

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA HUDOKLIN  
MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA HUDOKLIN

**FOTOKATALITSKA OKSIDACIJA BISFENOLA A IN NJEGOVIH ANALOGOVI  
Z IMOBILIZIRANIM TiO<sub>2</sub>**

**PHOTOCATALYTIC OXIDATION OF BISPHENOL A AND ITS ANALOGS  
WITH IMMOBILIZED TiO<sub>2</sub>**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Kemijskem inštitutu pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Boštjana Erjavca, univ. dipl. inž. kem. inž.. Spektroskopske meritve, elementne analize, mikroskopijo in druga merjenja smo opravili na Kemijskem inštitutu, v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo.

*Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za vso pomoč, usmerjanje in spodbude pri pisanju magistrske naloge. Zahvala gre tudi dr. Boštjanu Erjavcu, univ. dipl. inž. kem. inž. in doc. dr. Tatjani Tišler za pomoč in nasvete pri izvedbi praktičnega dela magistrske naloge ter ostalim sodelavcem Laboratorija za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu. Posebna zahvala gre moji družini in Tomažu za vso potrpežljivost in spodbude na moji študijski poti.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Boštjana Erjavca, univ. dipl. inž. kem. inž..

Ljubljana, 2014

Petra Hudoklin

# KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	ii
KAZALO SLIK.....	iv
KAZALO PREGLEDNIC.....	vi
POVZETEK .....	vii
ABSTRACT .....	ix
SEZNAM OKRAJŠAV.....	xi
1 UVOD.....	1
1.1 ENDOKRINI SISTEM.....	1
1.2 HORMONSKI MOTILCI .....	1
1.2.1 ODSTRANJEVANJE HORMONSKIH MOTILCEV .....	3
1.2.2 ODKRIVANJE HORMONSKIH MOTILCEV .....	5
1.3 BISFENOL A IN NJEGOVI ANALOGI.....	7
1.3.1 BISFENOL A .....	7
1.3.2 BISFENOL AF.....	13
1.3.3 BISFENOL F.....	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE .....	18
3.1. MATERIALI .....	18
3.2. METODE .....	18
3.2.1 FOTOKATALIZA .....	18
3.2.2 PRIPRAVA KATALIZATORJA.....	19
3.2.3 KARAKTERIZACIJA KATALIZATORJA.....	20
3.2.4 PRIPRAVA RAZTOPIN BPA, BPF IN BPAF .....	20
3.2.5 IZVEDBA FOTOKATALIZE (FOTOLIZE).....	21
3.2.6 KEMIJSKE ANALIZE VZORCEV .....	22

3.2.6.1	TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI .....	22
3.2.6.2	UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA .....	23
3.2.6.3	MERITEV TOTALNEGA ORGANSKEGA OGLJIKA (TOC) .....	24
3.2.6.4	OSTALE KEMIJSKE ANALIZE .....	25
3.2.7	EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE).....	25
3.2.8	BIOLOŠKE ANALIZE VZORCEV .....	26
3.2.8.1	ESTROGENSKI TEST S KVASOVKAMI (YES) .....	26
3.2.8.2	IZVEDBA YES TESTA.....	27
3.2.8.3	IZRAČUNI POTREBNI ZA VREDNOTENJE YES TESTA.....	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	33
4.1	KARAKTERIZACIJA KATALIZATORJA.....	33
4.2	FOTOKATALIZA BISFENOLOV BPA, BPF IN BPAF .....	37
4.3	FOTOLIZA BISFENOLOV BPA, BPF IN BPAF.....	43
4.4	ESTROGENA AKTIVNOST VZORCEV PO FOTOLIZI IN FOTOKATALIZI ...	45
5	SKLEP .....	49
6	LITERATURA .....	52

## KAZALO SLIK

Slika 1: Splošna formula bisfenolov.....	7
Slika 2: Strukturna formula bisfenola A.....	8
Slika 3: Strukturna formula bisfenola AF.....	13
Slika 4: Strukturna formula bisfenola F.....	15
Slika 5: Shema fotokatalitskega mehanizma TiO <sub>2</sub> .....	19
Slika 6: Kadička za nanos raztopine TiO <sub>2</sub> prekursorja na steklena vlakna.....	20
Slika 7: Aparatura za fotokatalizo (A – brez prižgane žarnica, B – s prižgano žarnico). ...	21
Slika 8: Razgradnja CPRG v galaktozo in CPR s pomočjo encima β-galaktozidaze. ....	26
Slika 9: Priprava redčitvene vrste na mikrotitrski plošči.....	31
Slika 10: Primer mikrotitrskе plošče.....	31
Slika 11: SEM posnetek steklenih vlaken.....	34
Slika 12: SEM posnetek steklenih vlaken s TiO <sub>2</sub> .....	34
Slika 13: BET specifična površina steklenih vlaken (GF), steklenih vlaken kalciniranih na 500 °C (GF_500) in steklenih vlaken s TiO <sub>2</sub> kalciniranih na 500 °C (GF_TiO <sub>2</sub> _500).....	35
Slika 14: UV-VIS-DR spekter steklenih vlaken in steklenih vlaken s TiO <sub>2</sub> .....	35
Slika 15: XRD graf steklenih vlaken in steklenih vlaken s TiO <sub>2</sub> .....	36
Slika 16: Spremljanje fotokatalitske (in fotolitske) razgradnje BPA s HPLC.....	38
Slika 17: Spremljanje fotokatalitske (in fotolitske) razgradnje BPF s HPLC.....	38
Slika 18: Spremljanje fotokatalitske (in fotolitske) razgradnje BPAF s HPLC.....	39
Slika 19: Primerjava spremembe koncentracije bisfenolov v odvisnosti od časa fotokatalitske oksidacije (4-urna fotokataliza).....	39
Slika 20: UV-VIS spektri vzorcev BPA pred in po fotokatalizi (fotolizi) v primerjavi z Milli-Q vodo (ultra čisto vodo).....	40
Slika 21: UV-VIS spektri vzorcev BPF pred in po fotokatalizi (fotolizi) v primerjavi z Milli-Q vodo (ultra čisto vodo).....	41
Slika 22: UV-VIS spektri vzorcev BPAF pred in po fotokatalizi (fotolizi) v primerjavi z Milli-Q vodo (ultra čisto vodo).....	41
Slika 23 Primerjava spremembe koncentracije bisfenolov v odvisnosti od časa fotolitske oksidacije (4-urna fotoliza).....	44
Slika 24: Relativna estrogena aktivnost vzorcev BPA po fotokatalizi (fotolizi) glede na estrogeno aktivnost izhodiščne raztopine BPA.....	46

---

Slika 25: Relativna estrogena aktivnost vzorcev BPF po fotokatalizi (fotolizi) glede na estrogenu aktivnost izhodiščne raztopine BPF.....	47
Slika 26: Relativna estrogena aktivnost vzorcev BPAF po fotokatalizi (fotolizi) glede na estrogenu aktivnost izhodiščne raztopine BPAF.....	47

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Vsebnost pogosto prisotnih bisfenolov v vzorcih iz okolja (Hangzhou bay, Zhejiang, Kitajska), odvzetih avgusta 2012 (20).....	7
Preglednica II: Fizikalno kemijske lastnosti BPA (23).....	8
Preglednica III: Preglednica preiskovanih spojin.....	18
Preglednica IV: Masa spojin za pripravo raztopine z molsko koncentracijo $4,38 \times 10^{-5}$ mol/L.....	21
Preglednica V: Pogoji analize vzorcev na HPLC.....	23
Preglednica VI: Odstotek odstranjenega TOC brez upoštevanja adsorpcije bisfenolov na katalizator, odstotek odstranjenega TOC z upoštevanjem adsorpcije bisfenolov na katalizator in odstotek odstranjenega bisfenola glede na rezultate dobljene s HPLC analizo.....	42
Preglednica VII: Prikaz razmerja med vezanim in prostim fluoridom po fotokatalizi.....	43



## POVZETEK

Onesnaženje vodnih virov postaja vse večji problem sodobnega sveta. Konvencionalne metode čiščenja odpadnih voda ne odstranijo vseh okolju škodljivih snovi, zato se le-te kopičijo v naravi. Številne izmed njih so se sposobne vezati na hormonske receptorje ali na drug način modulirati njihovo delovanje in tako moteče vplivati na organizme. Med hormonske motilce uvrščamo tudi nekatere bisfenole, ki veljajo za industrijsko zelo pomembne spojine. Zaradi njihovega širokega spektra uporabe pogosto prihajajo v stik z ljudmi, predvsem preko onesnaženih vodnih virov in kontaminirane hrane ter pijače. Odstranjevanje teh snovi iz okolja je poglobitnega pomena, saj številne študije poročajo o škodljivem delovanju bisfenolov že v zelo nizkih koncentracijah. Napredne oksidacijske metode sodijo med nove pristope čiščenja odpadnih voda, med katere uvrščamo tudi fotokatalizo, pri kateri pride do oksidacije organskih molekul s hidroksilnimi radikali. Metoda temelji na uporabi polprevodnih materialov v kombinaciji z ultravijoličnim sevanjem. Takšen način odstranjevanja je primeren tudi za kemijsko stabilne snovi in spojine z nizko stopnjo biorazgradljivosti.

Tekom magistrske naloge smo preverjali uspešnost heterogene fotokatalitske oksidacije z imobiliziranim  $\text{TiO}_2$  kot način odstranjevanja estrogeno aktivnih snovi (bisfenola A, bisfenola F in bisfenola AF) iz vodnih vzorcev. Titanov dioksid izkazuje številne dobre lastnosti, kot so visoka fotoaktivnost, dobra stabilnost, nizka cena in neškodljivost za okolje. Imobilizacija katalizatorja na trdni nosilec (steklena vlakna) zmanjša stroške in čas obdelave vzorca po fotokatalizi. Za vsak analog smo izvedli 2-urni in 4-urni test fotokatalize ter fotolize (poskus v odsotnosti katalizatorja). Razgradnjo analogov smo spremljali s HPLC, UV-VIS spektrofotometrijo in TOC analizo (določanje celokupnega organskega ogljika). Izvedli smo tudi karakterizacijo katalizatorja z namenom potrditve vezave delcev  $\text{TiO}_2$  na nosilec. S CHNS elementno analizo smo določili delež organskega ogljika vezanega na steklena vlakna (s  $\text{TiO}_2$ ) med fotokatalitsko reakcijo, z YES testom (test določanja estrogene aktivnosti s kvasovkami) pa smo določili padec estrogene aktivnosti vzorcev po fotokatalizi (s predhodno ekstrakcijo vzorcev na trdni fazi).

Rezultati meritev so pokazali, da se je med 2-urno fotokatalizo (pri vseh treh spojinah) večina bisfenola razgradila, vendar pa je zaradi ekstrakcije na trdni fazi (koncentriranja) končnih vzorcev, ki so vsebovali še nekaj nerazgrajenega bisfenola, estrogena aktivnost še vedno ostala visoka. V nekaterih primerih se je koncentracija bisfenola v vzorcu (v

manjšem obsegu) zmanjšala tudi na račun adsorpcije na steklena vlakna (s  $\text{TiO}_2$ ). Med 4-urno fotokatalizo so se vsi trije bisfenoli razgradili, bisenol F in bisfenol A pa sta v tem času skoraj v celoti reagirala do  $\text{CO}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ . Mineralizacija bisfenola AF je bila počasnejša, pri njegovi razgradnji pa se je sproščal tudi fluoridni ion. Po 4-urni fotokatalizi vzorci niso več vsebovali estrogeno aktivnih snovi, na podlagi česar lahko zaključimo, da kljub temu, da v danih eksperimentalnih pogojih mineralizacija bisfenolov ni potekla v celoti (predvsem pri bisfenolu AF), se je 4-urna fotokataliza z imobiliziranim  $\text{TiO}_2$  izkazala za uspešno v odstranjevanju estrogenosti vzorcev in s tem pretvorbo preučevanih bisfenolov v estrogeno neaktivne produkte.

**Ključne besede:**

hormonski motilci

bisfenoli A, F, AF

estrogena aktivnost

fotokataliza

titanov dioksid

## ABSTRACT

Water pollution is one of the major problems in modern world. Conventional methods of wastewater treatment do not remove all contaminants. Pollutants can accumulate in nature and have adverse impact on organisms. Many of them are capable of binding to endocrine receptors and modifying their activity. Some of bisphenols, which are very important chemicals in industry, are known as endocrine disrupting compounds. Because of their broad spectrum of applications they often come into contact with people, mainly through contaminated water and food. Removing these substances from environment is very important, since many studies have reported harmful effects of bisphenols at very low concentrations. Advanced oxidation processes including photocatalysis are new approaches to wastewater treatment. Photocatalysis (where main reaction is oxidation of organic molecules with hydroxyl radicals) is based on the use of semiconductors in combination with ultraviolet radiation and is also suitable for degradation of chemically stable substances and compounds with low biodegradability.

During the master's thesis, we examined heterogeneous photocatalytic oxidation with immobilized  $\text{TiO}_2$  as a potential way for degradation of estrogenic active substances (bisphenol A, bisphenol F and bisphenol AF) in aqueous samples. Titanium dioxide exhibits appropriate characteristics to promote photodegradation, such as high photo-activity, good stability, low cost and low toxicity. Immobilization of catalyst on a solid support (i.e., glass fibers) reduces costs and processing time after photocatalysis. For each bisphenol we carried out 2-hour and 4-hour photocatalysis and photolysis (experiment in the absence of catalyst). Degradation of bisphenols was monitored with HPLC, UV-VIS spectrophotometry and TOC analysis. We also carried out characterization of the catalyst in order to confirm the presence of  $\text{TiO}_2$  on glass fibers. With CHNS elemental analysis we determined the amount of organic carbon adsorbed on glass fibers (with  $\text{TiO}_2$ ) during photocatalytic reaction. With YES assay we observed a drop of estrogenic activity of photocatalytically treated aqueous samples (with preliminary extraction of samples on a solid phase).

The results showed that after 2-hour photocatalysis (for all three compounds) the majority of the initial bisphenol concentration was decomposed, but estrogen activity still remained high due to the presence of small portion of non-reacted bisphenol. In some cases, the concentration of bisphenol (to a lesser extent) also decreased due to the adsorption on the

glass fibers (with TiO<sub>2</sub>). During 4-hour photocatalysis all three bisphenols were degraded, bisphenol F and bisphenol A almost entirely reacted to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. Mineralization of bisphenol AF was slower, during its degradation also released some fluoride ion. After 4-hour photocatalysis samples no longer contained estrogenic active substances. Although the mineralization of bisphenols was not entirely complete (particularly the mineralization of bisphenol AF), we can conclude that 4-hour photocatalysis with an immobilized TiO<sub>2</sub> was successful in converting studied bisphenols in estrogen inactive products.

**Key words:**

endocrine disrupting compounds

bisphenols A, F, AF

estrogenic activity

photocatalysis

titanium dioxide

## SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
BET	specifična površina po Braunauer, Emmet in Teller metodi
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPF	bisfenol F
CH <sub>3</sub>	metilna skupina
CHNS	elementna analiza ogljika, vodika, dušika, žvepla
CF <sub>3</sub>	trifluorometilna skupina
CPR	klorofenol rdeče
CPRG	klorofenol rdeče β-D-galaktopiranozid
DES	dietilstilbestrol
DR	difuzna refleksija
e <sup>-</sup>	elektron
E2	17β-estradiol
EA	estrogena aktivnost
ER	estrogenski receptor
GF	steklena vlakna
GF_500	steklena vlakna kalcinirana na 500 °C
GF_TiO <sub>2</sub> _500	steklena vlakna s titanovim dioksidom kalcinirana na 500 °C
GSH	glutation
h <sup>+</sup>	vrzel
HM	hormonski motilci
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fostat
NOP	napredni oksidacijski postopki
·OH	hidroksilni radikal
OD	optična gostota
P	progesteron
PFTE	politetrafluoroetilen
PP	prevodni pas
PrP	prepovedani pas

---

REA	relativna estrogena aktivnost
RSD	relativna standardna deviacija
SEM	vrstični elektronski mikroskop
slepa_2h, slepa_4h	poskus 2-urne, 4-urne fotolize
SPE	ekstrakcija na trdni fazi
TiO <sub>2</sub> _2h, TiO <sub>2</sub> _4h	poskus 2-urne, 4-urne fotokatalize s titanovim dioksidom
TOC	celokupni organski ogljik
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidna svetloba (sevanje)
VP	valenčni pas
XRD	rentgenska praškovna difrakcija
YAS	test določanja androgene aktivnosti s kvasovkami
YES	test določanja estrogene aktivnosti s kvasovkami

# 1 UVOD

## 1.1 ENDOKRINI SISTEM

Endokrini sistem nadzira celične funkcije in aktivnosti pri ljudeh in živalih preko posebnih snovi, ki jim rečemo hormoni. Hormoni se sproščajo iz žlez in delujejo kot prenašalne molekule, ki vplivajo na razmnoževanje, metabolizem, rast, razvoj, obrambo proti stresu ter skrbijo za ustrezno ravnovesje elektrolitov, vode in hranil v telesu. Endokrini sistem nadzira delovanje hormonov tako, da vpliva na njihovo koncentracijo v krvi, na število dostopnih receptorjev v tarčni celici in na moč vezave med hormonom in receptorjem (1). Po vezavi hormona na specifični receptor pride do spremembe v signaliziranju celičnih proteinov ali pa do izražanja določenih genov in sinteze novih proteinov (2). Hormonski sistem je zelo dinamičen in se odziva na različne dražljaje. Motnje v njegovem delovanju so tako nekaj povsem običajnega, dokler ne presežejo normalnega delovanja sistema in privedejo do posledic, ki so lahko za organizem škodljive (3).

## 1.2 HORMONSKI MOTILCI

V zadnjih dveh desetletjih se je pojavilo več definicij o hormonskih motilcih, med katerimi so nekatere dvoumne. Snovi lahko v telesu povzročajo različne odzive. Pomembno je, da ločimo med pojavi, ki so posledica fiziološke spremembe v organizmu, z namenom ohranjanja hormonskega ravnovesja in pojavi, ki vodijo v nenormalno delovanje sistema ter posledično povzročajo škodljive učinke (3). Svetovno najbolj priznana in uveljavljena je definicija s strani Svetovne znanstvene organizacije (WHO), ki pravi, da je hormonski motilec eksogena snov ali mešanica snovi, ki spremeni funkcijo endokrinega sistema in posledično povzroči škodljiv odgovor v organizmu, njegovih potomcih ali (sub)populacijah (4). Med škodljive učinke sodijo spremembe v morfologiji, fiziologiji, rasti, razvoju, razmnoževanju in življenjski dobi organizma, sistema ali (sub)populacije, ki imajo za posledico poslabšanje funkcionalnih sposobnosti, zmanjšanje zmožnosti obvladovanja naporov ali povečanje občutljivosti na druge vplive (3).

Natančni mehanizmi delovanja hormonskih motilcev (HM) so slabo poznani, saj težko ločimo med direktnimi/indirektnimi ter primarnimi/sekundarnimi posledicami delovanja le-teh (5). Kljub različni kemijski strukturi povzročajo v organizmih podobne odzive (6). V telesu se lahko vežejo na receptor in izzovejo njegov odziv (agonistično delovanje) ali pa

zasedejo mesto na receptorju, s tem preprečijo vezavo endogenega hormona, pri tem pa ne pride do odziva (antagonistično delovanje). Vežejo se lahko na jedrne receptorje (estrogenske, androgene, mineralokortikoidne, glukokortikoidne, progesteronske, tiroidne in s peroksisomskim proliferatorjem aktivirane receptorje), motijo lahko sintezo specifičnega hormonskega receptorja, aktivirajo ali zavirajo encime, ki so odgovorni za metabolizem, transport ali sintezo hormona (npr. aromatazo,  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenazo,  $5\alpha$ -reduktazo) (7, 8).

Organizem se tekom določenih življenjskih obdobj različno odzove na prisotnost HM v njegovem okolju. Izpostavljenost tem snovem v maternici, v času razvoja endokrinega sistema, lahko povzroči trajno spremembo funkcije ali občutljivosti receptorja, medtem ko izpostavljenost v odrasli dobi naj ne bi bila nevarna, saj ima endokrini sistem zmožnost, da se prilagodi na spremembe. Kljub številnim dosedanjim študijam o delovanju in vplivu HM na zdravje ljudi, primanjkuje podatkov o izpostavljenosti motilcem v kritičnem obdobju razvoja endokrinega sistema in kako to vpliva na pojav bolezni v odrasli dobi. Učinki HM so lahko zaradi kompleksnega delovanja endokrinega sistema nepredvidljivi in tako prizadenejo druga mesta, kot pa bi sicer pričakovali (5). Številne spojine lahko že v zelo nizkih koncentracijah povzročajo škodljive učinke, ki pa jih pri višjih koncentracijah ne zaznamo, kar je posledica nemonotonega odziva organizmov na delovanje HM (9).

