančnost sta bili zadovoljivi pri visokih koncentracijah ( $c_{\text{BPA}}=45$  ng/mL,  $c_{\text{TCS}}=225$  ng/mL), pri nizkih ( $c=1$  ng/mL) pa je prišlo do večjih odstopanj, kar bi pripisali predvsem kontaminaciji vzorcev. Z razvito metodo smo nato analizirali štiri urinske vzorce. Prosti BPA in TCS sta bila pod mejo kvantifikacije metode. Celokupni BPA smo določili v dveh vzorcih, vrednosti sta bili 1,65 ng/mL in 9,45 ng/mL, v dveh vzorcih pa sta bili vrednosti pod LOQ. Celokupni TCS pa smo kvantitativno določili v treh vzorcih, vrednosti so bile med 0,68 ng/mL in 0,97 ng/mL.

Pri razvoju metode je največjo težavo predstavljala kontaminacija vzorcev. V slepih vzorcih smo namreč določili visoke vrednosti BPA in TCS. Težave smo poskusili odpraviti z odštevanjem vrednosti BPA in TCS dobljenih v slepih vzorcih. Ker so le-te varirale, na ta način nismo mogli zadovoljivo rešiti težav, zato sklepamo, da metoda v obstoječi obliki ni primerna za določanje nizkih koncentracij (pod 1 ng/mL) BPA in TCS v urinu. V prihodnje bomo poskušali določiti vir kontaminacije in ga odstraniti, ter uvedli še dodatno čiščenje vzorcev in metodo ponovno validirali.

## ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) and triclosan (TCS) are chemicals found in many everyday products. BPA is primarily used for the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins, while TCS is an antimicrobial agent, added to personal care products like soaps and shampoos. Because of their widespread use, the general population is exposed to low concentrations of these chemicals in daily life. It is apparent that very low levels of BPA and TCS may have a detrimental effect on our health. For example BPA is known to have weak estrogenic effect and, as such can disrupt hormone balance, while TCS is endocrine disrupter. In addition concerns exist that its overuse is adding to the problem of increasing bacterial resistance to antibiotics. As a result it is important to determine these chemicals in low concentrations. Which in turn requires the development of a sensitive and reliable analytical method.

The main task of this work involved method optimization and validation. We began with a method, originally developed for the determination of BPA and TCS in water samples. Since both, BPA and TCS are present predominantly in conjugated form, the analytes were first deconjugated using  $\beta$ -glucuronidase and sulfatase. This was followed by a solid phase extraction step (SPE), to extract analytes from the sample. Optimal conditions for extraction involved using an Evolute ABN<sup>TM</sup> cartridge at neutral pH. The purity of the extracts was further assured by flushing the column with 3 mL of water and 6 mL of 40 % methanol solution in water. Five mL of dichloromethane (DCM) was used to successfully eluted both analytes. Samples were derivatized using N-methyl (N-trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) and ethylacetate as derivatization reagents. BPA and TCS were determined in urine using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The method was validated to confirm its suitability for further analysis of the samples. The linear range of each compound was confirmed: BPA was between 0.5-50.0 ng/mL and TCS was between 0.5-250.0 ng/mL. We determined limit of detection (LOD), which was 0.21 ng/mL for BPA and 0.16 ng/mL for TCS, and limit of quantification (LOQ,  $LOQ_{BPA}=0.70$  ng/mL,  $LOQ_{TCS}=0.54$  ng/mL) Accuracy and reproducibility were acceptable at high concentrations ( $c_{BPA}=45$  ng/mL,  $c_{TCS}=225$  ng/mL), but not satisfactory at low concentrations ( $c=1$ ng/mL), due to sample contamination. Four urine samples were analysed. Free BPA and TCS were below the LOQ. Total BPA was determined in two

samples (1.65 ng/mL and 9.45 ng/mL), while total TCS was quantitatively determined in three of the samples and were between 0.68 ng/mL and 0.97 ng/mL.

During method development, sample contamination remained a major problem. An attempt to overcome this involved subtracting the blank values, but this was only partially successful and in its current form the method remains unsuitable for determining BPA and TCS in ultra low concentrations. In future attempts will be made to minimise the problem of contamination. We will introduce further sample purification and re-validate the method.

## SEZNAM OKRAJŠAV

BPA	bisfenol A
BPA-d16	bisfenol A-d16 (devteriran bisfenol A, s formulo $C_{15}D_{16}O_2$ )
DCM	diklorometan
ECD	detektor na zajetje elektronov (Electron Capture Detector)
ER	estrogenski receptorji
GC	plinska kromatografija (Gas Chromatography)
GC-MS	plinska kromatografija z masno spektrometrijo (Gas Chromatography – Mass Spectrometry)
GIT	gastrointestinalni trakt
HBM	humani biomonitring
IS	interni standard
LC	tekočinska kromatografija (Liquid Chromatography)
LLE	ekstrakcija tekoče-tekoče (Liquid-Liquid Extraction)
LOAEL	najnižji odmerek, pri katerem je opazen škodljivi učinek (Lowest Observed Adverse Effects Level)
LOD	meja zaznave (Limit of Detection)
LOQ	meja kvantifikacije (Limit of Quantification)
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
MSTFA	N-metil(N-trimetilsilil)trifluoroacetamid
NMR	nuklearna magnetna resonanca (Nuclear Magnetic Resonance)
SF	stacionarna faza
PVC	polivinilklorid
SBSE	ekstrakcija na magnetnem mešalu, prevlečenem s plastjo sorbenta (Stir Bar Sorptive Extraction)
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu (Solid Phase Extraction)
SPME	mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (Solid Phase Micro Extraction)
TCS	triklosan
TCS-C13	triklosan-C13 (masno označen triklosan s formulo $^{13}C_{12}H_7Cl_3O_2$ )
VDW	Van der Waalsove interakcije

# 1. UVOD

Z okoljskimi onesnažili, kamor sodita tudi BPA in TCS, smo ljudje vsakodnevno v stiku. Za mnoga izmed njih so potrjeni škodljivi vplivi na zdravje ljudi, do katerih lahko pride že pri zelo nizkih koncentracijah. Zato je pomembno, da imamo na razpolago zanesljive analizne metode, s katerimi jih določamo v nizkih koncentracijah, v katerih so prisotna v okolju in posledično tudi v človeškem telesu. Dolgotrajna izpostavljenost nizkim koncentracijam je pri številnih okoljskih onesnažilih relativno slabo opredeljena, zato se v zadnjem času vse pogosteje izvajajo nadzorne meritve v bioloških vzorcih, t.i. "biomonitoring", s katerimi določamo vsebnost spojin v bioloških vzorcih, na osnovi katere lahko podamo oceno izpostavljenosti izbranim onesnažilom.

## 1.1 Humani "biomonitoring"

Ljudje smo v vsakdanjem življenju izpostavljeni različnim spojinam, ki so bodisi naravno prisotne (v zraku, vodi, zemlji, kot produkt rastlin ali živali) ali pa so posledica človeške dejavnosti (farmacevtski izdelki, izdelki za osebno nego, itd.). Do vnosa snovi v telo pride po treh poteh, in sicer skozi kožo, pljuča in prebavni trakt. Obremenitev človeškega organizma z določeno snovjo je odvisna od fizikalnih in kemijskih lastnosti spojine, časa izpostavljenosti in fizioloških značilnosti posameznika (individualna dovzetnost). Končna obremenitev telesa je rezultat absorpcije, distribucije, metabolizma in eliminacije. Snov se lahko izloči iz telesa z urinom, slino, mlekom in fecesom, lahko pa se tudi skladišči v telesu. Izpostavljenost določenim snovem lahko vodi do neželenih učinkov in pojava različnih bolezni, zato je za te spojine pomembno izvajati nadzorne meritve in posledično zmanjšati izpostavljenost na čim nižjo raven (1).

Običajno okoljske nadzorne meritve obsegajo določanje vsebnosti snovi v okoljskih vzorcih, kot so zrak, zemlja in voda. Ti podatki nam povedo, katere snovi so prisotne v okolju in smo jim potencialno izpostavljeni. Ne dajo pa nam podatkov o dejanski izpostavljenosti, kar nam omogoča humani "biomonitoring" (HBM) (1).

HBM obsega določanje različnih snovi in njihovih presnovkov v krvi, urinu in ostalih bioloških vzorcih z namenom določiti dejansko izpostavljenost okoljskim onesnažilom.

Izboljšave v instrumentalnih analiznih metodah nam omogočajo določanje in kvantifikacijo teh snovi v že zelo nizkih koncentracijah. Razlogi za izvajanje HBM so:

- ugotavljanje glavnih virov okoljskih onesnažil,
- ugotavljanje celokupne izpostavljenosti posameznika določeni snovi (analiza bioloških markerjev izpostavitve omogoča določitev izpostavljenosti iz vseh virov izpostavitve),
- ocenjevanje uspešnosti programov za zmanjševanje izpostavljenosti,
- identifikacija ogroženih skupin,
- ugotavljanje časovnih trendov,
- ugotavljanje povezav med izpostavljenostjo in vplivom na zdravje (1).

Pri HBM analiziramo biološke vzorce, v katerih določamo različne analite. Analit je lahko sama spojina, ki jo iščemo, lahko pa je to njen presnovek ali produkt reakcije z določenimi biološkimi molekulami, kot so npr. proteini. Idealen vzorec mora biti na voljo v zadostni količini za analizo, ne sme predstavljati zdravstvene nevarnosti za darovalca, vsebovati mora količino analita, ki jo lahko zaznamo z izbrano metodo in mora odsevati obremenitev telesa z analitom. Biti mora enostaven za pridobivanje in shranjevanje in uporaben za določanje kateregakoli analita (2). Kri je idealen vzorec za večino spojin, saj je v stiku s celotnim organizmom. Ni pa idealen vzorec za snovi, ki se skladiščijo v telesu. Slabost krvi pa je tudi invaziven postopek pridobivanja. Urin po drugi strani pridobimo na neinvaziven način, njegova glavna slabost pa je variabilnost v volumnu in koncentriranosti. To pomanjkljivost lahko odpravimo z uporabo kreatinina, ki je kazalec nastajanja urina. Izbira primerne tkiva ali telesne tekočine za HBM je odvisna predvsem od kemijskih in fizikalnih lastnosti izbrane snovi. V določenih primerih pa je pomemben tudi čas, ki je minil od zadnje izpostavitve snovi (2). Določene lipofilne molekule, kot so na primer dioksini, se zelo dolgo zadržijo v telesu (meseci ali leta), saj se zaradi lipofilnosti skladiščijo v maščobnem tkivu. V nasprotju z njimi pa imajo hidrofilne molekule, kot so na primer organofosfatni pesticidi, relativno kratek razpolovni čas (ure ali dnevi), saj se hitro metabolizirajo in izločijo z urinom. Snovi, ki se dlje časa zadržijo v telesu, običajno določamo v krvi, snovi, ki pa se hitro metabolizirajo in izločijo, običajno določamo v urinu, in sicer čim hitreje po izpostavitvi (1).

## 1.2 Urin kot biološki material

Urin je tekočina, ki nastane s filtracijo plazme skozi glomerulne kapilare. V glomerulnem filtratu najdemo podobno sestavo soli in organskih molekul kot v plazmi. Izjema so proteini in krvne celice, ki se zaradi svoje velikosti ne morejo filtrirati skozi glomerulno membrano, ter tudi določene manjše organske molekule in soli, ki se v plazmi prenašajo vezane na proteine. vzdolž nefrona nato potekajo procesi tubulne reabsorpcije in tubulne sekrecije. V urin pridejo le snovi, ki se po glomerulni filtraciji ne reabsorbirajo v tubulih, oziroma tja pridejo preko sekrecije iz peritubularnih kapilar. Pri zdravem človeku končni urin vsebuje topljence, ki jih telo ne potrebuje, raztopljene v volumnu vode, ki ga telo ne potrebuje. Topljenci, ki so prisotni v urinu, so ioni ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}^+$ ,...), produkti presnove, kot so sečnina, sečna kislina in kreatinin, v urinu pa so prisotne tudi tuje snovi, ki jih vnesemo v telo, kot so na primer zdravila, pesticidi in snovi vnesene s hrano. V urinu zdravih ljudi lahko najdemo tudi manjše količine proteinov (80-100 mg/dan), predvsem globulinov z manjšo molekulsko maso (3). Dobra lastnost urina je, da je dosegljiv v večjih količinah. Kot ultrafiltrat plazme je odličen pokazatelj homeostaze organizma v celoti in presnovnih procesov (4).

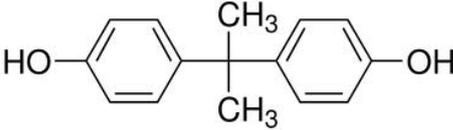
## 1.3 Bisfenol A

### 1.3.1 Lastnosti bisfenola A

BPA, njegovo IUPAC ime je 4,4'-dihidroksi-2,2-difenilpropan, so prvič sintetizirali leta 1905 s kondenzacijo fenola in acetona ob prisotnosti kisline kot katalizatorja (5). Je bela, trdna snov, prisotna v obliki kristalov ali kosmičev, s tališčem pri 155 °C in specifično gostoto  $1,060 \times 10^3$ - $1,195 \times 10^3$  g/L. Je zmerno hidrofobna spojina (porazdelitveni koeficient oktanol-voda [ $K_{ow}$ ] je  $10^{3,4}$ ), ki pa zaradi hidroksilnih skupin izkazuje tudi polaren značaj. BPA je zelo topen v etanolu, benzenu in dietil etru, topen je v očetni kislini, v vodi pa je zelo težko topen (0,3 g/L pri 25 °C). Ima relativno visoko vrelišče (398 °C pri 101,3 kPa) in nizek parni tlak ( $5,3 \times 10^{-6}$  Pa pri 25 °C), zato je njegova koncentracija v zraku zelo nizka.  $pK_a$  vrednosti BPA, ki jih različni avtorji navajajo v literaturi, se gibljejo v območju med 9,6 in 11,3. To pomeni, da je v tekočih medijih s pH nižjim od 7 prisoten večinoma v neionizirani obliki (6).

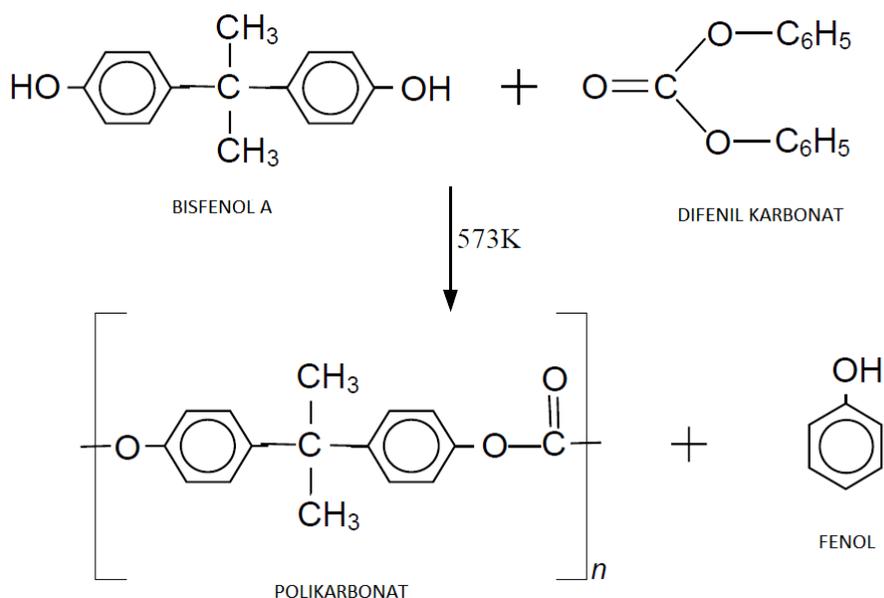
Čeprav je BPA v trdni obliki stabilen, je v okolju neobstoje. V vodi in zemlji je glavni način njegove odstranitve aerobna biodegradacija z razpolovnim časom približno 4,5 dni (6). Lastnosti BPA prikazuje tabela I (6).

Tabela I: Lastnosti BPA

LASTNOST	VREDNOST
Kemijska struktura	
IUPAC ime	4,4'-dihidroksi-2,2-difenilpropan
Formula	$C_{15}H_{16}O_2$
Molekulska masa	228,29 g/mol
Tališče	155 °C
Vrelišče	398 °C pri 101,3 kPa
Specifična gostota	$1,060 \times 10^3 - 1,195 \times 10^3$ g/L
Topnost v vodi	0,3 g/L, pri 25 °C
log $K_{ow}$	3,4
p $K_a$	9,6-11,3

### 1.3.2 Viri bisfenola A

BPA je monomer, ki se uporablja za proizvodnjo polikarbonatne plastike in epoksidnih smol. V letu 2009 se je za ta namen porabilo več kot 95 % svetovne porabe BPA (7). Polikarbonati nastanejo pri reakciji med BPA in difenil karbonatom ali fosgenom, kar prikazuje slika 1 (4). Za proizvodnjo epoksidnih smol pa uporabljajo reakcijo med BPA in epiklorhidrinom (6).



Slika 1: Sinteza BPA polikarbonata (Povzeto po 4)

BPA se v manjši meri uporablja kot material pri sintezi fenolnih smol, poliakrilatov in poliestrov. Derivati BPA se uporabljajo kot aditivi v polivinilkloridu (PVC), kjer so inhibitorji polimerizacije, ter kot antioksidanti v lepilu, plastiki in črnilu (4, 7).

Materiali, ki vsebujejo BPA, se uporabljajo za izdelavo številnih izdelkov. Polikarbonatna plastika se zaradi ugodnih lastnosti, kot so visoka stisljivost, trdnost, temperaturna odpornost na temperature od  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $145\text{ }^{\circ}\text{C}$ , transparentnost in odpornost na mnoge kisline ter olja, zelo pogosto uporablja. Najdemo jo v plastenkah za vodo, posodah za shranjevanje hrane, lečah za očala, zobnih zalivkah in številnih drugih izdelkih (4, 8). Epoksidne smole se uporabljajo kot prevleka na notranji strani pločevink za hrano in pijačo, prevleka na kovinskih posodah in prevleka za PVC cevi (9).

Zaradi vse večje porabe izdelkov, ki vsebujejo polikarbonatno plastiko in epoksidne smole, se je povečala tudi izpostavljenost ljudi BPA. V študiji, izvedeni na 394 odraslih ljudeh, so v 95 % dokazali prisotnost BPA v urinu v koncentraciji nad  $0,1\text{ }\mu\text{g/L}$ , geometrična sredina pa je bila  $1,33\text{ }\mu\text{g/L}$  (10). BPA v telo vnesemo predvsem z vodo in hrano, ki je onesnažena z BPA (9, 11).

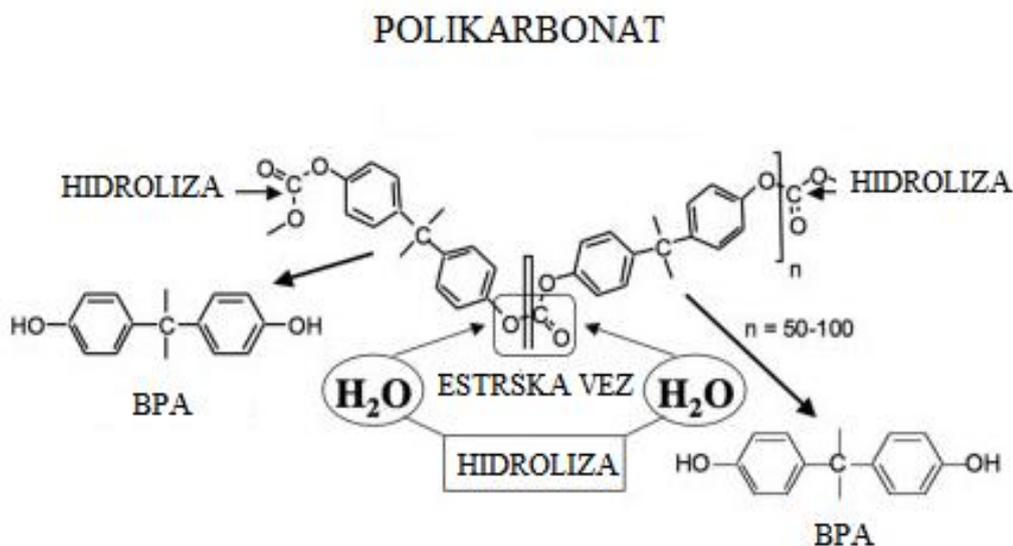
### Onesnaženost okolja z BPA

BPA pogosto najdemo v industrijskih odpadnih vodah. Odpadna voda, ki vsebuje BPA, je vir onesnaženja za vodne organizme. V rečni vodi pride ob aerobnih pogojih do

biodegradacije BPA z bakterijami, njegov razpolovni čas v rekah je od 3-5 dni. V morski vodi pa je BPA obstojen dlje, saj zaradi manjšega števila bakterij v morski vodi ne pride do njegove biodegradacije. Zato je tudi vsebnost BPA višja v morskih organizmih, kot pa v sladkovodnih. Razpolovni čas v vodi je dovolj dolg, da ima lahko vpliv na vodne organizme. Z BPA pa je lahko onesnažena tudi zemlja. Onesnaženje je največje v industrijskih in gosto poseljenih predelih. Poglavitni vir onesnaženja zemlje so namreč odpadki (11).

### Vnos BPA s hrano

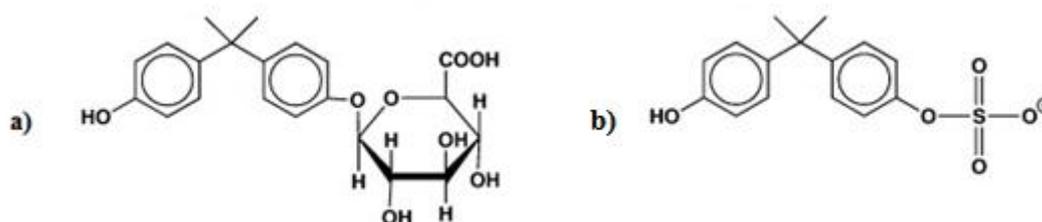
BPA je v hrani večinoma prisoten zaradi prehajanja iz vsebnikov premazanih z BPA smolami (pločevinke za hrano, ipd.). Glavna dejavnika, ki vplivata na prehajanje BPA iz vsebnikov premazano z epoksidnimi smolami, sta čas segrevanja in temperatura, uporabljena v proizvodnem procesu. Če je temperatura pri proizvodnji vsebnika nizka, pride do nepopolne polimerizacije in del prostega BPA ostane na površini, kar povzroči sproščanje iz vsebnikov med shranjevanjem. Na prehajanje lahko vpliva tudi čas shranjevanja v vsebniku. BPA, ki prehaja iz vsebnika, se lahko med shranjevanjem kopiči v konzervirani hrani. Pri vsebnikih iz polikarbonatne plastike pa lahko pride do hidrolize estrske vezi, ki se pojavi predvsem v vroči vodi ali ob alkalnem pH (11, 12). Reakcijo hidrolize polikarbonata prikazuje slika 2 (13).



