

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vesna BRGLEZ

**UGOTAVLJANJE UČINKOVITOSTI  
ZMANJŠEVANJA ESTROGENSKE AKTIVNOSTI  
KSENOESTROGENA BISFENOLA A V PROCESU  
FENTONOVE OKSIDACIJE**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vesna BRGLEZ

**UGOTAVLJANJE UČINKOVITOSTI ZMANJŠEVANJA  
ESTROGENSKE AKTIVNOSTI KSENOESTROGENA BISFENOLA A  
V PROCESU FENTONOVE OKSIDACIJE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF EFFECTIVENESS OF ESTROGENIC  
ACTIVITY REDUCTION OF XENOESTROGEN BISPHENOL A  
IN THE PROCESS OF FENTON OXIDATION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Brglez V. Ugotavljanje učinkovitosti zmanjševanja ... bisfenola A v procesu Fentonove oksidacije.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2010

---

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti. Vse analize so bile opravljene na Kemijskem inštitutu v L05 Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo in v sodelovanju s Katedro za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji 16. 6. 2010 za mentorico imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar in za somentorico doc. dr. Tatjano Tišler.

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Tatjana TIŠLER  
Kemijski inštitut, L05 Laboratorij za okoljske vede in inženirstvo

Član: prof. dr. Tom TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Vesna Brglez

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 502(043.2)=163.6
- KG varstvo okolja/ekotoksikologija/estrogenska aktivnost/hormonski motilci/ksestrogen/bisfenol A/Fentonova oksidacija/test YES/GC-MS
- KK AGRIS T01
- AV BRGLEZ, Vesna
- SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/TIŠLER, Tatjana (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2010
- IN UGOTAVLJANJE UČINKOVITOSTI ZMANJŠEVANJA ESTROGENSKE AKTIVNOSTI KSENOESTROGENA BISFENOLA A V PROCESU FENTONOVE OKSIDACIJE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 65 str., 1 pregl., 22 sl., 68 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Med hormonske motilce, ki s posnemanjem naravnih hormonov negativno delujejo na reprodukcijski sistem organizma, spada tudi bisfenol A (BPA), ki se med drugim uporablja v proizvodnji plastike. Zaradi dokazane toksičnosti in estrogenosti predstavlja tveganje za zdravje, zato je njegovo odstranjevanje nujno. Ena izmed metod odstranjevanja je Fentonova oksidacija, pri kateri oksidant  $H_2O_2$  popolnoma oksidira organsko snov. Namen našega dela je bil določiti učinkovitost zmanjševanja estrogenske aktivnosti BPA glede na različne pogoje pri postopku Fentonove oksidacije. Za to smo uporabili biološki test YES ter kemijsko metodo mikroekstrakcije na trdni fazi in plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (SPME/GC-MS). Najprej smo izvedli Fentonovo oksidacijo in pri tem uporabili dve začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l in 22,8 mg/l) ter pet različnih razmerij reagentov  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  in  $H_2O_2$ . Nato smo vzorce skoncentrirali s postopkom ekstrakcije na trdni fazi (SPE) na kolonah Water Oasis HLB in njihovo estrogensko aktivnost preverili s testom YES z gensko spremenjenimi kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae*. Razgradnjo smo preverili s SPME/GC-MS. Na podlagi rezultatov obeh metod smo ugotovili, da s Fentonovo oksidacijo delno oz. popolno razgradimo BPA, kar se kaže kot zmanjšana estrogenska aktivnost. Ugotovili smo tudi, da je za učinkovitost pomembno razmerje med reagentoma in da je najboljša razmerje 1 : 10 (2) (0,0005 M : 0,005 M oz. 0,05 M : 0,5 M). Zaradi sočasne adsorpcije BPA na usedlino je Fentonova oksidacija manj primerna metoda za odstranjevanje BPA iz vode.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 502(043.2)=163.6
- CX environmental protection/ecotoxicology/estrogenic activity/endocrine disrupting chemicals/xenoestrogen/bisphenol A/Fenton oxidation/test YES/GC-MS
- CC AGRIS T01
- AU BRGLEZ, Vesna
- AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/TIŠLER, Tatjana (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2010
- TI DETERMINATION OF EFFECTIVENESS OF ESTROGENIC ACTIVITY REDUCTION OF XENOENOESTROGEN BISPHENOL A IN THE PROCESS OF FENTON OXIDATION
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XI, 65 p., 1 tab., 22 fig., 68 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Endocrine disruptors mimic natural hormones and consequently have a negative impact on reproduction system of different organisms. Among them is bisphenol A (BPA), which is used in plastics industry. It represents a major health risk because of proven toxicity and estrogenicity. Therefore, it is necessary to remove BPA from wastewaters. One of the methods for elimination is Fenton oxidation, in which the oxidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> completely oxidizes organic matter. The purpose of our work was to determine effectiveness of reduction of estrogenic activity of BPA for different conditions of Fenton oxidation. Therefore, a biotest YES (yeast estrogen screen) and a chemical method solid phase microextraction/gas chromatography - mass spectrometry (SPME/GC-MS) were used. First Fenton oxidation with two initial concentrations of BPA (0,228 mg/l and 22,8 mg/l) and 5 different molar ratios of FeSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 : 0,5, 1 : 10, 1 : 10 (2), 1 : 20 and 1 : 33) was performed. Then our samples were concentrated by solid phase extraction (SPE) on Water Oasis HLB columns and their estrogenic activity was determined by YES test, where genetically modified yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used. The degradation of BPA was determined by SPME/GC-MS. Based on the results from both tests it can be concluded that BPA can be partially or completely degraded with Fenton oxidation which can be seen as reduced estrogenic activity. The molar ratios of reagents of Fenton oxidation determined effectiveness of degradation and the best ratio was 1 : 10 (2) (0,0005 M : 0,005 M and 0,05 M : 0,5 M). Because of the adsorption of BPA on the waste sludge during Fenton oxidation, Fenton oxidation seems to be less appropriate method for removal of BPA from water.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Okrajšave in simboli	XI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 HORMONSKI SISTEM	3
2.2 HORMONSKI MOTILCI	3
<b>2.2.1 Bisfenol A</b>	<b>6</b>
2.3 DOKAZOVANJE SPOJIN Z ESTROGENSKIM DELOVANJEM IN NJIHOVE ESTROGENSKE AKTIVNOSTI	9
<b>2.3.1 Koncentriranje vzorcev za dokazovanje hormonskih motilcev</b>	<b>10</b>
2.3.1.1 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)	10
2.3.1.2 Mikroekstrakcija na trdni fazi (SPME)	11
<b>2.3.2 Biološki testi za dokazovanje estrogenske aktivnosti</b>	<b>12</b>
2.3.2.1 <i>In vivo</i> testi	12
2.3.2.2 <i>In vitro</i> testi	13
2.3.2.2.1 Test YES	14
2.3.2.3 Testi brez uporabe celic	15
<b>2.3.3 Kemijske metode</b>	<b>15</b>
2.3.3.1 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS)	16
2.4 METODE ZA ODSTRANJEVANJE HORMONSKIH MOTILCEV IZ VODE	16
<b>2.4.1 Fentonova oksidacija</b>	<b>17</b>

<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	20
3.1	TESTIRANA SNOV	20
3.2	FENTONOVA OKSIDACIJA	20
3.3	PRIPRAVA VZORCEV	22
3.4	EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)	23
3.5	TEST YES	24
<b>3.5.1</b>	<b>Testni organizem</b>	24
<b>3.5.2</b>	<b>Priprava gojišč</b>	24
3.5.2.1	Priprava minimalnega gojišča	24
3.5.2.2	Priprava raztopin za rastno gojišče	25
3.5.2.2.1	Priprava raztopine glukoze	25
3.5.2.2.2	Priprava raztopine aspartatne kisline	25
3.5.2.2.3	Priprava raztopine vitaminov	25
3.5.2.2.4	Priprava raztopine treonina	26
3.5.2.2.5	Priprava raztopine CuSO <sub>4</sub>	26
3.5.2.3	Priprava rastnega gojišča	26
<b>3.5.3</b>	<b>Namnožitev kvasovk</b>	26
<b>3.5.4</b>	<b>Nanos vzorcev na mikrotitrsko ploščo</b>	27
<b>3.5.5</b>	<b>Izračun estrogenske aktivnosti vzorcev</b>	29
3.6	SPME/GC-MS	31
<b>3.6.1</b>	<b>Potek analize na SPME/GC-MS</b>	31
<b>3.6.2</b>	<b>Analiza kromatograma</b>	31
3.7	DOLOČANJE IZKORISTKA PRI KONCENTRIRANJU (SPE)	31
<b>3.7.1</b>	<b>Koncentriranje</b>	31
<b>3.7.2</b>	<b>Test YES</b>	31
<b>3.7.3</b>	<b>SPME/GC-MS</b>	32
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	33
4.1	IZKORISTEK PRI KONCENTRIRANJU	33
4.2	MANJŠA KONCENTRACIJA BPA (0,228 mg/l)	33
<b>4.2.1</b>	<b>Estrogenska aktivnost</b>	33
<b>4.2.2</b>	<b>Pretvorba BPA</b>	34
4.2.2.1	Razmerje reagentov 1 : 0,5 pri Fentonovi oksidaciji	35

4.2.2.2	Razmerje reagentov 1 : 10 pri Fentonovi oksidaciji	35
4.2.2.3	Razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri Fentonovi oksidaciji	36
4.2.2.4	Razmerje reagentov 1 : 20 pri Fentonovi oksidaciji	37
4.2.2.5	Razmerje reagentov 1 : 33 pri Fentonovi oksidaciji	38
4.3	VEČJA KONCENTRACIJA BPA (22,8 mg/l)	39
<b>4.3.1</b>	<b>Estrogenska aktivnost</b>	39
4.3.1.1	Razmerje reagentov 1 : 0,5 pri Fentonovi oksidaciji	41
4.3.1.2	Razmerje reagentov 1 : 10 pri Fentonovi oksidaciji	41
4.3.1.3	Razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri Fentonovi oksidaciji	42
4.3.1.4	Razmerje reagentov 1 : 20 pri Fentonovi oksidaciji	42
4.3.1.5	Razmerje reagentov 1 : 33 pri Fentonovi oksidaciji	42
<b>4.3.2</b>	<b>Pretvorba BPA</b>	42
4.3.2.1	Razmerje reagentov 1 : 0,5 pri Fentonovi oksidaciji	43
4.3.2.2	Razmerje reagentov 1 : 10 pri Fentonovi oksidaciji	43
4.3.2.3	Razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri Fentonovi oksidaciji	43
4.3.2.4	Razmerje reagentov 1 : 20 pri Fentonovi oksidaciji	44
4.3.2.5	Razmerje reagentov 1 : 33 pri Fentonovi oksidaciji	45
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	47
5.1	RAZPRAVA	47
5.2	SKLEPI	54
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	56
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	58
	<b>ZAHVALA</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Izkoristek pri koncentriranju (postopek SPE) za obe začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l in 22,8 mg/l) in za obe metodi (test YES in SPME/GC-MS). Izkoristek je podan v % in z vrednostjo standardnega odklona.	33

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: 17 $\beta$ -estradiol (E2)	6
Slika 2: Progesteron (P)	6
Slika 3: Bisfenol A (BPA)	7
Slika 4: Shematska predstavitev estrogensko aktiviranega ekspresijskega sistema pri testu YES v kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Gen za hER je vključen v genom in je v obliki (1), ki se lahko poveže z ERE pod hibridnim promotorjem na ekspresijskem plazmidu (2). Aktivacija hER (3) z vezavo liganda povzroči ekspresijo reporterskega gena lac-Z (4), ki kodira $\beta$ -galaktozidazo. Encim se izloči v medij (5) in CPRG pretvori v rdeč produkt (6), ki ga izmerimo s spektrofotometrom (Routledge in Sumpter, 1996).	15
Slika 5: Shema postopka Fentonove oksidacije	22
Slika 6: Shema koncentriranja (SPE) na kolonah Water Oasis HLB	23
Slika 7: Shematski prikaz redčitev vzorca; na primeru. Modro besedilo se nanaša na volumne vzorca, rdeče pa na koncentracijo glede na osnovni vzorec. 100 % predstavlja neredčen vzorec.	28
Slika 8: Shema mikrotitrne plošče za test YES z lokacijami vzorcev, standardov in kontrol	29
Slika 9: Prikaz načina izračuna parametrov $\Delta$ in X za izračun estrogenske aktivnosti	30
Slika 10: Primer aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze v odvisnosti od koncentracije za vzorce (pred, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90) pri razmerju reagentov 1 : 0,5 pri Fentonovi oksidaciji in kontrole (pozitivne: E2, BPA, BPA*; negativne: P, B) za začetno koncentracijo BPA 0,228 mg/l.	34
Slika 11: Primer kromatogramov po analizi SPME/GC-MS za vse vzorce (PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90) za razmerje 1 : 10 pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l). Vodoravna os prikazuje retencijski čas, navpična pa površino pod krivuljo.	35
Slika 12: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 10 pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90	36
Slika 13: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) za vzorce PRED, 1, 10, 30, 50, 70, 90	37
Slika 14: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 20 pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90	38

- Slika 15: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 33 pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) za vzorce PRED, 1, 10, 30, 50, 70, 90 39
- Slika 16: Primer aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze v odvisnosti od koncentracije za vzorce (PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90) pri razmerju reagentov 1 : 33 pri Fentonovi oksidaciji in kontrole (pozitivne: E2, BPA, BPA\*; negativne: P, B) za začetno koncentracijo BPA 22,8 mg/l 40
- Slika 17: Estrogenska aktivnost v odvisnosti od časa za razmerja 1 : 0,5, 1 : 10, 1 : 10 (2), 1 : 20, 1 : 33 in vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90 pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l). Rdeča črtkana črta predstavlja 100% estrogensko aktivnost. 41
- Slika 18: Primer kromatogramov po analizi SPME/GC-MS za vse vzorce (PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90) za razmerje 1 : 10 (2) pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l). Vodoravna os prikazuje retencijski čas, navpična pa površino pod krivuljo. Vsaka krivulja predstavlja posamezen vzorec. 42
- Slika 19: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 10 pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90 43
- Slika 20: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90 44
- Slika 21: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 20 pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90 45
- Slika 22: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 33 pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90 46

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BPA	Bisfenol A
CPRG	klorofenol rdeče $\beta$ -D-galaktopiranozid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (encimskoimunski test)
ELRA	Enzyme-linked receptor assay (encimskoreceptorski test)
ER	Estrogenski receptor
ERE	Estrogen-responsive element (element, ki se odziva na estrogen)
E2	17 $\beta$ -estradiol
GC-MS	Gas chromatography - mass spectrometry (plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo)
hER	Humani estrogenski receptor
MetOH	Metanol
P	Progesteron
SPE	Ekstrakcija na trdni fazi
SPME	Mikroekstrakcija na trdni fazi
YES	Yeast estrogen screen (estrogenski test s kvasovkami)

## 1 UVOD

V začetku 90. let prejšnjega stoletja so se prvič pojavile informacije o spojinah, ki vplivajo na hormonski sistem pri živalih. Ena od prvih raziskav je iz leta 1993, ko so Colborn in sod. (1993) – Colborn je med drugim prvič uporabil pojem hormonski motilec – dokazali učinke organoklorovih spojin na divje populacije rib in ptičev, ki so se kazali kot spremembe pri razvoju in razmnoževanju.