Snovi, ki sodijo med HM, lahko razvrstimo v več skupin, kot so hormoni (naravni, sintetični steroidi), farmacevtski izdelki, izdelki za osebno higieno, industrijske kemikalije, pesticidi, fitoestrogeni (6, 10). Med naravne hormone uvrščamo steroidne hormone (npr. estrogene), ki jih izločajo ljudje in živali. Njihovo izločanje je odvisno od starosti, zdravstvenega stanja, prehrane in posebnih stanj, kot je nosečnost. Med sintetičnimi hormoni prevladujejo oralni kontraceptivi in zdravila, ki se uporabljajo za hormonsko nadomestno zdravljenje in v terapiji neplodnosti (6, 7). Te snovi preko odpadnih vod iz gospodinjstev, industrije ter kmetijske dejavnosti prehajajo v okolje, kjer so prisotne v majhnih koncentracijah. Višje koncentracije zaznamo v okolici čistilnih naprav, saj obstoječe metode čiščenja niso dovolj uspešne pri odstranjevanju teh snovi. HM in njihovi razgradni produkti tako vstopajo nazaj v okolje ter vplivajo na endokrini sistem živih organizmov, ki živijo v neposredni bližini čistilnih naprav (6).

Številne snovi uvrščamo med potencialne HM, med njimi je tudi veliko zdravil (npr. antibiotikov, analgetikov, antidiabetikov, protivnetnih zdravil, antihistaminikov,



antiepileptikov, diuretikov in zdravil za zdravljenje psihičnih težav) (6). Nove substance, ki želijo vstopiti na evropski trg, morajo ustrezati zahtevam Evropske agencije za kemikalije (ECHA), ki je bila ustanovljena na podlagi uredbe REACH (registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij) z namenom varovanja zdravja ljudi in okolja pred nevarnimi vplivi kemikalij (6, 11). Ker je zahteva, da so snovi neškodljive, jih je potrebno ustrezno preizkusiti s toksikološkimi testi, med katerimi se sedaj vse pogosteje pojavljajo tudi tisti, ki vrednotijo endokrino delovanje spojin (6, 12).

Eden izmed prvih pokazateljev škodljivosti HM je bil dietilstilbestrol (DES) (sintetični estrogen), ki se je v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja uporabljal kot zdravilo za preprečevanje spontanih splavov in boljšo rast zarodka. Kasneje so pri deklicah, ki so bile v maternici izpostavljene dietilstilbestrolu, ugotovili spremembe v razvoju reproduktivnih organov in porast vaginalnega tumorja. DES so zaradi teh ugotovitev umaknili s tržišča (2). Številne kasnejše raziskave so pokazale škodljiv vpliv HM na nekatere živalske vrste in populacije, pomembno vlogo pa naj bi igrali tudi pri boleznih sodobnega sveta. Pri ljudeh naj bi povzročali spremembe v reproduktivnem sistemu (npr. zmanjšana kvaliteta semenčic, vpliv na plodnost, povečan delež spontanih splavov, zmanjšanje števila moških – spremembe v razmerju spolov, nenormalnosti v moškem reproduktivnem traktu), prezgodnjo puberteto, nevrološke in imunološke spremembe ter vplivali na pogostost nekaterih rakavih obolenj (npr. rak dojk, prostate, testisov) (5).

HM so lahko polarne, hidrofilne molekule z nizkim oktanol/voda porazdelitvenim faktorjem. Te snovi so relativno dobro topne v vodi in se ne vežejo na sediment ter telesno maščobo organizmov, za razliko od lipofilnih, težko topnih snovi, ki se adsorbirajo na sediment in akumulirajo v bioloških sistemih, predvsem v maščevju (13). HM so v naravi nagnjeni h kemični in biološki razgradnji (hidrolizi in fotolizi), pri tem pa lahko nastanejo celo produkti, ki imajo še močnejše hormonsko delovanje kot izhodne spojine (7, 13).

### **1.2.1 ODSTRANJEVANJE HORMONSKIH MOTILCEV**

V preteklih letih so študije HM temeljile predvsem na spojinah, ki delujejo na estrogenske receptorje (4). Razvite so bile številne metode detekcije in odstranjevanja teh snovi iz okolja.

## PROCESI ODSTRANJEVANJE ESTROGENIH SNOVI IZ VODE

V grobem jih delimo na štiri skupine:

- fizikalni procesi:
  - sorpcija (aktivno blato, granulirano aktivno oglje, molekularno vtisnjeni polimeri)
  - membranska filtracija (reverzna osmoza, nanofiltracija, ultrafiltracija)
- biološki procesi:
  - razgradnja z bakterijami
  - razgradnja z mikroalgami
  - razgradnja z encimi
- napredni oksidacijski procesi:
  - fotoliza
  - heterogena fotokataliza (dodatek polprevodnikov:  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Si}$ ,  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{CdS}$ )
  - močni oksidanti (vodikov peroksid, ferat, ozon, hipoklorna kislina, kloridni dioksid, manganov dioksid, Fe-TAML – železov tetra-amido makrociklični ligand)
  - kombinacija ultravijoličnega sevanja (UV) in močnih oksidantov (peroksid, Fentonov reagent)
  - sonoliza (7)
- elektrokemične metode (bor dopirana diamantna elektroda) (6)

Konvencionalne tehnike čiščenja odplak (koagulacija, flokulacija, precipitacija in aktivno blato) niso dovolj učinkovite v odstranjevanju HM, potrebne so naprednejše metode, kot so membranska filtracija, napredni oksidacijski postopki (NOP) in biološke metode (7, 10). Velik potencial za uspešno odstranjevanje HM kažejo NOP, ki so zelo učinkoviti, vendar pa lahko vmesni produkti, ki nastajajo v teh procesih, predstavljajo veliko grožnjo za okolje, saj so lahko nevarnejši kot sama izhodna snov. Med NOP uvrščamo tudi fotokatalizo, pri katerih je poglavitna oksidacija organskih onesnažil s hidroksilnim radikalom ( $\cdot\text{OH}$ ). Gre za dvostopenjsko reakcijo, pri kateri v prvi stopnji pride do nastanka  $\cdot\text{OH}$ , nato pa sledi reakcija  $\cdot\text{OH}$  z organskimi onesnažili v vodi. Metoda temelji na uporabi polprevodnih materialov v kombinaciji z ultravijoličnim sevanjem (7).

### 1.2.2 ODKRIVANJE HORMONSKIH MOTILCEV

Vse večja skrb in zavedanje, da smo ljudje vsakodnevno izpostavljeni snovem, ki motijo delovanje hormonskega sistema, je spodbudila k razvoju smernic za identifikacijo in detekcijo HM. Razvili so dve skupini testov, s pomočjo katerih naj bi učinkovito zaznali prisotnost teh snovi v vzorcih. V prvo skupino sodijo *in vivo* in *in vitro* testi, s katerimi identificiramo in klasificiramo HM (presejalni testi), v drugo skupino pa razvrščamo *in vivo* teste, ki nam omogočajo pridobivanje informacij o koncentracijski odvisnosti endokrinega učinka (odmerek–odgovor) (14).

Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) je razvila nabor testov za razvrščanje in identifikacijo HM (12). Razdelila jih je v pet stopenj:

1. stopnja: prednostno razvrščanje spojin glede na že znane podatke (npr. fizikalno-kemijske lastnosti, podatki o izpostavljenosti in škodljivosti),
2. stopnja: *in vitro* testi za ugotavljanje mehanizma delovanja potencialnega HM (npr. test vezave na receptor, test aktivacije transkripcije),
3. stopnja: *in vivo* testi za ugotavljanje specifične endokrine aktivnosti in odzivov (npr. uterotropni test (ugotavljanje estrogene aktivnosti), Hershbergerjev test (ugotavljanje androgene aktivnosti)),
4. stopnja: *in vivo* testi za ugotavljanje širše endokrine aktivnosti in odzivov,
5. stopnja: *in vivo* testi za pridobivanje podatkov o delovanju snovi na endokrini sistem in ostalih mehanizmih delovanja spojine (testi na več generacijah živali (npr. dvoživkah, ribah)) (2, 3).

Testi na prvih treh stopnjah sodijo med presejalne teste, s ciljem prepoznavanja nevarnih snovi. Če se izkaže, da spojina ni potencialni HM, testov na naslednjih dveh stopnjah ne izvajamo. S tem prihranimo čas in denar. Testi na četrti in peti stopnji nam dajo informacijo o delovanju spojine na endokrini sistem, o jakosti spojine, ki povzroča določene fiziološke in patološke spremembe in nam služijo kot ocena tveganja izpostavljenosti HM (3).

Najpomembnejši testni sistemi za določanje HM:

- Testi na organizmih

Opazujemo pojav deformacij, reproduktivnih pomanjkljivosti, razvoj potomcev, jajčne lupine, proizvodnjo serumskih proteinov (npr. vitelogenina)... Glavna prednost teh testov je, da lahko opazujemo tudi skupni učinek mešanice HM.

- Testi na celicah

Takšen test je test z reporterskim genom. Pri teh testih merimo izražanje proteina (luciferaza,  $\beta$ -galaktozidaza) po vezavi npr. estrogena na estrogenski receptor in s tem lahko določimo agonistično oz. antagonistično delovanje spojine. Prednosti teh testov so visoka občutljivost, hiter odgovor, ugodna cena. Manj primerni so za kvantitativno analizo specifičnih HM.

- Testi brez uporabe celic

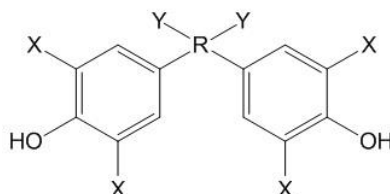
V to skupino sodita encimsko imunski test (ELISA) in encimsko receptorski test (ERLA), ki omogočata kvantitativno ovrednotenje HM. S temi testi določamo afiniteto vezave spojine na receptor. Poznana sta dva tipa komercialno dostopnih testov. Pri prvem imamo s fluorescentno molekulo označen humani estrogenski receptor, pri drugem pa protitelo proti določenemu HM. Ob vezavi HM na receptor oz. protitelo pride do fluorescence (10).

Med biološke teste za določanje HM sodita tudi YES test (za določanje estrogenosti) in XenoScreen YES YAS test (za določanje estrogenosti in androgenosti spojin). Pri obeh testih se kot testni organizmi uporabljajo gensko spremenjene kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*), ki imajo pri YES testu v DNA vneseno sekvenco za humani estrogenski receptor, pri XenoScreen YES YAS testu pa sekvenco za estrogenski in androgenski receptor ter plazmid (pri obeh testih), ki vsebuje reporterski gen lac-Z, ki nosi zapis za encim  $\beta$ -galaktozidazo. Vezava estrogena oz. androgena na receptor sproži sintezo encima, ki razgradi substrat klorofenol rdeče  $\beta$ -D-galaktopiranozid v rdeče-vijolično obarvan produkt, katerega absorbanco izmerimo pri 575 nm (15, 16, 17).

Za detekcijo in kvantifikacijo HM v vzorcih so na voljo tudi različne kromatografske metode, med katerimi se najpogosteje uporablja plinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom, ki velja za občutljivo in selektivno metodo z nizko mejo detekcije (1).

## 1.3 BISFENOL A IN NJEGOVI ANALOGI

Bisfenoli so skupina kemijskih spojin, ki so sestavljene iz dveh fenolnih obročev, katera med seboj praviloma povezujejo različno substituirana metilenska ali sulfonska skupina (Slika 1). Številni bisfenoli se uporabljajo v industrijske namene in kot onesnažilo prehajajo v okolje (Preglednica I), kjer lahko škodljivo vplivajo na organizme (18).



Slika 1: Splošna formula bisfenolov (kjer je R centralni (žveplov ali ogljikov) atom, ki med seboj povezuje fenolna obroča, X vodikov atom ali različni substituenti na fenolnem obroču in Y vodikov atom ali različni substituenti na centralnem atomu med fenolnima obročema (vezani z enojno ali dvojno vezjo) (19).

Preglednica I: Vsebnost pogosto prisotnih bisfenolov v vzorcih iz okolja (Hangzhou bay, Zhejiang, Kitajska), odvzetih avgusta 2012 (20).

Vzorec	Bisfenoli v reki (ng/L) ali sedimentu (ng/g suhe teže)		
	Bisfenol F	Bisfenol A	Bisfenol AF
Reka 1. vzorec	3,47	74,58	123,44
Reka 2. vzorec	2,84	26,39	245,69
Reka 3. vzorec	ni zaznan	11,40	2,17
Reka 4. vzorec	ni zaznan	10,84	1,73
Reka 5. vzorec	ni zaznan	6,59	0,90
Sediment 1. vzorec	< MLOQ*	20,56	111,65
Sediment 2. vzorec	30,16	42,76	2009,80
Sediment 3. vzorec	6,24	6,63	708,81
Sediment 4. vzorec	0,60	9,09	448,90
Sediment 5. vzorec	ni zaznan	1,37	0,18

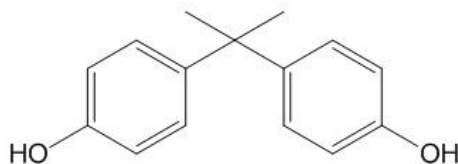
\*MLOQ = meja kvantifikacije

### 1.3.1 BISFENOL A

#### FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI

Bisfenol A (BPA, 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan) je monomer, ki ga je prvič sintetiziral Rus Dianin leta 1891. Nastane pri kondenzaciji dveh fenolnih molekul in ene molekule acetona, v prisotnosti kisline (klorovodikove kisline) ali ionsko-izmenjevalne smole kot katalizatorja (21). Sestavljen je iz dveh fenolnih obročev, ki sta med seboj povezana z

metilenskim mostom, na katerega sta pripeti dve metilni skupini (Slika 2) (22). Prisotnost hidroksilnih skupin omogoča reakcije s številnimi spojinami in tvorbo etrov, estrov ter soli. Možne so tudi elektrofilne substitucije, kot so nitriranje, sulfoniranje in alkiliranje (21, 23).



Slika 2: Strukturna formula bisfenola A.

Bisfenol A (BPA) je bela, trdna snov, ki se nahaja v obliki kristalov ali kosmičev, zelo dobro topna v etanolu, benzenu, dietil etru in maščobah, slabše v vodi (21, 23). V naravi ga razgrajujejo nekateri bakterijski sevi, glive, alge in rastline (21). Razpolovni čas BPA v rekah je 3–5 dni, v slani vodi pa okoli 30 dni (22). Glavne fizikalno-kemijske lastnosti BPA so zbrane v Preglednici II.

Preglednica II: Fizikalno-kemijske lastnosti BPA (23).

Molekulska formula	$C_{15}H_{16}O_2$
Molekulska masa	228, 29 g/mol
Tališče	155 °C
Vrelišče	398 °C pri 101,3 kPa
Topnost v vodi	300 mg/L pri 25 °C
log P	3,40
pKa	9,59 – 11,30

## PROIZVODNJA IN UPORABA

Za potrebe industrije se letno proizvede okoli 3,8 milijonov ton BPA. Večina se ga porabi za proizvodnjo polimerov (polikarbonatov, epoksidnih smol, polisulfonov, poliakrilatov), polivinil kloridne plastike (kjer se uporablja kot antioksidant in stabilizator) ter zaviralcev gorenja. Polikarbonati se pogosto uporabljajo za izdelavo plastičnih vsebnikov za shranjevanje hrane in pijače (npr. platenke za vodo) in medicinskih pripomočkov, kot so očesne leče, inkubatorji ter ohišja inhalatorjev. Epoksidne smole se nahajajo v zaščitnih premazih konzerv in pločevink (preprečujejo kontaminacijo vsebine s kovino ter ščitijo kovino pred korozijo). BPA se nahaja tudi v številnih drugih izdelkih, kot so sončna očala, termični papir, igrače, gradbeni material, vodovodne cevi, elektronske naprave in zobni

vsadki (24, 25). Tvori polimere, ki so stabilni v širokem temperaturnem območju (od - 40 °C do 145 °C) in odporni na številne kisline in olja. Odlikujejo jih tudi dobre mehanske lastnosti, ustrezna trdnost, transparentnost in nizka adsorpcija vlage (21, 22).

#### IZPOSTAVLJENOST BISFENOLU A

BPA smo izpostavljeni preko:

- vodnih virov (odpadne snovi lahko prehajajo v podtalnico in s tem tudi pitno vodo),
- zraka (vdihavanje prahu, ki vsebuje delčke BPA; pogosto pri delavcih v tovarnah),
- hrane (konzervirana hrana, hrana iz plastičnih vsebnikov),
- pijače (plastenke za vodo, vodomati) in
- izdelkov, ki vsebujejo BPA (medicinski pripomočki, termični papir, zobni vsadki, recikliran papir) (22, 24).

V naravi največ BPA zaznamo v bližini smetišč, tovarn in čistilnih naprav. Obstoječe metode čiščenja odplak niso dovolj učinkovite pri odstranjevanju teh snovi. S konvencionalnimi metodami čiščenja se odstrani med 37 in 94 % BPA, preostali del pa se vrne v okolje (22). Ljudje smo BPA najbolj izpostavljeni preko uživanja živil in pijače, ki se shranjujejo v ovojnini, narejeni iz polimerov, ki vsebujejo BPA. Ta lahko zaradi nepopolne polimerizacije (npr. prenizka temperatura med tvorbo polimerov) ostane na površini ovojnine in tekom shranjevanja (dolgotrajno shranjevanje, shranjevanje na soncu) ali termične obdelave izdelka (sterilizacije, priprave obroka v mikrovalovni pečici) prehaja v vsebino (22, 24).

Polikarbonati veljajo za dokaj stabilne spojine, vendar pa lahko pod vplivom segrevanja in kislega ali alkalnega pH-ja pride do hidrolize polimera ali difuzije BPA iz vsebnika (21, 22). Če izdelek uporabljamo skozi daljše časovno obdobje, se lahko količina izpusta BPA s časom povečuje. Sproščanje je odvisno tudi od vsebine vsebnika. Več BPA se tekom segrevanja sprosti v etanol in očetno kislino (kot pa v vodo) ter hrano z višjo vsebnostjo soli (natrijevega klorida) in rastlinskih olj (22, 24).

Številni znanstveniki so raziskovali sproščanje BPA iz polikarbonatnih otroških plasten. Ugotovili so, da visoka temperatura, alkalna čistilna sredstva in uporaba pomivalnega stroja povzročajo sproščanje BPA (22, 24). Posledično so nekatere države prepovedale uporabo polimerov BPA za izdelavo otroških plasten. Prva med njimi je bila Kanada (leta

2010) (26), ki je BPA nadomestila z njegovim analogom bisfenolom S. Leta 2011 ji je sledila tudi Evropska unija, ki je prepovedala proizvodnjo in prodajo teh izdelkov. Pred kratkim je ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) prepovedala uporabo BPA v embalaži pripravkov za dojenčke (21). Leta 2004 so določili mejo izpusta BPA v hrano, ki znaša 0,6 mg/kg hrane, ob predpostavki, da 60 kg težak človek dnevno poje 1 kg hrane iz plastičnih vsebnikov (24).

V zadnjih dvajsetih letih so se pojavile reproduktivne spremembe na vodnih organizmih, ki živijo na onesnaženem območju ali v njegovi bližini. Že leta 1938 so poročali, da BPA deluje kot sintetični estrogen, kljub temu je njegova uporaba v drugi polovici prejšnjega stoletja močno narastla. Estrogeno delovanje BPA so znova po naključju odkrili leta 1993 (24, 27). Ameriška agencija za varovanje okolja (EPA) je leta 1988 določila največjo sprejemljivo mejo izpostavljenosti bisfenolu A, ki dnevno znaša 50 µg BPA na kilogram telesne teže, Evropska unija pa je leta 2002 postavila novo mejo, tako imenovani začasni tolerančni dnevni vnos, ki znaša 10 µg BPA na kilogram telesne teže na dan (22). Nekatere študije kažejo na to, da lahko že zelo nizke koncentracije BPA škodujejo organizmom (predvsem tistim, ki so BPA izpostavljeni tekom razvoja v maternici) ter da ne obstaja linearni odnos med koncentracijo BPA in odgovorom organizma. Nevarne motnje v hormonskem sistemu so opazne že pri zelo nizkih koncentracijah BPA (0,025-0,2 µg na kilogram telesne teže na dan) (22, 27, 28). Zaradi novih, zaskrbljujočih podatkov o škodljivosti BPA, je Evropska agencija za varno hrano (EFSA) letos predlagala znižanje tolerančnega dnevnega vnosa iz 50 µg BPA na kilogram telesne teže na dan (tolerančni dnevni vnos iz leta 2006) na 5 µg BPA na kilogram telesne teže na dan (29).

## BIOMONITORING

Biomonitoring je način neposrednega merjenja izpostavljenosti ljudi ksenobiotikom preko določevanja koncentracije spojine oz. njenih presnovkov v krvi, urinu ali tkivih. Urin se pogosto uporablja za določevanje spojin topnih v vodi, z majhnim razpolovnim časom in konstantnim, dovolj velikim deležem presnovkov v urinu (28). BPA ima majhen razpolovni čas (6 ur) in se iz telesa v veliki meri izloča z urinom (kot konjugat z glukuronsko kislino in slufatom), zato je urin vzorec izbora za merjenje izpostavljenosti bisfenolu A. Izmerjene koncentracije nam dajo podatek o trenutni izpostavljenosti (v času malo pred vzorčenjem). Ob kronični izpostavitvi najdemo v urinu do nekaj µg/L BPA. Številne študije so pokazale, da ima več kot 90 % preiskovancev v urinu merljive



koncentracije BPA (24, 28). Koncentracije v urinu/serumu se pri ljudeh z določenimi bolezenskimi stanji (kot so debelost, nepoldnost, sladkorna bolezen tipa 2), ki so domnevno lahko tudi posledica izpostavljenosti bisfenolu A, gibljejo med 0,4 µg/L in 9 µg/L (9). BPA so zaznali tudi v mleku, plodovnici, neonatalni in folikularni tekočini, placenti, serumu nosečnic, jetrih človeškega plodu in krvi iz popkovine, kar kaže na veliko izpostavljenost BPA že tekom razvoja v maternici (9, 26).