Slika 2: Shematski prikaz reakcije hidrolize polikarbonata (Povzeto po 13)

### 1.3.3 Toksikokinetika bisfenola A

Völkel in sodelavci (14) so raziskovali metabolizem in kinetiko BPA pri ljudeh po peroralnem zaužitju. V poskusu so posamezniki zaužili 5 mg BPA-d16, ki v naravi ali v plastiki ni prisoten, nato pa so spremljali njegovo kinetiko. BPA-d16 in njegove presnovke so določali v urinu in plazmi. Po zaužitju manjših odmerkov se BPA hitro absorbira iz gastrointestinalnega trakta (GIT). V jetrih poteče učinkovit metabolizem prvega prehoda. Polarni konjugati, ki nastanejo, se z urinom hitro izločijo iz telesa. Izločanje BPA iz telesa je končano v 24-ih urah po zaužitju. BPA-glukuronid je glavni presnovek, ki nastane v telesu (17). V študiji, kjer so določali posamezne metabolite, so v urinu določili 9,5 % proste oblike BPA, 21 % BPA je bilo v obliki sulfata, 69,5 % BPA pa v obliki glukuronida (17). Formuli glukuronida in sulfata prikazuje slika 3 (15). Pri izločanju BPA iz telesa obstajajo razlike med človekom in živalmi. Pri podganah je BPA podvržen enterohepatičnemu kroženju, kar povzroči daljše zadrževanje BPA v telesu in višje koncentracije prostega BPA v krvi. Pri ljudeh pa enterohepatični cikel ne poteče. Vzrok za to je velikost glukuronida, ki je 404 Da. To je nad pragom za izločanje BPA pri podganah (350 Da), zato pri njih lahko poteče izločanje BPA v žolč, pri ljudeh pa je pod pragom za izločanje v žolč (550 Da). Pri ljudeh gre glukuronid, ki nastane v jetrih, v kri in se potem zaradi visoke topnosti v vodi hitro izloči z urinom (14).



Slika 3: BPA glukuronid (a) in BPA sulfat (b) (Povzeto po 15)

Glukuronidacijo BPA omogočajo jetrne UDP-glukuronoziltransferaze, predvsem izooblika UGT2B1 (16). Matsumoto je s sodelavci (18) v raziskavi ugotovil, da se pri podganah aktivnost tega izoenzima zmanjša med brejostjo. Prav tako je ta encim odsoten pri plodu, pojavi pa se po rojstvu. Zaradi zmanjšane očistka in povečanega razpolovnega časa, se

lahko pri nosečnicah, plodu in novorojenčku pojavijo višje koncentracije prostega BPA v krvi (18).

#### **1.3.4 Toksikodinamika bisfenola A**

Leta 1993 so Krishnan in sodelavci (19) preučevali, ali kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* proizvaja estrogene. Kot medij za gojenje so uporabili destilirano vodo, katero so avtoklavirali v polikarbonatni plastiki. Medij je kazal prisotnost snovi, ki je tekmovala z estrogenom za vezavo na estrogenske receptorje (ER). Odkrili so, da snov z estrogenimi učinki prihaja iz polikarbonatne plastike, z NMR in MS pa potrdili, da je ta snov BPA (19). Večina nadaljnjih študij se je osredotočila na estrogensko aktivnost BPA. V ospredju raziskav so bili predvsem estrogenni učinki BPA na razvoj zarodka, plodnost in karcinogenezo. Leta 1998 so preverjali delovanje BPA na ženski reproduktivni trakt. V študijah so dokazali, da so morfološke spremembe v maternici in nožnici, ki jih povzroči BPA, skoraj identične spremembam, ki jih povzroči estradiol ter, da je ponavljajoča se izpostavljenost nizkim koncentracijam BPA dovolj za estrogeno delovanje (20). BPA lahko izkazuje estrogene učinke že v koncentracijah od  $0,2-2 \times 10^{-2} \mu\text{g/L}$  (21).

V toksikoloških študijah na podganah so določili najnižji odmerek, ki povzroča pojav neželenih učinkov (LOAEL). Ta za BPA znaša 50 mg/kg telesne teže/dan. Pri določanju še varnih mej izpostavljenosti so LOAEL delili z varnostnim faktorjem 1000 in predlagali kot varno količino vnosa BPA 50  $\mu\text{g/kg}$  telesne teže/dan. V številnih poznejših študijah so dokazali učinke, ki se pojavijo že pod predvideno varno oziroma referenčno mejo. Do neželenih učinkov na endokrini sistem naj bi prišlo že v odmerkih od 0,025-0,2  $\mu\text{g/kg/dan}$  (11, 13). Zato je treba ponovno ovrednotiti referenčne vrednosti, ki bodo upoštevale tudi učinke BPA v nizkih odmerkih (23, 25).

BPA se veže na ER $\alpha$  in ER $\beta$  receptorje, njegova vezavna afiniteta pa je 10.000-100.000-krat manjša od estradiola (13). Iz tega bi sklepali, da lahko posnema ali tekmuje z estradiolom le v koncentracijah nad 200  $\mu\text{g/L}$ . BPA pa izkazuje estrogeno aktivnost, podobno kot estradiol, že pri 1000-krat nižjih koncentracijah. Za to je podanih veliko razlag. Poleg jedrnih ER obstajajo tudi membranski ER (mER) in transmembranski, ki so sklopljeni z G proteinom 30. BPA se lahko veže na vse tri tipe receptorjev, vezava na mER pa lahko povzroči negenomsko steroidno delovanje. Možna razlaga je tudi ta, da se BPA na drugačen način veže na klasične ER kot pa estradiol, opazili pa so tudi razlike v transkripcijskih ko-regulatorjih (13, 23). BPA deluje tudi na receptorje za ščitnične

hormone, kjer ima antagonistično delovanje in s tem prepreči vezavo in delovanje trijodtironina (T3). Ima tudi antagonistično delovanje na androgene receptorje in je inhibitor aromataze. Zadnje raziskave pa nakazujejo, da ima BPA sposobnost vezave na glukokortikoidni receptor, kjer deluje kot agonist. BPA ima torej potencial za delovanje na številne endokrine poti v telesu (12, 23).

BPA je najbolj škodljiv za plod, dojenčke in majhne otroke. BPA lahko prehaja placento, dokazali pa so tudi njegovo akumulacijo v placenti (11). Stik z BPA v tem obdobju lahko vodi do ireverzibilnih sprememb, ki se lahko izrazijo s časovnim zamikom. Učinki, ki se lahko pojavijo zaradi izpostavitve BPA med razvojem zarodka in v otroštvu, so zakasnel čas pubertete, spremembe v prostati, spremembe v maternici in jajčnikih, spremembe v obnašanju, povečana agresivnost in še mnogi drugi (23). Zaradi povečane občutljivosti dojenčkov na BPA je Evropska unija januarja 2011 sprejela odlok, s katerim je prepovedala uporabo otroških plastenk, ki vsebujejo BPA (27). Pri odraslih so povišane koncentracije BPA povezane s številnimi boleznimi, kot so diabetes, debelost in kardiovaskularna obolenja (22). Pri ženskah BPA veča verjetnost za prezgodnji porod in spontan splav, pri moških pa je povezan s poškodbami spermalne DNA in zmanjšano kakovostjo semena (23).

Pri delavcih, ki so v stiku s produkti, ki temeljijo na BPA, kot so na primer delavci v proizvodnji plastike ali delavci, ki so v stiku z epoksidnimi smolami, lahko pride do alergijskega kontaktnega dermatitisa. Kožni simptomi, ki jih povzročajo izpostavitve BPA ali njegovim produktom se pojavijo na rokah, lahko pa tudi na drugih delih telesa, kot na primer na glavi (11).

### **1.3.5 Določanje bisfenola A**

BPA lahko določamo v različnih vzorcih. Ne glede na naravo vzorca je princip določanja podoben. V bioloških vzorcih je BPA večinoma v konjugirani obliki (14). Če želimo določiti celokupen BPA, je prvi korak dekonjugacija. V določenih študijah so za dekonjugacijo uporabili le  $\beta$ -glukuronidazo (24), v določenih pa glukuronidazo in sulfatazo (17, 32). Pogosto so uporabili  $\beta$ -glukuronidazo iz vrste *Helix Pomatia*. V pripravku, ki ga pridobijo iz prebavnega soka polža, so poleg glukuronidaz prisotne tudi sulfataze, zato izkazuje glukuronidazno in arilsulfatazno aktivnost (14, 26).

Sledi priprava vzorca, katere cilj je, da izoliramo iskani analit iz vzorca in ga koncentriramo, tako da ga lahko izbran analitski sistem zazna. Pravilna priprava

vzorca lahko znatno izboljša LOD in LOQ za naš analit. Tehnika priprave vzorca, ki jo uporabimo, mora biti točna, ponovljiva, enostavna, varna, poceni in časovno sprejemljiva (30). Najpogosteje pri izolaciji BPA iz vzorca uporabljamo ekstrakcijske tehnike, in sicer ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) ali ekstrakcijo tekoče-tekoče (LLE). Možna je tudi uporaba številnih drugih ekstrakcijskih tehnik, kot je na primer mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (SPME) ali ekstrakcija na magnetnem mešalu, prevlečenem s plastjo sorbenta (SBSE). Te tehnike imajo določene prednosti, kot so na primer manj dela, manj potrebnega topila in posledično tudi manjše onesnaženje. Izbira metode za pripravo vzorca pa običajno temelji na tem, katero instrumentalno metodo smo izbrali za analizo ter od zahtevane hitrosti in točnosti (9, 28, 29, 30, 31). Pri določanju BPA v hrani moramo vzorce obdelati že pred postopkom ekstrakcije. Trdne vzorce običajno homogeniziramo, tekoče pa filtriramo in centrifugiramo. Glede na sestavo matrice pa so pogosto potrebni še dodatni koraki. Pri vzorcih z visoko vsebnostjo proteinov moramo le te odstraniti, kar lahko storimo s precipitacijo (9).

Nato običajno izvedemo derivatizacijo. Le ta je potrebna predvsem pri analizi BPA z GC, saj BPA ni dovolj hlapen, z derivatizacijo pa povečamo hlapnost BPA in posledično izboljšamo občutljivost instrumentalne metode. Običajno derivatizacija poteče na hidroksilnih skupinah BPA, najpogostejši metodi sta esterifikacija in siliranje (31). Kot reagent za esterifikacijo v literaturi pogosto navajajo pentafluorobenzoilklorid (32), za siliranje pa N-metil(N-trimetilsilil)trifluoroacetamid (MSTFA) (33), N,O bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA) (24) ter kombinacijo trimetilklorosilana (TMCS) in BSTFA (34). Siliranje je metoda, ki jo pogosto uporabljamo, predvsem kadar imajo molekule, ki jih želimo derivatizirati, v svoji strukturi aktivne vodikove atome v funkcionalnih skupinah kot so -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH in -COOH. Derivat ima običajno zmanjšano polarnost (manj dipol-dipol interakcij), povečano hlapnost ter termično stabilnost, ki je potrebna za optimalno občutljivost in ločljivost komponent v zmesi s plinsko kromatografijo (GC). Učinkovitost derivatizacije je odvisna od številnih dejavnikov, kot so temperatura in čas reakcije, lastnosti derivatizacijskega sredstva in topila (35).

Sledi instrumentalna analiza, kjer uporabljamo številne metode. Za analizo bioloških vzorcev najpogosteje uporabljamo GC sklopljeno z masno spektrometrijo (MS ali MS/MS). Druga možnost je uporaba tekočinske kromatografije (LC) sklopljene z ultravijoličnim detektorjem (UV), fluorescenčnim detektorjem (FLD) ali masno

spektrometrijo (MS ali MS/MS). Prednost MS pred ostalimi metodami detekcije je ta, da omogoča tudi identifikacijo spojin. GC izkazuje določene prednosti pred LC, kot so na primer večja separacijska učinkovitost in manj težav povezanih z učinkom matrice. Pri kompleksnih bioloških matricah omogoča GC-MS analiza boljšo občutljivost in nižje LOD. Glavna slabost GC v primerjavi z LC pa je nujnost derivatizacije slabo hlapnih spojin pred samo analizo. Dodaten korak v analizi poveča možnost kontaminacije in tudi podaljša čas analize (28). V nekaterih novejših raziskavah so uporabili imunokemijske metode detekcije, kot je na primer ELISA. A sama molekula BPA je premajhna, da bi povzročila imunski odgovor, zato jo moramo prej konjugirati s proteinom, da tvori popoln antigen (28, 30, 31).

Analiza BPA v hrani zahteva uporabo visoko občutljivih in selektivnih tehnik. Glavne metode za določanje BPA v hrani so LC/FLD (LOD v območju 0,1-2 ng/mL in 1-5 ng/g), LC/MS (LOD v območju 0,7-43 ng/g) in GC/MS (LOD v območju 0,4-2 ng/g) (9). Pri okoljskih vzorcih se najpogosteje uporabljata GC-MS in HPLC-MS (LOD v območju nekaj ng/L). Možna je tudi uporaba HPLC-FLD, ki pa ima slabšo LOD (v območju 5-50 ng/mL) (30).

Pri določanju nizkih koncentracij BPA predstavlja velik problem kontaminacija. Viri kontaminacije v laboratoriju so lahko plastični ekstrakcijski nosilci, injekcijske brizge, steklovina, uporabljena topila in voda (36). Pri laboratorijskem delu je najbolje uporabljati plastiko, ki ne vsebuje BPA, to je polistirenska in polipropilenska plastika. A tudi ta ni povsem varna, saj pogosto pride do kontaminacije z BPA med samim proizvodnim procesom. Priporočljiva je uporaba stekla. Glavna slabost pri steklu pa je adsorpcija BPA na stekleno površino, kjer lahko pride do tvorbe vodikovih vezi med hidroksilnimi skupinami v BPA in silanolnimi skupinami stekla. To lahko predstavlja nihanja predvsem pri zelo nizkih koncentracijah BPA (37). Zaradi široke uporabe produktov, ki vsebujejo BPA je težko določiti, ali izmerjene koncentracije prostega BPA odražajo resnično izpostavljenost BPA ali pa so posledica kontaminacije vzorca. Völkel je s sodelavci (26) izvedel raziskavo, v kateri je oseba zaužila 5 µg BPA in 5 µg BPA-d16. V urinu so zaznali le prosti BPA, prostega BPA-d16 pa ne. To nakazuje na možnost kontaminacije vzorcev z BPA. Do kontaminacije lahko pride že med vzorčenjem. V isti raziskavi so namreč določali tudi količino BPA v hišnem prahu. Povprečna koncentracija, ki so jo določili, je bila 553 µg/kg prahu. Kontaminaciji z BPA se je torej zelo težko v popolnosti izogniti. Da bi zmanjšali tveganje kontaminacije, pa je potrebno upoštevati naslednje ukrepe (38):

- izogibati se je potrebno uporabi plastičnih materialov,
- steklovina mora biti pravilno očiščena in deaktivirana,
- v vsaki seriji vzorcev je potrebno analizirati tudi slepe vzorce,
- samo eno injiciranje vzorca lahko opravimo iz iste viale.

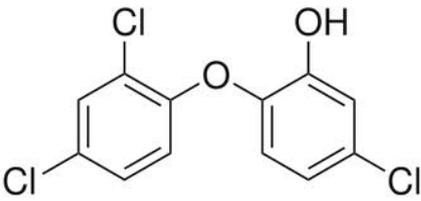
## 1.4 Triklosan

### 1.4.1 Lastnosti triklosana

Triklosan, 2,4,4'-trikloro-2'-hidroksi-difenil eter, je neionska, širokospektralna, protimikrobna učinkovina, ki se uporablja kot antiseptik in razkužilo v številnih produktih (39). TCS je relativno nehlapen, njegova topnost pa je 0,01 g/L. Ker je pKa TCS blizu pH večine okoljskih voda, je lahko znaten delež TCS v ionizirani obliki. TCS je odporen na hidrolizo v pH območju od 4-9. V vodi je TCS podvržen fotolizi z razpolovnim časom 41 minut. Potek fotolize je odvisen od pH vrednosti vode in prisotnosti drugih topljencev, kot so na primer kovinski ioni. Poteče lahko fotoinducirana hidroliza eterske vezi, kar vodi do nastanka 2,4-diklorofenola ter 3-klorofenola (40, 41, 42, 43). V vodi, predvsem pri višjih pH vrednostih, lahko pride do redukativne ciklizacije. Pri tem nastane 2,8-diklorodibenzo-p-dioksin (44).

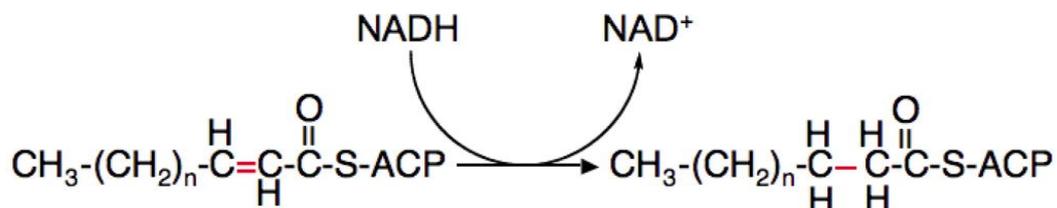
Fizikalno-kemijske lastnosti TCS prikazuje tabela II (43).

Tabela II: Lastnosti TCS

LASTNOST	VREDNOST
Kemijska struktura	
IUPAC ime	2,4,4'-trikloro-2'-hidroksi-difenil eter
Formula	$C_{12}H_7Cl_3O_2$
Molekulska masa	289,54
Tališče	55-57 °C
Vrelišče	120 °C

Specifična gostota	1550 g/L pri 22 °C
Topnost v vodi	0,01 g/L
log K <sub>ow</sub>	4,8
pK <sub>a</sub>	7,9

Mehanizem protimikrobnega delovanja TCS je inhibicija sinteze maščobnih kislin pri bakterijah. TCS je inhibitor enoil reduktaze, encima, ki sodeluje pri sintezi maščobnih kislin. Enoil reduktaza katalizira zadnjo stopnjo v elongacijskem ciklu sinteze maščobnih kislin. Omogoča redukcijo enoil tioestra, kar prikazuje slika 4 (46). Maščobne kisline so nujne za gradnjo celičnih membran in reprodukcijo bakterij. V nizkih odmerkih ima bakteriostatično delovanje, pri višjih pa baktericidno. Pri nizkih odmerkih je glavni način delovanja preko inhibicije enoil reduktaze, pri višjih odmerkih pa deluje na več različnih tarč, med drugim tudi na celično membrano. Deluje na širok spekter bakterij, večjo učinkovitost pa kaže pri Gram pozitivnih bakterijah (43).



Slika 4: Redukcija tioestra do acilne oblike ob prisotnosti katalizatorja enoil reduktaze

#### 1.4.2 Viri triklosana

TCS se zaradi svoje protimikrobne aktivnosti zelo široko uporablja v izdelkih za osebno nego kot so zobne kreme, ustne vodice, mila in dezodoranti (39). Izdelki za osebno nego so glavni vir izpostavitve, najdemo pa ga tudi v drugih virih, kot so kozmetika, plastični materiali, igrače, zaradi visoke lipofilnosti pa ga najdemo tudi v maščevju oziroma v mastni hrani (48). V kozmetičnih izdelkih je njegova koncentracija omejena na največ 0,3 % (m/m) (45). Zaradi široke uporabnosti in lipofilnosti je TCS prisoten v človeškem telesu in okolju (47). S TCS so onesnaženi predvsem vodni viri. TCS so določili v odpadnih vodah, površinskih vodah, pitni vodi, usedlinah in tudi v vodnih organizmih. Glavni način

odstranjevanja TCS iz vode je fotodegradacija (43). TCS pride v vodno okolje predvsem preko odpadnih vod iz gospodinjstev (51). Čistilne naprave uspejo iz vode odstraniti od 72 do 93 % TCS, večinoma z biološko razgradnjo in adsorpcijo. Sledovi TCS pa so še vedno prisotni v iztokih odpadnih vod v koncentracijskem območju ng/L. V koncentracijah, v katerih je prisoten v odpadnih vodah, ima lahko škodljiv vpliv na določene organizme, kot so npr. alge (50).

### **1.4.3 Toksikokinetika triklosana**

Zaradi široke uporabe izdelkov, ki vsebujejo TCS, ima le-ta velike možnosti vstopa v naše telo. Do vnosa v telo najpogosteje pride zaradi uporabe izdelkov za osebno nego (absorpcija skozi kožo ali sluznice), možen pa je tudi vnos s kontaminirano hrano in vodo (43). TCS so dokazali v različnih bioloških vzorcih, kot so kri, urin in materino mleko. Pri uporabi izdelkov za zobno nego se TCS absorbira skozi sluznico ustne votline in skozi GIT (48). Pri peroralni aplikaciji poteče hitra in popolna absorpcija iz GIT. Dermalna absorpcija je odvisna od formulacije, v kateri je TCS. Moss je s sodelavci (53) preučeval dermalno absorpcijo TCS in ugotovil, da po nanosu alkoholne raztopine TCS na kožo, v sistemski krvni obtok preide 6,3 % odmerka, do metabolizma pa pride že v koži (53). Po absorpciji iz GIT v jetrih poteče obsežen metabolizem prvega reda. Razpolovni čas TCS v telesu po peroralnem zaužitju je 13-29 ur. Glavna pot metabolizma je konjugacija z glukuronsko kislino in sulfatom. Konjugati se nato v največji meri izločijo z urinom, manjši delež pa se izloči tudi z blatom (43).

Pri doječih materah TCS prehaja iz plazme v materino mleko. Koncentracije v mleku so značilno nižje kot v plazmi. Razmerje v koncentraciji TCS med mlekom in plazmo je okoli 0,25. Vzrok za to je, da je 70 % TCS v plazmi v konjugirani obliki in kot tak ne more prehajati v materino mleko. Preko materinega mleka so TCS izpostavljeni tudi dojenčki (48).

### **1.4.4 Toksikodinamika triklosana**

TCS ni akutno toksičen za sesalce, a *in vitro* študije kažejo, da lahko vpliva na metabolični sistem in hormonsko ravnovesje (47). TCS izkazuje intrinzično estrogeno in androgenu aktivnost. Estrogene učinke izkazuje z izpodrivanjem estradiola z ER. Androgensko aktivnost pa doseže z izpodrivanjem testosterona pri vezavi na androgeni receptor (43). TCS ima vpliv tudi na ščitnični sistem. Študije na podganah so pokazale, da lahko zaradi

strukturne podobnosti s ščitničnimi hormoni zmanjša njihovo koncentracijo v plazmi, odnos pa je odvisen od odmerka (52). Pri ljudeh so v klinični študiji, ki je trajala 4 leta, spremljali vpliv uporabe zobne kreme z 0,3 % koncentracijo TCS na ščitnične hormone. Po primerjavi rezultatov s placebo skupino so ugotovili, da uporaba zobne kreme s TCS skozi daljše obdobje ne vpliva na raven ščitničnih hormonov (49).

Glavna zaskrbljenost pri uporabi produktov s TCS je ta, da lahko zaradi onesnaženosti okolja s TCS pride do pojava odpornih sevov bakterij, ki so odporne na TCS in preko mehanizma ko-rezistence tudi na antibiotike. Možnih vzrokov za razvoj odpornosti na TCS je več. Določene bakterije lahko razvijejo odpornost zaradi mutacije gena *fabI*, kar zmanjša učinek TCS na enoil transferazo. Najbolj razširjen mehanizem rezistence pa je aktivno izločanje TCS iz bakterijske celice (66). Do rezistence lahko pride tudi zaradi sprememb v celični steni. Največjo zaskrbljenost pa povzročajo novejša poročila o možnostih genetske povezave med geni za odpornost na antibiotike in geni za odpornost na biocide. Dokazano je bilo, da so sevi bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki so bili izpostavljeni TCS, sočasno razvili odpornost na različne antibiotike, kot je npr. ciprofloksacin (70).

