



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Kamila Wilczewska
Dyscyplina naukowa: Chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Oznaczanie bisfenolu A w próbkach biologicznych i ocena stopnia narażenia człowieka na ten związek

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Determination of bisphenol A in biological samples and assessment of human exposure to this compound

Promotor:

dr hab. inż. Andrzej Wasik, prof. nadzw. PG

Gdańsk, 2016

Składam serdeczne podziękowania:

Panu dr hab. inż. Andrzejowi Wasikowi, prof. nadzw. PG za opiekę merytoryczną, przekazaną mi wiedzę, konstruktywną krytykę, wsparcie i wszechstronną pomoc podczas wykonywania badań i redagowania pracy doktorskiej.

Pani prof. dr hab. inż. Agacie Kot-Wasik za przekazaną wiedzę, życzliwość, poświęcony czas oraz cenne uwagi w trakcie redagowania niniejszej pracy doktorskiej.

Panu prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi za życzliwą pomoc oraz za zaufanie i cierpliwość, a także za mobilizację do pracy.

Pracownikom i Doktorantom z Katedry Chemii Analitycznej, w szczególności z pokoju 011 za stworzenie przyjaznej i motywującej atmosfery w pracy.

Najbliższym za wsparcie, dobre słowo i wiarę we mnie.

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	5
WPROWADZENIE.....	8
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	9
1. Charakterystyka bisfenolu A	9
2. Zastosowania bisfenolu A.....	10
3. Bisfenol A jako związek zaburzający gospodarkę hormonalną	12
4. Zespół policystycznych jajników.....	18
5. Źródła narażenia zdrowia człowieka na bisfenol A.....	19
6. Techniki izolacji i wzbogacania bisfenolu A.....	25
6.1. Technika SPE	27
6.2. Technika LLE.....	29
6.3. Technika FPSE.....	29
7. Techniki analityczne wykorzystywane do oznaczania bisfenolu A	31
8. Problemy związane z oznaczaniem bisfenolu A.....	42
II. CEL I ZAKRES PRACY	43
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	44
1. Odczynniki i wzorce	44
2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	44
3. Opracowanie metodyki oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS	46
3.1. Dobór optymalnych warunków pracy tandemowego spektrometru mas MS/MS	46
3.2. Dobór optymalnych warunków analizy chromatograficznej	50
3.3. Przygotowanie roztworów wzorcowych oraz roztworów kalibracyjnych	52
3.4. Opracowanie procedury ekstrakcji bisfenolu A z próbek surowicy ludzkiej.....	52
3.4.1. Ekstrakcja za pomocą techniki SPE.....	53
3.4.2. Ekstrakcja za pomocą techniki ciecz-ciecz.....	54
3.4.3. Porównanie opracowanych metodyk izolacji bisfenolu A z próbek surowicy. ..	55
3.5. Kalibracja układu HPLC-MS/MS do oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy	56
3.6. Analiza próbek rzeczywistych	57
3.6.1. Projekt „PCOS”	58
3.6.2. Projekt „DIETA”	61
4. Oznaczanie tła systemu za pomocą techniki HPLC-MS/MS	64
4.1. Warunki pracy HPLC-MS/MS do oznaczania tła systemu	65
4.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych	66
4.3. Tło systemu HPLC-MS/MS w warunkach elucji gradientowej i izokratycznej	66
4.4. Wpływ tła systemu HPLC-MS/MS na wyniki oznaczeń.....	68
5. Oznaczanie całkowitej zawartości bisfenolu A w próbkach moczu.....	70
5.1. Optymalizacja procesu ekstrakcji bisfenolu A z zastosowaniem techniki FPSE.....	70
5.1.1. Wybór materiału sorpcyjnego stosowanego do izolacji bisfenolu A	70
5.1.2. Czas ekstrakcji FPSE	73

5.1.3. Czas elucji bisfenolu A	74
5.2. Optymalizacja procesu hydrolizy glukuronidu bisfenolu A	75
5.3. Kalibracja układu HPLC-MS/MS do oznaczania bisfenolu A w próbkach moczu	77
5.4. Procedura oznaczania bisfenolu A w próbkach moczu.....	79
5.5. Analiza próbek moczu.....	80
6. Podsumowanie	82
STRESZCZENIE.....	84
ABSTRACT.....	85
WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO	86
1. Publikacje.....	86
2. Komunikaty i postery.....	86
3. Monografie i druki zwarte	88
4. Nagrody i wyróżnienia.....	89
BIBLIOGRAFIA	90

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

Skrót/Akronim	Termin angielski	Termin polski
A	<i>Area</i>	Pole powierzchni
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Acetonitryl
AIS	<i>Area of internal standard</i>	Pole powierzchni wzorca wewnętrznego
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>	Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
APPI	<i>Atmospheric pressure photoionization</i>	Fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym
BMI	<i>Body mass index</i>	Wskaźnik masy ciała
BPA	<i>Bisphenol A</i>	Bisfenol A
BPA-d16	<i>Bisphenol A-d₁₆</i>	Deuterowany bisfenol A
BPA-gluc	<i>BPA-glucuronide</i>	Glukuronian bisfenolu A
BSTFA	<i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>	N-O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid
C	<i>Concentration</i>	Stężenie
CE	<i>Collision energy</i>	Energia kolizji
CUR	<i>Curtain gas</i>	Gaz osłonowy
CW	<i>Carboxen</i>	Karboksen
CXP	<i>Collision cell exit potential</i>	Potencjał wyjściowy komory kolizyjnej
DIB-Cl	<i>4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride</i>	Chlorek 4-(4,5-difenylo-1-imidazoilo)benzoilu
DOP	<i>Dopamine</i>	Dopamina
DOP-gluc	<i>Dopamine glucuronide</i>	Glukuronid dopaminy
DP	<i>Declustering potential</i>	Potencjał fragmentacyjny
DVB	<i>Divinylbenzene</i>	Diwinylobenzen
ED	<i>Electrochemical detector</i>	Detektor elektrochemiczny
EDCs	<i>Endocrine-disrupting chemicals</i>	Związki endokrynnie czynne
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>	Europejski Urząd Bezpieczeństwa żywności
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	Test immunoenzymatyczny
EP	<i>Entering potential</i>	Potencjał wyjściowy
ESI	<i>Electrospray ionization</i>	Jonizacja poprzez elektrorozpylanie
EtOH	<i>Ethanol</i>	Etanol
FA	<i>Formic acid</i>	Kwas mrówkowy
FIA	<i>Flow injection analysis</i>	Analiza wstrzykowo-przepływowa
FLD	<i>Fluorescence detector</i>	Detektor fluorescencyjny
FPSE	<i>Fabric phase sorptive extraction</i>	Ekstrakcja na powierzchni modyfikowanej tkaniny
GC	<i>Gas chromatography</i>	Chromatografia gazowa

GC-MS	<i>Gas chromatography coupled with mass spectrometry</i>	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrem mas
GS1	<i>Nebulizer gas</i>	Gaz rozpylający
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPLC-DAD	<i>High performance liquid chromatography coupled with diode array detector</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem z matrycą diodową
HPLC-FLD	<i>High performance liquid chromatography coupled with fluorescence detector</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem fluorescencyjnym
HPLC-MS/MS	<i>High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas
IPA	<i>Isopropanol</i>	Izopropanol
IS	<i>Internal standard</i>	Wzorzec wewnętrzny
IS	<i>IonSpray voltage</i>	Napięcie rozpylania
LC-MS	<i>Liquid chromatography coupled with mass spectrometry</i>	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i>	Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas
LC-UV-ViS	<i>Liquid chromatography coupled with ultraviolet-visible spectroscopy detector</i>	Chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem spektrofotometrycznym
LH	<i>Luteinizing hormone</i>	Hormon luteinizujący
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i>	Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz
LOD	<i>Limit of detection</i>	Granica wykrywalności
LOQ	<i>Limit of quantitation</i>	Granica oznaczalności
MeOH	<i>Methanol</i>	Metanol
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbent</i>	Mikroekstrakcja do sorbentu upakowanego w strzykawce
MIP	<i>Molecularly imprinted polymer</i>	Sorbent z odciskiem molekularnym
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>	Monitorowanie wielu reakcji fragmentacji
MS	<i>Mass spectrometry</i>	Spektrometr mas
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>	Tandemowy spektrometr mas
MW	<i>Molecular weight</i>	Masa cząsteczkowa
N	<i>Theoretical plate number</i>	Liczba pólk teoretycznych
NC	<i>Nebulizer current</i>	Natężenie przyłożone do elektrody wyładowania koronowego
NOAEL	<i>No observable adverse effect level</i>	Poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków
PA	<i>Polyacryl</i>	Poliakryl
PCOS	<i>Polycystic ovary syndrome</i>	Zespół policystycznych jajników
PDMDPS	<i>Polydimethyldiphenylsiloxane</i>	Polidimetylodifenylosiloksan

PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i>	Poli(dimetylosiloksan)
PEG	<i>Polyethylene glycol</i>	Glikol polietylenowy
PFBBr	<i>Pentafluorobenzyl bromide</i>	Bromek pentafluorobenzylu
PMME	<i>Polymer monolith microextraction</i>	Mikroekstrakcja na powierzchni polimerowego złoża monolitycznego
PTHF	<i>Polytetrahydrofuran</i>	Politetrahydrofuran
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction</i>	Ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego
SHBG	<i>Sex hormone binding globulin</i>	Białko wiążące hormony płciowe
SIM	<i>Selected-ion monitoring</i>	Monitorowanie wybranych jonów
S/N	<i>Signal-to-noise ratio</i>	Stosunek sygnału do szumu
SPDE	<i>Solid phase dynamic extraction</i>	Dynamiczna ekstrakcja do fazy stałej
SPE	<i>Solid phase extraction</i>	Ekstrakcja do fazy stałej
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
TDI	<i>Tolerable daily intake</i>	Wartość tolerowanego dziennego pobrania
TEM	<i>Temperature</i>	Temperatura
TFME	<i>Thin film microextraction</i>	Mikroekstrakcja na powierzchni cienkiej folii
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i>	Hormon tyreotropowy
TSP50	<i>Testes-specific protease 50</i>	Gen kodujący jądrową specyficzną proteazę 50
UPLC-MS/MS	<i>Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry</i>	Ultra-wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
UV-ViS	<i>Ultraviolet-visible spectroscopy</i>	Spektroskopia w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego
WHO	<i>World Health Organization</i>	Światowa Organizacja Zdrowia

WPROWADZENIE

Postępująca urbanizacja, industrializacja i konsumpcjonizm prowadzi do skażenia środowiska, które może z dużym prawdopodobieństwem wpływać negatywnie na zdrowie ludzi. Obecnie szczególną uwagę zwraca się na negatywne skutki zdrowotne spowodowane ekspozycją na związki endokrynnie czynne, szeroko stosowane w przemyśle. Wyniki badań modelowych, epidemiologicznych oraz obserwacji klinicznych utrzymują naukowców w przekonaniu na istnienie znacznego ryzyka dla zdrowia publicznego w wyniku działania związków endokrynnie czynnych. Związki te poprzez podobieństwo w budowie do hormonów steroidowych zaburzają ich naturalne działanie. Aktualnie znanych jest ponad 800 związków, które wykazują zdolność zaburzania prawidłowych czynności układu endokrynnego. Do grupy tych związków należy między innymi bisfenol A (BPA), który odgrywa ważną rolę w patogenezie:

- zaburzeń endokrynnych, włączając zaburzenia płodności u kobiet i mężczyzn, przedwczesne dojrzewanie, nowotwory hormonozależne, jak rak piersi i rak prostaty,
- schorzeń metabolicznych, włączając zespół policystycznych jajników (PCOS).

Bisfenol A to ważna, a jednocześnie kontrowersyjna substancja w naszym środowisku, albowiem jest ona produkowana na świecie w ogromnych ilościach, do kilku milionów ton rocznie. BPA znalazł zastosowanie jako monomer w wytwarzaniu tworzyw poliwęglanowych i żywic epoksydowych, które są wykorzystywane do produkcji opakowań mogących być w bezpośrednim kontakcie z żywnością.

Obecnie społeczeństwo narażone jest na kontakt z bisfenolem A, głównie w efekcie na jego szerokie zastosowanie w wytwarzaniu produktów codziennego użytku. Za jedną z głównych potencjalnych dróg ekspozycji uważa się spożywanie żywności przechowywanych w puszkach i pakowanych w tworzywa poliwęglanowe. Narażenie zdrowia człowieka spowodowane jest faktem, że bisfenol A może migrować z opakowań do żywności i zostać spożyty przez ludzi. Ekspozycja na działanie BPA nawet na niskim poziomie stężeń, z którymi człowiek ma do czynienia może mieć negatywny wpływ na zdrowie

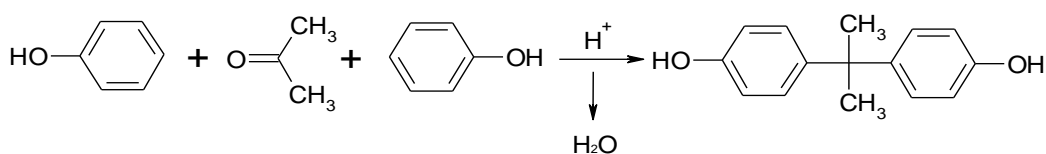
W ośrodkach naukowych trwają prace nad opracowaniem metodyk analitycznych umożliwiających oznaczanie śladowych ilości bisfenolu A oraz jego metabolitów w próbkach biologicznych. Wykrycie tego związku w płynach biologicznych można powiązać z występowaniem wybranych zaburzeń oraz chorób.

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka bisfenolu A

Bisfenol A (BPA, dian, 2,2-di(4'-hydroksyfenylo)propan) został zsyntezowany po raz pierwszy w 1905 roku przez Thomasa Zincke na Uniwersytecie w Marburgu, aczkolwiek dopiero po prawie pięćdziesięciu latach znalazł praktyczne zastosowanie, głównie jako monomer w produkcji poliwęglanów [1,2]. Poliwęglany oraz inne materiały polimerowe, oparte na monomerze bisfenolu A, ze względu na swoje unikalne właściwości fizyczne, względną łatwość i niski koszt produkcji znalazły szerokie zastosowanie w wytwarzaniu między innymi opakowań do żywności. Obecnie bisfenol A jest jedną z najczęściej produkowanych substancji na świecie, a zapotrzebowanie na ten związek w różnych gałęziach przemysłu wciąż rośnie. Przykładowo tylko w 2013 roku wyprodukowano go około 6,8 miliona ton [3].

Bisfenol A otrzymuje się w wyniku reakcji kondensacji fenolu z acetonem w obecności silnie kwaśnej żywicy jonowymiennej [2]. Schemat syntezy bisfenolu A przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat reakcji otrzymywania bisfenolu A.

Związek ten występuje zwykle w postaci białych kryształów o łagodnym zapachu fenolu. Wartość liczbowa współczynnika $\log K_{ow}=3,40$ wskazuje na dobrą rozpuszczalność związku w tłuszczach, a małą rozpuszczalność w wodzie [4]. Ponadto bisfenol A wykazuje dobrą rozpuszczalność w kwasie octowym, etanolu, eterze dietylowym [5]. Właściwości fizykochemiczne bisfenolu A zestawiono w Tabeli 1.

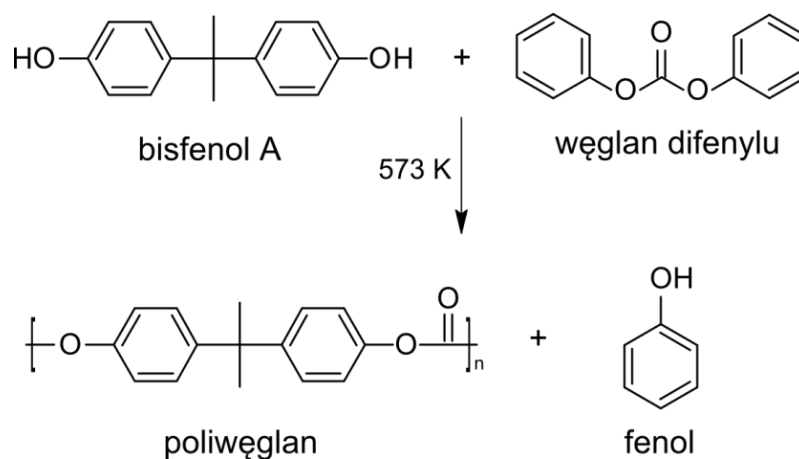
Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne bisfenolu A [2,5].

Cecha	Wartość
Wzór sumaryczny	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Nr CAS	80-05-7
Masa molekularna	228,2863 g/mol
Stan skupienia	Stały
Barwa	Biała
Zapach	Łagodny
Temperatura wrzenia	398°C w 101,3 kPa
Temperatura topnienia	155°C
Rozpuszczalność w wodzie	300 g/m ³ w 25°C
log K _{ow}	3,40
pK _a	9,59-11,30

2. Zastosowania bisfenolu A

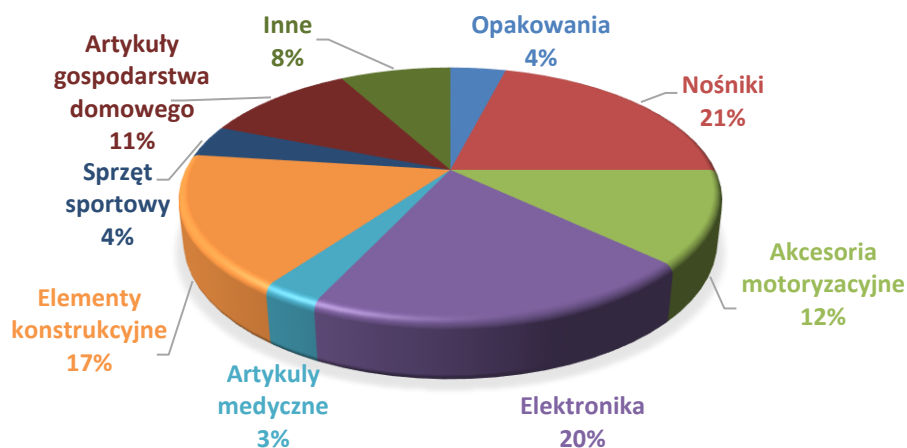
Bisfenol A znalazł zastosowanie w procesie wytwarzania szerokiej gamy produktów, które wykorzystuje się w różnych gałęziach przemysłu. Głównym jego zadaniem jest wiązanie, uplastycznianie oraz wzmacnianie tworzyw sztucznych, farb, lakierów, tworzyw wiążących i wypełniających. Obecnie stosuje się go w przemyśle chemicznym, w przemyśle metalowym (głównie żelaza), w budownictwie oraz w przemyśle tworzyw sztucznych [6].

Do głównych zastosowań bisfenolu A należy produkcja żywic poliwęglanowych (71% produkcji), żywic epoksydowych (27%), nienasyconych poliestrów, polisulfonów, polieteroimidów, żywic poliakrylamidowych. Na Rysunku 2 przedstawiono schemat reakcji syntezy poliwęglanów.



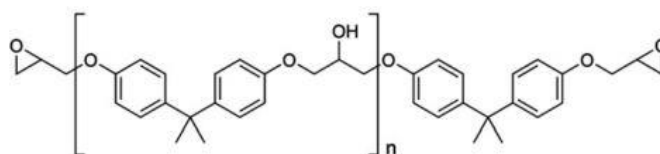
Rysunek 2. Schemat reakcji syntezy poliwęglanów [2].

Poliwęglany znalazły szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Stosuje się je jako składniki do produkcji elementów konstrukcyjnych, szkła odpornego na uderzenia np. kloszy latarni ulicznych, szkła stosowanego w gospodarstwach domowych, szyb, elementów elektrycznych i urządzeń elektronicznych, dysków kompaktowych, obudów telefonów komórkowych, elementów samochodów. Tworzywo to wykorzystywane jest również do produkcji butelek plastikowych, butelek do karmienia niemowląt, pojemników do przechowywania żywności i płynów [6]. Na Rysunku 3 przedstawiono główne zastosowania poliwęglanów w różnych gałęziach przemysłu.



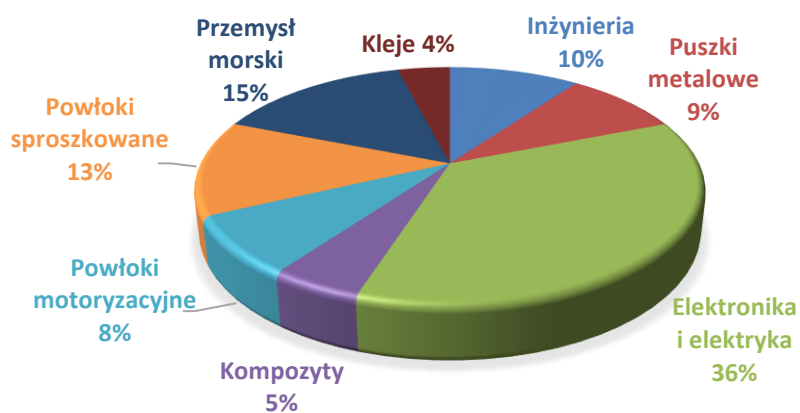
Rysunek 3. Światowe zastosowania poliwęglanów w 2010 roku [7].

Bisfenol A jest również monomerem wykorzystywanych do produkcji żywic epoksydowych, które są często stosowane jako powłoki chroniące produkty przed korozją. Struktura takiej żywicy epoksydowej została przedstawiona na Rysunku 4.



Rysunek 4. Struktura chemiczna żywicy epoksydowej [8].

Żywice epoksydowe stosowane się głównie jako składniki lakierów wykorzystywanych w przemyśle motoryzacyjnym, w obudowach sprzętu elektronicznego, laminatach, podłogach przemysłowych, częściach konstrukcyjnych, klejach. Ponadto wchodzi w skład powłok wyściełających wnętrza puszek. Główne zastosowania żywic epoksydowych zestawiono na Rysunku 5.



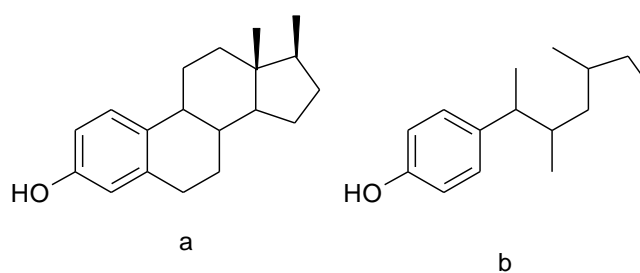
Rysunek 5. Światowe zastosowania żywic epoksydowych w 2009 roku [7].

Na przestrzeni ostatnich lat bisfenol A znalazł zastosowanie w produkcji papieru termicznego, papieru toaletowego, książek i paragonów [3]. W tego typu produktach bisfenol A nie tworzy wiązania z materiałem przyjmującym, przez co prawdopodobnie jest bardziej dostępny i łatwiej uwalnia się do otoczenia [6]. Po kontakcie papieru termicznego ze skórą bisfenol A może zatrzymywać się na jej powierzchni. Istnieje prawdopodobieństwo, że bisfenol A może być spożyty przez przypadkowy kontakt ręka-usta [9].

Ostatnie badania wskazują, że stosowanie bisfenolu A w produkcji papieru termicznego może również przyczynić się do obecności tego związku w strumieniu papieru z recyklingu oraz na składowiskach odpadów [10]. Na podstawie dostępnych danych oszacowano, że w latach 2005-2006 w Stanach Zjednoczonych oraz w Europie Zachodniej wykorzystano około 1890 ton bisfenolu A do produkcji papieru termicznego, którego łączna produkcja wynosiła 1150000 ton w ciągu roku [11].

3. Bisfenol A jako związek zaburzający gospodarkę hormonalną

Istnieje grupa związków endokrynnie czynnych (EDCs), które mogą naśladować działanie naturalnych hormonów. Związki te swoją budową przypominają często hormony steroidowe, dlatego mogą one wchodzić w interakcje z receptorami dla estrogenów, androgenów czy też progesteronu. Prowadzić to może do rozwoju zaburzeń i nowotworów hormonozależnych, takich jak raka sutka, jajnika i gruczołu krokowego [12]. Na Rysunku 6 przedstawiono strukturę naturalnego hormonu ludzkiego estradiolu (a) oraz związku strukturalnie podobnego – nonylofenolu (b).

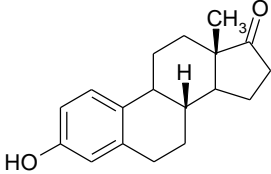
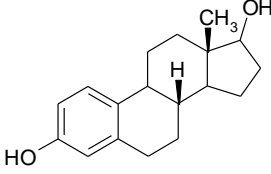
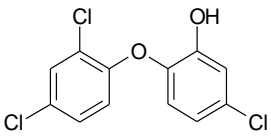
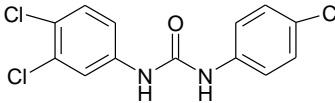
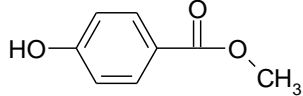
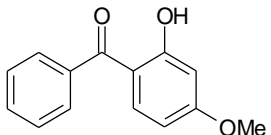
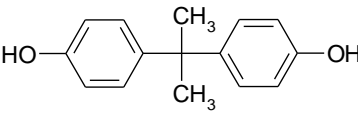
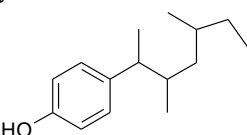
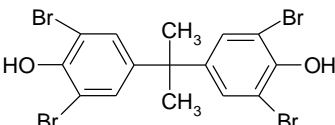
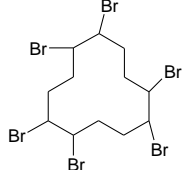
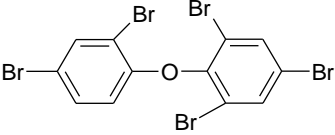
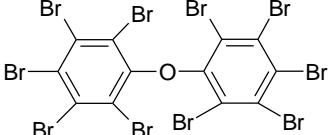
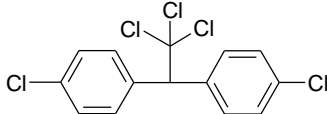
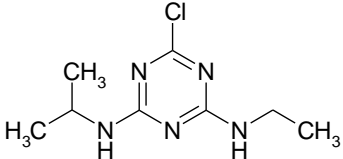
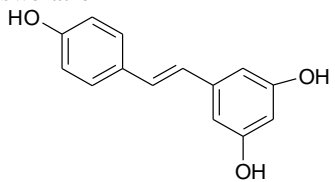
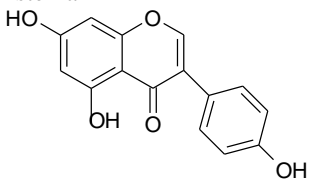
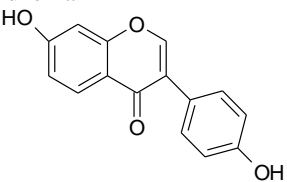


Rysunek 6. Struktura naturalnego hormonu estradiolu (a) i jego syntetycznego analogu nonylofenolu (b).

Do grupy związków endokrynnie czynnych należą substancje chemiczne zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego. Wśród nich można wyróżnić hormony, fitoestrogeny oraz składniki produktów higieny osobistej, surfaktanty, środki zmniejszające palność, herbicydy, pestycydy. Związki takie charakteryzują się wszechobecnością w środowisku oraz dużą

różnorodnością. W Tabeli 2 zestawiono przykładowe związki zaliczane do związków endokrynnie czynnych [13].

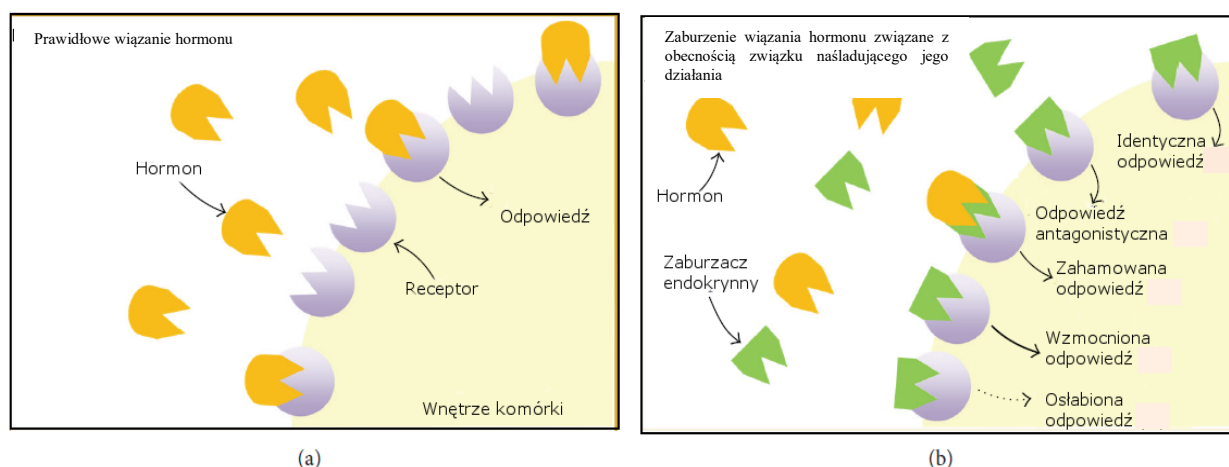
Tabela 2. Przykładowe struktury związków należących do grupy związków endokrynnie czynnych [13].

Naturalne lub syntetyczne hormony		
estron	17 β -estradiol	
		
Składniki środków do higieny osobistej/ do użytku codziennego		
triklosan	triklokarban	metylparaben
		
3-benzofenon	bisfenol A	nonylofenol
		
Środki zmniejszające palność		
TBBPA	HBCD	
		
BDE-100	BDE-209	
		
Pestycydy		
DDT	atrazyna	
		
Fitoestrogeny		
resweratrol	genisteina	daidzeina
		

Wymienione związki można określić mianem modulatorów endokrynych. Mogą one upośredzać działanie układu hormonalnego na kilka sposobów:

- przez całkowite lub częściowe naśladowanie hormonów i oddziaływanie z receptorami dla określonych hormonów. Może to prowadzić do wywołania przez modulator identycznej odpowiedzi jak dla prawidłowego hormonu (działanie agonistyczne) lub przeciwnej (działanie antagonistyczne),
- przez blokowanie wiązania się hormonów z ich receptorami,
- przez zaburzenie syntezy i funkcjonowania receptorów hormonalnych. Zmieniona struktura receptora, wynikająca ze współdziałania komórek docelowych ze związkami endokrynie czynnymi może skutkować pojawieniem się wzmocnionej lub osłabionej odpowiedzi po związaniu naturalnego hormonu,
- przez wpływ na szlaki przekazywania sygnałów z komórki do komórki,
- przez wpływ na produkcję lub degradację prawidłowych hormonów.

Na Rysunku 7 zobrazowano w sposób schematyczny procesy zachodzące w komórce w przypadku obecności prawidłowego hormonu (a) oraz w przypadku obecności w komórce związku egzogenego będącego modulatorem hormonalnym (b).

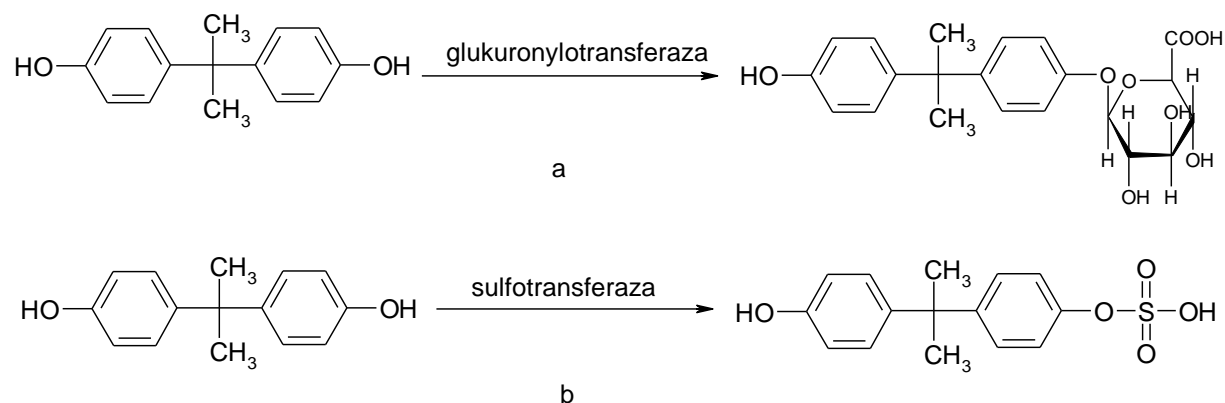


Rysunek 7. Porównanie procesów zachodzących w komórce w obecności prawidłowego hormonu (a) oraz modulatora endokrynnego (b) [13].

Bisfenol A należy do grupy związków zaburzających działanie układu endokrynnego. Badania *in vitro* wykazały, że związek ten antagonizuje skutki działania estrogenów, androgenów, a także hormonów tarczycy. Wpływa on także na aktywność hormonów oraz na ekspresję receptorów.

Dostępne dane literaturowe wskazują, że enzymy takie jak glukuronylotransferaza oraz sulfotransferaza mają posiadającą zdolność do biodegradacji i metabolizowania bisfenolu A

w organizmie człowieka [14]. Na Rysunku 8 zobrazowano przemianę bisfenolu A pod wpływem działania wspomnianych enzymów. W organizmie człowieka bisfenol A jest metabolizowany w wątrobie w ciągu 6 godzin.



Rysunek 8. Biotransformacja bisfenolu A w organizmie człowieka w obecności glukuronylotransferazy (a) oraz sulfotransferazy (b) [15].

W próbkach biologicznych bisfenol A może występować zarówno w postaci wolnej oraz w formie sprzężonej jako glukuronid lub siarczan. Aby oznaczyć całkowitą zawartość bisfenolu A w próbkach biologicznych, np. w moczu należy najpierw poddać bisfenol A sprzężony z glukuronidem bądź siarczanem reakcji hydrolizy w 37°C przez kilka do kilkunastu godzin w obecności enzymu. W przypadku nieprzeprowadzenia reakcji hydrolizy oznaczenie będzie dotyczyło tylko wolnego bisfenolu A.