## METABOLIZEM

BPA se po peroralnem zaužitju hitro in učinkovito absorbira iz gastrointestinalnega trakta ter v črevesju in jetrih podleže metabolizmu prvega prehoda. Pri ljudeh je njegova glavna presnovna pot konjugacija z glukuronsko kislino in tvorba neaktivnega glukuronida BPA, manjši delež pa se ga pretvori v BPA-sulfat. Spojine, ki nastanejo pri konjugaciji, izgubijo estrogenu aktivnost (24). Presnovki se nato s krvjo prenesejo v ledvica in izločijo z urinom. V urinu se  $32 \pm 31$  % BPA nahaja v obliki prostega BPA,  $57 \pm 34$  % v obliki BPA-glukuronida in  $7 \pm 14$  % v obliki BPA-disulfata (30). BPA, ki smo mu izpostavljeni z absorpcijo skozi pljuča ali kožo, ne zapade metabolizmu prvega prehoda, zato je njegov razpolovni čas daljši kot pri peroralnemu zaužitju (24). Pri glodalcih BPA-glukuronid zapade enterohepatičnemu kroženju, posledično so ti dlje časa izpostavljeni BPA, ki se pri njih izloča predvsem z blatom (24, 28). Koncentracije jetrnih encimov (UDP-glukuronozil transferaze), ki sodelujejo pri metabolizmu BPA, so tekom razvoja v maternici dosti nižje kot pri odraslem človeku, poleg tega pa ni zaznane transkripcije genov teh encimov v maternici, kar pomeni, da je vpliv BPA na zarodek večji kot pri odraslem človeku (22).

Poleg reakcij metabolizma druge faze obstajajo študije, ki kažejo na obstoj oksidativne metabolne poti in tvorbe reaktivnih produktov (kinonov, semikinonov) pod vplivom citokroma P450. Kinoni, ki nastanejo, se lahko kovalentno vežejo na DNA in povzročajo spremembe na dednem materialu (13, 31). V študiji, ki je *in vitro* preučevala biotransformacijo BPA in njegovih analogov v humanih jetrnih mikrosomih, z rekombinantnimi izoencimi citokroma P450 v prisotnosti NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfata) in GSH (glutationa), so kot glavni produkt metabolizma določili hidroksiliran metabolit BPA (orto in meta pozicija hidroksline skupine na obroču). Zaznali so tudi pojav metabolitov, ki so izkazovali večjo afiniteto vezave na estrogenske receptorje kot BPA, zato so potrebne še nadaljnje študije na področju estrogenske aktivnosti potencialnih metabolitov BPA (32).

## BISFENOL A KOT HORMONSKI MOTILEC

BPA je znan hormonski motilec, ki se lahko veže na številne receptorje:

- estrogenske receptorje,
- estrogenskemu podoben  $\gamma$ -receptor,
- arilne ogljikovodikove receptorje,
- androgene receptorje,
- glukokortikoidne receptorje,
- tiroidne receptorje,
- pregnan-X receptor,
- s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor gama

in vpliva na dopaminski sistem (8, 25, 26).

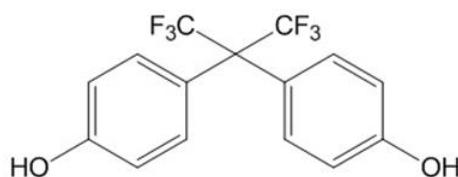
Sodi med šibke estrogene, z več kot 1000-krat do 10000-krat nižjo afiniteto vezave na estrogenske receptorje (ER) v primerjavi z naravnim hormonom  $17\beta$ -estradiolom (E2). Veže se tudi na nejedrne ER, zaradi česar izkazuje enako oz. celo močnejše estrogeno delovanje kot E2 (27). Poznamo dva tipa jedrnih ER ( $\alpha$  in  $\beta$ ), ki ju kodirata dva različna gena, razlikujeta pa se tudi po mestu nahajanja in specifičnemu odgovoru na vezavo ligandov (13). BPA naj bi na ER $\beta$  deloval agonistično in mešano agonistično, antagonistično na ER $\alpha$ . Izkazoval naj bi tudi večjo afiniteto vezave na  $\beta$  kot  $\alpha$  receptorje, poleg tega pa naj bi zaviral razgradnjo in sekundarno modifikacijo proteinov na ER $\beta$  (25, 27). Za vezavo na ER je ključna prisotnost fenolne skupine v molekuli in ustrežna geometrična razporeditev ostalih funkcionalnih skupin. Pri BPA sta za vezavo odgovorna hidroksilna skupina na fenolnem obroču in hidrofobne metilne skupine na centralnem ogljikovem atomu (13). Na nekatere jedrne receptorje (npr. estrogenskemu podoben  $\gamma$ -receptor) se BPA veže z večjo afiniteto vezave kot na ER  $\alpha$  in  $\beta$  (33).

Nekatere študije kažejo na obstoj nejedrnih mehanizmov delovanja estrogenov in nekaterih HM (tudi BPA) (14). Tako ER  $\alpha$  kot  $\beta$  so identificirali tudi zunaj jedra (v mitohondriju, citosolu in bližini plazemske membrane). Ti receptorji omogočajo hitre odgovore na dražljaje. Odkrili so tudi receptor sklopljen s proteinom G ter predpostavili, da lahko E2 deluje tudi na nekatere nevrottransmitterske receptorje in ionske kanale ter tako sproži odziv. Estrogeni imajo v našem telesu pomembno vlogo. Vplivajo na delovaje in razvoj kosti, jeter, možganov, maščevja, skeletnih mišic, hormonskega in kardiovaskularnega sistema (27). BPA z vezavo na ER deluje na te sisteme v telesu. Številne študije kažejo na

povezavo med izpostavljenostjo BPA in nekaterimi boleznimi, kot so sladkorna bolezen, debelost, kardiovaskularne bolezni (bolezni srca, hipertenzija, povečan holesterol), kronične bolezni ledvic (albuminurija), zmanjšana telesna teža novorojenčkov, reproduktivne spremembe (neplodnost, vpliv na spolnost pri moških, zmanjšana kvaliteta semenčic, spremembe v koncentracijah spolnih (manjša koncentracija testosterona) in drugih (npr. tiroidnih) hormonov, sindrom policističnih jajčnikov, povečano število splavov, rakava obolenja (rak prostate, dojk), kronične respiratorne bolezni (astma), bolezni jeter ter imunskega in živčnega sistema (vpliv na obnašanje in razvoj živčevja pri otrocih) (9, 21, 27, 34).

### 1.3.2 BISFENOL AF

Bisfenol AF (BPAF) je analog BPA. Sestavljata ga dva fenolna obroča, ki sta med seboj povezana z metilenskim mostom, na katerega sta pripeti dve trifluorometilni ( $\text{CF}_3$ ) skupini (Slika 3) (35).



Slika 3: Strukturna formula bisfenola AF.

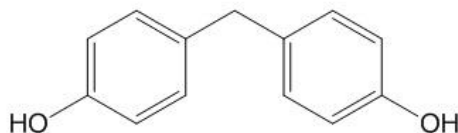
Zamenjava metilnih ( $\text{CH}_3$ ) skupin s  $\text{CF}_3$  poveča termično in kemično stabilnost, hkrati pa poveča estrogenost in potencialno toksičnost spojine, saj je  $\text{CF}_3$  skupina veliko bolj elektronegativna in s tem potencialno reaktivnejša kot pa  $\text{CH}_3$  pri BPA (18, 33, 36). BPAF se uporablja v proizvodnji fluoroelastomerov ter kot monomer v sintezi polimerov, kot so poliimidi, poliamidi, poliestri in polikarbonati. Najdemo ga v aparataturah za proizvodnjo hrane, elektronskih napravah in optičnih vlaknih (36, 37). Letno se ga v Združenih državah Amerike proizvede med 4500 in 227000 kilogrami (ocenjeno med letoma 1986 in 2002) (18). Glavni vir onesnaženja vodnega okolja predstavljajo odpadne vode iz industrije, ki zaradi neučinkovitih metod čiščenja v okolje izpuščajo BPAF in ostale HM. V Nemčiji so BPAF zaznali v treh četrтинah vzorcev površinskih in odpadnih voda in več kot polovici vzorcev sedimenta (37). V študiji, ki so jo leta 2012 izvedli na Kitajskem, so merljive koncentracije BPAF zaznali v rekah, sedimentu in zemlji, ne pa v pitni vodi (18). Tudi fluoridni ion, ki nastane pri razgradnji BPAF, lahko onesnažuje okolje (38).

BPAF sodi med hormonske motilce. Deluje lahko na estrogenske (agonistično, antagonistično delovanje) in androgenske (antagonistično delovanje) receptorje (37, 39). Glede na študijo, ki jo je izvedel Yin Li s sodelovci, naj bi BPAF v visokih koncentracijah ( $\geq 10$  nM) deloval agonistično, v nižjih ( $\leq 10$  nM) pa antagonistično na ER  $\alpha$  in  $\beta$  (39). Dve leti pred njim je Matsushima s sodelavci izvedel študijo, ki je pokazala, da se BPAF veže na ER z večjo afiniteto kot BPA. Ugotovil je tudi, da naj bi BPAF na ER $\alpha$  deloval kot agonist in na ER $\beta$  kot antagonist (33). Izkazoval naj bi tudi večjo estrogensko aktivnost in bil bolj toksičen kot pa BPA (36). BPAF lahko modulira tudi druge signalne poti (aktivacija p44/42 MAPK poti), ki omogočajo hitrejše odgovore na dražljaje in se veže na humani pregnan-X receptor (na steroide in ksenobiotike občutljiv jedrni receptor), ki ima pomembno vlogo pri metabolizmu ksenobiotikov (18, 39). Pri podganah naj bi povzročal zmanjšano izražanje genov, ki so pomembni za transport holesterola in biosintezo steroidov ter tako vplival na zmanjšano proizvodnjo testosterona (36).

Študije na podganah so pokazale, da se večina BPAF iz telesa izloči predvsem z blatom (nekonjugiran), nekaj pa tudi z urinom (35). V urinu podgan je glavni produkt metabolizma glukuronid BPAF. Encimi uridin difosfat glukuronozil transferaze so pomembni pri izločanju bisfenolov iz telesa (40). Leta 2013 je Schmid prišel do ugotovitev, da lahko citokromi P450 *in vitro* povzročijo hidroksilacijo BPAF. Pri tem kot glavna produkta metabolizma (v prisotnosti humanih jetrnih mikrosomov, NADPH, GSH in citokromov P450) nastaneta hidroksiliran BPAF in 4-heksafluorohidroksiizopropiliden-fenol (produkt razgradnje molekule na metilenskem mostu, ki med seboj povezuje fenolna obročja) (32).

### 1.3.3 BISFENOL F

Bisfenol F (BPF) je strukturno podoben BPA (41). Sestoji iz dveh fenolnih obročev, ki sta med sabo povezana z metilensko skupino (Slika 4). Nastane pri reakciji formaldehida s fenolom (42). Uporablja se v sintezi (polikarbonatov in epoksidnih smol), industriji (kot lepilo, lak, v proizvodnji plastike, konzerv, pločevink, vsebnikov za hrano in pijačo) in kmetijstvu. Najdemo ga tudi v vodnih pipah, čeladah, zobnih vsadkih in protezah (41, 43, 44). Epoksidne smole, ki vsebujejo BPF, odlikujeta manjša viskoznost in boljša odpornost na topila (kot tiste, ki vsebujejo BPA), zato je njihova uporaba v zadnjih letih močno narastla (41).



Slika 4: Strukturna formula bisfenola F.

V okolici tovarn in čistilnih naprav lahko BPF prehaja v zemljo, jezera in reke (43). V Nemčiji so ga zaznali v večini vzorcev iz površinskih in odpadnih voda ter sedimenta (41, 45). V naravi lahko poteče aerobna bakterijska razgradnja BPF. Za razgradnjo naj bi bili odgovorni nekateri sevi bakterije *Sphingomonas yanoikuyae*. BPF naj bi imel drugačno pot razgradnje kot ostali bisfenoli, ki imajo na ogljik med fenoloma vezane različne funkcionalne skupine (46).

BPF je hormonski motilec, ki v telesu posnema delovanje estrogena, deloval pa naj bi tudi antiandrogeno. Glede na nekatere *in vitro* študije, naj bi bil izkazoval močnejše estrogeno delovanje kot BPA, kljub enaki afiniteti vezave na ER (47, 48). Monomeri BPF lahko prehajajo v hrano in pijačo ter pitno vodo (47). Preko prehranjevalne verige lahko vstopijo v organizme, se v njih kopičijo in povzročajo številne škodljive zaplete (41, 44). Od leta 2005 je uporaba epoksidnih smol, ki vsebujejo BPF, prepovedana s strani Evropske agencije za varnost hrane, zaradi škodljivih učinkov bisfenola F diglicidil-etra na zdravje ljudi. Epoksidne smole, ki vsebujejo BPF, so se v nekaterih *in vitro* testih izkazale za genotoksične (48). Glavni *in vitro* produkt metabolizma BPF v humanih jetrnih mikrosomih (v prisotnosti NADPH in GSH) je hidrosilirani BPF (orto in meta produkt), poleg tega pa nastanejo še 4-hidroksibenzil alkohol, konjugat BPF z GSH in konjugat hidrosiliranega BPF z GSH (32). Nekateri *in vitro* študije poročajo tudi o nastanku dihidrosiliranega BPF, dimerov BPF in kateholov, v prisotnosti citokromov P450 in NADPH v humanih jetrnih mikrosomih. V urinu podgan lahko zaznamo glukuronidne in sulfatne konjugate BPF (47). BPF lahko prehaja placento glodalcev (48).

Zaradi omenjenih učinkov bisfenolov je pomemben razvoj novih, učinkovitejših metod za odstranjevanje teh snovi iz odpadnih voda in s tem preprečiti (oz. vsaj omejiti) prehajanje bisfenolov (in ostalih HM) v okolje ter posledično v ljudi ter ostale organizme.

## 2 NAMEN DELA

Onesnaženje vodnih virov postaja vse večji problem modernega sveta. Vsakodnevno v okolje spustimo velike količine industrijskih in kmetijskih odpadnih snovi ter snovi, ki jih uporabljamo v vsakodnevnem življenju. Konvencionalne metode čiščenja odplak ne odstranijo vseh okolju škodljivih snovi, zato se le-te kopičijo v naravi. Številne izmed njih so se sposobne vezati na hormonske receptorje ali na drug način modulirati njihovo delovanje in tako moteče vplivati na organizme. Bisfenoli veljajo za industrijsko zelo pomembne spojine, ki se množično uporabljajo v proizvodnji plastičnih izdelkov in polizdelkov. Zaradi njihove široke uporabe pogosto prihajajo na različne načine v stik z ljudmi in ostalimi organizmi. Ljudje smo bisfenolom izpostavljeni predvsem preko onesnaženih vodnih virov in ostale hrane, saj se le-ti pogosto nahajajo v vsebnikih za hrano in pijačo, zaznali pa so jih tudi v nekaterih vodnih organizmih. Bisfenole uvrščamo med hormonske motilce, ki se lahko v našem telesu vežejo na številne, predvsem jedrne receptorje in tako vplivajo na delovanje endokrinega sistema.

V magistrski nalogi bomo preverjali uspešnost fotokatalize pri odstranjevanju estrogeno aktivnih bisfenolov BPA, BPF in BPAF iz vodnih vzorcev. Fotokataliza je reakcija, ki poteče pod vplivom svetlobe v prisotnosti katalizatorja. Uvrščamo jo med napredne oksidativne postopke, pri katerih je poglavitna oksidacija organskih onesnažil s hidroksilnimi radikali. Določevali bomo estrogeno aktivnost (EA) raztopin BPA in njegovih dveh analogov (BPF, BPAF) pred in po fotokatalitski oksidaciji z imobiliziranim  $\text{TiO}_2$ . Razgradnjo analogov bomo spremljali s HPLC, UV-VIS spektrofotometrijo in TOC (*angl.* Total Organic Carbon) analizo (merjenje vsebnosti celokupnega organskega ogljika v vzorcih pred in po fotokatalizi). Izvedli bomo tudi karakterizacijo katalizatorja, z namenom potrditve vezave delcev  $\text{TiO}_2$  na steklena vlakna (nosilec). Pri tem bomo uporabili naslednje metode: določanje specifične površine trdnih snovi, določanje morfologije katalizatorja z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), UV-VIS-DR trdnih snovi (karakterizacija trdnih in pastoznih snovi z difuzno refleksijo) in določanje kristalne oblike z rentgensko praškovo difrakcijo (XRD). S CHNS elementno analizo bomo določili delež organskega ogljika vezanega na steklena vlakna oz. steklena vlakna s  $\text{TiO}_2$ , z YES testom pa bomo določili padec EA vzorcev po fotokatalizi (s predhodno ekstrakcijo vzorcev na trdni fazi) z namenom določevanja učinkovitosti fotokatalize z

imobiliziranim  $\text{TiO}_2$ , kot potencialne metode za odstranjevanje preučevanih estrogeno aktivnih snovi iz vodnih vzorcev.

V magistrski nalogi bomo preverili naslednje hipoteze:

- struktura BPA in njegovih analogov (BPF, BPAF) vpliva na fotokatalitsko sposobnost odstranjevanja (z imobiliziranim  $\text{TiO}_2$ ),
- estrogena aktivnost vodnih vzorcev BPA, BPF in BPAF se po fotokatalizi z imobiliziranim  $\text{TiO}_2$  zmanjša,
- fotokatalitska oksidacija poteče do popolne mineralizacije preučevanih bisfenolov,
- oksidacijski produkti proučevanih bisfenolov niso več estrogeno aktivni.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1. MATERIALI

Preglednica III: Preglednica preiskovanih spojin.

Spojina	Proizvajalec	CAS številka	Molska masa (g/mol)	Vsebnost (%)
BPA	Sigma-Aldrich, Nemčija	80-05-7	228,29	≥ 99
BPF	Sigma-Aldrich, Nemčija	620-92-8	200,23	98
BPAF	Sigma-Aldrich, Nemčija	1478-61-1	336,23	97

### 3.2. METODE

#### 3.2.1 FOTOKATALIZA

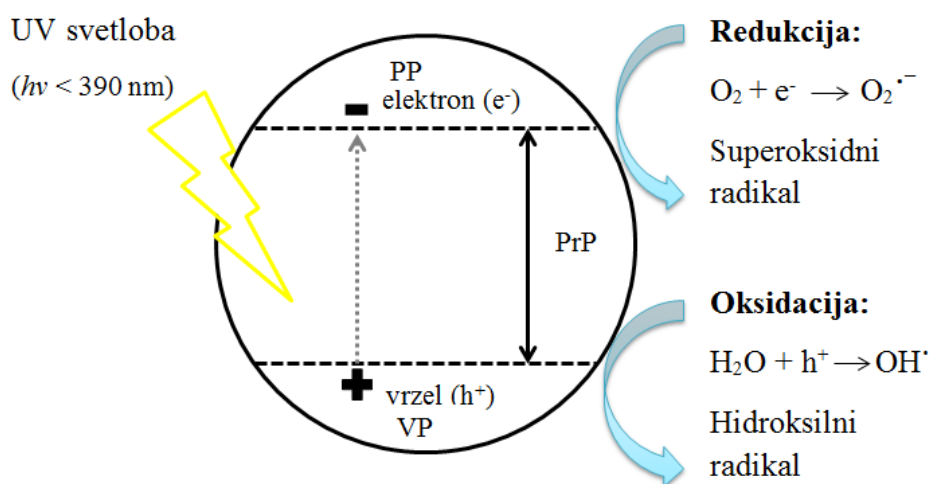
Fotokataliza je reakcija, ki poteče pod vplivom svetlobe v prisotnosti katalizatorja. Uvrščamo jo med NOP, pri katerih je poglavitna oksidacija organskih onesnažil s hidroksilnim radikalom ( $\cdot\text{OH}$ ). Gre za dvostopenjsko reakcijo, pri kateri v prvi stopnji pride do nastanka  $\cdot\text{OH}$ , nato pa sledi reakcija  $\cdot\text{OH}$  z organskimi onesnažili raztopljenimi v vodi. Takšen način odstranjevanja je primeren predvsem za kemijsko stabilne snovi ali spojine z nizko stopnjo biorazgradljivosti. Fotokatalitska oksidacija se je izkazala za učinkovito tudi pri odstranjevanju različnih spojin z estrogenim delovanjem iz vodnih raztopin. Metoda temelji na uporabi polprevodnih materialov (titanov dioksid, cinkov oksid, cinkov sulfid, železov oksid... ) v kombinaciji z ultravijoličnim sevanjem (7).