#### **1.4.5 Določanje triklosana**

V literaturi lahko najdemo različne metode za določanje TCS (39, 69). TCS v HBM določamo v zelo nizkih koncentracijah, zato potrebujemo za določanje selektivno in občutljivo metodo. Najpogosteje za določanje uporabljamo LC in GC, sklopljeni z različnimi detektorji. Ker GC zahteva derivatizacijo, ki pomeni dodaten korak v sami analizi, so LC sprejeli za prednostno metodo pri dokazovanju TCS v različnih vzorcih (47). TCS so v raziskavah dokazovali v vodah (s tem so preverjali obremenjenost okolja s TCS), v bioloških vzorcih (preverjali so obremenjenost ljudi s TCS) in v različnih kozmetičnih proizvodih, ki vsebujejo TCS (47).

Pred instrumentalno analizo moramo vzorec ustrezno pripraviti. V čim večji meri moramo odstraniti nečistoče, ki bi lahko motile instrumentalno analizo, analit pa moramo tudi koncentrirati, da ga lahko izbrani analitski sistem zaznava. To najpogosteje storimo z ekstrakcijskimi metodami. Še vedno pri pripravi vzorca prevladujeta SPE in LLE, v zadnjem času pa vse več uporabljamo novejše metode, kot sta SPME in SBSE. Prednosti SPME so enostavnost, velika selektivnost in visoka občutljivost, prednost SBSE je prav tako visoka občutljivost, uporablja pa se za ekstrakcijo analitov iz vodnih vzorcev (39).

V literaturi so na voljo podatki za analizo bioloških vzorcev z LC/MS, GC/ECD in GC/MS (69). V vodnih vzorcih so analizo izvajali s HPLC, LC/MS, GC/MS in GC/EC (69). Na splošno so v kozmetičnih izdelkih prisotne bistveno višje koncentracije TCS kot pa v bioloških ali vodnih vzorcih, zato lahko uporabimo metodo z nižjo občutljivostjo. Tu se za določanje TCS in ostalih konzervansov najpogosteje uporablja reverzna fazna HPLC/UV ali HPLC/MS (39).

## 1.5 Analizna metoda

Ko oblikujemo analizno metodo za analizo vzorca, si ponavadi postavimo naslednja vprašanja:

1. Kakšno natančnost želimo?
2. Koliko vzorca imamo na voljo?
3. V kakšnem koncentracijskem območju je naš analit?
4. Katere komponente vzorca lahko povzročajo interference?
5. Kakšne so fizikalne in kemijske lastnosti matrice vzorca?
6. Kolikšno bo število vzorcev, ki jih bomo analizirali?

Odgovor na prvo vprašanje je pomemben, saj določa čas potreben za analizo vzorcev. Odgovora na drugo in tretje vprašanje določata, kako občutljiva mora biti analizna metoda in kako široko koncentracijsko območje mora pokrivati. Odgovor na četrto vprašanje določa selektivnostne zahteve metode. Odgovor na peto vprašanje je pomemben, ker določene metode lažje apliciramo na raztopine, druge pa na plinske ali trdne vzorce. Število vzorcev, ki jih želimo analizirati (šesto vprašanje) je pomembno predvsem iz ekonomskega vidika. Če je število vzorcev veliko, je smotrno dobršen del časa in denarja nameniti za instrumente, razvoj metode in kalibracijo. Prav tako je v takšnih primerih pomembno, da izberemo metodo, ki bo zahtevala najmanj operatorjevega dela za analizo posameznega vzorca. Če pa moramo analizirati manjše število vzorcev, je boljše izbrati enostavno metodo, ki zahteva malo priprave vzorca (61). Razvoj celotne analizne metode vključuje veliko število korakov-od zbiranja vzorcev do končnega poročila. Vmesne stopnje vključujejo shranjevanje vzorcev, pripravo vzorcev, izolacijo analita, identifikacijo in kvantifikacijo. Na koncu sledi še validacija analizne metode, s katero potrdimo primernost metode za izbrano nalogo.

### 1.5.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu

SPE je pogosto izbrana ekstrakcijska metoda za ekstrakcijo izbranih analitov iz različnih matric. SPE je tehnika, ki loči izbrani analit od matrice vzorca glede na njegovo afiniteto do sorbenta. Uporabna je tako za čiščenje vzorca, kot tudi za koncentriranje iskanega analita v vzorcu (54). Prednosti SPE so, da je večnamenska, hitra, preprosta in v nasprotju LLE zahteva manj topila. Sorbenti so lahko polnjeni v kolone, izdelani v diske ali vstavljeni v plastične pipetne nastavke. Pri uporabi prevladujejo nosilci iz polipropilena, ki so polnjeni z manjšo količino sorbenta (25-500 mg). Sorbent običajno zavzema le spodnji del ekstrakcijskega nosilca in s tem pušča prostor za nanos vzorca, spiranje in elucijo (55). Izbira primerne sorbenta za SPE temelji na razumevanju mehanizma interakcij med sorbentom in analitom. Poznati moramo hidrofobne, polarne in ionske lastnosti analita in sorbenta, saj lahko le tako predpostavimo interakcije, ki se bodo vzpostavile med njima. Najpogostejši retencijski mehanizmi pri SPE temeljijo na vzpostavitvi van der Waalsovih sil (VDW) (nepolarna interakcija), vodikove vezi in dipol-dipol sil (polarna interakcija) ali pa na kationsko-anionskih interakcijah (ionska interakcija) (56). Poznamo 4 glavne tipe sorbentov:

- **Reverzno-fazni sorbenti:** Sorbent je nepolaren, vzorec, ki ga naneseemo pa je polaren ali zmerno polaren. Z njim določamo nepolarne ali srednje polarne analite. Retencija analita iz polarnega vzorca (npr. vodni vzorec) je posledica vzpostavitve VDW vezi med analitom in sorbentom. Za prekinitev vezi pri eluciji uporabimo nepolarno topilo (56).
- **Polimerni sorbenti:** Sem sodijo večinoma polimeri iz stirena in divinilbenzena. Uporabljajo se za retencijo hidrofobnih spojin, ki izkazujejo tudi hidrofilen karakter. Majhne hidrofobne molekule lahko vstopijo v pore polimera in interagirajo s sorbentom. S tem lahko učinkovito odstranimo velike molekule, kot so npr. proteini, saj so le ti preveliki, da bi vstopili v pore. Elucijo tu izvedemo s srednje polarnimi ali nepolarnimi topili (56).
- **Normalno-fazni sorbenti:** Sorbent je polaren, matrica vzorca pa je srednje polarna ali nepolarna (npr. aceton, klorirana topila, heksan). Z njim določamo polarne analite. Med analitom in sorbentom se vzpostavijo polarne interakcije, kot je vodikova vez. Elucijo običajno izvedemo s topilom, ki je polarnejše od matrice vzorca (56).
- **Ionsko-izmenjevalni sorbenti:** Vsebujejo ionizirane skupine. Mehanizem retencije tu so elektrostatske interakcije med nabitimi funkcionalnimi skupinami analita in nabitimi

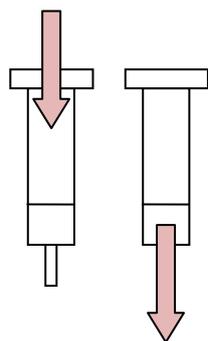
skupinami na sorbentu (56).

Pri samem postopku ekstrakcije moramo pozornost nameniti predvsem izbiri ustreznega polnila, topila, pH in hitrosti pretoka (28).

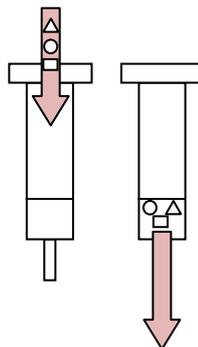
Postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu običajno sestavljajo štiri koraki:

- **Kondicioniranje sorbenta:** Na nosilec nalijemo topilo, ki omoči površino sorbenta in zagotovi enak pH in sestavo topila, kot jo ima vzorec. S tem preprečimo neželene kemijske spremembe ob aplikaciji samega vzorca ter omogočimo dober stik med analitom in sorbentom. Pri reverzno-faznih sorbentih je topilo za kondicioniranje najpogosteje metanol, ki mu sledi voda. Pri vzorcih, ki zahtevajo specifični pH, lahko le tega uravnamo z dodatkom ustreznih pufrov. Včasih moramo iz nosilca odstraniti nečistoče, ki bi lahko motile analizo. V teh primerih pred kondicioniranjem na nosilec nanesemo dodatno topilo, ki pa je običajno enako elucijskemu topilu (58).
- **Nanos vzorca:** V primeru manjših volumnov vzorca (nekaj mL) nanesemo vzorec na ekstrakcijski nosilec s pomočjo volumetrične pipete ali mikropipete, v primeru večjih volumnov pa ga prečrpavamo s pomočjo črpalke iz vsebnika na ekstrakcijski nosilec s konstantnim pretokom. Pri nanosu je pomemben pretok vzorca skozi ekstrakcijski nosilec. Če je pretok prehitel, analit nima dovolj časa za interakcijo s sorbentom. Za kolone je običajna hitrost pretoka 3-10 mL/min, za diske pa 10-100 mL/min (57).
- **Čiščenje:** S tem odstranimo vse komponente, ki se niso vezale na sorbent ob nanosu vzorca. Z uporabo primerne topila lahko odstranimo tudi nečistoče, ki so se šibkeje vezale na sorbent kot izbrani analit. Izbrati moramo topilo, ki iz vzorca odstrani vse neželene komponente (58).
- **Elucija:** Za elucijo analita z nosilca izberemo topilo, ki tvori močnejše interakcije z analitom kot pa s sorbentom (55, 58).

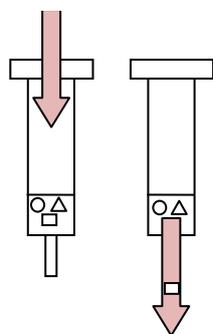
Slika 5 prikazuje postopek SPE, ki vključuje kondicioniranje (a), nanos vzorca (b), spiranje (c) in elucijo (d) (55).



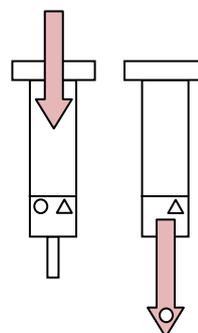
**a) Kondicioniranje-**  
kondicioniranje sorbenta pred aplikacijo vzorca zagotavlja ponovljivo retencijo analita.



**b) Nanos vzorca-**zagotoviti moramo dovolj počasen in konstanten pretok.



**c) Spiranje** -spiranje nosilca, da odstranimo neželjene komponente vzorca.



**d) Elucija** -dobimo očiščen in koncentriran analit, primeren za analizo.

Slika 5: Postopek SPE (○- analit, ki ga določamo, △- neželjene sestavine vzorca, □- neželjene komponente vzorca, ki se niso vezale na sorbent ali so se vezale šibkeje od iskanega analita) (Povzeto po 55)

## 1.5.2 Plinska kromatografija

GC je ena najbolj razširjenih separacijskih tehnik. Komponente uparjenega vzorca se ločijo na koloni zaradi različne porazdelitve med plinsko mobilno fazo (MF) in tekočo ali trdno stacionarno fazo (SF). Elucijo dosežemo s tokom inertne plinske MF. SF je lahko trdna ali tekoča. Bolj pogosto uporabljamo plinsko-tekočinsko kromatografijo (GLC), ki jo skrajšano tudi imenujemo plinska kromatografija (GC) (61).

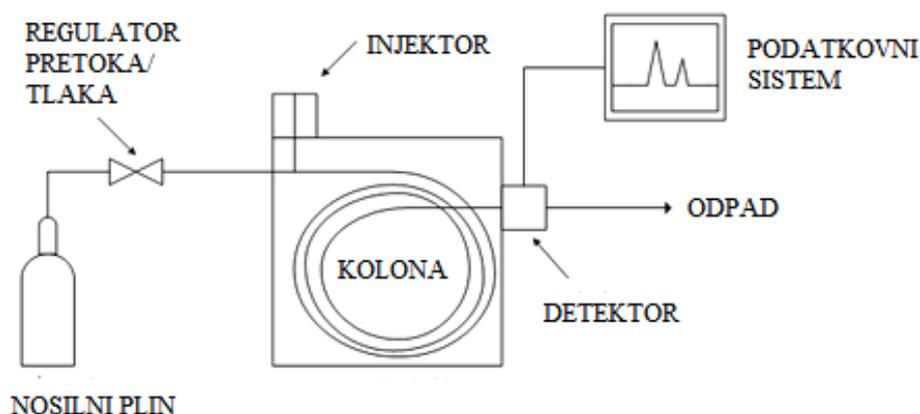
### **Deli plinskega kromatografa:**

- a) **Nosilni plin:** MF pri GC mora biti kemijsko inertna. Najpogosteje kot nosilni plin uporabljamo helij, lahko pa tudi argon, dušik in vodik. Pline hranimo pod tlakom v jeklenkah, za kontrolo njihovega tlaka in pretoka pa potrebujemo regulatorje tlaka in merilce pretoka. Vstopni tlak je običajno 70-350 kPa višji od sobnega, kar pri kapilarni koloni omogoča pretok od 1-25 mL/min. Na splošno velja, da je pretok plina odvisen od vstopnega tlaka. Načeloma konstanten vstopni tlak pomeni konstanten pretok MF.
- b) **Sistem za injiciranje vzorca:** Učinkovitost kolone je odvisna od vzorca, ki ga naneseemo nanjo. Nanesti moramo ustrezen volumen vzorca, pomembno pa je, da ga hitro injiciramo na kolono. Počasno injiciranje in preveliki vzorci lahko povzročajo širjenje vrhov in slabšo resolucijo. Za injiciranje tekočega vzorca v uparjalno komoro se uporabljajo kalibrirane mikroinjekcije. Temperatura v uparjalni komori je običajno za 50 °C višja od vrelišča najmanj hlapne komponente vzorca. Volumen vzorca, ki ga injiciramo, je običajno od 0,1-20 µL. Kapilarne kolone zahtevajo manjšo količino vzorca od polnjениh. Pri kapilarnih kolonah imamo možnost "split" ali "splitless" injiciranja. Pri "split" injiciranju je vzorec razdeljen na dva neenaka dela, običajno je razmerje 1:10 ali 1:100, pri čemer gre manjši del vzorca na kolono. Ta način se uporablja pri koncentriranih vzorcih, saj s tem preprečimo preobremenitev kolone. Njegova prednost je izboljšana ločljivost. Pri "splitless" načinu gre celotna količina injiciranega vzorca na kolono, kar je pomembno, kadar so analiti prisotni v sledih, kot je na primer pri določanju okoljskih onesnažil, kot sta BPA in TCS.
- c) **Kolona:** Pri GC poznamo 2 tipa kolon: polnjene in kapilarne. V preteklosti so se bolj uporabljale polnjene kolone, danes pa jih vse bolj nadomeščajo kapilarne, ki jih odlikuje večja učinkovitost in hitrost. Kapilarne kolone so narejene iz silicijevega dioksida in na zunaj prevlečene s poliamidom, ki jim daje večjo upogljivost. Dolžina kolone je od 2 do 50 metrov, notranji premer kolone pa je med 0,15 in 0,5 mm. Stena kolone je prevlečena s tekočo SF, katere debelina je od 0,1 do 5 µm. Najpogostejši tip SF temelji na organskih silikonskih polimerih (npr. polidimetilsiloksan), ki so kemijsko vezani na silanolne skupine na sami koloni. Verige polimerov so običajno prečno premrežene. Temperatura kolone je zelo pomembna spremenljivka in mora biti natančno nadzorovana. Optimalna temperatura kolone je odvisna od vrelišča vzorca in zahtevane stopnje separacije. Običajno nam temperatura, ki je malce nad vreliščem analita zagotavlja primerne čase elucije. Za vzorce s širokim razponom vrelišč pa je

potreben temperaturni program, kjer lahko temperatura narašča zvezno ali v korakih. Na splošno optimalno resolucijo dosežemo z minimalno potrebno temperaturo, kar pa ponavadi podaljša čas analize.

- d) **Detektor:** Idealen detektor za GC mora imeti zadostno občutljivost. Občutljivost detektorjev, ki jih danes uporabljamo, je v območju  $10^{-8}$  do  $10^{-15}$  g. Imeti mora dobro stabilnost in ponovljivost, ter linearen odziv v širokem koncentracijskem območju. Delovati mora v temperaturnem območju od sobne temperature do vsaj 400 °C. Detekcija mora biti hitra in neodvisna od hitrosti pretoka. Biti mora tudi visoko zanesljiv in enostaven za uporabo. Kazati mora podobnost v odzivu za vse analite, ali pa visoko selektiven odziv za eno vrsto analita in ne sme povzročiti razpada vzorca. Nobeden od današnjih detektorjev ne izkazuje vseh naštetih lastnosti. Danes se najbolj uporabljajo plamensko ionizacijski detektor (FID), toplotno prevodni detektor (TCD), ECD ter MS (60, 61).

Shemo plinskega kromatografa prikazuje slika 6 (55).



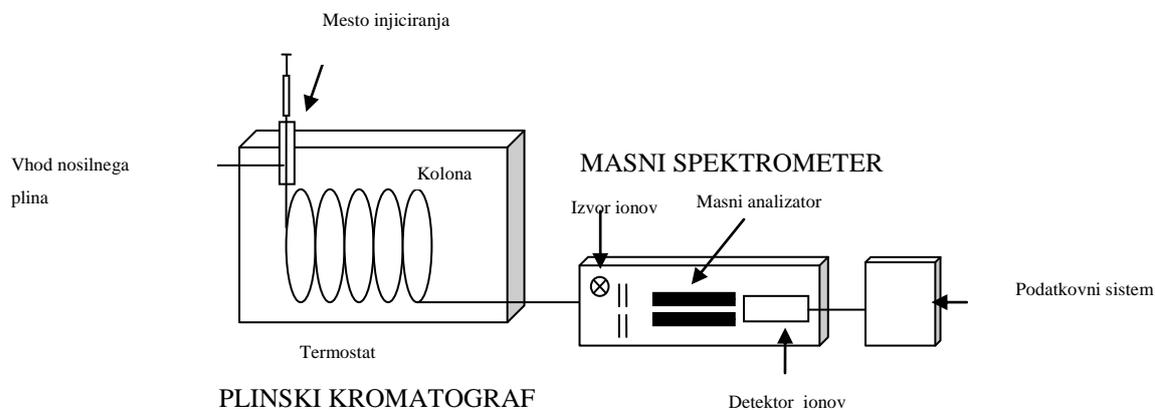
Slika 6: Shema plinskega kromatografa (Povzeto po 55)

### 1.5.3 Masna spektrometrija

Masni spektrometer meri razmerje med maso in nabojem ( $m/z$ ) ionov, ki nastanejo po ionizaciji vzorca. Molekule vzorca vstopijo v masni spektrometer skozi vstopni sistem. Pri GC je vzorec v uparjenem stanju in vhod predstavlja vmesnik med atmosferskim tlakom pri GC sistemu in nizkim tlakom pri MS sistemu. V masnem spektrometru molekule pridejo v stik z ionizacijskim izvorom, ki povzroči ionizacijo vzorca. Ionizacijski izvor mora imeti dovolj energije, da prekine nekatere kemijske vezi v molekulah vzorca, a ne

vseh, da bi razbil molekule na atome. Fragmente, ki jih dobimo, delimo na molekulske in fragmentne ione ter neionizirane molekule. Zaradi visokega vakuuma, ki ga proizvaja vakuumška črpalka, so nenabite molekule odstranjene. Sledi masni analizator, ki loči molekule glede na njihovo razmerje med maso in nabojem ( $m/z$ ). Sledi detekcija ločenih ionov, po integraciji pa še izpis na rekorderju (61). Slika 7 prikazuje shemo GC-MS sistema. Vzorec injiciramo na kapilarno kolono, kjer pride do ločitve spojin. Ločene spojine nato vstopijo v masni spektrometer, kjer sledi fragmentacija in ionizacija spojin ter vstop v kvadropolni masni analizator. Ioni se nato analizirajo in detektirajo z elektronsko pomnoževalko. Pri GC/MS masni spektrometer tekom kromatografskega eksperimenta ponavljajoče skenira mase. Podatki so lahko analizirani na več načinov:

- številčnost ionov v vsakem spektru se lahko sešteje in predstavi kot funkcija časa. Tako dobimo kromatogram vseh ionov,
- lahko se predstavi masni spekter v točno določenem času. Tako identificiramo analite, ki se eluirajo ob tem času,
- lahko izberemo določeno  $m/z$  vrednost, ki jo nato beležimo skozi celoten eksperiment. Ta tehnika se imenuje monitoring izbranega iona (single ion monitoring ali SIM) (61).



Slika 7: GC-MS instrument

## 2. NAMEN DELA

Namen predložene diplomske naloge je razviti in optimizirati analizno metodo za hkratno določanje BPA in TCS v urinu. V urinu bomo določali koncentracijo celokupnega in prostega analita. BPA in TCS se v urin izločata večinoma v konjugirani obliki, zato bomo morali za določitev celokupnega analita najprej opredeliti pogoje dekonjugacije. Ker konjugacija BPA in TCS poteče z glukuronsko kislino in sulfatom, bomo za dekonjugacijo uporabili encime pridobljene iz vinogradniškega polža, ki imajo sulfatazno in  $\beta$ -glukuronidazno aktivnost ( $\beta$ -glukuronidaza, tip H-2 iz *Helix pomatia*,  $\geq 85000$  enot/mL). Določili pa bomo tudi pogoje, ki so potrebni, da dekonjugacija kvantitativno poteče.

Čiščenje in koncentriranje vzorca bomo izvedli s postopkom ekstrakcije na trdnem nosilcu. Tu bomo preverili več dejavnikov, ki lahko vplivajo na izkoristek ekstrakcije. Prvi je izbira ekstrakcijskega nosilca, nato pa bomo preverili vpliv pH in redčitve vzorca na izkoristek ekstrakcije na izbranem nosilcu. Izbrali bomo optimalno topilo za čiščenje ekstrakcijskega nosilca po nanosu vzorca. Preizkusili bomo različna topila (metanol, acetonitril in vodo) in njihove mešanice ter ugotavljali, katera je optimalna kombinacija, ki še ne eluira BPA in TCS z ekstrakcijskega nosilca. Zadnji in zelo pomemben korak pri SPE je elucija analita. Tudi v tej fazi bomo preizkusili različna topila, in sicer aceton, DCM in etilacetat, ter določili izkoristke ekstrakcije. Po ekstrakciji bomo izvedli derivatizacijo spojin. Reagent za derivatizacijo bo silirno sredstvo MSTFA, preizkusili pa bomo različna topila za derivatizacijo in čas, ki je potreben, da derivatizacija kvantitativno poteče. Instrumentalno analizo bomo izvedli s plinsko kromatografijo z masnospektrofotometrično detekcijo. Pogoje bomo izbrali tako, da bomo dosegli ločitev obeh analitov.