Prva zakonska ureditev področja je iz leta 1996, ko je Agencija za zaščito okolja ZDA (U. S. EPA) izdala Food Quality Protection Act in Safe Drinking Water Act, ki sta hormonske motilce prvič uradno označila za problematične ter definirala metode spremljanja in testiranja teh spojin. Ustanovljen je bil tudi program za spremljanje – Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) (1996).

Hormonski motilci z estrogenskim delovanjem v odpadnih in površinskih vodah predstavljajo pereč problem svetovnih razsežnosti že nekaj let. Njihovo nepopolno odstranjevanje iz odpadnih vod dokazano vpliva na hormonska ravnovesja ter posledično na razvoj, razmnoževanje in obnašanje organizmov, ki živijo v vodah, onesnaženih s hormonskimi motilci. Vplivajo tudi na človeka, saj so dokazali povezavo med izpostavljenostjo hormonskim motilcem in nekaterimi vrstami raka, zlasti z rakom dojke in mod, ter zmanjšanim številom in aktivnostjo semenčic pri moških (Safe, 2004; WHO, 2002).

V skupino hormonskih motilcev spadajo tako naravni estrogeni kot ksenoestrogeni, spojine, ki oponašajo delovanje naravnih estrogenov in motijo delovanje hormonskega sistema organizmov. Zato je te snovi z različnimi postopki čiščenja treba odstraniti iz odpadnih vod, preden jih izpustimo v površinske vode.

Bisfenol A (BPA) je industrijska kemikalija, ki je nepogrešljiva pri izdelavi plastike in plastičnih izdelkov. Dokazano je, da vpliva na hormonski sistem, saj ima sposobnost vezave na estrogenski receptor (ER) (Krishnan in sod., 1993). Zaradi razširjenosti BPA v odpadnih vodah so vodni organizmi izpostavljeni BPA, kar vodi v različne škodljive kronične učinke.

## 1.1 NAMEN DELA

V diplomski nalogi smo raziskovali estrogensko aktivnost ksenoestrogena bisfenola A po Fentonovi oksidaciji, ki je eden od naprednih oksidacijskih postopkov za odstranjevanje organskih snovi.

Cilj naloge je bil spremljati zmanjšanje estrogenske aktivnosti BPA s testom YES po Fentonovi oksidaciji v različnih reakcijskih razmerah. Z biološkim testom YES z gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* smo po koncentriranju z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) preverjali, ali je po Fentonovi oksidaciji še prisotna estrogenska aktivnost v vodnih vzorcih. Kvantifikacija BPA po razgradnji je potekala s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo s predhodno mikroekstrakcijo (SPME/GC-MS).

## 1.2 HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo preverjali naslednji hipotezi:

1. S Fentonovo oksidacijo delno oz. popolno zmanjšamo estrogensko aktivnost BPA.
2. Zmanjšanje estrogenske aktivnosti in razgradnja BPA med procesom Fentonove oksidacije sta odvisna od reakcijskih razmer.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 HORMONSKI SISTEM

Po definiciji Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) je endokrini ali hormonski sistem pri živalih sestavljen iz: žlez (so v različnih delih telesa), hormonov (proizvajajo jih žleze in jih izločajo v kri ali medcelično tekočino) ter receptorjev (v različnih tkivih in organih, prepoznajo hormone in se odzovejo nanje). Hormoni delujejo v zelo nizkih koncentracijah. Potujejo po celotnem telesu in delujejo kot kemijski sporočevalci. Povežejo se s tarčnimi celicami, torej s celicami, ki imajo na površini za določen hormon specifične receptorje, pri čemer se hormon veže na receptor po principu ključ-ključavnica. Učinek hormona se tako pokaže le v tisti celici, ki ima specifičen receptor, do katere pride specifičen hormon in v kateri se aktivira ustrezna signalna pot kot odgovor na hormon. Ko se torej povežeta receptor in hormon, receptor informacijo hormona prenese v celico, in sicer na dva načina: lahko spremeni obstoječe celične proteine ali aktivira gene, ki kodirajo zapis za nov protein. Oba mehanizma povzročita odziv na ravni celotnega telesa ob aktivaciji več celic. Endokrini sistem tako regulira biološke procese v celotnem življenju organizma, vključno z razvojem možganov in živčnega sistema, razvojem in funkcijo reproduktivnega sistema ter metabolizmom ravni krvnega sladkorja. Regulacija je tkivno in časovno specifična, obstajajo številne povratne zanke, ki vzdržujejo homeostazo (ravnotežje) hormonov v telesu. Ena izmed najpomembnejših skupin hormonov so estrogeni, ki so odgovorni za reproduktivni razvoj ženskih osebkov. Primarno jih proizvajajo jajčniki, v manjši meri pa tudi nadledvični žlezi (Endocrine Disruptor Screening Program, 1996).

### 2.2 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilec je eksogena snov ali mešanica snovi, ki spremeni funkcijo(e) endokrinega sistema in posledično povzroči škodljiv odziv v organizmu, njegovih potomcih ali subpopulacijah (WHO, 2002).

Mehanizem delovanja hormonskih motilcev je različen. Nekateri delujejo tako, da vplivajo na receptorje, s čimer delujejo kot agonisti ali antagonisti. Agonist je spojina, ki posnema

naravni hormon, aktivira receptor in sproži odziv, kakor da bi se vezal naravni hormon. Agonisti ER so npr.  $17\beta$ -estradiol (E2), etinilestradiol (EE2) in nonilfenol. Antagonist z vezavo na receptor prepreči ali zmanjša odziv receptorja, zato hormon ne učinkuje na celico. Estrogenskih antagonistov ni veliko, primera sta npr. tamoksifen (farmacevtik) in fadrozol. Hormonski motilci pa ne vplivajo le na receptorje, lahko vplivajo tudi na sintezo, transport ali metabolizem hormona, npr. aromatazni inhibitorji preprečijo pretvorbo androgenov v estrogene (Sumpter, 2008; WHO, 2002). Ker so mehanizmi delovanja slabo poznani, je težko ločiti med posrednimi in neposrednimi ter primarnimi in sekundarnimi učinki izpostavitve hormonskim motilcem. Kljub nepopolnemu poznavanju delovanja spodnji primeri ponazarjajo neposredno povezavo med mehanizmom delovanja in *in vivo* učinki:

- Izpostavitvev hormonskim motilcem v času razvoja endokrinega sistema v zarodku lahko vodi v trajno spremembo funkcije ali občutljivosti receptorja.
- Izpostavitvev odraslega organizma ni tako kritična, saj se lahko uravnoteži z normalnimi homeostatskimi mehanizmi, zato po navadi ni pomembnih ali vidnih učinkov.
- Izpostavitvev enaki ravni endokrinega signala v različnih obdobjih življenja oz. razvoja ima lahko zelo različne učinke.
- Zaradi sporazumevanja med različnimi deli endokrinega sistema se lahko učinki nepredvidljivo pojavijo tudi v drugih tkivih (WHO, 2002).

Hormonski motilci imajo številne učinke na živali in ljudi. Pri sesalcih so dokazali, da izpostavitvev organoklorovim spojinam vpliva na imunski in reproduktivni sistem; npr. pri baltskih tjulnjih se je populacija zmanjšala. Pri večjih plenilskih pticah hormonski motilci povzročajo tanjšanje jajčne lupine in spremenjen razvoj spolnih žlez; npr. populacija belorepih jezercev se je zelo zmanjšala ob izpostavitvi DDT (dikloro-difenil-trikloroetan). Pri aligatorjih v jezeru Apopka na Floridi so ugotovili zmanjšanje populacije zaradi številnih razvojnih in reproduktivnih nepravilnosti. Pri ribah povzroči spremembo spola ter sintezo vitelogenina tudi pri samcih in mladica. Pri nevretenčarjih izpostavitvev povzroči maskulinizacijo samic in s tem zmanjšanje populacije. Pri ljudeh so dokazali naslednje



učinke: zmanjšanje števila semenčic in njihove kakovosti (aktivnosti), zmanjšana plodnost, povečan delež spontanih splavov, spremenjeno razmerje spolov – manjši delež moških, večja pogostost nepravilnosti v moškem reproduktivnem sistemu (npr. hipospadia), prezgodnji začetek pubertete, spremenjen razvoj živčevja in motnje v nevroendokrinem delovanju ob prenatalni izpostavitvi, spremenjena imunska funkcija in različne vrste raka (npr. rak dojke, mod, prostate) (WHO, 2002).

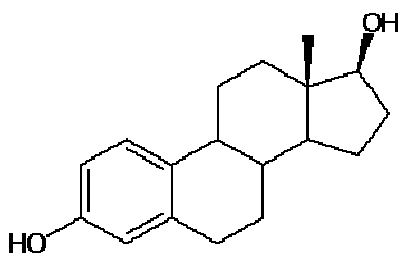
Hormonski motilci so zelo raznolika skupina snovi. Pogosto so zelo težko razgradljivi in v okolju ostanejo dlje časa, poleg tega se lahko prenašajo na dolge razdalje in so jih našli že v skoraj vseh delih sveta. Nekateri so lipofilni ali se ne razgradijo v metabolizmu, zato se kopičijo v organizmih in povzročijo odziv kljub relativno manjši afiniteti do ER glede na E2 (WHO, 2002; Andersen in sod., 1999).

Hormonske motilce delimo na več skupin:

- naravni in umetni/sintetični hormoni, npr. estrogeni, androgeni;
- fitoestrogeni in mikoestrogeni: naravne rastlinske in glivne nesteroidne snovi, ki so podobne E2, lahko imajo estrogensko ali antiestrogensko aktivnost, npr. izoflavonoidi, lignani iz rastlin;
- biocidi: herbicidi, insekticidi, fungicidi, npr. DDT, atrazin; tudi pesticidi, ki vsebujejo kovinske ione, npr. tributilin (TBT);
- industrijske kemikalije: poliklorirane aromatske spojine (npr. poliklorirani bifenili (PCB), poliaromatski ogljikovodiki (PAH) – stranski produkti pri nepopolnem izgorevanju, polibromirani difeniletri – zaviralci gorenja), organske kisikove spojine (proizvodnja plastike, npr. bisfenoli, ftalati, dioksini), površinsko aktivne snovi (proizvodnja detergentov, npr. nonilfenolne spojine) (Routledge in Sumpter, 1996; Chemicals purported ..., 2005).

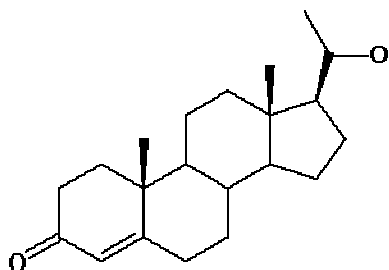
V skupini estrogenov je eden izmed najpomembnejših E2, saj je glavni ženski spolni hormon, vpliva na začetek pubertete, menstruacijo, vlogo pa ima tudi v nosečnosti. Spada med steroidne hormone, kar pomeni, da je sestavljen iz specifičnih štirih povezanih

obročev. Nastane iz holesterola prek testosterona, pri čemer je pomemben encim aromataza (Chemicals purported ..., 2005; WHO, 2002). E2 se kopiči v okolju, saj ga izločajo tako ljudje kot živali. Ugotovili so, da moški v povprečju izločijo 1,6  $\mu\text{g}$  E2 na dan in ženske 2,3–2,5  $\mu\text{g}$ , a noseče ženske lahko izločijo kar 259  $\mu\text{g}$  E2 na dan. Ti viri E2 lahko pridejo v okolje prek komunalne odpadne vode (Johnson in sod., 2000).



Slika 1: 17 $\beta$ -estradiol (E2)

Med steroidne hormone spada tudi progesteron (P), ki ima med drugim vlogo pri metabolizmu in razmnoževanju samic. Za hormonske terapije je na voljo precej sintetičnih progesteronov (Pluchino in sod., 2006).

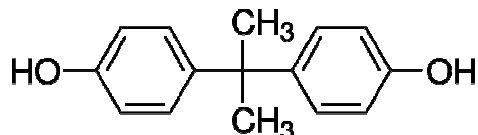


Slika 2: Progesteron (P)

### 2.2.1 Bisfenol A

BPA spada med ksenoestrogene. Ksenoestrogeni so snovi, ki strukturno niso podobne naravnemu E2, a vseeno delujejo na ER kot agonisti ali antagonisti; BPA deluje kot agonist. BPA ali 4,4'-dihidroksi-2,2-difenilpropan je organska snov z dvema nenasičenima fenolnima obročema, njegova molska masa je 228,27 g/mol. Nastane s kislinsko katalizirano reakcijo med fenolom in acetonom. BPA v alkalnem okolju disociira ( $\text{pK}_a$  je 9,9–11,3) (Ben-Jonathan in Steinmetz, 1998; Rykowska in Wasiak, 2006), v vodi je

relativno dobro topen (na sobni temperaturi je topnost 120 mg/l), log  $K_{ow}$  je 3,32 (Neamtu in Frimmel, 2006).



Slika 3: Bisfenol A (BPA)

Bisfenol A so prvič sintetizirali leta 1905 (Rykowska in Wasiak, 2006). Dodds in Lawson (1936) pa sta že v 30. letih prejšnjega stoletja ugotovila, da ima BPA estrogensko aktivnost, vendar so se šele pozneje začeli resnejši eksperimenti. Npr. Krishnan in sod. (1993) so estrogensko aktivnost odkrili po naključju, ko so ugotavljali, ali kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* proizvaja snovi, ki se vežejo na ER. Ugotovili so, da je v gojišču snov, ki se veže na ER, ni pa produkt kvasovk, temveč gre za snov, ki se sprošča iz polikarbonatnih stekleničk, v katerih so avtoklavirali vodo za gojišče. Snov so identificirali in določili, da gre za BPA.

BPA se v kombinaciji z drugimi snovmi v industriji uporablja predvsem za proizvodnjo polikarbonata (60 %) in epoksi smol (30 %), preostalih 10 % pa za proizvodnjo poliestrskih smol (Ben-Jonathan in Steinmetz, 1998). Globalna proizvodnja BPA je bila leta 2001 2,5 milijona ton na leto (Staples in sod., 2002; cit. po Rykowska in Wasiak, 2006).