Titanov dioksid ( $\text{TiO}_2$ ) je zaradi številnih prednosti (visoka fotoaktivnost, dobra stabilnost (v širokem pH območju), nizka cena in neškodljivost za okolje) najpogosteje uporabljen polprevodnik. Polprevodnik je snov, za katero so značilni valenčni, prepovedani in prevodni energijski pas. Ko foton z ustrežno energijo (energija fotona  $\geq$  energija prepovedanega pasu) zadane delec  $\text{TiO}_2$ , pride do absorpcije energije fotona, kar povzroči prehod elektrona iz valenčnega v prevodni pas (v višje energijsko stanje). Pri tem nastanejo pari »elektron-vrzel«, ki so nujni za potek fotokatalize (7, 49).

Nastali elektroni ( $e^-$ ) in vrzeli (angleško hole ( $h^+$ )) se lahko rekombinirajo ali pa potujejo na površino polprevodnika in reagirajo z elektron akceptorji ali elektron donorji (Slika 5). Vrzel lahko oksidirajo nekatere organske spojine, hidroksilne skupine in vodo. Pri tem



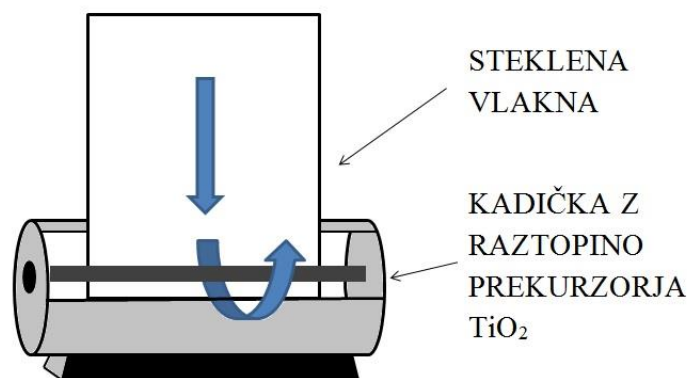
nastane zelo reaktiven hidroksilni radikal. Vzburjeni elektroni reagirajo s kisikom in povzročijo nastanek superoksidnega ion radikala, ki lahko reagira s protonom, pri čemer nastane hidroperoksidni radikal. Iz slednjega običajno nastane vodikov peroksid, ki je tudi dober oksidant. Nastali radikali so zelo reaktivni in reagirajo z organskimi onesnažili v vodi. Cilj fotokatalize je razgraditi organske molekule do ogljikovega dioksida in vode (oz. manj strupenih produktov z nižjo molekulsko maso) (49).



Slika 5: Shema fotokatalitskega mehanizma  $TiO_2$  (VP = valenčni pas, PrP = prepovedan pas, PP = prevodni pas) (49).

### 3.2.2 PRIPRAVA KATALIZATORJA

Kot nosilni sistem za katalizator smo uporabili steklena vlakna (borosilikatno steklo (Sartorius<sup>TM</sup>, grade MGA, Nemčija)). Filter papir iz steklenih vlaken (debeline 0,25 mm) smo razrezali na pravokotnike velikosti 6 x 12 cm in pripravili 0,3 molaro raztopino  $TiOSO_4 \cdot xH_2SO_4 \cdot xH_2O$  (angl. Titanium (IV) oxysulfate-sulfuric acid hydrate (Sigma-Aldrich, Nemčija)) v ultra čisti vodi (Milli-Q voda, upornost 18,2  $M\Omega \cdot cm$  pri 25 °C). Pri tem je nastala belo obarvana raztopina  $TiO_2$  prekurzorja. Raztopino smo do razbarvanja približno 30 min mešali na magnetnem mešalu (Ika, model C-MAG HS 7 IKAMAG<sup>®</sup>, Nemčija) ter jo nato prelili v posebno kadičko z valjem na sredini (Slika 6), s pomočjo katere smo nanесли raztopino  $TiO_2$  prekurzorja na steklena vlakna. Vlakna smo pomočili v raztopino in jih počasi, z enakomernimi potiski potopili pod valj ter jih na drugi strani valja z enakomerno hitrostjo dvigovali ob robu kadičke (da smo se znebili odvečne raztopine). Pri delu smo si pomagali s pinceto in se steklenih vlaknen čim manj dotikali.



Slika 6: Kadička za nanos raztopine  $\text{TiO}_2$  prekursorja na steklena vlakna.

Po nanosu raztopine smo vlakna dali v sušilnik (Kambič, model SP 45-C, Slovenija) na  $65\text{ }^\circ\text{C}$  (približno 5 do 10 min). Delno posušena vlakna smo zvali v valj, ki smo ga na eni strani speli s sponko in dali v kalcinacijsko peč (Nabertherm, model LV 5/11, Nemčija), ki smo jo s hitrostjo segrevanja  $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  za 1 h segreli na  $500\text{ }^\circ\text{C}$ . Hkrati smo pripravili tudi steklena vlakna brez  $\text{TiO}_2$  (brez katalizatorja), ki smo jih uporabili v slepem poskusu. Stekljena vlakna ustrezne velikosti (6 x 12 cm) smo speli v valj in segrevali 1 h na  $500\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.3 KARAKTERIZACIJA KATALIZATORJA

Z namenom karakterizacije katalizatorja so bile izvedene naslednje analize:

- določanje BET specifične površine trdnih snovi (po Braunauer, Emmet in Teller metodi) na aparaturi Micrometric, model Tristar II 3020, ZDA,
- določanje površinske morfologije z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Carl Zeiss, model FE-SEM (*angl.* field-emission elektron microscope) SUPRA 35 VP, Nemčija),
- UV-VIS-DR trdnih snovi (karakterizacija trdnih in pastoznih snovi z difuzno refleksijo) na spektrofotometru Perkin-Elmer, Lambda 35, ZDA,
- rentgenska praškovna difrakcija (XRD) izvedena na PANalytical X'pert PRO MPD difraktometru, Nizozemska.

### 3.2.4 PRIPRAVA RAZTOPIN BPA, BPF IN BPAF

Za poskus fotokatalize smo pripravili raztopine bisfenolov z molsko koncentracijo  $4,38 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ . Na analitski tehtnici (Mettler Toledo, model XP 105 DR, Švica) smo natančno natehtali ustrezno količino bisfenola (Preglednica IV) in ga kvantitativno prenesli v 2 L bučo, v katero smo nato dodali približno 1 L Milli-Q vode. Raztopino smo mešali na

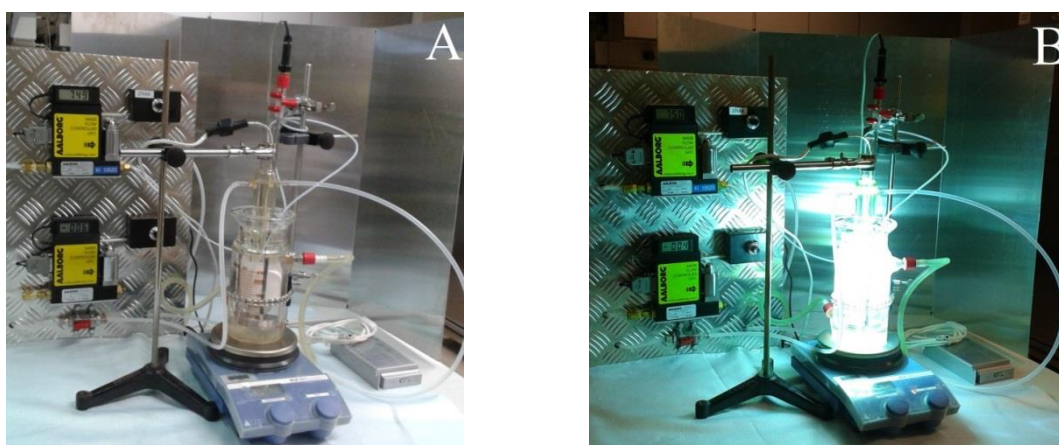
magnetnem mešalu (Ika, model C-MAG HS 7 IKAMAG<sup>®</sup>, Nemčija) pri 30 °C toliko časa, da ni bilo več prisotnih kristalov (do dva dni). Nato smo bučo do oznake dopolnili z Milli-Q vodo in mešali še približno 1 h. Tako pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Preglednica IV: Masa spojin za pripravo raztopine z molsko koncentracijo  $4,38 \times 10^{-5}$  mol/L.

Spojina	Masna koncentracija (mg/L)	Masa v 2 L raztopine (mg)
BPA	10,00	20,00
BPF	8,77	17,54
BPAF	14,73	29,46

### 3.2.5 IZVEDBA FOTOKATALIZE (FOTOLIZE)

V reaktor s hladilnim plaščem smo odmerili 300 mL raztopine bisfenola. V raztopino smo dali magnetno mešalo, termometer (Ika, Nemčija), PFTE cevko za dovod zraka, kovinsko držalo z imobiliziranim TiO<sub>2</sub> na steklenih vlaknih (oz. samo steklena vlakna pri slepem poskusu) in nizko-tlačno živosrebreno žarnico, ki je sevala UV-C žarke, z maksimumom pri 254 nm (Dr. Hönle AG, 150 W, Nemčija). Žarnico smo predhodno vstavili v hladilni sistem z vodo. Reaktor smo postavili na magnetno mešalo (Ika, model RET control/t IKAMAG<sup>®</sup> safety control, Nemčija). Slika 7 prikazuje sestavljeno aparaturu za fotokatalizo (pred in med poskusom).



Slika 7: Aparatura za fotokatalizo (A – brez prižgane žarnice, B – s prižgano žarnico).

Pred začetkom poskusa smo odprli dovod vode (za hlajenje žarnice) in zraka (vir kisika v raztopini). Pretok slednjega smo nastavili (750 mL/min) in uravnavali s krmilnikom masnega pretoka (Aalborg, Mass flow controller GCF, ZDA). Vključili smo hladilni sistem za reaktor (Julabo, model F25-ED, Nemčija) in nastavili želeno temperaturo raztopine (20 °C) ter magnetno mešalo, ki nam je prikazovalo temperaturo raztopine v reaktorju in s katerim smo nastavili hitrost vrtenja magnetna (360 obratov/min).

Prvih 30 min poskusa je potekalo v temi, z namenom stabilizacije sistema in doseg sorpcijskega ravnotežja med analitom v raztopini in adsorbiranim na trdne površine. Da ob vklopu žarnice ne bi prišlo do pregrevanja raztopine, smo temperaturo hladilne tekočine reaktorja po 20 min po vstavitvi katalizatorja, nastavili na 7,5 °C in jo po potrebi prilagajali (tekem poskusa je morala biti temperatura raztopine v reaktorju okoli 20 °C). Po 30 min od začetka poskusa (potopa katalizatorja v raztopino), smo (s pipeto) vzeli prvi vzorec ( $V = 1600 \mu\text{L}$ ) in prižgali žarnico. Vzorce smo nato jemali v 15 minutnih intervalih pri 2-urnem testu ter v 20 minutnih (prvi dve uri) in nato 30 minutnih intervalih (zadnji dve uri) pri 4-urnem testu. Med poskusom smo nosili zaščitna očala z zatemnjenimi stekli (UV filter) in okoli reaktorja namestili zaščitno pregrado.

Za vsak analog bisfenola smo izvedli 4 teste (po dva testa fotokatalize (poskus s katalizatorjem) in po dva fotolize (poskus v odsotnosti katalizatorja, slepi test)):

- 2-urni test:
  - steklena vlakna brez  $\text{TiO}_2$  - slepi test (slepa\_2h)
  - steklena vlakna s  $\text{TiO}_2$  ( $\text{TiO}_2$ \_2h)
- 4-urni test:
  - steklena vlakna brez  $\text{TiO}_2$  - slepi test (slepa\_4h)
  - steklena vlakna s  $\text{TiO}_2$  ( $\text{TiO}_2$ \_4h)

### **3.2.6 KEMIJSKE ANALIZE VZORCEV**

#### **3.2.6.1 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI**

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je pomembna metoda v analizni kemiji, saj omogoča ločevanje, identifikacijo in kvantifikacijo različnih snovi. Uvrščamo jo med separacijske metode, ki temeljijo na porazdeljevanju analitov med trdno in tekočo fazo. Ločevanje poteka na podlagi razlik v električnem naboju, polarnosti ali velikosti

analiziranih analitov. Za ločevanje analitov na podlagi polarnosti lahko uporabimo normalno fazna ali reverzno fazna polnila. V HPLC sistemih se pogosto uporabljajo reverzno fazna polnila, pri katerih je stacionarna faza hidrofobna in mobilna faza mešanica organskega topila in vode, ki se med seboj mešata. Sestava mobilne faze je lahko tekom analize ves čas enaka (izokratska elucija) ali pa se spreminja (gradientna elucija). HPLC sistemi so sestavljeni iz rezervoarja, visokotlačne črpalke, injektorja, predkolone, kolone, detektorja in ustrezne računalniške podpore (50, 51).

Vzorci, ki smo jih vzeli med eksperimentom, smo zbirali v vialah. Po končanem poskusu smo pomerili koncentracijo analogov v vzorcih na HPLC (Thermo Scientific, ZDA). S tem smo pridobili informacijo o časovnem poteku razgradnje bisfenolov. Vedno smo v sekvenco dodali še vzorec ultra čiste vode (Milli-Q) in osnovne raztopine bisfenola iz 2 L buče. Analizni pogoji HPLC metode so zbrani v Preglednici V. Ostanek raztopine po fotokatalizi smo shranili v plastičnih vsebnikih, ki smo jih do nadaljnjih analiz hranili pri 4 °C.

Preglednica V: Pogoji analize vzorcev na HPLC.

Spojina	BPA	BPF	BPAF
Mobilna faza	Metanol*/ultra čista voda = 70:30	Metanol*/ultra čista voda = 60:40	Metanol*/ultra čista voda = 70:30
Volumen injiciranja	10 µL		
Pretok	0,50 mL/min		
Elucija	izokratska		
Kolona	BDS HYPERSIL C18 (100 x 4,6) mm, Thermo Scientific, ZDA		
Detektor	Spectra system UV 2000, Thermo Scinetific , ZDA		
Ostala oprema	Spectra system SCM 1000, Spectra system P 4000, Spectra system AS 3000, Thermo Scinetific , ZDA		

\* HPLC grade, Sigma Aldrich, Nemčija

### 3.2.6.2 UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA

UV-VIS spektrofotometrijo uvrščamo med spektroskopske metode, ki temeljijo na interakciji analita z elektromagnetnim valovanjem, pri čemer pride do absorpcije energije in prehoda elektronov iz osnovnega v nestabilno vzbujeno stanje, ki mu sledi relaksacija.

UV-VIS spektrofotometrija je metoda, pri kateri določamo koncentracijo analita z merjenjem absorpcije monokromatske svetlobe (valovne dolžine 200-380 nm (UV območje) in 380-780 nm (vidno območje)), pri prehodu skozi raztopino vzorca. Absorpcijo elektromagnetnega valovanja lahko opišemo z Beer-Lambertovim zakonom, po katerem je absorbanca premo sorazmerna koncentraciji analita. Spektrofotometrija je enostavna in zanesljiva metoda, katere selektivnost je odvisna od preiskovanih spojin, saj so številni molekularni spektri široki in se med seboj prekrivajo (52).

Po končani fotokatalizi smo na spektrofotometru (Perkin-Elmer, Lambda 45, ZDA) posneli UV-VIS spektre vzorcev po fotokatalizi, ultra čiste vode in osnovne raztopine bisfenola (iz 2 L buče). Merili smo v območju valovnih dolžin med 200 in 600 nm s hitrostjo preleta 120 nm/min. Opazovali smo pojav vrhov v območju valovnih dolžin, ki so značilne za BPA, BPF in BPAF.

### 3.2.6.3 MERITEV TOTALNEGA ORGANSKEGA OGLJIKA (TOC)

Za določevanje organskega ogljika v vodi se pogosto uporabljajo TOC meritve (npr. za določanje organskih onesnažil v pitni vodi). Mednje sodijo tudi destruktivne metode, pri katerih je pomembna razčlenitev organskih molekul na manjše enote in pretvorba ogljika v kvantitativno določljiv produkt ( $\text{CO}_2$ ). Obstajata dva načina merjenja TOC. Pri prvem izmerimo celotni in anorganski ogljik v vzorcu, njuna razlika nam poda vsebnost TOC. Pri drugem načinu, pa se pred meritvijo znebimo anorganskega ogljika in merimo samo organski ogljik.

Postopek merjenja TOC lahko razdelimo v več stopenj:

- nakisanje vzorca (s tem pretvorimo anorganski ogljik (karbonate, bikarbonate) v  $\text{CO}_2$ , ki ga nato detektiramo ali izženemo iz sistema),
- oksidacija vzorca (za pretvorbo organskega ogljika v  $\text{CO}_2$  v sistem uvajamo toploto, kisik, UV sevanje, kemijske oksidante ali kombinacijo le-teh),
- odstranjevanje klora in ostalih halogenov ter vodne pare (lahko motijo detekcijo),
- detekcija nastalega  $\text{CO}_2$  (najbolj pogosto uporabljeni metodi sta merjenje prevodnosti in nedisperzna infrardeča analiza (NDIR)) (53).

Vzorcem, ki smo jih dobili po končani fotokatalizi in osnovnim raztopinam bisfenolov, smo na TOC analizatorju (Teledyne Tekmar, TOC Torch, ZDA) zmerili vsebnost

organskega ogljika, z namenom pridobitve informacije, v kolikšni meri je potekla razgradnja bisfenolov do končnih produktov fotokatalize (vode in ogljikovega dioksida). Koncentracijo organskega ogljika smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje. Pripravili smo raztopine standarda (TOC Standard from KHP ( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ) 1000 mg/L, Teledyne Tekmar, ZDA) z različnimi koncentracijami, tako da smo dobili umeritveno krivuljo v želenem koncentracijskem območju (med 0 mg/L in 15 mg/L). Dobljene rezultate meritev smo vstavili v enačbo krivulje in dobili koncentracijo organskega ogljika v vzorcih.

#### **3.2.6.4 OSTALE KEMIJSKE ANALIZE**

Z namenom določanja količine na steklena vlakna (oz. steklena vlakna s  $\text{TiO}_2$ ) adsorbiranega organskega ogljika (po fotokatalizi) je bila izvedena analiza na CHNS elementnem analizatorju (Perkin-Elmer, model 2400 Series II, ZDA). Na ionskem kromatografu (Dionex, model ICS 3000, ZDA) je bila izmerjena vsebnost prostega fluoridnega iona po fotokatalizi.

#### **3.2.7 EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)**

SPE je separacijska metoda, ki nam omogoča ločevanje v vzorcu raztopljenih ali suspendiranih snovi na podlagi porazdelitev komponent med trdno in tekočo fazo. Trdno fazo predstavljajo različna polnila, ki se nahajajo v diskah ali v majhnih, kromatografskim kolonom podobnim, vsebnikih. Postopek SPE lahko razdelimo na več faz, med katere sodijo aktivacija kolone, spiranje kolone, nanos vzorca, spiranje nevezanih snovi in elucija vzorca. Z ekstrakcijo odstranimo snovi, ki bi motile nadaljnje analize, s tem podaljšamo življenjsko dobo kromatografskega sistema ter izboljšamo kvalitativno in kvantitativno analizo. SPE je hitra in učinkovita metoda ekstrakcije, pri kateri se porabi relativno malo topila in s tem se ustvari manj odpadnih, za okolje škodljivih snovi (10, 54).

Pri ekstrakciji smo uporabili nastavek za ekstrakcijo Supelco Visiprep<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, ZDA) in kolone OASIS<sup>®</sup> HLB CARTRIDGE (Waters, ZDA), katerih polnilo je polimer hidrofilnega N-vinilpirolidona in lipofilnega divinilbenzena, ki zaradi svoje sestave omogoča izolacijo širokega spektra spojin (kislih, bazičnih in nevtralnih).