Nawet pobieżny rzut oka na dostępne dane literaturowe może stanowić podstawę do stwierdzenia, iż bisfenol A jest podejrzewany o sprzyjanie rozwojowi różnych zaburzeń i chorób. Przeprowadzono wiele badań mających na celu zbadanie wpływu zwiększonego stężenia bisfenolu A w próbkach biologicznych na zachorowalność na wybrane choroby. W Tabeli 3 zestawiono informacje literaturowe dotyczące zależności między zdiagnozowanymi zaburzeniami, a stężeniem bisfenolu A w próbkach biologicznych.

Wprawdzie większość z przedstawionych danych w Tabeli 3 wykazuje korelację między zwiększonym stężeniem bisfenolu A w próbkach biologicznych, a zachorowalnością na konkretne schorzenia czy też choroby. Tym niemniej wśród badań przeprowadzonych przez naukowców z całego świata można zauważyć wyniki wzajemnie się wykluczające.

Tabela 3. Informacje literaturowe dotyczące zaburzeń prawdopodobnie wywołanych przez zwiększone stężenie BPA w próbkach surowicy ludzkiej.

Wpływ bisfenolu A na wybrane schorzenia i choroby	Badana grupa	Obserwacje	Stężenie BPA w surowicy [ng/mL]	Liczebność badanej grupy	Literatura
Płodność	Kobiety i mężczyźni, którzy skorzystali z zapłodnienia <i>in vitro</i>	Zmniejszone prawdopodobieństwo zapłodnienia związane ze zwiększonym stężeniem bisfenolu A w próbkach surowicy kobiet i mężczyzn. Obniżone prawdopodobieństwa dojrzewania oocytów spowodowane podwyższonym poziomem stężeń bisfenolu A w próbkach surowicy.	0,3-2,5	75	[16]
Płodność	Kobiety i mężczyźni, którzy skorzystali z zapłodnienia <i>in vitro</i>	Zależność między dużym stężeniem bisfenolu A w próbkach surowicy, a niską jakością nasienia	0,5-3,3	54	[17]
Jakość nasienia	Mężczyźni narażeni na kontakt z BPA oraz grupa kontrolna, której kontakt z BPA był ograniczony	Większe stężenie bisfenolu A w próbkach pochodzących z grupy badanej niż u grupy kontrolnej. Mniejsza gęstość nasienia u mężczyzn narażonych na kontakt z bisfenolem A w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej	<LOD-102,0	36	[18]
Męskie reakcje związane z popędem seksualnym np. zainteresowanie współżyciem, zadowolenie z życia seksualnego	Mężczyźni pracujący przy produkcji BPA i puszek konserwowych oraz grupa kontrolna	U mężczyzn narażonych na kontakt z bisfenolem A wykryto większe stężenie BPA w próbkach surowicy niż u mężczyzn z grupy kontrolnej. Mężczyźni z grupy badanej wykazywali osłabienie typowo męskich reakcji związanych z popędem seksualnym	1,2-57,9	634	[19]
Stężenie hormonów płciowych/ PCOS	Kobiety z PCOS, zdrowi mężczyźni, zdrowe kobiety	Większe stężenie bisfenolu A, całkowitego testosteronu oraz wolnego testosteronu w próbkach surowicy u zdrowych mężczyzn oraz kobiet ze zdiagnozowanym PCOS w porównaniu z grupą kobiet zdrowych. Większe stężenie testosteronu u kobiet z PCOS niż u zdrowych kobiet	0,6-1,5	41	[20]
Stężenie hormonów płciowych/ PCOS/ otyłość	Kobiety z PCOS oraz zdrowe kobiety podzielone według masy ciała	Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem bisfenolu A w próbkach surowicy, a stężeniem całkowitego i wolnego testosteronu oraz BMI. Kobiety z PCOS borykające się z otyłością miały większe stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy niż kobiety zdrowe bez problemów z nadwagą. Kobiety z PCOS (zarówno te z nadwagą, jak i bez niej) miały większe stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy niż kobiety zdrowe	0,7-1,2	73	[21]
Endometrioza (rozrost błony śluzowej macicy)	Kobiety z endometriozą oraz zdrowe kobiety, wiek 18-44 lat	Większe stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy kobiet z endometriozą w porównaniu z grupą kontrolną	1,4-2,9	37	[22]

Wpływ bisfenolu A na wybrane schorzenia i choroby	Badana grupa	Obserwacje	Stężenie BPA w surowicy [ng/mL]	Liczebność badanej grupy	Literatura
PCOS/ stany zapalne/ cukrzyca typu 2	Kobiety otyłe oraz z normalną wagą i chorujące na PCOS oraz grupy kontrolne, wiek 23-33 lat	Kobiety ze zdiagnozowanym PCOS miały większe stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy. Większe stężenie bisfenolu A było skorelowane z powiększeniem śledziony. Kobiety z PCOS, które miały duże stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy cierpiały na ostrą insulinooporność oraz miały podwyższoną ilość markerów chronicznych stanów zapalnych	0,1-0,7	60	[23]
Rak piersi	Kobiety z rakiem piersi oraz kobiety zdrowe	W surowicy kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi nie zaobserwowano znaczącego wzrostu stężenia BPA-gluc w porównaniu z grupą zdrowych kobiet. Zaobserwowano kilka znaczących zależności między ryzykiem wystąpienia raka piersi, a stężeniem BPA	<0,012-13,870* * BPA-gluc	152	[24]
Poronienia	Kobiety po przejściu kilku poronień oraz kobiety bez problemów z utrzymaniem ciąży, wiek 26-36 lat	Stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy kobiet z nawracającymi poronieniami było znacząco większe w porównaniu z grupą kontrolną stanowiącą kobiety niemające problemów z utrzymaniem ciąży	0,2- 29,4	77	[25]
Poronienia	Kobiety po przejściu kilku poronień oraz kobiety bez problemów z utrzymaniem ciąży	Kobiety, które przeszły kilkukrotne poronienia miały większe stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy w porównaniu z grupą kontrolną. Korelacja liczby poronień z poziomem stężeń bisfenolu A w próbkach surowicy	4,0-9,0	170	[18]
Wzrost płodu/ waga urodzeniowa	Kobiety i ich dzieci	Zaobserwowano zależność pomiędzy podwyższonym poziomem stężenia bisfenolu A w próbkach surowicy, a małą wagą urodzeniową dzieci oraz małymi rozmiarami płodu w czasie okołoporodowym u chłopców. Nie zaobserwowano takiej zależności u dziewczynek	0,3-29,4	97	[26]
Wnętrostwo*/ stężenie hormonów płciowych * wada rozwojowa męskich genitaliów sprowadzająca się do niewłaściwego umieszczenia jednego lub obu jąder w jamie brzusznej albo w kanale pachwinowym zamiast w mosznie	Nowonarodzeni chłopcy z wnętrostwem oraz zdrowi chłopcy	Nie zaobserwowano zależności między podwyższonym stężeniem bisfenolu A w krwi pępowinowej, a występowaniem wnętrostwa. Zaobserwowano za to pozytywną zależność między stężeniem bisfenolu A w krwi pępowinowej a całkowitą zawartością testosteronu	0,14-4,76	152	[27]
Wnętrostwo/ czynność tarczycy	Nowonarodzeni chłopcy z wnętrostwem oraz zdrowi chłopcy	Zaobserwowano słabą ujemną korelację pomiędzy stężeniem bisfenolu A, a poziomem hormonu tyreotropowego (TSH). Nie stwierdzono związku między poziomem stężenia bisfenolu A, a występowaniem wnętrostwa	0,2-3,3* *w krwi pępowinowej	84	[28]
Epigenetyka	Kobiety poddawane zabiegom zapłodnienia <i>in vitro</i>	Zależność pomiędzy podwyższonym poziomem stężenia bisfenolu A w próbkach surowicy, a niskim poziomem metylacji regionu promotorowego genu TSP50	<LOD-67,4	43	[29]

Analizując powyższe wyniki, rodzą się pewne zastrzeżenia. Przykładowo w doświadczeniu mającym na celu zbadanie męskich reakcji związanych z popędem seksualnym (m.in. zainteresowanie współżyciem, zadowolenie z życia seksualnego) zaobserwowano, że u mężczyzn narażonych na kontakt z bisfenolem A w wyniku pracy zawodowej, którą wykonywali, wykryto większe stężenie tego związku w próbkach surowicy w porównaniu z mężczyznami będącymi w grupie kontrolnej. Ponadto mężczyźni pracujący przy produkcji bisfenolu A i puszek konserwowych wykazywali osłabienie typowo męskich reakcji związanych z popędem seksualnym [19]. Z kolei w doświadczeniu wykonanym przez naukowców z Japonii zaobserwowano większe stężenie bisfenolu A, całkowitego testosteronu oraz wolnego testosteronu w próbkach surowicy ludzkiej u zdrowych mężczyzn w porównaniu z grupą kobiet zdrowych oraz kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników [20]. W związku z powyższymi obserwacjami zauważono dwie sprzeczne hipotezy. W pierwszym doświadczeniu u mężczyzn narażonych na kontakt z bisfenolem A zaobserwowano osłabione męskie reakcje związane z popędem seksualnym. Natomiast w drugim zaobserwowano większe stężenie bisfenolu A, testosteronu całkowitego i wolnego u mężczyzn w porównaniu z grupą kobiet zdrowych i chorujących na PCOS. Przecież testosteron wpływa w istotny sposób na kondycję seksualną mężczyzn oraz stymuluje pobudliwość narządów płciowych. Poza tym w drugim doświadczeniu poziom testosteronu u mężczyzn porównywano z poziomem testosteronu u kobiet zdrowych oraz chorujących na zespół policystycznych jajników. Nie sposób porównywać poziomu testosteronu u mężczyzn i kobiet. W tym doświadczeniu brakuje porównania poziomu testosteronu u mężczyzn ze zwiększonym stężeniem bisfenolu A z poziomem testosteronu u mężczyzn, u których nie zaobserwowano zwiększonego stężenia tego związku (grupa kontrolna).

Ponadto zbadano poziom bisfenolu A w próbkach surowicy kobiet poddawanych zabiegom zapłodnienia *in vitro* [29]. Zaobserwowano korelację między podwyższonym poziomem stężeń bisfenolu A, a niskim poziomem metylacji regionu promotorowego genu TSP50. Gen ten koduje jądrową specyficzną proteazę 50. Aczkolwiek należy tutaj dodać, że funkcje proteazy 50 nie zostały dotychczas poznane, a to budzi pewne wątpliwości, co do znaczenia podwyższonego poziomu bisfenolu A na funkcje proteazy 50.

4. Zespół policystycznych jajników

Zespół policystycznych jajników, bądź zespół wielotorbielowatych jajników (ang. *polycystic ovary syndrome* – PCOS) jest powszechnie występującym zaburzeniem endokrynologicznym, które dotyczyć może nawet 10% kobiet w wieku rozrodczym [30].

Podejrzewa się, że zespół ten jest najczęstszą przyczyną niepłodności u młodych kobiet. Zaobserwowano również inne problemy zdrowotne związane z zachorowalnością na zespół policystycznych jajników, takie jak: otyłość, trądzik, oporność na insulinę, choroby układu krążenia, bezdech senny, przerost endometrium (błony śluzowej macicy), a nawet rak jajników [31,32].

Rozpoznanie PCOS u kobiet opiera się na spełnieniu dwóch z następujących trzech kryteriów:

- kliniczne i/lub biochemiczne objawy hiperandrogenizmu,
- oligoowulacja lub brak owulacji (wtórny brak miesiączki),
- obecność licznych torbieli osłonkowych w jajnikach [32,33].

Etiologia zespołu policystycznych jajników nadal pozostaje nie do końca poznana. Istnieją podejrzenia, że na rozwój PCOS znaczący wpływ mają czynniki środowiskowe i genetyczne [34]. W złożonym mechanizmie rozwoju zespołu prawdopodobnie uczestniczy kilka dysfunkcji hormonalnych. Uważa się, że może to przyczynić się do długotrwałych skutków ogólnorozwojowych w postaci zaburzeń metabolicznych, prokreacyjnych oraz układu sercowo-naczyniowego [32]. Ponadto, u większości kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników zaobserwowano podwyższony poziom androgenów [35].

Na podstawie najnowszych dostępnych doniesień naukowych, można wysunąć hipotezę, że bisfenol A może mieć wpływ na rozwój tej choroby. Odnotowano podwyższony poziom bisfenolu A w próbkach biologicznych u kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników w porównaniu ze stężeniem bisfenolu A w próbkach biologicznych kobiet bez zaburzeń hormonalnych [21,23,36].

5. Źródła narażenia zdrowia człowieka na bisfenol A

Szerokie zastosowanie bisfenolu A w wytwarzaniu produktów codziennego użytku powoduje, że człowiek jest narażony na kontakt z tym związkami. Znanych jest kilka dróg, którymi bisfenol A może dostawać się do organizmu człowieka. Przy czym ostatnie doniesienia naukowe wskazują, że głównym źródłem narażenia człowieka na bisfenol A jest pożywienie, a ściślej migracja tego związku z opakowań do produktów spożywczych. Bisfenol A może migrować z opakowań do żywności i być pochłonięty przez ludzi wraz z pokarmem. Uwalnianie tego związku z opakowań jest szczególnie zauważalne w podwyższonej temperaturze oraz w podwyższonym pH, w wyniku czego bisfenol A może dostawać się do produktów spożywczych [37,38]. Jakkolwiek ta teoria budzi wiele kontrowersji. Prawdopodobnie, przedostawanie się bisfenolu A do żywności spowodowane jest

wymywaniem się wolnego bisfenolu A z powierzchni polimeru. Bowiem, badania wykazały, że reakcja polimeryzacji nie zachodzi ze 100% wydajnością i część niespolimeryzowanego bisfenolu A może przechodzić z opakowań do mediów, z którymi jest w bezpośrednim kontakcie [39]. W Tabeli 4 zebrano informacje literaturowe na temat stężeń bisfenolu A w różnych próbkach spożywczych.

Tabela 4. Informacje literaturowe na temat stężeń bisfenolu A w produktach spożywczych należących do różnych grup.

Produkty spożywcze	Liczba przebadanych próbek (liczba próbek, w których wykryto obecność BPA)	Stężenie BPA	Literatura
Owoce	20 (15)	3,7-10,2 ng/g	[40]
	9 (2)	0,3 ng/g *	[41]
	4 (4)	5,0-24 ng/g	[42]
	14 (8)	2,7-19 ng/g	[39]
	1 (1)	6,4 ng/g	[43]
Warzywa	19 (19)	6,5-265,6 ng/g	[40]
	39 (36)	20 ng/g *	[41]
	24 (20)	19,2-399,2 µg/kg	[44]
	6 (6)	8,5-35 ng/g	[42]
	7 (5)	1,9-24,8 ng/g	[45]
	29 (27)	2,6-680 ng/g	[39]
	1 (1)	8,5 ng/g	[43]
Ryby	21 (15)	0,7-30,5 ng/g	[45]
	6 (6)	4,5-22 ng/g	[39]
	5 (4)	0,42-7,3 µg/kg	[46]
Soki	1 (1)	0,4 ng/mL	[43]
Mięso	8 (6)	0,17-3,2 µg/kg	[46]

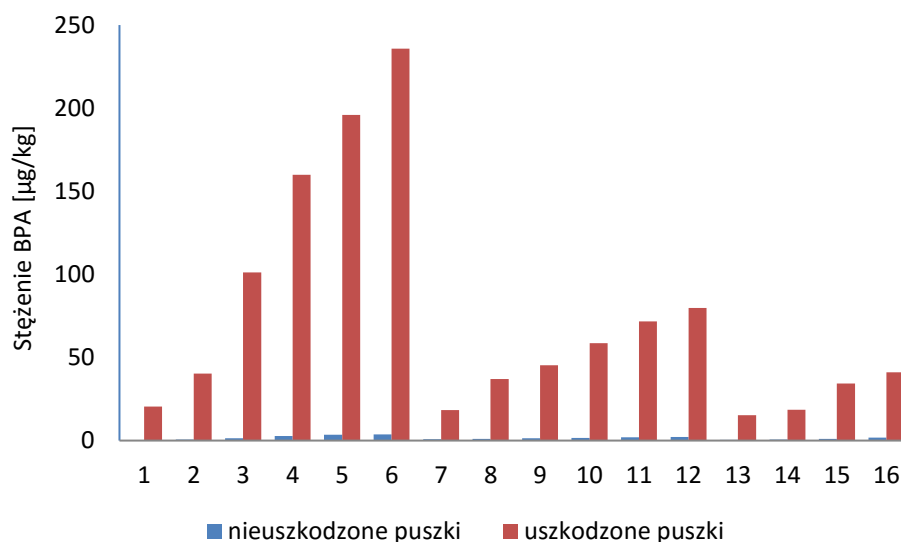
* wartość średnia obliczona ze stężeń próbek, w których wykryto obecność BPA

W przemyśle spożywczym stosowane są procesy technologiczne, mające na celu przedłużenie trwałości żywności poprzez niedopuszczenie do rozwoju i działalności drobnoustrojów, przez ich zabicie lub usunięcie, połączone z zabezpieczeniem przed zakażeniem wtórnym. Do tych procesów należą między innymi apertyzacja i sterylizacja, które polegają na termicznym utrwaleniu żywności w hermetycznych naczyniach. Jednakże w trakcie tych procesów istnieje duże prawdopodobieństwo, że bisfenol A może migrować z opakowań do żywności pod wpływem wysokiej temperatury [47].

Ponadto istnieje prawdopodobieństwo, że mycie naczyń detergentami może wpływać na stopień migracji bisfenolu A z opakowań wykonanych z poliwęglanu [48].

Wyniki badań przeprowadzonych przez włoskich naukowców potwierdziły zależność między zwiększoną migracją bisfenolu A z puszek pokrytych żywicą epoksydową do żywności, a stopniem uszkodzenia struktury tworzywa. Uszkodzenie puszek polegało na jej zgnieceniu. Przeprowadzona symulacja miała na celu sprawdzenie wpływu nieodpowiedniego transportu i przechowywania puszek z żywnością na stopień migracji bisfenolu A do żywności.

Oznaczono stężenie bisfenolu A w żywności przechowywanej w puszcze bez widocznych zgnieceń i odpowiednio w żywności przechowywanej w puszcze danej marki po celowym jej uszkodzeniu. Na Rysunku 9 przedstawiono zależność między stężeniem bisfenolu A w żywności, a stanem puszek, w których była przechowywana. Można zaobserwować wyraźny wpływ uszkodzenia materiału opakowaniowego na zawartość bisfenolu A w próbkach spożywczych [49].



Rysunek 9. Graficzne przedstawienie wpływu uszkodzenia struktury tworzywa na stopień migracji bisfenolu A do produktu spożywczego [49].

Papier termiczny stosowany w kasach fiskalnych stanowi również potencjalne źródło narażenia człowieka na kontakt z bisfenolem A. Dodatek bisfenolu A do papieru termicznego przeznaczonego do druku w technologii termicznej ma za zadanie wywoływanie koloru. Jedna strona papieru pokryta jest sproszkowaną warstwą, często zawierającą bisfenol A, która pod wpływem ciepła, lub ciśnienia reaguje z barwnikiem papieru termicznego wywołując kolor. Technika ta znajduje zastosowanie głównie w urządzeniach drukujących paragony do kas fiskalnych lub w terminalach kart płatniczych. Potencjalnie każdego dnia człowiek może mieć kontakt z papierem termicznym. Obecność w nim bisfenolu A może przyczynić się do narażenia zdrowia człowieka na ten związek przez bezpośredni kontakt. Przeprowadzono badania mające na celu oznaczenie zawartości bisfenolu A w papierze termicznym. Stężenie tego związku było w zakresie <LOD- 1,70 g BPA na 100 g paragonu [50].

W papierze termicznym bisfenol A występuje w postaci niespolimeryzowanej, przez co jest bardziej podatny na migrację, niż ten obecny w tworzywach sztucznych. W kontakcie ze skórą istnieje możliwość, że pozostałość bisfenolu A przypadkowo zostanie spożyta w kontakcie ręki z ustami lub wchłonięty przez skórę. Badania wykazały, że około 1 ng

bisfenolu A zostaje przeniesiony z paragonu na powierzchnie suchej skóry podczas 5-cio sekundowego kontaktu. W przypadku, gdy powierzchnia skóry jest mokra czy też tłusta to ilość przenoszonego bisfenolu A z paragonu może być nawet 10-krotnie większa. Przeprowadzone dotychczas doświadczenia nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że bisfenol A przechodzi do głębokich warstw skóry. Aczkolwiek zaobserwowano, że związek ten może przedostać się do takiej głębokości skóry, że niemożliwe jest jego zmycie [51].

Osoby pracujące na stanowisku kasjera należą do społeczeństwa najbardziej narażonego na kontakt skóry z papierem termicznym. Podczas wielokrotnego kontaktu skóry z papierem może przedostać się nawet 71 μg bisfenolu A w ciągu doby [51]. Przeprowadzono badania, w których zbadano mocz osób pracujących na stanowisku kasjera, mających ciągły kontakt z papierem termicznym. Stężenie bisfenolu A w moczu tych osób było dużo większe niż u osób niepracujących na tego typu stanowisku.

Ponadto wykazano obecność bisfenolu A w kurzu domowym, w związku z czym człowiek może być również narażony na kontakt z tym związkiem przez układ oddechowy [52].

Ekspozycja na działanie bisfenolu A nawet na niskim poziomie stężeń, z którymi człowiek ma do czynienia w życiu codziennym może mieć negatywny wpływ na zdrowie. Najnowsze doniesienia naukowe wskazują na obecność tego związku w próbkach biologicznych np. w surowicy i w moczu. Niepokojący jest fakt, że u więcej niż 90% badanej populacji Stanów Zjednoczonych wykryto bisfenol A w próbkach moczu [53,54].

Dotychczas powstało wiele badań naukowych mających na celu zbadanie ewentualnego toksycznego wpływu bisfenolu A na organizmy. Zbadano toksyczność reprodukcyjną i rozwojową w szerokim zakresie stężeń bisfenolu A u myszy. Wykazano negatywne skutki spożycia bisfenolu A tylko w dawkach powyżej 50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dobę}$ [55]. Przy czym badania przeprowadzone z wykorzystaniem niewielkiej ilości zwierząt eksperymentalnych wykazały negatywny wpływ bisfenolu A już w dużo niższych dawkach (2-20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$) [55]. Tak wielkie rozbieżności wyników wprowadzają naukowców w zakłopotanie. Jednakże przeprowadzenie badań na niewielkiej ilości zwierząt eksperymentalnych nie jest wystarczająco wiarygodne. Takie badania powinno przeprowadzać się na dużej grupie zwierząt by wyniki móc opracować w sposób statystyczny.

Przeprowadzono również testy *in vitro* mające pomóc w ocenie skutków narażenia zdrowia człowieka na bisfenol A. Dane uzyskane z testów *in vitro* wskazują, że bisfenol A ma słabe działanie estrogenne i istnieją obawy, że może to mieć wpływ na układ hormonalny. Bisfenol A może naśladować działanie naturalnego hormonu estradiolu zaburzając działanie całego układu hormonalnego [56-57]. Zaobserwowano wiele niekorzystnych skutków

spowodowanych przez obecność bisfenolu A, jak wzrost ilości zachorowań na nowotwory: piersi i prostaty. Zauważono również nieprawidłowości w narządach rozrodczych, spadek jakości nasienia, wczesne dojrzewanie płciowe u kobiet [48,53,57,58].

Europejski Urząd Bezpieczeństwa żywności (EFSA) szacuje wartość tolerowanego dziennego pobrania (ang. *Tolerable Daily Intake*, TDI) przez organizm człowieka głównie w oparciu o badania wielopokoleniowe z wykorzystaniem gryzoni oraz dwupokoleniowe na myszach. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń z wykorzystaniem szczurów zaobserwowano znaczące obniżenie wagi ciała u dorosłych i u noworodków gryzoni podczas ekspozycji przy dawce 50 mg bisfenolu A/kg/dzień [59]. Natomiast w badaniu przeprowadzonym na dwóch pokoleniach u myszy, stwierdzono zwiększoną częstość występowania przerostu hepatocytów po dawce 50 mg bisfenolu A/kg/dzień [60]. Nie zaobserwowano jednak toksycznych zmian u eksperymentalnych zwierząt przy zastosowaniu dawki równej 5 mg/kg/dzień [60].

W badaniach toksykologicznych w ocenie poziomu ryzyka stosowania danej substancji często posługuje się takim współczynnikiem jak NOAEL, który oznacza najwyższą dawkę bądź stężenie substancji lub czynnika, dla którego nie obserwuje się żadnego działania niepożądanego u badanych organizmów. Badacze oszacowali, że wartość liczbowa współczynnika NOAEL dla bisfenolu A wynosi 5 mg/kg/dzień [61]. Na podstawie wyznaczonego współczynnika NOAEL Europejska Agencja ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) określiła wartość tolerowanego dziennego pobrania bisfenolu A. W 2006 roku EFSA ustanowiła dawkę tolerowanego dziennego pobrania bisfenolu A na 0,05 mg/kg/dzień. Wartość ta bierze się po uwzględnieniu współczynnika niepewności równego 100 [61].

Do 2014 roku wartość tolerowanego dziennego pobrania bisfenolu A oszacowana przez ekspertów z Europejskiej Agencji ds. Bezpieczeństwa Żywności wynosiła 0,05 mg/kg/dzień. Oznaczało to, że dla człowieka ważącego 50 kg dzienna „bezpieczna” dawka wynosiła aż 2,5 mg. Jednakże spływające niepokojące doniesienia naukowe z całego świata spowodowały, że eksperci z Europejskiej Agencji ds. Bezpieczeństwa Żywności obniżyli wartość tolerowanego dziennego pobrania z 50 µg BPA na kg masy ciała na dzień na 4 µg BPA na kg masy ciała na dzień [41,61-62].

Dzieci są szczególnie narażone na negatywny wpływ bisfenolu A na ich zdrowie. Już na etapie poczęcia oraz rozwoju płodu może dojść do narażenia na ekspozycję bisfenolem A [18]. U małych dzieci akumulacja bisfenolu A jest największa, ponieważ w ich organizmach brak jest enzymów metabolizujących ten związek [63]. W Tabeli 5 zestawiono informacje dotyczące źródeł narażenia człowieka na kontakt z bisfenolem A. Ponadto powszechne

używanie butelek do karmienia niemowląt wykonanych z poliwęglanu są główną przyczyną, że to właśnie niemowlęta i małe dzieci stanowią grupę najbardziej narażoną na ewentualne szkodliwe działanie bisfenolu A. Zwłaszcza, gdy pod uwagę zostanie uwzględnione pobranie tego związku na kg masy ciała oraz ograniczone zdolności metaboliczne i detoksykacyjne niemowląt. Na tego typu doniesienia naukowe zareagowała Unia Europejska przyjmując dyrektywę Komisji 2011/8/UE w styczniu 2011 roku, która zakazuje stosowania bisfenolu A do produkcji butelek do karmienia niemowląt [49,64].

Tabela 5. Informacje literaturowe na temat źródeł narażenia człowieka na bisfenol A oraz dróg wnikania tego związku do ustroju człowieka [65].

Źródło narażenia na bisfenol A	Droga przedostawania się bisfenolu A do ustroju	Najbardziej narażona grupa	Oszacowana dzienna dawka [ng/dzień]
rodzice narażeni na kontakt z BPA	zapłodnienie	stadium embrionalne	Brak danych
matka narażona na kontakt z BPA	przez łożysko oraz podczas karmienia piersią	płód oraz niemowlę	Brak danych
pożywienie	układ pokarmowy	dzieci	1700-2700
zanieczyszczone powietrze	układ oddechowy	dzieci	7,8-14
materiały dentystyczne	układ pokarmowy	dzieci powyżej 6 roku życia	215
pożywienie	układ pokarmowy	dorośli	1560-10453
kurz	układ oddechowy	dorośli	8,44-109
papier termiczny	skóra	cała populacja	17,4-541
papier termiczny	skóra	kasjerki	1303-40590
papier inny niż termiczny	skóra	cała populacja	0,1

Pakowaną żywność, w której nie wykryto obecności bisfenolu A lub jego stężenie było niższe od dolnej granicy oznaczalności, czy też jego stężenie było mniejsze od maksymalnych dopuszczalnych wartości stężeń, należy spożywać z rozwagą. Istnieje bowiem możliwość wystąpienia efektu kumulacji bisfenolu A z różnych produktów, dlatego tak ważne jest monitorowanie zawartości tego związku w pakowanej żywności [49].

W celu ochrony zdrowia konsumentów przed potencjalnymi zagrożeniami przeprowadzono wiele badań naukowych mających na celu oszacowanie stopnia narażenia zdrowia człowieka na kontakt z bisfenolem A. Kluczowe jest wiarygodne oszacowanie ekspozycji i częstotliwości spożycia przez społeczeństwo zanieczyszczonej żywności [49]. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) oszacowała średnie spożycie bisfenolu A obecnego w produktach spożywczych, które wynosi $<0,04 - 0,40 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$, a w najgorszym przypadku wartość ta wynieść może $1,40 \mu\text{g}/\text{kg}$ [66-67]. Uspokajający jest fakt, że dzienne średnie

spożycie bisfenolu A oszacowane przez WHO jest poniżej wartości tolerowanego dziennego pobrania, tj. 4 µg/kg/dzień.

Zdania wśród naukowców na temat szkodliwego wpływu bisfenolu A nadal są podzielone. Dotychczas nie udało się jednoznacznie dowieść szkodliwego wpływu bisfenolu A na zdrowie ludzi, ale obniżenie dawki TDI z 50 µg/kg/dzień na 4 µg/kg/dzień przez EFSA ma pewne uzasadnienie naukowe. Ukazujące się wyniki badań w renomowanych czasopismach na temat negatywnego wpływu bisfenolu A na zdrowie ludzi budzą niepokój wśród społeczeństwa. Bisfenol A jest nie do końca poznaną substancją i dlatego należy monitorować jego stężenie w żywności i w próbkach biologicznych.

6. Techniki izolacji i wzbogacania bisfenolu A

Współczesna analityka chemiczna zmierza w kierunku oznaczania substancji na coraz niższym poziomie stężeń w coraz to mniejszej objętości próbki. Kluczową rolę w analizach śladowych oraz ultra-śladowych odgrywa etap przygotowania próbki do analizy, a w szczególności operacje związane z izolacją i wzbogacaniem analitów.

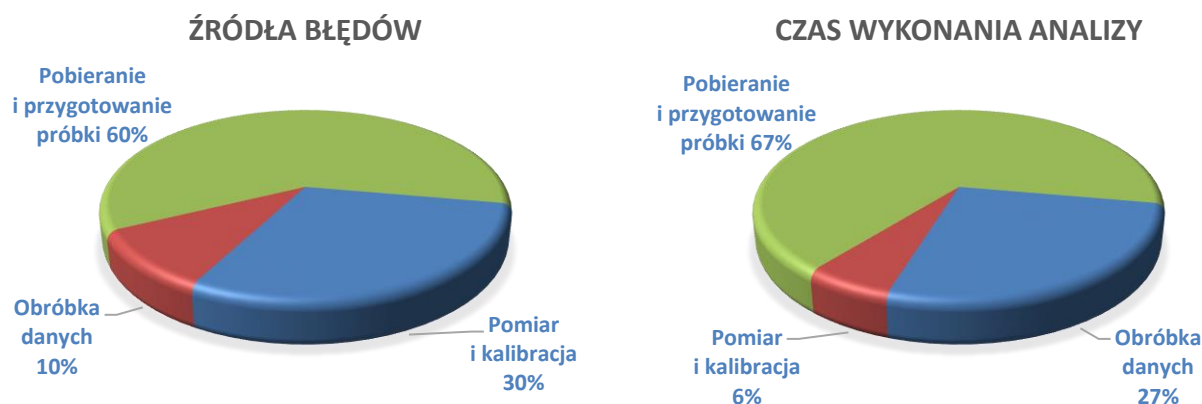
W każdej procedurze analitycznej można wyróżnić cztery lub opcjonalnie pięć podstawowych etapów, takich jak:

- pobieranie próbki,
- pierwotna i wtórna obróbka pobranej próbki,
- transport i przechowywanie próbek,
- przygotowanie próbki do analizy,
- analiza próbek i obróbka danych.

Na każdym z tych etapów mogą zostać popełnione błędy, które będą skutkować zafałszowaniem wyników końcowych. Jednakże najbardziej czasochłonnym i pracochłonnym oraz zarazem najtrudniejszym elementem procedury analitycznej jest etap przygotowania próbki do analizy. Dla próbek o złożonym składzie matrycy, dużej ilości substancji przeszkadzających oraz stosunkowo małych stężeniach substancji oznaczanych obecnych w próbkach, etap przygotowania próbek jest niezbędny, jeżeli ich analiza ma być źródłem rzetelnej informacji o stężeniu analitu. Udział etapu przygotowania próbek do analizy w budżecie niepewności i czasie analizy przedstawiono na Rysunku 10.

Nieustający trend opracowywania szybkich, tanich, czułych i selektywnych metodyk do identyfikacji oraz oznaczania analitów zapoczątkował rozwój wielu technik przygotowania próbek do analizy, bowiem stwierdzono, że etap ten stanowi najsłabsze ogniwo w całym cyklu analitycznym i należy go udoskonalać.

Z reguły przygotowanie próbki polega na selektywnym wyizolowaniu analitów z matrycy do odpowiedniego rozpuszczalnika i ich wzbogaceniu do poziomu umożliwiającego ich oznaczenie ilościowe za pomocą odpowiedniego narzędzia analitycznego.



Rysunek 10. Graficzne przedstawienie udziału poszczególnych etapów procedury analitycznej w budżecie niepewności i czasie analizy.