Ko bo analizna metoda optimizirana, bo sledila validacija metode, s katero bomo potrdili primernost metode za nadaljnjo analizo urinskih vzorcev. Pri validaciji bomo preverjali naslednje parametre: specifičnost, točnost, natančnost, mejo detekcije in kvantifikacije ter linearnost.

Z razvito analizno metodo bomo nato določili koncentracijo TCS in BPA v realnih urinskih vzorcih.

### 3. MATERIALI

#### 3.1 Standardi

Standardi, ki smo jih uporabljali pri analizi, so prikazani v tabeli III.

Tabela III: Tabela standardnih spojin

STANDARD	PROIZVAJALEC	KONCENTRACIJA IN KOLIČINA	ČISTOST
Bisfenol A	Merck	Prah, 100g	> 97 %
Bisfenol A-d16	Sigma-Aldrich (ISOTECH)	Prah, 250 mg	98 atom % D
Triklosan (Igasan)	Fluka (BioChemica)	Prah, 5g	>97,0 %
Triklosan C13	Cambridge Isotope Laboratories, inc	100 µg/mL v nonanu	> 98 %

#### 3.2 Reagenti in topila

Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri analizi, so prikazani v tabeli IV.

Tabela IV: Tabela reagentov in topil

REAGENT	PROIZVAJALEC	FORMULA	MOLEKULSKA MASA (g/mol)	VSEBNOST
Aceton	J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	58,08	99,4 %
Acetonitril	J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA	CH <sub>3</sub> CN	41,05	99,8 %
Analizna voda	J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA	H <sub>2</sub> O	18,00	/
Destilirana voda	IJS, Milli Q	H <sub>2</sub> O	18,00	/
Diklorometan	J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93	99,8 %
Etil acetat	J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,105	99,6 %
Fosforjeva kislina	Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	98	98 %

	Britanija			
Mravljična kislina	Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija	HCOOH	46,03	98 %
Metanol	J.T.Baker, Phillipsburg, ZDA	CH <sub>3</sub> OH	32,04	99,8 %
MSTFA	Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NOSi	199,1	98,5 %
Na-acetatni puffer, pH=5,2; c=3mol/L	Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija	CH <sub>3</sub> COONa /CH <sub>3</sub> COOH	/	/
Piridin	Merck, Darmstadt, Nemčija	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	79,1	99,5 %
β-glukuronidaza, tip H2, iz <i>Helix pomatia</i>	Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Velika Britanija	/	/	Min. 85000 enot/mL

### 3.3 Pribor in aparature

Za pripravo vzorca smo uporabili sistem za SPE, za instrumentalno analizo pa GC-MS sistem.

#### 3.3.1 Sistem za ekstrakcijo na trdnem nosilcu

SPE smo izvedli na ekstrakcijskem nosilcu Evolute ABN (Biotage, Upsala, Švedska) z volumnom 3 mL, maso sorbenta 50 mg in velikostjo polimernih delcev 50 μm. Pri ekstrakciji smo uporabili še kadičko (Visiprep<sup>TM</sup> SPE Vacuum Manifold; Supelco, Bellefonte, ZDA), vakuumsko črpalko za sušenje ekstraktov (220 V/50 Hz; Millipore, Massachusetts, ZDA), ter dušik. Sistem za SPE prikazuje slika 8.



Slika 8: Aparatura za SPE

### 3.3.2 Plinski kromatograf z masno selektivnim detektorjem

Za instrumentalno analizo smo uporabili GC-MS, ki je sestavljen iz:

- HP 6890 plinskega kromatografa (Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija),
- HP 6890 masno selektivnega detektorja (Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija).

## 4. METODE

### 4.1 Vzorčenje

Urinske vzorce smo pridobili od štirih prostovoljk. Do analize smo jih shranili v steklenih vsebnikih v hladilniku, pripravili in analizirali pa smo jih na dan odvzema urina. Podrobnosti vzorcev prikazuje tabela V.

Tabela V: Urinski vzorci

VZOREC	KOLIČINA VZORCA	DATUM ODVZEMA IN ANALIZE
Urin A	50 mL	6.2.2012
Urin B	60 mL	6.2.2012
Urin C	100 mL	6.2.2012
Urin D	50 mL	6.2.2012

### 4.2 Priprava raztopin standardov

Standardni spojini BPA in TCS sta bili v praškasti obliki. Na analitski tehtnici smo natehtali 1 mg BPA in 1 mg TCS ter ju kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko. Nato smo dopolnili z metanolom do oznake in premešali. Dobili smo raztopino standardov s koncentracijo 100 µg/mL. Le to smo ustrezno redčili z metanolom, da smo dobili koncentracije 10 µg/mL, 1 µg/mL in 0,1 µg/mL.

### 4.3 Priprava raztopin standardov za validacijo

Pred validacijo smo pripravili sveže metanolne raztopine standardov BPA in TCS. Pripravili smo dve raztopini, in sicer raztopino A, kjer sta bila TCS in BPA v koncentraciji 100 µg/mL in 20 µg/mL, ter raztopino B, kjer sta bila oba v koncentraciji 1 µg/mL. Raztopine smo pripravili z redčenjem z metanolom, kar prikazuje tabela VI.

Tabela VI: Priprava raztopin standardov za validacijo

Št.	c BPA ( $\mu\text{g/mL}$ )	c TCS ( $\mu\text{g/mL}$ )	Raztopina	V raztopine ( $\mu\text{L}$ )	V MeOH ( $\mu\text{L}$ )	c BPA v urinu (ng/mL)	c TCS v urinu (ng/mL)
1	0,1	0,1	B	100	900	0,5	0,5
2	2	10	A	100	900	10	50
3	4	20	A	200	800	20	100
4	6	30	A	300	700	30	150
5	8	40	A	400	600	40	200
6	10	50	A	500	500	50	250
7	0,14	0,14	B	140	860	1	1
8	9	45	A	450	550	45	225

Da smo dobili želene koncentracije TCS in BPA v urinu (zadnja dva stolpca) smo odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  posamezne mešanice v 10 mL urina.

#### 4.4 Priprava raztopin internih standardov

Kot interna standarda smo uporabili BPA-d16 in TCS-C13. Raztopino BPA-d16 smo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici zatehtali 0,83 mg IS BPA-d16 in ga kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko. Nato smo dopolnili z metanolom do oznake ter premešali. Dobili smo raztopino standarda s koncentracijo 83  $\mu\text{g/mL}$ . IS TCS-C13 smo že dobili v obliki raztopine v nonanu s koncentracijo 100  $\mu\text{g/mL}$ . Tako pripravljena standarda smo nato redčili, da smo dobili raztopino standardov s koncentracijo 0,2  $\mu\text{g/mL}$ . Pred validacijo smo pripravili sveže interne standarde, pri procesu optimizacije pa smo uporabljali že vnaprej pripravljene IS. Pripravljene standarde smo hranili v hladilniku največ 1 mesec.

## 4.5 Derivatizacija

Pred ločbo spojin v vzorcu s plinsko kromatografijo moramo analite derivatizirati. Kot derivatizacijsko sredstvo smo uporabili MSTFA, ki daje hlapne in termično stabilne produkte. V vzorec smo dodali 50  $\mu\text{L}$  MSTFA, varirali pa smo izbor topila ter čas derivatizacije. Tako smo preizkusili vpliv piridina in etilacetata na uspešnost derivatizacije. V vialo smo odpipetirali standardno raztopino BPA in TCS ter interni standard in v toku dušika odstranili topilo. Končna količina TCS in BPA v viali je bila 10 ng, količina BPA-d16 in TCS-C13 pa 4 ng. Dodali smo 50  $\mu\text{L}$  MSTFA ter 50  $\mu\text{L}$  izbranega topila. Vzorec smo nato 30 minut derivatizirali pri 60  $^{\circ}\text{C}$ .

Pri optimizaciji časa derivatizacije smo preizkusili naslednje čase: 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min in 120 min. V vialo z vzorcem smo odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  MSTFA ter 50  $\mu\text{L}$  etilacetata. Raztopino smo premešali ter inkubirali pri 60  $^{\circ}\text{C}$ .

## 4.6 Ekstrakcija na trdnem nosilcu

Vzorci smo pred analizo z GC očistili in koncentrirali s SPE. Na osnovi literaturnih podatkov smo izbrali ustrezen nosilec. Postopek ekstrakcije je bil sestavljen iz petih korakov, in sicer kondicioniranja ekstrakcijskega nosilca, nanosa vzorca, spiranja nosilca, sušenja nosilca in elucije izbranih analitov. Pri razvoju in optimizaciji SPE smo preizkusili različne vplive na izkoristek ekstrakcije:

- pogoji priprave vzorca,
- pogoji čiščenja vzorca,
- izbor topila za elucijo.

Pri optimizaciji ekstrakcije smo izhajali iz metode, ki je bila razvita za določanje BPA v odpadnih vodah. Nato smo pri vsakem koraku spreminjali le eno spremenljivko in preučevali njen vpliv na uspešnost ekstrakcije.

Vzorci smo pripravili tako, da smo odpipetirali 1 mL vode, ki smo ji dodali različne volumne standardne raztopine BPA in TCS, tako da smo dobili različne koncentracije BPA in TCS. Vzorec smo razredčili z 2 mL 1 % fosforjeve kisline. V vsak vzorec smo dodali še 20  $\mu\text{L}$  internega standarda BPA-d16 in TCS C-13 s koncentracijo 0,2  $\mu\text{g/mL}$ . Končna koncentracija IS v vzorcu je bila 4 ng/mL.

Za ekstrakcijo smo uporabili ekstrakcijske nosilce Evolute ABN. Najprej smo nosilce kondicionirali. To smo storili s 3 mL mešanice acetona in DCM v razmerju 1:1, 3 mL metanola in 3 mL 0,1 % fosforjeve kisline. S tem je bil nosilec pripravljen za nanos vzorca. Na nosilec smo nanесли 3 mL vzorca. Sledilo je spiranje nosilca s 3 mL destilirane vode. Po spiranju smo ekstrakcijski nosilec s pomočjo vakuumske črpalke popolnoma posušili (1 ura). Sledila je elucija naših spojin. Kot topilo za elucijo smo uporabili mešanico aceton:DCM v razmerju 1:1. Uporabili smo 5 mL topila, pretok skozi nosilec pa je bil približno 2 mL/min. Eluat smo posušili s prepihanjem v toku dušika, kar prikazuje slika 9. Vzorce smo nato raztopili v majhnem volumnu topila (aceton:DCM 1:1), jih prenesli v vialo ter posušili s prepihanjem v toku dušika.



Slika 9: Sušenje ekstraktov v toku dušika

## 4.7 Dekonjugacija

Dekonjugacijo smo izvedli z mešanico encimov, pridobljenih iz polža vrste *Helix pomatia*, ki izkazujejo glukuronidazno in aril-sulfatazno aktivnost. Glede na podatke v literaturi smo pripravili zmes za dekonjugacijo. Odpipetirali smo:

- 430  $\mu\text{L}$  destilirane vode,
- 45  $\mu\text{L}$  encima  $\beta$ -glukuronidaze z aktivnostjo 85000 U/mL,
- 25  $\mu\text{L}$  Na-acetatnega pufru s pH= 5,2 in koncentracijo 3 mol/L.

20  $\mu\text{L}$  te zmesi smo nato prenesli v 1 mL vzorca, ki smo mu pred tem dodali 50  $\mu\text{L}$  Na-acetatnega pufru. Koncentracija encima v vzorcu je znašala 150 U/mL. Pri dekonjugaciji smo želeli optimizirati čas, ki je potreben, da dekonjugacija kvantitativno poteče. Vzorce

smo pustili različno dolgo stresati pri 37 °C in 120 obratih. Časi, ki smo jih preverili, so bili 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h in 15 h. Po pretečenem času, smo vzorce dali v zamrzovalnik in jih naslednji dan analizirali. Vzorce smo analizirali po validiranem postopku.

## 4.8 Instrumentalna analiza

Derivatizirane vzorce smo analizirali z GC-MS, ki ga prikazuje slika 10.



Slika 10: Plinski kromatograf z masno selektivnim detektorjem

Ločitev spojin smo dosegli s plinskim kromatografom HP 6890. Separacija je potekala na kapilarni koloni (Agilent JW Scientific DB-5ms) z dolžino 30 m ter premerom 0,25 mm. Debelina stacionarne faze je bila 0,25  $\mu\text{m}$ , sestavljal pa jo je prečno premrežen polimer sestavljen iz 5 % fenil- in 95 % dimetilpolisiloksana. Pogoji so bili izbrani tako, da smo dosegli čim večjo ločljivost izbranih analitov. Kromatografske pogoje prikazuje tabela VII.

Tabela VII: Kromatografski pogoji

PARAMETER	VREDNOST
Čas analize	20 min
Volumen injiciranja	1 $\mu\text{L}$

Način injiciranja	"splitless"
Temperaturni program	začetna temperatura je 100 °C in nato zvezno narašča do 280 °C s hitrostjo 15 °C/min. Po končani ločbi temperatura naraste na 300 °C (2 minuti)
Nosilni plin	helij
Pretok plina skozi kolono	konstantni pretok 1 mL/min
Začetni tlak	7,23 x 10 <sup>4</sup> Pa
Izhodni tlak	vakuum

Po kromatografski ločbi je sledila detekcija z masnospektrometričnim detektorjem HP 6890. Za vsako spojino smo izbrali kvantifikacijski ion in dva identifikacijska iona, kar prikazuje tabela VIII.

Tabela VIII: Izbrani ioni pri MS detekciji

Spojina	Kvantifikacijski ion (m/z)	Potrditveni ion (m/z)
TCS	347	200, 345
TCS-C13	372	206, 374
BPA	357	358, 372
BPA-d16	368	217, 386

## 4.9 Validacija

Validacijske študije potrdijo, da nova metoda zadošča vsem zahtevanim specifikacijam in mora biti opravljena preden je nova metoda sprejeta v rutinsko laboratorijsko prakso. Parametri, ki jih določamo pri validaciji metode so selektivnost, točnost, linearnost, natančnost, LOD in LOQ.

### Selektivnost

Selektivnost je sposobnost metode, da nedvoumno izmeri in določi iskani analit v prisotnosti komponent, za katere lahko pričakujemo, da so prisotne v vzorcu. Selektivna multianalitska metoda mora biti sposobna ločiti vse izbrane analite med sabo in od matrice. Eden izmed pristopov za določanje selektivnosti metode je, da dokažemo, da metoda ne

daje odziva v slepem vzorcu, t.j. da v slepem vzorcu ni signalov, ki bi interferirali s signalom analita ali internega standarda (68).

### **Linearnost**

Linearnost metode je razmerje med koncentracijo analita v vzorcu in odzivom metode. Določamo jo z analizo različnih koncentracij standardnih raztopin in rezultate grafično predstavimo kot odziv v odvisnosti od koncentracije. Pri določanju linearnosti moramo:

- izmeriti koncentracijo vsaj šestim kalibracijskim standardom,
- kalibracijski standardi morajo biti enakomerno razporejeni skozi celotno koncentracijsko območje,
- linearnost moramo zagotoviti v območju od 50-150% vrednosti, kjer pričakujemo naš analit,
- vsako maritev kalibracijskega standarda moramo ponoviti vsaj 3x.

Statistični parameter, ki ponazarja stopnjo ujemanja, je korelacijski koeficient. Izračunamo ga po enačbi 1.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

Enačba 1: Korelacijski koeficient

Pri določanju linearnosti mora biti vrednost korelacijskega koeficienta nad 0,99 (68).

Linearnost naše metode smo preverili ločeno za oba analita. Pripravili smo vzorce urina, ki smo jim dodali različne koncentracije standardov BPA in TCS. Koncentracijsko območje, ki smo ga izbrali za določitev linearnosti, je bilo za BPA od 0,5 ng/mL do 50,0 ng/mL, za TCS pa od 0,5 ng/mL do 250,0 ng/mL. Za spodnjo mejo smo izbrali pri obeh 0,5 ng/mL, saj smo v tem območju pričakovali LOQ, zgornjo mejo pa smo izbrali glede na podatke o vrednostih BPA in TCS v literaturi. Raztopine standardov smo pripravili v šestih različnih koncentracijah, ki so bile enakomerno razporejene čez celotno koncentracijsko območje. Izhajali smo iz standardov TCS in BPA s koncentracijo 100 µg/mL, ki smo ju nato redčili, da smo dobili zelene koncentracije. Pri vsaki točki smo naredili 3 ponovitve. Korelacijo med koncentracijo in odzivom smo podali z determinacijskim koeficientom ( $r^2$ ). Iz dobljenih rezultatov smo določili tudi regresijsko premico, ki ima obliko  $y = k * x + n$ , pri

čemer predstavlja  $y$  razmerje med odzivom vzorca in internega standarda ( $A/A_{is}$ ),  $x$  predstavlja razmerje med koncentracijo vzorca in internega standarda ( $c/c_{is}$ ),  $n$  je odsek na ordinati,  $k$  pa naklon premice.

### **Točnost**

Točnost je ujemanje med izmerjeno vrednostjo in sprejeto referenčno vrednostjo analita, ki ga določamo. Točnost lahko določamo na več načinov. Rezultate naše metode lahko primerjamo z rezultati validirane metode z definirano točnostjo, ali pa z našo metodo določimo koncentracijo vzorcu, ki vsebuje znano koncentracijo analita. Za določanje točnosti moramo izvesti vsaj 9 določitev v vsaj treh koncentracijah, ki pokrivajo celotno območje metode. Točnost izrazimo kot razmerje med določeno in pravo vrednostjo (68).

Točnost smo določali pri treh različnih koncentracijah. Za BPA smo točnost določali pri koncentracijah 1 ng/mL, 20 ng/mL in 45 ng/mL, za TCS pa pri 1 ng/mL, 100 ng/mL in 225 ng/mL. Za vsako koncentracijo smo naredili 3 ponovitve. Izrazili smo jo kot razmerje med določeno in pravo vrednostjo, kar prikazuje enačba 2.

$$recovery (\%) = \frac{\text{določena vrednost}}{\text{prava vrednost}} \times 100 \%$$

Enačba 2: Enačba za določanje točnosti

### **Natančnost**

Natančnost izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijami meritev istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Poznamo 3 nivoje natančnosti: ponovljivost, rigidnost in reproducibilnost. Ponovljivost izraža stopnjo ujemanja pod enakimi delovnimi pogoji v kratkem časovnem intervalu. Določimo jo z merjenjem vsaj treh koncentracij v vsaj treh ponovitvah, ki so izbrane tako, da pokrijejo območje metode. Druga možnost pa je meritev vsaj šestih analiz pri 100 % tarčni koncentraciji. Rigidnost izraža variacije znotraj laboratorija, kot so na primer različni dnevi, osebje, naprave itd. Stopnja rigidnosti, ki jo moramo določiti, je odvisna od pogojev uporabe same metode. Reproducibilnost izraža natančnost med laboratoriji. Določa se v primeru standardizacije analiznega postopka, na primer za vključitev postopka v farmakopejo (68).

Pri validaciji smo določili ponovljivost in rigidnost celotne analizne metode. Ponovljivost smo določili z merjenjem treh različnih koncentracij. Za BPA smo ponovljivost določali pri koncentracijah 1 ng/mL, 20 ng/mL in 45 ng/mL, za TCS pa pri 1 ng/mL, 100 ng/mL in 225 ng/mL. Za vsako koncentracijo smo naredili 3 ponovitve. Rigidnost metode smo določili z analizo vzorcev ob različnih dnevih. Rigidnost smo določali pri dveh različnih koncentracijah-za BPA smo rigidnost določali pri koncentracijah 1 ng/mL in 45 ng/mL, za TCS pa pri 1 ng/mL in 225 ng/mL. Za vsako koncentracijo smo naredili 3 ponovitve. Natančnost smo izrazili kot koeficient variacije (CV) meritev.

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Enačba 3: Enačba za določanje koeficienta variacije

$\sigma$ =standardna deviacija vzorcev,  $\bar{x}$  = aritmetična sredina vzorcev

### **Meja detekcije (LOD)**

LOD je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko v predpisanih pogojih zaznamo, a ne nujno tudi kvantitativno določimo. Za določanje LOD so možni različni pristopi:

- Vizualna ocena: Analiziramo vzorce z znanimi koncentracijami analita in določimo minimalno mejo, ko lahko analit zanesljivo določimo.
- Razmerje med signalom in šumom (S/N): Primerjamo izmerjene signale vzorcev z nizko koncentracijo analita s signali slepih vzorcev in določimo minimalno koncentracijo, ko lahko analit zanesljivo določimo. S/N za določitev LOD je 3:1.
- Določanje standardne deviacije odziva: izmerimo odziv primernega števila slepih vzorcev in izračunamo standardno deviacijo (68).

$$LOD = \frac{3 \times \sigma}{S}$$

Enačba 4: Enačba za določanje LOD

$\sigma$ =standardna deviacija detektorja, S= naklon umeritvene premice

LOD smo določili kot 3-kratno standardno deviacijo slepega vzorca. Pripravili in analizirali smo 6 slepih vzorcev urina.

### **Meja kvantifikacije (LOQ)**

LOQ je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko v predpisanih eksperimentalnih pogojih kvantitativno ovrednotimo z ustrežno točnostjo in natančnostjo. Za določanje LOQ so možni različni pristopi:

- Vizualna ocena: Analiziramo vzorce z znanimi koncentracijami analita in določimo minimalno mejo, ko lahko analit kvantitativno določimo s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo.
- Razmerje med signalom in šumom (S/N): Primerjamo izmerjene signale vzorcev z nizko koncentracijo analita z signali slepih vzorcev in določimo minimalno koncentracijo, ko lahko analit zanesljivo kvantificiramo. Običajno je razmerje S/N za določitev LOQ 10:1.
- Določanje standardne deviacije odziva: Izmerimo odziv primerne števila slepih vzorcev in izračunamo standardno deviacijo (68).

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Enačba 5: Enačba za določanje LOQ

$\sigma$ =standardna deviacija detektorja, S= naklon umeritvene premice

LOQ smo določili kot 10-kratno standardno deviacijo slepega vzorca. Pripravili in analizirali smo 6 slepih vzorcev urina.