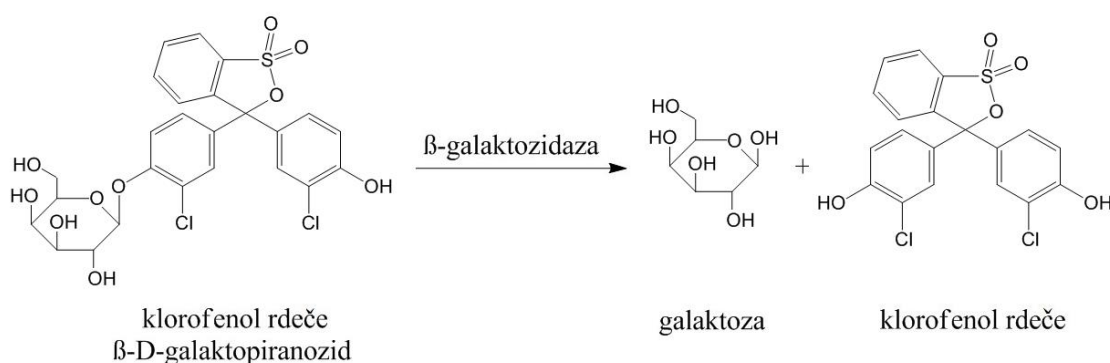
Kolone smo kondicionirali s 5 mL metanola (Sigma-Aldrich, Nemčija), preostanek topila pa smo sprali s 5 mL ultra čiste vode. Metanol in vodo smo skozi kolono spuščali po kapljicah. Nato smo nataknili cev za vodno črpalko (Millipore, ZDA), vzpostavili vakuum

in začeli z nanosom vzorca ( $V = 100 \text{ mL}$ ). Vzorec smo nanašali s pomočjo cevki, ki so bile na eni strani pritrjene na kolone, na drugi pa potopljene v čaše z vzorcem. Pretok skozi kolone je bil okoli  $5 \text{ mL/min}$ . Ko so vsi vzorci prišli skozi kolone, smo na kolone namestili nastavek za sušenje ter pričeli s prepihanjem z dušikom. Ko so bile kolone posušene, smo nastavek odstranili in v kadičko vstavili držalo z epruветami. Vzorce smo s pomočjo vakuuma eluirali s  $4 \text{ mL}$  metanola in zopet sušili z dušikom do končnega volumna  $1 \text{ mL}$ . S pomočjo kapalk smo vzorce prenesli v temno obarvane steklene vsebnike, ki smo jih do nadaljnjih analiz hranili pri  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.8 BIOLOŠKE ANALIZE VZORCEV

#### 3.2.8.1 ESTROGENSKI TEST S KVASOVKAMI (YES)

YES test (*angl.* Yeast Estrogen Screen) sodi med biološke teste za določanje estrogenosti spojin. Razvili so ga na oddelku za genetiko v Glaxu, pod vodstvom prof. Sumpsterja. Kot testni organizmi se uporabljajo gensko spremenjene kvasovke (sev *Saccharomyces cerevisiae*), ki imajo v DNA vneseno sekvenco za humani ER in vnesen plazmid, ki vsebuje reporterski gen lac-Z, kateri nosi zapis za encim  $\beta$ -galaktozidazo ter estrogen odzivne elemente. Vezava estrogena oz. estrogeno aktivne spojine na humani ER povzroči konformacijske spremembe, ki so pomembne za vezavo dimera receptor-ligand na estrogen odzivne elemente, kar povzroči izražanje reporterskega gena in posledično sintezo encima  $\beta$ -galaktozidaze. Ta se iz kvasovke sprosti v medij, kateremu je predhodno dodan kromogen substrat klorofenol rdeče  $\beta$ -D-galaktopiranozid (CPRG). CPRG je substrat encima  $\beta$ -galaktozidaza, ki razgradi galaktozidazne dimere v monomere (Slika 8). Pri tem iz rumeno obarvanega substrata nastane rdeče-vijolično obarvan produkt klorofenol rdeče (CPR), katerega absorbanco lahko izmerimo pri  $575 \text{ nm}$  (15, 16).



Slika 8: Razgradnja CPRG v galaktozo in CPR s pomočjo encima  $\beta$ -galaktozidaze.



### 3.2.8.2 IZVEDBA YES TESTA

#### TESTNI ORGANIZEM

Za določevanje estrogenosti vzorcev smo uporabljali gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki so jih razvili v Glaxu (Velika Britanija) pod vodstvom prof. dr. Sumpterja (Brunel University, Velika Britanija).

#### PRIPRAVA MINIMALNEGA GOJIŠČA

Za pripravo minimalnega gojišča smo v 1 L bučo na analitski tehtnici (Mettler Toledo, model XP 105 DR, Švica) zatehtali:

- 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nemčija),
- 1,98 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Kemična tovarna Podnart, Slovenija),
- 4,2 g KOH (Merck, Nemčija),
- 0,41 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Nemčija),
- 50 mg levcina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 50 mg histidina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 50 mg adenina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 20 mg arginina-HCl (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 20 mg metionina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 30 mg tirozina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 30 mg izolevcina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 30 mg lizina-HCl (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 25 mg fenilalanina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 100 mg glutaminske kisline (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 150 mg valina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 375 mg serina (Sigma-Aldrich, Nemčija)

in dodali 1 mL raztopine  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (40 mg/50 mL ultra čiste vode) (Merck KGaA, Nemčija), ter z ultra čisto vodo dopolnili do končnega volumna 1000 mL. Raztopino smo do 4 h mešali in segrevali na magnetnem mešalu (Ika, model C-MAG HS 7 IKAMAG<sup>®</sup>, Nemčija) (pri 55 °C). Minimalno gojišče smo nato razlili po 45 ml v 200 mL erlenmajerice in ga avtoklavirali (avtoklav Sutjeska Beograd, Jugoslavija; 121 °C, 1,1 bara, 15 min) ter

shranili v hladilnici. Čistoča uporabljenih reagentov za pripravo minimalnega gojišča je bila vsaj  $\geq 98\%$ , razen pri KOH kjer je znašala  $\geq 90\%$ .

#### PRIPRAVA RASTNEGA GOJIŠČA

Pripravili smo raztopine glukoze (20 g/100 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich; Nemčija), aspartatne kisline (200 mg/50 mL ultračiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija), treonina (1200 mg/50 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija), bakrovega (II) sulfata (249,7 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /50 mL ultra čiste vode) (Sigma-Aldrich, Nemčija) in vitaminov, ki smo jo naredili tako, da smo v 200 mL bučko zatehtali (tehtnica Mettler Toledo, model XP 105 DR, Švica):

- 8 mg tiamina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 8 mg piridoksina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 8 mg pantotenske kisline (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 40 mg inozitola (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija).

Vitamine smo nato raztopili v 180 mL ultra čiste vode in dodali 20 mL biotinske raztopine (2 mg/100 mL ultra čiste vode) (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija). Raztopini vitaminov in  $\text{CuSO}_4$  smo nato sterilno filtrirali čez filter s porami premera 0,22  $\mu\text{m}$  (PES membrana, TPP, Švica), raztopine glukoze, aspartatne kisline in treonina pa smo avtoklavirali (avtoklav Sutjeska Beograd, Jugoslavija; 121 °C, 1,1 bara, 15 min). Raztopino treonina in vitaminsko raztopino smo shranjevali pri 4 °C, ostale pa pri sobni temperaturi. Čistoča uporabljenih reagentov za pripravo rastnega gojišča je bila vsaj  $\geq 98\%$ .

Rastno gojišče smo pripravili tako, da smo v minimalno gojišče sterilno ob ognju dodali:

- 5 mL raztopine glukoze,
- 1,25 mL raztopine aspartatne kisline,
- 0,4 mL raztopine treonina,
- 125  $\mu\text{L}$  raztopine bakrovega (II) sulfata ( $\text{CuSO}_4$ ),
- 0,5 mL vitaminske raztopine.

#### PRIPRAVA TRDNEGA GOJIŠČA

Kvasovke smo gojili na trdnem agarškem gojišču, ki smo ga pripravili tako, da smo v 100 mL minimalnega gojišča dodali 1,5 g agarja (Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija).

Erlenmajerico z gojiščem in agarjem smo avtoklavirali (avtoklav Sutjeska Beograd, Jugoslavija; 15 min, 121 °C in 1,1 bara ) in nato v še vročo vsebino sterilno ob ognju dodali:

- 10 mL raztopine glukoze,
- 2,5 mL aspartatne raztopine,
- 1 mL vitaminske raztopine,
- 0,8 mL treoninske raztopine,
- 0,25 mL raztopine CuSO<sub>4</sub>.

V komori z laminarnim pretokom zraka (Thermo electron corporation, Holten laminair, ZDA) smo vsebino prelili v petrijevke, ki smo jih pustili napol odprte, da se je agar strdil (45 min). Petrijevke smo nato pokrili in ovili s paro-neprepustnim filmom (Parafilm<sup>®</sup> M), kar je preprečilo izgubo vlage med shranjevanjem. Gojišča smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

#### OHRANJEVANJE KULTURE KVASOVK

Kvasovke smo enkrat mesečno (z namenom ohranjanja kulture) precepili na novo trdno gojišče. Delo je potekalo sterilno ob ognju, na razkuženi delovni površini. S sterilno cepilno zanko smo prenesli eno, jasno ločeno kolonijo iz starega trdnega gojišča na novo. Petrijevko smo nato dali v inkubator (Inkubator 1000, Heidolph, Nemčija) na 28 °C. Po petih dneh so kvasovke zrastle. Petrijevko smo vzeli iz inkubatorja, jo ovili s paro-neprepustnim filmom (Parafilm<sup>®</sup> M) in shranili v hladilniku pri 4 °C.

#### PRIPRAVA INDIKATORJA

V sterilno epico smo zatehtali 10 mg klorofenol rdeče β-D-galaktopiranozida (CPRG) (Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost ≥ 90 %) in sterilno ob ognju dodali 1 mL sterilne destilirane vode. Vsebino smo dobro premešali in razdelili po 200 μL CPRG-ja v 5 sterilnih epic, ki smo jih zaščitili pred svetlobo z aluminijasto folijo in shranili pri 4 °C.

#### NAMNOŽITEV KVASOVK ZA YES test

V rastno gojišče smo sterilno ob ognju nacepili veliko kolonijo kvasovk z agarne plošče ter jih gojili na ogrevanem stresalniku (Promax 1020 in Inkubator 1000, Heidolph, Nemčija) pri 130 rpm in 28 °C. Po enem do dveh dnevih so kvasovke zrastle do zelene optične

gostote 1 pri 620 nm, ki smo jo pomerili na spektrofotometru (Perkin-Elmer, Lambada 20, ZDA).

#### IZVEDBA YES TESTA

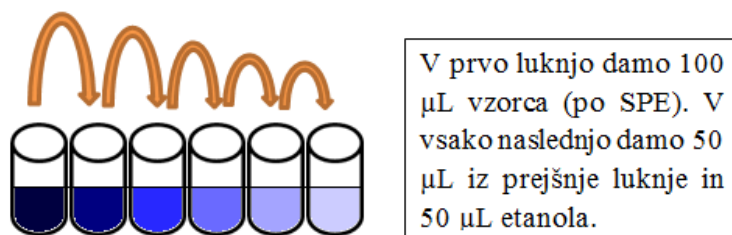
Test smo izvajali v komori z laminarnim pretokom zraka (Thermo electron corporation, Holten laminair, ZDA). Površino komore smo pred delom razkužili s 70 % etanolom (Carlo Erba, Francija) in dezinfekcijskim sredstvom (Asepsol<sup>®</sup>, Pliva, Hrvaška). 15 min pred začetkom dela smo prižgali UV luč, nato pa še 15 min pustili kroženje zraka. Test smo izvajali na mikrotitrskih ploščah z 96 luknjicami (TPP, Švica). Ob vsakem nanosu na ploščo smo menjavali sterilne nastavke na pipeti. Pri delu smo uporabljali rokavice.

#### Nanos vzorcev na mikrotitrsko ploščo

Na ploščo smo nanесли:

- E2 (Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost  $\geq 98$  %): pozitivna kontrola, naravni estrogen, ki se veže na ER in pri kvasovkah sproži odziv (začetna koncentracija 27,2  $\mu\text{g/L}$ );
- progesteron (Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost  $\geq 99$  %): negativna kontrola, hormon, ki nima estrogenskega učinka, pri kvasovkah ne sproži odziva (začetna koncentracija 31,4  $\mu\text{g/L}$ );
- BPA, BPF, BPAF (osnovna raztopina po ekstrakciji na trdni fazi): pozitivna kontrola;
- ultra čista voda po ekstrakciji na trdni fazi: negativna kontrola, kot dokaz, da kolone ne odpuščajo estrogene aktivnih snovi;
- rastni medij s CPRG (brez kvasovk): s tem smo preverili, ali so v gojišču snovi, ki reagirajo s CPRG in dajo lažno pozitivni rezultat;
- rastno gojišče s kvasovkami in CPRG: s tem nanosom smo preverili morebitno okužbo kulture kvasovk oz. nepravilno izražanje ER;
- končne vzorce po fotokatalizi oz. fotolizi (po predhodni ekstrakciji na trdni fazi).

Na prvi mikrotitrski plošči smo pripravili redčitveno vrsto za standarde in vzorce, s faktorjem redčenja 2 (Slika 9). Redčili smo z absolutnim etanolom (koncentracija  $\geq 99,8$  %, Sigma-Aldrich, Nemčija). Pripravili smo 6 redčitev vsakega vzorca, razen pri BPAF, kjer smo pri vzorcih z najvišjo koncentracijo analoga naredili do 18 redčitev.

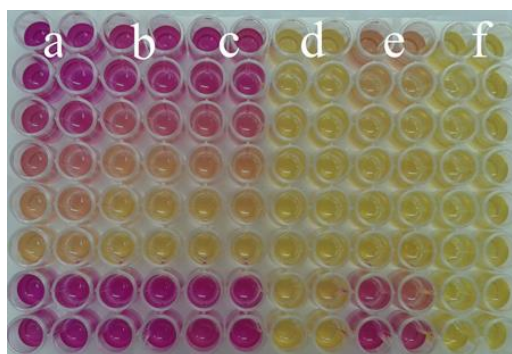


Slika 9: Priprava redčitvene vrste na mikrotitrski plošči.

Nato smo s prve plošče prenesli po 10  $\mu\text{L}$  iz vsake luknje na drugo mikrotitrsko ploščo. Nanašali smo v dveh paralelah. Po nanosu vseh vzorcev smo pustili, da topilo izhlapi (45 min). Medtem smo pripravili rastno gojišče in v njega odmerili 200  $\mu\text{L}$  CPRG-ja in 2 mL kulture kvasovk (z  $\text{OD}_{620} = 1$ ). Na drugo mikrotitrsko ploščo smo nanесли tudi 20  $\mu\text{L}$  vzorca po SPE (brez redčitev). V vsako luknjo smo dali 200  $\mu\text{L}$  ravnega gojišča s kvasovkami in CPRG-jem. Prazne luknje smo zapolnili z nanosom kontrol, s katerimi smo preverili ustreznost gojišča, kvasovk in CPRG-ja. Mikrotitrsko ploščo smo nato rahlo stresli in dali v inkubator na 34  $^{\circ}\text{C}$  za 46–48 ur. Za vsak bisfenol smo naredili dve ponovitvi YES testa.

#### Merjenje absorbance

Po dveh dneh v inkubatorju se je razvila barva (Slika 10), katere absorbanco smo izmerili na mikročitalcu PowerWave XS (Bio-Tek, ZDA), s programsko opremo KCJunior. Merili smo absorbanco pri 575 nm (za določanje intenzivnosti barve nastalega produkta) in 620 nm (za določanje stopnje rasti kvasovk).



Slika 10: Primer mikrotitrške plošče. (stolpec a = BPA\_standard, b = BPA\_slepa\_2h, c = BPA\_slepa\_4h, d = BPA\_TiO<sub>2</sub>\_4h, e = BPA\_TiO<sub>2</sub>\_2h, f = Milli-Q voda in slep vzorec). Prva vrstica predstavlja 5-kratni koncentrat, zadnji dve vrstici pa 10-kratni koncentrat vzorca. Ostale vrstice predstavljajo redčitveno vrsto (faktor redčenja 2).

### 3.2.8.3 IZRAČUNI POTREBNI ZA VREDNOTENJE YES TESTA

#### Izračun zaviranja rasti kvasovk

Bisfenoli so lahko za kvasovke strupeni, kar se kaže kot zaviranje rasti le-teh. Za vsak vzorec pri YES testu smo izračunali zaviranje rasti kvasovk (enačba 1). Če smo določili več kot 50 % zaviranje rasti, teh vzorcev pri nadaljnjih izračunih nismo upoštevali (55).

$$\text{Zaviranje rasti kvasovk (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{A_{620 \text{ nm}}}{\bar{K}}\right),$$

kjer je  $A_{620 \text{ nm}}$  absorbanca vzorca pri valovni dožini 620 nm,  $\bar{K}$  pa absorbanca povprečnih vrednosti negativne kontrole (pri 620 nm).

#### Izračun estrogene aktivnosti (EA) oz. aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze (enačba 2)

$$EA = A_{575 \text{ nm (vzorec)}} - (A_{620 \text{ nm (vzorec)}} - A_{620 \text{ nm (slepa)}}),$$

kjer je  $A_{575 \text{ nm (vzorec)}}$  absorbanca vzorca merjena pri 575 nm,  $A_{620 \text{ nm (vzorec)}}$  absorbanca vzorca merjena pri 620 nm,  $A_{620 \text{ nm (slepa)}}$  motnost kvasovk v testnem mediju (15).

#### Izračun relativne estrogenske aktivnosti (REA) (enačba 3)

$$REA = (EA_{\text{vzorec}} - EA_{\text{slepa}}) / \Delta \cdot 100,$$

kjer je  $EA_{\text{vzorec}}$  estrogena aktivnost vzorca izračunana po enačbi 2,  $EA_{\text{slepa}}$  povprečje estrogene aktivnosti slepih kontrol (rastni medij s kvasovkami in CPRG-jem) izračunane po enačbi 2,  $\Delta$  pa je interval estrogenosti z začetno točko v najvišji vrednosti EA standarda analoga (BPA, BPF, BPAF) in končno točko v  $EA_{\text{slepa}}$  (15).

#### Statistična obdelava podatkov dobljenih z YES testom:

Dobljene rezultate YES testa smo statistično obdelali z računalniškim programom OriginPro 8. Rezultati so grafično prikazani kot povprečne vrednosti relativne estrogene aktivnosti, z upoštevanjem relativne standardne deviacije (RSD).

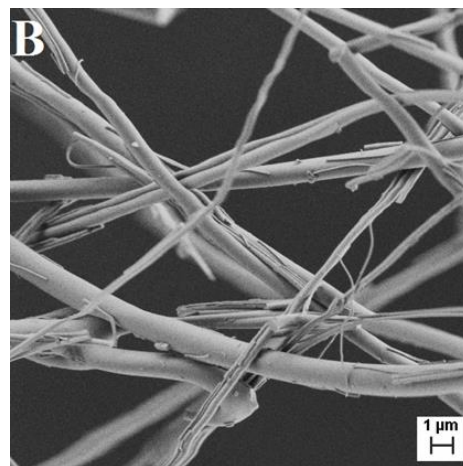
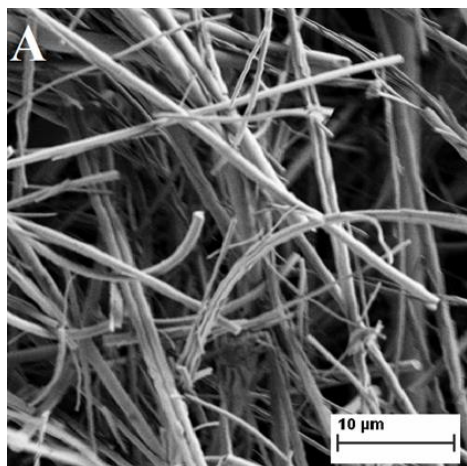
## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Onesnaženje vodnih virov postaja vse večji problem modernega sveta. Konvencionalne metode čiščenja odpadnih voda ne odstranijo vseh okolju škodljivih (sintetičnih, strupenih) snovi. V ta namen se številni znanstveniki trudijo razviti in vpeljati nove, učinkovitejše metode čiščenja odpadnih voda. Metode morajo biti učinkovite, hitre, enostavne, z nizkimi stroški postavitve opreme in obratovanja, z ustvarjanjem čim manj odpadkov in z možnostjo uporabe v procesu masovnega čiščenja onesnaženih vodnih izpustov. V magistrski nalogi smo razvili fotokatalizator na osnovi imobiliziranega  $\text{TiO}_2$  ter ovrednotili njegovo delovanje v kombinaciji z UV sevanjem v procesu heterogene fotokatalitske oksidacije estrogene aktivnih bisfenolov (BPA, BPF, BPAF) v vodnih vzorcih.

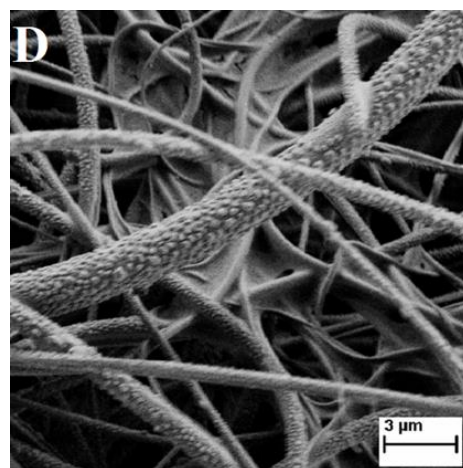
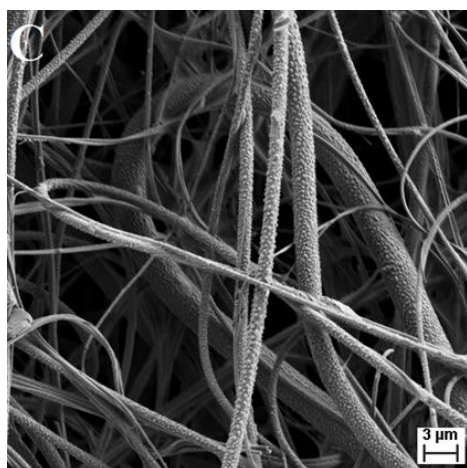
Imobilizacija katalizatorja na trdni nosilec nudi številne prednosti pred suspendiranim katalizatorjem v raztopini vzorca. Po uporabi suspendiranega katalizatorja moramo vzorce ustrezno obdelati (centrifugirati, filtrirati), da odstranimo suspendirane delce iz očiščene vode. To pogosto predstavlja problem, saj so delci majhnih velikosti (mikro in nanometrski delci), hkrati pa je ta proces časovno in finančno potraten. Poleg tega lahko delci med fotokatalizo senčijo drug drugega (vsi delci niso v enaki meri izpostavljeni UV sevanju), tvorijo usedlino (npr. pri premajhnem pretoku zraka, mešanju raztopine) ali aglomerate, ki so posledica različnih snovi v vzorcu in s tem povzročijo zaostajanje snovi, ki jo želimo razgraditi. Kljub temu pa ima tudi imobilizacija katalizatorja nekaj omejitev, kot so priprava imobiliziranega sistema (lahko tehnološko bolj zahtevna kot priprava suspendiranega katalizatorja), manjša reakcijska površina, možnost neenakomerne porazdelitve delcev na nosilcu, slabša porazdelitev katalizatorja v prostoru ter možna kontaminacija površine katalizatorja v procesu nanosa na površino nosilca.