Czynnościami często towarzyszącymi izolacji analitów jest oczyszczanie ekstraktu oraz wzbogacenie analitów obecnych w próbce. Uzyskany ekstrakt jest oczyszczany w celu usunięcia substancji przeszkadzających, które mogą doprowadzić do uzyskania wyników obarczonych błędami. Ponadto substancje obecne w matrycy często mają większe stężenie od oznaczanych związków, dlatego się je usuwa, aby wyeliminować wpływ matrycy na wynik końcowy. Wzbogacenie polega na zwiększeniu stężenia analitów do poziomu umożliwiającego jego oznaczenie ilościowe z wykorzystaniem odpowiedniej techniki do oznaczeń końcowych. Ponadto, etap przygotowania próbki ma na celu frakcjonowanie lub przekształcenie analitów w pochodne (derywatywacja).

W zależności od stanu skupienia próbki, typu materiału biologicznego a także rodzaju techniki oznaczeń końcowych dokonuje się wyboru odpowiedniej techniki przygotowania próbek do analizy. Próbki w stanie stałym zazwyczaj podlegają procesowi homogenizacji, natomiast ciekłe odsąca się i/lub wiruje. Specjalne zabiegi są stosowane pracując przykładowo z próbkami napojów gazowanych bądź z próbkami o wysokiej zawartości białka. W pierwszym przypadku należy usunąć gaz poprzez odgazowanie za pomocą ultradźwięków, natomiast w drugim należy strącić białka. Można zauważyć tendencję, iż próbki ciekłe najczęściej przygotowywane są z zastosowaniem techniki ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz i ekstrakcji do fazy stałej.

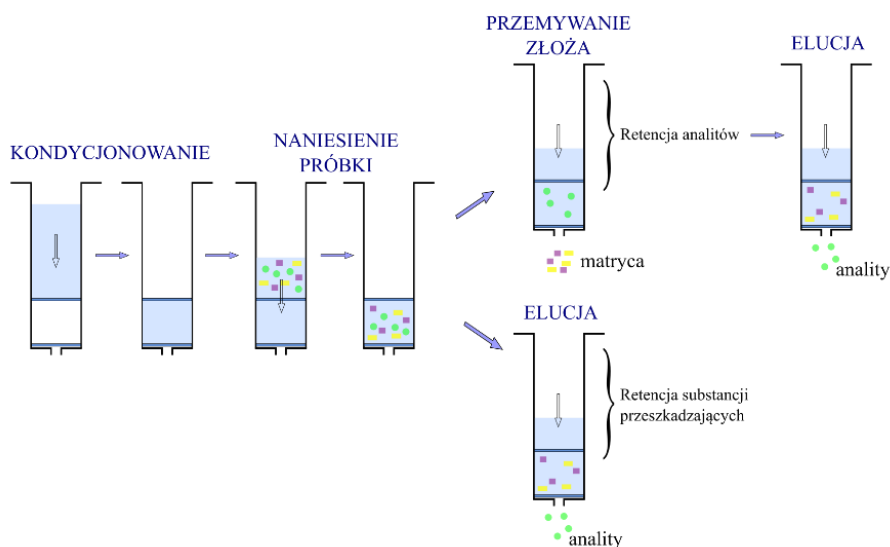
Niestety nie ma jednej, uniwersalnej metody przygotowywania próbek do oznaczania bisfenolu A, odpowiedniej dla wszystkich analizowanych materiałów. Przed przystąpieniem do opracowywania procedury analitycznej należy sprawdzić przydatność poszczególnych technik.

6.1. Technika SPE

Technika ekstrakcji do fazy stałej SPE, która została wprowadzona do praktyki laboratoryjnej ponad 30 lat temu, stała się popularną techniką izolacji oraz wzbogacania analitów [68]. Ekstrakcja do fazy stałej polega na przepuszczeniu próbki przez złożo stałego sorbentu i adsorpcji analitów na złożu. Zatrzymane związki są uwalniane ze złoża termicznie w przypadku analizy techniką GC, bądź rozpuszczalnikiem w przypadku analizy z wykorzystaniem techniki HPLC i/lub GC. Dodatkowo można wprowadzić etap oczyszczania. Wówczas złożo kolumnienki przemywa się odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem, aby usunąć substancje przeszkadzające bez straty analitów. Proces ten przeprowadza się zanim analyty będą wyeluowane za pomocą odpowiedniego eluentu. Tok postępowania podczas przygotowania próbki z wykorzystaniem techniki SPE został przedstawiony schematycznie na Rysunku 11.

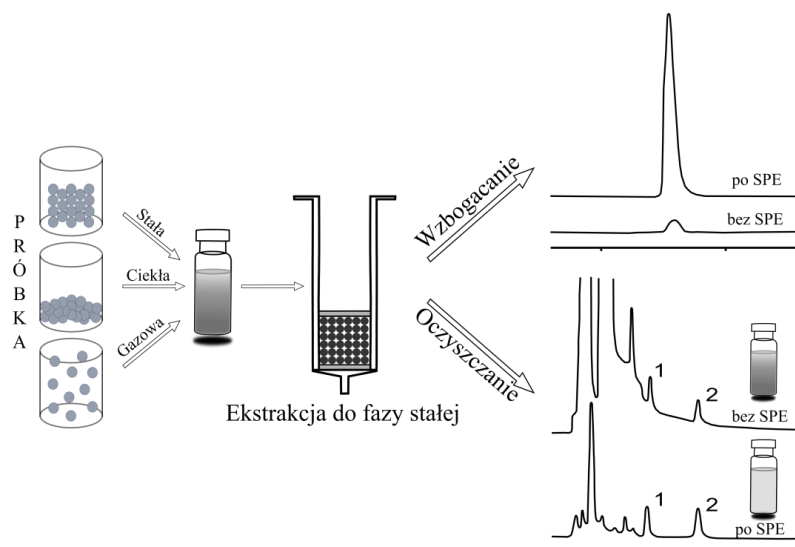
Najczęstsze zastosowania techniki SPE obejmują:

- usuwanie z próbki substancji przeszkadzających,
- izolację i wzbogacanie analitów,
- frakcjonowanie składników próbki,
- przechowywanie lotnych analitów bądź nietrwałych w roztworze,
- derywatyzację analitów poprzez reakcje z reaktywnymi grupami sorbentu.



Rysunek 11. Graficzne przedstawienie poszczególnych etapów ekstrakcji do fazy stałej SPE.

Głównymi celami ekstrakcji do fazy stałej są wzbogacenie analitów oraz usunięcie substancji przeszkadzających, co zostało przedstawione na Rysunku 12.



Rysunek 12. Główne cele ekstrakcji do fazy stałej.

Często w przypadku próbek biologicznych, próbka jest nanoszona na kolumnkę SPE bezpośrednio po rozcieńczeniu wodą. Wypełnienie kolumnek SPE najczęściej stanowi żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi (C18). Bywają również stosowane kolumny powinowactwa immunologicznego (IS) [68-69], które odznaczają się wyższą selektywnością w usuwaniu substancji przeszkadzających niż kolumnki z tradycyjnym wypełnieniem. Ekstrakcja do fazy stałej z wykorzystaniem sorbentów o powinowactwie immunologicznym polega na rozpoznaniu cząsteczki analitu przez przeciwciało, które jest unieruchomione na powierzchni nośnika. Sorbenty o powinowactwie immunologicznym stosowane są do ekstrakcji analitu, analitu i jego metabolitów bądź grupy związków o podobnej budowie. Wykorzystanie tego typu sorbentów znalazło zastosowanie w ekstrakcji analitów obecnych na śladowym poziomie w próbkach o bogatej matrycy.

Wśród nowszych rozwiązań technologicznych stosowanych do oczyszczania próbek z substancji przeszkadzających na uwagę zasługuje technika ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem sorbentów z odciskiem molekularnym (*ang. Molecularly Imprinted Polymers, MIP*) [68]. Złoże takie wykazuje dużą selektywność w stosunku do oznaczanych związków oraz dużą tolerancję dla skrajnych wartości pH [70]. Tworzone jest na zasadzie obudowania cząsteczki wzorca polimerami oddając w ten sposób jej kształt. W ten sposób powstaje kompleks monomeru z cząsteczkami substancji wzorcowej, która zostaje unieruchomiona w sieci polimerycznej. Po usunięciu cząsteczek wzorca, w strukturze polimeru

powstają wolne przestrzenie, dostępne jedynie dla analitów lub ewentualnie cząsteczek substancji o podobnej strukturze [71-72]. Mechanizm ekstrakcji oparty jest na efekcie wykluczania, wynikającego z różnic w wielkości i kształcie cząsteczki analitu.

6.2. Technika LLE

Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz jest najbardziej znanym i często stosowanym sposobem przygotowania próbek, zwłaszcza ciekłych. Wykorzystuje się w tym przypadku zjawisko podziału analitu między dwie niemieszające się fazy ciekłe. Jest to niezwykle uniwersalna i łatwa do wykonania technika ekstrakcyjna. Ponadto do jej realizacji nie jest wymagana specjalistyczna aparatura, dlatego między innymi cieszy się ona taką popularnością. Technikę tę można zastosować zarówno do oczyszczania próbek o skomplikowanej matrycy, np. środowiskowych jak i wzbogacania analitów. Ponadto możliwe jest ekstrahowanie analitów z dużej objętości próbki wodnej.

Jednakże klasyczna ekstrakcja typu ciecz-ciecz jest procesem czasochłonnym i kosztownym, bowiem podczas jej realizacji zużywa się duże ilości drogich oraz często toksycznych rozpuszczalników. Ponadto tworzenie się emulsji jest jedną z głównych wad ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz. Istnieje jednak kilka sposobów na jej wyeliminowanie, np. dodatek soli do warstwy wodnej, ogrzewanie/chłodzenie, przefiltrowanie przez bibułę filtracyjną bądź przez watę szklaną, odwirowanie, a także dodatek małej ilości rozpuszczalnika organicznego. Kolejną wadą, niezwykle istotną z punktu widzenia analiz na poziomie śladów, jest uzyskiwanie stosunkowo małego współczynnika wzbogacenia.

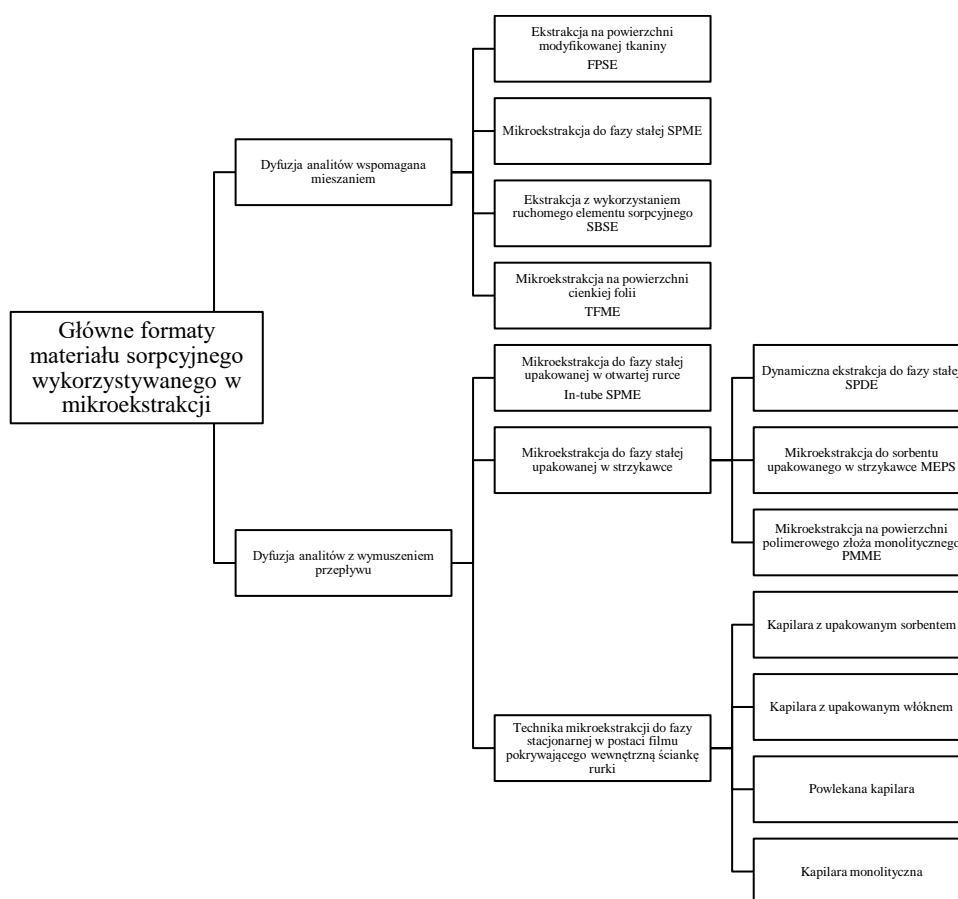
Coraz częściej stosowane są aparaty do ekstrakcji ciągłej ze względu na znacznie mniejsze zużycie drogich odczynników i skrócenie czasu trwania analizy, a co za tym idzie obniżenia kosztów.

Do oznaczeń ilościowych bisfenolu A w próbkach biologicznych na etapie przygotowania próbki do analizy często stosuje się ekstrakcję typu ciecz-ciecz. Najpowszechniej stosowanymi w tym celu rozpuszczalnikami jest acetonitryl, rzadziej etanol.

6.3. Technika FPSE

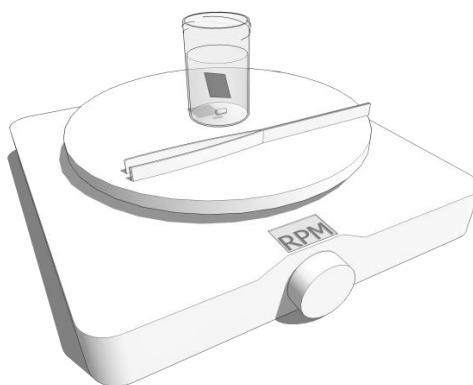
Wzrastające zainteresowanie naukowców nowymi rozwiązaniami w przygotowaniu próbek do analizy zainicjowało opracowanie licznych technik opartych na ekstrakcji analitów na powierzchni materiału sorpcyjnego. Opracowana przez Pawliszyna i jego współpracowników technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) jest uważana za innowacyjne podejście w dziedzinie przygotowania próbek do analizy. Rozwój tej techniki

zapoczątkował trend zmierzający w kierunku zminimalizowania ilości używanego rozpuszczalnika, miniaturyzacji i automatyzacji oraz skrócenia czasu wielu czasochłonnych etapów przygotowania próbki do analizy. Inspiracją techniką SPME spowodowała szybki rozwój technik opartych na ekstrakcji analitów na powierzchni materiału sorpcyjnego. W tym przypadku proces ekstrakcji opiera się na zjawisku podziału analitu pomiędzy matrycą próbki a sorbentem. Dostępne handlowo włókna ekstrakcyjne są kombinacją pięciu sorbentów: - polidimetylosiloksanu (PDMS), - diwinylobenzenu (DVB), - poliakrylu (PA), - carboxenu (CW), - glikolu polietylenowego (PEG) [73]. Zjawiska absorpcji i adsorpcji odgrywają ważną rolę w procesie izolacji i wzbogacenia analitów. Techniki oparte na mikroekstrakcji analitów na powierzchni materiału sorpcyjnego umożliwiły zredukowanie ilości wykorzystywanych toksycznych i niebezpiecznych rozpuszczalników, dlatego zaczęto je nazywać „zielonymi” metodami przygotowania próbek do analizy. Ogólny podział technik sorpcyjnych opartych na mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej przedstawiono na Rysunku 13.



Rysunek 13. Schematyczny podział technik sorpcyjnych należących do grupy technik mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej.

Najnowszym podejściem do izolacji analitów z próbek ciekłych jest wykorzystanie specjalnej tkaniny posiadającej specyficzne właściwości sorpcyjne (technika FPSE). Została opracowana przez zespół naukowców Abuzara Kabira i Kennetha G. Furtona na Uniwersytecie we Florydzie w 2014 roku [74]. Technika FPSE (ang. *Fabric phase sorptive extraction*) charakteryzuje się szybkością, prostotą, małymi kosztami i dużą efektywnością ekstrakcji. Niewątpliwą zaletą tej techniki jest niewielkie zużycie próbki i odczynników oraz prostota wykonania, bowiem w procedurze wykorzystuje się jedynie wytrząsanie i wirowanie próbki. Akcesoria wykorzystywane podczas przygotowania próbki są zazwyczaj na wyposażeniu laboratorium, a należą do nich: mieszadło magnetyczne z mieszadelkiem, bądź wytrząsarka, zlewka, fiolka oraz pęseta (Rysunek 14). Technika ta charakteryzuje się dużymi odzyskami oznaczanych związków.



Rysunek 14. Niezbędne akcesoria do przeprowadzenia ekstrakcji z wykorzystaniem techniki FPSE.

Technika FPSE polega na sorpcji analitów na powierzchni włókien tkaniny. Powierzchnia tych włókien może być modyfikowana różnymi grupami funkcyjnymi zapewniającymi tkaninie żądane właściwości sorpcyjne.

7. Techniki analityczne wykorzystywane do oznaczania bisfenolu A

Rozwój nowoczesnych technik analitycznych zapewnia możliwość oznaczania substancji, które występują w śladowych ilościach w próbkach charakteryzujących się skomplikowaną matrycą. Obecnie istnieje kilka znanych procedur analitycznych wykorzystywanych do oznaczania bisfenolu A. W metodykach tych na etapie oznaczeń końcowych, po odpowiednim przygotowaniu próbek, stosuje się głównie techniki chromatograficzne (chromatografię gazową i wysokosprawną chromatografię ciekłą) oraz immunologiczne [75].

Do oznaczenia bisfenolu A mogą być wykorzystane techniki immunochemiczne. Wśród nich najpowszechniej stosowaną techniką do oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy jest test immunoenzymatyczny ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*) [1,76].

Techniki immunologiczne charakteryzują się łatwością wykonania oraz niskimi kosztami. Pomimo wymienionych zalet, nie rekomenduje się ich do oznaczania bisfenolu A w próbkach biologicznych, ponieważ charakteryzują się one małą czułością. Ponadto ze względu na złożony skład próbek biologicznych istnieje możliwość interakcji z substancjami przeszkadzającymi obecnymi w matrycy [1]. Obecnie dostępne są handlowo dostępne zestawy do wykonywania testów ELISA do oznaczania zawartości bisfenolu A w próbkach biologicznych. Zestaw taki ma zakres pomiarowy od 0,3-100 ng/ml [77].

Istotą testu immunologicznego jest konkurowanie cząsteczek bisfenolu A obecnych w próbce z koniugatem enzymatycznym bisfenolu A o miejsce wiązania się z ograniczoną liczbą specyficznych przeciwciał monoklonalnych unieruchomionych na sorbencie mikro płytki. Po wymieszaniu próbki rzeczywistej oraz koniugatu, zawartość przenosi się do studzienek mikro płytki. W celu związania cząsteczek bisfenolu A z przeciwciałami, mieszaninę pozostawia się na pewien czas [1]. Enzym zawarty w koniugacie katalizuje konwersję substratu w barwny produkt, którego zawartość można oznaczyć metodą spektrofotometryczną przy długości fali wynoszącej 420 nm. Intensywność barwy jest proporcjonalna do stężenia przeciwciał w próbce. Jeśli z powierzchnią sorbentu mikro płytki zwiąże się więcej cząsteczek bisfenolu A pochodzących z próbki rzeczywistej, to powstaje produkt o mniejszym zabarwieniu. Wskazuje to na większe stężenie tego związku w próbce rzeczywistej w porównaniu ze stężeniem bisfenolu A w koniugacie. Należy zaznaczyć, że złożone matryce, takie jak krew czy mocz wymagają wcześniejszego przygotowania przed zastosowaniem wobec nich testu ELISA (np. przeprowadzenia ekstrakcji za pomocą rozpuszczalników lub ekstrakcji do fazy stałej) [6,22].

Technika chromatografii gazowej sprzężona ze spektrometrią mas jest często wykorzystywaną techniką do oznaczania bisfenolu A w różnego rodzaju matrycach. Ze względu na małą lotność bisfenolu A często przekształca się go w pochodną, co stanowi dodatkowy etap w przygotowaniu próbki do analizy. W oznaczaniu bisfenolu A w próbkach biologicznych derywatywacji chemicznej można dokonać za pomocą związków chemicznych takich jak: bezwodnik octowy, N-O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid (BSTFA), bromek pentafluorobenzylu (PFBBR) czy chlorek 4-(4,5-difenylo-1-imidazoilo) benzoilu (DIB-Cl) [6].

Analiza dostępnych danych literaturowych prowadzi do wniosku, że technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej jest najczęściej wykorzystywaną techniką do

oznaczania bisfenolu A w próbkach biologicznych. Chromatografy cieczowe mogą być połączone z różnymi detektorami, takimi jak: spektrofotometryczny (UV-ViS, ang. *ultraviolet visible detector*) [78], fluorescencyjny (FLD, ang. *fluorescence detector*) [69,79], elektrochemiczny (ED, ang. *electrochemical detector*), spektrometr mas [80] lub tandemowy spektrometr mas (MS/MS, ang. *tandem mass spectrometer*) [2,81].

Detektor UV-ViS jest rzadko stosowanym detektorem do oznaczania śladowych ilości bisfenolu A. Spowodowane jest to tym, że chromofor w cząsteczce bisfenolu A w niewielkim stopniu wykazuje zdolność absorpcji promieniowania, co wiąże się to z małą czułością detekcji [81]. Do oznaczania bisfenolu A znacznie częściej znajduje zastosowanie detektor fluorescencyjny, ponieważ fluorofor w cząsteczce bisfenolu A jest znacznie silniejszy. Literaturowa długość fali wzbudzenia bisfenolu A wynosi 275 nm [69,79], aczkolwiek wśród przeprowadzonych badań stosowany bywa również zakres 224-235 nm. Zakres długość fali emisji waha się między 300 a 317 nm [6,69,79].

Często stosowaną techniką do oznaczania bisfenolu A jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS). Za pomocą tej techniki możliwe jest jednoczesne przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej. Główne zalety układu LC-MS to wysoka selektywność, wysoka czułość oraz uniwersalność stosowania. Natomiast technika chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas HPLC-MS/MS cechuje bardzo wysoka selektywność, czułość wyższa niż w układzie LC-UV/ViS oraz wysoka przepustowość ze względu na szybsze analizy przeprowadzane bez konieczności rozdzielania wszystkich badanych substancji. Układ HPLC-MS/MS jest szczególnie przydatny do analizy wieloskładnikowych mieszanin oraz uzyskania informacji o strukturze poszczególnych składników.

Wprowadzenie do próbki znakowanego izotopowo bisfenolu A m.in. BPA- d_8 , BPA- d_{14} , BPA- d_{16} na etapie przygotowania próbki do analizy może poprawić precyzję oraz dokładność oznaczania zawartości bisfenolu A z wykorzystaniem techniki LC-MS ze względu na możliwość wyeliminowania efektu matrycy, efektów związanych z utratą analitu lub różną objętością ekstraktów [82]. W Tabeli 6 zestawiono informacje o warunkach rozdzielania i oznaczania bisfenolu A w próbkach biologicznych oraz żywności.

Tabela 6. Informacje literaturowe nt. wykorzystania różnych procedur analitycznych do oznaczania zawartości bisfenolu A w próbkach biologicznych i żywności.

Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	Technika analityczna	Warunki analizy	Zakres stężeń	Literatura
Próbki biologiczne					
Surowica	Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz za pomocą 0,2 M HCl – chloroform, derywatywacja za pomocą DIB-Cl	HPLC-FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Protein & Peptide C18 (Vydac, 150 x 4,6 mm) • Skład fazy ruchomej: ACN:0,1 M bufor octanowy (pH=5,5):MeOH, (55:12:33, v/v/v); elucja izokratyczna • Natężenie przepływu: 0,3 mL/min 	0,21 – 0,79 ng/mL	[83]
Surowica	Ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent typu OASIS HLB 60 mg/3 mL)	HPLC-ED	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: CAPCELL PAK UG 120 C18 (Shiseido, 150 x 4,6 mm) • Skład fazy ruchomej: H₂O + 0,3% H₃PO₄:ACN (60:40, v/v); elucja izokratyczna • Natężenie przepływu: 1 mL/min 	~0.32 ng/mL w surowicy ochotników	[81]
Surowica	Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz za pomocą mieszaniny acetonitrylu i buforu fosforanowego (35:65) oraz 25% kwasu nadchlorowego	HPLC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Onyx Monolithic C18 (Phenomenex, 150 x 4,6 mm) • Skład fazy ruchomej: ACN: bufor fosforanowy (pH=6,0) (35:65, v/v); elucja izokratyczna • Natężenie przepływu: 1 mL/min 	0,79 – 7,12 ng/mL w surowicy kobiet cierpiących na endometriozę	[84]
Surowica	Strącenie białek za pomocą acetonitrylu	HPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Acquity UPLC BEH C18 (Waters 50, x 2,1 mm, 1,7 μm) • Skład fazy ruchomej: H₂O:MeOH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,4 mL/min 	<LOD	[85]
Surowica	Ekstrakcja w układzie ciecz- ciecz za pomocą octanu etylu poprzedzająca derywatyzację za pomocą N-metylo-N-(tert-butylo-dimetylosililo) trifluoroacetamidu oraz 0,1% tert-butylo-dimetylo-chlorosilanu	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Zebron ZB-5MS (Phenomenex, 30 × 0,25 mm 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1,1 mL/min 	1.30 – 8.17 ng/mL w surowicy ciężarnych kobiet	[86]

Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	Technika analityczna	Warunki analizy	Zakres stężeń	Literatura
Surowica	Denaturacja białek za pomocą kwasu mrówkowego, ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorwent Oasis HLB), derywatyżacja za pomocą bezwodnika kwasu pentafluoropropionowego. Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz za pomocą mieszaniny heksan-dichlorometan (4:1, v/v) i dodatku 2% K ₂ CO ₃	GC -MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: DB-5 (J&W Scientific, 15 × 0,25 mm, 0,1 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	~0,71 ng/mL w surowicy ochotników	[87]
Surowica	Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz poprzedzająca ekstrakcję do fazy stałej (sorenty typu Envi-Florisil i Oasis HLB), derywatyżacja ekstraktów za pomocą N-(trimetylosililo) trifluoroacetamidu MSTFA	GC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Zebron ZB-5HT (Phenomenex, 30 × 0,25 mm, 0,1 μm) • Gaz nośny: Azot • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • <LOD – 10,4 ng/mL w surowicy kobiet będących w 2. trymestrze ciąży; • <LOD – 3,05 ng/mL w surowicy kobiet po porodzie 	[1]
Surowica	Dodatek do próbki 10% metanolu, naniesienie próbki na kolumnę do SPE (sorwent Oasis HLB), dodatek 0,2 mL buforu fosforanowego	Komercyjny zestaw do przeprowadzenia testu ELISA Spektrofotometr – pomiar przy długości fali 420 nm	-	<ul style="list-style-type: none"> • 2,5 ng/mL w surowicy zdrowych kobiet, • 2,9 ng/mL w surowicy kobiet cierpiących na endometriozę 	[22]
Mocz	Reakcja hydrolizy za pomocą enzymu β-glukuronidazy/sulfatazy. Ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorwent Oasis HLB)	UPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Acquity BEH PHENYL (Waters, 100 x 2,1 mm, 1,7 μm) • Skład fazy ruchomej: H₂O + 0,1% FA:ACN + 0,1% FA; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,4 mL/min 	1,31-1,98 ng/mL	[88,89]
Mocz	<u>Wolny bisfenol A</u> Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz za pomocą heksanu, derywatyżacja za pomocą chlorku dansylu	ID-LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Acquity UPLC HSS T3 (Waters, 50 x 2,1 mm, 1,8 μm) • Skład fazy ruchomej: H₂O + 0,1% FA:ACN; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,4 mL/min 	<LOD–0,215 ng/mL	[90]
Mocz	<u>Sprzężony bisfenol A</u> Ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorwent typu Strata X-AW 100 mg/3 mL)	ID-LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Acquity UPLC HSS T3 (Waters, 50 x 2,1 mm, 1,8 μm) • Skład fazy ruchomej: H₂O + 2% NH₄OH:MeOH + 0,1% NH₄OH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,4 mL/min 	<LOD–20,6 ng/mL	[90]

Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	Technika analityczna	Warunki analizy	Zakres stężeń	Literatura
Mocz	<u>Całkowity bisfenol A</u> Reakcja hydrolizy po dodaniu β-glukuronidazy w buforze octanowym o pH 5 przez 3 h w 37°C, dodanie ACN i węglanu potasu, dodanie bromku 2,3,4,5,6-pentafluorobenzylowego i ogrzewanie przez 2 h w 70°C, następnie dodanie mieszaniny dichlorometanu i heksanu w stosunku (8:92, v:v)	GC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: HP-5 MS (Agilent Technologies, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<LOD–21,0 ng/mL	[90]
Mocz	<u>Całkowity bisfenol A</u> Reakcja hydrolizy za pomocą enzymu β-glukuronidazy/sulfatazy w środowisku 0,1 M kwasu mrówkowego. Inkubowanie przez 4 h w 37°C, Następnie dodanie do próbki 750 μL 0, M kwasu mrówkowego	SPE–HPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Chromolith® High Resolution RP-18e (Merck KGaA, 100 x 4,6 mm) • Skład fazy ruchomej: H₂O:MeOH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,9 mL/min 	Całkowity bisfenol A <LOD–37,7 ng/mL Wolny bisfenol A <LOD–0,11 ng/mL	[91,92]
Mocz	Dodanie do próbki moczu 0,5 M kwasu solnego do pH=4. Przefiltrowanie, ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent 80 mg LiChrolut EN), derywatywacja za pomocą BSTFA + 1% TMCS	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: (J & W, Folsom, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<LOD–8,9 ng/mL	[93]
Mocz	<u>Wolny bisfenol A:</u> Ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Oasis HLB 200 mg/5 mL) <u>Całkowity bisfenol A</u> Dodanie do próbki moczu 5 mL buforu cytrynowego o pH=4,5-5. Reakcja hydrolizy za pomocą enzymu β-glukuronidazy przez 16 h w 37°C. Następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Oasis HLB 200 mg/5 ml)	UPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Acquity UPLC®BEH C18 (Waters, 100 x 2,1 mm, 1,7 μm) • Skład fazy ruchomej: H₂O + 1 mM octan amonu; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,3 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Wolny bisfenol A 0,036–0,119 ng/mL • Całkowity bisfenol A 0,243–6,812 ng/mL 	[94]
Próbki żywności					
Pomidory (bez skórki, cherry, koncentrat pomidorowy)	Homogenizacja, a następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Sep-Pak light Florisil 145 mg)	HPLC-DAD HPLC-FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Microsorb 300-C18 (Agilent Technologies, 250 x 4,6 mm, 5 μm) • Skład fazy ruchomej: H₂O:ACN; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 1 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Pomidory bez skórki 0,31-3,77 μg/kg • Pomidory cherry 0,87-2,21 μg/kg • Koncentrat pomidorowy 0,39-1,82 μg/kg 	[49]

Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	Technika analityczna	Warunki analizy	Zakres stężeń	Literatura
Owoce Warzywa	Homogenizacja, ekstrakcja z wykorzystaniem techniki QuEChERS, dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz DLLME oraz derywatywacja za pomocą bezwodnika octowego	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: DB-5MS (J & W, Folsom, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Owoce <LOD – 10,2 μg/kg • Warzywa 6,5 – 265,6 μg/kg 	[40]
Napoje	Odgazowanie, a następnie ekstrakcja/oczyszczanie z wykorzystaniem sorbentu składającego się z nanocząstek magnetycznych pokrytych hemicelami utworzonymi przez reszty kwasu tetradekanowego	HPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Symmetry Shield RP18 (Waters, 50 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) • Skład fazy ruchomej: H₂O:MeOH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,4 mL/min 	0,066–1,08 ng/mL	[95]
Napoje	Odgazowanie, a następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent ODS C18, 500 mg/6 mL), derywatywacja za pomocą BCEC-Cl	HPLC-FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Hypersil BDS C8 (Dalian Elite Analytical Instruments Co., Ltd., 200 mm × 4,6 mm, 5 μm) • Skład fazy ruchomej: 5% ACN w H₂O:ACN; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 1 mL/min 	<LOD- 0,86 μg/L	[96]
Napoje, mleko w proszku	Ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Sep-Pak C18 500 mg)	HPLC - MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Eclipse XDB-C8 (Agilent Technologies, 150 mm × 4,6 mm, 5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: 1 L H₂O + 1 mL 25% NH₃, B: ACN + 1 mL 25% NH₃; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,5 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Napoje 310-1460 ng/L • Mleko w proszku 11,820 – 15,310 ng/kg 	[97]
Produkty zbożowe, wyroby cukiernicze, wyroby mięsne/mięso, ryby, nabiał	Ekstrakcja za pomocą acetonitrylu, w przypadku próbek o wysokiej zawartości tłuszczów, ekstrakt oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii żelowej GPC, derywatywacja poprzez acetylowanie	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: VF-5 ms (Varian, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: - • Natężenie przepływu gazu: - 	<LOD – 29 ng/g	[66]
Owoce morza	Ekstrakcja z wykorzystaniem techniki QuEChERS oraz DLLME, derywatywacja za pomocą bezwodnika octowego	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: DB-5MS (J & W, Folsom, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<LOD – 99,9 μg/kg	[98]

Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	Technika analityczna	Warunki analizy	Zakres stężeń	Literatura
Napoje, nabiał, ryby i owoce morza, zboża i produkty zbożowe, mięso i produkty mięsne, owoce i przetwory owocowe, warzywa i przetwory warzywne	<ul style="list-style-type: none"> • Produkty stałe: homogenizacja, zamrożenie, ekstrakcja za pomocą acetonitrylu, a następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Strata NH₂ 200mg/3mL) • Próbkę olejowe: homogenizacja, ekstrakcja za pomocą acetonitrylu, a następnie ekstrakcja do fazy stałej (sorbent Strata NH₂ 200mg/3mL) • Napoje: ekstrakcja za pomocą octanu etylu, a następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Strata NH₂ 200 mg/3mL) • Nabiał: ekstrakcja za pomocą acetonitrylu, a następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Oasis MCX 60 mg/5 ml) 	HPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Betasil C18 (Thermo, Waltham, 100 mm × 2,1 mm, 5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: H₂O, B: MeOH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,3 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Warzywa <0,01–146 ng/g • Ryby i owoce morza <0,01–47,4 ng/g <ul style="list-style-type: none"> • Nabiał <0,01–20,8 ng/g • Napoje <0,01–3,41 ng/g • Owoce <0,01–6,52 ng/g 	[99]
Napoje bezalkoholowe (cola, lemoniada, tonic)	Odgazowanie	on-line SPE-LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Ascentis Express C18 (Supelco, 50 mm × 2,1 mm, 2,7 μm) • Skład fazy ruchomej: A: H₂O, B: MeOH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,6 mL/min 	<LOD- 607 ng/L	[100]
Groszek zielony, kukurydza, pomidory, groch, owoce koktajlowe, ananas, brzoskwinie, ravioli, wieprzowina, ryby, makaron, zupy, różne warzywa	Homogenizacja, a następnie ekstrakcja za pomocą acetonitrylu	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna 1: Pursuits XRs C18 (Agilent Technologies, 150 mm × 2 mm, 3 μm) • Skład fazy ruchomej 1: A: H₂O, B: MeOH; elucja gradientowa • Kolumna 2: Luna C8 (Phenomenx, 150 mm × 2 mm, 3 μm) • Skład fazy ruchomej 2: A: H₂O:ACN (95:5), B: ACN:H₂O (95:5); elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,4 mL/min 	<LOD – 790 ng/g	[39]
Woda, mleko	<ul style="list-style-type: none"> • Woda: derywatywacja za pomocą chloromrówczanu etylu, ekstrakcja do fazy stacjonarnej SPME • Mleko: strącenie białek za pomocą 2,5% kwasu trójchlorooctowego, derywatywacja za pomocą chloromrówczanu etylu, ekstrakcja do fazy stacjonarnej SPME 	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: VF-5MS (Varian, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<LOD - 70 μg/L	[101]

Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	Technika analityczna	Warunki analizy	Zakres stężeń	Literatura
Kukurydza, koncentrat pomidorowy, gulasz, tuńczyk	Homogenizacja, ekstrakcja za pomocą acetonitrylu, a następnie ekstrakcja do fazy stacjonarnej SPME	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: HP-5 (Agilent Technologies, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Przed ogrzewaniem: 1,23 - 32,55 μg/kg • Po ogrzewaniu: 6,86 – 50,67 μg/kg 	[102]
Mleko w proszku dla niemowląt Mleko w proszku, odtłuszczone	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika ASE	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Gemini C18 (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: H₂O + 0,1% NH₃, B: MeOH/ACN + 0,1% NH₃ (90/10, v/v); elucja izokratyczna: 95% B • Natężenie przepływu: 0,4 mL/min 	<LOD – 1,29 mg/kg	[75]
Świeże ryby	Liofilizacja, homogenizacja, a następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Oasis HLB 200 mg/6 ml)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Zorbax XDB-C18 (Agilent Technologies, 50 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: H₂O, B: MeOH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,25 mL/min 	<LOD – 2,0 ng/g	[103]
Woda	Ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent Supelclean ENVI-18 500 mg/3 ml), a następnie derywatywacja za pomocą chlorku pentafluorobenzoilu	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: DB-5MS (Agilent Technologies, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<LOD – 324 ng/L	[47]
Świeże mięso i ryby, konserwy, karma dla zwierząt	Homogenizacja, ekstrakcja acetonitrylem, ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz za pomocą heksanu, a następnie oczyszczanie ekstraktu z wykorzystaniem sorbentu ENVI- Carb, derywatywacja za pomocą BSTFA	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: DB-5MS (Agilent Technologies, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: - • Natężenie przepływu gazu: 2 mL/min 	<LOD – 65,0 ng/g	[104]
Groszek, groszek z marchewką, słodka kukurydza, karczochy, grzyby, fasola, mix warzyw	Derywatywacja za pomocą BSTFA, ekstrakcja do fazy stacjonarnej SPME	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: SLB-5MS (Supelco, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1 mL/min 	<LOD – 77,7 ng/g	[105]
Żywność dla dzieci	Ekstrakcja za pomocą acetonitrylu, ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent C18), a następnie derywatywacja za pomocą bezwodnika octowego	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: HP-5MS (Agilent Technologies, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1,2 mL/min 	<LOD – 7,2 ng/g	[106]

Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	Technika analityczna	Warunki analizy	Zakres stężeń	Literatura
Napoje bezalkoholowe	Ekstrakcja do fazy stałej (sorbent C18), a następnie derywatywacja za pomocą bezwodnika octowego	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: HP-5MS (Agilent Technologies, 30 × 0,25 mm, 0,25 μm) • Gaz nośny: Hel • Natężenie przepływu gazu: 1,2 mL/min 	<LOD – 4,5 μg/L	[107]
Owoce, warzywa	Mikroekstrakcja koacerwacyjna	LC-FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Hypersil ODS C18 (Analisis Vinicos, 150 mm × 4,6 mm, 5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: H₂O, B: ACN; elucja izokratyczna: 50%B (Owoce); • Skład fazy ruchomej: A: H₂O, B: ACN; elucja gradientowa (Warzywa); • Natężenie przepływu: 1 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Owoce 7,8 – 24,4 ng/g • Warzywa 55 – 103 ng/g 	[108]
Jajka, mleko	Homogenizacja, ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem MSPD, a następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent aminopropylowy 500mg/3mL)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Symmetry C18 (Waters, 150 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: H₂O + 0,1% NH₃, B: MeOH + 0,1% NH₃; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,2 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Mleko: <LOD – 0,49 μg/kg • Jajka: <LOD – 10,45 μg/kg 	[109]
Mleko w proszku, mleko dla niemowląt	Ekstrakcja do fazy stałej (sorbent C18), a następnie derywatywacja za pomocą BSTFA z 1% TMCS	GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: DB-5MS (30 m×0,25 mm 0,25 μm) 	44 – 113 ng/g	[110]
Ryby	Homogenizacja, ekstrakcja za pomocą acetonitrylu, po przefiltrowaniu oczyszczono ekstrakt z wykorzystaniem sol-żel pre kolumny połączonej z kolumną immunopowinowactwa	HPLC-FLD	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Spherisorb S ODS 1 (Knauer, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: 50 mM octan sodu (pH 4,8), B: ACN; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 1 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Makrela 2 – 4 ng/g • Tuńczyk 6 – 59 ng/g 	[111]

Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	Technika analityczna	Warunki analizy	Zakres stężeń	Literatura
Mięso (wieprzowina, ryby, mięso z królika, mięso z kaczki, kurczak, baranina, wołowina)	Homogenizacja, ekstrakcja ASE, a następnie ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent: aminopropylowy 500 mg/3mL)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Symmetry C18 (Waters, 150 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: H₂O + 0,1% NH₄OH, B: MeOH + 0,1% NH₄OH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,2 mL/min 	<ul style="list-style-type: none"> • Wieprzowina <LOD – 7,08 μg/kg • Baranina <LOD – 0,54 μg/kg • Kurczak <LOD – 0,73 μg/kg • Wołowina <LOD – 0,33 μg/kg • Mięso z kaczki 0,49 – 0,85 μg/kg • Ryby <LOD – 1,01 μg/kg 	[112]
Napoje bezalkoholowe	Ekstrakcja do fazy stałej SPE (sorbent: OASIS HLB 200 mg)	LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kolumna: Symmetry C18 (Waters, 150 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) • Skład fazy ruchomej: A: H₂O + 0,1% NH₄OH, B: MeOH + 0,1% NH₄OH; elucja gradientowa • Natężenie przepływu: 0,2 mL/min 	<LOD	[113]

8. Problemy związane z oznaczaniem bisfenolu A

Oznaczanie bisfenolu A, szczególnie na niskim poziomie stężeń, jest wyzwaniem dla chemików analityków. Śladowe jego ilości mogą być obecne w rozpuszczalnikach, naczyniach laboratoryjnych i w produktach z tworzyw sztucznych, co znacznie utrudnia opracowanie metodyki analitycznej cechującej się wysoką czułością i dobrą powtarzalnością wyników [114–116]. Ostatnie doniesienia naukowe wskazują, że śladowe ilości bisfenolu A mogą być również obecne w wodzie, oczyszczonej za pomocą systemu Milli-Q. Prawdopodobnie ultra-czysta woda może zostać zanieczyszczona przez kontakt z tworzywami sztucznymi, obecnymi w systemie do jej produkcji. Naukowcy oznaczyli zawartość bisfenolu A w próbce wody uzyskanej z systemu Milli-Q. W pobranej próbce wody zawartość bisfenolu A była na poziomie 0,02 ng/mL [68,81,117].

Ponadto, materiał wykorzystywany do produkcji kolumnienek do SPE również może stanowić źródło bisfenolu A i dodatkowo zanieczyszczać próbkę rzeczywistą już na etapie jej przygotowania do analizy [81]. Bisfenol A można skutecznie wymyć z kolumnienki poprzez przemycie jej co najmniej 15 mL metanolu. Podczas przenoszenia roztworu wzorcowego bisfenolu A lub próbek rzeczywistych za pomocą pipet Pasteura wykonanych z tworzyw sztucznych można doprowadzić do skażenia próbek bisfenolem A, a uzyskane wyniki oznaczeń końcowych mogą być obarczone błędem [118].

Obecnie znane są już procedury umożliwiające zredukowanie zawartości BPA w materiałach i odczynnikach użytych podczas przygotowania próbek do analizy [119]. Zaleca się unikania kontaktu próbek z materiałami z tworzyw sztucznych podczas ich pobierania i przygotowania do analizy. Zaproponowano również odpowiednie przygotowanie naczyń laboratoryjnych, zaczynając od ich wygrzewania w wysokiej temperaturze (4 h w 400°C), a kończąc na myciu ultra czystą wodą, metanolem i acetonem [68,117,120].

Zauważalna, a co gorsze zmienna, wartość tła, utrudnia uzyskanie wyników o dobrej powtarzalności. W szczególności dotyczy to oznaczeń bisfenolu A na poziomie śladów. Dlatego tak ważne jest wyeliminowanie potencjalnych źródeł zanieczyszczenia próbki bisfenolem A na etapie jej przygotowania do analizy.

II. CEL I ZAKRES PRACY

Związki zakłócające działanie układu endokrynnego to szerokie spektrum substancji chemicznych wykrywanych w wodzie, powietrzu, glebie oraz pożywieniu, które poprzez podobieństwo w budowie do hormonów steroidowych zaburzają ich naturalne działanie. Niepożądane skutki działania związków endokrynnie czynnych mogą stanowić jedną z przyczyn rozwoju chorób cywilizacyjnych. Właściwa diagnoza, postawiona we wczesnym stadium rozwoju choroby, ma zazwyczaj kluczowe i korzystne znaczenie dla skutecznego jej leczenia. Nic więc dziwnego, że wciąż poszukuje się nowych rozwiązań celem szybkiej diagnostyki różnych chorób. Współczesna medycyna pokłada wszelkie wysiłki w celu przedłużenia życia pacjentów. Nie ogranicza się jedynie do leczenia chorób, lecz stara się również uzyskać możliwie jak najbardziej wiarygodne wyniki diagnostyczne niezbędne do profilaktyki. Od lat prowadzone są badania nad możliwością oznaczania w próbkach biologicznych substancji, których zwiększone stężenie może być związane ze zwiększonym prawdopodobieństwem zachorowania na poszczególne choroby.

Analiza dostępnych danych literaturowych prowadzi do wniosku, że społeczeństwo na całym świecie jest narażone na obecność bisfenolu A. Jego obecność wykryto nie tylko w produktach spożywczych, ale również w papierze termicznym, kurzu oraz w próbkach biologicznych. Wykrywanie oraz ilościowe oznaczenie bisfenolu A na coraz niższych poziomach stężeń, w próbkach o skomplikowanej matrycy, takich jak próbki materiału biologicznego, wymaga stałego rozwoju zaawansowanych technik analitycznych. Dotyczy to zarówno wykorzystywanych technik oznaczenia końcowego, które muszą cechować się wysoką czułością, jak i metod przygotowania próbek do analizy, które pozwolą na łatwą, efektywną i selektywną ekstrakcję analitów z matrycy badanej próbki.

Głównym celem pracy doktorskiej było opracowanie metod analitycznych do oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej i moczu. W ramach części eksperymentalnej podjęto się zbadania zależności między zwiększonym stężeniem bisfenolu A, a zachorowalnością na zespół policystycznych jajników. Zbadano również wpływ diety na zawartość tego związku w próbkach biologicznych.

Uzyskane wyniki badań będą pomocne w rozwiązaniu sporu dotyczącego obciążenia populacji na działanie bisfenolu A i konsekwencji narażenia zdrowia człowieka na ten związek.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Odczynniki i wzorce

Podczas realizacji części doświadczalnej zastosowano następujące odczynniki i substancje wzorcowe:

- Metanol do HPLC – firma *Merck*, Niemcy,
- Acetonityl do LC-MS – firma *Merck*, Niemcy,
- Izopropanol do HPLC – firma *Merck*, Niemcy,
- Woda dejonizowana – system HLP5 – firmy *Hydrolab*, Polska,
- Siarczan magnezu – firma *POCH*, Polska,
- Kwas octowy (cz.d.a.) – firma *POCH*, Polska,
- Octan amonu do HPLC – firma *Sigma-Aldrich* (czystość $\geq 99\%$), Niemcy,
- Bisfenol A – firma *Sigma-Aldrich* (czystość $\geq 99\%$), Niemcy,
- Deuterowany bisfenol A – firma *Sigma-Aldrich* (czystość $\geq 98\%$), Niemcy.
- Glukuronid dopaminy – firma *Santa Cruz Biotechnology*, USA.
- Chlorowodorek dopaminy – firma *Sigma-Aldrich*, Niemcy.
- β -glukuronidaza, typ HP-2 – firma *Sigma-Aldrich* ($\geq 100,000$ units/mL), Niemcy.

2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Do przeprowadzenia badań naukowych wykorzystano niżej wymienione urządzenia i sprzęt laboratoryjny:

- Chromatograf ciekłowy firmy *Agilent* seria 1200 wyposażony w pompę G1312A; termostat kolumny G1316C; automatyczny podajnik próbek G1367B; detektor spektrofotometryczny typu UV G1314B *Agilent Technologies* (USA); detektor tandemowy spektrometr mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol/liniowa pułapka jonowa 4000 Q TRAP® LC/MS/MS, *AB Sciex Instruments*, USA,
- Chromatograf ciekłowy firmy *Shimadzu* wyposażony w urządzenie do odgazowania fazy ruchomej DGU-20A5R, kontroler CBM-20A, dwukanałowa pompa Nexera X2 LC-30AD, automatyczny podajnik próbek Nexera X2 SIL-30AC oraz termostat kolumny CTO-20AC; detektor tandemowy spektrometr mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol LC-MS-8050, *Shimadzu*, Japonia,
- Kolumna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm \times 2,1 mm; 1,8 μ m) – firmy *Agilent*, USA,
- Kolumna Lichrospher RP-18e (250 mm \times 4,0 mm; 5 μ m) – firmy *Merck*, Niemcy,

- Kolumna Synergi Hydro-RP (150 mm × 4,6 mm; 4 μm) – firmy *Phenomenex*, USA,
- Dejonizator wody HLP5 – Hydrolab Polska, Polska,
- Kolumnienki do SPE –Strata-X33 μm *Polymeric RP* 3 ml/200 mg – firmy *Phenomenex*, Niemcy,
- Łaźnia ultradźwiękowa – firma *Bandelin Sonore*, Niemcy,
- Waga analityczna XP50H – firma *Mettler Toledo*, Szwajcaria,
- pH-metr CI-316 – firma *Elmetron*, Polska,
- Szklane wkładki redukcyjne z dnem stożkowym – firmy *Agilent*, USA,
- Komora do wykonywania ekstrakcji za pomocą techniki SPE– firma *Grace*, USA,
- Pipeta elektroniczna Handy Step – firmy *Brand*, Niemcy,
- Automatyczna pipeta (10, 100, 1000, 2500 μL) – firmy *Eppendorf*, Niemcy,
- Szklana strzykawka (5, 100 μL) – firmy *Hamilton*, USA.
- Fiolki do automatycznego podajnika próbek, o objętości 1,5 mL z nakrętkami z tworzywa sztucznego – firmy *Sigma-Aldrich*, Niemcy,
- Szklane probówki wirówkowe, Pyrex, USA,
- Probówki wirówkowe typu Eppendorf – firmy *Eppendorf*, Niemcy,
- Szklane butelki o objętości 250 mL – firmy *Schott Glass*, Niemcy,
- Cylindry miarowe szklane o objętości 50, 250, 500 mL – firmy *LABART*, Polska,
- Wirówka *Eppendorf AG Centrifuge 5702* – firmy *Eppendorf*, Niemcy.

3. Opracowanie metodyki oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS

Szerokie zastosowanie produktów wytwarzanych z udziałem bisfenolu A jest powodem narażenia człowieka na ten związek. Badania toksykologiczne wskazują na negatywny wpływ bisfenolu A na zdrowie ludzi. Nawet bardzo małe dawki (0,01 – 0,71 µg/kg/dzień) mogą mieć negatywny wpływ na gospodarkę hormonalną organizmu. Ostatnie doniesienia naukowe wskazują, że w organizmach kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników występują wyższe, w porównaniu do kobiet bez zaburzeń endokrynologicznych, stężenia bisfenolu A [23]. Jednym z celów pracy doktorskiej było opracowanie metodyki oznaczania śladowych ilości tego związku z surowicy krwi. Metodę tę wykorzystano następnie (w ramach współpracy z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym) do zbadania zależności między zwiększonym stężeniem bisfenolu A, a zachorowalnością na zespół policystycznych jajników. Badano również wpływ diety, potencjalnie bogatej w bisfenol A, na zawartość tego związku w surowicy krwi ludzkiej.

Do oznaczania śladowych ilości bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej wykorzystano technikę chromatografii ciekowej sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS). W kolejnych podrozdziałach opisano poszczególne kroki podjęte podczas optymalizacji każdego z etapów procedury analitycznej wraz z omówieniem wyników.

3.1. Dobór optymalnych warunków pracy tandemowego spektrometru mas MS/MS

Na przestrzeni ostatnich 20 lat technika spektrometrii mas znalazła szerokie zastosowanie w analityce chemicznej, ze względu na swoje unikalne cechy. Zważywszy na fakt, że charakteryzuje się ona wysoką czułością i selektywnością możliwe jest oznaczanie związków występujących na śladowych poziomach stężeń. Aby wykonać analizę przy użyciu tego rodzaju detekcji niezbędne jest przeprowadzenie analitów w formę zjonizowaną. W przypadku połączenia techniki chromatografii ciekowej ze spektrometrią mas najczęściej stosowaną techniką jonizacji jest jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym, która może zostać zrealizowana na wiele sposobów, przy czym w przypadku połączenia spektrometrii mas z wysokosprawną chromatografią ciekową (HPLC-MS) najczęściej wykorzystuje się trzy metody (jonizacja poprzez elektrorozpraszanie ESI, jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym APCI lub fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym APPI). Wybór sposobu jonizacji (tryb tworzenia jonów naładowanych dodatnio lub ujemnie) oraz techniki jonizacji ściśle zależy od właściwości analitów. Na podstawie badań roztworów wzorcowych

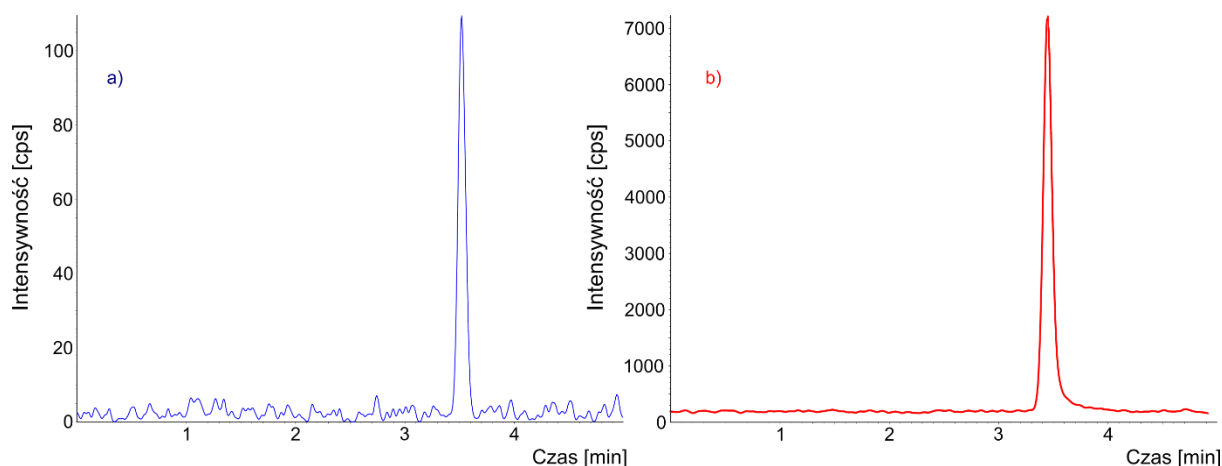
BPA oraz BPA- d_{16} wybrano tryb tworzenia jonów naładowanych ujemnie. Jako technikę jonizacji cząsteczek analitów wykorzystano technikę jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (Tabela 7), która jest szczególnie przydatna do jonizacji związków o charakterze niepolarnym.

Tabela 7. Porównanie przydatności techniki jonizacji oraz trybów jonizacji do identyfikacji i oznaczania bisfenolu A.

Technika jonizacji \ Tryb jonizacji	ujemny	dodatni
	APCI	++
ESI	+	-

++ bardzo duży sygnał; + duży sygnał; - brak sygnału

Wybór sposobu jonizacji (tryb tworzenia jonów naładowanych dodatnio lub ujemnie) oraz techniki jonizacji ściśle zależy od właściwości analitów. Cząsteczka bisfenolu A stosunkowo łatwo oddaje proton, dlatego pracowano w trybie tworzenia jonów ujemnych. Aby uzyskać jak największą wartość intensywności sygnału dla bisfenolu A, porównano efektywność dwóch technik jonizacji cząsteczek bisfenolu A – jonizację poprzez elektrorozpylanie i technikę jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (Rysunek 15).



Rysunek 15. Porównanie zastosowania dwóch technik jonizacji ESI (a) i APCI (b) do oznaczania bisfenolu A. Stężenie BPA w roztworze w obu przypadkach wynosiło 40 ng/mL.

Porównując powyższe chromatogramy widać zdecydowanie większą intensywność sygnału pochodzącego od bisfenolu A otrzymanego z wykorzystaniem techniki jonizacji APCI w porównaniu do intensywności sygnału uzyskanego za pomocą techniki ESI. W przypadku techniki ESI intensywność uzyskiwanego sygnału jest 60-cio krotnie mniejsza w stosunku do tego uzyskanego podczas zastosowania techniki APCI. Na podstawie wyników tego

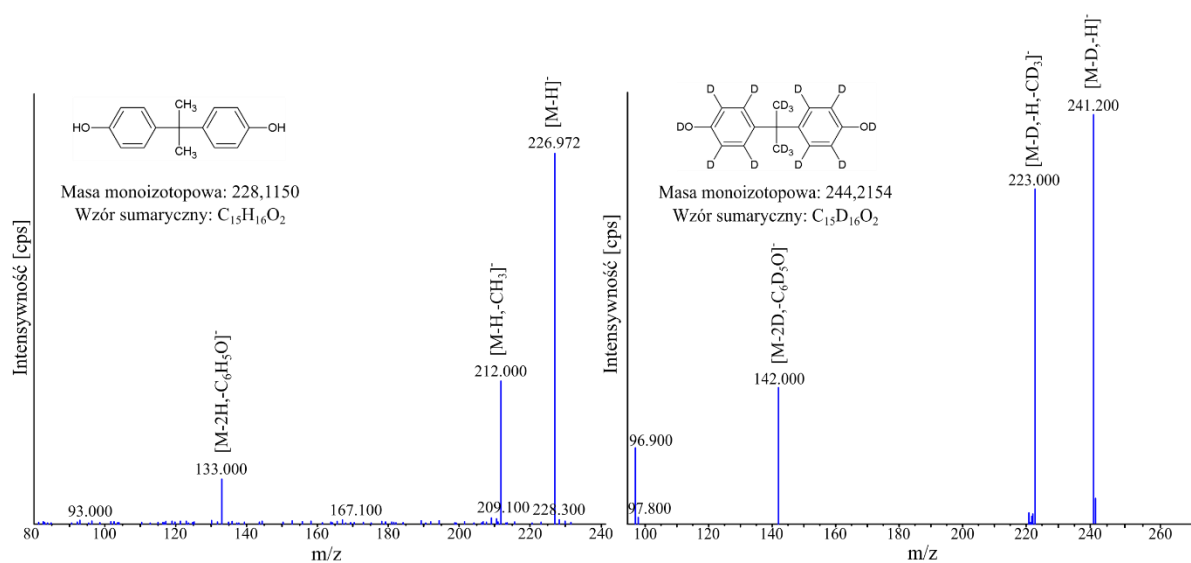
doświadczenia wybrano technikę jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI), jako tę, która zapewnia wyższą czułość detekcji.

Optymalne warunki pracy tandemowego spektrometru mas zostały wyznaczone poprzez wprowadzenie roztworu wzorcowego BPA oraz roztworu wzorcowego BPA- d_{16} do układu HPLC-MS/MS pracującego w trybie FIA. W Tabeli 8 zestawiono informacje o optymalnych parametrach pracy tandemowego spektrometru mas dla BPA i BPA- d_{16} . Analizy te zostały przeprowadzone z wykorzystaniem tandemowego spektrometru mas 4000 Q TRAP.

Tabela 8. Informacje o parametrach pracy tandemowego spektrometru mas pracującego w trybie MRM tworzenia jonów naładowanych ujemnych.

	MW	MRM	Dwell (ms)	DP [eV]	CE [eV]	CXP [eV]	CUR [psi]	TEM [°C]	GS1 [psi]	NC [eV]	EP [eV]	IS [eV]
BPA	228,287	226,972→212,000	150	-100	-26	-9	20	490	70	-5	-10	-
BPA- d_{16}	244,385	241,200→142,000		-85	-38	-23						

Uzyskane widma fragmentacyjne dla BPA i BPA- d_{16} zostały przedstawione na Rysunku 16.

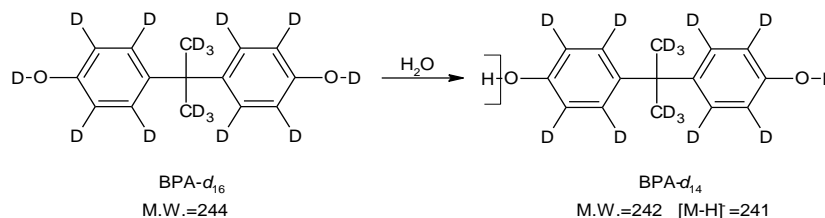


Rysunek 16. Widma fragmentacyjne dla BPA i BPA- d_{16} uzyskane w trybie FIA z zastosowaniem tandemowego spektrometru mas.

Podczas jonizacji cząsteczki bisfenolu A za pomocą techniki APCI (-) tworzą się jony będące wynikiem odszczepienia protonu [M-H]⁻, grupy metylowej oraz grupy C₆H₅O – stąd na widmie MS widoczne są odpowiednio jony m/z = 226,972, 212,000 oraz 133,000.

Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt, że w wyniku jonizacji cząsteczki wzorca wewnętrznego o masie cząsteczkowej równej 244,385 powstał jon pseudomolekularny o stosunku masy do ładunku m/z=241,200. Powodem tego zjawiska najprawdopodobniej jest obecność w cząsteczce wzorca wewnętrznego dwóch grup hydroksylowych, w których atomy wodoru zastąpione są atomami deuteru. Ze względu na kwasowy charakter tych atomów, są

one łatwo wymieniane na atomy wodoru w środowisku protycznym (np. w wodzie). Przebieg hipotetycznej reakcji cząsteczki wzorca wewnętrznego z cząsteczką wody przedstawiono na Rysunku 17. Z kolei wiązanie pomiędzy atomami deuteru a atomami węgla jest silniejsze i w tych warunkach atomy deuteru nie są wymieniane na atomy wodoru.

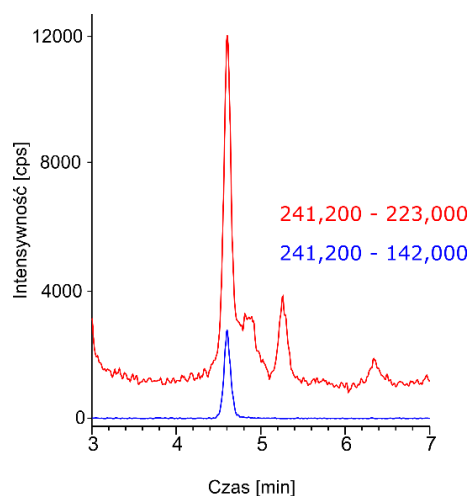


Rysunek 17. Reakcja cząsteczki wzorca wewnętrznego (BPA- d_{16}) z cząsteczką wody.

Podczas optymalizacji parametrów pracy tandemowego spektrometru mas dla cząsteczki wzorca wewnętrznego BPA- d_{16} , zaobserwowano dwa przejścia MRM:

- 241,200 → 223,000 [M-D, -H]⁻ → [M-D, -H, -CD₃]⁻
- 241,200 → 142,000 [M-D, -H]⁻ → [M-2D, -C₆D₅O]⁻

Przejście MRM 241,200 → 223,000 charakteryzuje się większą intensywnością w porównaniu z przejściem MRM 241,200 → 142,000. Jednakże w trakcie prac związanych z oznaczaniem śladowych ilości bisfenolu A w próbkach surowicy zauważono niezadowalającą selektywność tego przejścia. W próbkach surowicy, przejście to okazało się niespecyficzne, dlatego w dalszych etapach pracy doktorskiej postanowiono monitorować przejście MRM 241,200 → 142,000 charakteryzujące się większą selektywnością i specyficzną pomimo mniejszej intensywności. Przykładowy chromatogram obrazujący niespecyficzną odpowiedź detektora MS/MS dla przejścia 241,200 → 223,000 został przedstawiony na Rysunku 18.



Rysunek 18. Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki surowicy po dodaniu roztworu wzorca wewnętrznego.

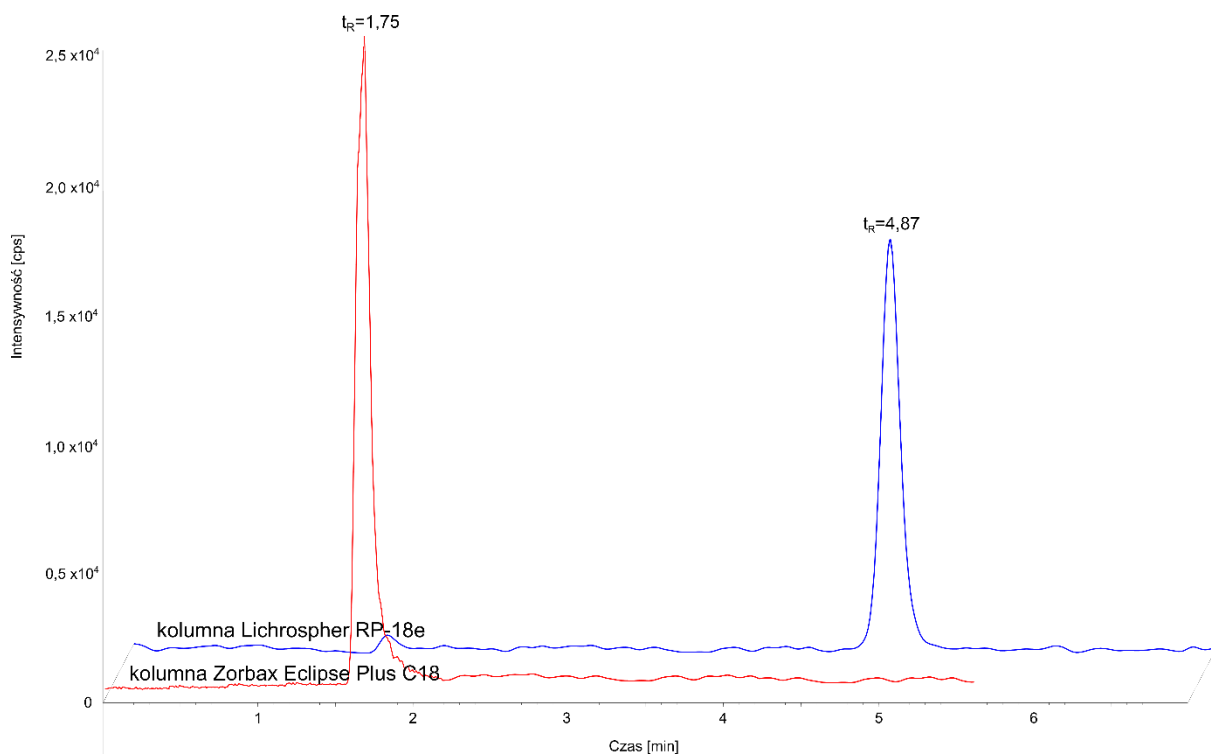
3.2. Dobór optymalnych warunków analizy chromatograficznej

Na rozdzielanie w chromatografii cieczowej duży wpływ ma rodzaj fazy stacjonarnej oraz skład fazy ruchomej, które dobiera się pod kątem właściwości fizykochemicznych analizowanych substancji oraz rodzaju oddziaływań, jakie są wykorzystywane w procesie rozdzielania składników mieszaniny. Rozdzielanie mieszaniny na poszczególne składniki może przebiegać przy stałym składzie fazy ruchomej, czyli w warunkach elucji izokratycznej. W czasie analizy skład fazy ruchomej może jednakże zmieniać się w sposób ciągły lub skokowy. W takim wypadku proces chromatograficzny przebiega w warunkach elucji gradientowej. Do oznaczania śladowych ilości bisfenolu A wykorzystano zarówno elucję izokratyczną, jak i gradientową. Jednakże ze względu na brak powtarzalności wyników otrzymanych w przypadku zastosowania elucji gradientowej do oznaczeń rekomenduje się elucję izokratyczną. Problem ten został szczegółowo omówiony w *Rozdziale 4*.