### **Učinkovitost ekstrakcije**

Učinkovitost ekstrakcije smo za posamezen analit določali iz razmerja odziva ekstrahiranega urinskega vzorca analita in neekstrahiranega urinskega vzorca analita. Učinkovitost ekstrakcije smo preverjali v dveh koncentracijskih območjih, in sicer pri nizkih koncentracijah (1 ng/mL) in visokih koncentracijah ( $c_{BPA}=45$  ng/mL,  $c_{TCS}=225$  ng/mL). V vsakem koncentracijskem območju smo pripravili 6 vzorcev, od katerih smo v 3 dali standard pred samo ekstrakcijo, v 3 pa smo dodali standard po ekstrakciji. Interni standard (0,2  $\mu$ g/mL, 20  $\mu$ L) smo v vse vzorce dodali po ekstrakciji. Izkoristek ekstrakcije (E %) smo določili po enačbi 6.

$$a) E_{\text{BPA}} = \frac{\text{povprečje BPA/BPA-d16 pred ekstrakcijo}}{\text{povprečje BPA/BPA-d16 po ekstrakciji}}$$

$$b) E_{\text{TCS}} = \frac{\text{povprečje TCS/TCS-C13 pred ekstrakcijo}}{\text{povprečje TCS/TCS-C13 po ekstrakciji}}$$

Enačba 6: Izkoristek ekstrakcije za BPA (a) in TCS (b)

## 4.10 Določanje koncentracije bisfenola A in triklosana v realnih vzorcih

Z razvito in validirano metodo smo analizirali realne urinske vzorce. Pri vzorcih smo določali prost ter celokupen BPA in TCS. Pri določanju prostih analitov smo uporabili naslednjo metodo: 1 mL urina smo razredčili z 2 mL destilirane vode vode ter dodali 20  $\mu\text{L}$  IS BPA-d16 in TCS C-13 s koncentracijo 0,2  $\mu\text{g/mL}$ . Sledila je SPE, kjer smo uporabili ekstrakcijski nosilec Evolute ABN. Najprej smo kondicionirali ekstrakcijski nosilec s 3 mL DCM, 3 mL metanola in 3 mL destilirane vode. Na nosilec smo nato nanesti 3 mL vzorca. Sledilo je spiranje nosilca s 3 mL vode in 6 mL 40 % metanola v vodi ter sušenje ekstrakcijskega nosilca. Elucijo spojin smo izvedli s 5 mL DCM in pretokom 2 mL/min. Eluat smo posušili s prepihanjem v toku dušika. Vzorce smo nato raztopili v majhnem volumnu topila (DCM), jih prenesli v vialo, ter posušili s prepihanjem z dušikom. Sledila je derivatizacija, ki smo jo izvedli s 50  $\mu\text{L}$  MSTFA in 50  $\mu\text{L}$  etilacetata. Vzorce smo derivatizirali 30 min pri 60 °C. Nato je sledila instrumentalna analiza z GC-MS.

Pri določanju celokupnih analitov smo najprej izvedli dekonjugacijo. Pripravili smo zmes za dekonjugacijo. Odpipetirali smo:

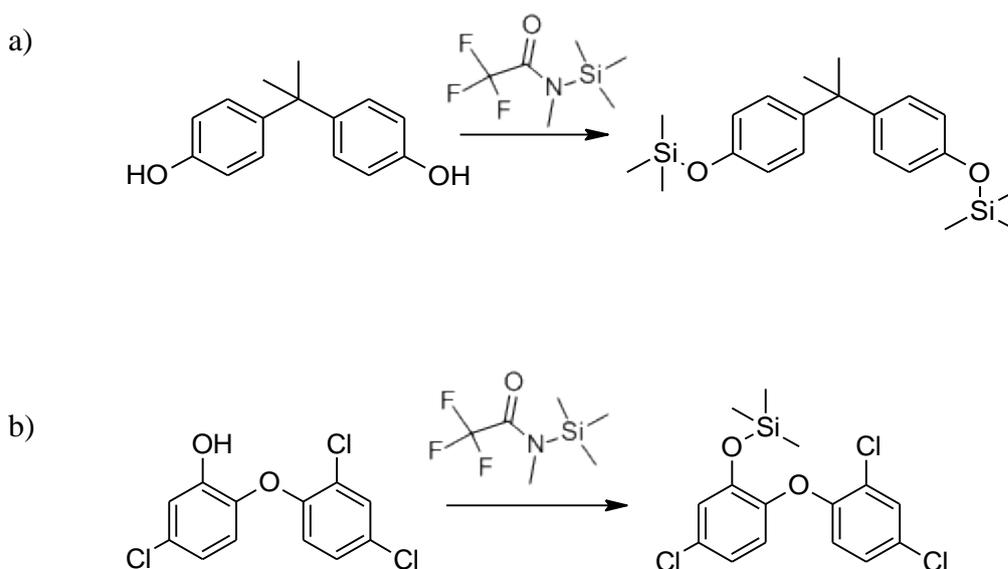
- 430  $\mu\text{L}$  destilirane vode,
- 45  $\mu\text{L}$  encima  $\beta$ -glukuronidaze, z aktivnostjo 85000 U/mL,
- 25  $\mu\text{L}$  Na- acetatnega pufru s pH=5,2 in koncentracijo 3 mol/L.

20  $\mu\text{L}$  te zmesi smo nato prenesli v 1 mL urina, ki smo mu pred tem dodali 50  $\mu\text{L}$  Na-acetatnega pufru. To smo stresali 15 ur pri 37 °C in 120 obratih/min.

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 Derivatizacija bisfenola A in triklosana

Pri GC analizi je derivatizacija pomemben korak pri pripravi vzorca za analizo, saj z njo povečamo hlapnost spojin in njihovo temperaturno obstojnost. BPA in TCS imata v molekuli hidroksilne skupine, zato smo se odločili, da bomo izvedli siliranje. Kot silirni reagent smo uporabili MSTFA. Siliranje nam daje hlapne in termično stabilne produkte, njena glavna slabost pa je, da so produkti občutljivi na vlago. Pred derivatizacijo smo zato vzorce temeljito posušili, pozorni pa smo bili tudi na to, da so bile vialne med dodajanjem reagentov odprte čim krajši čas in tako omejili vstop zračne vlage. Slika 11 prikazuje potek derivatizacije z MSTFA.



Slika 11: Derivatizacija BPA (a) in TCS (b) z MSTFA

Derivatizacijsko sredstvo smo dodali v prebitku. Glede na pričakovane vrednosti BPA in TCS v urinskih vzorcih, bi bile zadostne že veliko manjše količine. V večini dosedanjih raziskav so se izmerjene vrednosti za BPA in TCS gibale od LOD do 10 ng/mL, možne pa so tudi višje koncentracije merjenih analitov v urinu. V urinskih vzorcih so lahko prisotne tudi številne druge spojine, ki jih pri SPE ne odstranimo, imajo pa ustrezne funkcionalne

skupine, ki omogočajo derivatizacijo z MSTFA. Zato smo se odločili dodati prebitno količino MSTFA.

### 5.1.1 Optimizacija izbora derivatizacijskega topila

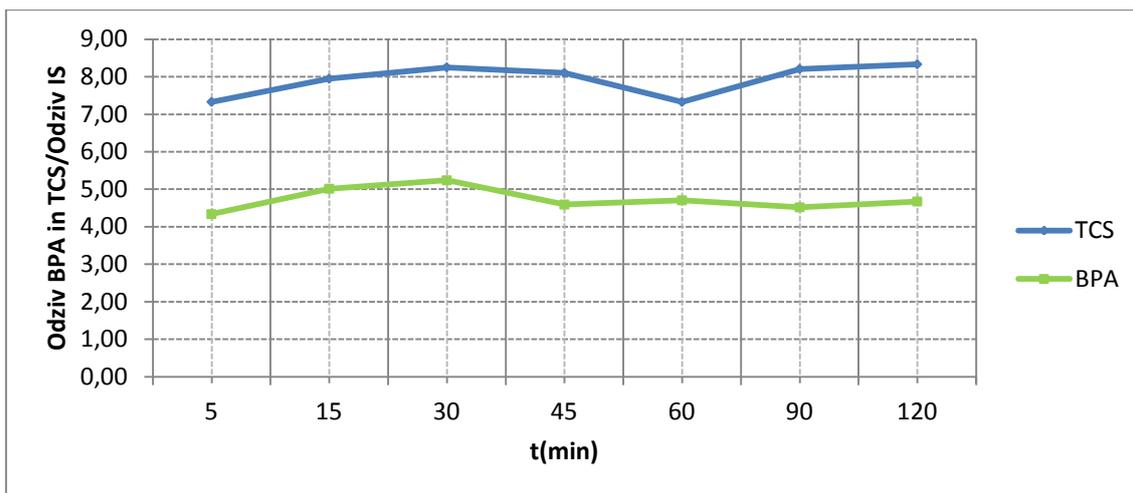
Pri optimizaciji izbora topila smo uporabili standardno raztopino BPA in TCS. Končna količina BPA in TCS v viali je bila 10 ng, količina BPA-d16 in TCS-C13 pa 4 ng. Temu smo dodali 50  $\mu$ L MSTFA, 50  $\mu$ L izbranega derivatizacijskega topila (etilacetat in piridin) ter derivatizirali. Pri uporabi etilacetata smo dobili višje izkoristke derivatizacije kot pa pri uporabi piridina, kar prikazuje tabela IX. Prednost piridina je sicer v tem, da veže vlago, kar je pri reakciji siliranja pomembno. V piridinu pa smo določili znatno vsebnost BPA (kontaminacija), ki je bila v etilacetatu zanemarljiva. Zato smo se odločili za uporabo etilacetata.

Tabela IX: Optimizacija izbora derivatizacijskega topila

	<b>Odziv TCS/Odziv TCS-C13</b>	<b>Odziv BPA/Odziv BPA-d16</b>
piridin	6,8	4,5
etilacetat	8,2	5,1

### 5.1.2 Optimizacija časa derivatizacije

Derivatizacija z MSTFA in etilacetatom je potekla zelo hitro, in sicer je za BPA derivatizacija potekla že v manj kot 15-ih minutah, za TCS pa v 30-ih minutah. Potek derivatizacije v odvisnosti od časa prikazuje slika 12. Za derivatizacijo smo izbrali 30 minut. To je čas, za katerega smo dokazali popolno derivatizacijo za BPA in TCS.

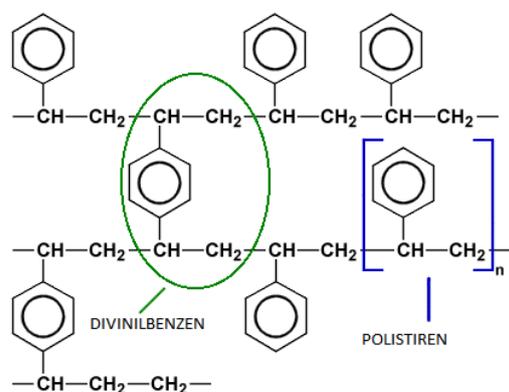


Slika 12: Optimizacija časa derivatizacije

## 5.2 Optimizacija ekstrakcije na trdnem nosilcu

### 5.2.1 Ekstrakcijski nosilec

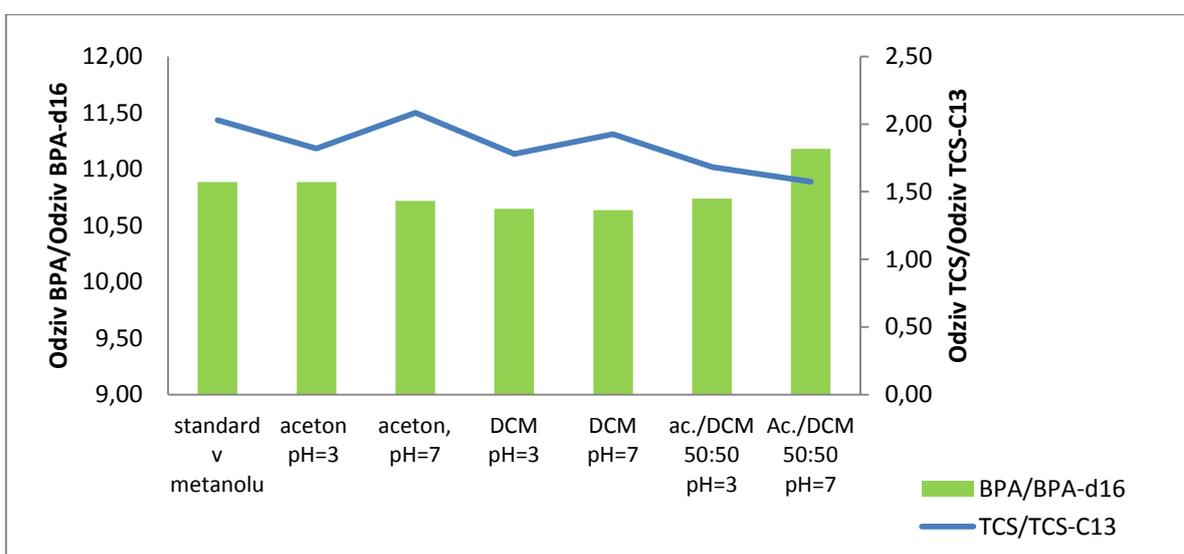
Izbira ekstrakcijskega nosilca je odvisna predvsem od spojine, ki jo želimo določiti in od matrice, v kateri je spojina. Vez med spojino in sorbentom mora biti čim močnejša, a reverzibilna, tako da jo lahko pri eluciji prekinemo. BPA in TCS sta lipofilni spojini, zaradi prisotnosti hidroksilnih skupin pa izkazujeta tudi polaren značaj. Glede lastnosti spojin smo se odločili, da bomo ekstrakcijo izvajali na ekstrakcijskem nosilcu Evolute ABN. Nosilec Evolute ABN vsebuje lipofilno/hidrofilni sorbent, ki je kemijsko polimer sestavljen iz polistirena in divinilbenzena. Strukturo sorbenta prikazuje slika 13 (64).



Slika 13: Struktura polimernega sorbenta iz polistirena/divinilbenzena

Polistirenski del ima površino modificirano z oligomeri, ki vsebujejo hidroksilne funkcionalne skupine, zaradi česar izkazuje zelo dobro močljivost. Polimer je modificiran tako, da ima zelo ozko porazdelitev velikosti por. Majhne molekule se lahko ujamejo v pore, ki jih tvori polimer in tako pridejo v stik s sorbentom. Velike molekule, kot so npr. proteini, pa se zaradi svoje velikosti ne morejo ujeti v pore in gredo zato skozi kolono, zaradi česar so te kolone primerne in priporočene za uporabo pri urinskih vzorcih.

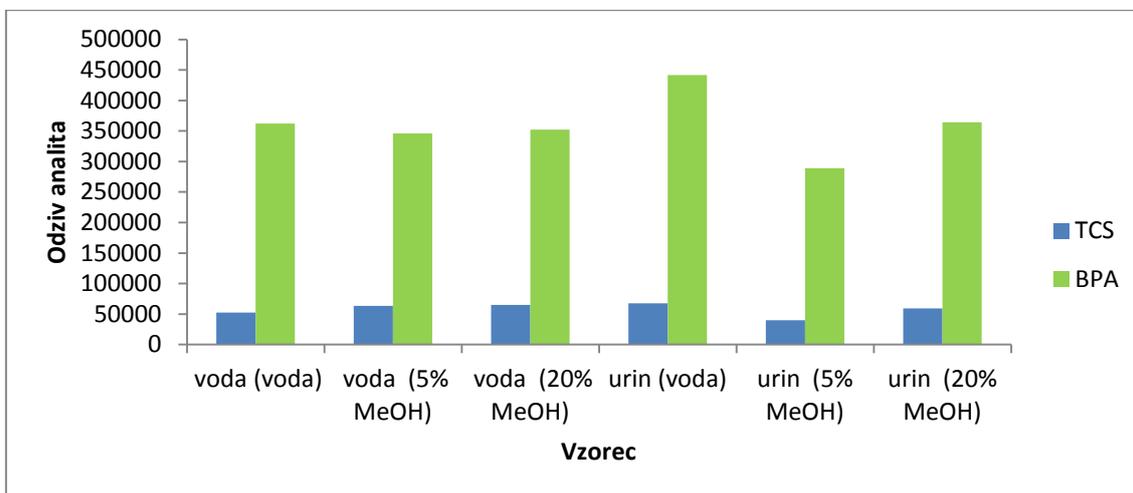
Primernost ekstrakcijskega nosilca smo preverili pri različnih pH vrednostih (pH=3, pH=7) in različnih topilih (acetone, DCM, acetone:DCM 1:1), kar prikazuje slika 14. Ekstrakcijski nosilec Evolute ABN je primeren za istočasno določevanje BPA in TCS.



Slika 14: Določanje primernosti ekstrakcijskega nosilca Evolute ABN za hkratno elucijo TCS in BPA

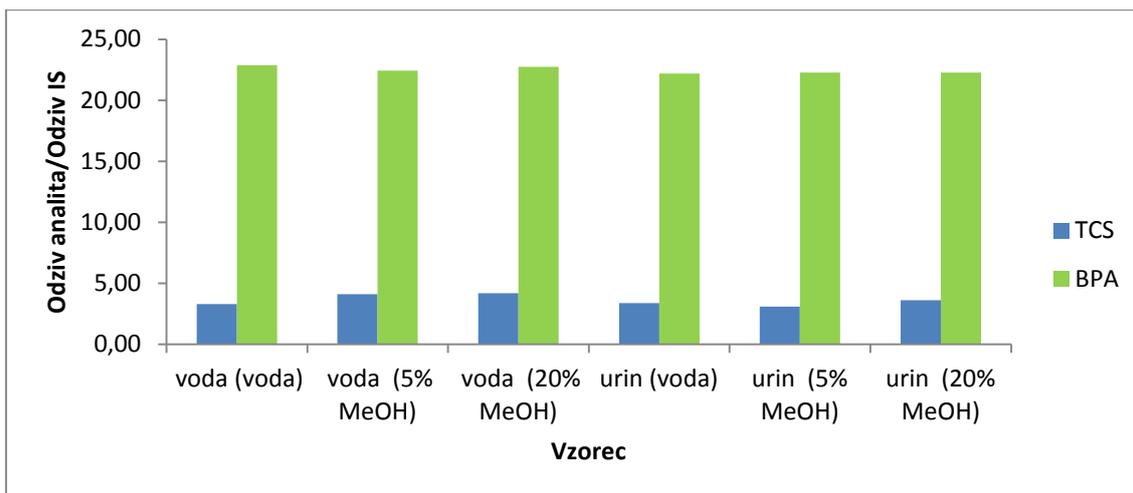
Zanimalo nas je tudi, kako se izbran nosilec odziva na urinske vzorce oz. ali obstaja razlika med izkoristkom ekstrakcije v vodi in urinu. Urin je namreč kompleksna matrica, ki lahko vsebuje različne nečistoče, kot so proteini in lipidi. Analita bi lahko tvorila interakcije s komponentami matrice, kot so npr. proteini, kar bi se odražalo v slabših izkoristkih ekstrakcije. V ta namen smo pripravili 3 vodne in 3 urinske vzorce. Vzorce smo po nanosu na ekstrakcijski nosilec spirali z destilirano vodo, ter 5 in 20 % raztopino metanola v vodi, kot elucijsko topilo pa smo uporabili acetone:DCM v razmerju 1:1.

Pri spremljanju odziva, ki so ga dali urinski vzorci, je prišlo do majhnih variacij (BPA  $\pm$  13 %, TCS  $\pm$  16 %), kar prikazuje slika 15. Vzrok za to je lahko priprava vzorca, ekstrakcija ali instrumentalna analiza. Možen je tudi vpliv matrice na ekstrakcijo.



Slika 15: Določanje primernosti ekstrakcijskega nosilca Evolute ABN za ekstrakcijo urinskih vzorcev

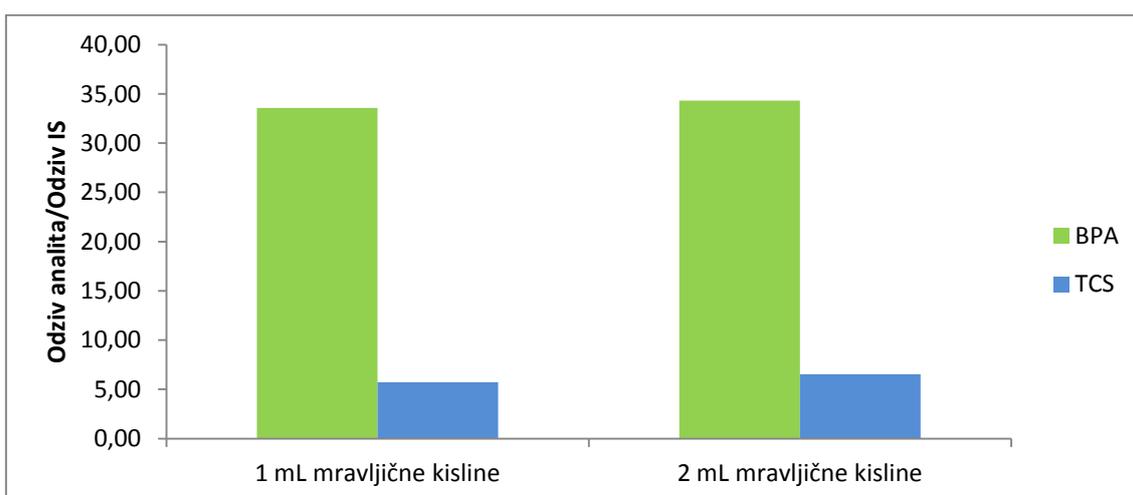
Rezultate odziva, ki smo jih dobili za BPA in TCS, smo zato delili z IS. S tem smo omejili variacije, do katerih je lahko prišlo pri pripravi vzorca in pri instrumentalni analizi. IS lahko kompenzira številne napake, tako naključne kot sistematske. Če se analit in IS proporcionalno odzivata na naključna nihanja instrumenta in metode, je razmerje teh signalov neodvisno od nihanj. Prav tako pride do kompenzacije učinkov zaradi vpliva matrice, če matrica vpliva enako na signal analita in IS. Z uporabo IS bistveno izboljšamo točnost in natančnost metode (61). Rezultati med vodnimi vzorci in urinskimi vzorci, ki smo jih dobili po korekciji z IS, se ne razlikujejo med seboj, kar prikazuje slika 16. To kaže, da je ekstrakcijski nosilec Evolute ABN primeren za ekstrakcijo urinskih vzorcev, hkrati pa smo potrdili tudi primernost IS.



Slika 16: Razlike v učinkovitosti ekstrakcije med urinskim in vodnim vzorcem

### 5.2.2 Optimizacija priprave vzorca

Najprej smo preverili volumen reagenta za redčenje vzorca. Sam volumen je pomemben predvsem pri bolj viskoznih vzorcih, saj z redčenjem izboljšamo pretočne lastnosti vzorca. Vzorec smo redčili z 1 mL in 2 mL 1 % mravljične kisline v vodi. Rezulti so prikazani na sliki 17 in kažejo, da volumen, s katerim redčimo vzorec, ne vpliva na izkoristek ekstrakcije. Vpliva pa na potek ekstrakcije. Pri koncentriranih urinskih vzorcih se je namreč pretok skozi ekstrakcijski nosilec zelo upočasnil in nosilec se je pogosto zamašil. Zato smo se odločili, da bomo vzorec redčili z 2 mL topila.



Slika 17: Vpliv redčitve vzorca na izkoristek ekstrakcije

Pri ekstrakciji je pomembna izbira pH vrednosti vzorca. Ta je predvsem pomembna pri spojinah, ki ionizirajo. BPA in TCS sta zelo šibki kislini. Pri zmernih pH vrednostih ostajata v neionizirani obliki, do ionizacije bi prišlo le pri zelo visokih pH vrednostih. pH zato ne bi smel imeti odločilnega vpliva na samo ekstrakcijo. Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije smo preverili tako, da smo vzorec redčili z 2 mL destilirane vode (pH=7) in nato še z 2 mL 1 % mravljične kisline (pH=2,5). Kot vzorec smo uporabili vodo z dodatkom 30 ng/mL BPA in TCS. Pri vsakem vzorcu smo naredili 3 ponovitve, povprečja pa so prikazana v tabeli X.