Polikarbonat, ki nastane iz monomerov BPA, ima veliko tehnološko zaželenih lastnosti, kot so visoka zmogljivost, prozornost in velika natezna trdnost. Karbonatne povezave so relativno stabilne, a jih je mogoče hidrolizirati pri visoki temperaturi in nevtralni do bazični vrednosti pH, kar sprosti monomere BPA (Lazear, 1995, cit. po Ben-Jonathan in Steinmetz, 1998). Polikarbonat se uporablja tudi za posode za shranjevanje živil, npr. za otroške stekleničke, ki se jih pred uporabo segreje (Ben-Jonathan in Steinmetz, 1998).

Epoksi smole vsebujejo BPA diglicidileter (BADGE) in imajo odlično lepljivost. Ob reakciji s sredstvom za strjevanje se križno povežejo in se kot take lahko uporabljajo kot prevleke za pločevinke za preprečevanje korozije (Brotons in sod., 1995; Ben-Jonathan in

Steinmetz, 1998). BPA diglicidil metakrilat (bis-GMA) se uporablja v zobozdravstvu. Polimerizacija je spodbujena z vidno ali UV-svetlobo. Nepopolno polimerizirane smole lahko vsebujejo 5–10 % prostega BPA (Olea in sod., 1996).

Ker so ostanki BPA prisotni v smolah in je BPA ena od glavnih sestavin polikarbonatne plastike, ki je veliko v uporabi, človeška izpostavljenost BPA ni nezanemarljiva, zlasti ker veliko teh materialov grejemo ali steriliziramo pri višjih temperaturah (npr. laboratorijska plastika iz polikarbonatov), kar pospeši izločanje BPA (Dodge in sod., 1996). Problem je tudi industrija, ki je glavni vir z BPA onesnaženih vodotokov (Fürhacker in sod., 2000). BPA se v standardnih procesih priprave pitne vode, kot sta kloriranje in elektrokemijsko tretiranje, ne razgradi popolnoma (Korshin in sod., 2006), kar pomeni, da prehaja v pitno vodo in tako predstavlja potencialno tveganje za zdravje. Koncentracije BPA v vodi se zelo razlikujejo glede na vir: od nekaj ng/l v površinski in pitni vodi do 1.000 ng/l v površinski vodi in več kot 5.000 ng/l v vtoku čistilne naprave (Vethaak in sod., 2005, 2009; Kuch in Ballschmiter, 2001). BPA v naravi bakterije razgradijo na številne razgradne produkte, čeprav natančen mehanizem razgradnje še ni poznan. Glavna produkta sta p-hidroksiacetofenon in p-hidroksibenzaldehid, ki se naprej razgradita na p-hidroksibenzojsko kislino. Nastanejo tudi 2,3-bis-(4-hidroksifenil)-1,2-propandiol, bis(4-hidroksifenil)-1-propan in p-hidroksifenil alkohol. Test estrogenosti na gensko spremenjeni kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* Y190 je pokazal, da je ima šibko estrogeno aktivnost le p-hidroksiacetofenon, a še pri njem je bila estrogenost komaj zaznavna in je znašala le malo več kot 10 % estrogenske aktivnosti BPA pri enaki koncentraciji, vsi preostali produkti pa niso bili estrogeno aktivni (Ike in sod., 2002).

BPA se neposredno poveže z ER, in sicer je jakost vezave za 1.000–5.000-krat manjša od E2, torej je BPA *in vitro* precej šibek estrogen (Dodge in sod., 1996). Estrogenska aktivnost BPA je za  $2 \cdot 10^{-3}$  manjša od E2 (Fürhacker in sod., 2000).

Glede *in vivo* učinkov so dokazali višjo bioaktivnost od pričakovane, delno agonistično aktivnost in razlike v odzivnosti na BPA pri podganah (Ben-Jonathan in Steinmetz, 1998). BPA se pri oralnem vnosu v prebavnem traktu absorbira in popolnoma izloči v blatu. V urinu je prisoten kot konjugat glukuronske kisline, kljub temu pa lahko pri večjem odmerku povzroči težave, saj se lahko v telesu zadržuje kar nekaj časa, preden se izloči

(BUA, 1997, cit. po Fürhacker in sod., 2000). Strupenost (EC/LC50) za vodne organizme je 2,7–3,1 mg/l za alge (*Selenastrum capricornutum*), 10,2–15,5 mg/l za nevretenčarje (*Daphnia magna*) in 4,6–4,7 mg/l za ribe (*Pimephales promelas*) (Alexander in sod., 1988).

BPA je od 6. avgusta 2002 dovoljen za uporabo v Evropski uniji, in sicer za plastične materiale, ki so v stiku z živilom. Največji dovoljeni dnevni vnos BPA je 0,01 mg/kg telesne mase (Commission Directive 2002/72/EC, 2002).

### 2.3 DOKAZOVANJE SPOJIN Z ESTROGENSKIM DELOVANJEM IN NJIHOVE ESTROGENSKE AKTIVNOSTI

Za dokazovanje spojin z estrogenskim delovanjem uporabljamo kemijske in biološke metode. Pri kompleksnih vzorcih z biološkim testom najprej preverimo, ali je v vzorcu snov, ki ima estrogensko delovanje, nato pa s kemijskimi metodami identificiramo in kvantificiramo to snov. Pri preprostih vzorcih z znano sestavo biološke teste kombiniramo s kemijskimi, da določimo povezavo med koncentracijo in estrogensko aktivnostjo ter morebitno estrogensko aktivnost zaradi drugih dejavnikov (na primer razgradnja hormonskega motilca, interakcije in sinergistično delovanje). Pred izvedbo testa moramo vzorce koncentrirati.

Prednosti kemijskih metod so, da so natančne, omogočajo identifikacijo in kvantifikacijo spojine, so ponovljive, lažje jih je validirati, rezultati so primerljivi med laboratoriji in so neodvisne od zunanjih pogojev. Slabosti kemijskih metod so, da so drage, v kompleksnih vzorcih lahko druge spojine s podobnim delovanjem motijo analizo, zahtevna predpriprava vzorcev, uporaba zdravju škodljivih kemikalij (Murk in sod., 2002; Chang in sod., 2009).

Prednosti bioloških testov so, da so primerni za kompleksne vzorce, katerih sestave ne poznamo, omogočajo določitev dejanskega biološkega vpliva na organizem, zaznavajo tudi sinergistično delovanje (npr. dve spojini, ki sami po sebi nista estrogeni, imata lahko biološki vpliv, če sta skupaj v raztopini) in razgradne produkte z biološkim učinkom, so cenejši od kemijskih metod, ne zahtevajo velike količine vzorca. Slabosti bioloških testov so, da so rezultati slabo ponovljivi, vplivajo zunanji dejavniki, rezultati so slabše

primerljivi med laboratoriji, nekateri testi zaradi rasti organizmov trajajo dlje časa, zaradi nespecifične vezave lahko dobimo lažno pozitiven rezultat, snovi z estrogenskim delovanjem lahko spodbudijo ali zavirajo rast celične populacije in tako lažno pretirano povečajo ali zmanjšajo odziv (Murk in sod., 2002; Chang in sod., 2009).

### **2.3.1 Koncentriranje vzorcev za dokazovanje hormonskih motilcev**

Koncentriranje je pomembno iz več razlogov: za zmanjševanje volumna vzorca, s čimer pridobimo večjo koncentracijo analita in tako olajšamo nadaljnje teste, saj presežemo mejo detekcije; hkrati s koncentriranjem odstranimo nekatere nečistoče, ki bi lahko motile nadaljnjo analizo; koncentriranje pa nam omogoča tudi zamenjavo topila z ustrežnejšim topilom za nadaljnje analize.

Poznamo različne metode za koncentriranje, a se najpogosteje uporabljata ekstrakcija na trdni fazi (SPE) in mikroekstrakcija na trdni fazi (SPME).

#### **2.3.1.1 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)**

Pri SPE gre za porazdelitev vzorca med trdno in tekočo fazo. Trdna faza deluje kot selektivni adsorbent, torej se na njeno površino z adsorbcijo veže analit, pri čemer je ves čas v stiku s tekočim vzorcem, ki predstavlja tekočo fazo (Dean, 2003, cit. po Chang in sod., 2009). Adsorbent je po navadi pakiran v majhne kartuše, podobne so majhnim kromatografskim kolonam. Eden od najpomembnejših dejavnikov pri SPE je izbira pravega adsorbenta glede na analit, saj je od tega močno odvisen izkoristek (Gatidou in sod., 2007), prav tako so pomembni tudi izbira topil za spiranje, kapaciteta kolone ter kontaktni čas. Prednosti SPE so, da je metoda hitra, relativno preprosta, učinkovita, poraba topil je manjša, zato nastane manj strupenih odpadkov (Chang in sod., 2009).

Pred SPE je pri nečistih vzorcih potrebno predhodno filtriranje.

SPE je sestavljena iz petih faz:

- Kondicioniranje kolone: s tem aktiviramo funkcionalne skupine polnila kolone in tako v nadaljnjih stopnjah omogočimo vezavo analita.

- Spiranje kolone: s tem odstranimo topilo, s katerim smo aktivirali kolono v prvi stopnji. Za spiranje po navadi uporabimo vodo, kar je odvisno od tega, kakšen je vzorec, saj za spiranje uporabimo tekočino, ki ima podobne lastnosti kot vzorec.
- Nanašanje vzorca: s pipeto ali prek cevk s pomočjo vakuumske črpalke, kar je odvisno od volumna vzorca. Pri uporabi vakuumske črpalke je treba zagotoviti enakomeren in dovolj majhen pretok, da se analit lahko veže na površino polnila kolone. Največji pretok za kolone je 5 ml/min.
- Spiranje nevezanih snovi: uporabimo topilo, v katerem analit ni topen ali pa je le slabo topen; s tem odstranimo večino nečistoč. Zatem je treba kolone posušiti, kar po navadi storimo s prepihavanjem z dušikom.
- Elucija: v zadnji fazi analit speremo s kolone, kar storimo s topilom, v katerem je analit dobro topen. Povezava med analitom in površino polnila kolone se prekine in analit se izpere s kolone (Oasis HLB ..., 2008; Bulletin 910 ..., 1998).

#### 2.3.1.2 Mikroekstrakcija na trdni fazi (SPME)

Metoda je v osnovi podobna SPE, le da se kot adsorbent uporablja nitka, prevlečena s polimernim silikagelom, ki ima visoko afiniteto za organske molekule. Na nitki potečeta ekstrakcija in koncentriranje. Desorbpcija poteka v kombinaciji s plinskim kromatografom (GC), kamor se neposredno izloči analit. Enako kot pri SPE tudi pri SPME princip ločevanja temelji na porazdelitvi med tekočo (vzorec) in stacionarno fazo (nitka) (Chang in sod., 2009). Količina vezanega analita je premosorazmerna s koncentracijo v vzorcu. Masni prenos z difuzijo analita od tekoče do stacionarne faze je mogoče povečati z mešanjem, s čimer se hitrost analize poveča (Louch in sod., 1992). Pomembni faktorji, ki vplivajo na učinkovitost SPME, so še: čas ekstrakcije; temperatura, ki je potrebna za doseg ravnotežja med tekočo in stacionarno fazo (Djozan in Ebrahimi, 2008); ionska moč (Diaz in sod., 2002) ter koloidne snovi in druge nečistoče, ki so prisotne v vzorcu (Zhu in sod., 2009, cit. po Chang in sod., 2009), zaradi česar moramo, da se izognemo prehitri zamašitvi nitke, vzorce predhodno filtrirati. Obstajata dve možnosti izvedbe SPME glede na lokacijo nitke pri ekstrakciji, in sicer neposredna, pri kateri je nitka potopljena v tekočino, in t. i. headspace, pri kateri je nitka nad tekočino v plinasti fazi (Chang in sod., 2009).

### 2.3.2 Biološki testi za dokazovanje estrogenske aktivnosti

Z nekaterimi biološkimi testi dokazujemo tudi estrogensko aktivnost. Estrogenska aktivnost neke snovi je definirana kot njena zmožnost vezave na ER in povzročitev estrogenskega odziva. Zato je zelo pomembna kemijska struktura molekule, saj ta določa vezavo na ER. Tako polarna skupina omogoča nastanek mostička (npr. hidroksilnega) z aromatskim obročem, ki je ključen za vezavo na ER (Hamblen in sod., 2003; Maniero in sod., 2008).

Vsak test proučuje drugačen vidik estrogenskega delovanja neke snovi, saj se odziv med različnimi vrstami organizmov razlikuje, prav tako pa se lahko razlikuje tudi odziv v različnih tkivih, življenjskih obdobjih in glede na različne okoljske dejavnike, zato univerzalnega testa ni.

#### 2.3.2.1 *In vivo* testi

*In vivo* testov za dokazovanje estrogenske aktivnosti ni veliko na izbiro, saj jih je težko standardizirati, pogosto so povezani z visokimi stroški vzdrževanja populacije testnega organizma, so dragi, analiza je dolgotrajna in posamezna vrsta se odzove le na nekatere hormonske motilce. Njihove prednosti so, da upoštevajo učinke metabolizma, vezave med proteinom in plazmo ter farmakokinetiko (Andersen in sod., 1999).

Primeri *in vivo* testov sta:

- Maternični test na glodalcih. Estrogenost je bila prvič definirana s tem testom. Kot odgovor na hormonski motilec z estrogensko aktivnostjo se pri mladih glodalcih poveča masa materničnega tkiva. Ta test pogosto uporabljajo kot standard, čeprav še vedno ni popolnoma standardiziran (Perez in sod., 1998).
- Test z vitelogeninom. Vitelogenin je protein, prekursor jajčnega rumenjaka, ki se v normalnih razmerah izraža le v odraslih samicah. Test je osnovan na meritvi vitelogenina pri mladih ribah, ki nastane kot odgovor na hormonski motilec. Meritev poteka na podlagi vezave vitelogenina in specifičnega protitelesa, zaznava tega produkta pa poteka z encimskoimunskim testom ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Test z vitelogeninom se je izkazal kot zelo občutljiv, saj je



odziv sorazmeren z odmerkom hormonskega motilca (Sumpter in Jobling, 1995). Za test lahko uporabljamo različne ribe, npr. zebrice *Danio rerio* in mavrične postrvi *Oncorhynchus mykiss* itd. (Legler in sod., 2002).

### 2.3.2.2 *In vitro* testi

Z večino *in vitro* testov estrogensko aktivnost določamo na podlagi vezave na ER, pri čemer ne upoštevamo faktorjev (vezava estrogena na proteine, vstop v tarčne celice, čas razgradnje, koncentracija endogenega estrogena), ki bi lahko vplivali na aktivnost hormonskega motilca v intaktnem organizmu (Andersen in sod., 1999). Relativna učinkovitost sintetičnih estrogenov je v *in vitro* testih brez dodanih plazemskih proteinov lažno nizka, saj imajo v nasprotju z E2 manjšo afiniteto vezave na plazemske proteine, zato je več hormonskega motilca topnega in lažje vstopi v celico ter aktivira ER (Nagel in sod., 1997).