Podczas optymalizacji rozdzielania porównano dwie kolumny chromatograficzne: Zorbax Eclipse Plus C18 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm) i Lichrospher RP-18e (250 × 4,0 mm, 5 μm). Parametry układu chromatograficznego w przypadku zastosowania obydwu kolumn przedstawiono w Tabeli 9, a otrzymane chromatogramy pokazano na Rysunku 19.

Tabela 9. Porównanie parametrów pracy układu chromatograficznego dla dwóch rodzajów kolumn chromatograficznych stosowanych do oznaczania bisfenolu A.

Parametr	właściwości	Kolumna chromatograficzna	
		Zorbax Eclipse Plus C18	Lichrospher RP-18e
	wymiary [mm]	100×2,1	250×4,0
	średnica ziarna [μm]	1,8	5
	powierzchnia [m ² /g]	160	350
	średnica porów [Å]	95	100
	zawartość węgla [%]	9	21
	Skład fazy ruchomej	H ₂ O/ACN	
	Rodzaj elucji	izokratyczna 50/50, v/v	
	Obj. natężenie przepływu fazy ruchomej [ml/min]	0,35	1
	Objętość dozowanej próbki [μL]	20	30
	Stężenie BPA [ng/mL]	100	
	Temperatura termostatu kolumny [°C]	45	



Rysunek 19. Porównanie chromatogramów uzyskanych podczas analizy próbki roztworu wzorcowego BPA z wykorzystaniem dwóch różnych kolumny: Zorbax i Lichrospher.

Można zauważyć, że zastosowanie ponad dwukrotnie dłuższej kolumny chromatograficznej Lichrospher RP-18e powoduje wydłużenie czasu retencji bisfenolu A do 4,87 min w porównaniu do czasu retencji, jaki uzyskano w przypadku stosowania krótszej kolumny Zorbax Eclipse Plus (1,75 min). Znacząco duża różnica w czasie retencji wynika także z różnic we właściwościach fizykochemicznych obu faz stacjonarnych (Tabela 9). Faza stacjonarna w kolumnie Lichrospher RP-18e ma ponad dwukrotnie większą powierzchnię aktywną sorbentu oraz ponad dwukrotnie większą zawartość węgla. W przypadku zastosowania kolumny Lichrospher RP-18e otrzymano symetryczny pik dla bisfenolu A (asymetria rzędu 1,04), natomiast zastosowanie kolumny Zorbax Eclipse Plus powodowało uzyskanie piku mającego tendencję do ogonowania (asymetria rzędu 1,69). Dlatego do dalszych analiz wybrano kolumnę Lichrospher RP-18e ($250 \times 4,0$ mm, $5 \mu\text{m}$).

Procesowi optymalizacji warunków rozdzielania podlegał również dobór składników fazy ruchomej i dodatków do niej, odpowiedniego objętościowego natężenia przepływu strumienia fazy ruchomej, objętości dozowanej próbki do układu chromatograficznego oraz odpowiedniej temperatury termostatu kolumny. Określono wpływ dodatków do fazy ruchomej na intensywność sygnału uzyskiwanego dla bisfenolu A. Do fazy wodnej dodano odpowiednio: 5 mM, 10 mM i 20 mM NH_4CO_3 , 5 mM i 20 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ oraz 5 mM i 20 mM HCOONH_4 . Drugim składnikiem fazy ruchomej był acetonitryl.

Zaobserwowano tłumienie sygnału dla bisfenolu A w przypadku stosowania wszystkich wymienionych dodatków do fazy ruchomej. Tłumienie wzrastało wraz ze wzrostem stężenia modyfikatora. Po przeprowadzeniu eksperymentów zdecydowano się na stosowanie wody bez żadnych dodatków i acetonitrylu w dalszych etapach prac eksperymentalnych.

3.3. Przygotowanie roztworów wzorcowych oraz roztworów kalibracyjnych

Roztwory podstawowe BPA i BPA- d_{16} o stężeniu 0,2 mg/mL zostały przygotowane poprzez odważenie odpowiedniej ilości czystych substancji w kolbach miarowych i uzupełnienie do kreski acetonitrylem. Stężenie BPA w roztworze roboczym wynosiło 1,024 $\mu\text{g/mL}$, a stężenie BPA- d_{16} wynosiło 191,2 ng/mL.

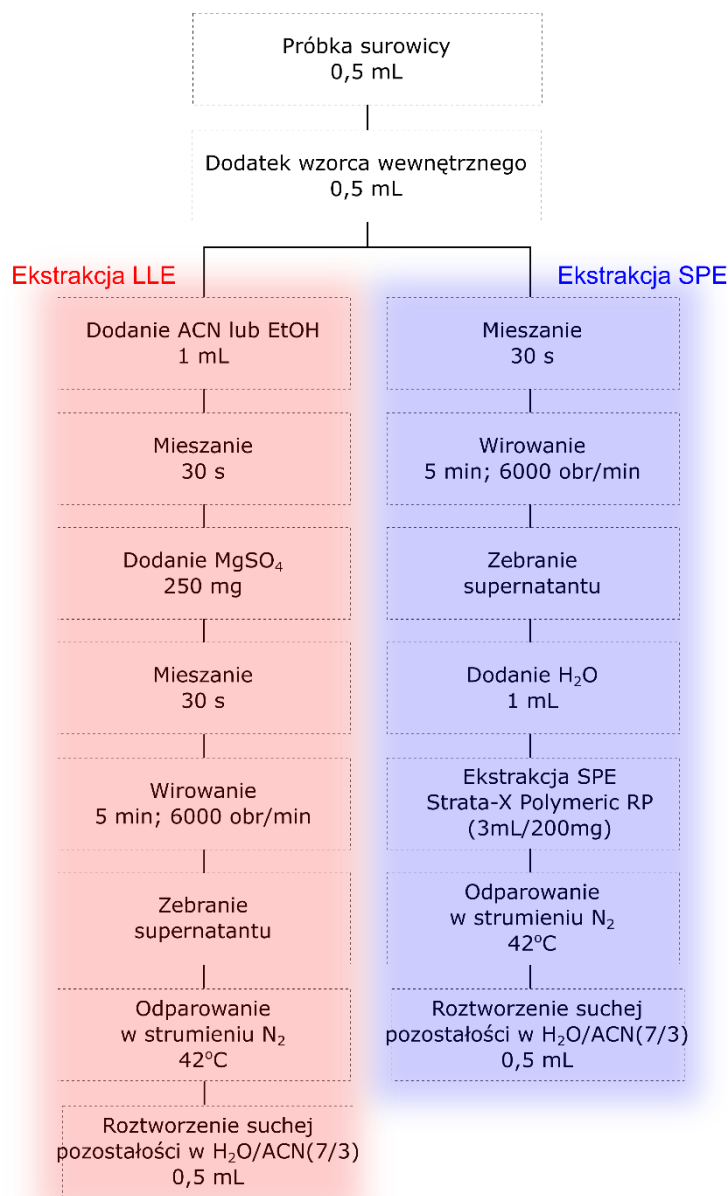
Roztwory kalibracyjne przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworów roboczych w acetonitrylu uzyskując następujące stężenia bisfenolu A: 4,9, 50, 100, 200, 340, 498 ng/mL. Wszystkie roztwory podstawowe, robocze i kalibracyjne przechowywane były w szklanych naczyniach oraz w zamrażalniku w temperaturze -20°C .

3.4. Opracowanie procedury ekstrakcji bisfenolu A z próbek surowicy ludzkiej

Jednym z niezwykle istotnych etapów procedury analitycznej jest etap przygotowania próbek do analizy. Dla próbek o złożonym składzie matrycy, dużej ilości substancji przeszkadzających oraz stosunkowo małych stężeniach substancji oznaczanych, etap przygotowania próbek jest niezbędny. Analiza dostępnych danych literaturowych pozwala stwierdzić, że najczęściej wybieraną techniką przygotowania próbek surowicy ludzkiej do oznaczania śladowych ilości BPA jest technika SPE i ekstrakcja ciecz-ciecz. W trakcie poszukiwania dogodnej metody oznaczania bisfenolu A w próbkach biologicznych wykonywano doświadczenia bazując na wspomnianych metodach, a kryteriami, które brano pod uwagę w celu wyboru ostatecznej metody były:

- precyzja wykonania oznaczeń,
- powtarzalność wyników,
- szybkość przygotowania próbki,
- koszt przygotowania próbki do analizy.

Podczas realizacji tego zadania zaproponowano dwa sposoby przygotowania próbek surowicy do analizy, które w sposób schematyczny zostały zaprezentowane na Rysunku 20.



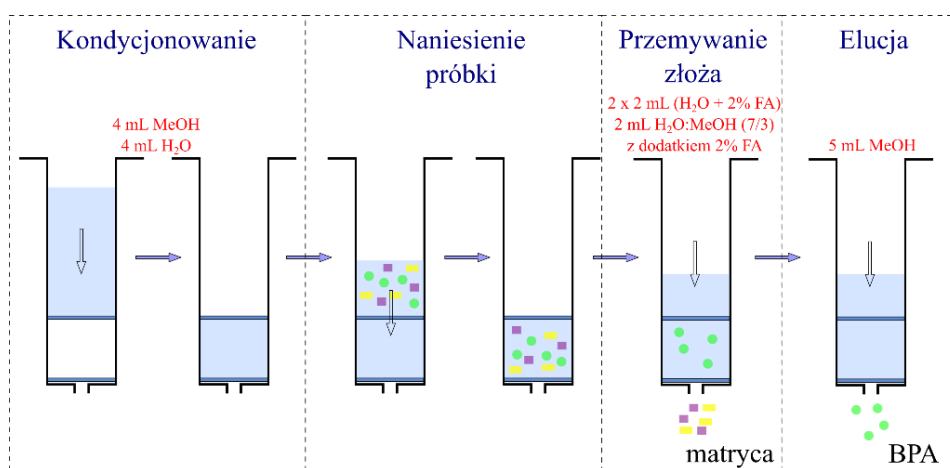
Rysunek 20. Schematyczne przedstawienie etapów przygotowania próbek surowicy ludzkiej do analizy chromatograficznej.

3.4.1. Ekstrakcja za pomocą techniki SPE

Technika ekstrakcji do fazy stałej polega na przepuszczeniu ciekłej próbki przez złożę sorbentu i adsorpcji oznaczanych związków na tym złożu. Na Rysunku 20 przedstawiono ogólną procedurę przygotowania próbek z zastosowaniem techniki SPE. W przeprowadzonym doświadczeniu do próbki surowicy dodawano 0,5 mL roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 191,2 ng/mL. Wzorzec wewnętrzny rozpuszczano w acetonitrylu, który jednocześnie po dodaniu do próbki powodował wytrącanie białek surowicy. Następnie taką próbkę mieszano, zawartość wytrząsano i odwirowywano. Supernatant zbierano do czystych probówek szklanych, po czym do każdej z nich dodawano 1 mL wody. Tak przygotowana próbka była

gotowa do naniesienia na kolumnienkę do SPE. Do tego celu użyto kolumnienki *Strata-X Polymeric RP* (3 mL/200 mg). Aktywacji złoża dokonywano przepuszczając przez nie 4 mL metanolu, a następnie 4 mL wody. Kolejnym etapem było naniesienie próbki na kolumnienkę. Zanieczyszczenia były wmywane z kolumny za pomocą wody z dodatkiem 2% kwasu mrówkowego (FA) oraz za pomocą mieszaniny H₂O:MeOH (7:3) również z dodatkiem 2% FA. Następnie złoże suszono. Do elucji bisfenolu A ze złoża kolumnienki ekstrakcyjnej stosowano 5 mL czystego metanolu. Schemat procedury ekstrakcji z wykorzystaniem techniki SPE przedstawiono na Rysunku 21.

Po wyluowaniu bisfenolu A ze złoża sorbentu za pomocą metanolu, otrzymana próbka była klarowna i bezbarwna. Następnym krokiem było odparowanie rozpuszczalnika do sucha za pomocą strumienia azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w mieszaninie wody i acetonitrylu (7:3). Tak przygotowaną próbkę dozowano do układu chromatograficznego HPLC-MS/MS.



Rysunek 21. Schemat procedury ekstrakcji za pomocą techniki SPE stosowany do izolacji BPA z próbek surowicy ludzkiej.

3.4.2. Ekstrakcja za pomocą techniki ciecz-ciecz

W kolejnym etapie oceniono efektywność ekstrakcji bisfenolu A z próbek surowicy w układzie ciecz-ciecz. Do próbek surowicy ludzkiej dodawano roztwór wzorca wewnętrznego. Następnie, w celu strącenia białek surowicy, do próbek dodawano ACN lub EtOH. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że bardziej efektywnym rozpuszczalnikiem okazał się ACN, ponieważ po dodaniu tego rozpuszczalnika do próbek surowicy, warstwa rozpuszczalnikowa była klarowna w przeciwieństwie do warstwy uzyskanej po dodaniu EtOH.

Następnie uzyskaną próbkę mieszano za pomocą wytrząsarki i odwirowywano. Supernatant odparowywano do sucha z użyciem strumienia azotu, a suchą pozostałość rozpuszczano w mieszaninie wody i acetonitrylu.

Modyfikację powyższej ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz stanowiło dodanie do próbki bezwodnego siarczanu magnezu ($MgSO_4$). Siarczan magnezu jest uniwersalnym środkiem suszącym, a dodatkowo sprzyja lepszemu rozdzielaniu faz. W opisanym układzie dodatek $MgSO_4$ do próbki na etapie ekstrakcji powodował, że ACN efektywniej oddzielał się od nasyconego roztworu soli nieorganicznej.

3.4.3. Porównanie opracowanych metodyk izolacji bisfenolu A z próbek surowicy.

W celu oceny zaproponowanych sposobów przygotowania próbek do analizy, przeprowadzono doświadczenia, w którym porównywano intensywność sygnału pochodzącego od bisfenolu A oraz wzorca wewnętrznego w próbkach przygotowywanych z zastosowaniem:

- dwóch rozpuszczalników strącających białka surowicy krwi: EtOH i ACN,
- techniki SPE i ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz,
- ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz wykonanej z dodatkiem $MgSO_4$ oraz bez dodatku $MgSO_4$.

W Tabeli 10 zestawiono wyniki przeprowadzonych doświadczeń. W przypadku próbek przygotowywanych z użyciem techniki SPE mimo wyższych wartości porównywanych parametrów metodyka ta została odrzucona na korzyść techniki ekstrakcji ciecz-ciecz, ze względu na brak powtarzalności wyników uzyskanych dla próbek przygotowywanych z wykorzystaniem techniki SPE. Ważnymi zaletami w przypadku ekstrakcji ciecz-ciecz była szybkość i niski koszt przygotowania próbek. Zatem po przeanalizowaniu wyników zawartych w Tabeli 10 zdecydowano się na stosowanie ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz za pomocą acetonitrylu z dodatkiem $MgSO_4$.

Tabela 10. Porównanie efektywności metod przygotowania próbek surowicy ludzkiej do oznaczania bisfenolu A.

Informacje o próbce	A_{BPA}	A_{IS}	A_{BPA}/A_{IS}	S/N	Komentarz
Wpływ rozpuszczalników strącających białka surowicy					
ACN	$4,8 \times 10^{3*}$	$8,1 \times 10^{3*}$	0,59	16	Sygnał pochodzący od BPA ma około 2 razy większą intensywność oraz pole powierzchni w przypadku strącania białek za pomocą ACN w porównaniu do sygnału uzyskanego podczas analizy próbki otrzymanej po strącaniu białek za pomocą EtOH. Stosunek sygnału do szumu około 3 razy większy w przypadku strącania białek za pomocą ACN.
EtOH	$2,4 \times 10^{3*}$	$4,3 \times 10^{3*}$	0,56	5,0	

Informacje o próbce	A _{BPA}	A _{IS}	A _{BPA} /A _{IS}	S/N	Komentarz
Porównanie efektywności techniki SPE oraz ekstrakcji w układzie ciecz–ciecz					
ekstrakcja SPE	1,9x10 ^{5**}	2,4x10 ^{4**}	7,9	2,8 x10 ²	Uzyskano większą intensywność pików pochodzącego od BPA w przypadku próbek przygotowanych z wykorzystaniem techniki SPE. Natomiast zaobserwowano brak powtarzalności uzyskiwanych wyników w przypadku analizy próbek surowicy ludzkiej przygotowanych za pomocą techniki SPE.
ekstrakcja ciecz-ciecz	1,1x10 ^{5**}	2,2x10 ^{4**}	5,1	1,9 x10 ²	
Porównanie ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz z dodatkiem i bez dodatku bezwodnego MgSO₄					
Próbka z dodatkiem MgSO ₄	1,3x10 ^{5**}	2,2x10 ^{4**}	5,9	2,0 x10 ³	Dodatek do próbki surowicy bezwodnego MgSO ₄ poprawiał klarowność roztworu.
Próbka bez dodatku MgSO ₄	1,1x10 ^{5**}	1,8x10 ^{4**}	6,1	7,0	

* stężenie dodanego wzorca bisfenolu A wynosi 25 ng/mL, natomiast wzorca wewnętrznego wynosi 95,6 ng/mL

** stężenie dodanego wzorca bisfenolu A wynosi 100 ng/mL, natomiast wzorca wewnętrznego wynosi 191,2 ng/mL

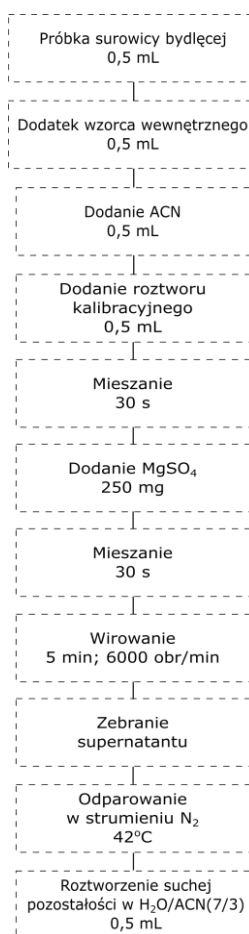
3.5. Kalibracja układu HPLC-MS/MS do oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy

Techniki chromatograficzne opierają się na pomiarze względnym, czyli takim, w którym porównuje się sygnały detektora uzyskane dla roztworów wzorcowych (o znanych stężeniach) z sygnałami uzyskanymi dla badanych próbek. W tym celu niezbędne jest przeprowadzenie etapu kalibracji. Na etapie kalibracji wybrano metodę wzorca wewnętrznego (w celu niwelacji zmian czułości spektrometru mas w czasie).

Kalibracja procedury analitycznej powinna odwzorowywać zależność między stężeniem analitu w próbce rzeczywistej, a uzyskanym sygnałem analitycznym. Ze względu na możliwy wpływ składników próbki surowicy ludzkiej na wielkość sygnału analitycznego dla bisfenolu A, sporządzono roztwory kalibracyjne z odwzorowaniem matrycy. Na początku przygotowano sześć roztworów kalibracyjnych (RK) w zakresie 4,9-498 ng/mL zawierających bisfenol A. Na Rysunku 22 przedstawiono metodykę przygotowania roztworów kalibracyjnych z odwzorowaniem matrycy. Surowica bydłęca stanowiła matrycę do sporządzenia matrycowych roztworów kalibracyjnych. Uzyskane w ten sposób próbki zostały zadozowane do układu HPLC-MS/MS.

Na podstawie chromatogramów uzyskanych w wyniku analiz chromatograficznych próbek roztworów kalibracyjnych z odwzorowaniem matrycy wykreślono krzywą kalibracyjną opisującą zależność stężenia analitu w funkcji stosunku pola powierzchni pod pikiem analitu i pola powierzchni pod pikiem wzorca wewnętrznego. Biorąc pod uwagę wartość liczbową współczynnika determinacji ($R^2=0,998$), który jest miarą stopnia dopasowania funkcji regresji do danych empirycznych (zależność między stosunkiem pola powierzchni pod pikiem analitu do pola powierzchni pod pikiem wzorca wewnętrznego a odpowiadającym mu stężeniu

analitu) można stwierdzić, że w badanym zakresie stężeń (4,9-498 ng/mL) istnieje liniowa zależność pomiędzy zmiennymi. Krzywa kalibracyjna dla bisfenolu A charakteryzuje się szerokim zakresem liniowości.



Rysunek 22. Schemat przygotowania roztworów kalibracyjnych z odwzorowaniem matrycy.

Istotną rolę w procesie walidacji metodyk analitycznych ma wyznaczenie takich parametrów jak: granica oznaczalności i wykrywalności. Granica wykrywalności (LOD) definiowana jest jako najmniejsza ilość bądź najmniejsze stężenie oznaczanej substancji możliwe do wykrycia z wykorzystaniem danej techniki analitycznej. Z kolei granicę oznaczalności (LOQ) definiuje się jako najmniejszą ilość lub najmniejsze stężenie oznaczanej substancji możliwe do ilościowego oznaczenia za pomocą danej metody z założoną dokładnością i precyzją. Obliczone wartości granicy wykrywalności i oznaczalności dla BPA zdefiniowano jako stężenie analitu dające stosunek sygnał/szum wynoszący odpowiednio 3 i 10. Granica wykrywalności wynosi 1,5 ng/mL a oznaczalności 4,5 ng/mL.

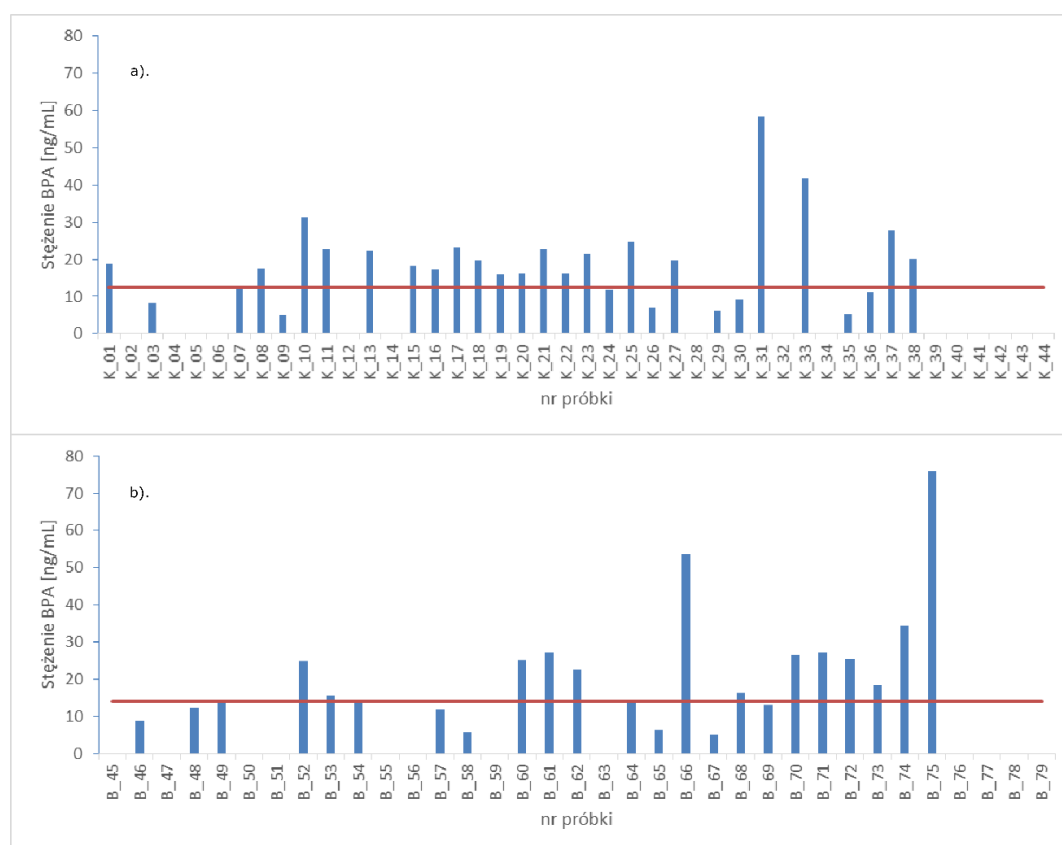
3.6. Analiza próbek rzeczywistych

Opracowaną procedurę analityczną wykorzystano do oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej. Próbki zostały pozyskane w ramach współpracy

z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu i Gdańskim Uniwersytetem Medycznym. W ramach współpracy zbadano zależność między stężeniem bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej, a zachorowalnością na zespół policystycznych jajników (projekt „PCOS”). Zbadano również wpływ diety na stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej (Projekt „DIETA”).

3.6.1. Projekt „PCOS”

Projekt „PCOS” miał na celu zbadanie zawartości bisfenolu A w próbkach surowicy kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników i porównanie jej z poziomem stężeń bisfenolu A w próbkach surowicy pobranych od kobiet z prawidłową masą ciała, bez zaburzeń endokrynologicznych i regularnie miesiączkujących. Materiał biologiczny pobrano łącznie od 79 kobiet, spośród których 44 uczestniczki badania o średniej wieku $26,6 \pm 6,4$ lat należały do grupy kontrolnej. W grupie badanej było 35 kobiet chorujących na zespół policystycznych jajników, a średnia wieku w tej grupie wynosiła $24,7 \pm 4,7$ lat. Wyniki oznaczania BPA w próbkach surowicy kobiet przedstawione zostały na Rysunku 23.



Rysunek 23. Wyniki oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy kobiet uzyskane w ramach projektu „PCOS”. Oznaczenie bisfenolu A wykonano dla a). grupy kontrolnej; oraz b). grupy badanej (grupa kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników). Czerwoną linią oznaczono średnią wartość stężenia bisfenolu A w ramach badanej grupy.

Na podstawie uzyskanych wyników z oznaczenia bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej, obliczono średnią jego zawartość w grupie kontrolnej i badanej. Ponadto oznaczono stężenia wybranych hormonów i białka wiążącego hormony płciowe, a analizy biochemiczne zostały wykonane w ramach współpracy naukowej z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym. Zebrane wyniki przedstawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Charakterystyka grupy kontrolnej i badanej wraz z wynikami oznaczeń bisfenolu A, hormonów i białka wiążącego hormony płciowe w próbkach surowicy badanych kobiet.

Parametr	Grupa kontrolna – zdrowe kobiety	Grupa badana – kobiety z PCOS
Wiek [lata]	26,6 ± 6,4	24,7 ± 4,7
BMI	21,9 ± 1,4	21,9 ± 1,4
Średnie stężenie BPA [ng/mL]	13 ± 13	14 ± 17
Średnie stężenie prolaktyny [ng/mL]	13,7 ± 9,8	14 ± 12
Średnie stężenie 17OH-Progesteronu [ng/mL]	1,9 ± 1,3	1,6 ± 0,7
Średnia zawartość całkowitego testosteronu [nmol/L]	1,28 ± 0,51	1,76 ± 0,75
Współczynnik wolnych androgenów	2,7 ± 1,5	3,7 ± 2,0
Hormon luteinizujący/hormon folikulotropowy, LH/FSH	1,5 ± 1,1	1,9 ± 1,1
Średnie stężenie insuliny [mIU/mL]	26 ± 14	28 ± 14
Średnia zawartość białka wiążącego hormony płciowe – SHBG [nmol/L]	61 ± 29	57 ± 24

Zauważono, że średnie stężenie bisfenolu A w próbkach surowicy kobiet z PCOS było nieco wyższe w porównaniu z grupą kontrolną.

Nadwaga występuje u około 15-19% kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników, a otyłość aż u 30-75% pacjentek. U kobiet z PCOS obserwuje się nieprawidłowe rozmieszczenie tkanki tłuszczowej i otyłość brzuszna [121]. Jednakże wskaźnik masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) w przypadku kobiet zdrowych, jak i chorych poddanych badaniom mieścił się w przedziale ustalonym dla prawidłowej wagi (BMI 18-25).

W ramach badań oznaczono zawartość prolaktyny we krwi. Hormon ten stymuluje wzrost gruczołów sutkowych w czasie ciąży oraz wywołuje laktację, wpływa również na gonady. Na podstawie dostępnej literatury naukowej można stwierdzić, że podwyższony poziom prolaktyny o 10-50% obserwuje się u kobiet chorych na PCOS [33]. W powyższym doświadczeniu średnia zawartość prolaktyny we krwi kobiet cierpiących na PCOS była nieznacznie większa w porównaniu ze średnim poziomem tego hormonu u kobiet będących w grupie kontrolnej.

Z kolei 17-hydroksyprogesteron (17-OH progesteron) jest hormonem steroidowym, który powstaje głównie w korze nadnerczy, a niewielkie jego ilości powstają w gonadach i łożysku. Stanowi on jeden z głównych metabolitów progesteronu. Można zauważyć, że średnie stężenie 17-OH progesteronu było niewiele większe u kobiet w grupie kontrolnej w porównaniu ze średnim stężeniem tego hormonu w surowicy kobiet należących do grupy badanej. Zwykle u kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników obserwuje

się zwiększony poziom stężenia 17-OH progesteronu we krwi. Jest to związane z nadmiernym wydzielaniem insuliny we krwi, która zwiększa aktywność 17 α -hydroksylazy przekształcającej progesteron w 17-OH progesteron [89]. U kobiet z PCOS średnie stężenie insuliny było większe w porównaniu z poziomem stężenia insuliny u kobiet zdrowych.

W zespole PCOS obserwuje się często nadmierne wydzielanie androgenów (hormonów męskich). Ich podwyższony poziom u kobiet sprzyja zaburzeniom owulacji i powstawaniu zmian torbielowatych na jajnikach. W ramach badań zaobserwowano podwyższoną wartość liczbową współczynnika wolnych androgenów u kobiet z PCOS w stosunku do kobiet z prawidłową masą ciała, bez zaburzeń endokrynologicznych i regularnie miesiączkujących.

W doświadczeniu zbadano również wartość liczbową stosunku poziomu stężenia hormonu luteinizującego (LH) do folikulotropowego (FSH). Charakterystyczne dla zespołu policystycznych jajników jest duża częstość powikłań ciąży, wśród których zalicza się poronienia. Częstość poronień samoistnych u kobiet z PCOS jest 2-krotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną, a ich liczbę wiąże się z podwyższonym poziomem hormonu luteinizującego (LH), niedoborem progesteronu lub nieprawidłowym endometrium. U kobiet z PCOS obserwuje się często większe stężenie hormonu luteinizującego w porównaniu z poziomem tego hormonu w surowicy kobiet zdrowych [33]. Natomiast hormon folikulotropowy odpowiedzialny jest za pobudzanie dojrzewania pęcherzyków Graafa i produkcję estrogenów. Większa wartość liczbowa współczynnika LH/FSH u kobiet z PCOS może świadczyć o zwiększonym wydzielaniu hormonu luteinizującego i/lub hamowaniu działania hormonu folikulotropowego na proces dojrzewania pęcherzyków jajowych. U kobiet z PCOS zaobserwowano większą wartość współczynnika LH/FSH.

Poziom stężenia SHBG u kobiet chorujących na PCOS był nieco niższy w porównaniu z poziomem tego białka w surowicy kobiet zdrowych. W przypadku zachorowań na zespół policystycznych jajników obserwuje się właśnie obniżenie stężenia SHBG. Prawdopodobnie jest to związane z występowaniem w surowicy nadmiaru biologicznie aktywnego testosteronu. Zależność tą można zaobserwować w przypadku grupy kobiet z PCOS.

Uzyskane w ramach współpracy naukowej z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym wyniki badań pozwoliły na wykazanie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem bisfenolu A w surowicy kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników, a współczynnikiem wolnych androgenów oraz poziomem insuliny we krwi badanych osób. Ujemną korelację zaobserwowano pomiędzy poziomem stężenia białka wiążącego hormony płciowe w surowicy, a stężeniem bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej pobranych od kobiet z PCOS. W przypadku próbek pobranych od kobiet z grupy kontrolnej wykazano

dotadnią korelację pomiędzy poziomem stężenia białka wiążącego hormony płciowe, a stężeniem bisfenolu A w surowicy ludzkiej. Natomiast zaobserwowano brak korelacji pomiędzy stężeniem całkowitego testosteronu, 17OH-progesteronu, prolaktyny oraz stosunkiem LH/FSH, a poziomem stężeń bisfenolu A w próbkach surowicy.

3.6.2. Projekt „DIETA”

Celem projektu „DIETA” było określenie wpływu diety na poziom stężenia bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej. W projekcie uczestniczyło łącznie 19 kobiet w wieku 22 – 25 lat, a ochotniczki przypisano do dwóch grup: kontrolnej oraz badanej. W doświadczeniu brały udział kobiety bez schorzeń przewlekłych.

W grupie kontrolnej, kobiety przez okres 7 dni stosowały dietę, polegającą na unikaniu w jadłospisie produktów, które potencjalnie mogły zawierać bisfenol A. W jadłospisie znalazły się między innymi świeże owoce, warzywa, mięso, produkty przechowywane w szkle. W celu zminimalizowania ryzyka narażenia uczestniczek projektu na bisfenol A w menu dobrano żywność jak najmniej przetworzoną.

