

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**VALIDACIJA METODE ZA DOLOČANJE BISFENOLA A
V IZCEDNI VODI S TEKOČINSKO KROMATOGRFIJO
VISOKE ZMOGLJIVOSTI**

DIPLOMSKO DELO

Nina PLANTAN

Mentorja: doc. dr. Andreja Drolc
prof. dr. Albin Pintar

Nova Gorica, 2012

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Nina PLANTAN

ZAHVALA

Raziskovalno delo za diplomsko delo sem opravila v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo, na Kemijskem inštitutu v Ljubljani

Predvsem se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Andreji Drolc za strokovno pomoč in nasvete pri opravljanju ter pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi mentorju prof. dr. Albinu Pintarju in vsem zaposlenim na Kemijskem inštitutu Ljubljana, v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo, ki so mi pomagali pri opravljanju eksperimentalnega dela.

Zahvala tudi moji družini in vsem bližnjim, ki so mi v času pisanja diplomske naloge stali ob strani in me podpirali.

POVZETEK

Bisfenol A (BPA) je spojina katera vpliva na delovanje endokrinega sistema in s tem škoduje živemu in neživemu delu narave. V naravno okolje preide z antropogenimi dejavnostmi, saj se uporablja predvsem pri proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksi smol. Prisoten je lahko tudi v površinskih in podzemnih vodah, najdemo ga tudi v izcednih vodah deponij. Najvišje koncentracije BPA so izmerili na območjih, ki so v bližini raznih industrijskih postrojenj, katerih glavne dejavnosti so proizvodnja plastike. V diplomskem delu sem se osredotočila na razvoj in validacijo metode za določanje BPA v različnih vzorcih vod. Za vzorce sem vzela izcedno vodo iz starega in delujočega dela deponije Barje, podtalno vodo in umetno pripravljeno izcedno vodo. Prisotnost BPA v teh vzorcih sem določala s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC - *high performance liquid chromatography*). Z validacijskim postopkom sem ugotavljala ali je metoda primerna za določanje BPA v vzorcih oz. sem iskala rešitve za primernost metode.

KLJUČNE BESEDE

Bisfenol A, validacija, tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC), izcedna voda

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is an organic compound that affects the endocrine system damaging both living and abiotic parts of nature. It is used to produce polycarbonate plastics and epoxy resins. BPA enters into the environment through anthropogenic processes. It can occur in the underground water and surface water as well as in landfill leachates. The highest concentrations of BPA were measured in the industry areas, where the plastics are produced. In this work, I focused on the development and validation of methods for determining BPA in various samples. The samples were taken both from the older and active part of the leachate »deponija Barje«, from underground water and from an artificially made leachate. The presence of BPA in samples was determined by means of high performance liquid chromatography (HPLC). Through the validation process, this method was assessed in terms of suitability at determining the BPA in various samples.

KEY WORDS

Bisphenol A, validation, high performance liquid chromatography (HPLC), leachate

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Namen naloge	1
2	TEORETIČNE OSNOVE.....	3
2.1	Bisfenol A.....	3
2.1.1	Splošni podatki o bisfenolu A	3
2.1.2	Uporaba BPA	4
2.2	BPA v okolju.....	4
2.2.1	BPA v prsti in sedimentih	5
2.2.2	BPA v zraku	5
2.2.3	BPA v vodnem okolju	6
2.2.4	Zakonodaja	6
2.3	BPA v izcednih vodah iz deponij.....	7
2.3.1	Odstranjevanje BPA iz izcednih vod	7
2.4	Metode za določanje vsebnosti bisfenola A	7
2.5	Kromatografija	8
2.5.1	Tekočinska kromatografija	9
2.5.2	Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC)	9
2.6	Validacija	12
2.6.1	Selektivnost	13
2.6.2	Meja detekcije.....	13
2.6.3	Meja kvantifikacije	13
2.6.4	Delovno območje	14
2.6.5	Linearno območje.....	14
2.6.6	Točnost	14
2.6.7	Natančnost	14
2.6.8	Robustnost – stabilnost raztopin standarda	15
2.7	Osnovni statistični pojmi	15
3	EKSPERIMENTALNI DEL	17
3.1	Deponija Barje	17

3.2	Kemikalije	18
3.3	Aparatura in oprema	18
3.4	Priprava raztopin	19
3.4.1	Osnovni standard BPA	19
3.4.2	Priprava raztopin za umeritveno krivuljo	19
3.4.3	Priprava umetno pripravljene izcedne vode	20
3.4.4	Priprava raztopin s standardnim dodatkom BPA za izbrane matrikse	21
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1	Delovno in linearno območje	23
4.2	Meja detekcije in meja kvantifikacije	24
4.3	Selektivnost	26
4.4	Merilna natančnost	27
4.4.1	Ponovljivost	27
4.4.2	Obnovljivost	28
4.5	Točnost	29
4.5.1	Motnje	33
4.6	Robustnost	34
4.7	Merjenje BPA v realnih vzorcih	35
5	ZAKLJUČEK	37
6	VIRI	39

SEZNAM PREGLEDNIC

Tabela 1: Fizikalno kemijske lastnosti BPA.....	3
Tabela 2: Shema priprave raztopin za umeritveno krivuljo	20
Tabela 3: Priprava umetno pripravljene izcedne vode.....	20
Tabela 4: Povprečna površina kromatografskih vrhov različnih vzorcev s koncentracijami BPA od 2 do 20 mgL ⁻¹	23
Tabela 5: Določitev meje detekcije in meje kvantifikacije	25
Tabela 6: Naklon kalibracijske krivulje, odsek na ordinati in R ² za kalibracijske krivulje BPA, pripravljene v različnih matriksih vod.....	26
Tabela 7: Ponovljivost za ultra čisto vodo	27
Tabela 8: Ponovljivost za podtalnico.....	27
Tabela 9: Ponovljivost za umetno pripravljeno izcedno vodo	28
Tabela 10: Ponovljivost za stabilizirano izcedno vodo	28
Tabela 11: Ponovljivost za svežo izcedno vodo.....	28
Tabela 12: Statistični parametri za določitev obnovljivosti	29
Tabela 13: Izkoristek (R) pri določanju BPA v površinski vodi in izcednih vodah z deponije (kalibracija z raztopinami standarda, pripravljenimi v ultra čisti vodi)	31
Tabela 14: Izkoristek (R) pri določanju BPA v izcednih vodah iz deponije (kalibracija z raztopinami standarda, pripravljenimi v matriksu - umetno pripravljene izcedni vodi)	32
Tabela 15: Priprava raztopin za določitev motenj pri določanju koncentracije BPA.....	33
Tabela 16: Prikaz površine kromatografskih vrhov pri vzorcih, z različnimi spremenljivkami.....	34
Tabela 17: Koncentracija BPA v vzorcih izcedne vode z deponije Barje	35

SEZNAM SLIK

Slika 1: Bisfenol A.....	3
Slika 2: Produkti, ki vsebujejo BPA.....	4
Slika 3: Shema HPLC sistema.....	10
Slika 4: Čistilna naprava za izcedne vode na deponiji Barje.....	17
Slika 5: HPLC instrument, na katerem sem opravljala meritve.....	19
Slika 6: Injiciranje vzorca s HPLC aparatom – avtomatski vzorčevalnik.....	19
Slika 7: Priprava vial z raztopinami z ultra čisto vodo za meritve s HPLC instrumentom	20
Slika 8: Priprava raztopin svežega vzorca z deponije s koncentracijo BPA 10 mgL^{-1} .	22
Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje BPA	24
Slika 10: Priprava raztopin za določitev meje detekcije in meje kvantifikacije	25
Slika 11: Kalibracijske krivulje BPA, pripravljene v izbranih matriksih vod (simboli: izmerjeno; črte: regresijska premica).....	26
Slika 12: Graf vpliva motenj na merjene koncentracije BPA v umetno pripravljene izcedni vodi.....	34

SEZNAM OKRAJŠAV

AOP = »*Advanced Oxidation Process*« = napredni oksidacijski procesi

BPA = »*bisphenol A*« = bisfenol A

CRM = certificiran referenčni material

GC-MS = plinska kromatografija-masna spektrometrija

HPLC = »*high performance liquid chromatography*« = tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti

HPLC-ECD = tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti z elektrokemičnim detektorjem

HPLC-FLD = tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s fluorescenčnim detektorjem

KPK = kemijska potreba po kisiku

LC-MS = tekočinska kromatografija-masna spektrometrija

LOD = »*limit of detection*« = meja detekcije

LOQ = »*limit of quantification*« = meja kvantifikacije

RSD = relativni standardni odmik

UČV = ultra čista voda

UV = ultravijolični del spektra

UV-VIS = ultravijolični in vidni del spektra

ZDA = Združene države Amerike

1 UVOD

Naraščajoča populacija, urbanizacija in modernizacija so ključni elementi, ki vodijo k sproščanju organskih toksičnih komponent v okolje, vključno s hormonskimi motilci. V zadnjih letih narašča interes preučevanja in odkrivanja hormonskih motilcev v okolju, zato poskušajo znanstveniki razviti čim več visoko občutljivih analiznih tehnik, ki bi bile sposobne zaznati že zelo majhne koncentracije (koncentracijski nivo ngL^{-1} in pgL^{-1}) teh motilcev. Eden izmed aktualnih in zelo škodljivih motilcev, ki je v zadnjem času zelo raziskan je tudi bisfenol A (BPA). Ta je prisoten v naravnem okolju kot posledica antropogenih dejavnosti pri proizvodnji plastike. Škodljivost BPA je odvisna od časa izpostavljenosti in koncentracije, kateri je neko živo bitje ali okolje izpostavljeno.

1.1 Namen naloge

V okviru diplomskega dela sem validirala obstoječo, hišno metodo, razvito v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu, za določanje vsebnosti bisfenola A v različnih vzorcih vod: podtalnica, umetno pripravljena izcedna voda, izcedna voda deponije v delovanju (sveža izcedna voda) ter izcedna voda zaprtega dela deponije (stabilizirana izcedna voda) s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC). Tako sem si zastavila cilj, da na osnovi rezultatov validacije pokažem, ali je razvita metoda primerna za določanje koncentracije bisfenola A v podtalnici in izcedni vodi z deponij. Validirana metoda se bo lahko uporabljala za sledenje učinkovitosti čiščenja izcednih vod z deponij z naprednimi oksidacijskimi postopki.

2 TEORETIČNE OSNOVE

V pod poglavjih teoretičnih osnov bom opisala osnovne podatke o bisfenolu A, njegovo prisotnost v okolju in izcedni vodi z deponij, metode, s katerimi lahko določimo prisotnost te spojine v vzorcih ter validacijske metode.

2.1 Bisfenol A

2.1.1 Splošni podatki o bisfenolu A

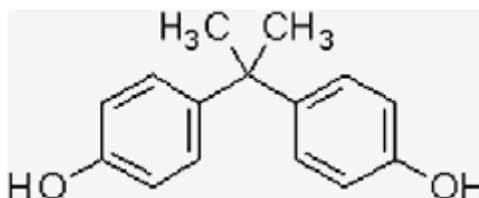
Bisfenol A (2,2-bis(4-hidroksifenil)propan) je organska spojina, uvrščena med alkilfenole. Sestavljena je iz dveh fenolnih funkcionalnih skupin, povezanih z metilenskim mostom, ki je substituiran z dvema metilnima skupinama (slika 1). Je tipični produkt industrijske družbe, ki se proizvaja v velikih količinah po vsem svetu in je bil prvič sintetiziran leta 1905 (Staples s sod., 1998; Rykowska in Wasaik, 2006 ; Ballesteros-Gomez s sod., 2009; Rubin in Soto, 2009). Zaradi razširjene uporabe prehaja v vodno okolje (52 %), zemljo (25 %) in sedimente (23 %), in je eden izmed glavnih okoljskih onesnažil (Ballesteros-Gomez s sod., 2009; Rubin in Soto, 2009). Glavne fizikalno kemijske lastnosti BPA so prikazane v tabeli 1.

Sinteza BPA poteka s kondenzacijo fenola in acetona pri nizkem pH-ju in visoki temperaturi ter v prisotnosti katalizatorjev (klorovodikova kislina, polistirenske sulfonatne smole) (Watabe in Kondo, 2004).