### 4.1 KARAKTERIZACIJA KATALIZATORJA

Kot nosilni sistem za katalizator smo uporabili steklena vlakna. Obliko in topografijo steklenih vlaken smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM). Opazili smo številne med seboj prepletene niti (Slika 11). Slika 12 prikazuje steklena vlakna z imobiliziranim katalizatorjem. Iz slike je razvidno, da se je  $\text{TiO}_2$  (v obliki skupkov) enakomerno porazdelil po celotni površini. Priprava imobiliziranega katalizatorja se je izkazala za enostavno in hitro metodo, ki je dala zadovoljive in ponovljive rezultate (primerjava poteka razgradnje med 2-urno in 4-urno fotokatalizo).

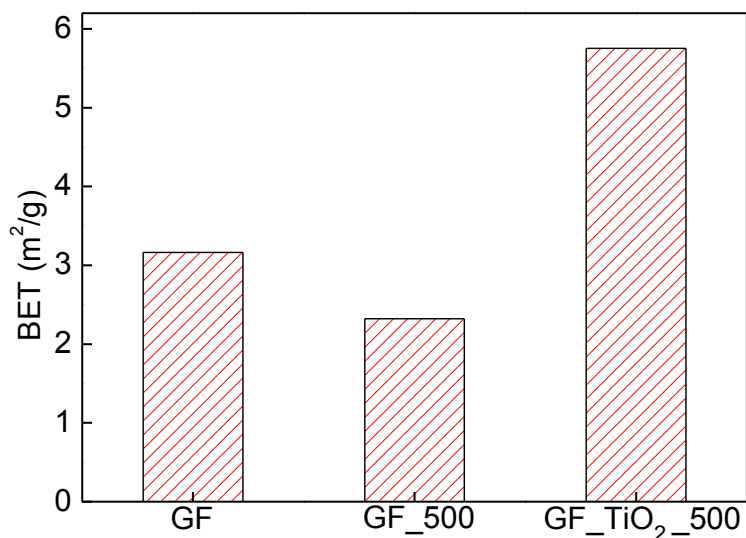


Slika 11: SEM posnetek steklenih vlaken.

Slika 12: SEM posnetek steklenih vlaken s TiO<sub>2</sub>.

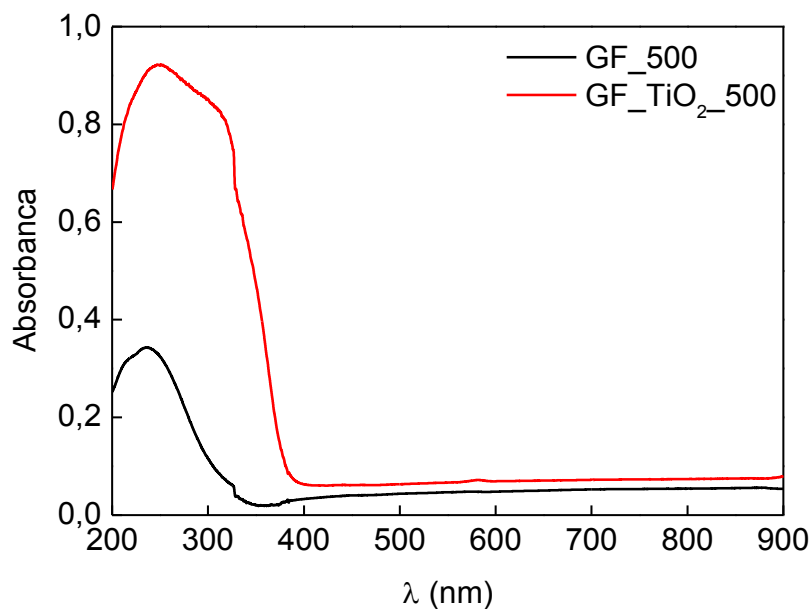
BET specifična površina steklenih vlaken se je po termični obdelavi (na 500 °C) zmanjšala kot posledica sintranja, po nanosu TiO<sub>2</sub> in nadaljnji termični obdelavi na 500 °C, pa se je povečala za 1,8-krat (v primerjavi z GF) oziroma za 2,5-krat (v primerjavi z GF<sub>500</sub>) (Slika 13). Specifična površina je pri GF<sub>TiO<sub>2</sub></sub> znašala 5,75 m<sup>2</sup>/g, pri GF 3,16 m<sup>2</sup>/g in pri GF<sub>500</sub> pa 2,32 m<sup>2</sup>/g. Na podlagi povečanja specifične površine, ki kaže na povečanje površinske hrapavosti, lahko sklepamo, da je bil nanos TiO<sub>2</sub> uspešen. Kljub temu, da je specifična površina GF<sub>TiO<sub>2</sub>500</sub> znašala približno 10-krat manj, kot pri komercialnem TiO<sub>2</sub> (P25, Degussa, BET specifična površina 50 ± 15 m<sup>2</sup>/g) (56), ki predstavlja standard (referenčni suspendirani katalizator) v fotokatalizi, se je naš katalizatorski sistem v danih eksperimentalnih pogojih izkazal za učinkovitega in v izbranem časovnem okviru fotokatalitske oksidacije omogočil kompletno razgradnjo bisfenolov ter v veliki meri tudi popolno oksidacijo pri reakciji nastalih reakcijskih intermediatov.





Slika 13: BET specifična površina steklenih vlaken (GF), steklenih vlaken kalciniranih na 500 °C (GF\_500) in steklenih vlaken s TiO<sub>2</sub> kalciniranih na 500 °C (GF\_TiO<sub>2</sub>\_500).

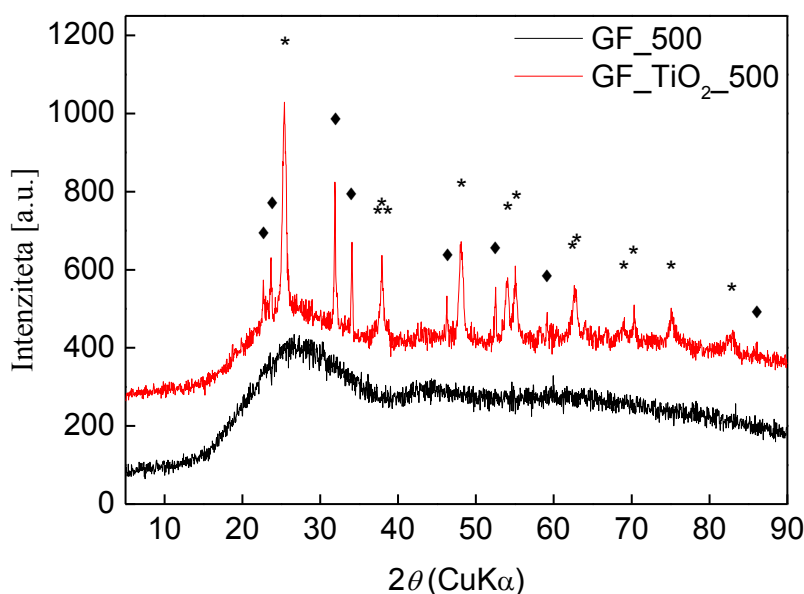
Prisotnost delcev TiO<sub>2</sub> na steklenih vlaknih smo potrdili tudi z merjenjem absorbanca difuzne svetlobe v območju valovnih dolžin od 200 do 900 nm (v primerjavi s spektrom steklenih vlaken kalciniranih na 500 °C) (Slika 14).



Slika 14: UV-VIS-DR spekter steklenih vlaken in steklenih vlaken s TiO<sub>2</sub>.

Višjo absorbanco smo izmerili pri valovnih dolžinah  $\leq 400$  nm, kar je značilno za  $\text{TiO}_2$ . Energija prepovedanega pasu (energijska razlika med prevodnim in valenčnim pasom) pri  $\text{TiO}_2$  (anataz) znaša okoli 3,2 eV, kar ustreza energiji svetlobe z valovno dolžino pod 387 nm. Če  $\text{TiO}_2$  obsevamo s svetlobo valovne dolžine  $\leq 387$  nm, pride do prehoda elektrona iz valenčnega v prevodni pas in nastanka parov »elektron–vrzel«, ki so nujni za potek fotokatalize (49) (Slika 5).

Z rentgensko praškovno difrakcijo smo določili kristalno obliko  $\text{TiO}_2$ , vezanega na steklena vlakna (Slika 15). Opazili smo pojav uklonskih vrhov značilnih za kristalno obliko anataz, ki se najpogosteje uporablja v fotokatalitskih procesih. Poleg tega smo v XRD spektru zaznali za anataz neznačilne vrhove, za katere smo določili, da pripadajo kristalni strukturi  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ki je kot nečistota nastal med postopkom priprave imobiliziranega katalizatorja. Steklena vlakna so vsebovala natrijev ione, ki so zreagirali s sulfatnimi ioni v kisli raztopini prekursorja  $\text{TiO}_2$ . Ker je  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dobro topen v vodi, lahko sklepamo, da se je v raztopini vzorca nahajal v obliki  $\text{Na}^+$  in  $\text{SO}_4^{2-}$  ionov.



Slika 15: XRD graf steklenih vlaken in steklenih vlaken s  $\text{TiO}_2$ . (\* vrhovi značilni za anataz, ♦ vrhovi značilni za natrijev sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),  $\theta$  kot, pod katerim rentgenski žarki obsevajo površino vzorca).

Prisotnost  $\text{SO}_4^{2-}$  ionov lahko vpliva na potek fotokatalize. Večina raziskav kaže na to, da prisotnost teh ionov zmanjša hitrost razgradnje preiskovanih spojin (57, 58), medtem ko

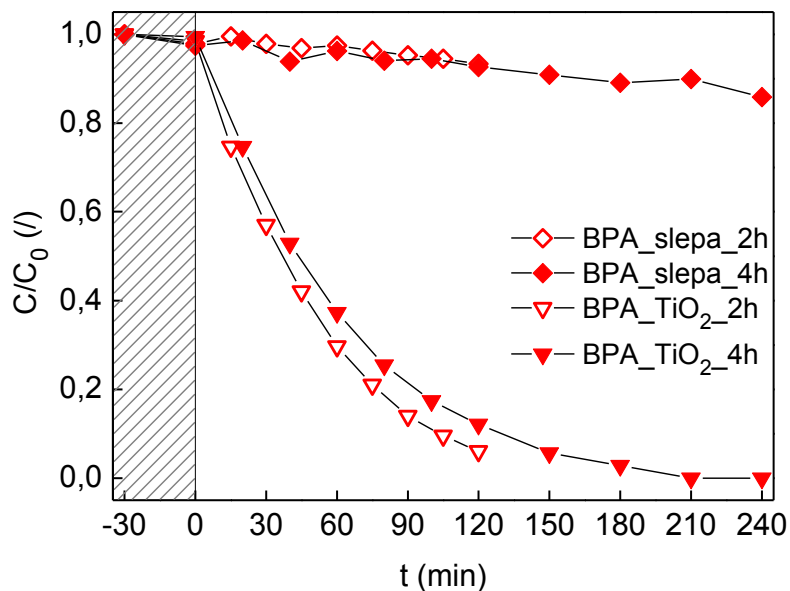
rezultati drugih trdijo ravno nasprotno (59). Nekateri znanstveniki trdijo, da  $\text{SO}_4^{2-}$  ioni tekmujejo z organskimi molekulami za vezavna mesta na katalizatorju, se vežejo na njegovo površino ter reagirajo z nastalimi vrzelmi in hidrosilnimi radikali. Pri tem nastane sulfatni anion radikal, ki lahko oksidira organske molekule, ker pa je manj reaktiven kot hidrosilni radikal, upočasni fotokatalitsko razgradnjo (57). Ostali znanstveniki pa so prepričanja, da se  $\text{SO}_4^{2-}$  ion tako kot ostali anioni veže na površino katalizatorja, pri tem se ustvari negativni naboj, ki povleče nastale vrzeli na površino  $\text{TiO}_2$ . Tako je več vrzeli na voljo za interakcijo s površinsko adsorbiranimi molekulami (predvsem  $\text{H}_2\text{O}$ ), pri čemer nastanejo hidrosilni radikali, ki pospešijo fotokatalitsko razgradnjo. Rezultati na tem področju so si nasprotujoči, kar je najverjetneje posledica različnih modifikacij površine katalizatorja in reakcijskih pogojev (60). Iz pregleda literature lahko zaključimo, da obstaja možnost, da je nastali  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  vplival na proces razgradnje bisfenolov, zato bi bilo smiselno, da se le-ta pred fotokatalizo odstrani s površine katalizatorja (npr. s spiranjem z vodo) in razišče njegov vpliv na fotokatalizo z imobiliziranim  $\text{TiO}_2$ .

## 4.2 FOTOKATALIZA BISFENOLOV BPA, BPF IN BPAF

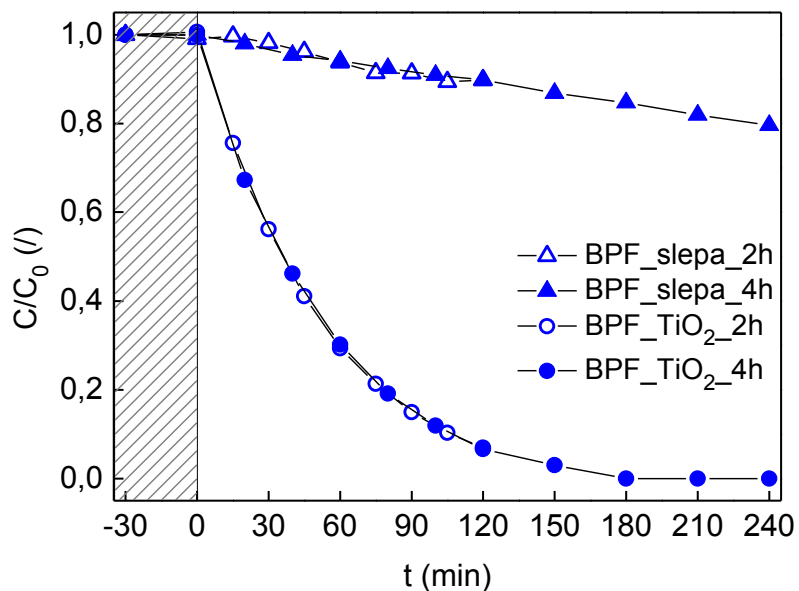
Za vsak bisfenol smo izvedli 2-urni in 4-urni test fotolize (poskus v odsotnosti katalizatorja) ter fotokatalize. Razgradnjo analogov smo spremljali s HPLC, UV-VIS spektrofotometrijo in TOC analizo. Estrogenost vzorcev pred in po fotokatalizi (fotolizi) smo določali z YES testom, s CHNS analizatorjem pa smo določili delež na steklena vlakna (oz. steklena vlakna s  $\text{TiO}_2$ ) akumuliranega organskega ogljika, kot posledica adsorpcije bisfenolov in reakcijskih produktov.

Iz grafov dobljenih s HPLC, ki prikazujejo foto(kata)litsko odstranjevanje bisfenolov v odvisnosti od časa (Slike 16–18), je razvidno, da smo dobili dobro ponovljive rezultate. Razlika je bila opazna samo pri BPA, pri katerem je prišlo do manjših odstopanj (Slika 16), ki so lahko posledica razlik v pripravi katalizatorja (npr. neenakomeren nanosa  $\text{TiO}_2$  delcev na steklena vlakna), oziroma eksperimentalne napake (npr. neoptimalne postavitve žarnice glede na položaj katalizatorja, senčenje oblog kalcijevega karbonata, ki se je izločal iz vodovodne vode na hladilnem plašču okoli žarnice). Vse to je lahko pripomoglo k počasnejšim fotokatalitskim reakcijam in razgradnji BPA (pri 4-urni fotokatalizi). Pri vseh treh analogih smo opazili, da je po 2-urni fotokatalizi v raztopini ostalo še nekaj analoga, koncentracija je dosegla vrednosti nič po 3 h (pri BPF in BPAF) oz. 3,5 h (pri BPA) od

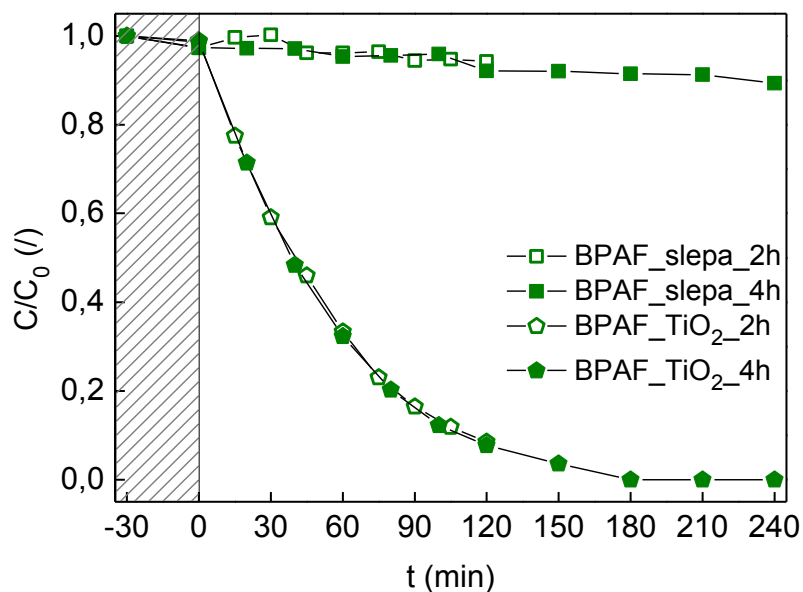
začetka fotokatalize. Po koncu 4-urnega poskusa v vzorcu nismo več zaznali bisfenolov (Slika 19). Na podlagi omenjenih rezultatov lahko sklepamo, da so se bisfenoli s podobno hitrostjo in najverjetneje po podobnem mehanizmu razgradili na manjše enote.



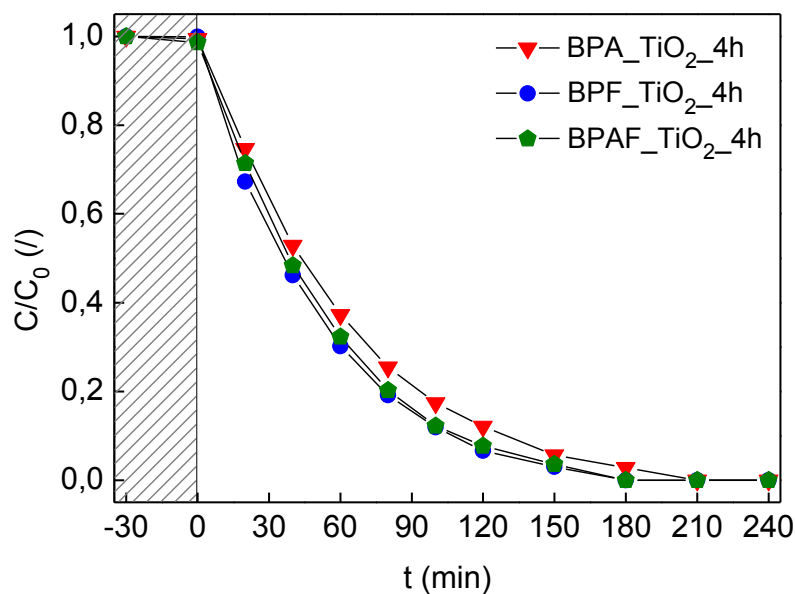
Slika 16: Spremljanje fotokatalitske (in fotolitske) razgradnje BPA s HPLC.



Slika 17: Spremljanje fotokatalitske (in fotolitske) razgradnje BPF s HPLC.



Slika 18: Spremljanje fotokatalitske (in fotolitske) razgradnje BPAF s HPLC.

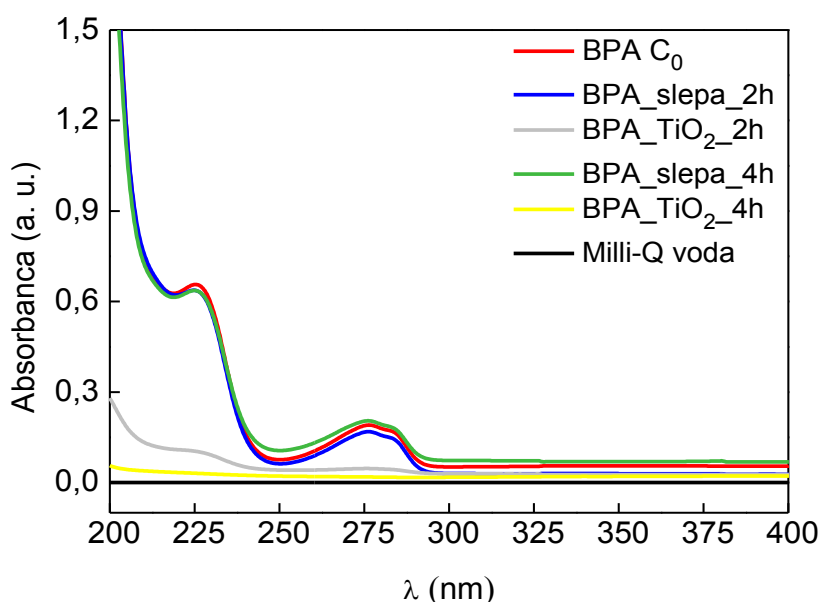


Slika 19: Primerjava spremembe koncentracije bisfenolov v odvisnosti od časa fotokatalitske oksidacije (4-urna fotokataliza).