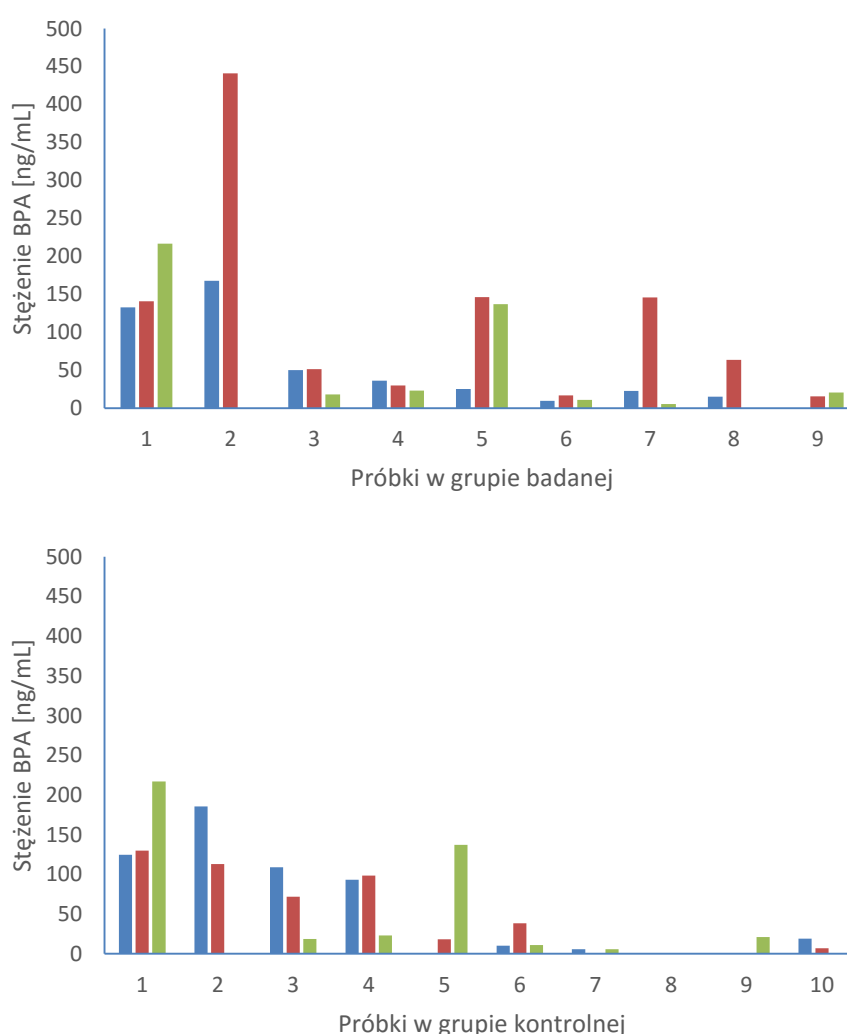
Z kolei do grupy badanej należały kobiety, których tygodniowy jadłospis składał się przede wszystkim z żywności, która mogła stanowić potencjalne źródło bisfenolu A. Produkty zostały wyselekcjonowane na podstawie przeprowadzonej analizy doniesień literaturowych dotyczących zawartości bisfenolu A w produktach żywnościowych. Do konsumpcji wybrano te rodzaje produktów spożywczych, w których najczęściej oznaczano bisfenol A, a podstawą diety grupy badanej była żywność przetworzona. Na liście menu znajdowały się warzywa, owoce, mięso i ryby przechowywane w materiałach wykonanych z tworzyw sztucznych.

Jadłospis dla obydwu grup, po wcześniejszej konsultacji z dietetykiem, zawierał takie same składniki, ale jakość tych produktów odpowiadała założeniom dla poszczególnej diety.

Od każdej uczestniczki projektu zostały pobrane próbki surowicy trzykrotnie: w odstępach tygodniowych, tj. przed rozpoczęciem diety, po zakończeniu diety oraz tydzień po zakończeniu diety. Próbki krwi były pobierane w godzinach porannych, po czym po umieszczeniu ich w przenośnej lodówce transportowane były do laboratorium Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej. Do momentu analizy próbki były przechowywane w zamrażarce w temperaturze -80°C . Dla każdej uczestniczki projektu, data pierwszego pobrania krwi oraz rozpoczęcia diety była ustalana indywidualnie. Była ona uzależniona od cyklu menstruacyjnego kobiety. Pierwsze pobranie krwi odbywało się pomiędzy 3 a 5 dniem cyklu menstruacyjnego.

W celu wykluczenia zaburzeń endokrynologicznych u kobiet biorących udział w badaniu, próbka krwi pobrana pierwszego dnia projektu została przeznaczona zarówno do oznaczenia zawartości bisfenolu A, jak i do oznaczenia poziomu poszczególnych hormonów (hormonu luteinizującego, hormonu folikulotropowego, prolaktyny, estradiolu, testosteronu).

W Tabeli 12 zestawiono otrzymane wyniki oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej, natomiast na Rysunku 24 w sposób obrazowy zostały przedstawione wyniki oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy pochodzących z projektu „DIETA”. Jednym kolorem zaznaczono wyniki oznaczeń bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej pobranych od poszczególnych uczestniczek projektu przed wprowadzeniem diety, po zakończeniu diety oraz tydzień po zakończeniu diety.



Rysunek 24. Wyniki oznaczania bisfenolu A w próbkach grupy kontrolnej i badanej w ramach projektu „DIETA”. Niebieskim kolorem zaznaczono poziom stężenia bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej pobranych od uczestniczek projektu przed wprowadzeniem diety, czerwonym po zakończeniu tygodniowej diety, a zielonym tydzień po zakończeniu interwencji żywieniowej.

Tabela 12. Wyniki oznaczania BPA w próbkach surowicy ludzkiej w ramach projektu „DIETA”.

Próbki kontrolne	Stężenie BPA [ng/mL]	Uwagi	Próbki badane	Stężenie BPA [ng/mL]	Uwagi
1_1	124,5	wzrost, wzrost	1_1	133,0	wzrost, wzrost
1_2	130,0		1_2	141,0	
1_3	167,0		1_3	217,0	
2_1	185,5	spadek, wzrost	2_1	168,0	wzrost, spadek
2_2	113,0		2_2	441,0	
2_3	119,0		2_3	< LOQ	
3_1	109,0	spadek, spadek	3_1	50,3	wzrost, spadek
3_2	71,9		3_2	51,6	
3_3	6,5		3_3	18,4	
4_1	93,1	wzrost, spadek	4_1	36,4	spadek, spadek
4_2	98,6		4_2	30,0	
4_3	91,9		4_3	23,1	
5_1	< LOQ	wzrost, spadek	5_1	25,2	wzrost, spadek
5_2	18,3		5_2	146,5	
5_3	< LOQ		5_3	137,0	
6_1	10,1	wzrost, spadek	6_1	9,8	wzrost, spadek
6_2	38,4		6_2	16,9	
6_3	26,7		6_3	10,9	
7_1	5,7	spadek, wzrost	7_1	23,0	wzrost, spadek
7_2	< LOQ		7_2	146,0	
7_3	7,2		7_3	5,6	
8_1	< LOQ	< LOQ, wzrost	8_1	15,4	wzrost, spadek
8_2	< LOQ		8_2	63,7	
8_3	49,8		8_3	< LOQ	
9_1	< LOQ	< LOQ, brak danych	9_1	< LOQ	wzrost, wzrost
9_2	< LOQ		9_2	15,7	
9_3	brak		9_3	20,9	
10_1	18,8	spadek, spadek			
10_2	6,9				
10_3	< LOQ				
Średnie stężenie BPA w surowicy przed zastosowaniem diety [ng/mL]					
54,7			51,2		
Średnie stężenie BPA w surowicy po tygodniu stosowania diety [ng/mL]					
47,7			116,9		
Średnie stężenie BPA w surowicy po tygodniu od zakończenia diety [ng/mL]					
46,8			48,1		

Przed przystąpieniem do eksperymentu założono, że po tygodniu stosowania diety, potencjalnie stanowiącej źródło bisfenolu A, stężenie tego związku wzrośnie w porównaniu do jego zawartości w próbkach surowicy ludzkiej pobranej pierwszego dnia eksperymentu. Zakładano również, że tydzień po zakończeniu diety potencjalnie „bogatej” w bisfenol A, poziom stężenia tego związku w surowicy zmaleje.

Na podstawie średniej zawartości bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej pobranych od uczestniczek z grupy badanej można zauważyć wzrost stężenia BPA z 51,2 ng/mL na 116,9 ng/mL po tygodniu stosowania diety potencjalnie stanowiącej źródło bisfenolu A. W surowicy pobranej tydzień po zakończeniu diety średnia zawartość bisfenolu A była zbliżona do poziomu stężenia BPA przed wprowadzeniem interwencji żywieniowej.

Z kolei średnia zawartość bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej pobranych od uczestniczek należących do grupy kontrolnej utrzymywała się na zbliżonym poziomie zarówno przed wprowadzeniem diety, po zakończeniu diety i tydzień po zakończeniu diety.

4. Oznaczanie tła systemu za pomocą techniki HPLC-MS/MS

W trakcie prac związanych z doбором optymalnych warunków chromatograficznych do oznaczania śladowych ilości bisfenolu A w próbkach surowicy, zaobserwowano niezadowalającą powtarzalność wyników. Szczególnie było to zauważalne, gdy do układu chromatograficznego dozowano roztwory wzorcowe o małym stężeniu (rzędu 5 ng/mL). Jednym z parametrów stanowiącym podwaliny wiarygodności oznaczeń jest zapewnienie powtarzalności wyników pomiarów. Powtarzalność dotyczy zgodności kolejnych wyników pomiarów wykonywanych w tych samych warunkach pomiarowych.

Niezadowalającą powtarzalność wyników zauważono podczas pracy w warunkach elucji gradientowej. Postawiono hipotezę, że bisfenol A jest obecny w fazie ruchomej i może być zatrzymywany na czole kolumny chromatograficznej podczas stabilizacji kolumny przed analizą chromatograficzną. Przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu potwierdzenie przyczyny braku powtarzalności uzyskiwanych wyników, a oznaczanie tła systemu przeprowadzono za pomocą techniki HPLC-MS/MS. Wykorzystano do tego celu chromatograf cieczowy firmy *Shimadzu* sprzężony z tandemowym spektrometrem mas LC-MS-8050. W poniższych podrozdziałach opisano przebieg prac badawczych wraz z omówieniem wyników.

4.1. Warunki pracy HPLC-MS/MS do oznaczania tła systemu

W celu oznaczenia tła systemu, analizy przeprowadzono z wykorzystaniem systemu HPLC złożonego z urządzenia do odgazowania fazy ruchomej, pompy, automatycznego podajnika próbek i termostatu kolumny. Identycznie, jak w przypadku oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy, w trakcie oznaczeń korzystano z kolumny chromatograficznej Lichrospher RP-18e (250 mm × 4 mm; 5 μm). Faza ruchoma składała się z dwóch składników: A - wody, B - acetonitrylu. Analizy chromatograficzne prowadzono w warunkach elucji izokratycznej i gradientowej. W przypadku trybu elucji izokratycznej, faza ruchoma zawierała mieszaninę wody i acetonitrylu (1:1), a program elucji gradientowej był następujący: 10-90% B (0-10 min), 90% B (10-12 min). Po każdej analizie kolumnę chromatograficzną kondycjonowano przez 10, 20 lub 30 min. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej było równe 1 mL/min, a temperatura termostatu kolumny wynosiła 45°C. Analizy wykonywano bez dozowania próbki do układu chromatograficznego, tzn. gdy przez kolumnę przepływa wyłącznie faza ruchoma oraz z dozowaniem 10 μL roztworów wzorcowych bisfenolu A.

Jako detektor zastosowano tandemowy spektrometr mas (Shimadzu LC-MS-8050 Shim-pol, Polska) pracujący w trybie MRM. W związku z zastosowaniem, innego niż w poprzednim zadaniu, tandemowego spektrometru mas, konieczne było przeprowadzenie procesu optymalizacji warunków pracy detektora. Jako technikę jonizacji zastosowano jonizację poprzez elektrorozpylanie z tworzeniem jonów naładowanych ujemnie. Specyficzne przejścia MRM zostały wybrane poprzez dozowanie roztworów wzorcowych BPA i BPA-*d*₁₆ o stężeniu 200 ng/mL do spektrometru mas pracującego w trybie FIA. Optymalne warunki pracy tandemowego spektrometru mas zostały przedstawione w Tabeli 13.

Tabela 13. Informacje o parametrach pracy tandemowego spektrometru mas pracującego w trybie MRM tworzenia jonów naładowanych ujemnych.

Analit	jon pseudomolekularny → jon fragmentacyjny	Napięcie w Q1 [V]	Energia kolizji [V]	Napięcie w Q3 [V]	
BPA	227.0 → 211.9	17	18	20	
BPA- <i>d</i> ₁₆	241.0 → 142.2	26	27	13	
parametry MS/MS					
Gaz rozpylający [L/min]	Gaz ogrzewający [L/min]	Temperatura źródła [°C]	Temperatura DL [°C]	Temperatura bloku grzewczego [°C]	Gaz suszący [L/min]
3	10	300	250	500	10

DL – Linia odparowująca

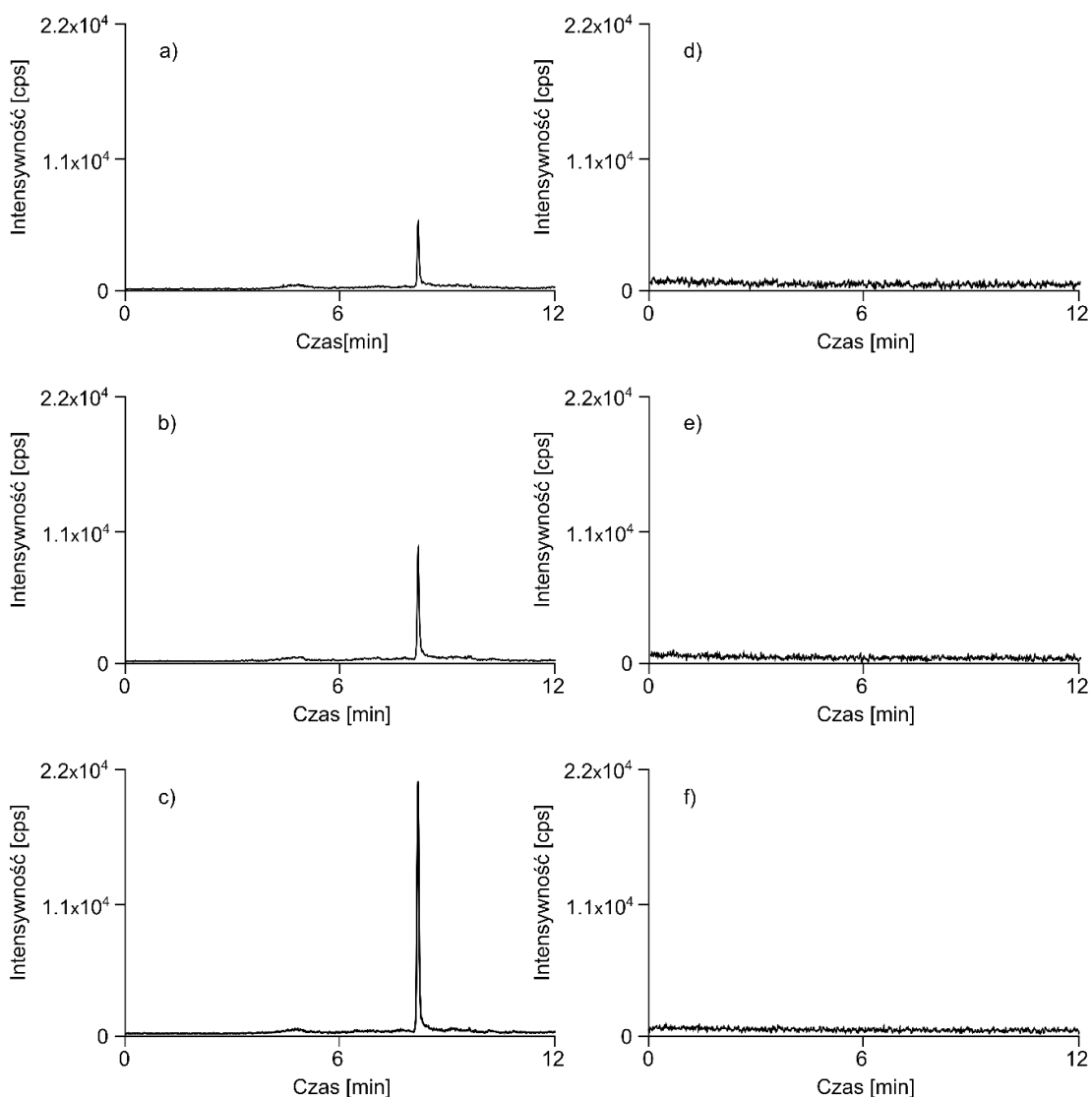
4.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Roztwory podstawowe BPA i BPA-d16 o stężeniu 1 mg/mL zostały przygotowane poprzez odważenie odpowiedniej ilości czystych substancji w kolbach miarowych i uzupełnienie do kreski metanolem. Roztwory robocze BPA, o stężeniach 5 ng/mL i 100 ng/mL, przygotowano w mieszaninie wody i acetonitrylu (90:10), do których dodano BPA-d₁₆, tak, aby uzyskać jego stężenie na poziomie 100 ng/mL. Wszystkie roztwory były przechowywane w szklanych naczyniach oraz w zamrażalniku w temperaturze -20°C.

4.3. Tło systemu HPLC-MS/MS w warunkach elucji gradientowej i izokratycznej

Zaobserwowano niezadowalającą powtarzalność wyników podczas dozowania do układu chromatograficznego roztworów wzorcowych bisfenolu A, a w szczególności tych o małym stężeniu (5 ng/mL). Wysłano hipotezę, że bisfenol A najprawdopodobniej jest obecny w fazie ruchomej i może ulegać ogniskowaniu na czole kolumny chromatograficznej podczas stabilizacji kolumny przed analizą. W celu potwierdzenia hipotezy przeprowadzono analizy z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS w warunkach elucji gradientowej bez dozowania próbki do układu chromatograficznego. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów, otrzymano pik dla bisfenolu A. Doświadczenie powtórzono 3-krotnie z różnym odstępem czasowym pomiędzy analizami bez dozowania próbki, w wyniku czego uzyskano różną intensywność piku dla BPA. Przeprowadzono eksperyment mający na celu zbadanie wpływu czasu stabilizacji kolumny na intensywność sygnału. Kolumnę stabilizowano odpowiednio przez 10, 20 i 30 minut, a każdą analizę powtórzono 3-krotnie. Zaobserwowano, że wraz z wydłużeniem czasu stabilizacji kolumny chromatograficznej, intensywność sygnału dla BPA rośnie (uzyskane chromatogramy zostały przedstawione na Rysunku 25 a, b, c).

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że BPA obecny w rozpuszczalnikach ulega ogniskowaniu na czole kolumny, gdy faza ruchoma ma niewielką siłę elucyjną. Rosnąca zawartość składnika organicznego w fazie ruchomej powoduje, że zaadsorbowany BPA jest eluowany z kolumny. Metodą dodatku wzorca wyznaczono zawartość eluowanego BPA przy różnych czasach stabilizacji kolumny – 10 min, 20 min i 30 min, która wynosiła odpowiednio 0,11 ng, 0,15 ng i 0,29 ng.



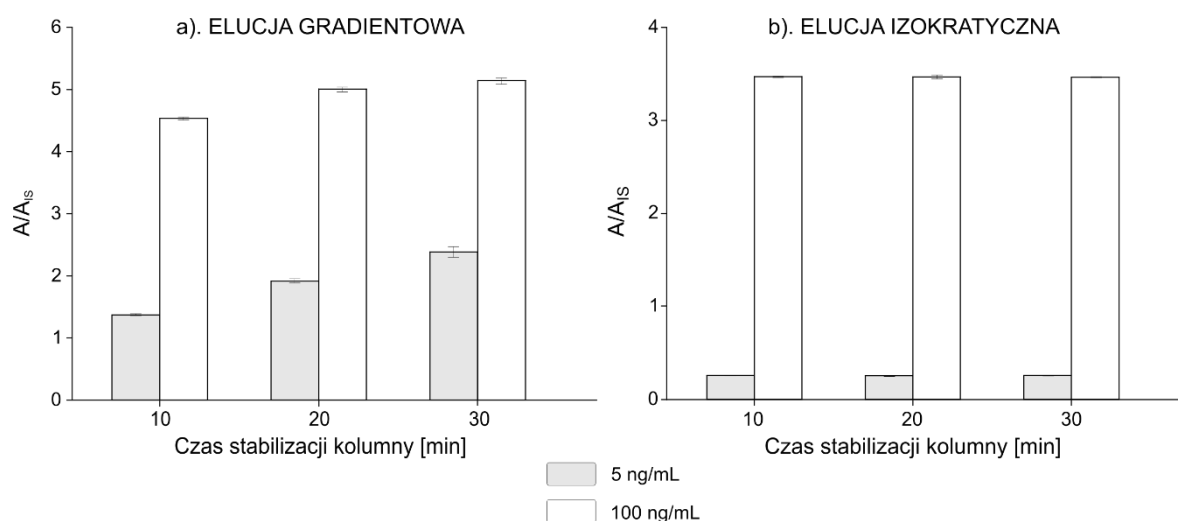
Rysunek 25. Chromatogramy MRM uzyskane w wyniku analizy tła systemu z różnym czasem stabilizacji kolumny chromatograficznej w warunkach elucji gradientowej a). 10min, b). 20 min, c). 30 min; oraz w warunkach elucji izokratycznej d). 10 min, e). 20 min, f). 30 min.

Rozwiązaniem powyższego problemu okazało się zastosowanie elucji izokratycznej, z dużą zawartością acetonitrylu w fazie ruchomej. Sprawdzone wpływ warunków elucji izokratycznej na wysokość linii bazowej, w przypadku, gdy do układu chromatograficznego nie była dozowana próbka roztworu wzorcowego bisfenolu A. Zastosowanie stałego składu fazy ruchomej (50% acetonitrylu) nie spowodowała trwałego wiązania się bisfenolu A na czole kolumny. Ponadto czas stabilizacji kolumny w tych warunkach nie miał wpływu na uzyskany poziom tła systemu (Rysunek 25 d, e, f). Jednakże zaobserwowano, że intensywność linii bazowej była 10-krotnie większa w przypadku zastosowania stałego składu fazy ruchomej w porównaniu z linią bazową otrzymaną w wyniku analizy w warunkach elucji gradientowej. Spowodowane to mogło być faktem, że w tych warunkach, gdy skład fazy ruchomej zawierał

aż 50% rozpuszczalnika organicznego, zachodziło ciągle wymywanie się bisfenolu A bez ogniskowania na czole kolumny chromatograficznej.

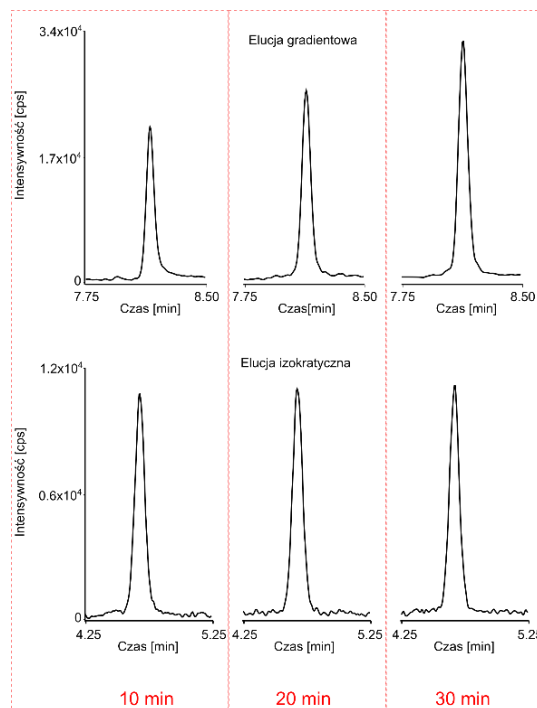
4.4. Wpływ tła systemu HPLC-MS/MS na wyniki oznaczeń

W dalszym etapie prac eksperymentalnych zbadano wpływ czasu stabilizacji kolumny chromatograficznej zarówno w warunkach elucji gradientowej, jak i izokratycznej na intensywność sygnału dla bisfenolu A. W tym celu dozowano próbkę roztworu wzorcowego bisfenolu A o dwóch różnych stężeniach: 5 i 100 ng/mL wraz z wzorcem wewnętrznym o stężeniu 100 ng/mL, a analizy chromatograficzne powtarzano 3-krotnie. Na podstawie uzyskanych wyników można wywnioskować, że czas stabilizacji kolumny w warunkach elucji gradientowej ma kluczowe znaczenie w oznaczaniu bisfenolu A na niskim poziomie stężeń. W przypadku większego stężenia (100 ng/mL) zawartość bisfenolu A w tle nie wpływa w istotny sposób na otrzymane wartości liczbowe stosunku pola powierzchni analitu (A) do pola powierzchni wzorca wewnętrznego (A/A_{IS}). Wartości liczbowe A/A_{IS} są zbliżone niezależnie od czasu stabilizacji kolumny chromatograficznej (Rysunek 26 a).



Rysunek 26. Wpływ czasu stabilizacji kolumny chromatograficznej na wartość liczbowa stosunku pola powierzchni analitu do pola powierzchni wzorca wewnętrznego w warunkach elucji gradientowej (a) i izokratycznej (b).

W warunkach elucji izokratycznej, czas stabilizacji kolumny nie miał istotnego wpływu na uzyskane wartości liczbowe A/A_{IS} zarówno po zadozowaniu roztworu wzorcowego BPA o stężeniu 5 ng/mL, jak i 100 ng/mL (Rysunek 26 b). Przykładowe chromatogramy MRM uzyskane w wyniku analizy roztworu wzorcowego bisfenolu A o stężeniu 5 ng/mL w warunkach elucji gradientowej i izokratycznej zostały pokazane na Rysunku 27.



Rysunek 27. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek roztworu wzorcowego bisfenolu A o stężeniu 5 ng/mL w warunkach elucji gradientowej i izokratycznej z zastosowaniem różnych czasów stabilizacji kolumny chromatograficznej.

Reasumując, obecność bisfenolu A w rozpuszczalnikach, nawet tych o czystości LC-MS utrudnia jego oznaczanie z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS, szczególnie na niskim poziomie stężeń. Jak dotąd nikt nie pokazał wpływu trybu elucji gradientowej i izokratycznej na tło systemu HPLC-MS/MS. Praca w warunkach elucji gradientowej może prowadzić do uzyskania wyników obciążonych dużym błędem, zwykle zawyżonych, ponieważ w tych warunkach może pojawić się sygnał dla bisfenolu A, gdy przepływa przez układ chromatograficzny wyłącznie faza ruchoma. Powodem tego jest fakt, że obecny w eluentach bisfenol A ulega ogniskowaniu na czole kolumny chromatograficznej podczas jej stabilizacji. Dlatego, im dłużej kolumna jest stabilizowana przed analizą chromatograficzną tym większe jest tło systemu. Obecność bisfenolu A w tle systemu ma szczególne znaczenie podczas oznaczania tego związku na niskim poziomie stężeń. Obliczona, metodą dodatku wzorca, zawartość bisfenolu A w tle systemu HPLC-MS/MS w warunkach elucji gradientowej z 10 minutowym czasem stabilizacji kolumny wynosiła 0,11 ng. Dozując w tych warunkach roztwór o zawartości 0,05 ng bisfenolu A, obliczony błąd pomiaru jest rzędu 200%.

Rozwiązaniem powyższego problemu jest stosowanie warunków elucji izokratycznej z dużą zawartością acetonitrylu w fazie ruchomej do oznaczania śladowych ilości bisfenolu A, ponieważ w tych warunkach bisfenol A obecny w fazie ruchomej jest ciągle wymywany z kolumny chromatograficznej.

5. Oznaczanie całkowitej zawartości bisfenolu A w próbkach moczu

Podczas realizacji kolejnego etapu prac badawczych opracowano metodykę oznaczania poziomu stężenia wolnego bisfenolu A oraz jego koniugatu z kwasem glukuronowym w próbkach moczu.

W ramach współpracy naukowej z Międzynarodowym Uniwersytetem na Florydzie (ang. *Florida International University*) postanowiono określić przydatność techniki FSPE do izolacji bisfenolu A z próbek moczu. W próbkach moczu bisfenol A może występować w postaci wolnej oraz sprzężonej, głównie jako glukuronid. Z uwagi na to, że celem eksperymentu było oznaczenie całkowitej zawartości bisfenolu A, niezbędne było przeprowadzenie reakcji hydrolizy glukuronidu za pomocą enzymu β -glukuronidazy. Do oznaczeń końcowych została wykorzystana technika wysokosprawnej chromatografii cieczonej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas HPLC-MS/MS.

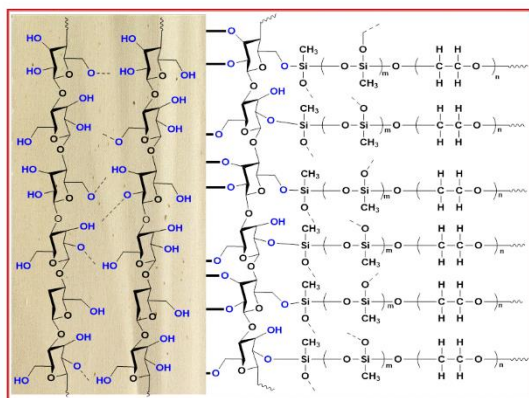
5.1. Optymalizacja procesu ekstrakcji bisfenolu A z zastosowaniem techniki FPSE

W celu wyizolowania bisfenolu A z próbek moczu została wykorzystana technika FPSE. Technika ta, opracowana przez naukowców z Uniwersytetu na Florydzie, polega na sorpcji analitów na powierzchni włókien, z których zbudowana jest tkanina. Powierzchnia tych włókien może być modyfikowana różnymi grupami funkcyjnymi zapewniającymi tkaninie odpowiednie właściwości sorpcyjne. Taka tkanina po wcześniejszym kondycjonowaniu w mieszaninie składającej się z metanolu i acetonitrylu (1/1), a następnie przemyciu w wodzie, może być wprowadzona bezpośrednio do różnego rodzaju próbek ciekłych.

5.1.1. Wybór materiału sorpcyjnego stosowanego do izolacji bisfenolu A

Ze względu na skomplikowany skład matrycy próbek moczu, początkowo doświadczenia związane z optymalizacją procedury przygotowania próbek do analizy były przeprowadzane z wykorzystaniem próbek wody. Dopiero po uzyskaniu satysfakcjonujących rezultatów, określono przydatność opracowanej procedury analitycznej do próbek moczu.

W ramach prac badawczych nad opracowaniem procedury izolacji bisfenolu A z próbek moczu z wykorzystaniem techniki FPSE, sprawdzono przydatność tkanin modyfikowanych odpowiednio: polidimetylodifenylosiloksanem (PDMDPS), poli(tetrahydrofuranem) (PTHF) oraz glikolem polietylenowym (PEG), których struktury i właściwości zostały przedstawione na Rysunku 28.

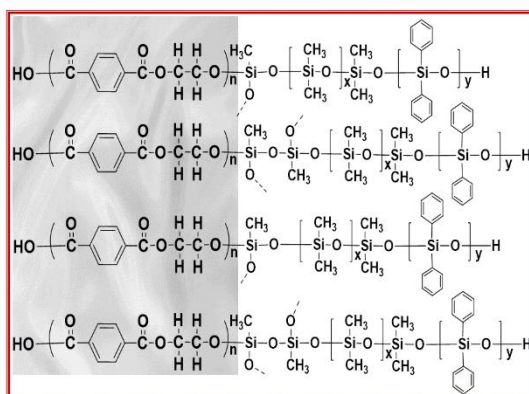


Celuloza modyfikowana glikolem polietylenowym
PEG

Materiał sorpcyjny rekomendowany do oznaczania
analitów o charakterze polarnym, włączając kwasy,
fenole i alkohole

Materiał stabilny w pH 1-13

Stopień pokrycia materiałem sorpcyjnym
8,63 mg/cm²

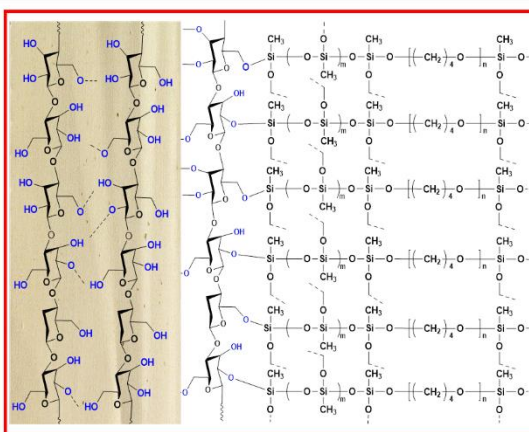


Poliester modyfikowany polidimetylodifenylosiloksanem
PDMDPS

Materiał sorpcyjny rekomendowany do oznaczania
analitów o charakterze niepolarnym i związków
aromatycznych

Materiał stabilny w pH 1-13

Stopień pokrycia materiałem sorpcyjnym
1,93 mg/cm²



Celuloza modyfikowana politetrahydrofuranem
PTHF

Materiał sorpcyjny rekomendowany do oznaczania
analitów o charakterze polarnym i średnio polarnym

Materiał stabilny w pH 1-13

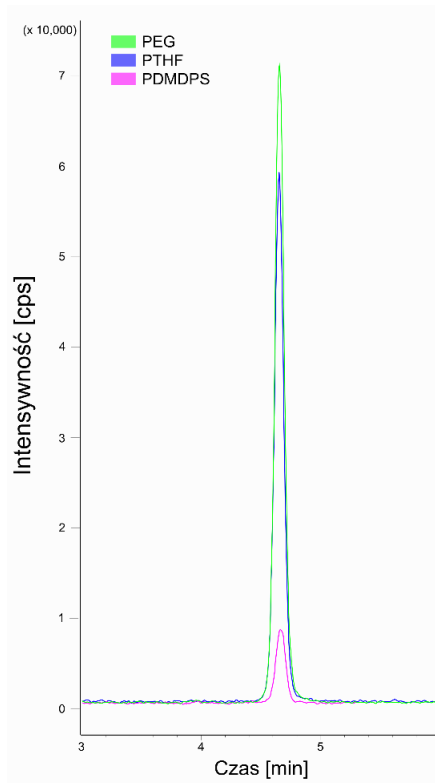
Stopień pokrycia materiałem sorpcyjnym
3,96 mg/cm²

Rysunek 28. Informacje na temat struktur powierzchni tkanin modyfikowanych odpowiednimi grupami PEG, PDMDPS, PTHF.