BPA je bil dolgo časa znan kot človeku neškodljiva oz. nevtralna spojina. Vendar so z detekcijo BPA v naravnem okolju, pitni vodi in v hrani dokazali, da ima negativne vplive na človeško zdravje. Leta 1996 je Evropska komisija označila BPA kot snov zunanega izvora, ki ima škodljiv vpliv na zdravje ljudi. S številnimi toksikološkimi in biokemijskimi študijami so potrdili, da ima BPA estrogene lastnosti. Študije so pokazale tudi, da BPA moti hormonsko ravnovesje pri ljudeh in živalih. Izkazalo se je, da je BPA estrogen tudi pri koncentracijah, nižjih od 1 ngL^{-1} (Watabe in Kondo, 2004).

Tabela 1: Fizikalno kemijske lastnosti BPA

Molska masa	$228,29 \text{ g mol}^{-1}$
Linearna formula	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$
Gostota	$1,20 \text{ g cm}^{-3}$
Topnost v vodi	$120\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$ (20-25°C)
Temperatura tališča	$T_t=158\text{-}159^\circ\text{C}$
Temperatura vrelišča	$T_v=220^\circ\text{C}$
Oblika nahajanja	luske, kristali



Slika 1: Bisfenol A

2.1.2 Uporaba BPA

Produkcija BPA v zadnjih letih močno narašča; tako se je proizvodnja omenjene spojine od leta 1996, ko so letno pridelali okoli 3,9 milijonov ton BPA, povišala na okoli 5 milijonov ton v letu 2010. Povpraševanje po BPA je visoko v ZDA, močno pa narašča v Aziji in na Kitajskem, medtem ko v Evropi povpraševanje ostaja na isti ravni kot je bilo v preteklosti (Huang s sod., 2011). Tako lahko ugotovimo, da je največja količina BPA oz. onesnaženje z njim prisotno bolj v državah s hitro razvijajočim ekonomskim trgom. Več kot 95 % BPA se uporablja kot monomer za izdelavo polikarbonatne plastike in epoksi smol, ostalih 5 % pa se uporablja pri sintezi polisulfonov, poliestrskih ketonov, kot inhibitor polimerizacije v polivinil kloridu,... BPA kot del končnega produkta lahko najdemo v steklenicah za vodo, otroških stekleničkah, lečah, zobnih plombah, športni opremi, CD-jih, DVD-jih, najdemo ga lahko tudi v plastenkah hrane in pijače (slika 2). Lahko je uporabljen tudi kot inertna sestavina v pesticidih in fungicidih (Rodriguez s sod., 2005; Huang s sod., 2011). BPA so uporabljali tudi kot komponente za medicinsko opremo (za dializo). Uporaba polikarbonatov se je uveljavila predvsem zaradi njihovih posebnih lastnosti, kot so majhna teža, vzdržljivost, visoka natezna trdnost, visok modul elastičnosti in visoko tališče (Ryskowska in Wasiak, 2006).



Slika 2: Produkti, ki vsebujejo BPA

2.2 BPA v okolju

Prisotnost BPA v okolju je posledica antropogene dejavnosti, saj slednji ni naravno prisoten v okolju. V okolje (voda, zrak, sedimenti) prihaja neposredno iz predelovalnih dejavnosti za izdelavo polikarbonatne plastike in epoksi smol ter iz številnih izdelkov, ki se jih po uporabi odlaga na odlagališča. V okolje prihaja tudi nedirektno z uporabo komponent BPA za izdelavo in predelavo različnih komercialnih izdelkov, pri katerih se sproščajo emisije v zrak. Prav tako se lahko sprošča v okolje preko plastenk, embalaže, papirja in plastičnih rastlin (Huang s sod., 2011).

BPA so zaznali v pritokih in odtokih kanalizacije ter čistilnih naprav, v okolje se sprosti skozi kanalizacijske odtoke, z odpadnimi izcednimi vodami (s hidrolizo BPA iz plastike) ali preko naravne razgradnje polikarbonatne plastike zaradi zmerne topnosti v vodi in

nizkega parnega tlaka. BPA lahko v okolje prihaja preko različnih točkovnih in netočkovnih virov (Mohapatra s sod., 2010).

Viri onesnaženja okolja z BPA so:

- odpadna voda,
- kanalizacija,
- izcedna voda,
- surova odpadna voda,
- podzemna voda,
- voda v kanalih, lagunah, estuarjih in
- rečna voda.

Prisotnost BPA so zasledili tudi v vodnjakih, v katere se izpirajo industrijske in kmetijske odpadne vode. Najbolj nevarno pa je to, da se lahko ta spojina prenaša tudi preko različnih virov hrane (Mohapatra s sod., 2010):

- predelava hrane v povezavi s plastiko, smolami, laki, preko barv iz cevi, tesnil in posode,
- z migracijo iz embalaže in pakiranega materiala ter ovojnic s tiskanim črnilom.

2.2.1 BPA v prsti in sedimentih

Narejene so bile raziskave za določanje prisotnosti BPA v sedimentih in prsti po celem svetu. Tako so koncentracije BPA v prsti in sedimentih nižje od koncentracije v vodnem okolju. Najnižje koncentracije so zaznane v rečnem sedimentu, razen v Nemčiji (reka Elba) in na Tajskem (reka Estuary), kjer so koncentracije zelo visoke, zaradi bližine industrije. Nizke koncentracije BPA so tudi v Indijskem oceanu in Pacifiku ter na polarnih območjih ($1-17 \text{ ngL}^{-1}$). Višje koncentracije so opazne v obrečnem sedimentu mest in industrijskih območjih ter v marinah. Najvišje koncentracije BPA so v blatu v odpadnih kanalih in kanalizaciji (Huang s sod., 2011).

2.2.2 BPA v zraku

Zaradi slabe hlapnosti BPA je koncentracija BPA nižja v atmosferi kot v vodi. V zrak lahko prehaja preko industrijskih izpustov (do 100 ton na leto), z nekontroliranim domačim sežigom (npr. platenke), z odpadno računalniško opremo in barvnimi spreji (Pingging in Kawamura, 2010). Za določanje prisotnosti koncentracije BPA v zraku je malo študij oz. so le-te omejene. Tako so ugotovili, da je prisotnost BPA v zraku najvišja nad industrijskimi obrati in pada proti odmaknjenim mestom (podeželje, kjer ni proizvodnje BPA ali predelovalnic, kjer uporabljajo komponente BPA). Najbolj zaskrbljujoče je dejstvo, da so koncentracije BPA razmeroma višje v zaprtih prostorih (stanovanja, podjetja, pisarne, ...) kot odprtih prostorih, kar je posledica prisotnosti materialnih dobrin, ki vsebujejo BPA (Huang s sod., 2011).

2.2.3 BPA v vodnem okolju

Največ BPA se sprosti v vodno okolje (sladkovodna telesa in morje), z migracijo iz produktov, izdelanih iz komponent, ki vsebujejo BPA, predvsem z odpadno vodo iz papirne in plastične industrije in iz izpustov čistilnih naprav ter deponij (Mohapatra s sod., 2010; Liu s sod., 2011). Koncentracije BPA v vodnih območjih po celem svetu tako nihajo od nekaj nanogramov BPA na liter v morjih in čistejših vodah, do kar $0,15 \text{ mgL}^{-1}$ BPA v odpadnih industrijskih vodah, v izcednih vodah iz predelovalnice (reciklirnice) umetnih rastlin pa kar $0,37 \text{ mgL}^{-1}$ BPA. Najbolj onesnažena vodna telesa so tako v okolici industrijskih obratov in čistilnih naprav. Iz študij lahko razberemo, da so najbolj obremenjena vodna telesa v Aziji, na Japonskem in Kitajskem ter v Združenih državah Amerike (ZDA), medtem ko so koncentracije BPA v evropskih državah razmeroma nizke v primerjavi z ostalim svetom. Vendar so prav v Evropi zasledili prisotnost BPA v podzemni vodi, medtem ko je v Aziji in ZDA še niso (Huang s sod., 2011). BPA lahko delno razpade pod mikrobiološkim vplivom v vodi, kjer ima razpolovni čas od 2,5 do 4 dni (Rodriguez s sod., 2005).

Zaradi odkritja, da BPA škoduje ljudem ter zaradi njegove povečane uporabe in proizvodnje, so znanstveniki začeli raziskovati, kako bi BPA odstranili iz okolja po fizikalni, biološki in kemijski poti. Med njimi naj bi bila najbolj učinkovita fizikalna adsorpcija, ki povzroči najhitrejše znižanje koncentracije organskih molekul v iztoku, zaradi skupnih absorbentov (predvsem mineralna glina in aktivno oglje) (Tsai Ali in Su, 2006). BPA se odstranjuje oz. se njegova koncentracija znižuje tudi z uporabo čistilnih naprav, kakšna je učinkovitost odstranjevanja, pa je odvisno predvsem od specifične čistilne značilnosti in zmogljivosti naprave (Mohapatra s sod., 2010).

2.2.4 Zakonodaja

Prva država, v kateri so omejili uporabo, uvoz, oglaševanje in prodajo izdelkov, ki vsebujejo BPA, je Kanada. Predvsem se je ta omejitev nanašala na polikarbonatne otroške stekleničke, s tem pa so hoteli zaščititi otroke, mlajše od 18 mesecev. Strogo so omejili in nadzirali tudi pločevinke in vso ostalo embalažo, v katerih je bila otroška hrana. S tem so nadaljevali tudi v ZDA, medtem ko so v Evropi v letu 2008 sprva kljub zavedanju škodljivosti BPA njegovo uporabo še vedno dovolili, vendar je Evropska komisija kmalu omejila uporabo izdelkov iz BPA na dovoljeni dnevni vnos glede na telesno težo, ki je znašal $0,05 \text{ mgkg}^{-1}$. Ta meja naj bi zagotavljala varnost potrošnikov, vključno z bolj občutljivimi, kot so zarodki in dojenčki.

Medtem pa so v avstralski in novozelandski agenciji za varnost hrane (angl. *Food Standards Australia New Zealand*) zatrdili, da je pri njih količina BPA nizka in da ne presega meje toksičnosti. Tudi v Aziji, ki je eno izmed najbolj industrializiranih področij, še vedno nimajo predpisov o omejitvi vnosa BPA. V Afriki še vedno nimajo urejenih čistilnih naprav in kanalizacije, namenjene odstranjevanju patogenih mikroorganizmov, povzročiteljev bolezni, odstranjevanju težkih kovin ter ostalih zdravju in okolju škodljivih snovi. Prav tako še nimajo opravljenih raziskav o organskih onesnažilih in BPA (Mohapatra s sod., 2010).

V Sloveniji so avgusta 2011 prepovedali prodajo otroških stekleničk, ki vsebujejo BPA komponente.

2.3 BPA v izcednih vodah iz deponij

V odpadnih izcednih vodah iz deponij so lahko prisotne tudi do 1800 krat višje koncentracije BPA, kot v površinskih vodah (Asakura in Matsuto, 2009). Na nekaterih območjih sveta lahko te koncentracije dosežejo kar 17 miligramov BPA na liter (Yamamoto s sod., 2001).

Glavni vir BPA na deponijah so pripeljani odpadki, predvsem odpadne plastenke. Čeprav viri onesnaženja še niso povsem preiskani, naj bi se najbolj onesnažena izcedna voda iztekala iz odlagališč z nevarnimi odpadki. Vzrok je sežig odpadkov na odlagališčih, predvsem plastike, ki vsebuje komponente BPA (Yamamoto s sod., 2001). S hidrolizo in procesi izpiranja pride izcedna voda iz odlagališč do podzemne in površinske vode (Filho s sod., 2003; Liu s sod., 2011).

2.3.1 Odstranjevanje BPA iz izcednih vod

Zaradi ugotovitev prisotnosti hormonskih motilcev v odpadnih izcednih vodah so bile izvedene mnoge študije, s katerimi so jih poskušali določiti in odstraniti. Študije so pokazale, da je eden izmed glavnih hormonskih motilcev v odpadnih vodah prav BPA (Coors s sod., 2003; Asakura in Matsuto, 2009).