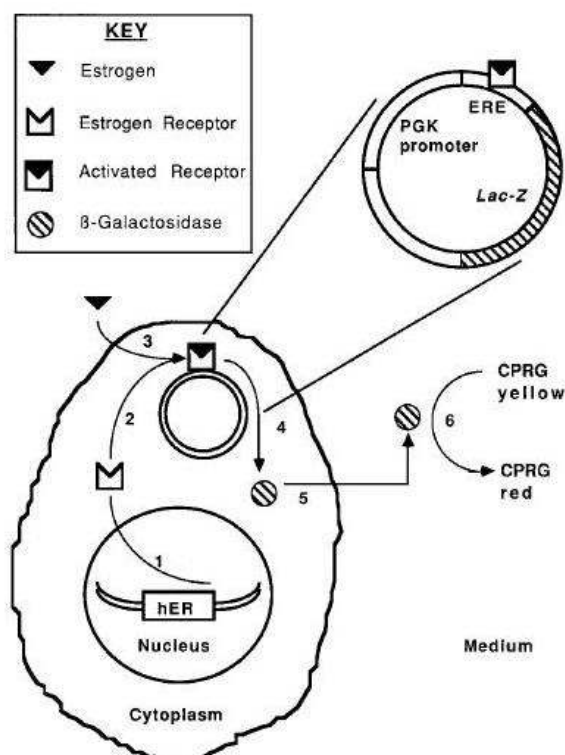
Biološki *in vitro* testi se delijo na 3 skupine:

- testi s kompetitivno vezavo liganda: merijo specifičnost vezave na ER tako agonistov kot antagonistov, a ne dajo informacije o aktivaciji ER, snovi ni treba prečiti membrane (Andersen in sod., 1999; Murk in sod., 2002);
- testi s pomnoževanjem celic: merijo celični odziv na hormonski motilec, a ne dajo informacije o mehanizmu, primer je test E-SCREEN s človeškimi rakastimi celicami MCF-7, ki za razvoj v tumor oziroma pomnoževanje zahtevajo prisotnost snovi z estrogenskim delovanjem (Murk in sod., 2002; Soto in sod., 1992, cit. po Korach in McLachlan, 1995).
- testi, ki temeljijo na ekspresiji reporterskih genov (zaznavajo aktivacijo ER, kar povzroči vezavo na elemente DNA, ki se odzivajo na estrogen (ERE), in ekspresijo reporterskega gena; primera sta test YES in ER-CALUX (Andersen in sod., 1999; Murk in sod., 2002). Test ER-CALUX vsebuje človeške adenokarcinogene celice z lastnim ER. Celice so transformirane z genom za luciferazo, ki se odziva na estrogen. Membrano lahko prehajajo tako lipofilne kot hidrofilne molekule, test pa zaznava tudi antiestrogensko aktivnost (Korach in McLachlan, 1995).

#### 2.3.2.2.1 Test YES

Test YES sta Routledge in Sumpter (1996) razvila v sodelovanju z Glaxo Group Research Ltd. V testu uporabljamo gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki imajo v svoj genom vstavljen gen za humani ER (hER). DNA-zaporedje zanj je stabilno integrirano v kromosom kvasovke. Genom kvasovke prav tako vsebuje ekspresijski plazmid z reporterskim genom *lac-Z* za  $\beta$ -galaktozidazo, ki se uporablja za merjenje aktivnosti hER. Ekspresija hER je takšna, da omogoča vezavo na ERE, ki je pod močnim promotorjem na ekspresijskem plazmidu. Ko se aktiven ligand (snov z estrogenskim delovanjem) veže na hER, se dimer (snov z estrogenskim delovanjem in hER) poveže s transkripcijskimi faktorji ter tako vpliva na ekspresijo genov, med drugim gena *lac-Z*, kar sproži sproščanje  $\beta$ -galaktozidaze v gojišče, kjer ta razgradi kromogen substrat klorofenol rdeče  $\beta$ -D-galaktopiranozid (CPRG) na klorofenol rdeče (CPR), s čimer se barva spremeni iz rumene v rdečevijoličasto. Spremembo barve lahko kvantitativno izmerimo z absorpcijo pri 575 nm. Test omogoča zaznavo agonistične vezave na hER (Routledge in Sumpter, 1996).

Estrogenska potencia v primerjavi z E2, za katerega je 1, za BPA znaša  $6,7 * 10^{-4}$  (Nishihara in sod., 2000).



Slika 4: Shematska predstavitev estrogensko aktiviranega ekspresijskega sistema pri testu YES v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. Gen za hER je vključen v genom in je v obliki (1), ki se lahko poveže z ERE pod hibridnim promotorjem na ekspresijskem plazmidu (2). Aktivacija hER (3) z vezavo liganda povzroči ekspresijo reporterskega gena *lac-Z* (4), ki kodira  $\beta$ -galaktozidazo. Encim se izloči v medij (5) in CPRG pretvori v rdeč produkt (6), ki ga izmerimo s spektrofotometrom (Routledge in Sumpter, 1996).

### 2.3.2.3 Testi brez uporabe celic

Sem spadajo testi, ki ne vsebujejo celotnih celic, temveč le njihove dele. Njihova prednost je, da ni omejitev zaradi prehoda čez celično membrano, življenjskega obdobja organizma in toksičnega vpliva testirane snovi. V osnovi gre za interakcijo med hormonskim motilec in reportersko molekulo, ki je v tem primeru protitelo, specifično za določen hormonski motilec. Signal zaznamo s fluorescenco ali razgradnjo substrata z encimom. Primera tovrstnih testov sta ELISA in encimskoreceptorski test (ELRA) (Chang in sod., 2009).

### 2.3.3 Kemijske metode

Za identifikacijo in kvantifikacijo hormonskih motilcev so pomembne kemijske metode, med katerimi prevladujejo take, ki temeljijo na analizi mase, npr. masna spektrometrija (MS), saj imajo relativno nizko mejo detekcije v primerjavi z drugimi metodami, kar je

prednost metode, saj so hormonski motilci v vzorcih pogosto v zelo nizkih koncentracijah. Za analizo se torej uporablja različne kombinacija instrumentov in detektorjev, kot so npr. plinska kromatografija, sklopljena z MS (GC-MS), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, sklopljena z MS (HPLC-MS) in tekočinska kromatografija, sklopljena z UV-detektorjem (LC-UV) (Chang in sod., 2009).

Za metode, ki temeljijo na analizi mase, je potrebna predhodna obdelava ali ekstrakcija vzorca, šele nato s specifičnimi nastavitvami glede na kemijsko strukturo tarčne molekule dejansko izvedemo analizo. Ta korak je pogosto eden od najpomembnejših za kakovost analize. Možne metode ekstrakcije so: SPE, SPME, ekstrakcija v tekoči fazi (LLE) in mikroekstrakcija v tekoči fazi (LPME) (Chang in sod., 2009).

#### 2.3.3.1 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS)

GC-MS je analitska metoda, sestavljena iz dveh delov. GC snovi najprej loči, MS pa jih identificira in kvantificira. GC je sestavljen iz kapilarne kolone, katere dolžina in sestava se razlikujeta glede na vzorec, ki ga želimo analizirati. Na koloni se snovi iz vzorca, ki jih vbrizgamo v inerten tok plina, ločijo na podlagi razlik v kemijski sestavi, saj imajo različno afiniteto adsorbcije do funkcionalnih skupin na površini polnila kolone. Iz kapilare GC se tako izločijo ob različnih časih, kar je osnova za nadaljnje analize z MS. MS snovi, ki pridejo iz GC, v vakuumu razbije na manjše, ionizirane delce, katerim z magnetnim analizatorjem določi maso in te nato primerja med sabo (McMaster, 2008).

Prednosti GC-MS so, da lahko z združitvijo obeh metod natančno določimo posamezen analit v vzorcu tako kvantitativno kot kvalitativno, metoda je relativno preprosta. Slabosti GC-MS pa so, da ima zaradi zahteve po hlapnih snoveh omejitev glede velikosti molekul, ki jih lahko analiziramo, in metoda je precej draga (McMaster, 2008).

## 2.4 METODE ZA ODSTRANJEVANJE HORMONSKIH MOTILCEV IZ VODE

Odstranjevanje hormonskih motilcev iz vode je problematično zlasti zato, ker so njihove koncentracije v okolju zelo nizke in ker pri takih koncentracijah že kažejo biološko aktivnost.

- Separacijske metode: uporabljajo se tako konvencionalne metode, kot so koagulacija, flokulacija in precipitacija, kot naprednejše metode, kot sta membranska filtracija (reverzna osmoza, nanofiltracija, ultrafiltracija) in ionska izmenjava (Chang in sod., 2009), pri čemer so zadnje učinkovitejše (do 95 % odstranjenega hormonskega motilca) – zlasti pri odstranjevanju hormonskih motilcev z nizko molekulsko maso (Barceló, 2003). Ključno vlogo imajo sestava membrane, površinski naboj in hidrofobnost, saj določajo, kaj se bo vezalo nanjo (Chang in sod., 2009).
- Adsorbpcija: po navadi se uporablja granulirano aktivirano oglje, lahko pa tudi druge materiale, ki omogočajo selektivno adsorbpcijo, kot so razne izpeljanke silikagela (Chang in sod., 2009). Primer je odstranjevanje BPA z mezopornim silikagelom s spremenjeno površino, ki je sicer odstranil manj BPA kot oglje, a je bilo recikliranje učinkovitejše (Yamaguchi in sod., 2006). Proučevali so tudi kombinacijo spremenjenega adsorbenta in hkratne oksidacije s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ki se je izkazala kot učinkovita pri odstranjevanju BPA in nekaterih drugih snovi (Kim in sod., 2009).
- Biološka in kemijska pretvorba: konvencionalne biološke metode, kot sta aktivno blato in biofiltracija, so se izkazale kot manj učinkovite. Od kemičnih in naprednih oksidativnih procesov se uporabljata npr. kloriranje in ozoniranje (Chang in sod., 2009), pri čemer pa se je pokazalo, da ima ključno vlogo pri učinkovitosti odstranjevanja kemijska struktura hormonskega motilca (Westerhoff in sod., 2005). Druge možnosti so fotooksidacija z UV-svetlobo, ultrazvočna sonikacija in Fentonova oksidacija (konvencionalna, foto- in elektroizvedba), ki so se vse izkazale kot uspešne pri odstranjevanju BPA (Zhou in sod., 2004; Torres in sod., 2007).

#### **2.4.1 Fentonova oksidacija**

Je eden izmed najpogosteje uporabljanih oksidacijskih procesov, ki ga je prvič definiral Fenton (1894, cit po. Deng in Englehardt, 2006). Fentonov proces je sestavljen iz 4 delov: oksidacija, nevtralizacija, flokulacija in separacija trdno-tekoče. Osnoven princip je, da

zakisanemu vodnemu vzorcu dodamo vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) in železove soli, pri čemer nastanejo hidroksilni radikali ( $OH^\bullet$ ), ki kot eni izmed najmočnejših oksidantov nadalje oksidirajo organsko onesnažilo. Železovi ioni delujejo kot katalizator in se stalno obnavljajo (Deng in Englehardt, 2006).



Celotno reakcijo je mogoče povzeti z eno enačbo, iz katere se tudi vidi, zakaj je potrebno kislo okolje za nastanek čim večje količine hidroksilnih radikalov (Walling, 1975):



S pomočjo hidroksilnih radikalov nastanejo organski radikali:



Hidroksilni radikali lahko z organskimi snovmi reagirajo na 4 načine: verižna polimerizacija (radikalska adicija), stopenjska polimerizacija (kondenzacija), prenos elektronov (disproporcionacija) in združevanje radikalov (terminacija) (SES, 1994, cit. po Deng in Englehardt, 2006). Nastali radikal organske spojine nato reagira s kisikom in

nastanejo novi radikali, ki reagirajo dalje, kar vodi v nadaljnjo dekompozicijo in končno mineralizacijo do vode in CO<sub>2</sub> (Deng in Englehardt, 2006).

Pri Fentonovi oksidaciji k odstranjevanju hormonskega motilca pomaga tudi koagulacija, ki pa je odvisna od razmerja med Fe<sup>2+</sup> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pri višjem razmerju (več Fe<sup>2+</sup>) namreč prevladuje koagulacija in ima reakcija oksidacije kinetiko 2. reda, medtem ko pri nižjem prevladuje oksidacija in se kinetika približuje 0. redu. Pri visokem razmerju torej potečeta tako reakcija (1) kot (4) (Neyens in Baeyens, 2003; Zhang in sod., 2005). Prav tako je pomembna koncentracija obeh reagentov, saj pri prebitku kateregakoli lahko nastanejo stranski produkti. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je bolj kritičen kot Fe<sup>2+</sup>, saj neposredno vpliva na teoretično največjo maso hidroksilnih radikalov (Deng in Englehardt, 2006). Pomemben je tudi pH, ki naj bi bil nizek – okoli 3 (Arnold in sod., 1995), prav tako mešanje (Deng in Englehardt, 2006). Razgradnja se poveča pri višji temperaturi (do 37 °C), a se pri previsoki temperaturi spet zmanjša. Vpliv ima tudi čas reakcije, saj se s podaljšanjem časa razgradnja poveča, a le do neke mere, ko kljub podaljšanju časa reakcije stopnja razgradnje ostaja enaka (Zhang in sod., 2005).

Fentonov proces se v praksi uporablja pri čiščenju odpadnih voda, po navadi gre za procese z enkratnim polnjenjem, ki so sklopljeni z drugimi procesi za večjo učinkovitost odstranjevanja nečistoč (Deng in Englehardt, 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 TESTIRANA SNOV

Kot testirano snov smo uporabili BPA (Sigma Aldrich), in sicer v vodni raztopini dveh koncentracij: 0,228 mg/l in 22,8 mg/l.