Do trzech szklanych probówek dodawano po 100 μ L roztworu wzorcowego wzorca wewnętrznego o stężeniu 1 μ g/mL, 100 μ L roztworu bisfenolu A o stężeniu wyjściowym 1 μ g/mL, a następnie 5 mL wody dejonizowanej. Tak przygotowany roztwór intensywnie mieszano przez 15 s. Po uprzednim przygotowaniu trzech tkanin modyfikowanych odpowiednio PDMDPS, PTHF i PEG poprzez 10-minutowe zanurzenie ich w mieszaninie metanolu i acetonitrylu (w stosunku objętościowym 1:1) i przemywanie w wodzie dejonizowanej w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalników organicznych, umieszczono je

w probówkach zawierających roztwory wzorcowe bisfenolu A. Proces ekstrakcji bisfenolu A z roztworu wzorcowego prowadzono poprzez wytrząsanie całej zawartości próbki przez 30 min. Następnie sorbent przenoszono za pomocą pensety do próbki zawierającej eluent, który w tym przypadku stanowił mieszaninę wody i acetonitrylu (w stosunku objętościowym 1:1). Elucję prowadzono przez 10 min, po czym zawartość próbki wymieszano. Uzyskane ekstrakty odwirowano i dozowano do układu chromatograficznego. Na Rysunku 29 przedstawiono chromatogramy uzyskane podczas powyższych doświadczeń.

Zauważono niezadowalającą retencję bisfenolu A na tkaninie modyfikowanej polidimetylodifenylsiloksanem, w związku z czym w kolejnych eksperymentach badania powtarzalności ekstrakcji prowadzono za pomocą techniki FPSE z wykorzystaniem tkanin modyfikowanych odpowiednio glikolem polietylenowym oraz politetrahydrofuranem.



Rysunek 29. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek ekstraktów roztworu bisfenolu A o stężeniu 100 ng/mL przygotowanych z wykorzystaniem techniki FPSE z zastosowaniem trzech różnych tkanin, modyfikowanych odpowiednio: PEG, PTHF i PDMDPS.

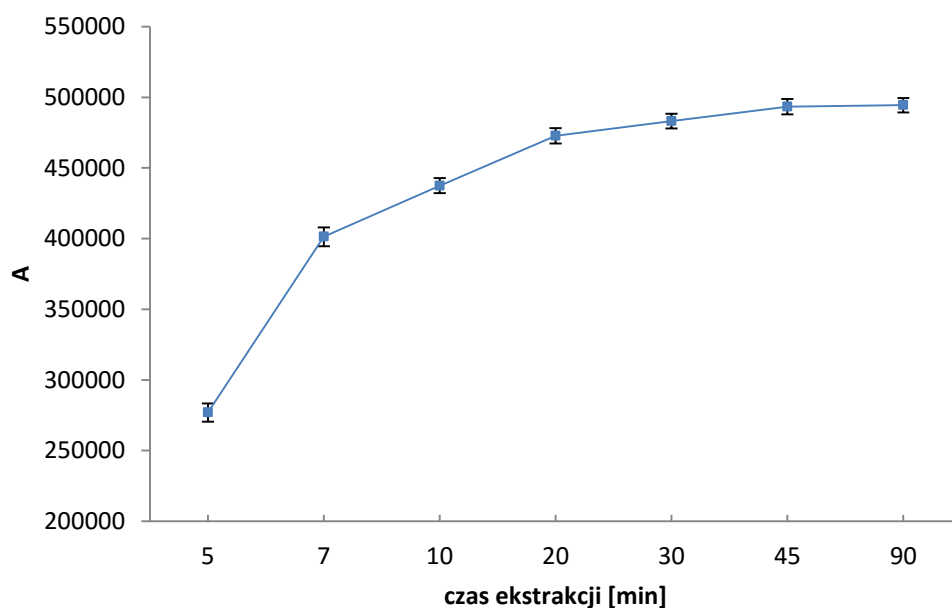
Powtarzalność ekstrakcji z zastosowaniem techniki FPSE wyznaczona została na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego serii trzech pomiarów przygotowanych roztworów wzorcowych bisfenolu A w wodzie o stężeniu 100 ng/mL.

Opracowana procedura ekstrakcji bisfenolu A z próbek wody charakteryzuje się dobrą powtarzalnością dla objętych badaniem materiałów sorpcyjnych, modyfikowanych

odpowiednio politetrahydrofuranem i glikolem polietylenowym. Z uwagi na wyższą intensywność sygnału dla bisfenolu A w przypadku zastosowania tkaniny modyfikowanej glikolem polietylenowym w porównaniu z intensywnością sygnału jaką uzyskano w przypadku tkaniny modyfikowanej politetrahydrofuranem, zdecydowano się w dalszych etapach prac badawczych na zastosowanie tkaniny PEG jako tej odpowiedniej do izolacji bisfenolu A z próbek moczu.

5.1.2. Czas ekstrakcji FPSE

W ramach prac badawczych przeprowadzono serię eksperymentów mających na celu optymalizację czasu ekstrakcji bisfenolu A z próbek moczu za pomocą techniki FPSE. W tym celu do pobranej próbki moczu o objętości 500 μL dodawano 25 μL roztworu wzorcowego bisfenolu A o stężeniu 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oraz 4475 μL 0,1 M buforu octanowego o pH 4,5. Do próbek moczu dodawano 0,1 M bufor octanowy by zapewnić stałe pH wszystkich próbek poddawanych analizie. Tak przygotowaną próbkę po intensywnym wymieszaniu poddawano ekstrakcji FPSE odpowiednio przez 5, 7, 10, 20, 30, 45 i 90 min. Po zadanym czasie materiał sorpcyjny przenoszono do 1 mL ekstrahenta na czas 10 min, po czym ekstrakt wirowano i przenoszono do fiolki, a następnie dozowano do układu chromatograficznego. Na Rysunku 30 przedstawiono uzyskaną zależność pola powierzchni piku dla bisfenolu A od czasu ekstrakcji FPSE.

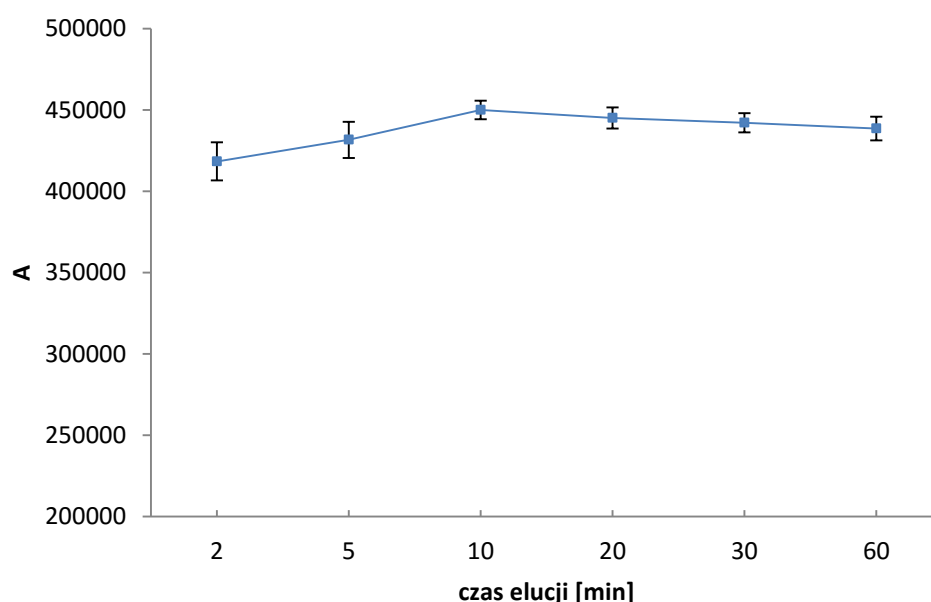


Rysunek 30. Wykres przedstawiający zależność pola powierzchni piku bisfenolu A od czasu ekstrakcji FPSE.

Przebieg krzywej ekstrakcji bisfenolu A ma niemalże „podręcznikowy” przebieg, wyraźnie pokazując wzrost wydajności ekstrakcji wraz z wydłużaniem czasu jej trwania. Ponadto można zaobserwować, że po 45 minutach ustala się równowaga, dlatego też czas ten uznać można za optymalny. Taki czas mieści się w zakresie plateau krzywej i w dalszych pracach eksperymentalnych czas ekstrakcji bisfenolu A z próbek moczu trwał 45 min.

5.1.3. Czas elucji bisfenolu A

Optymalizację czasu elucji bisfenolu A z powierzchni tkaniny modyfikowanej glikolem polietylenowym przeprowadzono z użyciem mieszaniny składającej się z H₂O i ACN, a próbki moczu zostały przygotowane analogicznie, jak w przypadku prac związanych z optymalizacją czasu ekstrakcji (*pkt. 5.1.2.*). W trakcie prac związanych ze sprawdzeniem czasu niezbędnego na wyluowanie zaadsorbowanego bisfenolu A z tkaniny do ekstrahentu uwzględniono optymalny czas ekstrakcji bisfenolu A z próbek moczu (45 min) ustalony w poprzednim eksperymencie. Po przeprowadzeniu etapu ekstrakcji materiał sorpcyjny wraz z zaadsorbowanym analitem przenoszono do 1 mL mieszaniny ekstrahującej. Elucję prowadzono odpowiednio przez 2, 5, 10, 20 i 30 min. Następnie próbki po odwirowaniu przenoszono do fiolek i dozowano do układu chromatograficznego. Na Rysunku 31 przedstawiono zależność pola powierzchni piku dla bisfenolu A od czasu elucji analitu z materiału sorpcyjnego.

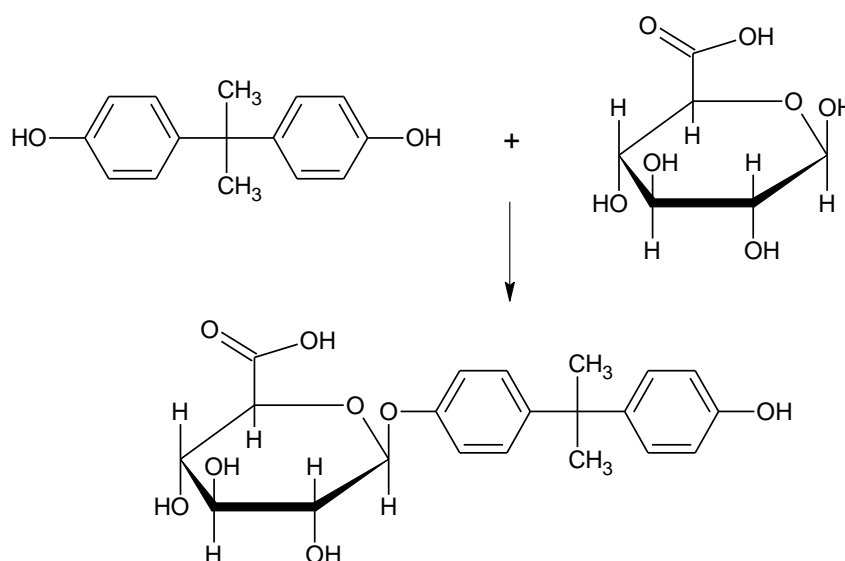


Rysunek 31. Wykres przedstawiający zależność pola powierzchni piku bisfenolu A od czasu elucji analitu z materiału sorpcyjnego.

Analizując powyższy wykres obrazujący zależność pola powierzchni pików bisfenolu A od czasu elucji bisfenolu A z powierzchni modyfikowanej tkaniny glikolem polietylenowym za pomocą mieszaniny ekstrahującej składającej się z H₂O i ACN zaobserwowano, że optymalne jest prowadzenie elucji przez okres 10 min.

5.2. Optymalizacja procesu hydrolizy glukuronidu bisfenolu A

Bisfenol A w próbkach moczu może występować w postaci wolnej, jak i związanej z kwasem glukuronowym. Sprzężenie substancji z kwasem glukuronowym, czyli reakcja glukuronidacji, stanowi podstawowy mechanizm detoksykacji i eliminacji związków lipofilowych z organizmu [123]. Glukuronidy powstają w wyniku połączenia wiązaniem glikozydowym cząsteczki kwasu glukuronowego z analitem. Utworzenie glukuronidów w obecności UDP-glukuronozylotransferazy zwiększa polarność związków, dzięki czemu są one łatwo usuwane z moczem i żółcią doprowadzając do całkowitej eliminacji bądź znacznego obniżenia toksyczności związków [124]. Na Rysunku 32 przedstawiono reakcje sprzęgania cząsteczki bisfenolu A z kwasem glukuronowym.



Rysunek 32. Reakcja sprzęgania cząsteczki bisfenolu A z kwasem glukuronowym.

Ze względu na cel niniejszego projektu badawczego, którym było oznaczenie całkowitej zawartości bisfenolu A w moczu, BPA sprzężony z kwasem glukuronowym należało poddać reakcji hydrolizy w obecności enzymu β -glukuronidazy. Reakcje hydrolizy glukuronidu bisfenolu A były przeprowadzane w temperaturze 37°C. Wysoki koszt substancji wzorcowej glukuronidu bisfenolu A spowodował podjęcie prac związanych z optymalizacją czasu reakcji hydrolizy z wykorzystaniem wzorca glukuronidu dopaminy, dostępnego w laboratorium.

W celu oszacowania stopnia konwersji glukuronidu dopaminy do dopaminy, analizy chromatograficzne wykonano z użyciem systemu HPLC złożonego z urządzenia do odgazowania fazy ruchomej, pompy, automatycznego podajnika próbek i termostatu kolumny. W trakcie oznaczeń korzystano z kolumny chromatograficznej Synergi Hydro-RP (150 mm × 4,6 mm; 4 μm). Analizy chromatograficzne prowadzono w warunkach elucji izokratycznej, a faza ruchoma zawierała 98% wody i 2% acetonitrylu. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej było równe 1 mL/min, a temperatura termostatu kolumny wynosiła 45°C. Do układu chromatograficznego dozowano 10 μL mieszaniny reakcyjnej składającej się z roztworu wzorcowego glukuronidu dopaminy i enzymu β-glukuronidazy.

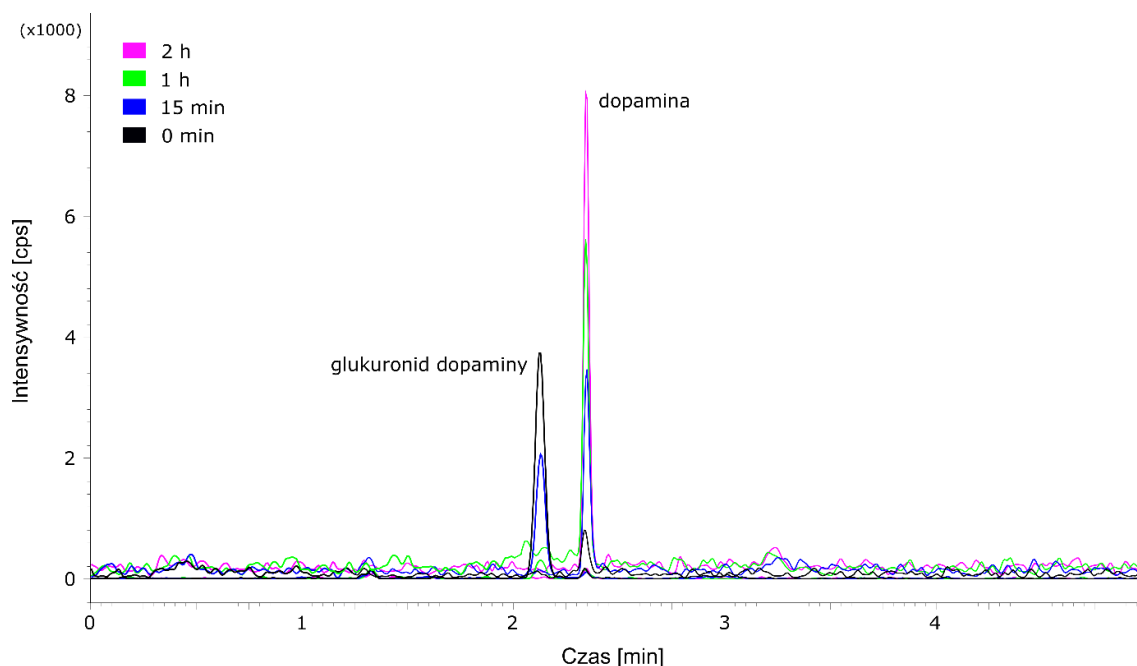
Jako detektor zastosowano tandemowy spektrometr mas (Shimadzu LC-MS-8050 Shim-pol, Polska) pracujący w trybie MRM z jonizacją poprzez elektrorozpylanie z tworzeniem jonów naładowanych dodatnio. Specyficzne przejścia MRM zostały wybrane poprzez dozowanie roztworów wzorcowych DOP i DOP-gluc o stężeniu 200 ng/mL do spektrometru mas pracującego w trybie FIA. Optymalne warunki pracy tandemowego spektrometru mas zostały przedstawione w Tabeli 14.

Tabela 14. Informacje o parametrach pracy tandemowego spektrometru mas pracującego w trybie MRM tworzenia jonów naładowanych dodatnio.

Analit	jon pseudomolekularny → jon fragmentacyjny	Napięcie w Q1 [V]	Energia kolizji [V]	Napięcie w Q3 [V]	
DOP-gluc	330,10 → 137,25	15	20	28	
DOP	154,00 → 91,00	16	22	17	
parametry MS/MS					
Gaz rozpylający [L/min]	Gaz ogrzewający [L/min]	Temperatura źródła [°C]	Temperatura DL [°C]	Temperatura bloku grzewczego [°C]	Gaz suszący [L/min]
3	10	300	250	400	10

W celu oznaczenia całkowitej zawartości bisfenolu A w próbkach moczu niezbędne jest przeprowadzenie reakcji hydrolizy wiązania glikozydowego. Wzorując się na potrzebnym czasie do przeprowadzenia reakcji hydrolizy wiązania glikozydowego glukuronidu dopaminy do dopaminy oszacowano konieczny czas na przeprowadzenie konwersji glukuronidu bisfenolu A do wolnego związku. W tym celu przygotowano 4 próbki. Do każdej z nich dodano 500 μL próbki moczu, 4380 μL 0,1 M buforu octanowego o pH=4,5, 100 μL glukuronidu dopaminy oraz 20 μL enzymu β-glukuronidazy, po czym zawartość intensywnie mieszano. Z pierwszej próbki pobrano 500 μL próbki, do której dodano 500 μL acetonitrylu, wymieszano i odwirowano. Supernatant zadozowano do układu HPLC-MS/MS. W ten sposób została przygotowana próbka pobrana w czasie 0. Trzy pozostałe próbki inkubowano w 37°C

odpowiednio przez 15 minut, 1 godzinę i 2 godziny. Po zadanym czasie inkubacji zawartość próbki intensywnie mieszano, po czym pobrano 500 μL próbki. Do której dodano 500 μL acetonitrylu, a zawartość intensywnie mieszano i wirowano. Otrzymany supernatant wprowadzono do systemu HPLC-MS/MS. Na Rysunku 33 pokazano przykładowe chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek moczu z dodatkiem glukuronidu dopaminy po przeprowadzeniu reakcji hydrolizy przy różnym czasie inkubacji w obecności enzymu β -glukuronidazy.



Rysunek 33. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek moczu z dodatkiem glukuronidu dopaminy po przeprowadzeniu reakcji hydrolizy w obecności β -glukuronidazy przy zastosowaniu różnych czasów inkubacji: 0 min, 5 min, 1 h i 2 h.

Analizując chromatogramy przedstawione na Rysunku 33 można stwierdzić, że optymalny czas inkubacji dla reakcji hydrolizy glukuronidu dopaminy wynosił 2 godziny. W tym czasie nastąpiła całkowita konwersja glukuronidu dopaminy do wolnego związku. Na podstawie tej obserwacji wybrano optymalny czas hydrolizy glukuronidu bisfenolu A w celu oznaczenia całkowitej zawartości bisfenolu A w próbkach moczu.

5.3. Kalibracja układu HPLC-MS/MS do oznaczania bisfenolu A w próbkach moczu

Do oznaczania ilościowego zastosowano metodę wzorca wewnętrznego, która polega na dodaniu do próbki znanej ilości wzorca wewnętrznego. Istotnym aspektem metody wzorca wewnętrznego jest konieczność dodawania IS do próbek z dużą precyzją, a także zawsze z tego samego roztworu wyjściowego.

Jako wzorca wewnętrznego, podobnie jak w przypadku oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej, użyto deuterowanego bisfenolu A. Dodatek wzorca wewnętrznego do próbki przed etapem przygotowania pozwala uniknąć strat analitów na etapie izolacji i wzbogacania. Ponadto dodatek IS podczas detekcji za pomocą techniki spektrometrii mas umożliwia kompensację zmian czułości detektora.

Wspomniano już w *Rozdziale 3.5*, że techniki chromatograficzne opierają się na pomiarze względnym, dlatego niezbędne jest przeprowadzenie kalibracji układu HPLC-MS/MS. W tym celu przygotowano roztwory podstawowe BPA i BPA- d_{16} o stężeniu 0,2 mg/mL poprzez odważenie odpowiedniej ilości czystych substancji w kolbach miarowych i uzupełnienie do kreski acetonitrylem. Stężenie BPA i BPA- d_{16} w roztworze roboczym wynosiło 1 $\mu\text{g/mL}$. Roztwory kalibracyjne (RK) przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu roboczego BPA w 0,1 M buforze octanowym uzyskując następujące stężenia bisfenolu A: 10, 50, 100, 250 i 500 ng/mL. W osobnej kolbie miarowej przygotowano roztwór wzorca wewnętrznego o stężeniu 250 ng/mL poprzez rozcieńczenie roztworu roboczego BPA- d_{16} również w 0,1 M buforze octanowym. Wszystkie roztwory podstawowe, robocze i kalibracyjne przechowywane były w szklanych naczyniach oraz w zamrażalniku w temperaturze -20°C .

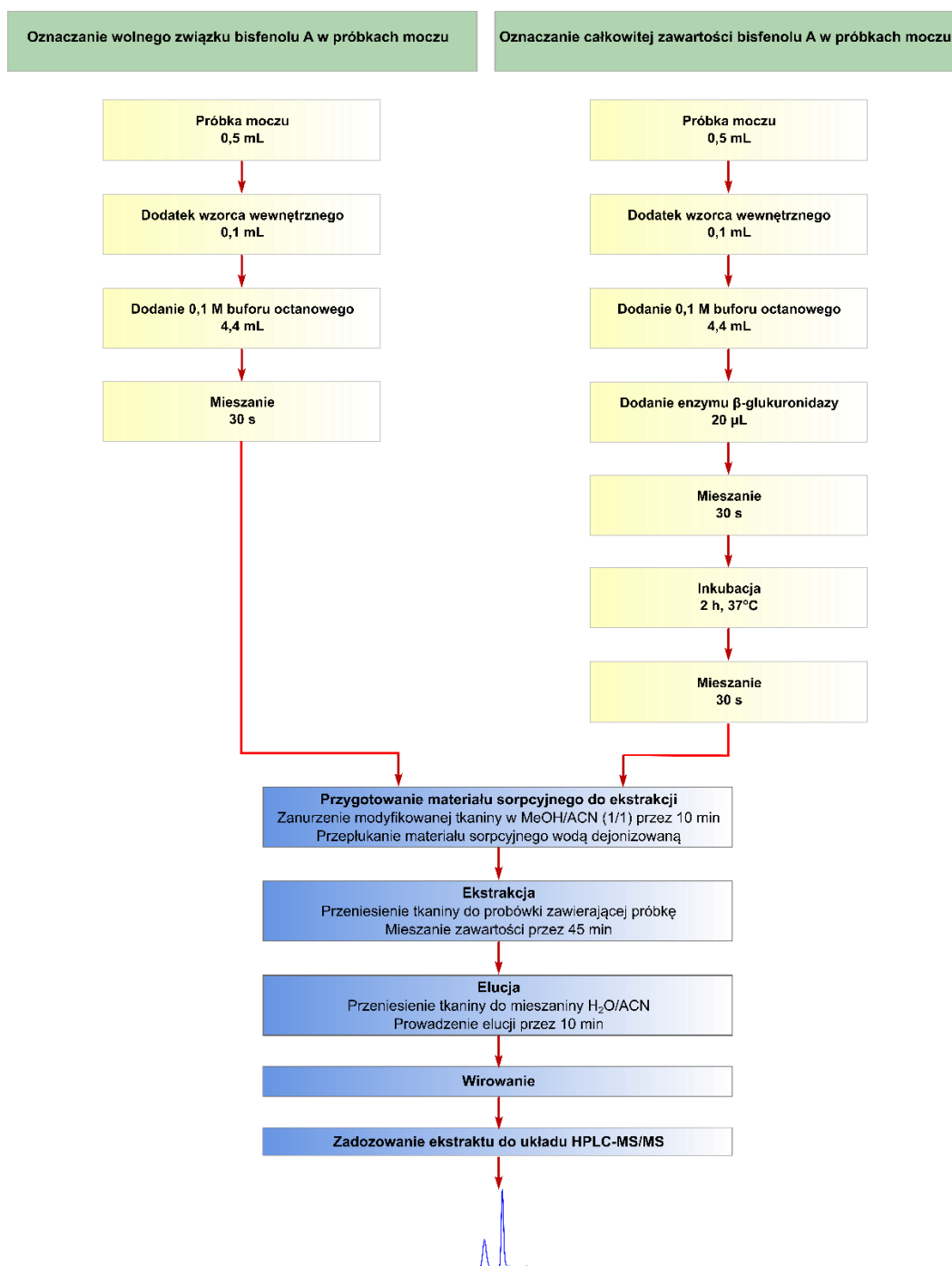
Ze względu na efekty matrycowe przygotowano roztwory kalibracyjne z odwzorowaniem matrycy. Do 500 μL próbki moczu dodano 100 μL roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 250 ng/mL, 100 μL roztworu kalibracyjnego (z zakresu stężeń 10-500 ng/mL) oraz 4300 μL 0,1 M buforu octanowego. Zawartość mieszało, a następnie tak przygotowaną próbkę poddano ekstrakcji za pomocą techniki FPSE. Po etapie elucji bisfenolu A z powierzchni materiału sorpcyjnego za pomocą 1 mL mieszaniny składającej się z $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ w stosunku objętościowym 1:1 dozowano do układu HPLC-MS/MS, uzyskując w ten sposób krzywą kalibracyjną dla BPA w zakresie stężeń 1-50 ng/mL.

Na podstawie uzyskanych chromatogramów sporządzono krzywe kalibracyjne opisujące zależność stężenia analitu w funkcji stosunku powierzchni piku analitu i powierzchni wzorca wewnętrznego. Mając na uwadze wartość liczbową współczynnika determinacji ($R^2=0,999$), można stwierdzić, że w badanym zakresie stężeń bisfenolu A (1-50 ng/mL) istnieje liniowa zależność pomiędzy zmiennymi.

Obliczone wartości granicy wykrywalności i oznaczalności dla BPA zdefiniowano jako stężenie analitu dające stosunek sygnału do szumu wynoszący odpowiednio 3 i 10. Dla opracowanej procedury analitycznej granica wykrywalności wynosi 0,5 ng/mL, a oznaczalności 1 ng/mL.

5.4. Procedura oznaczania bisfenolu A w próbkach moczu

Na podstawie przeprowadzonych badań optymalizacyjnych związanych z przeprowadzeniem reakcji hydrolizy, przygotowaniem próbek moczu za pomocą techniki FPSE oraz ich analizy za pomocą techniki HPLC-MS/MS, opracowano procedurę oznaczania śladowych ilości bisfenolu A. Została ona schematycznie przedstawiona na Rysunku 34.

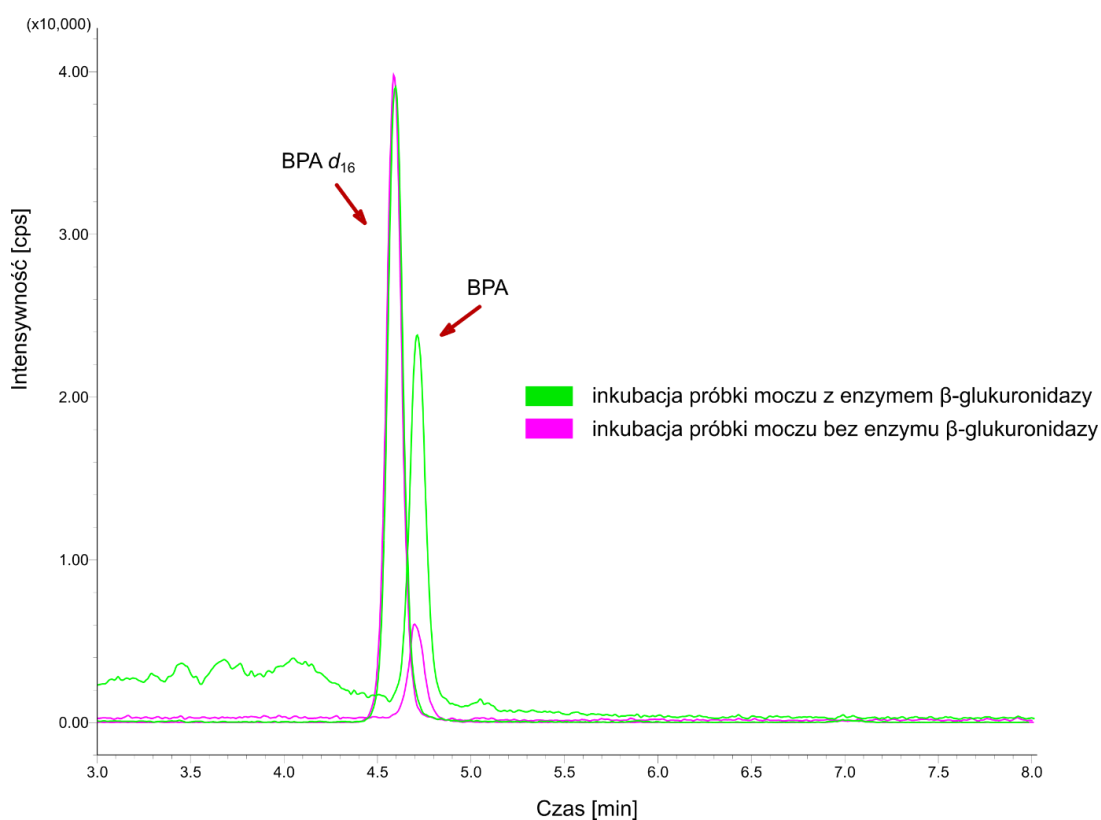


Rysunek 34. Schemat opracowanej procedury oznaczania wolnego bisfenolu A oraz całkowitej zawartości bisfenolu A w próbkach moczu.

Uogólniając, procedura oznaczania bisfenolu A w próbkach moczu opiera się na dodaniu wzorca wewnętrznego i buforu octanowego w celu zapewnienia identycznych wartości pH dla próbek poddanych badaniom. W przypadku oznaczenia całkowitej zawartości bisfenolu A konieczne jest przeprowadzenie reakcji hydrolizy przy obecności β -glukuronidazy. Tak przygotowane próbki poddaje się ekstrakcji za pomocą techniki FPSE. Uzyskany ekstrakt poddawany jest rozdzielaniu chromatograficznemu w odwróconym układzie faz, a anality podlegają detekcji z zastosowaniem tandemowego spektrometru mas pracującego w trybie MRM.

5.5. Analiza próbek moczu

Opracowaną procedurę analityczną wykorzystano do badań próbek rzeczywistych. Próbki moczu zostały pozyskane w ramach współpracy z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym. Po dostarczeniu do Laboratorium Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej próbki przechowywano w zamrażalniku w temperaturze -80°C . Na Rysunku 35 przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbki moczu zarówno po przeprowadzeniu, a także bez przeprowadzenia reakcji hydrolizy.



Rysunek 35. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbki moczu bez przeprowadzenia oraz po przeprowadzeniu reakcji hydrolizy.

W wyniku przeprowadzenia reakcji hydrolizy glukuronidu bisfenolu A zaobserwowano większą intensywność pików dla bisfenolu A w stosunku do uzyskanej intensywności sygnału bez poddania próbki moczu inkubacji w obecności enzymu β -glukuronidazy. Uzyskane wyniki dla próbek moczu zestawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Wyniki oznaczania zawartości bisfenolu A oraz całkowitej zawartości bisfenolu A w próbkach moczu.

Nazwa próbki	Zawartość wolnego bisfenolu A [ng/mL]	Całkowita zawartość bisfenolu A [ng/mL]	Obliczona zawartość glukuronidu bisfenolu A [ng/mL]
1	<LOD	7,68	7,68
2	<LOD	1,00	1,00
3	<LOD	<LOD	<LOD
4	2,46	4,79	2,33
5	<LOD	1,09	1,09
6	<LOD	<LOD	<LOD
7	<LOD	11,28	11,28
8	<LOD	18,58	18,58
9	<LOD	<LOD	<LOD
10	<LOD	1,35	1,35
11	<LOD	1,89	1,89
12	<LOD	<LOD	<LOD
13	<LOD	1,09	1,09
14	<LOD	<LOD	<LOD
15	<LOD	<LOD	<LOD
16	3,02	3,03	0,01
17	3,46	56,37	52,91
18	1,15	8,22	7,07
19	1,30	30,14	28,84
20	2,56	2,82	0,26
21	1,43	19,52	18,09
22	2,46	54,75	52,29
23	6,40	7,49	1,09
średnia	1,05	10,05	8,99

Na podstawie uzyskanych wyników można zaobserwować, że w próbkach moczu bisfenol A częściej występuje w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym, niż w postaci wolnego związku. Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że bisfenol A metabolizowany jest w wątrobie w ciągu 6 godzin do postaci glukuronidu. Reakcja glukuronidacji stanowi w tym przypadku mechanizm obronny organizmu przed szkodliwymi związkami, albowiem powstający w tej reakcji glukuronid bisfenolu A jest łatwiej usuwany z organizmu wraz z moczem. Zawartość glukuronidu bisfenolu A obliczono na podstawie różnicy całkowitej zawartości bisfenolu A i stężenia wolnego związku bisfenolu A.

6. Podsumowanie

W ramach badań prowadzonych w trakcie studium doktoranckiego opracowano nowe procedury analityczne umożliwiające oznaczanie śladowych ilości bisfenolu A w próbkach biologicznych.

Opracowana metodyka do oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej oparta jest na ekstrakcji analitu za pomocą acetonitrylu, a na etapie oznaczeń końcowych zastosowano technikę HPLC-MS/MS. Zaproponowana metodyka oznaczania BPA w próbkach surowicy ludzkiej stanowi rozwiązanie skuteczne, a jednocześnie konkurencyjne w stosunku do innych znanych metod. Dzięki wykorzystaniu opracowanej metodyki możliwe jest wykrycie bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej na niskim poziomie stężeń (LOQ= 4,5 ng/mL).

Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było zbadanie zależności między stężeniem bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej, a zachorowalnością na PCOS. W ramach badań prowadzonych we współpracy z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym zaobserwowano, że średnia zawartość bisfenolu A w próbkach surowicy kobiet ze zdiagnozowanym zespołem policystycznych jajników była niewiele większa w porównaniu ze średnią zawartością tego związku u kobiet bez zaburzeń endokrynologicznych.

Ponadto w ramach prac badawczych sprawdzono wpływ diety potencjalnie stanowiącej źródło bisfenolu A na zawartość tego związku w próbkach surowicy ludzkiej. Od każdej uczestniczki projektu zostały pobrane próbki surowicy: przed rozpoczęciem diety, po zakończeniu diety oraz tydzień po zakończeniu diety. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, że wzrosła średnia zawartość bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej pobranych od uczestniczek z grupy badanej po tygodniu stosowania diety „bogatej w BPA”.

W trakcie studium doktoranckiego opracowano również procedurę oznaczania bisfenolu A w próbkach moczu. Opracowana metodyka składała się z odpowiedniego przygotowania próbki moczu do analizy, a następnie analizy oczyszczonego ekstraktu z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Procedura izolacji bisfenolu A z próbek moczu stanowi alternatywne rozwiązanie w stosunku do znanych już czasochłonnych i drogich metod przygotowania próbek do analizy. Najnowszym podejściem do izolacji bisfenolu A z próbek moczu było wykorzystanie techniki FPSE opracowanej przez naukowców z Uniwersytetu na Florydzie.

Zoptymalizowano również proces reakcji hydrolizy glukuronidu bisfenolu A do wolnego związku w celu oznaczenia całkowitej zawartości tego związku w próbkach moczu.

Ponadto w ramach pracy doktorskiej oszacowano wpływ tła systemu HPLC-MS/MS na wyniki oznaczeń bisfenolu A. Wykazano, że obecność bisfenolu A w tle systemu ma szczególne znaczenie podczas oznaczania tego związku na niskim poziomie stężeń. Rozwiązaniem powyższego problemu jest zastosowanie warunków elucji izokratycznej z dużą zawartością acetonitrylu w fazie ruchomej.

STRESZCZENIE

Bisfenol A jest jedną z najczęściej produkowanych substancji na świecie. Głównie używa się go do wytwarzania tworzyw sztucznych: poliwęglanów i żywic epoksydowych, które znajdują zastosowanie w produkcji opakowań, butelek, zabawek i urządzeń medycznych. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że BPA może migrować z tego typu materiałów do mediów, które są z nim w bezpośrednim kontakcie. Szerokie zastosowanie produktów wytwarzanych z udziałem bisfenolu A jest głównym źródłem narażenia człowieka na ten związek. Badania toksykologiczne wskazują na negatywny wpływ tego związku na zdrowie ludzi, nawet przy małych dawkach (0,01 – 0,71 µg/kg/dzień), jak również na jego właściwości zakłócające gospodarkę hormonalną.

Oznaczanie bisfenolu A, szczególnie na niskim poziomie stężeń, stanowi wyzwanie dla analityków. Śladowe jego ilości mogą być obecne w rozpuszczalnikach, naczyniach laboratoryjnych i w produktach z tworzyw sztucznych, co znacznie utrudnia opracowanie metodyki analitycznej cechującej się wysoką czułością i dobrą powtarzalnością wyników. W ramach pracy doktorskiej opisano wpływ elucji gradientowej i izokratycznej na tło systemu HPLC-MS/MS. Wykazano, że obecność bisfenolu A w tle systemu ma szczególne znaczenie podczas oznaczania tego związku na niskim poziomie stężeń. Rozwiązaniem powyższego problemu jest zastosowanie warunków elucji izokratycznej z dużą zawartością acetonitrylu w fazie ruchomej.

Podstawowym celem pracy doktorskiej było opracowanie nowych metodyk analitycznych do oznaczania bisfenolu A w próbkach biologicznych: surowicy i moczu. Opracowana procedura do oznaczania bisfenolu A w próbkach surowicy ludzkiej opiera się na ekstrakcji bisfenolu A za pomocą acetonitrylu, a analizę uzyskanych ekstraktów przeprowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas.

Ponadto opracowano procedurę oznaczania bisfenolu A w próbkach moczu. Metodyka ta polega na izolacji bisfenolu A z próbek moczu za pomocą techniki FPSE, a analizę ekstraktów prowadzono z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS.

Opracowane procedury analityczne mogą być wykorzystywane przez laboratoria analityczne i kliniczne.

ABSTRACT

Bisphenol A is one of the highest volume of chemicals produced worldwide. BPA is mainly used in the production of polycarbonates and epoxy resins utilized in manufacture of containers, bottles, toys and medical devices. Recent scientific findings indicate that BPA may migrate from those materials to media which are in direct contact with them. The widespread use of products containing bisphenol A is a major source of human exposure for this compound. Toxicological studies on BPA indicate its negative health effects including endocrine disrupting properties, even at low doses (0.01 –0.71 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$).

Determination of low concentration of BPA is a challenge for analytical chemists. Trace amounts of BPA can be present in solvents, laboratory vessels and plastic equipment. Because of this it is difficult to develop an analytical methodology characterized by high sensitivity and good reproducibility of results. The doctoral dissertation describes effects of gradient and isocratic elution conditions on LC-MS/MS system blank. Low repeatability of results especially at low concentration level was observed. To deal with this problem an isocratic elution mode, characterized by fairly high acetonitrile content was used.

The main objective was to develop new chromatographic methods for determination of bisphenol A in biological samples: serum and urine. An analytical procedure for determination of bisphenol A in serum samples is based on the use of liquid-liquid extraction (LLE) and then analysis of extracts by using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

An analytical procedure involving FPSE technique and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry has been developed for the determination of bisphenol A in urine samples.

The developed analytical procedures may be used in analytical and clinical laboratories.

WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

1. Publikacje

- [1] **K. Wilczewska**, J. Namieśnik, A. Wasik, *Troubleshooting of the determination of bisphenol A at ultra-trace levels by liquid chromatography and tandem mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. 408, 1009, 2016.
- [2] **K. Wilczewska**, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *LC-MS and LC-NMR as Complementary Techniques for the Determination of Pharmaceuticals in Dosage Formulations*, Crit. Rev. Anal. Chem. 43, 148, 2013.
- [3] M. Wiergowski, J. Aszyk, M. Kaliszan, **K. Wilczewska**, J. Sein Anand, A. Kot-Wasik, Z. Jankowski, *Identification of novel psychoactive substances 25B-NBOMe and 4-CMC in biological material by UPLC-Q-TOF-MS and their quantification in blood by UPLC-MS/MS in a case of severe intoxications*, J.Chromatogr. B (w recenzji).
- [4] A. Szybiak, A. Rutkowska, **K. Wilczewska**, N. Szczepańska, A. Wasik, J. Namieśnik, D. Rachoń, *Serum bisphenol A (BPA) concentrations in young women rise after the consumption of canned foods*, J. Toxicol. Env. Heal. A (w recenzji).
- [5] **K. Wilczewska**, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *Czy wiemy co łykamy – Zanieczyszczenia obecne w produktach farmaceutycznych i sposoby ich detekcji*. Analityka Nauka i Praktyka, 2 (2014) 28.

2. Komunikaty i postery

- [1] **K. Wilczewska**, P. Kubica, J. Namieśnik, A. Wasik, *The troubleshooting of the determination of BPA at ultra-trace levels by liquid chromatography and tandem mass spectrometry*, Proceedings of the 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Genewa 21-25 czerwca 2015, str. 181.
- [2] **K. Wilczewska**, A. Rutkowska, A. Konieczna, J. Namieśnik, A. Wasik, *An alternative approach for the determination of total bisphenol A in urine samples*, Proceedings of the 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Genewa 21-25 czerwca 2015, str. 182.
- [3] P. Kubica, **K. Wilczewska**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, M. Szczygieł, J. Aszyk, J. Namieśnik, *Separation of complex mixture of pharmaceuticals by RPLC-MS/MS and HILIC-MS/MS – comparison of developed methods*, Proceedings of the 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Genewa 21-25 czerwca 2015, str. 166.

- [4] P. Kubica, **K. Wilczewska**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, *Analysis of nicotine free e-liquids for electronic cigarettes for trace amounts of carbohydrates and nicotine by RPLC/MS/MS and HILIC-MS/MS*, Proceedings of the 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Genewa 21-25 czerwca 2015, str. 343.
- [5] J. Aszyk, M. Szczygieł, P. Kubica, **K. Wilczewska**, M. Wiergowski, A. Kot-Wasik *Simultaneous and simple determination of 25B-NBOMe and 4-CMC in blood by HPLC-MS/MS and HPLC-QTOF in a case of severe intoxication*, Proceedings of the 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Genewa 21-25 czerwca 2015, str. 349.
- [6] A. Rutkowska, A. Konieczna, **K. Wilczewska**, A. Ciechanowicz, R. Czernych, A. Kowalewska-Wlas, Ł. Laczmański, J. Kuliczowska, A. Lenarcik, A. Trzmiel-Bira, A. Brona, M. Kuligowska-Jakubowska, A. Kot-Wasik, A. Wasik, A. Milewicz, J. Namieśnik, L. Wolska, D. Rachoń, *The commonly used plasticisers (bisphenols and phthalates) as endocrine disrupting chemicals in healthy women and women with polycystic ovary syndrome*, Proceedings of the 17th European Congress of Endocrinology, Dublin 16-20 maj 2015, str. 37.
- [7] A. Rutkowska, **K. Wilczewska**, Ł. Laczmański, J. Kuliczowska, A. Lenarcik, A. Trzmiel-Bira, A. Brona, M. Kuligowska-Jakubowska, A. Konieczna, A. Kot-Wasik, A. Wasik, A. Milewicz, J. Namieśnik, D. Rachoń, *The potential role of bisphenol A in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome*, Proceedings of the 16th European Congress of Endocrinology, Wrocław 03-07 maj 2014, str. 35.
- [8] **K. Wilczewska**, A. Wasik, A. Rutkowska, P. Kubica, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *Determination of Trace Amounts of Bisphenol a in Human Serum by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry*, Proceedings of the 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam 16-20 czerwca 2013, str. 608.
- [9] **K. Wilczewska**, A. Jakimska, W. Hewelt-Belka, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *A Simple and Rapid Method for Simultaneous Determination of Food Additives in Beverages and Soft Drinks*, Proceedings of the 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam 16-20 czerwca 2013, str. 674.
- [10] P. Kubica, **K. Wilczewska**, A. Wasik, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *Do electronic cigarettes help in quitting nicotine and smoking addiction? Evaluation of nicotine content in zero-level e-liquids with the approach "dilute and shoot" by RPLC-MS/MS and HILIC-MS/MS*,

Proceedings of the 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam 16-20 czerwca 2013, str. 499.

[11] A. Jakimska, **K. Wilczewska**, W. Hewelt-Belka, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, *Photodegradation of Tetracycline Antibiotics in Natural Water Samples*, Proceedings of the 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam 16-20 czerwca 2013, str. 515.

[12] A. Zyglar, **K. Wilczewska**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, *Analysis of food additives in beverages by HPLC-DAD-MS*, Proceedings of the 29th International Symposium on Chromatography, Toruń, 9-13 września 2012, str. 521.

[13] Płotka, C. Morrison, **K. Wilczewska**, M. Biziuk, D. Adam, *Enantioresolution of chloro intermediates of methamphetamine by multidimensional nuclear magnetic resonance and chiral gas chromatography*, Proceedings of the 16th European Conference on Analytical Chemistry: Challenges in Modern Analytical Chemistry, Belgrade, Serbia, 11-15 września 2011, str.121.

[14] **K. Wilczewska**, *Determination of impurities in pharmaceutical products using LC-MS*, Materiały Konferencyjne: 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers: "Advances in Chemical and Mechanical Engineers", Gdańsk 16-19 maja 2012, str. 263-264.

3. Monografie i druki zwarte

[1] **K. Wilczewska**, W. Hewelt-Belka, P. Kubica, A. Kot-Wasik, A. Wasik, Analiza ilościowa w chromatografii cieczowej, str. 1-52, ISBN: 978-83-7348-587-7, GUT Publishing House, 2014.

[2] P. Kubica, **K. Wilczewska**, A. Jakimska, A. Kot-Wasik, A. Wasik, Water and Wastewater Analysis, str. 1-54, ISBN: 978-83-7348-532-7, GUT Publishing House, 2014.

[3] A. Jakimska, W. Hewelt-Belka, **K. Wilczewska**, A. Kot-Wasik, Nowoczesna chromatografia cieczowa, str. 1-82, ISBN: 978-83-7348-566-2, GUT Publishing House, 2014.

[4] **K. Wilczewska**, *Determination of impurities in pharmaceutical products using LC-MS*, Materiały Konferencyjne: Proceedings of the 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers: "Advances in Chemical and Mechanical Engineers", Gdańsk 16-18 maja 2012, Vol. 2/2, str. 301-306.

4. Nagrody i wyróżnienia

[1] Stypendium naukowe otrzymane w roku akademickim 2014/2015 w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii”.

[2] Stypendium wyjazdowe w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” w roku 2013-2014. Realizacja projektu „Liquid chromatography” w Instytucie Van’t Hoff Institute for Molecular Sciences przy Uniwersytecie w Amsterdamie.

[3] Stypendium naukowe dla najlepszych doktorantów Politechniki Gdańskiej w roku akademickim 2013/2014.

[4] Stypendium doktoranckie za osiągnięcia naukowe z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w latach 2012/2013 I 2013/2014.

[5] Beneficjent programu „Mistrz” (edycja 2009) przyznawanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej w roku akademickim 2011-2012.

BIBLIOGRAFIA

- [1] I. Kosarac, C. Kubwabo, K. Lalonde, W. Foster, *J. Chromatogr. B.* **898** (2012) 90-94.
- [2] I. Rykowska, W. Wasiak, *Acta Chromatogr.* **16** (2006) 7-27.
- [3] K. Mokra, M. Kocia, J. Michałowicz, *Food Chem. Toxicol.* **84** (2015) 79–88.
- [4] J. Michałowicz, *Envir. Toxicol. Pharm.* **37** (2014) 738–758.
- [5] FAO/WHO Expert Meeting on Bisphenol A (BPA) Ottawa, Canada, 2–5 November 2010
- [6] C. Groshart, P. Okkerman, A. Pijnenburg, Chemical study on bisphenol A, Report: RIKZ/1001.027, 2001.
- [7] <http://www.bisphenol-a-europe.org> (dostęp: 23.10.2015).
- [8] T. Geens, D. Aerts, C. Berthot, J. P. Bourguignon, L. Goeyens, P. Lecomte, G. Maghuin-Rogister, A. M. Pironnet, L. Pussemier, M. L. Scippo, J. Loco, A. Covaci, *Food Chem. Toxicol.* **50** (2012) 3725–3740.
- [9] D. Zalko, C. Jacques, H. Duplan, S. Bruel, E. Perdu, *Chemosphere.* **82** (2011) 424–430.
- [10] JRC Scientific and Technical Reposts: European Union Risk Assessment Report.
- [11] U.S. Environmental Protection Agency Report: Bisphenol A Alternatives in Thermal Paper.
- [12] A. Rutkowska, D. Rachoń, A. Milewicz, M. Ruchała, M. Bolanowski, D. Jędrzejuk, T. Bednarczuk, M. Górską, A. Hubalewska-Dydejczyk, B. Kos-Kudła, A. Lewiński, W. Zgliczyński, *Endokrynol. Pol.* **66** (2015) 276-281.
- [13] Z. Sosa-Ferrera, C. Mahugo-Santana, J.J. Santana-Rodríguez, *Biomed Res Int.* **2013** (2013) 1-23.
- [14] J. H. Kang, Y. Katayama, F. Kondo, *Toxicol.* **217** (2006) 81–90.
- [15] W. Völkel, N. Bittner, W. Dekant, *Drug Metab. Dispos.* **33** (2005) 1748–1757.
- [16] V. Y. Fujimoto, D. Kim, F. S. Saal, J. D. Lamb, J. A. Taylor, M. S. Bloom, *Fertil. Steril.* **95** (2011) 1816–1819.
- [17] M. S. Bloom, F. S. Saal, D. Kim, J. A. Taylor, J. D. Lamb, V. Y. Fujimoto, *Environ. Toxicol Phar.* **32** (2011) 319–323.
- [18] J. R. Rochester, *Reprod. Toxicol.* **42** (2013) 132–155.
- [19] D. Li, Z. Zhou, D. Qing, Y. He, T. Wu, M. Miao, J. Wang, X. Weng, J. R. Ferber, L. J. Herrinton, Q. Zhu, E. Gao, H. Checkoway, W. Yuan, *Hum. Reprod.* **25** (2010) 519-527.

- [20] T. Takeuchi, O. Tsutsumi, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **291** (2002) 76–78.
- [21] T. Takeuchi, O. Tsutsumi, Y. Ikezuki, Y. Takai, Y. Taketani, *Endocr. J.* **51** (2004) 165–169.
- [22] H. Hiroi, O. Tsutsumi, T. Takeuchi, M. Momoeda, Y. Ikezuki, A. Okamura, H. Yokota, Y. Taketani, *Endocr. J.* **51** (2004) 595–600.
- [23] G. Tarantino, R. Valentino, C. D. Somma, V. D’Esposito, F. Passaretti, G. Pizza, V. Brancato, F. Orio, P. Formisano, A. Colao, S. Savastano, *Clin. Endocrinol.* **78** (2013) 447–453.
- [24] M. Yang, J. H. Ryu, R. Jeon, D. Kang, K. Y. Yoo, *Arch.Toxicol.* **83** (2009) 281–285.
- [25] M. Sugiura-Ogasawara, Y. Ozaki, S. Sonta, T. Makino, K. Suzumori, *Hum. Reprod.* **20** (2005) 2325–2329.
- [26] W. C. Chou, J. L. Chen, C. F. Lin, Y. C. Chen, F. C. Shih, C. Y. Chuang, *Environ Health.* **3** (2011) 10–94.
- [27] P. Fenichel, H. Dechaux, C. Harthe, J. Gal, P. Ferrari, P. Pacini, K. Wagner-Mahler, M. Pugeat, F. Brucker-Davis, *Hum. Reprod.* **27** (2012) 983–990.
- [28] F. Brucker-Davis, P. Ferrari, M. Boda-Buccino, K. Wagner-Mahler, P. Pacini, J. Gal, P. Azuar, P. Fenichel, *Thyroid.* **21** (2011) 1133–1141.
- [29] C. W. Hanna, M. S. Bloom, W. P. Robinson, D. Kim, P. J. Parsons, F. S. Saal, J. A. Taylor, A. J. Steuerwald, V. Y. Fujimoto, *Hum. Reprod.* **27** (2012) 1401-1410.
- [30] A. Dumont, G. Robin, S. Catteau-Jonard, D. Dewailly, *Reprod. Biol. Endocrinol.* **13** (2015) 137-146.
- [31] T. Zuo, M. Zhu, W. Xu, Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* **2016** (2015).
- [32] E. Housman, R.V. Reynolds, Polycystic ovary syndrome: a review for dermatologists: Part I. Diagnosis and manifestations, *J. Am. Acad. Dermatol.* **71** (2014) 847–857.
- [33] G. Jakiel, D. Robak-Chołubek, J. Tkaczuk-Włach, *Prz. Menopauz.* **4** (2006) 265-269.
- [34] G. N. Daskalopoulos, A. Karkanaki, A. Karagiannis, D. P. Mikhailidis, V. G. Athyros, *Angiology.* **62** (2011) 285–290.
- [35] R. Homburg, *H. Reprod.* **24** (2009) 1548-1555.
- [36] S. Mahalingaiah, J.D. Meeker, K.R. Pearson, A.M. Calafat, X. Ye, J. Petrozza, R. Hauser, *Environ. Health Perspect.* **116** (2008) 173-178.
- [37] E. M. Munguia-Lopez, E. Peralta, A. Gonzalez-Leon, C. Vargas-Requena, H. Soto-Valdez, *J. Agr. Food Chem.* **50** (2002) 7299–7302.

- [38] B. G. Timms, K. L. Howdeshell, L. Barton, S. Bradley, C. A. Richter, F. S. Saal, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102** (2005) 7014–7019.
- [39] G. O. Noonan, L. K. Ackerman, T. H. Begley, *J. Agr. Food Chem.* **59** (2011) 7178–7185.
- [40] S. Cunha, J. Fernandes, *Food Control.* **33** (2013) 549–555.
- [41] M. Lorber, A. Schechter, O. Paepke, W. Shropshire, K. Christensen, L. Birnbaum, *Environ. Int.* **77** (2015) 55–62.
- [42] R. Braunrath, D. Podlipna, S. Padlesak, M. Cichna-Markl, *J. Agr. Food Chem.* **53** (2005) 8911–8917.
- [43] R. Braunrath, M. Cichna, *J. Chromatogr. A.* **1062** (2005) 189–198.
- [44] S. Sungur, M. Köroglu, A. Özkan, *Food Chem.* **142** (2014) 87–91.
- [45] J. Yonekubo, K. Hayakawa, J. Sajiki, *J. Agr. Food Chem.* **56** (2008) 2041–2047.
- [46] A. K. Sakhi, I. T. Lillegaard, S. Voorspoels, M. H. Carlsen, E. B. Løken, A. L. Brantsæter, M. Haugen, H. M. Meltzer, C. Thomsen C, *Environ. Int.* **73** (2014) 259–269.
- [47] X. Li, G. G. Ying, H. C. Su, X. B. Yang, L. Wang, *Environ. Int.* **36** (2010) 557–562.
- [48] J. Maia, J. Cruz, R. Sendón, J. Bustos, J. Sanchez, P. Paseiro, *Food Res.Int.* **42** (2009) 1410–1414.
- [49] S. Errico, M. Bianco, L. Mita, M. Migliaccio, S. Rossi, C. Nicolucci, C. Menale, M. Portaccio, P. Gallo, D. G. Mita, N. Diano, *Food Chem.* **160** (2014) 157–164.
- [50] T. Mendum, E. Stoler, H. VanBenschoten, J. C. Warner, *Green Chem. Lett. Rev.* **4** (2011) 81–86.
- [51] S. Biedermann, P. Tschudin, K. Grob, *Anal. Bioanal. Chem.* **398** (2010) 571–576.
- [52] T. Geens, L. Roosens, H. Neels, A. Covaci, *Chemosphere.* **76** (2009) 755–760.
- [53] J. Maia, J. M. Cruz, R. Sendón, J. Bustos, M.E. Cirugeda, J. J. Sanchez, P. Paseiro, *Food Res. Int.* **43** (2010) 1283–1288.
- [54] A. M. Calafat, Z. Kuklanyik, J. A. Reidy, S. P. Caudill, J. Ekong, L.L. Needham, *Environ Health Persp.* **113** (2005) 391–395.
- [55] J. E. Goodman, *Cr. Rev. Toxicol.* **36** (2006) 387–457.
- [56] A. V. Krishnan, P. Stathis, S. F. Permeth, Laszlo Tokes, D. Feldman, *Endocrinology.* **132** (1993) 2279–2286.
- [57] S. C. Laws, S. A. Carey, J. M. Ferrell, G. J. Bodman, R. L. Cooper, *Toxicol. Sci.* **54** (2000) 154–167.
- [58] F. S. P. Farabollini, F. Dessi-Fulgheri, *Pharmacol. Biochem. Be.* **64** (1999) 687–694.

- [59] R. Tyl, C. Myers, M. Marr, B. Thomas, A. Keimowitz, D. Brine, M. M. Veselica, P. A. Fail, T. Y. Chang, J. C. Seely, R. L. Joiner, J. H. Butala, S. S. Dimond, S. Z. Cagen, R. N. Shiotsuka, G. D. Stropp, J. M. Waechter, *Toxicol. Sci.* **68** (2002) 121–146.
- [60] R. W. Tyl, C. B. Myers, M. C. Marr, C. S. Sloan, N. P. Castillo, M. M. Veselica, J. C. Seely, S. S. Dimond, J. P. Miller, R. N. Shiotsuka, D. Beyer, S. G. Hentges, J. M. Waechter, *Toxicol. Sci.* **104** (2008) 362–384.
- [61] Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A, *EFSA J.* **8** (2010) 1829-1945.
- [62] www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol, (dostęp: 10.05.2015).
- [63] S. M. Zimmers, E. P. Browne, P. W. O’Keefe, D. L. Anderton, L. Kramer, D. A. Reckhow, K. F. Arcaro, *Chemosphere.* **104** (2014) 237–243.
- [64] Dyrektywa 2011/8/EU, z dnia 28 stycznia 2011 r. zmieniająca dyrektywę 2002/72/WE w odniesieniu do ograniczenia stosowania bisfenolu A w butelkach z tworzyw sztucznych do karmienia niemowląt.
- [65] R. Rezg, S. El-Fazaa, N. Gharbi, B. Mornagui, *Environ. Int.* **64** (2014) 83–90.
- [66] I. Gyllenhammar, A. Glynn, P. O. Darnerud, S. Lignell, R. Delft, M. Aune, *Environ.Int.* **43** (2012) 21–28.
- [67] Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A, Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting 2–5 November 2010 Ottawa, Canada.
- [68] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A.* **1216** (2009) 449–469.
- [69] M. Cichna-Markl, *Methods.* **56** (2012) 186–191.
- [70] E. R. C. M. Herrero-Hernández, E. Rodríguez-Gonzalo, *Anal. Chim. Acta.* **650** (2009) 195–201.
- [71] L. Rodziewicz, *Bromatol. Chem. Toksyk.* **43** (2010) 222–227.
- [72] G. P. D. De Middeleer, S. D. Saeger, *Trend. Anal. Chem.* **76** (2016) 71–85.
- [73] N. Fontanals, R. M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr A.* **1152** (2007) 14–31.
- [74] www.google.com/patents/US20140274660, (dostęp: 16.07.2016.).
- [75] E. Ferrer, E. Santoni, S. Vittori, G. Font, J. Mañes, G. Sagratini, *Food Chem.* **126** (2011) 360–367.
- [76] A. Kim, C. R. Li, C. F. Jin, K. W. Lee, S. H. Lee, K. J. Shon, N. G. Park, D. K. Kim, S. W. Kang, Y. B. Shim, J. S. Park, *Chemosphere.* **68** (2007) 1204–1209.

- [77] E. Kandaraki, A. Chatzigeorgiou, S. Livadas, E. Palioura, F. Economou, M. Koutsilieris, S. Palimeri, D. Panidis, E. Diamanti-Kandarakis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96** (2011) 480–484.
- [78] Y. Aristiawan, N. P. D. Aryana, D. Styarini, *Procedia Chemistry.* **16** (2015) 202–208.
- [79] A. Alabi, N. Caballero-Casero, S. Rubio, *J Chromatogr. A.* **1336** (2014) 23–33.
- [80] A. Khedr, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **930** (2013) 98–103.
- [81] K. Inoue, K. Kato, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B.* **749** (2000) 17–23.
- [82] D.A. Markham, J.M. Waechter, M. Wimber, N. Rao, P. Connolly, J.C. Chuang, S. Hentges, R. N. Shiotsuka, S. Dimond, A. H. Chappelle, *Journal of Analytical Toxicology.* **34** (2010) 293–303.
- [83] N. Kuroda, Y. Kinoshita, Y. Sun, M. Wada, N. Kishikawa, K. Nakashima, T. Makino, H. Nakazawa, *J. Pharmaceut.Biomed.* **30** (2003) 1743–1749.
- [84] L. Cobellis, N. Colacurci, E. Trabucco, C. Carpentiero, L. Grumetto, *Biomed. Chromatogr.* **23** (2009) 1186–1190.
- [85] I. Gyllenhammar, R. Tröger, A. Glynn, J. Rosén, K. E. Hellenäs, S. Lignell, *Environ. Int.* **64** (2014) 56-60.
- [86] A. Aris, *Reprod. Toxicol.* **45** (2014) 8-13.
- [87] A. C. Dirtu, L. Roosens, T. Geens, A. Gheorghe, H. Neels. A. Covaci, *Anal. Bioanal. Chem.* **391** (2008) 1175–1181.
- [88] K. Servaes, S. Voorspoels, J. Lievens, B. Noten, K. Allaerts, H. Van De Weghe, G. Vanermen, *J. Chromatogr. A.* **1294** (2013) 25–32.
- [89] T. Geens, L. Bruckers, A. Covaci, G. Schoeters, T. Fierens, I. Sioen, G. Vanermenf, W. Baeyensg, B. Morrens, I. Loots, V. Nelen, B. N. Bellevauxj, N. Larebekek, E. Hon, *Environ. Res.* **134** (2014) 110–117.
- [90] G. Provencher, R. Bérubé, P. Dumas, J.-F. Bienvenu, É. Gaudreau, P. Bélanger, P. Ayotte, *J. Chromatogr. A.* **1348** (2014) 97–104.
- [91] X. Zhou, J. P. Kramer, A. M. Calafat, X. Ye, *J. Chromatogr. B.* **944** (2014) 152–156.
- [92] X. Ye, Z. Kuklenyik, L. L. Needham, A. M. Calafat, *J.Chromatogr. B.* **831** (2006) 110–115.
- [93] A. Azzouz, A. J. Rascón, E. Ballesteros, *J. Pharmaceut. Biomed.* **119** (2016) 16–26.
- [94] B. Buscher, D. Lagemaat, W. Gries, D. Beyer, D. A. Markham, R. A. Budinsky, S. S. Dimond, R. V. Nath, S. A. Snyder, S. G. Hentges, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1005** (2015) 30–38.

- [95] S. R. Yazdinezhad, A. Ballesteros-Gómez, L. Lunar, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta.* **778** (2013) 31–37.
- [96] Y. Li, S. Zhang, C. Song, J. You, *Food Anal. Method.* **6** (2013) 1284–1290.
- [97] A. Khedr, *J. Chromatogr. B.* **930** (2013) 98–103.
- [98] S. Cunha, C. Cunha, A. Ferreira, J. Fernandes, *Anal. Bioanal. Chem.* **404** (2012) 2453–2463.
- [99] C. Liao, K. Kannan, *J. Agr. Food Chem.* **61** (2013) 4655–4662.
- [100] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M. Galceran, *Analytica Chimica Acta.* **683** (2011) 227–233.
- [101] M. K. R. Mudiam, R. Jain, V. Dua, A. K. Singh, V. P. Sharma, R. C Murthy, *Anal. Bioanal. Chem.* **401** (2011) 1695-1701.
- [102] N. Rastkari, M. Yunesian, R. Ahmadvani, *J. Environ. Health. Sci. Eng.* **8** (2011) 95-100.
- [103] X. Wei, Y. Huang, M. H. Wong, J. P. Giesy, C. K. Wong, *Chemosphere.* **85** (2011) 122–128.
- [104] A. Schecter, N. Malik, Darrah Haffner, S. Smith, T. R. Harris, O. Paepke, L. Birnbaum, *Environ. Sci. Technol.* **44**, 2010, 9425–9430.
- [105] P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, *Anal. Bioanal. Chem.* **397** (2010) 115-125.
- [106] X. L. Cao, J. Corriveau, S. Popovic, G. Clement, F. Beraldin. G. Dufresne, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 5345–5351.
- [107] X.-L. Cao, J. Corriveau, S. Popovic, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 1307–1311.
- [108] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta.* **617** (2008) 51–58.
- [109] B. Shao, H. Han, X. Tu, L. Huang, *J. Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **850** (2007) 412–416.
- [110] H. W. Kuo, W. H. Ding, *J. Chromatogr A.* **1027** (2004) 67–74.
- [111] D. Podlipna, M. Cichna-Markl, *Eur. Food Res. Technol.* **224** (2007) 629–634.
- [112] B. Shao, H. Hana, D. Lic, Y. Mab, X. Tua, Y. Wua, *Food Chem.* **105** (2007) 1236–1241.
- [113] B. Shao, H. Hana, J. Hu, J. Zhao, G. Wu, Y. Xuea, Y. Ma, S. Zhangd, *Anal. Chim. Acta.* **530** (2005) 245–252.
- [114] X. L. Cao, J. Corriveau, S. Popovic, M.C. Coughlan, N. Chepelev, W. Willmore, T. Schrader, X. Jin, *Chemosphere.* **81** (2010) 817–820.

- [115] Y. S. Choi, S. Cho, C. Lee, H. M. Luu, J. Guo, Contamination of ultrapure water with bisphenol A leached from polysulfone ultrafilter, *Talanta*. **94** (2012) 353–355.
- [116] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahia, D. Prada-Rodriguez, *Talanta*. **101** (2012) 413–419.
- [117] Y. Watabe, T. Kondo, M. Morita, N. Tanaka, J. Haginaka, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A*. **1032** (2004) 45–49.
- [118] V. Padmanabhan, K. Siefert, S. Ransom, T. Johnson, J. Pinkerton, L. Anderson, L. Tao, K. Kannan, *J. Perinatol.* **28** (2008) 258–263.
- [119] Y. Peng, Q. Chu, F. Liu, J. Ye, *Food Chem.* **87** (2004) 135–139.
- [120] B. Shao, H. Han, D. Li, Y. Ma, X. Tu, Y. Wu, *Food Chem.* **105** (2007) 1236–1241.
- [121] A. Kruszyńska, J. Słowińska-Srzednicka, *Postępy Nauk Medycznych*, **25** (2012) 895–899.
- [122] M. Casas, D. Valvi, N. Luque, A. Ballesteros-Gomez, A. E. Carsin, M. F. Fernandez, H. M. Koch, M. A. Mendez, J. Sunyer, S. Rubio, M. Vrijheid, *Environ. Int.* **56** (2013) 10–18.
- [123] J. K. Ritter, *Chem. Biol. Interact.* **129** (2000) 171–193.
- [124] R. Żółtaszek, M. Hanausek, Z. M. Kiliańska, Z. Walaszek, *Postępy Hig. Med. Dosw.* **62** (2008) 451–462.