Za odstranjevanje lahko razgradljivih spojin iz odpadnih voda so namenjene biološke čistilne naprave, vendar pa so te manj učinkovite pri odstranjevanju kompleksnih organskih spojin (Tišler s sod., 2010; Bistan s sod., 2011). Za biološko težko ali pa sploh nerazgradljive organske spojine so primerni napredni oksidacijski procesi (AOP - *Advanced oxidation processes*). Ti temeljijo na fotokatalizi, ozonaciji, oksidaciji z mokrim zrakom in Fentonovi reakciji. Postopki fotokatalitske oksidacije se v današnjem času veliko uporabljajo zaradi številnih prednosti, saj te oksidacije potekajo pri normalnih pogojih (sobna temperatura, atmosferski tlak), nizke so tudi cene katalizatorja, katalizatorji so komercialno dostopni v različnih oblikah, so nestrupeni in fotokemijsko stabilni (Mohapatra s sod., 2010). Za razgradnjo organskih onesnaževal, raztopljenih v vodi, se najpogosteje uporablja fotokatalizator titanov dioksid (TiO₂). Slednji pod UV svetlobo (ultravijolična svetloba) doseže visok oksidacijski potencial, ki je potreben za razgradnjo (Fujishima s sod., 2008; Tišler s sod., 2010).

2.4 Metode za določanje vsebnosti bisfenola A

Zaradi različnih značilnosti in karakteristik snovi, ki vsebujejo BPA, je potrebno odvzeti čim več različnih vzorcev, katerim določamo vsebnost BPA. Pri čistilnih napravah najpogosteje vzorce vzamejo pri vtoku vode in na iztoku. Za dokazovanje prisotnosti

BPA so na voljo razne biološke metode (imunokemijske metode, biotesti *in vitro* in biotesti *in vivo*) in kemijske analizne tehnike (kromatografije). Najpogosteje se uporabljajo kemijske analizne tehnike, saj lahko z njimi določimo analit v sledeh, tudi nižje koncentracije kot je 1 ngL^{-1} . Določitev BPA v odpadni in kanalizacijski vodi vključuje različne korake, kot so zbiranje vzorcev, ekstrakcija, čiščenje in določitev koncentracije (Mohapatra s sod., 2010).

Kemijska analiza BPA poteka večinoma s kromatografskimi metodami, bolj malo metod je na voljo za določanje prisotnosti BPA v okolju. Za določanje BPA v vodnih vzorcih se prvenstveno uporabljata plinska kromatografija-masna spektrometrija (GC-MS) in tekočinska kromatografija-masna spektrometrija (LC-MS). V uporabi so tudi tehnike tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z elektrokemičnim (HPLC-ECD) in fluorescenčnim detektorjem (HPLC-FLD) (Fromme s sod., 2002; Mohapatra s sod.; 2010).

Pri biološki analizi BPA se za njegovo dokazovanje največkrat uporabljajo imunokemijske metode. Biotesti *in vitro* so hitri in ponovljivi ter cenovno ugodni, vendar z njimi ne dobimo rezultatov vpliva na celotni organizem, zato so potrebni tudi biotesti *in vivo*, s katerimi lahko preučujemo vplive BPA na endokrini sistem (Li s sod., 2008; Saiyood s sod., 2010).

2.5 Kromatografija

Kromatografija je skupno ime za analizne tehnike kjer je osnova separacijski proces, pri katerem najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrežno detekcijo s ciljem kvantitativne in kvalitativne določitve. Tako poskušamo v praksi doseči čim boljšo separacijo v najkrajšem času, z načinom optimizacije vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Od zmogljivosti opreme in pritiska v koloni ter ustreznosti ločbe, je ponavadi odvisna meja optimalnosti. Posamezne komponente vzorca se ločijo zaradi različnega porazdeljevanja med mobilno in stacionarno fazo. Kromatografske metode se zelo uporabljajo zaradi njihovih prednosti, kot so ponovljivost, selektivnost in visoka občutljivost. Kromatografske metode lahko razdelimo na tri tipe, glede na mehanizem porazdeljevanja, ki so:

- reverznofazna,
- ionsko-izmenjevalna in
- izključitvena kromatografija.

Kromatografske metode ločimo tudi glede na mobilno fazo in sicer:

- plinsko in
- tekočinsko kromatografijo.

Pri plinski kromatografiji je mobilna faza v plinastem agregatnem stanju, pri tekočinski pa v tekočem. Pri tekočinski kromatografiji stacionarno fazo sestavljajo organski ali

anorganski trdni delci. Tako jo glede na obliko nosilca trdne faze razdelimo na planarno in kolonsko kromatografijo, glede na polarnost stacionarne faze pa na normalnofazno in reverznofazno. Pri normalnofazni tekočinski kromatografiji je stacionarna faza polarna, mobilna faza pa nepolarna, pri reverznofazni kromatografiji je stacionarna faza nepolarna, mobilna faza pa polarna.

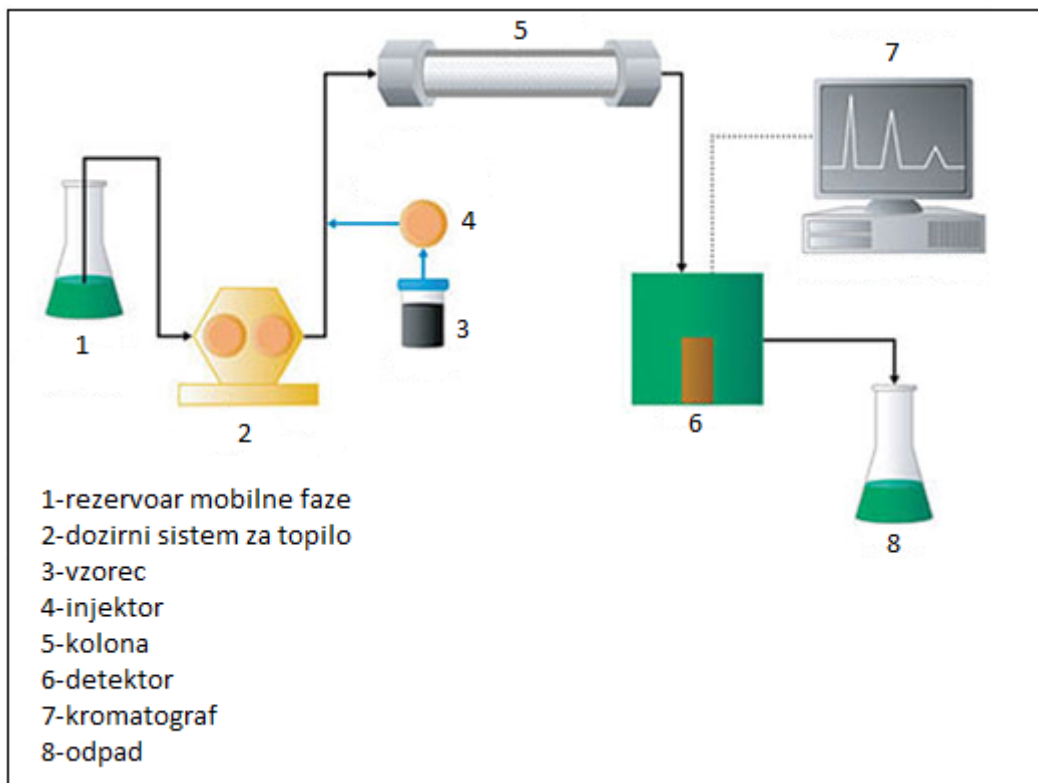
2.5.1 Tekočinska kromatografija

Pri tekočinski kromatografiji visoke zmogljivosti (HPLC) gre v osnovi za močno izpopolnjeno kromatografsko kolono, pri kateri topilo oz. mobilna faza prihaja skozi kolono pod vplivom gravitacijske sile oziroma pod tlakom (kar dosežemo s črpalko). Kromatografsko kolono je leta 1906 odkril ruski botanik Tsweet in jo uporabil za separacijo karotenov in ksantofilov na kalcijevem karbonatu s petrolejem. V naslednjih desetletjih zanimanja na tem področju ni bilo, dokler ni v letih 1962-1964 podjetje Waters Associates patentiralo prvi ustrezeni komercialni HPLC sistem.

2.5.2 Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC)

HPLC je najpogosteje uporabljena tehnika tekočinske kromatografije. Stacionarna faza je sestavljena iz majhnih delcev velikosti 3-20 μm , kar zagotavlja učinkovito ločevanje. Mobilno fazo pri tej tehniki potiskamo skozi stacionarno fazo v koloni pod visokim pritiskom (do 400 barov ali še več), kar zagotavlja konstantno hitrost pretoka. HPLC sistem je v osnovi sestavljen iz specializiranih enot, ki se lahko uporabljajo posamezno ali pa so integrirane v skupen sestav. Enote HPLC sistema (slika 3) so:

- rezervoar za mobilno fazo,
- črpalka,
- avtomatski injektor,
- termostatisirana komora s kromatografsko kolono,
- detektor in
- instrument za zapis signala (računalnik s programsko opremo).



Slika 3: Shema HPLC sistema

(vir: http://www.comsol.com/stories/waters_corp_hplc_systems/full/; 12.08.2011)

Med posameznimi enotami je vzpostavljena cirkulacija mobilne faze, katero omogoča sistem cevčic iz nerjavečega materiala ali polimera polieter (eterketon z zelo majhnim premerom), ki so odporne na visok tlak (t.j. do 400 barov). Vse te komponente predstavljajo dva dela in sicer separacijski ter detekcijski del. Prvi je namenjen separaciji, drugi pa detekciji. Separacijski del sestavljajo črpalka, injektor in kromatografska kolona, detekcijskega pa eden ali več detektorjev ter instrument za zapis signala (računalnik s programsko opremo).

2.5.2.1 Rezervoar za mobilno fazo

Mobilne faze, ki se uporabljajo pri HPLC, so lahko tudi toksična in vnetljiva topila. Zato je potrebno, da se hranijo in med delom črpajo iz dovolj tesno zaprtih steklenih posod. To je potrebno, da hlapi topil ne izhajajo zaradi zdravstvenih razlogov in da se sestava mobilne faze med delom ne spreminja. Hkrati pa ne smejo biti preveč zatesnjene, ker bi lahko prišlo do nastanka podtlaka, ki bi povzročil motnje v delovanju črpalke.

2.5.2.2 Črpalka

Dobra črpalka za analitsko delo mora zadoščati zahtevam po brezpulznem delovanju, konstantnem pretoku in ponovljivosti pretoka.

Naloga črpalke je, da zagotavlja enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono in preprečuje pulzacije tudi v primeru, ko se sestava mobilne faze spreminja. To

omogočata dva nasprotno delujoča bata. Eden izmed njiju črpa, drugi pa se polni. Če med črpalko in injektor vstavimo dušilce tlaka (zvitke cevke, membrana s heptanom), s tem izboljšamo uravnavanje pretoka mobilne faze. Moderne črpalke pa imajo že vgrajene mikroprocesorje. Ti omogočajo dostavo mobilne faze s konstantno ali spreminjajočo se sestavo, odvisno od programa analize. Mikroprocesorji omogočajo tudi ponovitev nastavljenih sekvenc, kar je pomembno predvsem pri delu z avtomatskimi injektorji.

2.5.2.3 Injektor

Injektorji omogočajo dobro ponovljivost med posameznimi doziranjmi in čim manjšo kontaminacijo med posameznimi injiciranimi vzorci. Injektor mora omogočati, da lahko doziramo različne volumne in s tem tudi različne koncentracije vzorca kakor tudi avtomatizacijo doziranja. Danes so v uporabi injektorji z zankami, kateri omogočajo analitsko, preparativno ter avtomatizirano delo z istim injektorjem. Te lahko uporabljamo tako, da v zanko doziramo poljuben del volumna ali pa definirano zanko do konca napolnimo z vzorcem. Volumen zank za analitsko delo je od 1 do 100 μL , za preparativno delo pa od 100 μL do nekaj mL. Vzorec lahko injiciramo z avtomatskim injektorjem ali pa ročno (z dozirno iglo ali brizgo). Največjo ponovljivost pa lahko dosežemo z uporabo avtomatskega injektorja s fiksno vzorčno zanko.