#### 3.2 FENTONOVA OKSIDACIJA

Opravili smo več poskusov Fentonove oksidacije, v katerih smo uporabili različne količine in razmerja oksidantov za obe koncentraciji BPA (22,8 mg/l in 0,228 mg/l). Razmerja reagentov med  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) (Fluka) in  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Belinka) so bila za koncentracijo 22,8 mg/l naslednja:

- 1 : 33 = 0,03 M : 1 M
- 1 : 20 = 0,05 M : 1 M
- 1 : 10 = 0,1 M : 1 M
- 1 : 10 (2) = 0,05 M : 0,5 M
- 1 : 0,5 = 0,1 M : 0,05 M

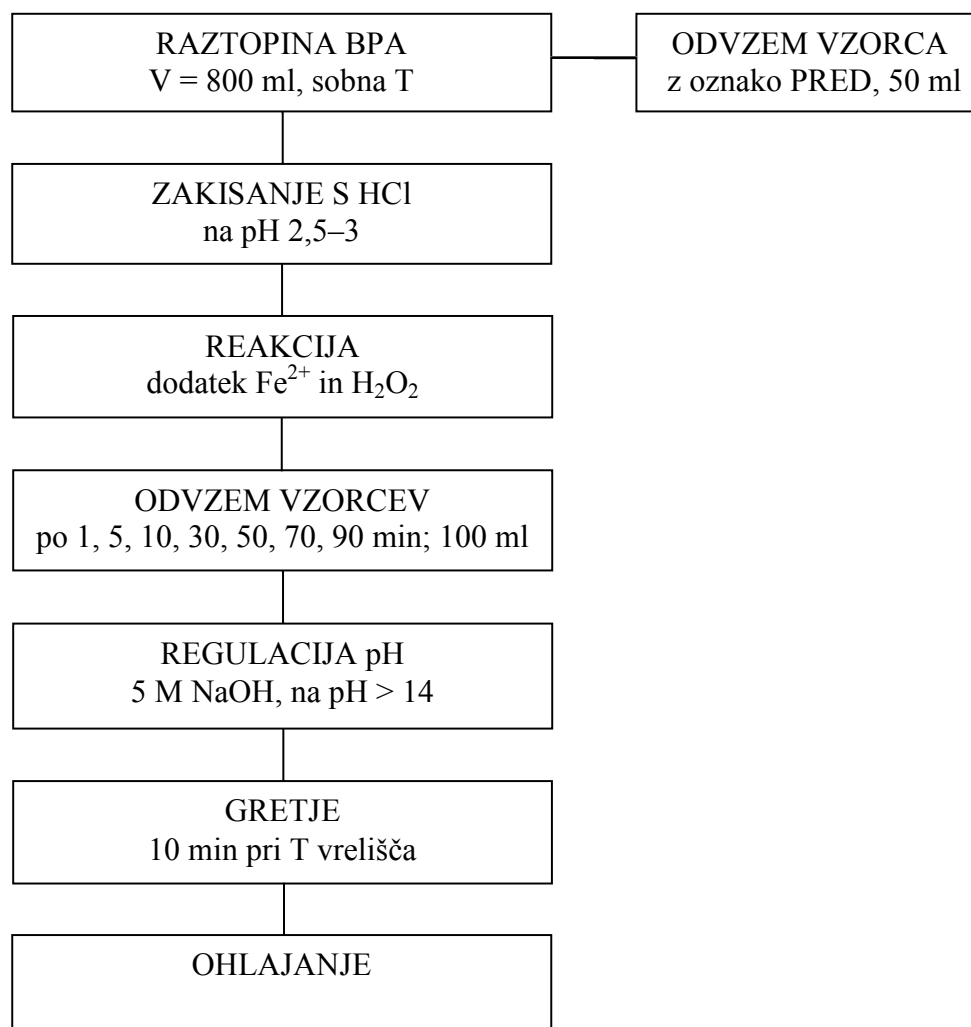
Razmerja reagentov med  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  so bila za koncentracijo 0,228 mg/l naslednja:

- 1 : 33 = 0,0003 M : 0,01 M
- 1 : 20 = 0,0005 M : 0,01 M
- 1 : 10 = 0,001 M : 0,01 M
- 1 : 10 (2) = 0,0005 M : 0,005 M
- 1 : 0,5 = 0,001 M : 0,0005 M



Začetni volumen je bil 800 ml za obe koncentraciji, pri čemer smo ustrezno količino BPA raztopili v destilirani vodi (dH<sub>2</sub>O). Raztopino smo ves čas reakcije mešali na magnetnem mešalu. Reakcije smo izvajali pri sobni temperaturi. Pred začetkom reakcije smo iz vodne raztopine vzeli 50 ml vzorca z oznako PRED. Nadaljnje vzorce smo vzeli ob časih 1, 5, 10, 30, 50, 70 in 90 minut, in sicer smo jemali po 100 ml.

Vodno raztopino BPA smo najprej nakisali s HCl (Merck) do pH 2,5–3, nato smo glede na testirano razmerje dodali ustrezno količino Fe<sup>2+</sup>. Ko se je Fe<sup>2+</sup> popolnoma raztopil, smo počasi dodali H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, začeli poskus in ob predvidenih časih odvzeli vzorce. Odvzete vzorce smo nato mešali na magnetnem mešalu in dodali 5 M NaOH (Merck), s čimer smo pH povišali na vsaj 12 in reakcijo ustavili. Vzorce smo nato prestavili na grelnik, s čimer smo odstranili preostali H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in po 10 minutah vretja ohladili. Ko se je raztopina ohladila, se je usedlina železovih spojin usedla na dno.



Slika 5: Shema postopka Fentonove oksidacije

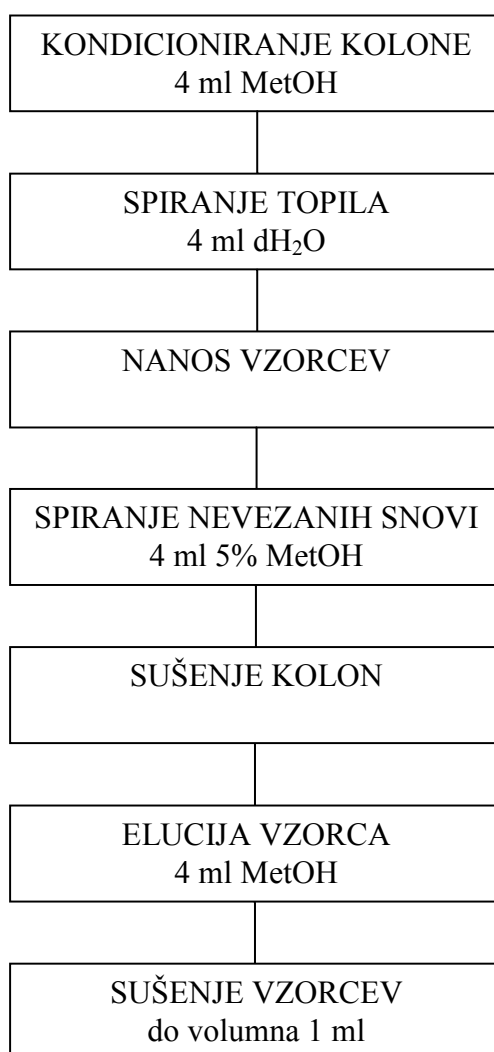
### 3.3 PRIPRAVA VZORCEV

Ohlajene vzorce smo filtrirali skozi celulozni filter papir, s čimer smo odstranili večino usedline, in pH zaradi SPME/GC-MS uravnali na 6–8 ter do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Za kvantifikacijo preostalega BPA v vzorcih smo odvzeli 18 ml vsakega filtriranega vzorca in ga filtrirali še skozi filter s porami premera 0,30 µm. Določili smo volumen preostalega vzorca, ki je bil odvisen od izparevanja vzorca oz. količine nastalih železovih kompleksov med Fentonovo oksidacijo, in ga koncentrirali s SPE za izvedbo testa YES.

### 3.4 EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)

Pri ekstrakciji na SPE smo uporabili kolone proizvajalca Waters® Oasis® s polnilom Oasis® HLB 60 µm (Oasis HLB ..., 2008). Kolone smo kondicionirali s 4 ml metanola (MetOH, Merck), preostanek topila pa smo sprali s 4 ml destilirane vode. Po nanosu vzorcev (volumni so bili različni) smo nečistoče oz. nevezane snovi sprali s 5% MetOH in kolone posušili s prepihanjem z dušikom. Vzorce smo nato eluirali s 4 ml MetOH in spet sušili z dušikom do končnega volumna 1 ml. Vzorce smo do analize shranili pri -20 °C.



Slika 6: Shema koncentriranja (SPE) na kolonah Water Oasis HLB

### 3.5 TEST YES

#### 3.5.1 Testni organizem

Pri testu YES smo kot testni organizem uporabili gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* BJ1991, ki so jih razvili pod vodstvom profesorja Sumpterja (Glaxo, UK). Privoljenje za uporabo omenjene kvasovke za test YES je pridobil L05 Laboratorij za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu.

#### 3.5.2 Priprava gojišč

##### 3.5.2.1 Priprava minimalnega gojišča

Minimalno gojišče s pH 7,1 smo pripravili po naslednjem receptu:

- 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)
- 1,98 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Kemična tovarna Podnart)
- 4,2 g KOH (Merck)
- 0,41 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Merck)
- 1 ml raztopine  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (40 mg / 50 ml vode MilliQ) (Merck)
- 50 mg levcina (Sigma Aldrich)
- 50 mg histidina (Sigma Aldrich)
- 50 mg adenina (Sigma Aldrich)
- 20 mg arginina-HCl (Sigma Aldrich)
- 20 mg metionina (Sigma Aldrich)
- 30 mg tirozina (Sigma Aldrich)
- 30 mg izolevcina (Sigma Aldrich)

- 30 mg lizina-HCl (Sigma Aldrich)
- 25 mg fenilalanina (Sigma Aldrich)
- 100 mg glutaminske kisline (Sigma Aldrich)
- 150 mg valina (Sigma Aldrich)
- 375 mg serina (Sigma Aldrich)
- voda MilliQ do končnega volumna 1000 ml

Minimalno gojišče smo nato razlili po 45 ml v 200 ml erlenmajerice, ga avtoklavirali (121 °C, 1,1 bara, 20 min) in shranili pri sobni temperaturi.

#### 3.5.2.2 Priprava raztopin za rastno gojišče

##### 3.5.2.2.1 Priprava raztopine glukoze

Raztopino s 40 g glukoze (Sigma Aldrich) v 200 ml vode MilliQ smo avtoklavirali (121 °C, 1,1 bara, 20 min) in shranili pri sobni temperaturi.

##### 3.5.2.2.2 Priprava raztopine aspartatne kisline

Raztopino z 200 mg aspartatne kisline (Sigma Aldrich) v 50 ml vode MilliQ smo avtoklavirali (121 °C, 1,1 bara, 20 min) in shranili pri sobni temperaturi.

##### 3.5.2.2.3 Priprava raztopine vitaminov

- 8 mg tiamina (Sigma Aldrich)
- 8 mg piridoksina (Sigma Aldrich)
- 8 mg pantotenske kisline (Sigma Aldrich)
- 40 mg inozitola (Sigma Aldrich)

Vse vitamine smo raztopili v 180 ml MilliQ in dodali 20 ml biotinske raztopine, ki smo jo pripravili tako, da smo 2 mg biotina (Fluka) raztopili v 100 ml vode MilliQ. Vitaminsko raztopino smo nato sterilno filtrirali čez filter s porami premera 0,2  $\mu\text{m}$  in shranili pri 4 °C.

#### 3.5.2.2.4 Priprava raztopine treonina

Raztopino s 1.200 mg treonina (Fluka) v 50 ml vode MilliQ smo avtoklavirali (121 °C, 1,1 bara, 20 min) in shranili pri 4 °C.

#### 3.5.2.2.5 Priprava raztopine $\text{CuSO}_4$

Raztopino z 249,7 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (Carlo Erba reagenti) v 50 ml vode MilliQ smo sterilno filtrirali čez filter s porami, velikimi 0,2  $\mu\text{m}$ , in shranili pri sobni temperaturi.

#### 3.5.2.3 Priprava ravnega gojišča

Ravno gojišče smo pripravili tako, da smo v minimalno gojišče sterilno dodali naslednje snovi:

- 5 ml raztopine glukoze
- 1,25 ml raztopine aspartatne kisline
- 0,5 ml raztopine vitaminov
- 0,4 ml raztopine treonina
- 125  $\mu\text{l}$  raztopine  $\text{CuSO}_4$

### 3.5.3 Namnožitev kvasovk

Ravno gojišče smo inokulirali z veliko kolonijo kvasovk z agarne plošče ali z 250  $\mu\text{l}$  koncentrirane kulture in vse skupaj inkubirali na ogrevanem orbitalnem stresalniku (Heidolph Promax 1020 in Heidolph Inukubator 1000) pri 130–140 rpm in 28 °C. Inkubacija je trajala 24–28 ur – do na spektrofotometru (PerkinElmer Lambda20) izmerjene absorbance oz. optične gostote 1,0 pri 620 nm, pri kateri so bile kvasovke v logaritemski fazi rasti.

### 3.5.4 Nanos vzorcev na mikrotitrsko ploščo

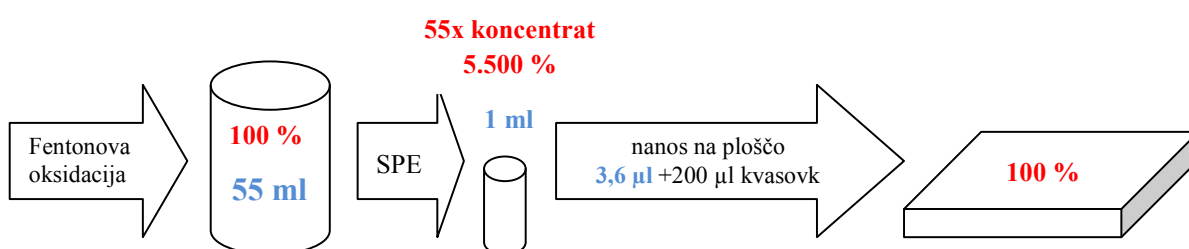
Test YES smo izvajali na mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami.

Kontrole so bile naslednje:

- E2 (Sigma Aldrich): splošna pozitivna kontrola testa YES, saj se kot naravni estrogen vedno veže na ER in da odziv pri kvasovkah; pripravili smo ga v založni koncentraciji  $10^{-7}$  M;
- progesteron (P) (Sigma Aldrich): negativna kontrola, ker nima estrogenskega učinka; pripravili smo ga v založni koncentraciji  $10^{-7}$  M;
- BPA: pozitivna kontrola, pripravili smo ga v založni koncentraciji 228,29 M (0,2 g/l);
- BPA\*: pozitivna kontrola; končna koncentracija na plošči je bila  $10^{-4}$  M oz.  $10^{-6}$  M, kar ustreza 22,8 mg/l oziroma 0,228 mg/l, torej enako kot vzorec z oznako PRED;
- koncentrirana dH<sub>2</sub>O: negativna kontrola zaradi izpiranja kolon med SPE;
- rastno gojišče s CPRG (Fluka), a brez kvasovk: s tem smo preverjali, ali so morda v gojišču snovi, ki reagirajo s CPRG;
- kvasovke (Bb): kontrola gojišča, s katero smo preverjali primernost rastnega gojišča;
- B: ničelna kontrola; rastno gojišče s kvasovkami in CPRG, s katero smo preverjali morebitno okužbo kulture kvasovk oz. nepravilno izražanje ER.