Tabela X: Vpliv pH na učinkovitost ekstrakcije

OPIS	Odziv TCS/ Odziv	Odziv BPA/ Odziv
	TCS-C13	BPA-d16
1 % mravljična kislina, pH=2,5	18,0	16,3
destilirana voda, pH=7	18,4	14,2

Rezultati, ki smo jih dobili, kažejo, da v našem primeru pH ne vpliva znatno na izkoristek ekstrakcije. Pri TCS ni razlike med kislim in nevtralnim pH. Pri BPA pa so vrednosti nekoliko nižje ob uporabi destilirane vode kot redčitvenega reagenta. Kljub temu smo se odločili za uporabo destilirane vode, katero nam je priporočil tudi proizvajalec ekstrakcijskih nosilcev. Mravljična kislina je lahko vir kontaminacije vzorca z BPA, saj je shranjena v plastičnem vsebniku, kar je še dodaten razlog, da smo jo v procesu optimizacije ekstrakcije izločili. Mravljično kislino bi bilo smotrno uporabiti v primeru, če bi se naše spojine močno vezale na proteine matrice, saj bi z dodatkom mravljične kisline spojine sprostil s proteinov. Ker v urinu do tega ne pride, uporaba mravljične kisline ni nujna in smo zato raje uporabili destilirano vodo.

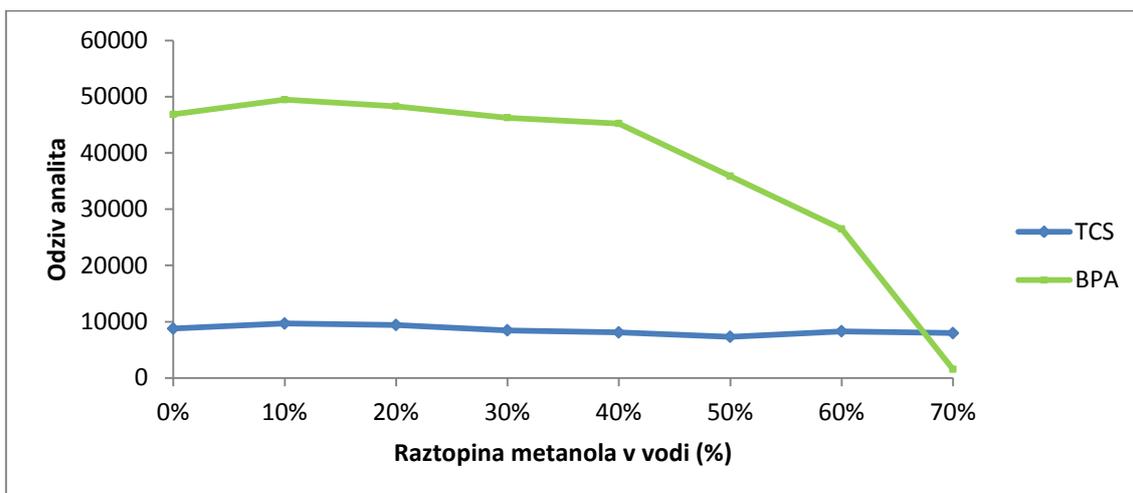
### 5.2.3 Optimizacija čiščenja vzorca

Po nanosu vzorca na nosilec Evolute ABN sledi spiranje nosilca. Le to je še posebej pomembno pri kompleksnih vzorcih, kot je urin. S spiranjem odstranimo morebitne nečistoče, pri urinu so to predvsem proteini in lipidi. To je izredno pomembno za nadaljnjo analizo, saj nam lahko nečistoče povzročajo težave pri kromatografski ločbi. Izbrati moramo takšno topilo, ki bo čim bolj odstranilo nečistoče, hkrati pa ne bo eluiralo BPA in

TCS. Za spiranje ekstrakcijskega nosilca po nanosu vzorca smo preizkusili različne koncentracije metanola ter acetonitrila.

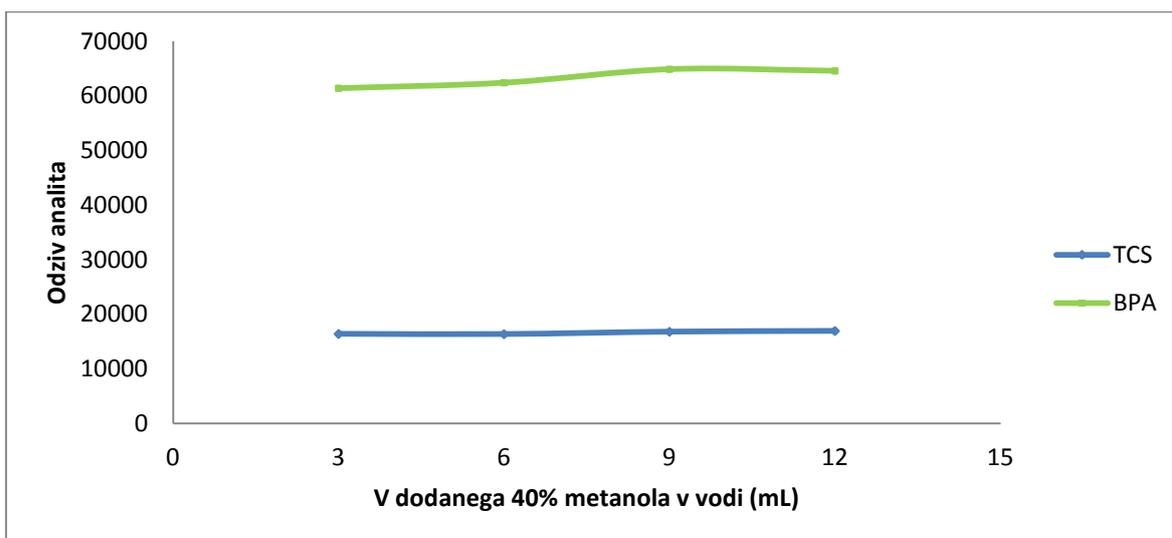
### Metanol

Vzorci, ki so vsebovali 50 ng/mL BPA in TCS, smo nanesti na ekstrakcijski nosilec. Nato smo za spiranje nosilca preizkusili različna topila. Nosilec smo spirali s 3 mL vodne raztopine metanola z različno koncentracijo-od 0 % (tu smo spirali le z destilirano vodo) pa do 70 % in pri tem gledali, kje je meja, ko se poleg nečistoč eluirata tudi iskana analita. Rezultati, ki smo jih dobili, so predstavljeni na sliki 18. TCS je neobčutljiv za spiranje z metanolom, saj se ni eluiral niti pri nanosu 70 % vodne raztopine metanola. BPA pa se je pri višjih koncentracijah metanola eluiral in zato le te niso primerne za spiranje nosilca. Mejna koncentracija, pri kateri še ni prišlo do elucije BPA, je 40 % raztopina metanola v vodi. To koncentracijo smo tudi izbrali za nadaljnje delo-to je najvišja koncentracija, pri kateri še ne pride do elucije iskanih analitov, hkrati pa z višjo koncentracijo tudi najbolj odstranimo nečistoče.



Slika 18: Določanje optimalne koncentracije metanola v vodi za spiranje ekstrakcijskega nosilca

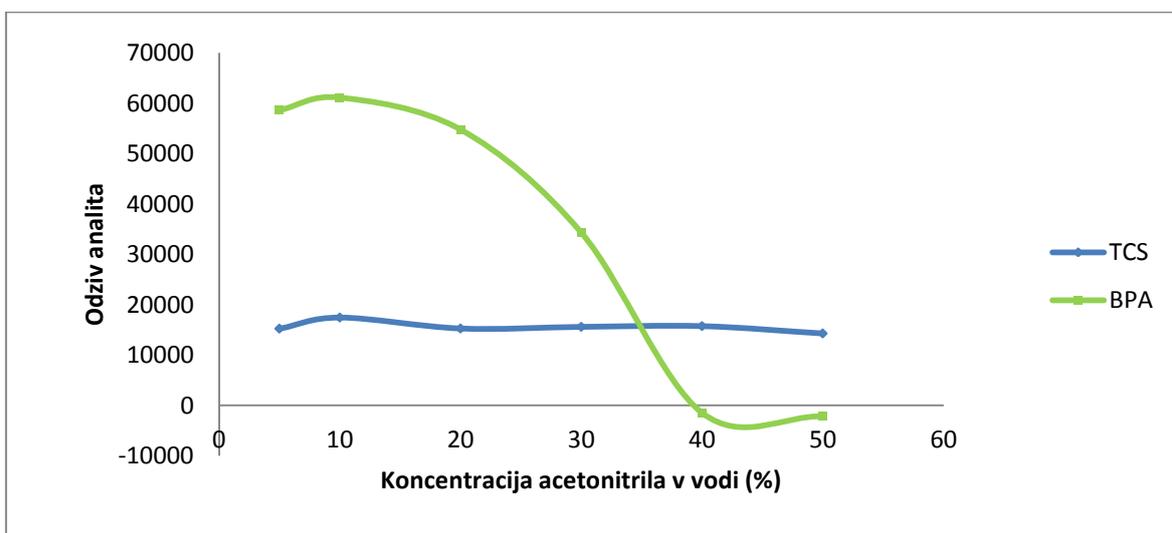
Nato smo preverili še vpliv različnih volumnov 40 % vodne raztopine metanola. Za spiranje nosilca smo izbrali 3 mL, 6 mL, 9 mL in 12 mL 40 % metanola v vodi. Rezultate predstavlja slika 19, ki prikazuje, da tudi pri večjih volumnih ne pride do elucije naših analitov.



Slika 19: Določanje optimalnega volumna 40 % vodne raztopine metanola za spiranje ekstrakcijskega nosilca

### Acetonitril

Vzorce, ki so vsebovali 50 ng/mL BPA in TCS smo nanesti na ekstrakcijski nosilec. Nato smo nosilec spirali s 3 mL destilirane vode, ter vodnimi raztopinami acetonitrila s koncentracijami od 10 pa do 50 %. Rezultati so predstavljeni na sliki 20.



Slika 20: Določanje optimalne koncentracije acetonitrila v vodi za spiranje ekstrakcijskega nosilca

Rezultati, ki smo jih dobili, kažejo, da se TCS ne spira z vodnimi raztopinami acetonitrila nižjimi od 50 %. BPA pa se začne eluirati iz nosilca že pri spiranju z 20 % raztopino acetonitrila v vodi. Pri 40 % vodni raztopini acetonitrila pa se eluira že celoten BPA. Mejna koncentracija, ki bi jo torej lahko uporabili, je 10 % vodna raztopina acetonitrila. Glede na rezultate, ki smo jih dobili, smo se odločili, da bomo za spiranje izbrali 40 % raztopino metanola v vodi. Za volumen metanola smo izbrali 6 mL, pred spiranjem z metanolom pa bomo nosilec sprali še s 3 mL destilirane vode. Če bi želeli z našo metodo analizirati večje število vzorcev, bi bilo smiselno uvesti še dodaten korak čiščenja. Po analizi večje količine urinskih vzorcev smo namreč opazili spremembe na GC koloni-podaljšali so se retencijski časi spojin, kromatogrami pa niso bili več tako ostri kot na začetku. To kaže, da postopek čiščenja vzorca pred samo analizo ni zadosten. Čistost ekstraktov bi lahko povečali z uvedbo dodatnega postopka čiščenja, kot je na primer uporaba ekstrakcijskega nosilca s silikagelom.

#### **5.2.4 Optimizacija elucije**

Elucija spojine iz ekstrakcijskega nosilca je eden ključnih korakov pri sami ekstrakciji. Za elucijo moramo izbrati topilo, ki tvori močnejše interakcije z našim analitom, kot pa so interakcije med analitom in sorbentom. Z elucijskim topilom moramo torej prekiniti interakcije med analitom in sorbentom. V našem primeru to lahko naredimo z nepolarnim ali srednje polarnim topilom. Naša naloga je bila poiskati topilo, ki bi z maksimalnim izkoristkom iz ekstrakcijskega nosilca eluiralo tako TCS kot BPA. Elucijska topila t.j. aceton, DCM in etilacetat, smo preizkusili pri nizkih koncentracijah BPA in TCS (1 ng/mL) ter pri visokih koncentracijah ( $c_{\text{BPA}}=45$  ng/mL,  $c_{\text{TCS}}=225$  ng/mL). Rezultati, ki smo jih dobili, so prikazani v tabelah XI in XII. Podani so kot razmerje med odzivom analita in odzivom IS.

Najboljšo elucijo BPA pri nizkih koncentracijah smo dosegli z DCM, sledi aceton, najslabšo elucijo pa smo dosegli pri uporabi etilacetata. Ker bi bil pri tako nizkih koncentracijah lahko vzrok za različne odzive BPA onesnaženje uporabljenih topil, smo preverili vsebnost BPA v samih topilih. To smo naredili tako, da smo posušili 5 mL elucijskega topila, ter vzorec derivatizirali. Rezultati, ki smo jih dobili, kažejo, da je manjša količina BPA prisotna v acetonu, v DCM in etilacetatu pa ne. Prav tako v topilih ni bil prisoten TCS.

Pri eluciji TCS smo pri nizkih koncentracijah dobili podoben rezultat pri vseh treh uporabljenih topilih, malce višji odziv smo dobili z DCM.

Tabela XI: Primerjava elucijskih topil pri nizki koncentraciji ( $c=1$  ng/mL)

VZOREC	Odziv BPA/ Odziv BPA-d16	Odziv TCS/ Odziv TCS-C13
DCM	0,72	0,83
ACETON	0,59	0,71
ETILACETAT	0,46	0,72

Pri visokih koncentracijah pa smo pri eluciji BPA dobili enak odziv pri vseh topilih, pri eluciji TCS pa smo najboljše odzive dosegli z acetonom.

Tabela XII: Primerjava elucijskih topil pri visoki koncentraciji ( $c_{\text{BPA}}=45$  ng/mL,  $c_{\text{TCS}}=225$  ng/mL)

VZOREC	Odziv BPA/ Odziv BPA-d16	Odziv TCS/Odziv TCS-C13
DCM	16,00	129,65
ACETON	15,78	156,03
ETILACETAT	16,19	130,62

Glede na rezultate smo se odločili, da bomo kot topilo za elucijo uporabili DCM. Le ta zadovoljivo eluira BPA in TCS pri nizkih koncentracijah, kar je zelo pomembno, saj želimo z izbrano metodo analizirati vzorce, kjer bosta izbrana analita prisotna v nizkih koncentracijah. Poleg tega smo dokazali, da DCM ne vsebuje BPA in zato z njegovo uporabo ne bomo dodatno kontaminirali vzorca. Prednost DCM je tudi ta, da je zelo hlapen, zaradi česar je čas sušenja eluata kratek, kar skrajša čas analize. DCM bomo uporabili tudi pri prvem koraku kondicioniranja ekstrakcijskega nosilca.

Pri optimizaciji SPE je pomembno določiti optimalen volumen topila za elucijo. Dodati moramo zadosten volumen topila, da omogočimo kvantitativno elucijo BPA in TCS. Večja količina topila pa pomeni daljši čas sušenja vzorca, zato želimo določiti minimalen volumen, saj bomo tako lahko skrajšali čas analize in preprečili prekomerno porabo organskih topil. Preizkusili smo 1,5 mL, 3 mL in 5 mL DCM. Rezultate prikazuje tabela XIII.

Tabela XIII: Vpliv volumna elucijskega topila na uspešnost elucije

<b>VOLUMEN (mL)</b>	<b>Odziv BPA/ odziv BPA-d16</b>	<b>Odziv TCS/odziv TCS-C13</b>
1,5	0,43	0,72
3	0,51	0,75
5	0,61	0,80

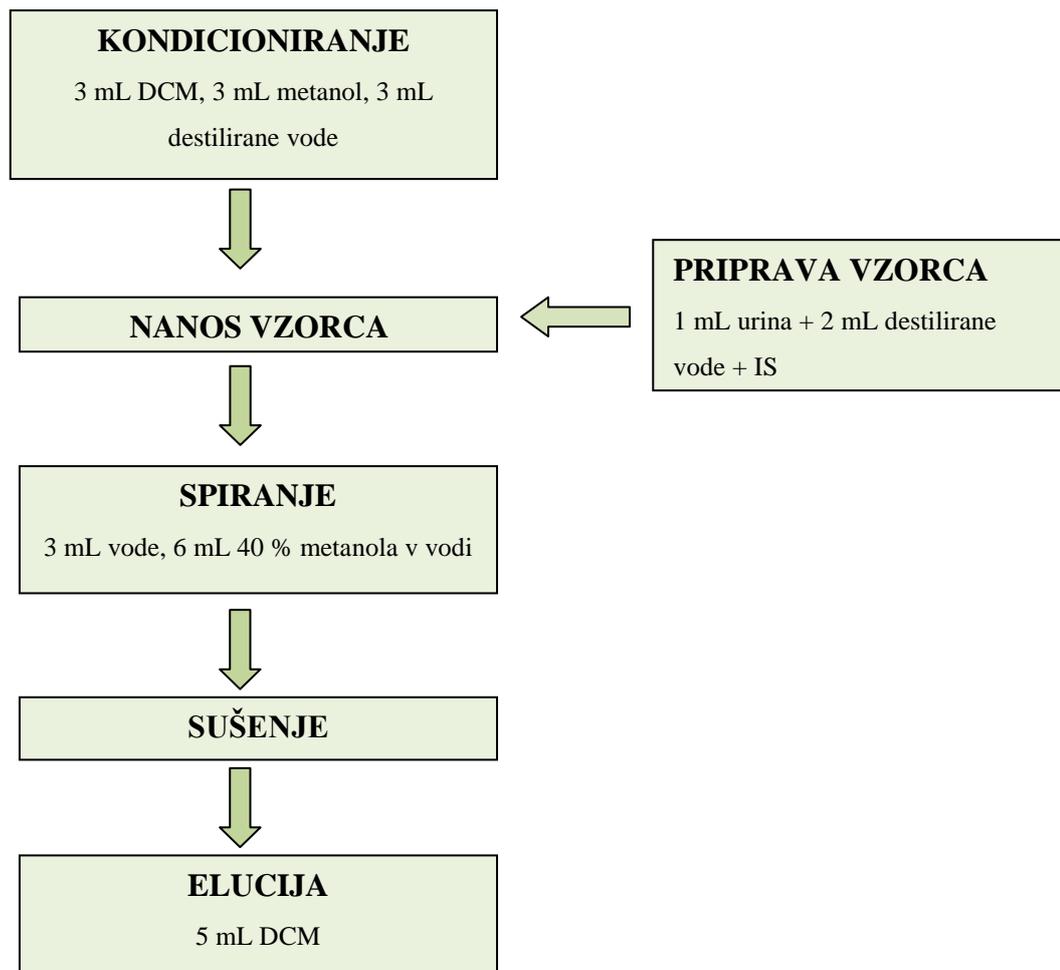
Glede na dobljene rezultate, smo se odločili, da bomo eluirali s 5 mL elucijskega topila.

### **5.3 Opis optimiziranih pogojev ekstrakcije**

#### **Priprava vzorcev**

1 mL urinskega vzorca smo razredčili z 2 mL destilirane vode, ter dodali 20  $\mu$ L IS BPA-d16 in TCS C-13 s koncentracijo 0,2  $\mu$ g/mL.

Nato smo izvedli SPE. S SPE lahko določimo le nekonjugirana analita. Če želimo v urinu določati celokupna BPA in TCS, moramo prej izvesti dekonjugacijo. Pri SPE smo uporabili ekstrakcijski nosilec Evolute ABN. Prvi korak pri ekstrakciji je bilo kondicioniranje nosilca, ki smo ga izvedli s 3 mL DCM, 3 mL metanola in 3 mL destilirane vode. S tem je bil nosilec pripravljen za nanos vzorca. Na nosilec smo nanесли 3 mL vzorca. Sledilo je spiranje s 3 mL vode in 6 mL 40 % metanola v destilirani vodi. Nosilec smo nato s pomočjo vakuumske črpalke posušili. Sušili smo 1 uro. Sledila je elucija naših spojin s 5 mL DCM, ob pretoku približno 2 mL/min. Eluat smo posušili s prepihanjem v toku dušika. Vzorce smo nato raztopili v DCM (1 mL), jih prenesli v vialo, ter posušili s prepihanjem v toku dušika. Slika 21 prikazuje izbrane pogoje ekstrakcije.



Slika 21: Grafični prikaz poteka SPE

### 5.3.1 Učinkovitost ekstrakcije

Učinkovitost ekstrakcije za obe spojini smo preverjali pri nizkih (1 ng/mL) in visokih koncentracijah ( $c_{\text{BPA}}=45$  ng/mL,  $c_{\text{TCS}}=225$  ng/mL). V vsakem koncentracijskem območju smo ekstrahirali 6 vzorcev. V 3 vzorce smo dodali BPA in TCS pred ekstrakcijo, v 3 pa po ekstrakciji. Interni standard smo v vzorce dodali po ekstrakciji. Z dodatkom internega standarda smo izravnali napake, do katerih bi lahko prišlo pri instrumentalni analizi. Iz razlike med koncentracijami BPA in TCS, ki smo jih določili, smo določili izkoristek ekstrakcije. Rezultati so prikazani v tabeli XIV.

Tabela XIV: Učinkovitost ekstrakcije

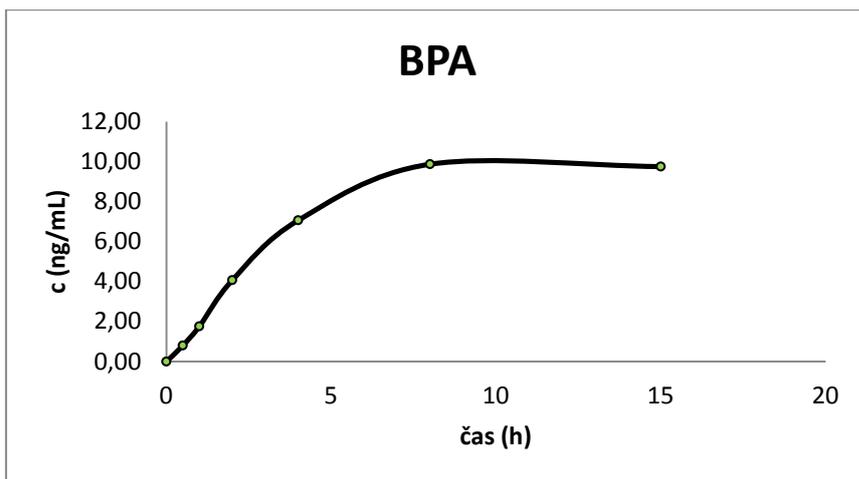
	<b>TCS</b>	<b>BPA</b>
NIZKA KONCENTRACIJA (c=1 ng/mL)	89 % ± 15%	91 % ± 12%
VISOKA KONCENTRACIJA (c <sub>BPA</sub> =45 ng/mL, c <sub>TCS</sub> =225 ng/mL).	102 % ± 8 %	108 % ± 4 %

Pri določanju pogojev ekstrakcije smo pogoje optimizirati tako, da je bil izkoristek čim bližje 100 %. Izkoristki ekstrakcije, ki smo jih dobili, so zadovoljivi in so načeloma manjši pri nižjih koncentracijah.

## 5.4 Optimizacija dekonjugacije bisfenola A

BPA in TCS se v urin izločita pretežno v konjugirani obliki. Glavni presnovek, ki se izloči v urin, je glukuronid, to je konjugat z glukuronsko kislino, okoli 20 % BPA pa se izloča v obliki sulfata. Kadar želimo določiti celokupni BPA in TCS je dekonjugacija prvi korak pri pripravi vzorca. Za pretvorbo konjugatov v aglikonsko obliko smo uporabili zmes encimov izoliranih iz prebavnega soka polža *Helix pomatia*, saj vsebuje encime z glukuronidazno ( $\beta$ -glukuronidaze) in arilsulfatazno aktivnostjo (sulfataze).