2.5.2.4 Kolona

Kolona je bistveni del HPLC sistema, v katerem potekajo najpomembnejši procesi separacije. Kolona je ravna jeklena cevka, ki je dolga od 3 do 25 cm in mora biti nerjaveča. Notranje stene kolone so prekrivane z inertnim materialom. Kolona mora biti zaprta in zatesnjena s posebnimi materiali ter napolnjena s stacionarno fazo. Pomemben del kolone je tudi njen notranji premer, ki je lahko različnih velikosti (2-4 mm, 1-2 mm, <1 mm), te proizvajajo različni proizvajalci, v njih pa so delci stacionarne faze različne velikosti. Z uporabo predkolon (t.j. jeklena cevka, dolga od 0,4 do 1 cm, ki je napolnjena z enako stacionarno fazo kot analitična kolona) lahko podaljšamo življenjsko dobo kolone, saj le-te preprečujejo kontaminacijo kolone s kemijskimi in mehanskimi primesmi iz mobilne faze in vzorca. Predkolona tudi upočasnjuje raztapljanje stacionarne faze v mobilni fazi. Tako danes za analizo uporabljamo termostatisirane kolone in predkolone, saj se s kontrolo temperature poveča kvaliteta separacije in ponovljivost meritev.

2.5.2.5 Detektor

Vloga detektorja je, da zazna substance, ločene na koloni. Detektorji temeljijo na tem, da merijo spremembo neke fizikalne količine (volumen, masa, absorbanca, ...), ki jo je povzročil prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja. Pomembno je, da je detektor občutljiv, stabilen skozi čas in da je zmožen filtrirati večino šumov iz ozadja. Pri HPLC metodi obstaja več načinov detekcije med prehajanjem snovi skozi kolono. Pri HPLC analizi je pomembno, da je detektor sposoben določevati koncentracije

ločene substance. Pri tekočinski kromatografiji najpogosteje uporabljamo UV-VIS (ultravijolični in vidni del spektra) spektrofotometre in detektorje na niz diod, lahko pa uporabljamo tudi radioaktivne, elektrokemične, fluorescenčne ali druge posebne detektorje.

Veliko organskih komponent absorbira UV svetlobo pri različnih valovnih dolžinah. Če imamo žarek UV svetlobe, ki sije skozi tok mobilne faze, ki prihaja iz kolone in UV detektor na nasprotni strani toka, lahko direktno določimo količino absorbirane svetlobe. Količina absorbirane svetlobe je odvisna od količine posamezne komponente, ki prehaja skozi tok v določenem času.

Podatki, pridobljeni na detektorju, so prikazani kot serije vrhov, katerih vsak prikazuje eno komponento, prisotno v mešanici, ki potuje skozi detektor in absorbira določeno UV svetlobo. Če so pogoji kontrolirani in se ne spreminjajo, se lahko kot identifikator za določeno spojino oz. komponento uporabi zadrževalni čas, pod pogojem, da je bila snov oz. komponenta že izmerjena v čistem vzorcu različnih komponent pod identičnimi pogoji. Če injiciramo poznano koncentracijo čiste komponente v napravo, lahko poleg zadrževalnega časa določimo tudi površino pod vrhom, ki je bila ustvarjena. Površina pod vrhom je proporcionalna količini določene komponente, ki je šla skozi detektor. Ta površina je lahko izračunana avtomatsko in jo odčitamo iz naprave oz. monitorja.

Zadrževalni čas je čas, ki ga potrebuje določena komponenta, da prepotuje skozi kolono. To je čas, ki je merjen od točke, ko je vzorec injiciran, do točke, ko se na monitorju prikaže maksimalni vrh za to komponento. Različne komponente imajo različen zadrževalni čas. Za določeno komponento bo zadrževalni čas nihal in bo odvisen od pritiska, narave stacionarne faze (material in velikost delcev stacionarne faze), temperature kolone in sestave topila. To pomeni, da morajo biti pri uporabi HPLC tehnike pogoji konstanti in kontrolirani pri uporabi zadrževalnega časa kot identifikatorja komponent (Žorž, 1991).

2.6 Validacija

Validacija je postopek potrditve s preiskovanjem in zagotovitev učinkovitih dokazov, da so izpolnjene posebne zahteve za predvideno uporabo (Eurachem 1998). Je postopek dokazovanja karakteristik zmogljivosti in omejitev metode ter identifikacija vplivov, kateri lahko spremenijo te lastnosti, v kakšnem obsegu jih lahko spremenijo, katere analite je mogoče določati v katerih matriksih in kakšno točnost ter natančnost je možno določiti pri izbranih pogojih v prisotnosti katerih motečih komponentah. Je tudi postopek preverjanja, ali metoda ustreza njenemu namenu. Cilj validacije je, da so analitske meritve, opravljene na neki lokaciji, primerljive z meritvami, narejenimi na drugih lokacijah (Hayashi s sod., 2002).

Proces validacije je sestavljen iz naslednjih parametrov analizne metode (Čop A., 1994):

- selektivnost/specifičnost,
- meja detekcije,
- meja kvantifikacije,
- delovno območje,
- linearno območje,
- pravilnost,
 - o točnost,
 - o natančnost,
 - ponovljivost,
 - obnovljivost,
- robustnost in
- stabilnost.

2.6.1 Selektivnost

Selektivnost metode je sposobnost, da lahko pravilno določimo koncentracijo preiskovane snovi v vzorcu. Selektivnost se ugotavlja z analizo različnih vzorcev in z opazovanjem merjene lastnosti elementa, ki se ga določuje.

Za vsak konkreten primer analize je potrebno ugotoviti, katere snovi vplivajo na določitev preiskovane lastnosti. Tako se preiskovanemu vzorcu dodaja moteče snovi ali nečistoče. S tem se določi, ali je preizkusna metoda selektivna, ali ne. Metoda je selektivna v primeru, da na določeno lastnost ene komponente v mešanici ne vpliva nobena druga komponenta iz mešanice. Popolna selektivna metoda se imenuje specifična metoda.

2.6.2 Meja detekcije

Meja detekcije (LOD - *limit of detection*) je spodnja meja koncentracije, ki je lahko izmerjena s primerno statistično zanesljivostjo. Je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki je ne moremo določiti kvantitativno. Mejo detekcije lahko med drugim določimo iz razmerja med signalom in šumom, ki mora biti večje kot 3.

$$S/N > 3 \tag{1}$$

kjer je:

S ... signal

N ... šum

2.6.3 Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije (LOQ – *limit of quantification*) je najnižja koncentracija merjene komponente, katero še lahko kvantitativno določimo z zadovoljivo stopnjo točnosti in natančnosti. Meja kvantifikacije je običajno najnižja točka umeritvene krivulje, oziroma najnižja koncentracije standardne raztopine, ki smo jo lahko izmerili. Mejo kvantifikacije

lahko med drugim določimo iz razmerja med signalom in šumom, ki mora biti večje kot 10.

$$S/N > 10 \quad (2)$$

kjer je:

S ... signal

N ... šum

2.6.4 Delovno območje

Delovno območje je območje, v katerem predpisana metoda daje rezultate z ustrezno ponovljivostjo, točnostjo in linearnostjo. Velikost delovnega območja določimo z merjenjem koncentracij vzorcev z različnimi koncentracijami merjene spojine. Pri njegovi določitvi je potrebno upoštevati zahteve in merske zmožnosti aparature. Spodnji konec delovnega območja običajno določimo z mejo detekcije, zgornji pa z odzivi oz. različnimi vplivi na instrument. Delovno območje je lahko večje od linearnega območja v primeru, ko je v tem območju določitev kvantitativna in doseže zahtevano natančnost ter točnost meritev.

2.6.5 Linearno območje

Linearno območje oz. linearnost je lastnost metode, da v določenem območju daje linearno proporcionalne rezultate, odvisne od koncentracije vzorca oz. sposobnost metode, da z rezultati preskušanja dobimo proporcionalne vrednosti koncentracije analita. Za določitev linearnega območja je potrebno izmeriti standardne raztopine vzorca različnih koncentracij po celem delovnem območju, potem pa izračunamo regresijsko premico z metodo najmanjših kvadratov. Metodo lahko določimo kot linearno v primeru, ko je korelacijski koeficient enak ali višji kot 0,99.

2.6.6 Točnost

Točnost analizne metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analizne metode dobimo pravilne rezultate. Je tudi merilo stopnje ujemanja rezultatov, katere pridobimo z našo metodo, s pravo vrednostjo. Pravo vrednost pa lahko dobimo na dva načina. Prvi je, da primerjamo rezultate z referenčno metodo, za katero vemo, da nima sistematske napake in čim manjša je razlika med pravo (referenčno) vrednostjo in povprečjem meritve, bolj je metoda točna. Drugi način pa je dodajanje znane koncentracije merjene komponente v matrično raztopino ali z uporabo certificiranega referenčnega materiala (CRM) in merjenje pripadajočih signalov.

2.6.7 Natančnost

Natančnost analizne metode je merilo za velikost slučajne napake in se ne nanaša na pravo vrednost ali specificirano vrednost. Pove nam, koliko rezultati meritev med seboj

nihajo. Merilo natančnosti se običajno izračuna kot standardni odmik (s). Natančnost posamezne metode lahko določimo iz vrednosti standardnega odmika meritev. Metoda je bolj natančna pri čim manjšem standardnem odkiku. Natančnost določimo tako, da izmerimo več ponovitev meritev oz. paralel realnega vzorca, več ponovitev meritev standardnih raztopin ali referenčnih materialov. Kvantitativno merilo natančnosti je odločilno odvisno od dogovorjenih pogojev, pod katerimi smo jo določali. Tako ločimo dva načina podajanja natančnosti metode.

- Ponovljivost je natančnost, dobljena iz rezultatov meritev pri ponovljivih pogojih. To pomeni, da moramo uporabiti isto metodo, isti reagent oz. vzorec, analizo mora izvajati isti analitik, v istem laboratoriju, isti dan in z istim setom vzorcev. Za čim boljšo ponovljivost je potrebno v čim krajšem času narediti najmanj 6 ponovitev.
- Obnovljivost je natančnost, dobljena iz rezultatov meritev pri obnovljivih pogojih. To pomeni, da moramo uporabiti isto metodo, isti reagent oz. vzorec, analizo mora izvajati drug analitik, v drugem laboratoriju, pri drugih pogojih (temperatura, vlažnost, ...) in v različnih dneh oz. daljšem časovnem obdobju.

2.6.8 Robustnost – stabilnost raztopin standarda

Stabilnost podaja velikost odstopanj v analiznih rezultatih, narejenih v različnih časovnih intervalih. Stabilnost je potrebno določiti zato, ker mnoge snovi lahko razpadejo že tekom priprave vzorca ali med analizo vzorca. Sistem stabilnosti je sprejemljiv, če relativni standardni odmik v časovnih intervalih ne prekorači več kot 20% celotne natančnosti. V primeru večje vrednosti je potrebno izračunati časovno uporabnost vzorčne raztopine.

2.7 Osnovni statistični pojmi

Standardni odmik meritev (s) je meritev, ki nam pove, kako meritve odstopajo od povprečne vrednosti (Miller, 2008):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

kjer je:

s ... standardni odmik meritev

n ... število meritev

x_i ... posamezna meritev

\bar{x} ... povprečna vrednost vseh meritev

Relativni standardni odmik (RSD) je koeficient, izražen v procentih:

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (4)$$

kjer je:

RSD ... relativni standardni odmik

s ... standardni odmik meritev

\bar{x} ... povprečna vrednost vseh meritev

Linearna regresija je metoda, po kateri določimo regresijsko premico, ki ustreza enačbi.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

Ekperimentalni del sem opravila v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Za pripravo vzorcev sem morala pripraviti osnovni standard BPA ter matrikse, katerim sem določala koncentracijo BPA. Tako sem za matrikse vzela podtalno vodo, svežo in stabilizirano izcedno vodo iz deponije Barje ter umetno pripravljeno izcedno vodo.

3.1 Deponija Barje

Deponija Barje je ljubljansko odlagališče nenevarnih odpadkov in leži na južnem obrobju Ljubljane. Odlagališče je razdeljeno na dva dela in sicer na starejši in novi del. Stari del se je zapolnjeval z odpadki od leta 1964 do leta 1987. Po zapolnitvi odlagališča so zahodni del starega odlagališča spremenili v sejmišče rabljenih avtomobilov, vzhodni del pa v rekreacijsko površino. Novi del odlagališča postopoma gradijo in urejajo posamezna odlagalna polja. V uporabi je od leta 1987 in ima pet odlagalnih polj. Predvidevajo, da ga bodo zapolnili do leta 2014. Na odlagališču gradijo in dograjujejo tudi spremljajoče objekte ter posodablajo infrastrukturo. Njihova infrastruktura obsega: čistilno napravo za izcedne vode (slika 4), izgradnjo kableske kanalizacije in visokonapetostne kableske povezave do razdelilne transformatorske postaje Vič, nadomeščanje izrabljenih strojev (teptalci, nakladalniki, ...), dopolnitev in posodobitev monitoringa odlagališča, ureditev končne površine že zapolnjenih polj in dograditev objektov s tehnologijami za ravnanje z odpadki (skladno s strateškimi usmeritvami Mestne občine Ljubljana).