Najprej smo na prvi mikrotitrski plošči pripravili redčitveno vrsto za standarde (BPA, E2, P) s faktorjem redčitve 2, pri čemer smo vseh 8 redčitev posamezne snovi pripravljali v etanolu (Riedel-de Haen). S prve plošče smo sterilno (v laminariju) po 10 µl iz vsake jamice prenesli na novo mikrotitrsko ploščo, torej so bili standardi po dodatku rastnega gojišča s kvasovkami redčeni 20-krat (in več, skladno z redčitveno vrsto). Prav tako smo

dali po 8 ponovitev BPA\* in koncentrirane dH<sub>2</sub>O. Na drugo ploščo smo dodali po 4 ponovitve vsakega vzorca posamezne reakcije Fentonove oksidacije, skupno 8 vzorcev (oznake: PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90). Dodani volumni vzorcev so se razlikovali, saj so bili začetni volumni pred koncentriranjem različni, tako da smo preračunano v jamici imeli končno koncentracijo vzorca, če ne upoštevamo morebitne razgradnje v procesu Fentonove oksidacije, enako kot na začetku (22,8 mg/l oziroma 0,228 mg/l). Plošče smo nato pustili odprte v laminariju, da je etanol oziroma metanol izhlapel.



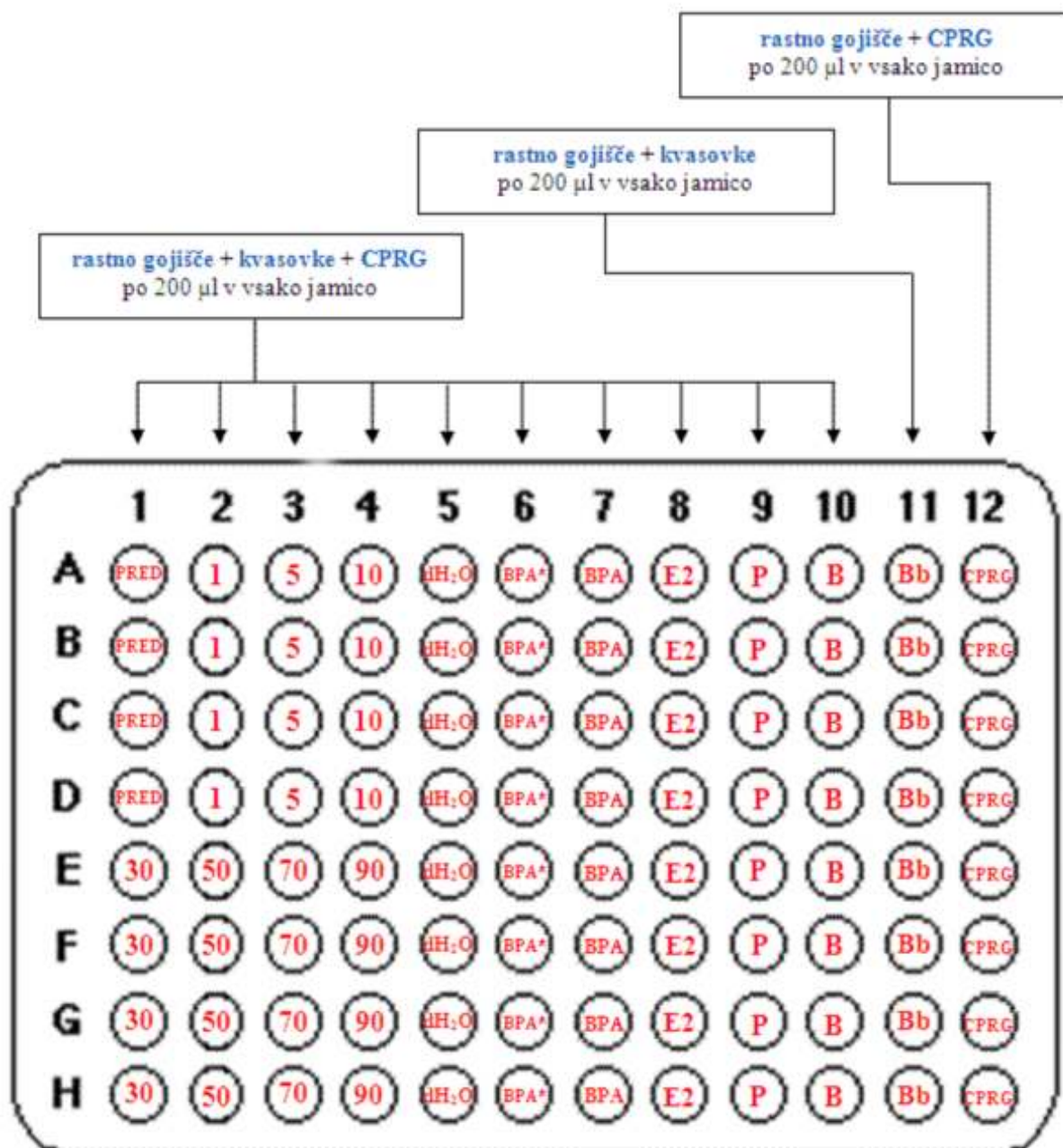
Slika 7: Shematski prikaz redčitev vzorca; na primeru. Modro besedilo se nanaša na volumne vzorca, rdeče pa na koncentracijo glede na osnovni vzorec. 100 % predstavlja neredčen vzorec.

Pripravili smo tudi novo rastno gojišče iz minimalnega gojišča, v katerega smo nacepili 2 ml kvasovk z optično gostoto 1, iz česar smo prenesli 8 ponovitev po 200 µl na ploščo v kolono Bb. Na ploščo smo dodali tudi 8 ponovitev po 200 µl rastnega gojišča z dodanim CPRG (kolona CPRG). V rastno gojišče s kvasovkami smo nato dodali 200 µl CPRG in v vse preostale luknjice na plošči dodali po 200 µl rastnega gojišča s kvasovkami in CPRG.

Mikrotitrsko ploščo smo nato dali v inkubator na 34 °C za 48–52 ur do razvitja barve, potem pa smo na mikročitalcu (Bio-Tek) pri 575 nm (za določanje intenzivnosti barve CPR) in 620 nm (za določanje stopnje rasti, motnosti) izmerili absorbanco.



Brglez V. Ugotavljanje učinkovitosti zmanjševanja ... bisfenola A v procesu Fentonove oksidacije.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2010



Slika 8: Shema mikrotitrne plošče za test YES z lokacijami vzorcev, standardov in kontrol

### 3.5.5 Izračun estrogenske aktivnosti vzorcev

Aktivnost encima  $\beta$ -galaktozidaza ( $T_a$ ) smo izračunali po naslednji enačbi:

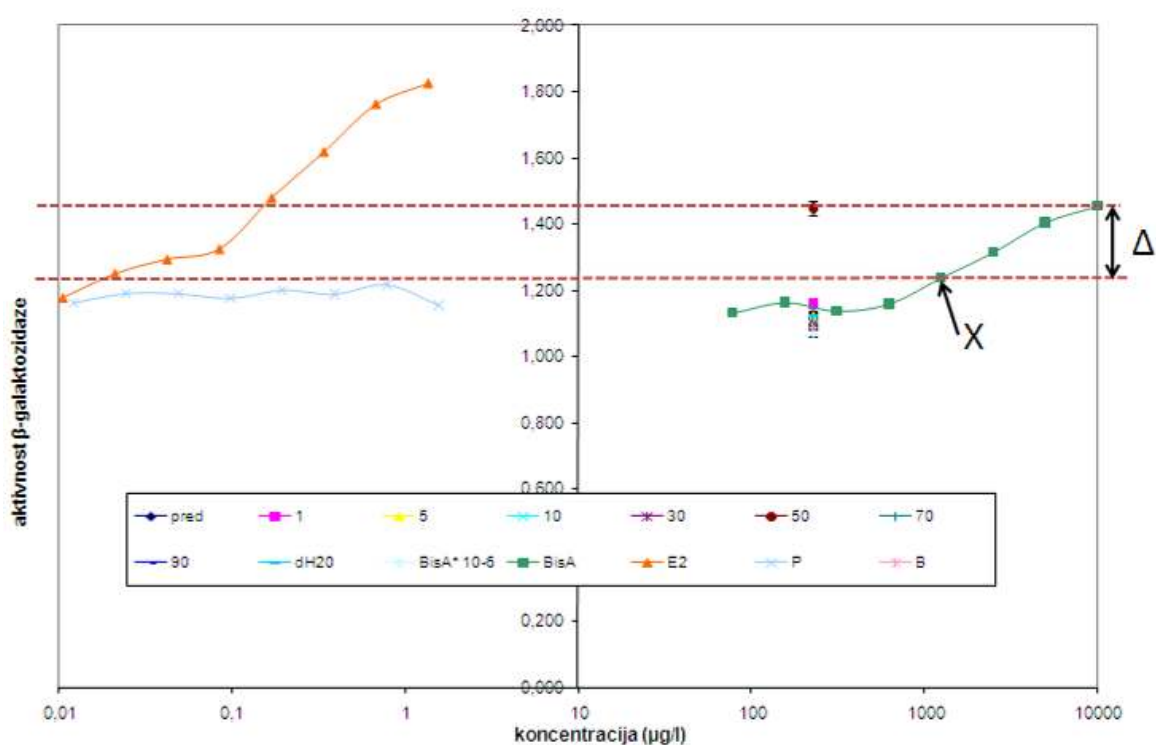
$$T_a = A_{575} - (A_{620} - B_{povp.}) \quad \dots (11)$$

V enačbi (11)  $A_{575}$  predstavlja absorbanco vzorca, izmerjeno pri 575 nm;  $A_{620}$  absorbanco vzorca, izmerjeno pri 620 nm; in  $B_{\text{povp.}}$  povprečno absorbanco ničelnega vzorca B, izmerjeno pri 620 nm.

Estrogensko aktivnost (EA) smo izračunali po naslednji enačbi:

$$EA = \frac{T_a - X}{\Delta} \quad \dots (12)$$

V enačbi (12)  $T_a$  predstavlja aktivnost encima  $\beta$ -galaktozidaza v vzorcu, izračunano po enačbi (11).  $X$  predstavlja najnižjo aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze na krivulji standarda BPA, ki je še nad ravno negativnih kontrol (B, P).  $\Delta$  predstavlja razliko med točkama z največjo in najmanjšo (ki je še nad ravno negativnih kontrol (B, P)) estrogensko aktivnostjo na krivulji standarda BPA.



Slika 9: Prikaz načina izračuna parametrov  $\Delta$  in  $X$  za izračun estrogenske aktivnosti

### 3.6 SPME/GC-MS

#### 3.6.1 Potek analize za SPME/GC-MS

18 ml posameznega filtriranega vzorca smo prenesli v 20 ml stekleničko. Analiza je potekala na GC-MS Agilent 6890N/5973 s predhodno mikroekstrakcijo z avtomatiziranim vzorčevalnikom Gerstel MultiPurposeSampler MPS.

#### 3.6.2 Analiza kromatograma

Kromatograme smo pregledali in poiskali vrhove z retencijskim časom okrog 17,05 ( $\pm$  0,15), kar ustreza BPA, ter s pomočjo programa dobili podatke o površini pod krivuljo (TIC). % ostanka BPA smo izračunali po naslednji formuli:

$$\% \text{ ost.} = \frac{TIC_{VZOREC}}{TIC_{PRED}} * 100 \quad \dots (13)$$

V enačbi (13)  $TIC_{VZOREC}$  predstavlja površino pod krivuljo za enega od vzorcev 1, 5, 10, 30, 50, 70 ali 90;  $TIC_{PRED}$  pa površino pod krivuljo za vzorec PRED.

% razgrajenega BPA smo izračunali po spodnji formuli:

$$\% \text{ razgr.} = 100 - \% \text{ ost.} \quad \dots (14)$$

### 3.7 DOLOČANJE IZKORISTKA PRI KONCENTRIRANJU (SPE)

#### 3.7.1 Koncentriranje

Najprej smo (kot opisano pod točko 3.4) skoncentrirali po 3 vzorce po 50 ml za vsako od začetnih koncentracij (0,228 mg/l in 22,8 mg/l).

#### 3.7.2 Test YES

Za test YES (kot opisano pod točko 3.5) smo na mikrotitrsko ploščo nanesti po 4 ponovitve vsakega koncentriranega vzorca in po 8 ponovitev nekoncentriranega vzorca za vsako koncentracijo (0,228 mg/l in 22,8 mg/l), in sicer v takšnih volumnih, da so bile končne koncentracije na mikrotitrski plošči po redčenju z gojiščem 0,228 mg/l oziroma 22,8 mg/l, pri čemer nismo upoštevali morebitne izgube pri koncentriranju.

Izkoristek smo izračunali kot % estrogenske aktivnosti po enačbi (12), vendar pa smo v nasprotju s to enačbo za najvišjo vrednost BPA pri parametru  $\Delta$  vzeli povprečno vrednost aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze koncentriranih vzorcev.

### 3.7.3 SPME/GC-MS

Koncentrirane vzorce smo analizirali tudi s pomočjo SPME/GC-MS (kot opisano pod točko 3.6), pri čemer smo nanesti po 3 koncentrirane in po 3 nekoncentrirane vzorce za vsako koncentracijo (0,228 mg/l in 22,8 mg/l).

Rezultate smo primerjali glede na TIC po naslednji enačbi:

$$TIC (\%) = \frac{TIC_K}{TIC_{POVP. NEK}} * 100 \quad \dots (15)$$

V enačbi (15)  $TIC_K$  predstavlja povprečje površin pod krivuljo koncentriranih vzorcev,  $TIC_{POVP. NEK}$  pa povprečje površin pod krivuljo nekoncentriranih vzorcev.

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZKORISTEK PRI KONCENTRIRANJU

Pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) estrogenosti ni bilo mogoče zaznati niti pri koncentriranih niti pri nekoncentriranih vzorcih, saj je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pod vrednostjo X na krivulji BPA, zato izkoristka na podlagi testa YES ni bilo mogoče določiti. Izkoristek glede na SPME-GC/MS je znašal 88 ( $\pm$  17) % (preglednica 1).

Pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) je izkoristek glede na estrogensko aktivnost pri koncentriranih vzorcih znašal 82 ( $\pm$  12) %, glede na SPME-GC/MS pa 65 ( $\pm$  4) % (preglednica 1).

Preglednica 1: Izkoristek pri koncentriranju (postopek SPE) za obe začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l in 22,8 mg/l) in za obe metodi (test YES in SPME/GC-MS). Izkoristek je podan v % in z vrednostjo standardnega odklona.