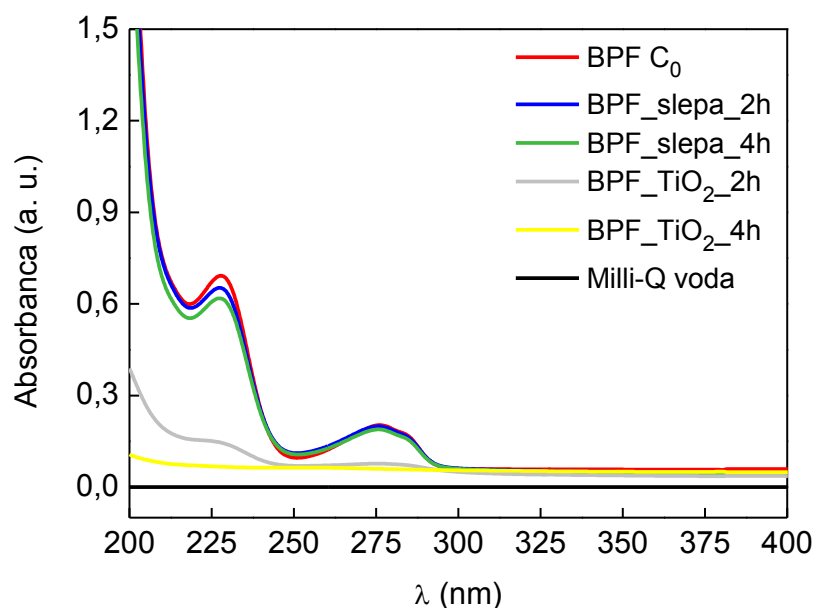
Natančen mehanizem razgradnje BPA in ostalih analogov še ni poznan. Produkti razgradnje, ki nastajajo tekom fotokatalitske oksidacije, so zelo reaktivni in se hitro pretvarjajo v končne produkte oksidacije oz. mineralizacije, kar otežuje njihovo detekcijo in identifikacijo. Najpogosteje se kot vmesni produkti fotokatalitske razgradnje BPA (s

TiO<sub>2</sub>) omenjajo fenol, p-hidrokinon, p-izopropenilfenol, p-hidroksibenzaldehid in 4-hidroksifenil-2-propanol (61). Vmesni produkti fotokatalitske razgradnje BPF in BPAF s TiO<sub>2</sub> kot katalizatorjem še niso poznani. Pri oksidaciji BPF z MnO<sub>2</sub> so kot vmesne produkte razgradnje zaznali 2,2'-bisfenol, 3,4-hidroksibenzil alkohol, hidrokinon in 4-hidroksibenzaldehid (41), pri oksidacijski razgradnji BPAF (v montmorilonitni disperziji) pa naj bi potekla orto hidroksilacija BPAF, ki naj bi ji sledilo odprtje obroča in nadaljnja oksidacija do CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O (38).

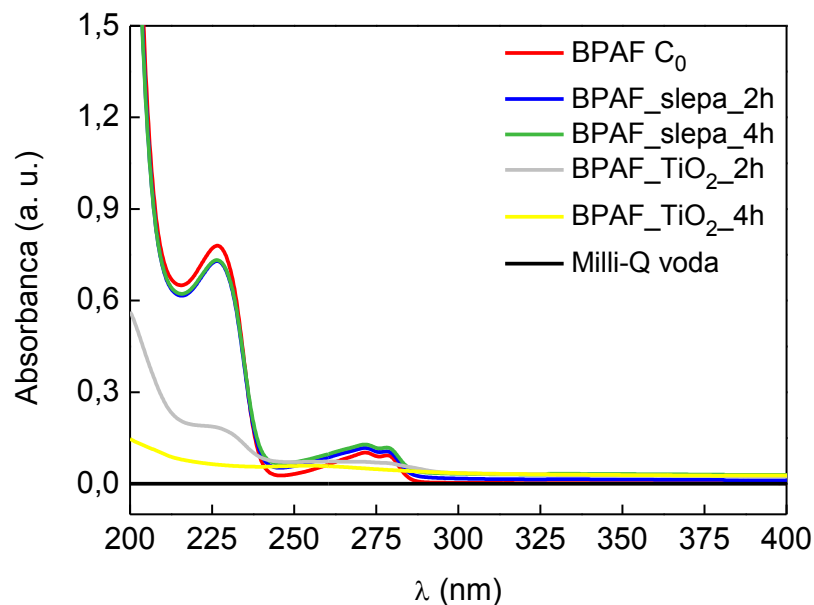
Razgradnjo bisfenolov smo spremljali tudi z UV-VIS spektrometrijo. BPA ima v UV-VIS območju dva značilna vrhova, ki se pojavljata pri valovnih dolžinah 227 nm in 275 nm (podoben spekter smo opazili tudi pri BPF in BPAF) (Slika 20–22). Tudi UV-VIS spektri končnih vzorcev (BPA, BPF, BPAF) fotokatalize so pokazali, da je po 2 h v raztopini ostalo še nekaj bisfenola (oz. produktov razgradnje, ki so absorbirali v podobnem območju valovnih dolžin kot izhodne spojine), po 4 h pa se je bisfenol v celoti razgradil na manjše enote (najverjetneje alifatske kisline, aldehide, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O), ki niso več vsebovale aromatskega obroča, saj na spektru nismo zaznali značilnega vrha za benzenski obroč, ki se pojavlja okoli valovne dolžine 254 nm (odvisno od vezanih substituentov) (62).



Slika 20: UV-VIS spektri vzorcev BPA pred in po fotokatalizi (fotolizi) v primerjavi z Milli-Q vodo (ultra čisto vodo).



Slika 21: UV-VIS spektri vzorcev BPF pred in po fotokatalizi (fotolizi) v primerjavi z Milli-Q vodo (ultra čisto vodo).



Slika 22: UV-VIS spektri vzorcev BPAF pred in po fotokatalizi (fotolizi) v primerjavi z Milli-Q vodo (ultra čisto vodo).

Rezultati TOC analize so pokazali (Preglednica VI), v kolikšnem obsegu je potekla mineralizacija bisfenolov (razgradnja do CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O). Tekom 2-urne fotokatalize se je nekaj BPA in BPAF adsorbiralo na steklena vlakna s TiO<sub>2</sub>. V obeh primerih se je na račun

adsorpcije koncentracija organskih molekul v raztopini znižala za dodatnih 20 % glede na izhodiščno koncentracijo. Po upoštevanju adsorpcije, ki smo jo določili s pomočjo podatkov dobljenih s CHNS elementno analizo, je delež odstranjenega TOC po 2-urni fotokatalizi znašal 73,85 % pri BPF, 50,77 % pri BPA in 23,05 % pri BPAF. Po koncu 4-urne fotokatalize na steklenih vlaknih s TiO<sub>2</sub> nismo zaznali adsorbiranega ogljika, na podlagi česar lahko sklepamo, da nastali produkti razgradnje niso imeli tendence po vezavi na steklena vlakna s TiO<sub>2</sub>, medtem ko so se pred tem adsorbirane molekule povsem oksidirale. V največji meri je pri 4-urni fotokatalizi potekla razgradnja BPF (odstranjen TOC je znašal 98,74 %) in BPA (odstranjen TOC je znašal 92,79 %), medtem ko je delež odstranjenega TOC pri BPAF znašal le 66,58 %. Razlog za počasnejšo razgradnjo BPAF v primerjavi z BPA in BPF je najverjetneje posledica prisotnosti CF<sub>3</sub> skupin v molekuli BPAF. Vez med ogljikom in fluorom velja za eno najmočnejših v organski kemiji. V procesu razgradnje BPAF lahko nastajajo tudi fluoroalkani, ki veljajo za zelo stabilne spojine. Da bi povečali stopnjo razgradnje BPAF, bi morali spremeniti pogoje fotokatalize.

Preglednica VI: Odstotek odstranjenega TOC brez upoštevanja adsorpcije bisfenolov na katalizator, odstotek odstranjenega TOC z upoštevanjem adsorpcije bisfenolov na katalizator in odstotek odstranjenega bisfenola glede na rezultate dobljene s HPLC analizo.

Vzorec	Odstotek odstranjenega TOC (%) (adsorpcija ni upoštevana)	Odstotek odstranjenega TOC (%) (adsorpcija je upoštevana)	Odstotek odstranjenega bisfenola (%)
BPA_slepa_2h	0,15	0	6,68
BPA_slepa_4h	2,92	0	14,13
BPA_TiO <sub>2</sub> _2h	71,46	50,77	93,97
BPA_TiO <sub>2</sub> _4h	92,79	92,79	100
BPF_slepa_2h	0,68	0	10,23
BPF_slepa_4h	1,83	1,83	20,45
BPF_TiO <sub>2</sub> _2h	73,85	73,85	93,06
BPF_TiO <sub>2</sub> _4h	98,74	98,74	100
BPAF_slepa_2h	0,15	0	5,77
BPAF_slepa_4h	13,45	0	10,67
BPAF_TiO <sub>2</sub> _2h	42,87	23,05	91,50
BPAF_TiO <sub>2</sub> _4h	66,58	66,58	100



Pri razgradnji BPAF se je sproščal tudi fluoridni ion. Količino sproščenega iona po fotokatalizi smo določili z ionsko kromatografijo. Rezultati so pokazali, da se količina prostega fluoridnega iona po 4-urni fotokatalizi (delež prostega fluoridnega iona glede na celokupni fluor prisoten v molekuli BPAF je znašal 26,06 %) ni povečala glede na 2-urno fotokatalizo (delež prostega fluoridnega iona glede na celokupni fluor prisoten v molekuli BPAF je znašal 26,69 %) (Preglednica VII).

Preglednica VII: Prikaz razmerja med vezanim in prostim fluoridom po fotokatalizi.

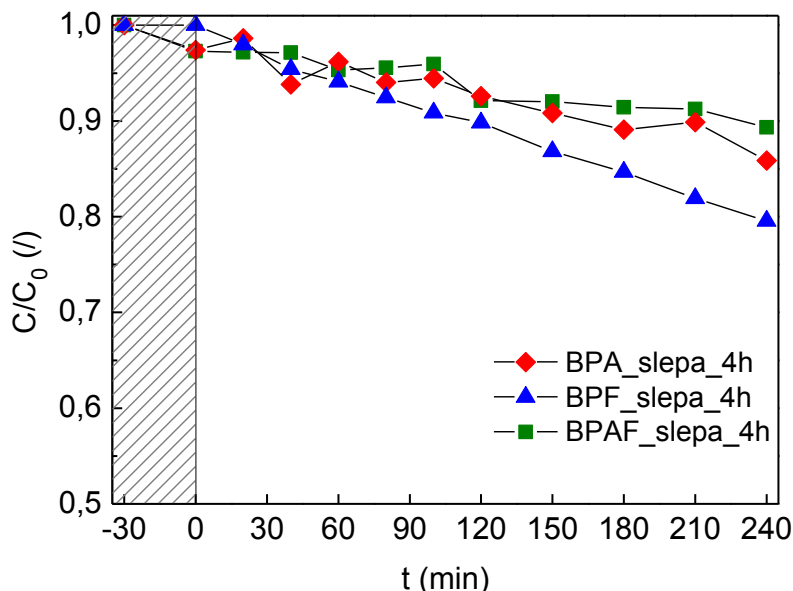
Vzorec	Vezan fluorid (%)	Prost fluorid (%)
BPAF_TiO <sub>2</sub> _2h	73,31	26,69
BPAF_TiO <sub>2</sub> _4h	73, 94	26,06

Vzrok za nespremenjeno koncentracijo prostega fluoridnega iona v raztopini vzorca po 2-urni in 4-urni fotokatalizi je lahko posledica močne vezi med fluorom in ogljikom in s tem visoke stabilnosti CF<sub>3</sub> skupine ali pa posledica adsorpcije fluoridnega iona na TiO<sub>2</sub>. Adsorpcija fluoridnega iona je odvisna predvsem od pH-ja raztopine, saj je večja v kislem mediju. Fluoridni ioni lahko vplivajo na fotokatalitsko razgradnjo organskih molekul (63). Glede na vsebnost fluora v molekuli BPAF in količino sproščenega fluoridnega iona tekom fotokatalize pa iz naših poskusov lahko sklepamo, da le ta ni imel večjega vpliva na razgradnjo BPAF. Fluoridne ioni, ki so nastali pri razgradnji BPAF, bi morali po končani fotokatalizi odstraniti, saj tudi ti predstavljajo nevarnost za organizme, ki so izpostavljeni povečanim koncentracijam fluoridnega iona v vodi (64). V preteklih letih so bile razvite številne metode odstranjevanja fluoridnega iona iz vodnih vzorcev, med drugim tudi z adsorpcijo na delce TiO<sub>2</sub> (enoplastna adsorpcijska konstanta za anataz (delci nanometrskih velikosti) je 0,85 mg/g) (65).

### 4.3 FOTOLIZA BISFENOLOV BPA, BPF IN BPAF

Razgradnja organskih molekul pod vplivom UV žarkov (fotoliza) je zelo neekonomičnem proces, ki zahteva veliko energije, zato se sama fotoliza ne uporablja za namene odstranjevanja organskih onesnažil. Razgradnjo molekul lahko pospešimo s kombinacijo UV obsevanja in različnih polprevodnikov (npr. TiO<sub>2</sub>) ter oksidantov (npr. vodikov peroksid, ozon) (6). Tudi pri naših eksperimentalnih pogojih se je fotoliza izkazala za neučinkovito (počasno reakcijo), kar lahko potrdimo tudi s HPLC analizo spremljanja

koncentracije bisfenolov (Slika 23), UV-VIS spektri končnih vzorcev fotolize (Slika 20, Slika 21, Slika 22) in rezultati TOC analize (Preglednica VI).



Slika 23 Primerjava spremembe koncentracije bisfenolov v odvisnosti od časa fotolitske oksidacije (4-urna fotoliza).

Absorpcijski UV-VIS spektri vzorcev po 2-urni in 4-urni fotolizi so bili zelo podobni absorpcijskim spektrom izhodiščnih raztopin, kar pomeni, da je v vzorcih po fotolizi večina bisfenolov ostala nerazgrajena. BPF se je izkazal za fotolitsko najmanj stabilno molekulo, kar je bilo v skladu z našimi pričakovanji, saj za razliko od BPA in BPAF na veznem ogljiku med fenolnima skupinama ni vezanih funkcionalnih skupin, zaradi česar je potencialno bolj podvržen razgradnji. Po 4-urah fotolize se je na manjše enote razgradilo 20,45 % začetne koncentracije BPF (glede na podatke dobljene s HPLC analizo), odstranjen TOC pa je znašal 1,83 %. Delež odstranjenega TOC je po 4-urah fotolize znašal 2,92 % pri BPA in 13,45 % pri BPAF (Preglednica VI). V obeh primerih je bilo zmanjšanje TOC posledica adsorpcije razgradnih produktov na steklena vlakna in ne fotolitske popolne oksidacije. Derivati BPF so v danih eksperimentalnih pogojih kazali najmanjšo afiniteto za vezavo na steklena vlakna in steklena vlakna s  $\text{TiO}_2$ . Po 4-urni fotolizi se je na manjše enote razgradilo 14,13 % začetne koncentracije BPA in 10,67 % BPAF. BPAF se je izkazal za fotolitsko najbolj stabilno molekulo.

## 4.4 ESTROGENA AKTIVNOST VZORCEV PO FOTOLIZI IN FOTOKATALIZI

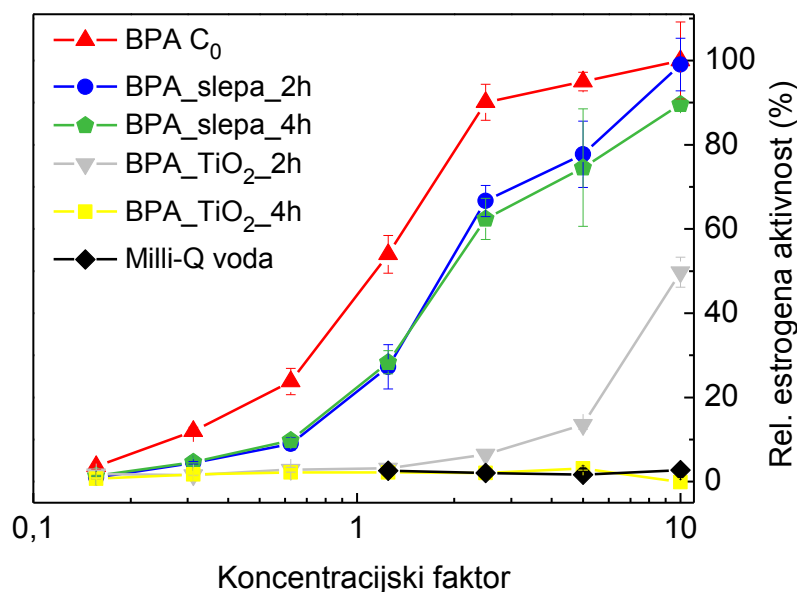
Učinkovitost fotokatalize smo preverili tudi z YES testom, s katerim smo določali padec estrogene aktivnosti (EA) vzorcev po fotokatalizi (in fotolizi – poskus v odsotnosti katalizatorja) glede na EA izhodiščne raztopine. Na mikrotitrne plošče smo nanašali vzorce po SPE, s čimer smo povečali možnost detekcije estrogenih snovi v vzorcih po fotokatalizi (predvidevali smo, da bo koncentracija le-teh po fotokatalizi zelo nizka). Postopek SPE lahko predstavlja vir izgub vzorca. Izkoristek ekstrakcije za BPA pri danih ekstrakcijskih pogojih (kolone Water Oasis HLB, elucijsko topilo metanol) znaša med 89 in 97 % (RSD < 12) (55). Enaka količina bisfenola se lahko adsorbira v različni meri, nekaj bisfenola pa lahko ostane vezanega tudi po eluciji, kar je predvsem posledica neenakomernega pretoka skozi kolone med nanosom in elucijo vzorca. Spojino pa lahko izgubimo tudi med odparevanjem elucijskega topila. Prevelik pretok dušika lahko povzroči pršenje vzorca iz zbirne epruvete, s tem pa izgubimo tudi del preiskovane spojine.

Pri izvedbi YES testa smo morali biti pozorni, da je delo potekalo v sterilnih pogojih, saj je lahko hitro prišlo do okužbe gojišča in s tem neveljavnosti testa oz. izgube kulture kvasovk. Relativno estrogenu aktivnost (REA) vzorcev po fotokatalizi (fotolizi) smo izračunali s pomočjo enačb 2 in 3, z upoštevanjem izmerjenih absorbanc vzorcev pri YES testu. REA vzorcev smo določevali glede na EA 10-kratnega koncentrata izhodiščne raztopine BPA in BPF ter 2,5-kratnega koncentrata izhodiščne raztopine BPAF. Vzorcev, pri katerih je bilo prisotno več kot 50 % zaviranje rasti kvasovk (glede na rast kvasovk v slepem vzorcu), pri izračunu EA nismo upoštevali. To se je zgodilo pri 10-kratnem in 5-kratnem koncentratu izhodiščne raztopine BPAF in pri vzorcih BPAF\_slepa\_2h ter BPAF\_slepa\_4h, zato rezultatov teh meritev nismo upoštevali. Vzrok zaviranja rasti kvasovk je najverjetneje posledica strupenosti visokih koncentracij BPAF za gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

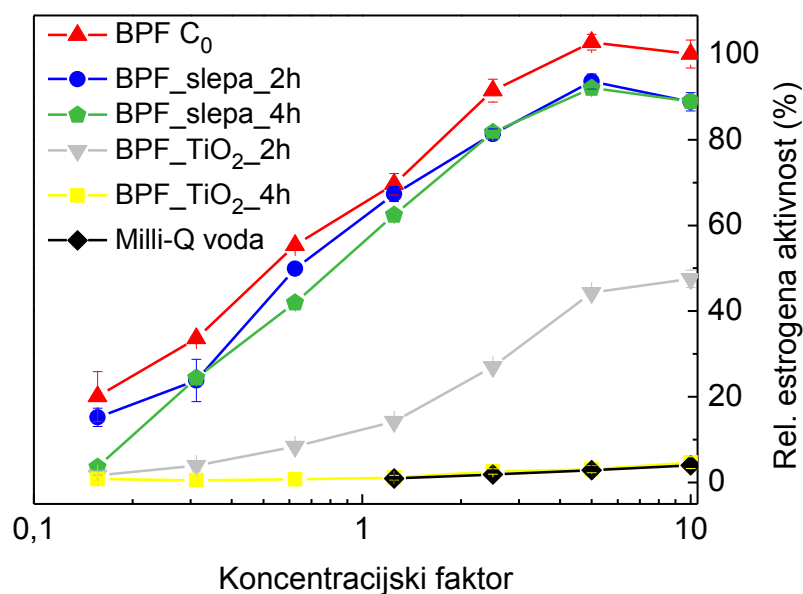
YES test smo izvedli tako, da smo pripravili redčitveno vrsto vzorcev po foto(kata)lizi, izhodiščnih raztopin ter standardov. Standarde (E2 in P) smo nanašali z namenom potrditve specifičnosti in pravilne izvedbe testa, standarde BPA, BPF in BPAF pa z namenom ugotavljanja padca EA vzorcev po foto(kata)lizi. Vsi trije bisfenoli so se vezali na ER in sprožili spremembo obarvanja testne raztopine, kar je v skladu z ugotovitvami

predhodnih študij, ki pravijo, da se BPA, BPF in BPAF vežejo na ER (24, 33, 41). Z rezultati YES testa smo potrdili predhodne ugotovitve dobljene s HPLC, UV-VIS spektrofotometrijo in TOC analizo. Tudi z YES testom smo ugotovili (Slika 24–26), da fotoliza ni imela velikega vpliva na razgradnjo bisfenolov (EA po fotolizi se je le malo zmanjšala glede na EA izhodiščnih raztopin).