Na odlagališču potekajo tudi nadzori vplivov na okolje. Imajo okoljsko merilno postajo, na kateri potekajo emisijski monitoringi zraka in meteorološke meritve. Za nadzor kakovosti podzemne vode pa imajo svoj laboratorij, v katerem merijo osnovne parametre izcednih, odpadnih, padavinskih in površinskih voda.



Slika 4: Čistilna naprava za izcedne vode na deponiji Barje
(vir: <http://www.ljubljana.si/si/mol/dogodki/68573/detail.html>, 13.8.2011)

Izcedne vode lahko okarakteriziramo s kemijskimi parametri, kot so: vsebnost kloridnega iona, celotnega fosforja, organske snovi (KPK), dušika ter ogljika v karbonatni obliki.

Dušik se nahaja v različnih oblikah, zato merimo vsebnost nitratnega in amonijevega dušika. Kemijska potreba po kisiku (KPK) je parameter, ki pove količino kisika, potrebnega za kemijsko oksidacijo organskega onesnaženja v odpadni vodi.

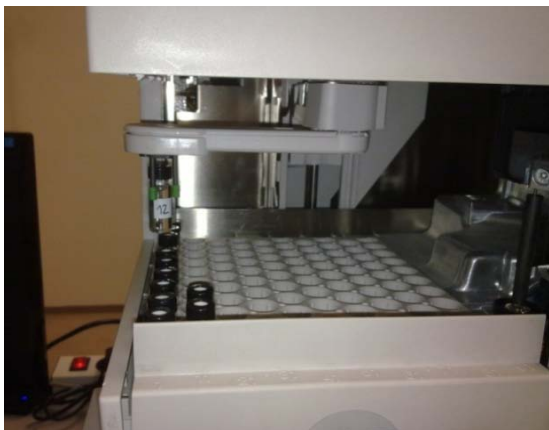
Pri delu sem uporabila vzorce odpadne izcedne vode iz deponije Barje. Tako sem imela stabiliziran vzorec, ki je bil odvzet 20.02.2009 iz stare deponije in sveži vzorec, vzet na delujoči deponiji 07.07.2011. Vzorce sem nato ustrezno pripravila in ugotavljala prisotnost BPA v odpadnih izcednih vodah.

3.2 Kemikalije

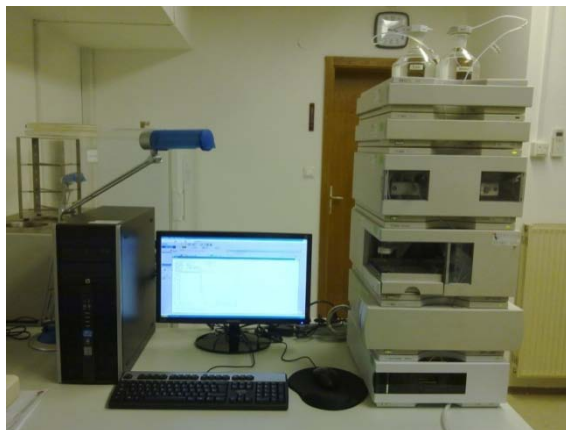
- Ultra čista voda (upornost večja kot 18,2 mohm.cm)
- Bisfenol A (Sigma Aldrich, čistost > 99 %)
- Metanol (CH₃OH) za tekočinsko kromatografijo, $MM=32,04 \text{ g mol}^{-1}$
- Kalijev hidrogen ftalat (C₈H₅KO₄), $MM=204,22 \text{ g mol}^{-1}$
- Kalcijev karbonat (CaCO₃), $MM=100,09 \text{ g mol}^{-1}$
- Amonijev sulfat (H₈N₂O₄S), $MM=132,14 \text{ g mol}^{-1}$
- Amidožveplena kislina (H₃NO₃S), $MM=97,08 \text{ g mol}^{-1}$
- Natrijev pirofosfat (Na₄P₂O₇ / Na₄P₂O₇·10H₂O), $MM=446,06 \text{ g mol}^{-1}$
- Natrijev klorid (NaCl), $MM=58,44 \text{ g mol}^{-1}$

3.3 Aparatura in oprema

- Laboratorijska steklovina
 - merilne buče (10, 50, 100, 250, 500 in 1000 mL),
 - polnilna pipeta (5, 10, 15, 20, 25, 40 in 50 mL),
 - lij,
 - steklena palčka.
- Filtri (0,45 μm)
- Injekcija (2,5 in 5 mL)
- Analitska tehtnica (Mettler Excellence plus)
- Avtomatska pipeta in nastavki (Biohit)
- Instrument HPLC
 - Pri delu sem uporabila za HPLC analizo aparat Agilent 1100 (Agilent Technologies, ZDA) z binarno črpalko in UV detektorjem pri temperaturi 30°C. Volumen injiciranega vzorca je bil 20 μL, ki smo ga injecirali na kolono Phenomenex Luna 5u C18(2) 100A (250×4.6 mm I.D., 5 μm) (Phenomenex, ZDA). Absorbance so bile merjene pri valovni dolžini 210 nm.
 - Mobilna faza je bila sestavljena iz metanola (MeOH) in ultra čiste vode v razmerju metanol:voda=75:25. Pretok mobilne faze je bil 1 mLmin⁻¹, s časom analize 9 minut.



Slika 5: HPLC instrument, na katerem sem opravljala meritve



Slika 6: Injiciranje vzorca s HPLC aparatom – avtomatski vzorčevalnik

3.4 Priprava raztopin

Za pripravo vzorcev z določeno koncentracijo BPA in z različnimi matriksi (podtalnica, umetno pripravljena izcedna voda, sveža in stabilizirana odpadna voda) sem morala najprej pripraviti osnovni standard BPA. Koncentracija osnovnega standarda je bila 20 mgL^{-1} . Le-ta je bil natančno pripravljen z ultra čisto vodo. Pri pripravi vzorcev sem nato vsaki ustrezni raztopini z BPA dodala ustrezno količino osnovnega standarda in matriksa.

3.4.1 Osnovni standard BPA

Za osnovni standard BPA sem pripravila raztopino s koncentracijo 20 mgL^{-1} BPA v litrski buči. Zatehtala sem, natančno 20 mg BPA in ga kvantitativno prenesla v 1000 mL bučo, ter le-to do oznake napolnila z ultra čisto vodo. Bučo sem postavila na magnetno mešalo za 24 ur. Osnovni standard sem nato uporabila za pripravo raztopin nižjih koncentracij, hranila pa sem ga v hladilniku pri 4°C .

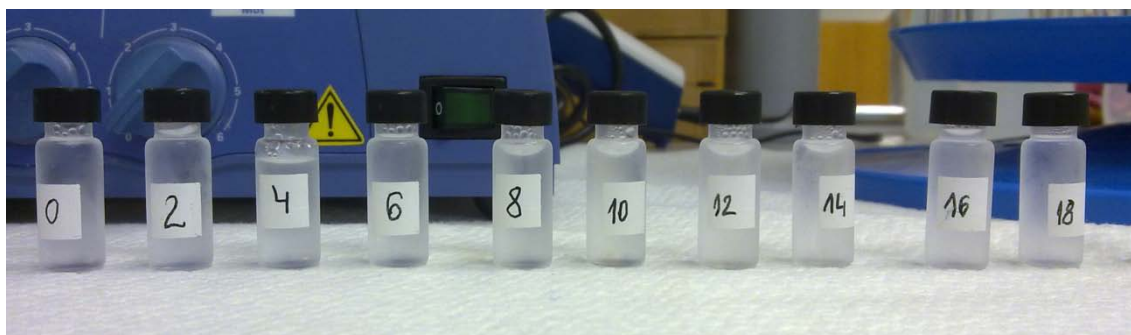
3.4.2 Priprava raztopin za umeritveno krivuljo

Raztopine sem pripravila iz osnovnega standarda in jim dodala ultra čisto vodo. Za vsak vzorec (z ultra čisto vodo, podtalnico, umetno pripravljeno izcedno vodo, s stabiliziranim vzorcem in svežim vzorcem) sem pripravila osnovni standard ter naredila raztopine z ustrezno koncentracijo. Shema priprave raztopin za umeritveno krivuljo je prikazana v tabeli 2.

Posamezne raztopine z ustrezno koncentracijo sem nato prenesla v vialo (slika 7) in jih dala v HPLC instrument na katerem sem opravljala meritve (sliki 5 in 6).

Tabela 2: Shema priprave raztopin za umeritveno krivuljo

Začetna koncentracija C_1 (mgL^{-1})	Vzet volumen osnovnega standarda (mL)	Končni volumen V_2 (mL)	Končna koncentracija C_2 (mgL^{-1})
20	5	50	2
20	10	50	4
20	15	50	6
20	20	50	8
20	25	50	10
20	30	50	12
20	35	50	14
20	40	50	16
20	45	50	18
20	50	50	20



Slika 7: Priprava vial z raztopinami z ultra čisto vodo za meritve s HPLC instrumentom

3.4.3 Priprava umetno pripravljene izcedne vode

Po pregledani literaturi sem ugotovila, da so v Sloveniji odpadne snovi v izcedni vodi v precej nižjih koncentracijah kot v izcednih vodah po svetu. Tako sem se odločila, da bom pripravila umetni vzorec po izmerjenih kemijskih parametrih izcedne vode iz starega dela deponije Barje. Kemijske parametre sem povzela po literaturi (Urh, 2007).

Tako sem koncentracije preračunala na določen volumen in pripravila raztopine.

Za pripravo umetnega vzorca sem uporabila spojine, navedene v tabeli 3.

Tabela 3: Priprava umetno pripravljene izcedne vode

Specija oz. parameter	Spojina	Masa dodane spojine (g na 500 mL)	C (mgL^{-1}) Koncentracija stabilizirane vode iz Deponije Barje
Cl^-	NaCl	0,4115	500
$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,0461	6,4
$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$	0,1075	31,0
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	1,9270	350
Anorganski ogljik (IC)	CaCO_3	1,7975	431
KPK	$\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$	0,2083	490

3.4.4 Priprava raztopin s standardnim dodatkom BPA za izbrane matrikse

Raztopine s standardnim dodatkom BPA v izbranih matriksih (podtalnica, sveža izcedna voda, stabilizirana izcedna voda, umetno pripravljena izcedna voda) sem pripravila na enak način kot za umeritveno krivuljo v ultra čisti vodi, le da sem namesto ultra čiste vode uporabila izbran matriks. Pri pripravi koncentracije s končno koncentracijo 20 mgL^{-1} , sem za pripravo vzorca v vzeti volumen osnovnega standarda dodala še matriks podtalne vode, umetno pripravljenega vzorca, stabiliziranega vzorca in svežega vzorca, odvisno katere raztopine sem pripravljala.

3.4.4.1 Priprava raztopin s standardnim dodatkom BPA podtalnica

Za pripravo vzorcev sem vzela vodo iz pipe (saj se voda na Kemijskem inštitutu črpa iz podtalnice). V 50 mL bučah sem pripravila raztopine BPA z naslednjimi koncentracijami: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 in 20 mgL^{-1} .

3.4.4.2 Priprava raztopin s standardnim dodatkom BPA v stabilizirani izcedni vodi z deponije Barje

Za pripravo sem vzela stabiliziran vzorec izcedne vode z deponije Barje (odvzet 20.02.2009), ki je bil shranjen v zamrzovalniku laboratorija na Kemijskem inštitutu. Stabilizirana izcedna voda je bila 5 krat redčena, in sicer sem v 500 mL bučo odpipetirala 100 mL stabilizirane izcedne vode in dodala 400 mL ultra čiste vode. Nato sem pripravila raztopine z različnimi koncentracijami BPA v 50 mL bučah (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 in 20 mgL^{-1}).