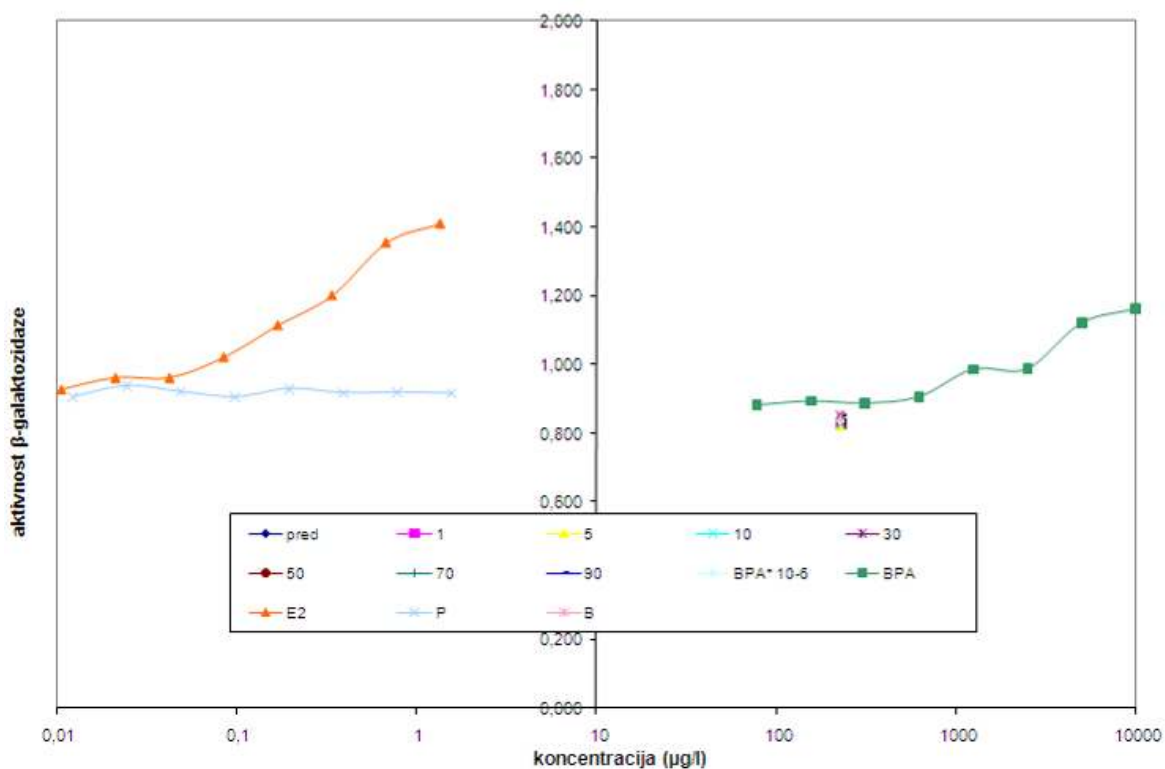
koncentracija BPA (mg/l)	0,228	22,8
	povprečje $\pm$ st. odklon (%)	
test YES	*	82 ( $\pm$ 12)
SPME/GC-MS	88 ( $\pm$ 17)	65 ( $\pm$ 4)

\* Izkoristka ni bilo mogoče določiti, saj estrogenske aktivnosti ni bilo mogoče izračunati, ker je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pod vrednostjo X na krivulji BPA.

### 4.2 MANJŠA KONCENTRACIJA BPA (0,228 mg/l)

#### 4.2.1 Estrogenska aktivnost

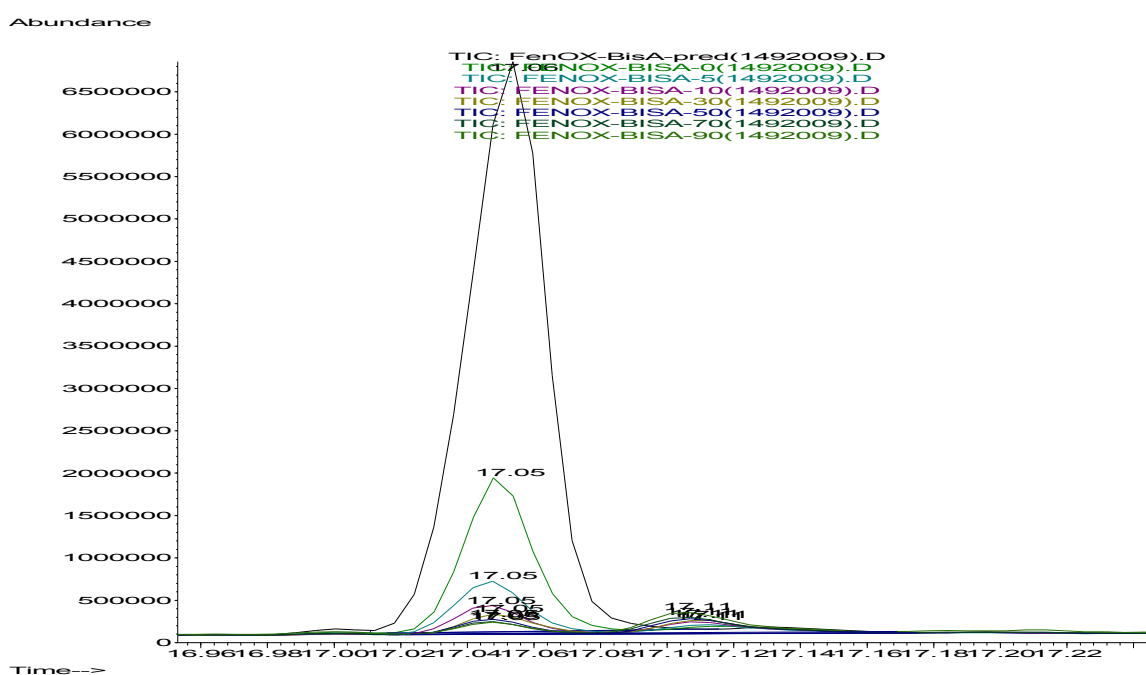
Estrogensko aktivnost smo izračunali z enačbama (11) in (12) glede na dobljeno aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pri testu YES. Pri nobenem razmerju in nobenem vzorcu estrogenske aktivnosti nismo zaznali, saj je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pod vrednostjo X na krivulji BPA (podatki niso prikazani).



Slika 10: Primer aktivnosti  $\beta$ -galaktosidaze v odvisnosti od koncentracije za vzorce (pred, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90) pri razmerju reagentov 1 : 0,5 pri Fentonovi oksidaciji in kontrole (pozitivne: E2, BPA, BPA\*; negativne: P, B) za začetno koncentracijo BPA 0,228 mg/l.

#### 4.2.2 Pretvorba BPA

Odstotek ostanka in razgrajenega dela smo izračunali z enačbama (13) in (14).



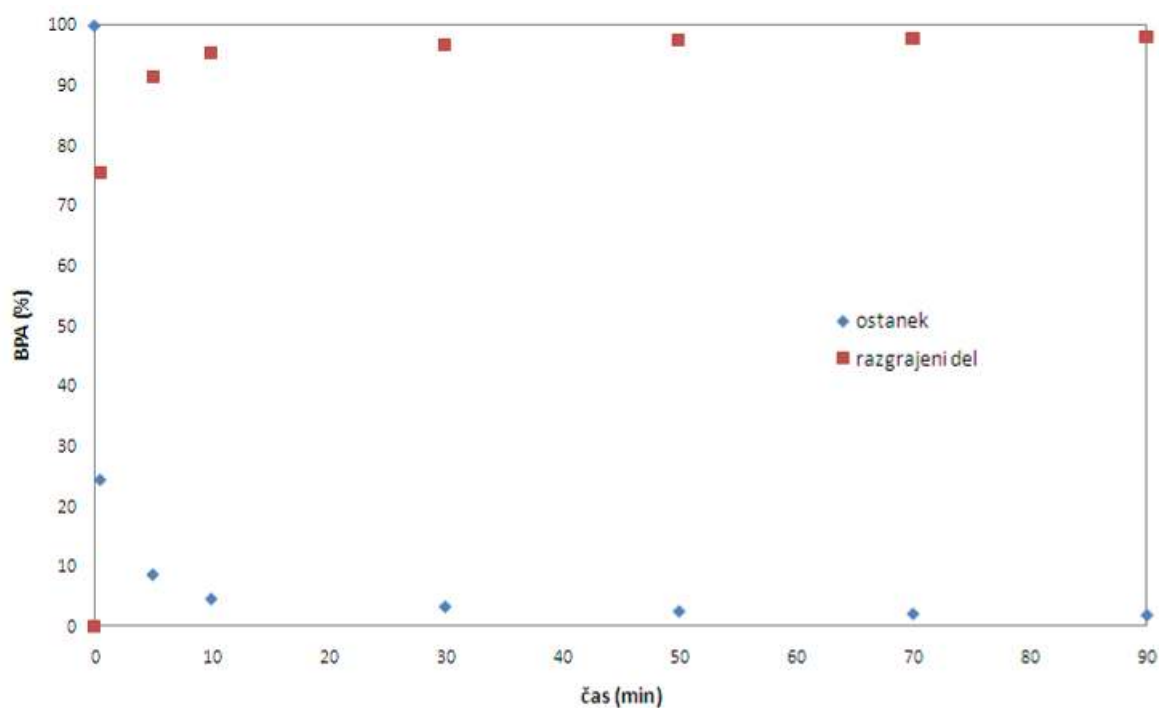
Slika 11: Primer kromatogramov po analizi SPME/GC-MS za vse vzorce (PRED, 1, 5 10, 30, 50 70, 90) za razmerje 1 : 10 pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l). Vodoravna os prikazuje retencijski čas, navpična pa površino pod krivuljo.

#### 4.2.2.1 Razmerje reagentov 1 : 0,5 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju reagentov 1 : 0,5 razgradnje ni bilo (podatki niso prikazani).

#### 4.2.2.2 Razmerje reagentov 1 : 10 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju reagentov 1 : 10 je s slike 12 razvidno, da je bila razgradnja BPA eksponentna in največja v prvih 10 minutah, ko se je razgradilo kar 95 % BPA, potem pa se je razgradnja upočasnila in se je preostanek nerazgrajenega BPA počasi asimptotično približeval ničli (pri 90 minutah je ostalo 1,9 odstotka nerazgrajenega BPA).

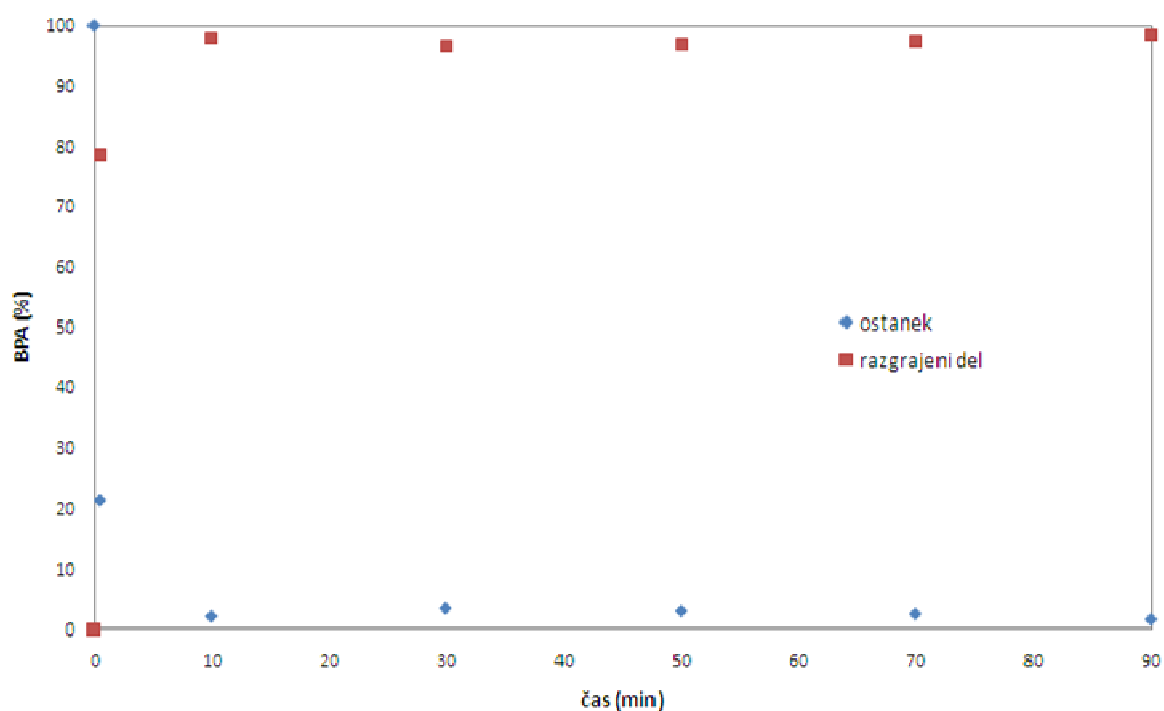


Slika 12: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 10 pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90

#### 4.2.2.3 Razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju reagentov 1 : 10 (2) je s slike 13 razvidno, da je bila razgradnja BPA največja v prvih 10 minutah, ko se je razgradilo kar 98 % BPA, potem pa je preostanek nerazgrajenega BPA pri vseh nadaljnjih vzorcih ostajal konstanten – okoli 2 odstotka.

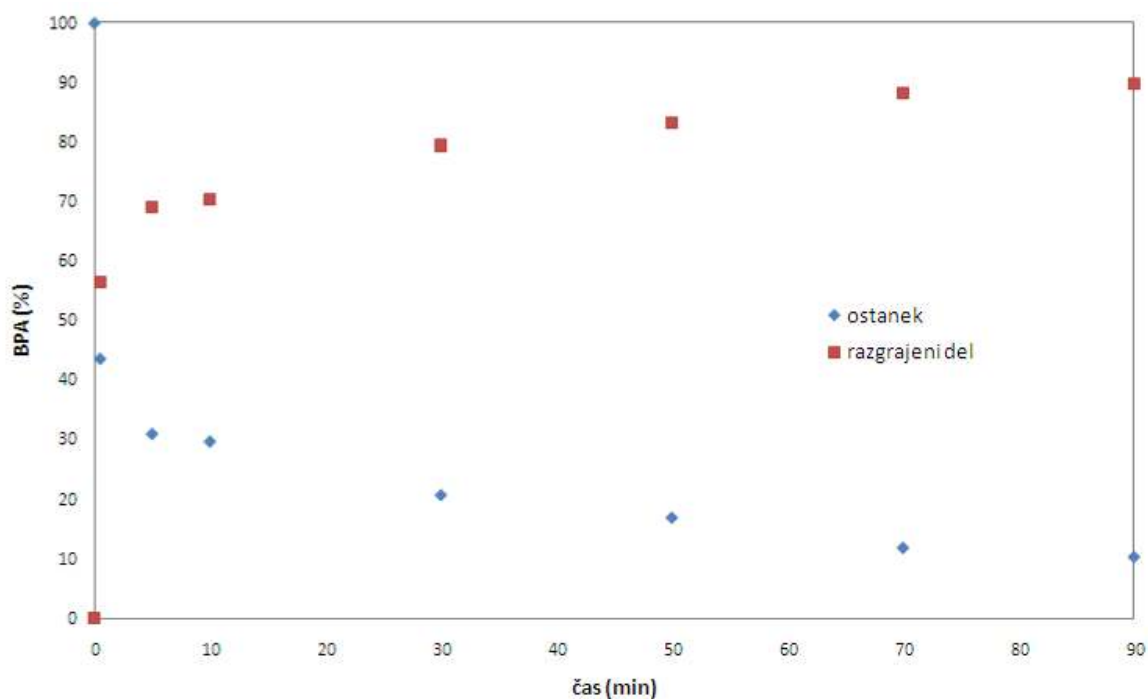




Slika 13: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) za vzorce PRED, 1, 10, 30, 50, 70, 90