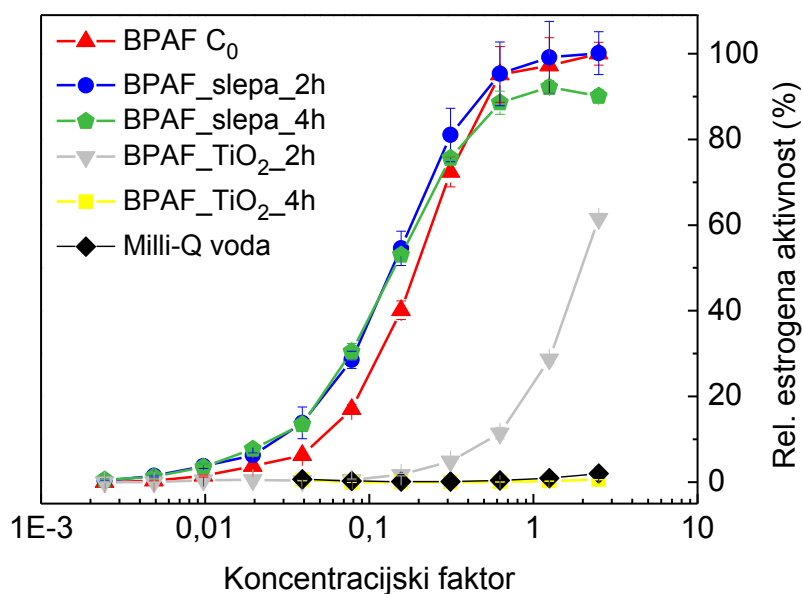
REA po 2-urni fotokatalizi je bila še relativno visoka in je znašala 49,76 % pri BPA in 47,54 % pri BPF (pri 10-kratnem koncentratu) ter 61,54 % pri BPAF (pri 2,5-kratnem koncentratu). Kljub temu, da se je po 2-urni fotokatalizi že večina analoga razgradila, je REA še vedno ostala visoka, kar je najverjetneje bila posledica prisotnosti še nerazgrajenega bisfenola v koncentriranem vzorcu po fotokatalizi. Možno je tudi, da so med fotokatalizo nastali estrogeno aktivni razgradni produkti, vendar pa te trditve brez nadaljnjih študij ne moremo potrditi.



Slika 24: Relativna estrogena aktivnost vzorcev BPA po fotokatalizi (fotolizi) glede na estrogenu aktivnost izhodiščne raztopine BPA.



Slika 25: Relativna estrogena aktivnost vzorcev BPF po fotokatalizi (fotolizi) glede na estrogenu aktivnost izhodiščne raztopine BPF.



Slika 26: Relativna estrogena aktivnost vzorcev BPAF po fotokatalizi (fotolizi) glede na estrogenu aktivnost izhodiščne raztopine BPAF.

EA vzorcev BPA, BPF in BPAF po 4-urni fotokatalizi je bila v območju EA ultra čiste vode, REA po 4-urni fotokatalizi se je gibala okoli 0 % (REA 10-kratnega koncentrata BPA je bila okoli 0 %, REA 10-kratnega koncentrata BPF je znašala 1,40 % in REA

2,5-kratnega koncentrata BPAF pa 0,57 %), kar pomeni, da vzorci niso vsebovali več estrogeno aktivnih snovi oz. da je bila koncentracija estrogeno aktivnih snovi v vzorcu pod mejo detekcije.

V danih eksperimentalnih pogojih se je 4-urna fotokataliza s  $\text{TiO}_2$  (imobiliziranim na steklena vlakna) izkazala za učinkovito metodo pri odstranjevanju estrogenosti vodnih vzorcev BPA, BPF in BPAF.

## 5 SKLEP

Na podlagi rezultatov našega eksperimentalnega dela lahko povzamemo naslednje zaključke:

Ugotovitve o imobiliziranem katalizatorju:

- Uporabljen postopek priprave imobiliziranega katalizatorja ( $\text{TiO}_2$ ) se je izkazal za učinkovito in nezahtevno metodo, s katero pripravimo katalizatorski sistem, ki daje dobre in ponovljive rezultate, za odstranjevanje preučevanih bisfenolov.
- S karakterizacijo katalizatorskega sistema smo potrdili prisotnost delcev  $\text{TiO}_2$  na steklenih vlaknih in s tem uspešnost sinteze.
- Med pripravo imobiliziranega katalizatorja kot nečistoča nastaja tudi  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ki lahko vpliva na potek fotokatalize. Potrebne so nadaljnje raziskave na tem področju, ki bodo pojasnile ta vpliv. Po potrebi lahko  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  odstranimo s katalizatorja (npr. s predhodnim spiranjem).

Ugotovitve o fotolitski oz. fotokatalitski razgradnji BPA, BPF in BPAF:

- Tekom fotokatalize, fotolize je potekla adsorpcija reakcijski intermediatov na steklena vlakna oz. steklena vlakna s  $\text{TiO}_2$ . Najmanjšo tendenco za adsorpcijo so kazali derivati BPF.
- Po 4-urni fotokatalizi so se vsi trije analogi razgradili na manjše enote. V največji meri je potekla mineralizacija BPF in BPA, najmanj pa BPAF, ki je posledica trifluorometilnih skupin v molekuli. Da bi povečali stopnjo razgradnje BPAF, bi morali prilagoditi katalizator ali spremeniti reakcijske pogoje (npr. podaljšati čas fotokatalize).
- Pri razgradnji BPAF se je sproščal tudi fluoridni ion, ki lahko vpliva na potek fotokatalize, kar bi bilo potrebno še dodatno raziskati.
- Sama fotoliza ni bila učinkovita pri razgradnji preučevanih bisfenolov.
- Fotoliza je v največji meri razgradila BPF.

Ugotovitve o estrogenosti vzorcev:

- Izhodiščne raztopine BPA, BPF in BPAF so bile estrogeno aktivne v YES testu.
- Z razgradnjo bisfenolov se je zmanjšala tudi REA vzorcev, kar potrjuje njihovo razgradnjo v estrogeno neaktivne snovi in s tem uspešnost izbrane metode.

- Po 2-urni fotokatalizi je REA koncentriranih vzorcev kljub skorajšnji razgradnji bisfenolov na manjše enote ostala visoka, kar je posledica prisotnosti še nerazgrajenih bisfenolov v vzorcu.
- Visoke koncentracije BPAF (10-kratni in 5-kratni koncentrat izhodiščne raztopine BPAF) so bile strupene za kvasovke (rast kvasovk v vzorcih je bila za več kot polovico manjša glede na rast v slepem vzorcu). Teh rezultatov pri izračunu EA nismo upoštevali.
- Po 4-urni fotokatalizi vzorci niso več vsebovali estrogeno aktivnih snovi, na podlagi česar lahko zaključimo, da je bila 4-urna fotokataliza uspešna v odstranjevanju estrogenosti vodnih raztopin BPA, BPF in BPAF.

Na podlagi teh zaključkov lahko:

- Potrdimo hipotezo, da struktura BPA in njegovih analogov (BPF, BPAF) vpliva na fotokatalitsko sposobnost odstranjevanja (z imobiliziranim  $\text{TiO}_2$ ) (BPAF je najtežje razgradljiv).
- Potrdimo hipotezo, da se estrogena aktivnost vodnih vzorcev BPA, BPF in BPAF po fotokatalizi z imobiliziranim  $\text{TiO}_2$  zmanjša.
- Delno potrdimo hipotezo, da fotokatalitska oksidacija poteče do popolne mineralizacije preučevanih bisfenolov (skoraj popolna mineralizacija pri BPA in BPF, ne pa pri BPAF).
- Potrdimo hipotezo, da oksidacijski produkti proučevanih bisfenolov niso več estrogeno aktivni (po 4-urni fotokatalizi).

Sintetiziran fotokatalizator in njegova uporaba v naprednem oksidacijskem procesu se je izkazala za učinkovito kombinacijo, saj vzorci po 4-urni fotokatalizi niso več izkazovali estrogene aktivnosti. Nadaljnji razvoj uporabljenega katalizatorskega sistema bi lahko šel v smeri sprememb katalizatorja z namenom zmanjšanja energije prepovedanega pasu in premika iz UV v VIS območje, kar bo omogočalo izkoriščanje sončne svetlobe (ki je le v 5-ih % sestavljena iz UV svetlobe in kar v 43-ih % iz vidne (66)) kot vir energije za fotokatalitsko razgradnjo. Raziskati pa je potrebno tudi vpliv  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  na fotokatalitsko razgradnjo in razviti učinkovit način odstranjevanja le-tega iz površine katalizatorja (verjetno spiranje z vodo). Poleg tega pa bi bilo potrebno izvesti študije stabilnosti



katalizatorja (npr. določiti upad aktivnosti tekom ciklične (večkratne) uporabe) in določiti maksimalno kapaciteto katalizatorja.

## 6 LITERATURA

1. LaFleur AD, Schug KA: A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous system. *Anal Chim Acta* 2011; 696: 6-26.
2. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP): <http://www.epa.gov/scipoly/oscp/edspoverview/whatare.htm> Dostop: 25.4.2014.
3. Dekant W, Colnot T: Endocrine effects of chemicals: Aspects of hazard identification and human health risk assessment. *Toxicol Lett* 2013; 223: 280–6.
4. Endocrine disruptors and child health: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75342/1/9789241503761\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75342/1/9789241503761_eng.pdf?ua=1) Dostop: 25.4.2014.
5. IPCS Global Assessment of ECDs: <http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch1.pdf?ua=1> Dostop: 25.4.2014.
6. Basile T, Petrella A, Petrella M, Boghetich G, Petruzzelli V, Colasuonno S, Petruzzelli D: Review of Endocrine-Disrupting-Compound Removal Technologies in Water and Wastewater Treatment Plants: An EU Perspective. *Ind Eng Chem Res* 2011; 50: 8389–401.
7. Silva CP, Otero M, Esteves V: Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environ Pollut* 2012; 165: 38–58.
8. Vuorinen A, Odermatt A, Schuster D: In silico methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 137: 18–26.
9. Rochester JR: Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod Toxicol* 2013; 42: 132–55.
10. Chang HS, Choo KH, Lee B, Choi SJ: The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J Hazard Mater* 2009; 172: 1–12.
11. Evropska agencija za kemikalije je pričela z delom: [http://www.uk.gov.si/si/splosno/vstopna\\_stran/aktualno/evropska\\_agencija\\_za\\_kemikalije\\_je\\_pricela\\_z\\_delom/](http://www.uk.gov.si/si/splosno/vstopna_stran/aktualno/evropska_agencija_za_kemikalije_je_pricela_z_delom/) Dostop: 23.4.2014.
12. OECD Work Related to Endocrine Disruptors: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm> Dostop: 7. 7. 2014.
13. Schmidt J, Peterlin Mašič L: Organic Synthetic Environmental Endocrine Disruptors: Structural Classes and Metabolic Fate. *Acta Chim Slov* 2012; 59: 722–38.

14. Shanle EK, Xu W: Endocrine Disrupting Chemicals Targeting Estrogen Receptor Signaling: Identification and Mechanisms of Action. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 6–19.
15. Bistan M, Podgorelec M, Marinšek Logar R, Tišler T: Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. *Food Technol Biotechnol* 2012; 50: 427–33.
16. Routledge EJ, Sumpter JP: Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed by using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 1996; 15: 241–8.
17. Fic A, Žegura B, Gramec D, Peterlin Mašič L: Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay. *Chemosphere* 2014; 112: 362–9.
18. Song S, Ruan T, Wang T, Liu R, Jian G: Distribution and Preliminary Exposure Assessment of Bisphenol AF (BPAF) in Various Environmental Matrices around a Manufacturing Plant in China. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 13136–43.
19. Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S: Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicol Sci* 2005; 84: 249–59.
20. Yang Y, Lu L, Zhang J, Yang Y, Wu Y, Shao B: Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2014; 1328: 26–34.
21. Michałowicz J: Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37: 738–58.
22. Kang JH, Kondo F, Katayama Y: Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006; 226: 79–89.
23. [http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/1\\_chemistry\\_analytical\\_methods.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/1_chemistry_analytical_methods.pdf)  
Dostop: 25.4.2014.
24. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scippo ML, Van Loco J, Covaci A: A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3725–40.

25. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B: Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int* 2014; 64: 83–90.
26. Rogers JA, Metz L, Yong VW: Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol* 2013; 53: 421–30.
27. Alonso-Magdalena P, Belén Ropero A, Soriano S, García-Arévalo M, Ripoll C, Fuentes E, Quesada I, Nadal A: Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 355: 201–7.
28. Dekant W, Völkel W: Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228: 114–34.
29. European Food Safety Authority, FAQ on bisphenol A: <http://www.efsa.europa.eu/en/faqs/faqbisphenol.htm> Dostop: 7. 7. 2014.
30. Liao C, Kannan K: Determination of Free and Conjugated Forms of Bisphenol A in Human Urine and Serum by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Environ Sci Technol* 2012; 46, 5003–9.
31. Kolsek K, Mavri J, Sollner Dolenc M, Reactivity of bisphenol A-3,4-quinone with DNA. A quantum chemical study. *Toxicol in Vitro* 2012; 26: 102–6.
32. Schmidt J, Kotnik P, Trontelj J, Knez Ž, Peterlin Mašič L: Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicol in Vitro* 2013; 27: 1267–76.
33. Matsushima A, Liu X, Okada H, Shimohigashi M, Shimohigashi Y: Bisphenol AF Is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER $\alpha$  but a Highly Specific Antagonist for ER $\beta$ . *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1267–72.
34. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kannod J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM: In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 178–98.
35. Yang Y, Yin J, Yang Y, Zhou N, Zhang J, Shao B, Wu Y: Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2012; 901: 93–7.

36. Feng Y, Yin J, Jiao Z, Shi J, Li M, Shao B: Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicolo Lett* 2012; 211: 201–9.
37. Zhang L, Lv J, Xu T, Yang L, Jiang X, Li Q: High efficiency removal and recovery of an endocrine disrupting compound–bisphenol AF from wastewaters. *Sep Purif Technol* 2013; 116: 145–53.
38. Liu Y, Zhang X, Wu F: Photodegradation of bisphenol AF in montmorillonite dispersions: Kinetics and mechanism study. *Appl Clay Sci* 2010; 49: 182–6.
39. Li Y, Burns KA, Arao Y, Luh CJ, Korach KS: Differential Estrogenic Actions of Endocrine-Disrupting Chemicals Bisphenol A, Bisphenol AF, and Zearalenone through Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in Vitro. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 1029–35.
40. Li M, Yang Y, Yang Y, Yin J, Zhang J, Feng Y, Shao B: Biotransformation of Bisphenol AF to Its Major Glucuronide Metabolite Reduces Estrogenic Activity, *Plos ONE* 2013; 8: e83170  
(<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0083170&representation=PDF> Dostop: 7.7.2014)
41. Lu Z, Lin K, Gan J: Oxidation of bisphenol F (BPF) by manganese dioxide. *Environ Pollut* 2011; 159: 2546–51.
42. Gruber T, Nestler R, Seichter W, Bombicz P: Crystal structures and isometricity comparison of methylated bisphenol F derivatives. *J Mol Struct* 2014; 1056–1057: 319–25.
43. Wang X, Yang L, Jin X, Zhang L: Electrochemical determination of estrogenic compound bisphenol F in food packaging using carboxyl functionalized multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Food Chem* 2014; 157: 464–9.
44. Zhang L, Pan F, Liu X, Yang L, Jiang X, Yang J, Shi W: Multi-walled carbon nanotubes as sorbent for recovery of endocrine disrupting compound-bisphenol F from wastewater. *Chem Eng J* 2013; 218: 238–46.
45. Fromme H, K uchler T, Otto T, Pilz K, M uller J, Wenzel A: Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res* 2002; 36: 1429–38.
46. Inoue D, Hara S, Kashihara M, Murai Y, Danzl E, Sei K, Tsunoi S, Fujita M, Ike M: Degradation of Bis(4-Hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) by *Sphingobium yanoikuyae* strain FM-2 isolated from river water. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 352–8.

47. Cabaton N, Zalko D, Rathahao E, Canlet C, Delous G, Chagnon M, Cravedi J, Perdu E: Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicol in Vitro* 2008; 22: 1697–704.
48. Cabaton N, Dumont C, Severin I, Perdu E, Zalko D, Cherkaoui-Malki M, Chagnon MC: Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology* 2009; 255: 15–24.
49. Pelaeza M, Nolanb NT, Pillai SC, Seeryc MK, Falarasd P, Kontosd AG, Dunlope PSM, Hamiltone JWJ, Byrnee JA, O'Sheaf K, Entezarig MH, Dionysioua DD: A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Appl Catal B Environ* 2012; 125: 331–49.
50. Waters, HPLC Separation Modes: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076](http://www.waters.com/waters/en_US/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076) Dostop 13.5.2014.
51. Waters, How does high performance liquid chromatography work? [http://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055](http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055) Dostop: 13.5.2014.
52. Pihlar B: Osnove analizne kemije: zapiski predavanj, Ponatis, Katedra za analizno kemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2005: 213–21.
53. Total Organic Carbon (TOC): [http://www.globallab.com.br/download/artigos/toc/standard\\_methods\\_toc.pdf](http://www.globallab.com.br/download/artigos/toc/standard_methods_toc.pdf) Dostop: 13.5.2014.
54. Solid Phase Extraction Products: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General\\_Information/t402150.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf) Dostop: 13.5.2014.
55. Podgorelec M: Ugotavljanje prisotnosti estrogeno aktivnih snovi v odpadnih vodah z biotestom, Magistrsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani; Biotehniška fakulteta, 2010: 38, 51.
56. Product Information, AEROXIDE<sup>®</sup> TiO<sub>2</sub> P 25: <http://www.novochem.ro/letoltes/aeroxide%20tio2%20p25%20en.pdf> Dostop: 9.6.2014.
57. Santiago DE, Arana J, González-Díaz O, Alemán-Dominguez ME, Acosta-Dacal AC, Fernandez-Rodríguez C, Pérez-Pena J, Dona-Rodríguez JM: Effect of inorganic ions on the photocatalytic treatment of agro-industrial wastewaters containing imazalil. *Appl Catal B Environ* 2014; 156–157: 284–92.
58. Wu M, Zheng A, Deng F, Su BL: Significant photocatalytic activity enhancement of titania inverse opals by anionic impurities removal in dye molecule degradation. *Appl Catal B Environ* 2013; 138–139: 219–28.

59. Hua Z, Manping Z, Zongfeng X, Low G: Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of monocrotophos. *Water Res* 1995; 29: 2681–8.
60. Sheng H, Li Q, Ma W, Ji H, Chen C, Zhao J: Photocatalytic degradation of organic pollutants on surface anionized TiO<sub>2</sub>: Common effect of anions for high hole-availability by water. *Appl Catal B Environ* 2013; 138–139: 212–8.
61. Lee JW, Kwon TO, Thiruvengkatachari R, Moon IS: Adsorption and photocatalytic degradation of bisphenol A using TiO<sub>2</sub> and its separation by submerged hollowfiber ultrafiltration membrane: *J Environ Sci* 2006; 18: 193–200.
62. Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications: [http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile\\_12067.pdf](http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_12067.pdf) Dostop: 10.6.2014.
63. Park H, Choi W: Effects of TiO<sub>2</sub> Surface Fluorination on Photocatalytic Reactions and Photoelectrochemical Behaviors. *J Phys Chem B* 2004; 108: 4086–93.
64. Barbiera O, Arreola-Mendozab L, Del Razo LM: Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact* 2010; 188: 319–33.
65. Babaeivelni K, Khodadoust AP: Adsorption of fluoride onto crystalline titanium dioxide: Effect of pH, ionic strength and co-existing ions. *J Colloid Interface Sci* 2013; 394: 419–27.
66. Kumar SG, Devi LG: Review on Modified TiO<sub>2</sub> Photocatalysis under UV/Visible Light: Selected Results and Related Mechanisms on Interfacial Charge Carrier Transfer Dynamics. *J Phys Chem A* 2011; 115: 13211–41.