3.4.4.3 Priprava raztopin s standardnim dodatkom BPA v sveži izcedni vodi z deponije Barje

Za pripravo sem vzela svež vzorec izcedne vode z deponije Barje (odvzet 07.07.2011). Vzorec je bil 5 krat redčen, in sicer sem v 500 mL bučo odpipetirala 100 mL stabilizirane izcedne vode in ga prefiltrirala ter dodala 400 mL ultra čiste vode. Nato sem pripravila raztopine z različnimi koncentracijami BPA v 50 mL bučah (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 in 20 mgL^{-1}), kar prikazuje slika 8.

3.4.4.4 Priprava raztopin s standardnim dodatkom BPA - umetno pripravljena izcedna voda

Za pripravo umetno pripravljene izcedne vode sem v 500 ml bučo zatehtala spojine iz tabele 3 in jim do oznake dodala ultra čisto vodo. Nato sem v 50 mL buče pripravila raztopine z naslednjimi koncentracijami BPA: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 in 20 mgL^{-1} .



Slika 8: Priprava raztopin svežega vzorca z deponije s koncentracijo BPA 10 mgL^{-1}

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za validacijske parametre sem določala delovno in linearno območje, mejo detekcije in mejo kvantifikacije, selektivnost, merilno natančnost, točnost in robusnost. Rezultati, do katerih sem prišla tekom laboratorijskega dela, so prikazani v naslednjih podpoglavjih.

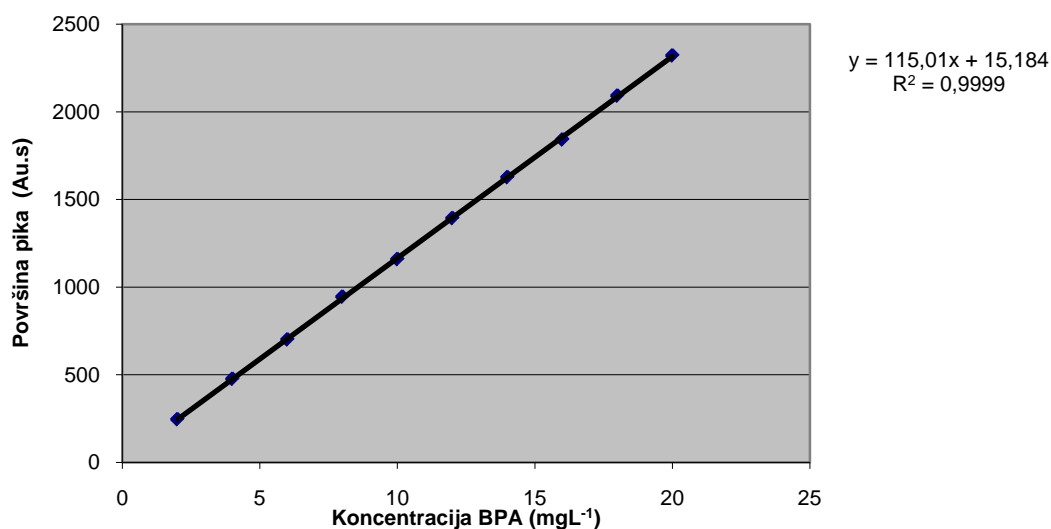
4.1 Delovno in linearno območje

Za določitev delovnega in linearnega območja sem pripravila standardne raztopine za kalibracijsko krivuljo za BPA. Delovno območje sem izbrala glede na kriterij, da bo razvita analitska metoda ustrezna za sledenje čiščenja izcednih vod z deponij z naprednimi oksidacijskimi postopki.

Za izris umeritvene krivulje sem uporabila površine kromatografskih vrhov raztopin BPA s koncentracijami 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 in 20 mgL⁻¹. Meritve sem izvajala v šestih paralelnih določitvah. Povprečna površina vrhov pri različnih koncentracijah je podana v tabeli 4. Grafični prikaz je podan na sliki 9.

Tabela 4: Povprečna površina kromatografskih vrhov različnih vzorcev s koncentracijami BPA od 2 do 20 mgL⁻¹

Koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	Povprečna površina kromatografskega vrha (AU.s)
2	246
4	476
6	702
8	946
10	1160
12	1395
14	1626
16	1846
18	2091
20	2318



Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje BPA

Koncentracijo BPA izračunamo po enačbi:

$$C_{BPA} = \frac{A - 15,184}{115,01} \quad (5)$$

kjer je:

C_{BPA} ... koncentracija bisfenola A (mgL⁻¹)

A ... površina kromatografskega vrha pri merjenju vzorca

S pripravo kalibracijske krivulje sem dokazala, da je metoda linearna, saj je korelacijski faktor znašal 0,9999 in s tem je ustrezal zahtevi $R^2 \geq 0,99$. Delovno območje BPA je v območju koncentracije od 2 do 20 mgL⁻¹ BPA, kar ustreza zahtevi, povezani z namenom uporabe metode (sledenje učinkovitosti čiščenja izcedne vode z naprednimi oksidacijskimi postopki).

4.2 Meja detekcije in meja kvantifikacije

Glede na zahteve za uporabo analitskega postopka sem pri določitvi delovnega in linearnega območja vzela koncentracije BPA od 2 do 20 mgL⁻¹. Meja kvantifikacije mora biti nižja od najnižje točke umeritvene krivulje.

Mejo detekcije in kvantifikacije sem določila na osnovi razmerja med signalom in šumom, ki za mejo detekcije znaša več kot 3, za mejo kvantifikacije pa več kot 10. Šum na aparaturi je tista površina, ki jo programska oprema še zazna kot nihanje bazne linije (nastavitev za šum je bila 1 AU.s). Pripravila sem raztopine s koncentracijami BPA med 0,03125 mgL⁻¹ in 2 mgL⁻¹ (tabela 5 in slika 10). Z napravo sem lahko določila koncentracijo 0,125 mgL⁻¹, pri nižjih koncentracijah pa sem dobila dva kromatografska

vrhova, ki ju nisem mogla ločiti. Pri tej koncentraciji je razmerje med signalom in šumom 35, kar ustreza predpisanemu kriteriju ($S/N > 10$).

Eksperimentalno določena meja kvantifikacije naše metode je $0,125 \text{ mgL}^{-1}$, kar je nižje kot najnižja točka umeritvene krivulje ($2\text{--}20 \text{ mgL}^{-1}$).

Tabela 5: Določitev meje detekcije in meje kvantifikacije

$C_{\text{BPA}} \text{ (mgL}^{-1}\text{)}$	Površina vrha (AU.s)
0,03125	89
0,06250	91
0,12500	35
0,25000	54
0,50000	87
1,0000	148
2,0000	269



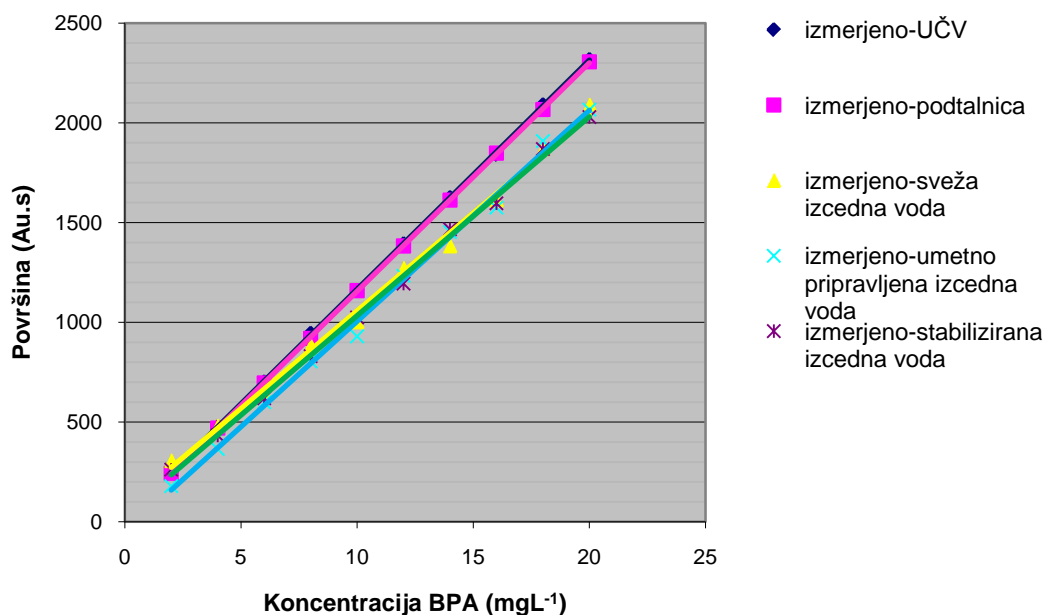
Slika 10: Priprava raztopin za določitev meje detekcije in meje kvantifikacije

4.3 Selektivnost

Selektivnost metode nam pove, ali lahko kvantitativno določimo koncentracijo analita v izbranem matriksu vzorca (npr. podtalnica, izcedna voda iz deponije, ...). Pri določanju selektivnosti ugotavljamo, ali so v analiziranih vzorcih prisotne snovi, ki motijo določitev (interference). Selektivnost sem ugotavljala tako, da sem primerjala naklone kalibracijskih krivulj, dobljenih z analizo vzorcev, pripravljenih v ultra čisti vodi in v izbranih relevantnih matriksih (podtalnica, sveža izcedna voda z deponije, stabilizirana izcedna voda z deponije). Rezultati so prikazani v tabeli 6 in na sliki 11.

Tabela 6: Naklon kalibracijske krivulje, odsek na ordinati in R^2 za kalibracijske krivulje BPA, pripravljene v različnih matriksih vod

	Naklon kalibracijske krivulje	Odsek na ordinati	R^2
Ultra čista voda	114,94	15,724	0,9999
Podtalnica	114,57	9,911	1,0000
Sveža izcedna voda	98,081	76,578	0,9954
Umetno pripravljena izcedna voda	105,83	-53,122	0,9960
Stabilizirana izcedna voda	99,738	35,367	0,9981



Slika 11: Kalibracijske krivulje BPA, pripravljene v izbranih matriksih vod (simboli: izmerjeno; črte: regresijska premica)

Iz rezultatov je razvidno, da je metoda selektivna za določanje BPA v podtalnici, saj se naklona kalibracijskih premic ne razlikujeta.

Nakloni kalibracijskih premic, pripravljenih iz raztopin standarda BPA v sveži izcedni vodi, stabilizirani izcedni vodi ter umetno pripravljene izcedni vodi se razlikujejo od naklona kalibracijske premice, pripravljene z raztopinami standarda v ultra čisti vodi. Torej so v vzorcih izcednih vod prisotne snovi, ki motijo določitev – metoda ni selektivna.

Če želimo izvajati analizo z zadovoljivo točnostjo, moramo izdelati kalibracijsko krivuljo z raztopinami standarda v ustreznem matriksu.

4.4 Merilna natančnost

Določila sem ponovljivost (natančnost, dobljena pri ponovljivih pogojih) in obnovljivost metode (natančnost, dobljena iz rezultatov pri obnovljivih pogojih v daljšem časovnem obdobju – ista metoda, isti vzorec, drug analitik, daljši čas med merjenji, različna oprema).

4.4.1 Ponovljivost

Ponovljivost sem merila pri vseh pripravljenih vzorcih (z ultra čisto vodo, podtalnico, umetno pripravljeno izcedno vodo, svežo in stabilizirano izcedno vodo). Vsakemu vzorcu in koncentraciji sem pripravila po 6 paralelk in iz dobljenih rezultatov izračunala povprečno vrednost vseh paralelk, razlike med ponovitvami in relativni standardni odklik vseh teh meritev. Nato sem preverila, ali je sipanje rezultatov v okviru 15 %. Rezultati meritev so prikazani v tabelah 7-11.