Konjugacijo smo izvedli pri optimalnih pogojih delovanja izbranega encima (37 °C in pH 5,2), preučevali pa smo različne čase, potrebne, da dekonjugacija v popolnosti poteče. Rezultate, ki smo jih dobili, prikazuje slika 22.

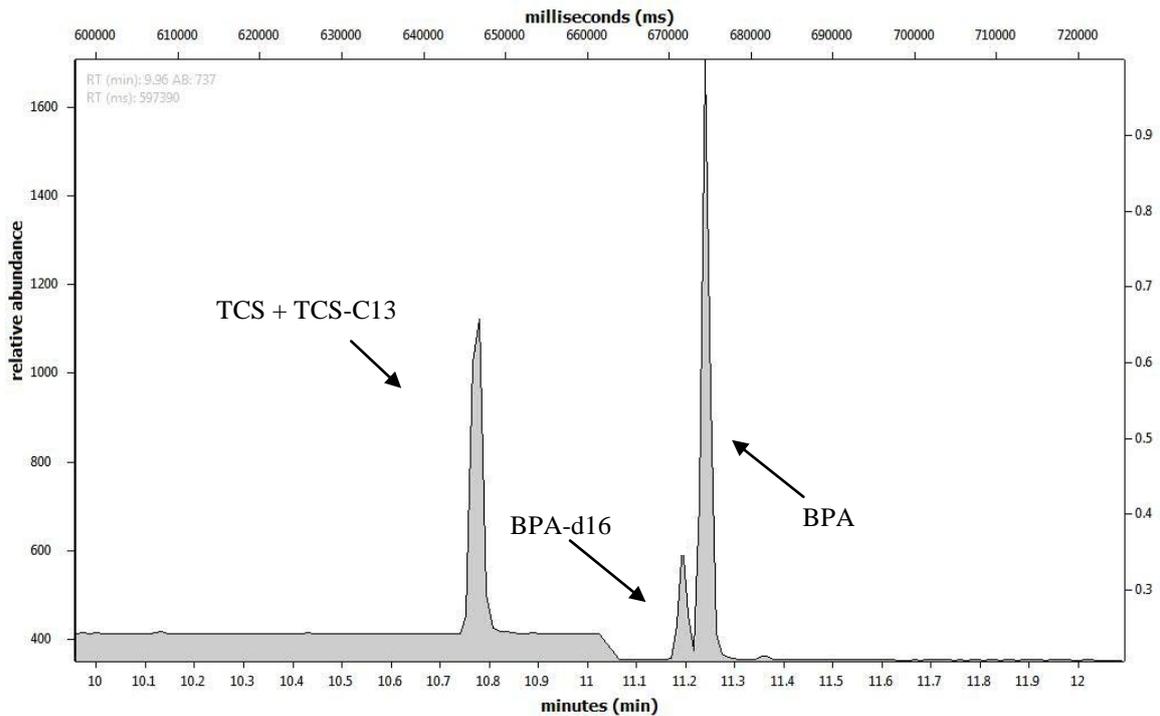


Slika 22: Uspešnost dekonjugacije pri različnih časih inkubacije

Dobljeni rezultati kažejo, da dekonjugacija z izbranim encimom v popolnosti poteče že po 8-ih urah. Ker tudi po 15-ih urah ne pride do bistvenih sprememb, smo se odločili, da bomo dekonjugacijo izvajali preko noči, ob stresanju pri 37 °C in 120 obratih/min. Za daljši čas smo se odločili tudi, ker se v vzorcu poleg BPA in TCS z dodanimi encimi dekonjugirajo tudi druge spojine, pa tudi koncentracija samega BPA v urinskih vzorcih je lahko različno visoka in so potrebni za kvantitativen potek dekonjugacije različno dolgi časi. Pokazali smo, da so izbrani pogoji dekonjugacije 15 h, 37 °C in 120 obratov/min, ustrezni. Če pa bi hoteli dekonjugacijo natančneje optimizirati, bi za to potrebovali ustrezen konjugiran standard.

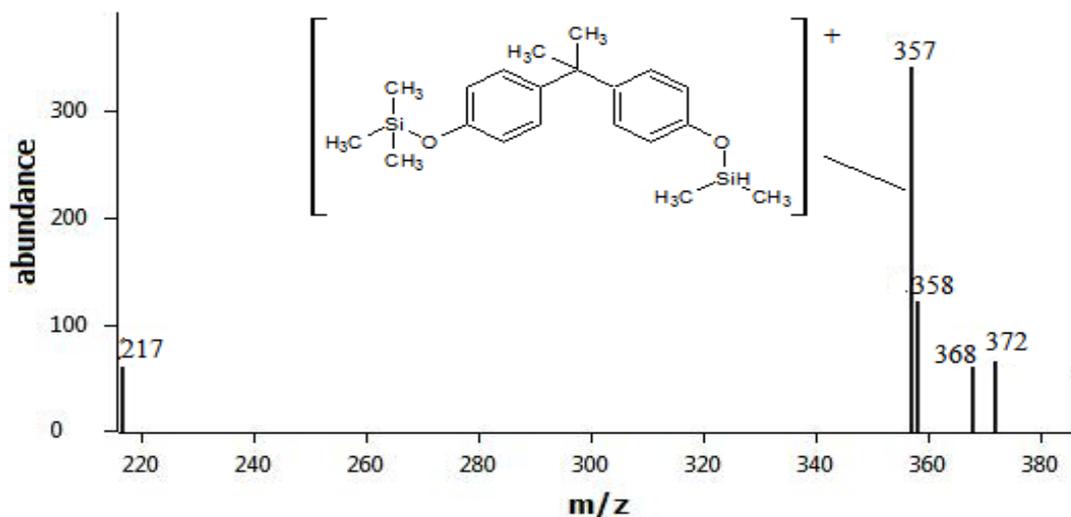
## 5.5 Izbira pogojev instrumentalne analize

S pogoji, ki smo jih izbrali pri analizi, smo uspeli doseči zadostno ločbo med TCS in BPA. Pod izbranimi pogoji, je bil retencijski čas BPA 11,24 min, retencijski čas BPA-d16 11,19 min, retencijska časa za TCS in TCS-C13 pa sta bila 10,78 min. Slika 23 prikazuje kromatogram spojin, kjer vidimo retencijske čase spojin. Vidimo, da se TCS in BPA ustrezno ločita med sabo. Prav tako sta na kromatogramu videna ločena vrhova za BPA in BPA-d16, medtem pa, ko se vrhova za TCS in TCS-C13 med sabo ne ločita, kar pa ne predstavlja težav, saj smo detekcijo izvajali z masno selektivnim detektorjem in smo za vsako spojino izbrali značilne ione, ki se med seboj razlikujejo.

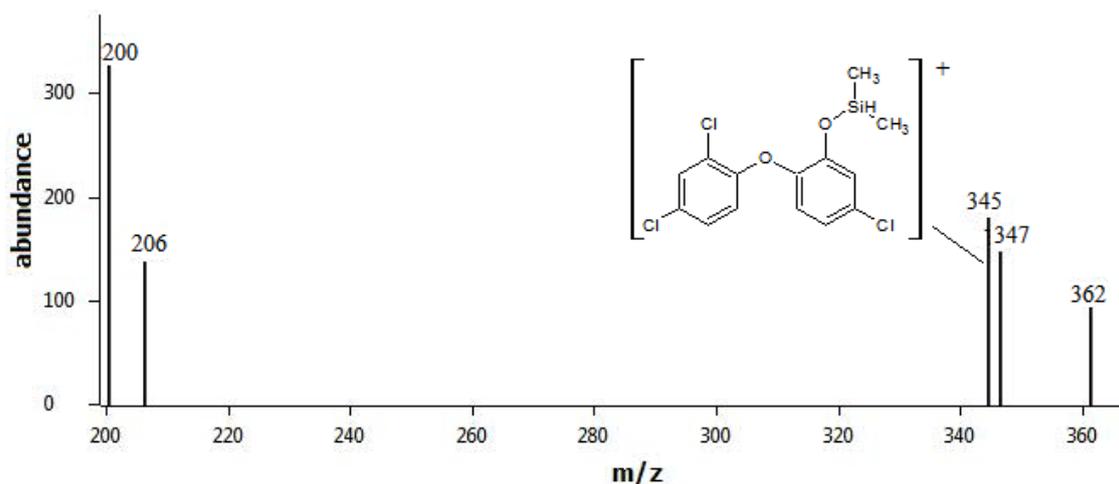


Slika 23: Kromatogram standardnih raztopin BPA in TCS

Za identifikacijo spojin nam je služil retencijski čas spojin in izbrani ioni v pravem razmerju. Za vsako spojino smo izbrali kvantifikacijski ion in 2 potrditvena iona. V spektru so morali biti prisotni vsi ioni, biti pa so morali tudi v ustreznem razmerju. Sliki 24 in 25 prikazujeta masna spektra BPA in TCS.



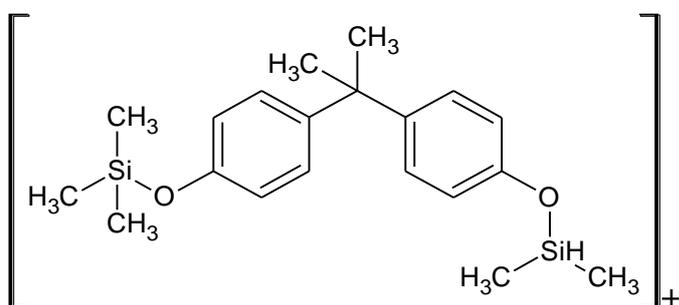
Slika 24: Masni spekter BPA (SIM)



Slika 25: Masni spekter TCS (SIM)

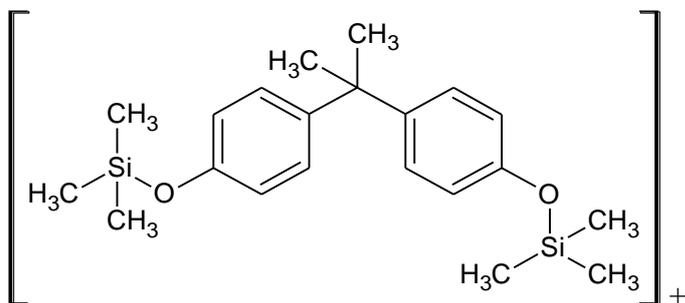
Masne spektre smo posneli v SIM načinu. S tem smo povečali občutljivost metode. Pri tem smo za vsako spojino izbrali značilne ione, t.i. kvantifikacijski ion in 2 potrditvena iona. Kot kvantifikacijski ion smo izbrali ion, ki je dal najvišji odziv. Dodatno smo izbrali še dva potrditvena iona, ki sta bila čim bolj specifična za spojino. To so običajno ioni z višjo molekularno maso. S prisotnostjo vseh treh ionov, ki so bili med sabo v ustreznem razmerju, smo lahko z gotovostjo potrdili, da gre za iskani analit. Večjega števila ionov nismo izbrali, saj bi s tem zmanjšali občutljivost metode.

V masnem spektru BPA daje najvišji odziv ion m/z 357, ki ga prikazuje slika 26. To je di-TMS derivat BPA, pri katerem pride do cepitve vezi med silicijem in metilno skupino. Zaradi visokega odziva smo ga izbrali kot kvantifikacijski ion.



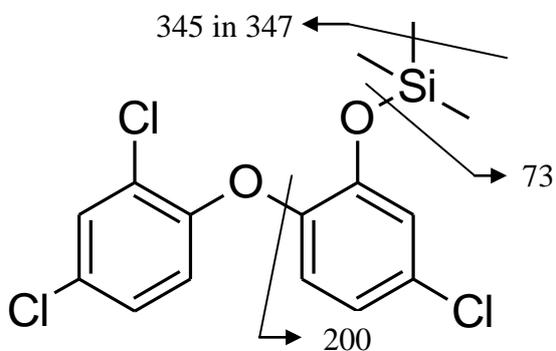
Slika 26: Kvantifikacijski ion za BPA (m/z 357)

Kot potrditveni ion smo izbrali molekulski ion di-TMS bisfenola A  $m/z$  372 (slika 27), ter ion  $m/z$  358, ki je protonirana oblika iona  $m/z$  357.

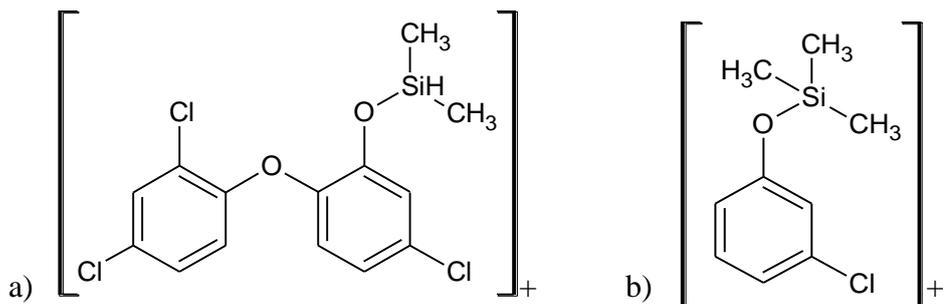


Slika 27: Molekulski ion BPA ( $m/z$  372)

V masnem spektru TCS smo dobili približno enak odziv za iona  $m/z$  347 in  $m/z$  345. Le to sta izotopa TCS ( $^{35}\text{Cl}$  in  $^{37}\text{Cl}$ ), pri katerih pride do cepitve vezi med metilno skupino in silicijem. Odločili smo se, da bomo kot kvantifikacijski ion upoštevali  $m/z$  347, iona  $m/z$  345 in  $m/z$  200 pa kot potrditvena iona. Slika 28 prikazuje fragmentacijo TMS-derivata triklosana in nastanek značilnih ionov (72), slika 29 pa iona  $m/z$  347 in  $m/z$  200.



Slika 28: Fragmentacija TCS



Slika 29: Kvantifikacijski ion (m/z 347) in potrditveni ion (m/z 200) za TCS

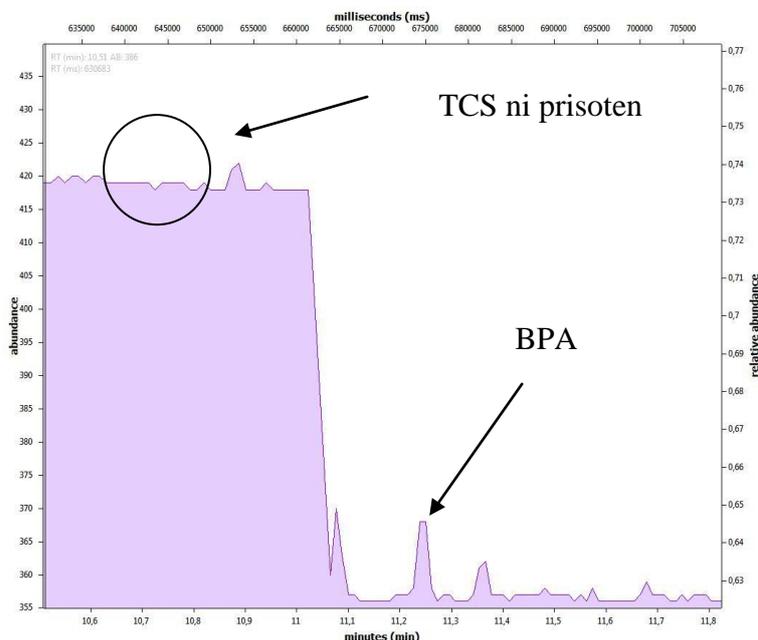
## 5.6 Določanje vira kontaminacije

Pri analizi smo imeli težave s kontaminacijo vzorcev, do katere je prišlo med eksperimentalnim postopkom. Slepri vzorci so namreč vsebovali visoke vrednosti BPA in TCS. Ker je koncentracija BPA in TCS v urinu zelo majhna, lahko kontaminacija moti analizo oziroma daje lažno previsoke rezultate.

BPA je zelo razširjen, zato je možnosti za kontaminacijo zelo velika. Najdemo ga v plastičnih vsebnikih, nastavkih za pipete, ekstrakcijskih nosilcih, vodi,.. Zaradi lepil, ki učvrščujejo iglo, so lahko vir kontaminacije tudi injekcijske igle, ki jih uporabljamo pri kromatografskem sistemu in pri odmerjanju manjših volumnov (65). TCS najdemo v čistilih-vzrok kontaminacije bi lahko bila uporaba pribora, očiščenega s čistilom, ki vsebuje TCS. Možni vzrok kontaminacije bi lahko bili tudi IS. Kontaminacijo smo poskušali odpraviti s čim manjšo uporabo plastičnega pribora: avtomatske pipete s plastičnimi nastavki smo nadomestili s steklenimi pipetami, pri ekstrakciji nismo uporabljali mravljične kisline, ki je bila shranjena v plastičnem vsebniku, steklovina je bila pred uporabo prežarjena na 400 °C. Naš namen je bil določiti vir visokih vrednosti BPA in TCS v slepih vzorcih in ga odstraniti.

Najprej smo preverili, koliko h končni kontaminaciji prispeva zadnji korak-derivatizacija in uporaba vial. V vialo brez vzorca smo dodali 50 µL MSTFA in 50 µL derivatizacijskega topila, derivatizirali ter analizirali. Že tu smo dobili odziv za BPA, kar prikazuje slika 30. Pri uporabi piridina kot derivatizacijskega topila smo dobili višje odzive, kot pa pri uporabi etilacetata, kar je bil tudi en izmed vzrokov, da smo se pri derivatizaciji odločili za uporabo etilacetata. Derivatizacijo smo poskusili izvesti tudi s svežim piridinom. Le-ta nam je dal

4-krat višje odzive za BPA. Vzrok so bila najverjetneje molekularna sita v svežem piridinu, ki so služila kot sušilno sredstvo.



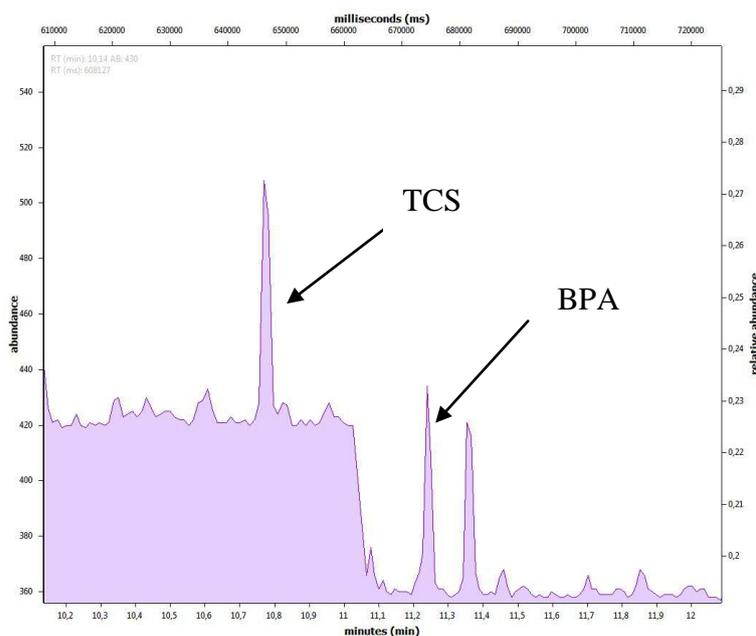
Slika 30: Določanje prisotnosti BPA in TCS v viali z MSTFA in piridinom

Preverili smo tudi doprinos uporabljenih topil h kontaminaciji. To smo storili tako, da smo posušili izbrano količino topila, ga prenesli v vialo in derivatizirali. Pri tem nismo opazili znatno povišanega odziva za BPA tako pri uporabi DCM, kot pri uporabi metanola.

IS, ki smo jih uporabili, niso povsem čisti (zagotovljena je 98 % čistost), zato nas je zanimalo, ali so IS vzrok kontaminacije. Tudi tu nismo zaznali znatno višjega odziva, v primerjavi s poskusom, ko smo uporabili samo vialo. Prav tako smo kot vzrok kontaminacije izločili uporabljeno vodo.

Preverili smo tudi doprinos ekstrakcijskega nosilca. Nosilci, ki smo jih uporabili, so iz polipropilenske plastike, ki naj ne bi vsebovala BPA. Vpliv ekstrakcijskega nosilca smo preverili tako, da smo ga kondicionirali po ustaljenem postopku. Nato smo ga posušili, ter izvedli elucijo z DCM. Eluat smo posušili, prenesli v vialo in derivatizirali. Po analizi smo določili visoke vrednosti BPA in TCS (slika 31). Možno bi torej bilo, da nosilci prispevajo znaten delež h končni kontaminaciji. Čeprav so sestavljeni iz polipropilenske plastike, pa lahko do kontaminacije z BPA pride med samim proizvodnim procesom.

Kontaminacijo vzorcev z BPA in TCS težko pripišemo samo enemu viru. K njej lahko prispevajo poleg zgoraj preverjenih virov tudi ostali koraki priprave vzorca, od uporabe plastičnih pipetnih nastavkov do ekstrakcijskih nosilcev. Če bi želeli popolnoma opustiti uporabo plastike pri pripravi vzorcev, bi to podražilo (stekleni ekstrakcijski nosilci) in podaljšalo čas analize (klasično pipetiranje s steklenimi nastavki). Zato bomo, preden se lotimo nadaljnje odprave kontaminacije, poiskusili vrednost kontaminacije ovrednotiti in, v kolikor bo le-ta konstantna, jo odšteti od vrednosti v vzorcih.



Slika 31: Določanje prisotnosti BPA in TCS v ekstrakcijskem nosilcu

## 5.7 Validacija metode

### 5.7.1 Selektivnost

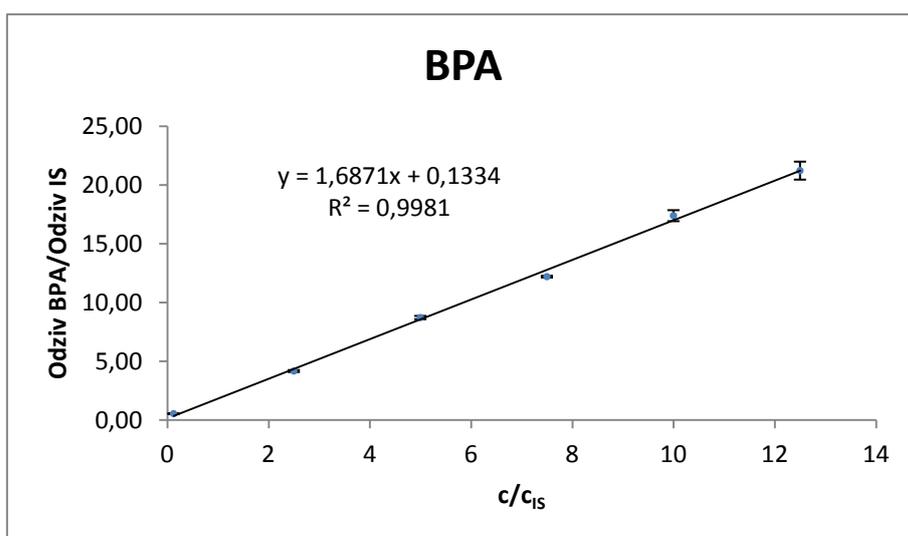
Selektivnost metode smo za izbrana analita potrdili z določanjem retencijskih časov, ki je znašal za BPA 11,24 min in za TCS 10,78 min. Prav tako smo jo potrdili z določanjem značilnih ionov, ki so morali biti prisotni, biti pa so morali tudi v pravilnem razmerju.