Tabela 7: Ponovljivost za ultra čisto vodo

Konc. BPA (mgL ⁻¹)	Ultra čista voda		
	povprečje (Au.s)	st. odmik (Au.s)	RSD (%)
2	246	1,5	0,6
4	476	2,9	0,6
6	702	6,0	0,8
8	946	5,3	0,6
10	1160	3,3	0,3
12	1395	5,5	0,4
14	1626	5,2	0,3
16	1846	5,2	0,8
18	2091	2,7	0,1
20	2318	9,2	0,4

Tabela 8: Ponovljivost za podtalnico

Konc. BPA (mgL ⁻¹)	Podtalnica		
	povprečje (Au.s)	st. odmik (Au.s)	RSD (%)
2	243	1,3	0,5
4	470	1,0	0,2
6	696	1,3	0,2
8	919	1,6	0,2
10	1159	3,7	0,3
12	1383	5,4	0,4
14	1613	3,6	0,2
16	1848	5,4	0,3
18	2067	2,1	0,1
20	2306	1,9	0,1

Tabela 9: Ponovljivost za umetno pripravljeno izcedno vodo

Konc. BPA (mgL ⁻¹)	Umetno pripravljena izcedna voda		
	povprečje (Au.s)	st. odmik (Au.s)	RSD (%)
2	179	4,2	2,3
4	365	1,3	0,4
6	599	0,7	0,1
8	804	1,4	0,2
10	929	2,8	0,3
12	1233	1,5	0,1
14	1452	4,7	0,3
16	1575	3,5	0,2
18	1908	2,6	0,1
20	2066	2,7	0,1

Tabela 10: Ponovljivost za stabilizirano izcedno vodo

Konc. BPA (mgL ⁻¹)	Stabilizirana izcedna voda		
	povprečje (Au.s)	st. odmik (Au.s)	RSD (%)
2	262	1,3	0,5
4	433	1,4	0,3
6	620	3,4	0,6
8	831	1,0	0,1
10	1025	1,0	0,1
12	1194	1,4	0,1
14	1467	1,0	0,1
16	1597	1,9	0,1
18	1868	3,3	0,2
20	2030	3,1	0,2

Tabela 11: Ponovljivost za svežo izcedno vodo

Konc. BPA (mgL ⁻¹)	Sveža izcedna voda		
	povprečje (Au.s)	st. odmik (Au.s)	RSD (%)
2	307	4,88	1,59
4	482	3,56	0,74
6	647	2,19	0,34
8	886	0,71	0,08
10	1003	1,48	0,15
12	1272	0,45	0,04
14	1384	1,14	0,08
16	1613	1,48	0,09
18	1871	1,10	0,06
20	2091	1,79	0,09

Povprečna ponovljivost pri določanju BPA v izbranih matriksih vod in na različnih koncentracijskih nivojih BPA znaša 0,34 %.

4.4.2 Obnovljivost

Obnovljivost sem določala vzorcem, ki so bili pripravljene z ultra čisto vodo in so imeli koncentracijo BPA 6, 10 in 14 mgL⁻¹. Vzorcem sem merila kromatografske vrhove skozi daljše časovno obdobje. Iz dobljenih rezultatov sem izračunala povprečno vrednost, standardni odmik ter preverila, ali je sipanje rezultatov manjše ali enako 15 %. V tabeli 12 lahko vidimo rezultate za obnovljivost.

Tabela 12: Statistični parametri za določitev obnovljivosti

Vzorec	Povprečje pikov (Au.s)	Št. ponovitev	Standardni odmik (Au.s)	Standardni odmik v %
BPA 6 mgL ⁻¹	735	132	1,9	0,27
BPA 10 mgL ⁻¹	1213	154	4,1	0,36
BPA 14 mgL ⁻¹	1666	132	5,1	0,31

Iz rezultatov je razvidno, da povprečna obnovljivost znaša 0,31 %.

4.5 Točnost

Točnost analizne metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analizne metode dobimo pravilen rezultat. Merilo za točnost je določitev izkoristka (R). Izkoristek sem določila tako, da sem v izbrane matrikse dodala znano količino analita ter dodatek primerjala z izmerjeno vrednostjo, izračunano iz kalibracijske krivulje.

$$R(\%) = \frac{C_{\text{izmerjeno}} - C_{\text{vzorec}}}{C_{\text{dodano}}} \times 100 \quad (6)$$

kjer je:

$C_{\text{izmerjeno}}$... koncentracija BPA v vzorcu s standardnim dodatkom (mgL⁻¹)

C_{vzorec} ... koncentracija BPA v vzorcu

C_{dodano} ... koncentracija dodanega BPA

V tabeli 13 so prikazani rezultati izkoristka metode pri določanju BPA v podtalnici in v izcednih vodah z deponije (sveža izcedna voda, stabilizirana izcedna voda, umetno pripravljena izcedna voda), kjer je bila za izračun uporabljena kalibracijska krivulja iz raztopin standarda BPA v ultra čisti vodi.

$$C_{BPA} = \frac{A - 15,184}{115,01} \quad (7)$$

kjer je:

C_{BPA} ... koncentracija bisfenola A (mgL⁻¹)

A ... površina kromatografskega pika pri merjenju vzorca

Iz tabele 13 je razvidno, da je bil pri analizi podtalnice izkoristek 99,1 %, pri analizi izcednih vod pa so bile vrednosti nižje (94 % pri sveži izcedni vodi, 90 % pri stabilizirani izcedni vodi in 85 % pri umetno pripravljene izcedni vodi).

Da bi izboljšala točnost, sem izdelala kalibracijsko krivuljo, pripravljeno z raztopinami standarda v realnem vzorcu (umetno pripravljena izcedna voda).

$$C_{BPA-kor} = \frac{A + 53,122}{105,83} \quad (8)$$

kjer je:

$C_{BPA-kor}$... koncentracija bisfenola A, izračunana na osnovi kalibracijske krivulje z realnim matriksom (mgL^{-1})

A ... površina kromatografskega pika pri merjenju vzorca

Tabela 13: Izkoristek (R) pri določanju BPA v površinski vodi in izcednih vodah z deponije (kalibracija z raztopinami standarda, pripravljenimi v ultra čisti vodi)

Dodana koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	Podtalnica		Sveža izcedna voda		Stabilizirana izcedna voda		Simulirana izcedna voda	
	Izmerjena koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	R (%)	Izmerjena koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	R (%)	Izmerjena koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	R (%)	Izmerjena koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	R (%)
2	1,98	98,9	2,54	120,3	2,15	107,3	1,42	71,1
4	3,95	98,9	4,06	99,2	3,12	78,1	3,04	75,9
6	5,92	98,6	5,49	90,2	5,26	87,6	5,08	84,6
8	7,86	98,2	7,58	93,9	7,09	88,6	6,86	85,7
10	9,94	99,4	8,59	85,4	8,78	87,8	7,95	79,5
12	11,89	99,1	10,92	90,7	10,25	85,4	10,59	88,2
14	13,90	99,3	11,90	84,8	12,62	90,1	12,49	89,2
16	15,94	99,6	13,89	86,7	13,75	85,9	13,56	84,8
18	17,83	99,1	16,14	89,6	16,11	89,5	16,46	91,4
20	19,91	99,6	19,91	99,6	19,93	99,6	19,93	99,6
Povprečna vrednost R		99,1		94,0		90,0		85,0

V tabeli 14 so prikazani rezultati izkoristka metode pri določanju BPA v izcednih vodah z deponije (sveža izcedna voda, stabilizirana izcedna voda, umetno pripravljena izcedna voda), kjer je bila za izračun uporabljena kalibracijska krivulja iz raztopin standarda BPA v umetno pripravljene izcedni vodi. Iz tabele je razvidno, da je bil pri analizi umetno pripravljene izcedne vode izkoristek 101,8 %, pri sveži izcedni vodi 101,7 % in pri stabilizirani izcedni vodi 102,9 %.

Ugotovila sem, da je metoda za določanje BPA točna, če za izračun rezultatov uporabim kalibracijsko krivuljo, pripravljeno z raztopinami standarda v ustreznem matriksu (v mojem primeru je bila to umetno pripravljena izcedna voda).

Tabela 14: Izkoristek (R) pri določanju BPA v izcednih vodah iz deponije (kalibracija z raztopinami standarda, pripravljenimi v matriksu - umetno pripravljene izcedni vodi)

Dodana koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	Umetna izcedna voda		Sveža izcedna voda		Stabilizirana izcedna voda	
	Izmerjena koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	R (%)	Izmerjena koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	R (%)	Izmerjena koncentracija BPA (mgL ⁻¹)	R (%)
2	2,19	109,3	2,1	99,6	2,1	105
4	3,94	98,6	4,04	98,5	4,04	100,9
6	6,16	102,7	6,36	104,5	6,36	106
8	8,1	101,2	8,35	103,5	8,35	104,4
10	9,28	92,8	10,19	101,3	10,19	101,9
12	12,16	101,3	11,79	97,9	11,79	98,3
14	14,23	101,7	14,37	102,4	14,37	102,6
16	15,4	96,2	15,6	97,3	15,6	97,5
18	18,55	103	18,17	100,9	18,17	100,9
20	22,32	111,6	22,32	111,6	22,32	111,6
Povprečna vrednost R		101,8		101,7		102,9

4.5.1 Motnje

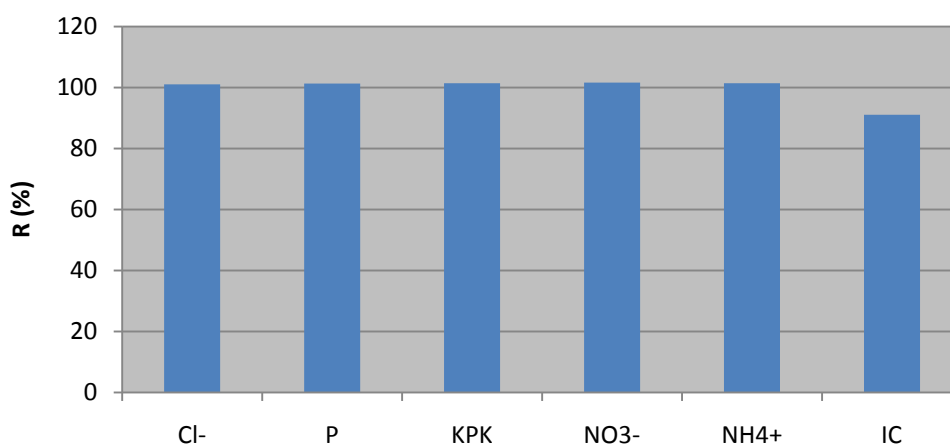
Ugotavljala sem, kako prisotnost neke spojine vpliva na določitev koncentracije BPA v izcedni vodi. Zato sem preverila vsako spojino posebej in določala vpliv motenj v umetno pripravljene izcedni vodi (tabela 15).

Tabela 15: Priprava raztopin za določitev motenj pri določanju koncentracije BPA

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5	Vzorec 6
BPA	10 mgL ⁻¹	10 mgL ⁻¹	10 mgL ⁻¹	10 mgL ⁻¹	10 mgL ⁻¹	10 mgL ⁻¹
Klorid	500 mgL ⁻¹	-	-	-	-	-
Celotni fosfor	-	6,4 mgL ⁻¹	-	-	-	-
KPK	-	-	490 mgL ⁻¹	-	-	-
Nitratni dušik	-	-	-	31 mgL ⁻¹	-	-
Amonijev dušik	-	-	-	-	350 mgL ⁻¹	-
Anorganski ogljik	-	-	-	-	-	431 mgL ⁻¹

Za vsakega od vzorcev umetno pripravljene izcedne vode sem izračunala izkoristek (R). Rezultati so prikazani na sliki 12, kjer vidimo, da prisotni kloridni ioni, fosfor v različnih oblikah, organske snovi (KPK) ter nitratni in amonijev dušik ne vplivajo na določitev koncentracije BPA, saj so bili izkoristki za klorid 101 %, celotni fosfor 101 %, KPK 101 %, nitratni dušik 101 % in amonijev dušik 102 %.

Pri vzorcu 6, kjer je bil kot motnja dodan anorganski ogljik v karbonatni obliki, pa je bil izkoristek 91%.



Slika 12: Graf vpliva motenj na merjene koncentracije BPA v umetno pripravljene izcedni vodi

4.6 Robustnost

Ugotavljala sem vpliv temperature na stabilnost raztopine standarda BPA. Pripravila sem vzorce z koncentracijo 10 mgL^{-1} BPA v ultra čisti vodi. Opravila sem meritve sveže pripravljenega vzorca in na vzorcu, staranemu 24 in 48 ur. Pri meritvah za robustnost sem za spremenljivko vzela temperaturo in čas. Tako sem starala vzorce v hladilniku na 4°C in pri sobni temperaturi (25°C) v časovnem obdobju 24 in 48 ur. Rezultati so prikazani v tabeli 16.

Tabela 16: Prikaz površine kromatografskih vrhov pri vzorcih, z različnimi spremenljivkami

	48h	48h	24h	24h	sveži
	4°C	25°C	4°C	25°C	
	1151	1165	1170	1170	1150
	1154	1160	1170	1167	1150
	1147	1165	1172	1168	1150
	1154	1162	1173	1167	1146
Povprečje (AU.s)	1151,5	1163	1171,25	1168	1149
st. odmik	3,3	2,4	1,5	1,4	2,0

Dokazala sem, da so vzorci stabilni, saj se koncentracije BPA oz. izmerjene površine kromatografskih vrhov pri vzorcih, ki so se starali v hladilniku in tistih, ki so se starali pri sobni temperaturi, niso bistveno razlikovale, saj so bili njihovi standardni odmiki majhni. To pomeni, da če vzamemo za spremenljivki temperaturo in čas, ti ne bosta vplivali na naše vzorce.

4.7 Merjenje BPA v realnih vzorcih

Po pregledani literaturi sem ugotovila, da so koncentracije BPA v izcednih vodah po svetu mnogo višje kot v Sloveniji. V vzorcih izcedne vode z deponije Barje sem izmerila koncentracijo BPA. Rezultati so podani v tabeli 17.

Tabela 17: Koncentracija BPA v vzorcih izcedne vode z deponije Barje

	BPA (mgL⁻¹)
Sveža izcedna voda z deponije Barje	3,2
Stabilizirana izcedna voda z deponije Barje	< 2

5 ZAKLJUČEK

Z razvito metodo (tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti - HPLC) sem določala koncentracijo bisfenola A (BPA) v vzorcih podtalnice in izcednih vod z deponije (sveža izcedna voda, stabilizirana izcedna voda, umetno pripravljena izcedna voda).

V okviru validacije sem preverjala naslednje validacijske parametre: delovno in linearno območje, mejo detekcije in mejo kvantifikacije, selektivnost/specifičnost, točnost, natančnost (ponovljivost in obnovljivost) ter robustnost – stabilnost raztopin. Za vse preverjene validacijske parametre sem ugotovila, da zadovoljivo izpolnjujejo zahteve validacije.

Delovno območje sem izbrala glede na kriterij, da bo razvita analitska metoda ustrezna za sledenje čiščenja izcednih vod z naprednimi oksidacijskimi postopki (območje 2–20 mgL⁻¹). V tem območju je korelacijski koeficient R² znašal 0,9999.

Mejo detekcije in kvantifikacije sem določila na osnovi razmerja med signalom in šumom, ki za mejo detekcije znaša več kot 3, za mejo kvantifikacije pa več kot 10. Z uporabljenim HPLC instrumentom sem lahko določila koncentracijo 0,125 mgL⁻¹, pri nižjih koncentracijah pa sem dobila dva kromatografska vrhova, katera nisem mogla ločiti. Pri tej koncentraciji je razmerje med signalom in šumom 35, kar ustreza predpisanemu kriteriju za mejo kvantifikacije (S/N>10). Meja kvantifikacije metode je torej 0,125 mgL⁻¹, kar je nižja vrednost od najnižje točke kalibracijske krivulje (2 mgL⁻¹).

Selektivnost sem ugotavljala tako, da sem primerjala naklone kalibracijskih krivulj, pripravljenih v ultra čisti vodi in v izbranih relevantnih matriksih (podtalnica, sveža izcedna voda z deponije, stabilizirana izcedna voda z deponije). Rezultati so pokazali, da je metoda selektivna za določanje BPA v ultra čisti vodi in v podtalnici. Naklone kalibracijskih premic, pripravljenih iz raztopin standarda BPA v sveži izcedni vodi, stabilizirani izcedni vodi ter umetno pripravljene izcedni vodi, so se razlikovali od naklona kalibracijske premice, pripravljene z raztopinami standarda v ultra čisti vodi. V vzorcih izcednih vod so prisotne snovi, ki motijo določitev – metoda ni selektivna. Če želimo izvajati analizo z zadovoljivo točnostjo, moramo izdelati kalibracijsko krivuljo z raztopinami standarda v ustreznem matriksu (umetno pripravljena izcedna voda).

Ponovljivost sem določila z meritvijo koncentracij realnih vzorcev izcednih vod v šestih paralelkah. Povprečna ponovljivost je znašala 0,34 %. Obnovljivost sem določila z meritvijo vzorcev raztopin standarda skozi daljše časovno obdobje. Iz dobljenih rezultatov sem ugotovila, da sipanje znaša 0,31 %.

Točnost analizne metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analizne metode dobimo pravilen rezultat. Merilo za točnost je določitev izkoristka (R). Ugotovila sem, da je pri analizi podtalnice izkoristek znašal 99,1 %, pri analizi izcednih vod pa so bile vrednosti nižje (94 % pri sveži izcedni vodi, 90 % pri stabilizirani izcedni vodi in 85% pri umetno pripravljene izcedni vodi). Da bi izboljšala točnost, sem izdelala kalibracijsko krivuljo, pripravljeno z raztopinami standarda v realnem vzorcu (umetno pripravljen izcedna voda). Pri analizi umetno pripravljene izcedne vode je bil izkoristek 101,8 %, pri sveži izcedni vodi 101,7 % in pri stabilizirani izcedni vodi 102,9 %.

Ugotovila sem, da je metoda za določanje BPA točna, če za izračun rezultatov uporabim kalibracijsko premico, pripravljeno z raztopinami standarda v ustreznem matriksu (v mojem primeru je bila to umetno pripravljena izcedna voda).

Ugotavljala sem, katere snovi v izcedni vodi motijo določitev vsebnosti BPA s HPLC napravo. Pripravila sem umetno pripravljeno izcedno vodo in preverila vpliv vsake spojine posebej. Ugotovila sem, da na izkoristek (R) vpliva vsebnost anorganskega ogljika v vodi, saj je bil v tem primeru izkoristek R najnižji.

Pri testiranju robustnosti sem dokazovala stabilnost raztopin standarda pri različnih pogojih (temperatura, čas). Dokazala sem, da je metoda stabilna, saj se koncentracije BPA oz. izmerjene površine kromatografskih vrhov pri vzorcih raztopin standarda, ki so se starali v hladilniku in tistih, ki so se starali pri sobni temperaturi, niso bistveno razlikovale. To pomeni, da so vzorci stabilni pri sobni temperaturi do 48 ur.

Na osnovi eksperimentalno določenih validacijskih parametrov povzemam, da je HPLC metoda primerna za določanje koncentracije bisfenola A v podtalnici in izcednih vodah z deponij v koncentracijskem območju 2–20 mgL⁻¹.

6 VIRI

Asakura H., Matsuto T. 2009. Experimental study of behaviour of endocrine-disrupting chemicals in leachate treatment process and evaluation of removal efficiency. *Waste management*, 29: 1852-1859.

Ballesteros-Gomez A., Rubio S., Perez-Bendino D. 2009. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A*, 1216: 449-469.

Bistan M., Tišler T., Pintar A. 2011. Efficiency of photolytic/photocatalytic and catalytic wet air oxidation processes: study of BPA conversion, ecotoxicology and estrogenicity. *Slovenian-Italian conference on materials and technologies for sustainable growth, University of Nova Gorica, 4.-6.5.2011.*

Comsol: Simulation Addresses Band-Broadening in HPLC Systems (12.08.2011). http://www.comsol.com/stories/waters_corp_hplc_systems/full/

Coors A., Jones P.D., Giesy J.P., Ratte H.T. 2003. Removal of estrogenic activity from municipal waste landfill leachate assessed with a bioassay based on reporter gene expression. *Environmental science and technology*, 37/15: 3430-3434.

Čop A. 1994. Mesto validirane analizne metode v procesu pridobitve kakovostnega izdelka. *Validacija v proizvodnji zdravil. Zbornik referatov 6. Posvetovanja farmacevtskih tehnologov.* Ljubljana. Slovensko farmacevtsko društvo: 97-109.

Drovc A., Pintar A. 2011. Measurement uncertainty evaluation and in-house method validation of the herbicide iodosulfuron-methyl-sodium in water samples by using HPLC analysis. *Accreditation and Quality Assurance*, 16/1: 21-29.

Filho, I.N., von Muhlen C., Schosler P., Caramao E.B. 2003. Identification of some plasticizers compounds in landfill leachate. *Chemosphere*, 50: 657-663.

Fromme H., Kucher T., Otto T., Pilz K., Muller J., Wenzel A. 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water research*, 36: 1429-1438.

Fujishima A., Zhang X., Tryk D. A. 2008. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Report*, 63: 515-582.

Hayashi Y., Matsuda R., Haishima Y., Yagami T., Nakamura A. 2002. Validation of HPLC and GC-MS systems for bisphenol-A leached from hemodialyzers on the basis of FUMI theory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28: 421-429.

Huang Y.Q., Wong C.K.C., Zheng J.S., Bouwman H., Barra R., Wahlström B., Neretin L., Wong M.H. 2011. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*. (Članek v tisku).

Li Y., Low G. K.-C., Scott J.A., Amal R. 2010. Arsenic speciation in municipal landfill leachate. *Chemosphere*, 79: 794-801.

Li X., Lin L., Luan T., Yang L., Lan C. 2008. Effects of landfill leachate effluent and bisphenol A on glutathione and glutathione-related enzymes in the gills and digestive glands of the freshwater snail *Bellamya purificata*. *Chemosphere*, 70: 1903-1909.

Liu W., Zhang H., Cao B., Lin K., Gan J. 2011. Oxidative removal of bisphenol A using zero valent aluminum – acid system. *Water research*, 45: 1872-1878.

Lu F., Chang C.-H., Lee D.-J., He P.-J., Shao L.-M., Su, A. 2008. Dissolved organic matter and estrogenic potential of landfill leachate. *Chemosphere*, 72: 1381-1386.

Mestna občina Ljubljana: Otvoritev nove čistilne naprave za izcedne vode (13.08.2011).

<http://www.ljubljana.si/si/mol/dogodki/68573/detail.html>

Miller J.C. 2008. Statistics for analytical chemistry. 2. Izdaja: 18-20.

Mohapatra D.P., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. 2010. Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge – Fate of bisphenol A. *Chemosphere*, 78: 923-941.

Pingqing F., Kawamura K. 2010. Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environmental Pollution*, 158: 3138-3143.

Rodriguez-Mozaz S., Lopez de Alda M., Barcelo D. 2005. Analysis of bisphenol A in natural waters by means of an optical immunosensor. *Water Research*, 39: 5071-5079 .

Rykowska I., Wasiak W. 2006. Properties, threats, and methods of analysis of Bisphenol A and its derivatives. *Acta chromatographia*, No.16.

Rubin BS., Soto AM. 2009 Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304: 55-62.

Saiyood S., Vangnai A.S., Thiravetyan P., Inthorn D. 2010. Bisphenol A removal by the *Dracaena* plant and the role of plant-associated bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 178: 777-785.

Staples C.A, Dom P.B., Klecka G.M., O'Bloock S.T., Harris L.R. 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36: 2149-2173.

Statistični testi. 1998. Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje Ljubljana.

Tatsi A.A., Zouboulis A.I., Matis K.A., Samaras P. 2003. Coagulation-flocculation pretreatment of sanitary landfill leachates. *Chemosphere*, 53: 737-744.

The fitness for purpose of analytical methods. 1998. A laboratory guide to method validation and related topics. Velika Britanija.

Tišler T., Bistan M., Pintar A. 2010. Odstranjevanje hormonskih motilcev z naprednimi oksidacijskimi procesi: kemijska in biološka karakterizacija vod. Vodni dnevi 2010.

Tsai W.T., Ali C.W., Su T.Y. 2006. Adsorption of bisphenol – A from aqueous solution onto minerals and carbon adsorbents. *Journal of Hazardous Materials, B134 (2006); 169-175.*

Urase T., Miyashita K. 2003. Factors affecting the concentration of bisphenol A in leachates from solid waste disposal sites and its fate in treatment processes. *Mater Cycles Waste Manag, 5: 77-82.*

Urh Ž., Ozonacija izcedne komunalne vode, diplomsko delo, 2007. str. 46

Watabe Y., Kondo T. 2004. Determination of bisphenol A in environmental water at ultra-low level by high-performance liquid chromatography with an effective on-line pretreatment device. *Journal of Chromatography A, 1032: 45-49.*

Yamamoto T., Yasuhara A., Shiraishi H., Nakasugi O. 2001. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachate. *Chemosphere, 42: 415-418.*

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana: samozaložba.