Ko smo v GC kolono injicirali samo topilo, nismo zaznali vrhov pri izbranih retencijskih časih za BPA in TCS. Pri analizi urinskega vzorca pa smo zaznali vrhova za BPA in TCS. Ko smo urinskemu vzorcu dodali majhno količino standarda, sta se ta vrhova povečala.

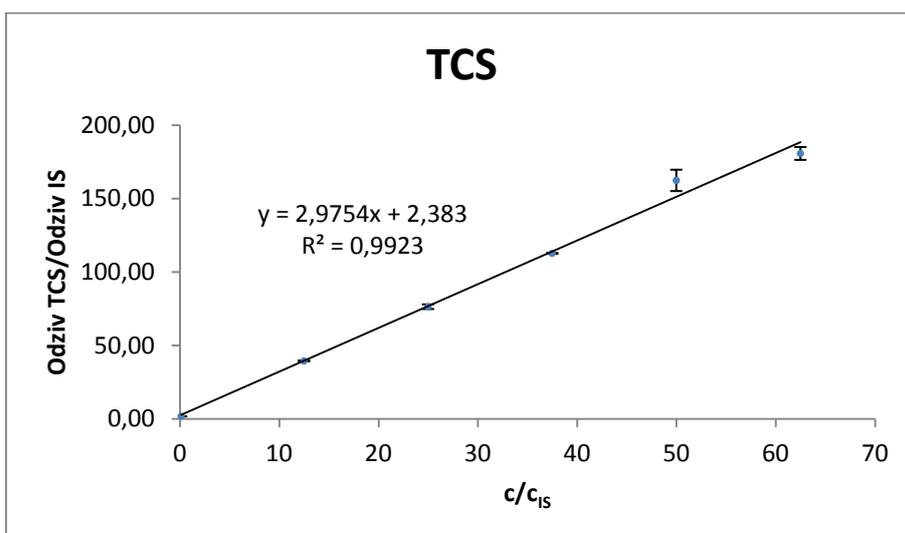
### 5.7.2 Linearnost

Linearnost metode smo preverili za vsak analit posebej. Koncentracijsko območje, ki smo ga izbrali za določitev linearnosti, je bilo za BPA od 0,5-50,0 ng/mL in za TCS od 0,5-250,0 ng/mL. Za spodnjo mejo smo izbrali 0,5 ng/mL, saj smo v tem območju pričakovali LOQ, zgornjo mejo pa smo izbrali glede na podatke v literaturi.

Rezultate smo grafično obdelali in določili umeritveno premico po metodi linearne regresije. Umeritveni premici za BPA in TCS prikazujeta sliki 32 in 33.



Slika 32: Umeritvena premica za BPA



Slika 33: Umeritvena premica za TCS

Za BPA smo potrdili linearnost v območju 0,5-50,0 ng/mL.  $R^2$  v tem območju znaša 0,9981, enačba premice pa je  $y = 1,6871x + 0,1334$  (slika 32). Za TCS pa smo linearnost potrdili v območju od 0,5-250,0 ng/mL.  $R^2$  v tem območju je 0,9923, enačba premice pa je  $y = 2,9754x + 2,383$  (slika 33).

### 5.7.3 Meja detekcije in meja kvantifikacije

LOD smo določali kot 3-kratno standardno deviacijo slepega vzorca, LOQ pa kot 10-kratno standardno deviacijo slepega vzorca. Vrednosti LOD in LOQ, ki smo jih dobili (tabela XV), so primerljive z vrednostmi drugih laboratorijev, ki so za določevanje uporabljali isto metodo. Calafat s sodelavci (65) je prav tako z GC-MS določila LOD za BPA 0,1 ng/mL, Gatidou s sodelavci (70) pa je za BPA določila LOD 0,14 ng/mL, za TCS pa 0,13 ng/mL. Vrednosti za LOD in LOQ sta zadosti nizki, da lahko določimo celokupni BPA in TCS v urinu, za določanje prostih analitov v urinu pa bi bilo potrebno mejo kvantifikacije še znižati.

Tabela XV: LOD in LOQ za vpeljano metodo

	<b>TCS</b>	<b>BPA</b>
LOD (ng/mL)	0,16	0,21
LOQ (ng/mL)	0,54	0,70

### 5.7.4 Točnost in natančnost

Točnost in natančnost smo za BPA in TCS določali pri treh različnih koncentracijah, pri vsaki koncentraciji pa smo naredili 3 ponovitve. Točnost smo določali kot razmerje med določeno in pravo vrednostjo, ter rezultat izrazili v odstotkih, natančnost metode pa smo izrazili kot koeficient variacije izvedenih meritev. Točnost se je pokazala slabša pri nižjih koncentracijah. To smo tudi pričakovali, saj smo imeli težave z visokimi koncentracijami BPA in TCS v slepem vzorcu, kar se je med drugim odrazilo tudi s slabšo točnostjo pri nizkih koncentracijah. Pri višjih koncentracijah pa vrednosti slepega vzorca ne predstavljajo več tolikšne napake. Tu se je pokazala težava naše metode, saj želimo z njo določati nizke koncentracije BPA in TCS. Koncentracije BPA v urinu so običajno v območju nekaj ng/mL. Koncentracije BPA, ki smo jih dobivali v slepih vzorcih, pa so se

gibale okoli 1 ng/mL. Koncentracije v slepih vzorcih smo odšteli od izmerjene vrednosti, a težava je bila tudi variabilnost rezultatov slepih vzorcev. Le ti so bili dokaj konstantni znotraj enega dneva, vrednosti med različnimi dnevi pa so se znatno razlikovale med sabo. Ponovljivost je tako pri BPA, kot pri TCS zadovoljiva. Do odstopanj je lahko prišlo zaradi nenatančnega pipetiranja standardov, subjektivne integracije kromatogramov,.. Težava pa je rigidnost oz. ponovljivost pri različnih dnevih. Tu so se pojavila velika odstopanja pri nizki koncentraciji. Vzrok za to so najbrž vrednosti v slepih vzorcih, ki so variabilne med različnimi dnevi. Delna rešitev za to težavo bi bila, da pred vsakimi meritvami pomerimo slepe vzorce in jih nato odštejemo od rezultata. Trajna rešitev pa bi bila odprava kontaminacije slepih vzorcev, ki pa je nismo uspeli doseči.

Dobljeni rezultati so podani v tabeli XVI.

Tabela XVI: Točnost in natančnost

	<b>Izmerjena konc.(ng/mL)</b>	<b>Izmerjena – slepa konc. (ng/mL)</b>	<b>Točnost (%)</b>	<b>Ponovljivost (%)</b>	<b>Rigidnost (%)</b>
<b>c BPA</b>					
1 ng/mL	1,6	0,9	90	2	10
20 ng/mL	20,7	20,0	100	2	/
45 ng/mL	46,7	46,1	102	5	6
<b>c TCS</b>					
1 ng/mL	1,7	0,95	95	5	19
100 ng/mL	102,5	101,8	102	2	/
225 ng/mL	257,5	256,7	114	1	4

Metodo smo validirali. Validacija v celoti ne ustreza zahtevam. Težavo predstavljata predvsem točnost in rigidnost pri nizkih koncentracijah (1 ng/mL), vzrok za to pa so variabilne vrednosti BPA in TCS dobljene v slepih vzorcih.

## **5.8 Določanje koncentracije v realnih urinskih vzorcih**

Vzorce smo analizirali z razvito metodo. Od dobljenih koncentracij smo odšteli slepo vrednost za ekstrakcijo vodnega vzorca, ki je za BPA znašala 0,69 ng/mL, za TCS pa 0,73 ng/mL. Rezultati so zbrani v tabeli XVII.

Tabela XVII: Vrednosti BPA in TCS izmerjene v realnih vzorcih

		<b>c TCS (ng/mL)</b>	<b>c BPA (ng/mL)</b>
Urin A	prosti	pod LOQ	pod LOQ
	celokupni	0,97	9,47
Urin B	prosti	pod LOQ	pod LOQ
	celokupni	0,88	1,65
Urin C	prosti	pod LOQ	pod LOQ
	celokupni	pod LOQ	pod LOQ
Urin D	prosti	pod LOQ	pod LOQ
	celokupni	0,68	pod LOQ

Pri nobenem vzorcu nismo uspeli kvantitativno določiti prostega BPA ali TCS. Vse vrednosti so bile pod LOQ. To je tudi skladno s pričakovanji-proste oblike naj bi bilo v urinu od 5-10 %. Te vrednosti pa so pod LOQ za našo metodo. To potrjujejo literaturni podatki, ki kažejo, da je bila prosta oblika BPA in TCS določena pri majhnem številu ljudi. Volkel je s sodelavci pri določanju prostega BPA v 474 urinskih vzorcih le tega določil v 10 %, vsi so bili v koncentracijah nižjih od 2,5 ng/mL (26). V drugi raziskavi, ki je bila izvedena na dojenčkih pa so prosti BPA dokazali le v 3 %, celokupni BPA pa v 42 %, vrednosti pa so se gibale med <LOQ, ki je bila 0,45 ng/mL in 17,85 ng/mL (63).

BPA smo po dekonjugaciji kvantitativno določili v dveh vzorcih. V ostalih dveh vzorcih smo BPA lahko detektirali, a ker je bila vrednost pod LOQ, ga nismo mogli kvantitativno določiti. Vrednosti, ki smo jih določili za BPA, sta bili 1,65 ng/mL in 9,47 ng/mL. Celokupen TCS pa smo lahko kvantitativno določili pri treh vzorcih. Vrednosti pri TCS so se gibale od 0,68-0,97 ng/mL. Vrednosti smo določali v naključnih vzorcih urina-za bolj natančno analizo in določanje dejanske obremenjenosti ljudi z BPA in TCS bi bilo smiselno določiti še vrednost kreatinina, s čimer bi omejili variacije zaradi različne koncentriranosti urina.

## 6. SKLEP

BPA in TCS sta okoljski onesnažili, ki sta prisotni v vrsti produktov uporabljenih v vsakdanjem življenju. To povzroča vnos teh snovi v telo. Ker imata oba že v majhnih koncentracijah vpliv predvsem na endokrini sistem, je pomembno določiti njune vsebnosti v telesu. Pri diplomski nalogi smo razvili metodo za hkratno določanje TCS in BPA v urinu.

Vsebnost BPA in TCS v urinskih vzorcih smo določali s plinsko kromatografijo z masno selektivnim detektorjem. Pred samo analizo smo optimizirali postopek priprave vzorca. Dekonjugacijo smo izvedli z  $\beta$ -glukuronidazo, potekala pa je 15 ur. Dokazali smo, da dekonjugacija kvantitativno poteče sicer že v krajšem času, a zaradi variabilnih koncentracij BPA in TCS v urinu smo izbrali daljši čas. Vzorec smo očistili in koncentrirali s SPE. Kot ekstrakcijski nosilec smo izbrali Evolute ABN. Ekstrakcijo smo izvedli pri nevtralnem pH, saj smo dokazali, da pH ne vpliva na sam izkoristek ekstrakcije. Čistost ekstraktov smo omogočili s spiranjem kolone po nanosu vzorca. Le to smo spirali s 3 mL vode in 6 mL 40 % metanola v vodi. Ta način čiščenja ekstraktov ni optimalen, zato bi bilo ob analiziranju večje količine vzorcev smiselno bolje optimizirati ta korak. Elucijsko topilo, ki smo ga izbrali, je DCM. Dokazali smo, da omogoča hkratno elucijo BPA in TCS. Sledila je derivatizacija, ki smo jo izvedli. z MSTFA in etilacetatom pri termostatisiranju vzorca za pol ure na 60 °C.

Metodo, ki smo jo razvili, smo nato validirali. Linearnost metode smo za BPA potrdili v območju od 0,5-50,0 ng/mL, za TCS pa v območju od 0,5-250,0 ng/mL. LOQ za izbrano metodo je znašal za BPA 0,7 ng/mL, za TCS pa 0,5 ng/mL. Te vrednosti so dovolj nizke, da omogočajo določanje celokupnega BPA in TCS v urinskih vzorcih. Koncentracije prostega BPA in TCS pa so prenizke, da bi jih lahko z našo metodo zanesljivo kvantitativno določili. Natančnost rezultatov znotraj dneva je primerna, medtem ko pa smo imeli težave z natančnostjo pri nizkih koncentracijah med različnimi dnevi. Vzrok za to so visoke koncentracije BPA in TCS v slepem vzorcu. Le te so nam pri razvoju metode povzročale največ težav. BPA je namreč tako široko prisoten, da se mu je nemogoče v popolnosti izogniti. Kljub številnim poskusom, da bi zmanjšali vrednost BPA in TCS v slepih vzorcih, nam to ni v popolnosti uspelo. Kontaminacija slepih vzorcev je nihala v območju 0,5-1,0 ng/mL, kar je moteče pri določanju analitov v sledovih. Težava je bila

tudi nekonstantna vsebnost BPA in TCS v slepih vzorcih. Pri analizi v enem dnevu smo uspeli zagotoviti konstantne vrednosti slepih vzorcev, pri analizi med različnimi dnevi pa so bili slepi vzorci variabilni.

Z razvito metodo smo analizirali 4 urinske vzorce. Prostega TCS in BPA nismo uspeli kvantitativno določiti, saj so bile vse vrednosti pod mejo kvantifikacije za našo metodo. To je v skladu s pričakovanji, saj so koncentracije prostega BPA in TCS običajno zelo nizke. Celokupni BPA je bil nad mejo kvantifikacije pri dveh vzorcih, vrednosti so bile 1,65 ng/mL in 9,45 ng/mL. Celokupni TCS pa smo kvantitativno določili v treh vzorcih, vrednosti so bile med 0,68 ng/mL in 0,97 ng/mL. Dobljene vrednosti se skladajo z vrednostmi, ki so opisane v literaturi, vendar je njihova zanesljivost zaradi možne nekonstantne kontaminacije vprašljiva.

Dobljene vrednosti pa nam ne povejo veliko o dejanski izpostavljenosti BPA in TCS, saj ne poznamo koncentriranosti urinskega vzorca. Če bi želeli vzorce primerjati med sabo, bi potrebovali tudi podatke o kreatininu, ali pa bi morali zbirati 24 urni urin.

Razvita metoda v sedanji obliki ni optimalna za določanje BPA in TCS v urinu. Njena glavna slabost so visoke in neponovljive koncentracije BPA in TCS v slepih vzorcih, kar bo potrebno v prihodnje odpraviti.

## 7. LITERATURA

1. K. Sexton, L.L. Needham, J.L. Pirkle: Human biomonitoring of environmental chemicals. *Am Scientist* 2004; 92: 38–45
2. M. Esteban, A. Castaño: Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environment International* 2009; (35): 438–449
3. M. Rupnik: Fiziologija ledvic. *Med razgl* 2005; 44: 235–256
4. I. Avberšek Lužnik, et al.: Vaje iz klinične kemije 1, Študijsko gradivo za študente UŠ farmacije, Ljubljana 2010
5. I. Rykowska, W. Wasiak: Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives. *Acta chromatographica* 2006; (16): 7-27
6. X. Cao: Background paper on chemistry and analytical methods for determination of bisphenol a in food and biological samples, WHO 2011
7. Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A Summary Report
8. X. Li, G. Ying, J. Zhao, Z. Chen, H. Lai, H. Su: 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environment international* 2011;
9. A. Ballesteros-Gomez, S. Rubio, D. Perez-Bendito. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A* 2009, (1216): 449–469
10. A. M. Calafat, et. al.: Urinary Concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a Human Reference Population. *Environ Health Perspect* 2005; (113):391-395
11. J. Kang, F. Kondo, Y. Katayama: Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006; (226): 79–89
12. L. N. Vandenberg, M. V. Maffini, C. Sonnenschein, B. S. Rubin, A. M. Soto: Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocrine Reviews* 2009; (30):75–95
13. 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* 2006; (147): S56–S69

14. W. Volkel: Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical research in toxicology* 2002; (10):1281-7
15. W. Dekant, W. Volkel: Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and applied pharmacology* 2007; (228): 114-134
16. 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. *Biochem. J.* 1999; (340): 405- 409
17. X. Ye, Z. Kuklenyik, L. L. Needham, A. M. Calafat: Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2005; (383): 638–644
18. J. Matsumoto, H. Yokota, and A. Yuasa: Developmental Increases in Rat Hepatic Microsomal UDP-Glucuronosyltransferase Activities toward Xenoestrogens and Decreases during Pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2002; (110): 193–196
19. Krishnan et al.: Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 1993; (132): 2279-2286
20. R. Steinmetz: The Xenoestrogen Bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology* 1998; (139): 2741-2747
21. P. Alonso-Magdalena et al: Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2012, (355): 201–207
22. N. Ben-Jonathan: Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; (304): 49-54
23. B. S. Rubin: Bisphenol A :An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2011; (127): 27–34
24. C. Arakawa, et. al.: Daily urinary excretion of bisphenol A. *Environmental health and preventive medicine* 2004; (9): 22–26
25. F. S. vom Saal, C. Hughes: An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 2005; (113): 926–933

26. W. Volkel, M. Kiranoglu, H. Fromme: Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicology Letters* 2008; (179):155–162
27. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:EN:PDF>
28. A. G. Asimakopoulos, N. S. Thomaidis, M. A. Koupparis: Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicology Letters* 2012; (210):141-154
29. L. N. Vandenberg, et. al.: Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2010; (118): 1055–1070
30. A. D. LaFleur, K. A. Schug: A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Analytica Chimica Acta* 2011; (696): 6–26
31. [http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/1\\_chemistry\\_analytical\\_methods.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/1_chemistry_analytical_methods.pdf)
32. T. Geens, H. Neels, A. Covaci: Sensitive and selective method for the determination of bisphenol-A and triclosan in serum and urine as pentafluorobenzoate-derivatives using GC–ECNI/MS. *Journal of Chromatography B*, 2009; (877): 4042–4046
33. Jure Bergles: Optimizacija metode merjenja vsebnosti hormonskih motilcev v površinskih in odpadnih vodah, diplomska naloga FFA, 2008
34. S. Berkner, G. Streck, R. Herrmann: Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere* 2004, (54): 575–584
35. A. Sharef, M. J. Angove, J. D. Wells. Optimization of silylation using *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, *N,O*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and *N*-(*tert*-utyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17<sub>β</sub>-ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006; (1108): 121–128
36. R. Carabias-Martinez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz: Determination of endocrine-disrupting compounds in cereals by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. Study of background contamination. *Journal of Chromatography A* 2006; (1137): 207–215

37. X. Cao et.al.: Background bisphenol A in experimental materials and its implication to low-dose in vitro study. *Chemosphere* 2010; (81): 817–820
38. M. Petrovic, E. Eljarrat, M. J. Lopez de Alda, D. Barcelo: Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A* 2002; (974): 23–51
39. A. Piccoli, J. Fiori, V. Andrisano, M. Orioli: Determination of triclosan in personal health care products by liquid chromatography (HPLC). *Il Farmaco* 2002; (57): 369–372
40. R. Reiss, N. Mackay, C. Habig, J. Griffin: An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2002; (21): 2483–2492
41. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_023.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_023.pdf)
42. Triclosan-White paper prepared by the alliance for the prudent use of antibiotics (APUA). January 2011
43. J. Fang, et. al.: Occurrence, Efficacy, Metabolism, and Toxicity of Triclosan. *Journal of Environmental Science and Health* 2010; (28): 147–171
44. L. Sanchez-Prado, M. Llompart, et all: Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction 2006, (65):1338-1347
45. European Economic Community Council Directive 76/768 EEC (Appendix VI 81976)
46. R. P. Massengo-Tiassé, J. E. Cronan: Diversity in Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductases. *Cellular and molecular life sciences* 2009, (66):1507-1517
47. A. Rita, M. Silva, J.M.F. Nogueir: New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrice. *Talanta* 2008; (74): 1498–150
48. M. Allmyr, M. Adolfsson-Erici, M. S. McLachlan, G. Sandborgh-Englund: Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Science of the Total Environment* 2006; (372) 87–9
49. M. P. Cullinan, J. E. Palmer, A. D. Carle, M. J. West, G. J. Seymour: Long term use of triclosan toothpaste and thyroid function. *Sci total environ* 2012; (416):75-79
50. G. Ying, R. S. Kookana: Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environment International*. 2007; 199–205

51. M. G. Cantwell, et. al.: Temporal trends of triclosan contamination in dated sediment cores from four urbanized estuaries: Evidence of preservation and accumulation. *Chemosphere* 2010; (78): 347–35
52. K. M. Crofton, K. B. Paul, M. J. DeVito, J. M. Hedge: Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2007; (24): 194–197
53. T. Moss, D. Howes, F. M. Williams: percutaneous penetration and dermal metabolism of triclosan (2,4,4'-trichloro-2'- hydroxydiphenyl ether). *Food and Chemical Toxicology* 2000; (38): 361-370
54. S. C Moldoveanu, V. David: *Sample preparation in chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2002: 3-12, 341-373
55. D. Kealey, P. J. Haines: *Analytical chemistry*, Bios scientific publisher 2002, 109-119
56. A. Żwir-Ferenc, M. Biziuk: *Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications*. *Polish J. of Environ.* 2006; (15): 677-690
57. J. R. Dean: *Extraction techniques in analytical sciences*. Wiley 2009, 49-67
58. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
59. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/97892141564274\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/97892141564274_eng.pdf)
60. D. G. Watson: *Pharmaceutical analysis, a textbook for Pharmacy students and pharmaceutical chemists*, Churcil Livingstone 1999, London
61. Skoog, West, Holler, Crouch: *Fundamentals of analytical chemistry*, 8th edition, Thomson learning 2004, 1026-1030
62. S. Moors, M. Blaszkewicz, H. M. Bolt, Gisela H. Degen: Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in human urine by a fast and simple method using SPE and GC-MS. *Mol.Nutr. Food research* 2007; (51): 787-798
63. W. Volkel, M. Kiranoglu, H. Fromme: Determination of free and total bisphenol A in urine of infants. *Environmental research* 2011; (111): 143-148
64. <http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/HPLC/chroma3.html>
65. Y. Watabe, T. Kondo, H. Imai, M. Morita, N.Tanaka, K. Hosoya. Reducing bisphenol A contamination from analytical procedures to determine ultralow levels in environmental samples using automated HPLC microanalysis. *Anal. Chem.* 2004, (76): 105-109

66. L. Birosova, M. Mikulasova: Development of triclosan and antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology* 2009; (58): 436–441
67. M. M. Houck, J. A. Siegel: *Fundamentals of forensic science*, second edition, Elsevier Ltd. 2010, str.141-145
68. [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002662.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf) Direktiva CPMP/ICH/381/95.
69. Triclosan- Priority Existing Chemical, Assessment Report No. 30, 2009
70. L. Campbell, M. J. Zirwas: Triclosan. *Dermatitis*, 2006; (17): 204-207
71. G. Gatidou, et al.: Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1138 (2007) 32–41
72. T. Chalew: *Chemical indicators of surface water pollution*, doktorska naloga, 2006