#### 4.2.2.4 Razmerje reagentov 1 : 20 pri Fentonovi oksidaciji

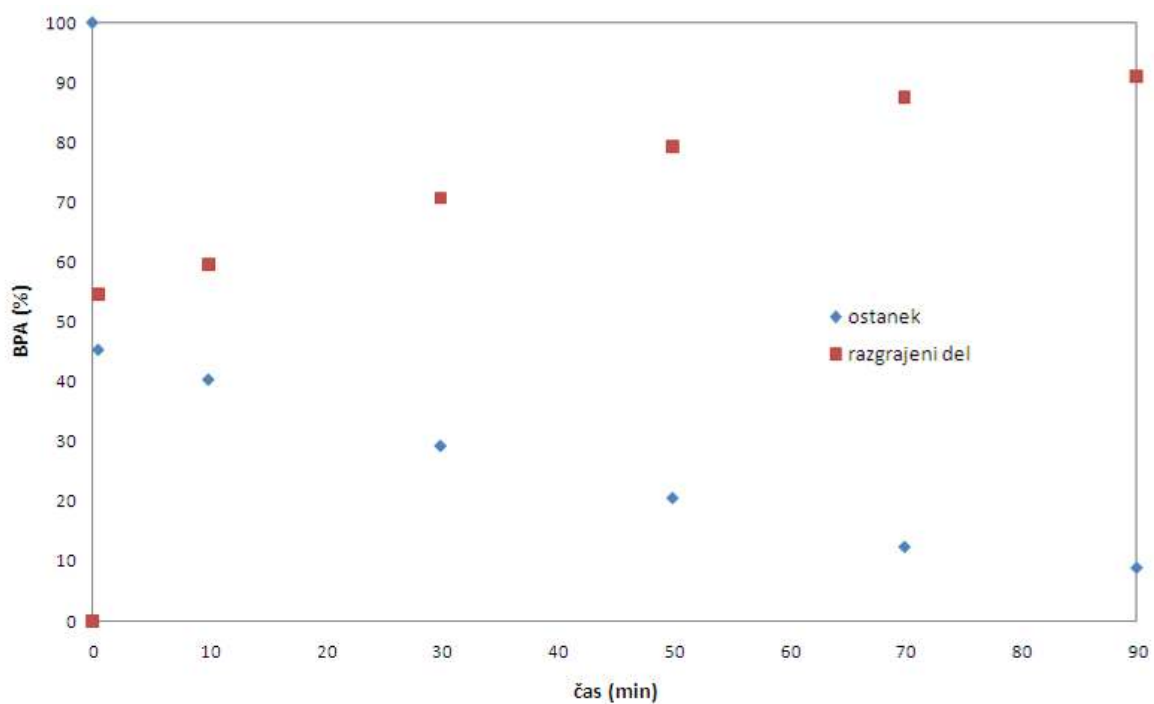
Pri razmerju reagentov 1 : 20 je s slike 14 razvidno, da je bila razgradnja BPA največja takoj na začetku (pri času 1 minute smo zaznali še 44 odstotkov nerazgrajenega BPA), potem pa se je razgradnja upočasnila in se je preostanek nerazgrajenega BPA počasi zmanjševal do 10 %, kolikor je znašal pri 90 minutah.



Slika 14: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 20 pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90

#### 4.2.2.5 Razmerje reagentov 1 : 33 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju reagentov 1 : 33 je s slike 15 razvidno, da je bila razgradnja BPA na začetku hitra (pri času 1 minute smo zaznali še 45 odstotkov nerazgrajenega BPA), potem pa se je ostanek počasi in enakomerno zmanjševal do 9 %, kolikor je znašal pri 90 minutah.



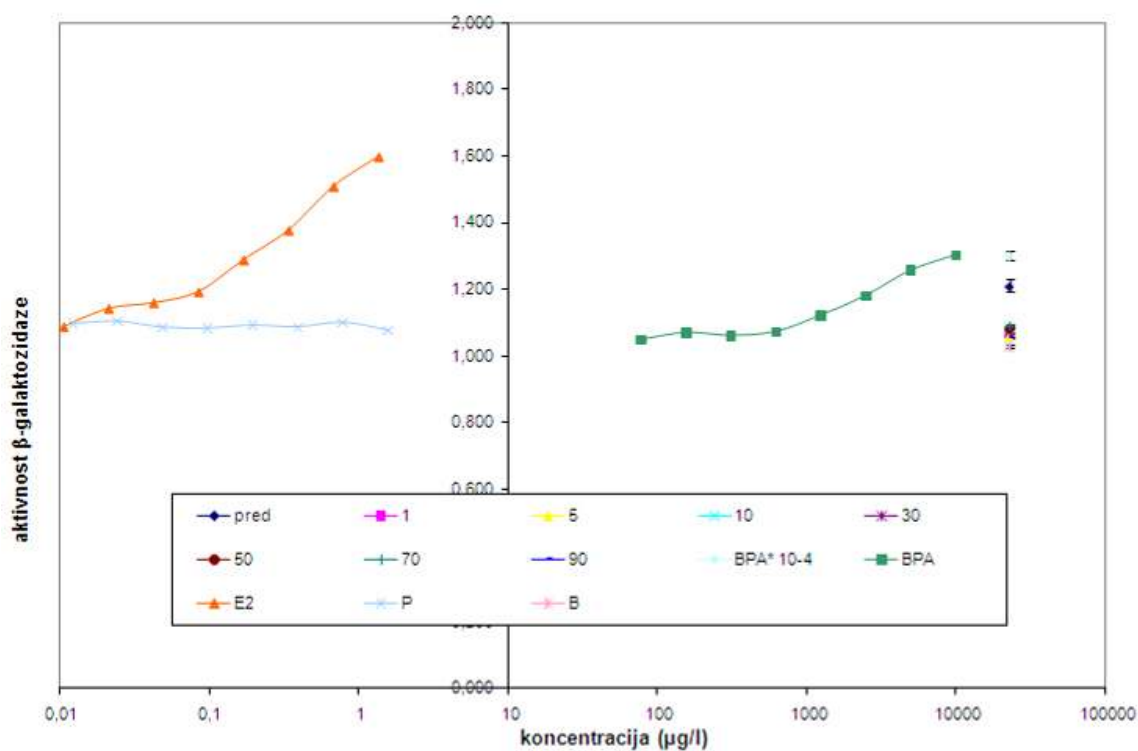
Slika 15: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 33 pri manjši začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l) za vzorce PRED, 1, 10, 30, 50, 70, 90

#### 4.3 VEČJA KONCENTRACIJA BPA (22,8 mg/l)

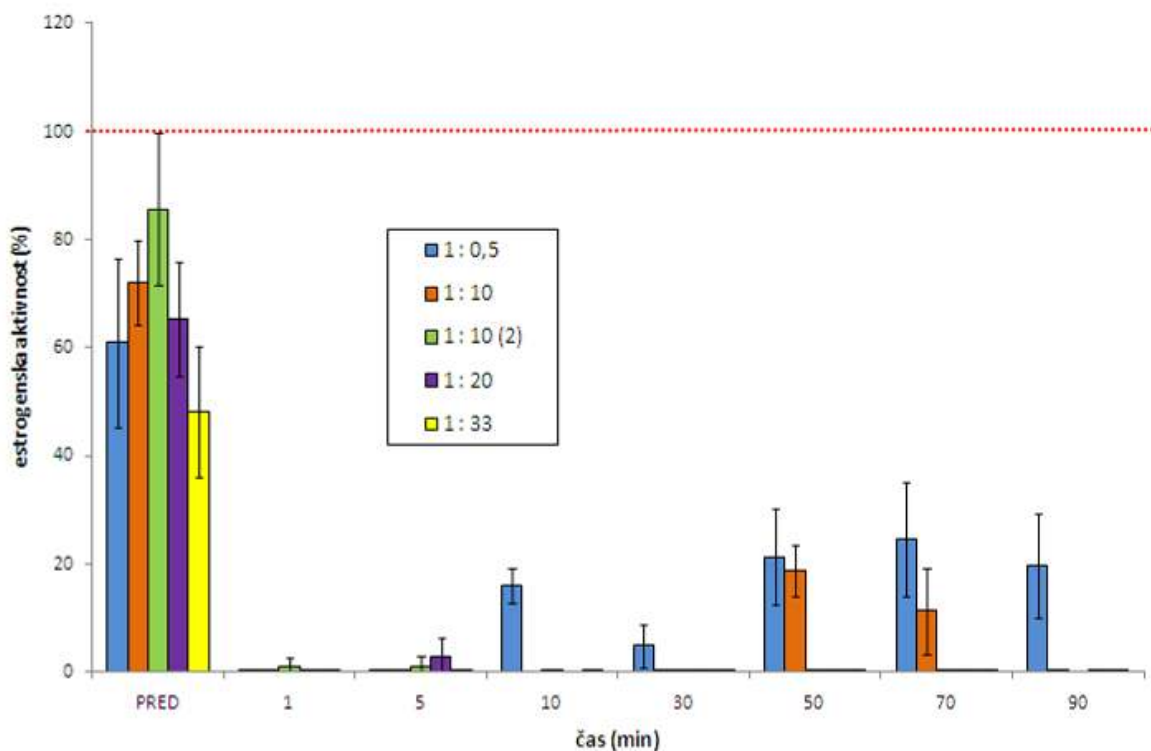
##### 4.3.1 Estrogenska aktivnost

Estrogenska aktivnost (slika 17) je bila izračunana na podlagi enačb (11) in (12) glede na dobljeno aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pri testu YES.

Brglez V. Ugotavljanje učinkovitosti zmanjševanja ... bisfenola A v procesu Fentonove oksidacije.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2010



Slika 16: Primer aktivnosti  $\beta$ -galaktosidaze v odvisnosti od koncentracije za vzorce (PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90) pri razmerju reagentov 1 : 33 pri Fentonovi oksidaciji in kontrole (pozitivne: E2, BPA, BPA\*; negativne: P, B) za začetno koncentracijo BPA 22,8 mg/l



Slika 17: Estrogenska aktivnost v odvisnosti od časa za razmerja 1 : 0,5, 1 : 10, 1 : 10 (2), 1 : 20, 1 : 33 in vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90 pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l). Rdeča črtkana črta predstavlja 100% estrogensko aktivnost.

#### 4.3.1.1 Razmerje reagentov 1 : 0,5 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju 1 : 0,5 smo estrogensko aktivnost zaznali pri vseh vzorcih razen pri vzorcih, vzetih ob časih 1 in 5 minut, pri katerih je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pod vrednostjo X na krivulji BPA (podatki niso prikazani). Pri vzorcu PRED smo zaznali 61 ( $\pm$  15) % estrogenske aktivnosti, pri vzorcih 10, 30, 50, 70 in 90 minut pa je bila estrogenska aktivnost med 5 in 25 % (slika 17).

#### 4.3.1.2 Razmerje reagentov 1 : 10 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju 1 : 10 estrogenske aktivnosti nismo zaznali pri vzorcih 1, 5, 30 in 90 minut, pri katerih je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pod vrednostjo X na krivulji BPA (podatki niso prikazani). Pri vzorcu PRED smo zaznali 72 ( $\pm$  7) % estrogenske aktivnosti, pri vzorcih 50 in 70 minut pa 19 ( $\pm$  5) oziroma 11 ( $\pm$  8) % estrogenske aktivnosti (slika 17).

#### 4.3.1.3 Razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju 1 : 10 (2) smo estrogensko aktivnost zaznali le pri vzorcu PRED, pri katerem je znašala  $86 (\pm 14) \%$  (slika 17), pri vseh preostalih pa je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pod vrednostjo X na krivulji BPA (podatki niso prikazani).

#### 4.3.1.4 Razmerje reagentov 1 : 20 pri Fentonovi oksidaciji

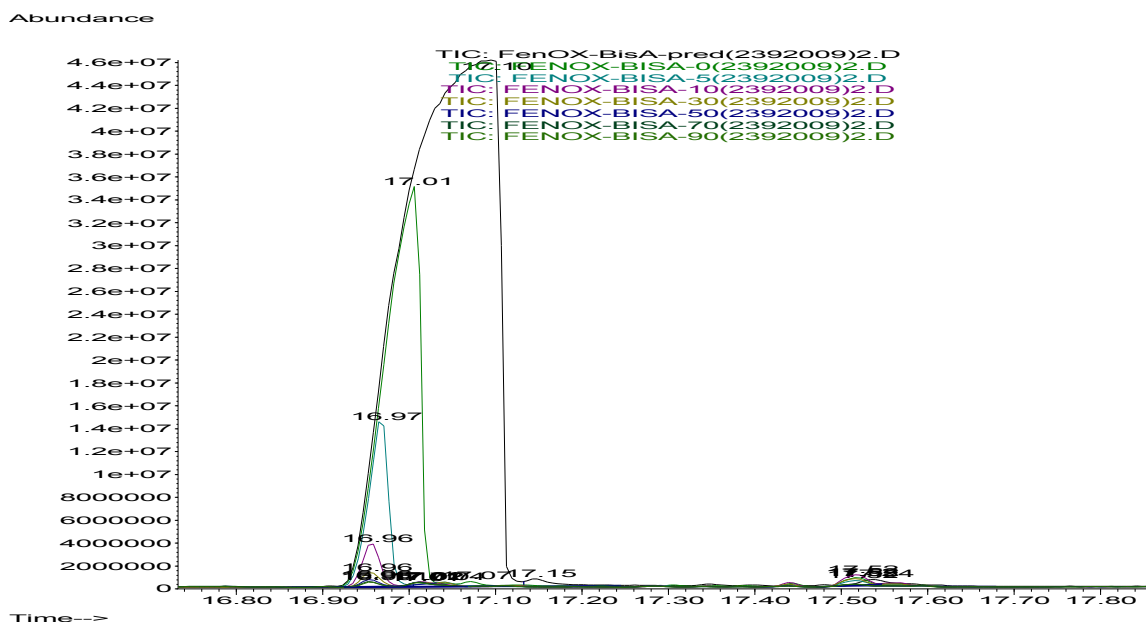
Pri razmerju 1 : 20 smo estrogensko aktivnost zaznali le pri vzorcu PRED, pri katerem je znašala  $65 (\pm 11) \%$  (slika 17), pri vseh preostalih pa je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pod vrednostjo X na krivulji BPA (podatki niso prikazani).

#### 4.3.1.5 Razmerje reagentov 1 : 33 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju 1 : 33 smo estrogensko aktivnost zaznali le pri vzorcu PRED, pri katerem je znašala  $48 (\pm 12) \%$  (slika 17), pri preostalih vzorcih pa je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze pod vrednostjo X na krivulji BPA (slika 16).

### 4.3.2 Pretvorba BPA

Odstotek ostanka in razgrajenega dela je bil izračunan z enačbama (13) in (14).



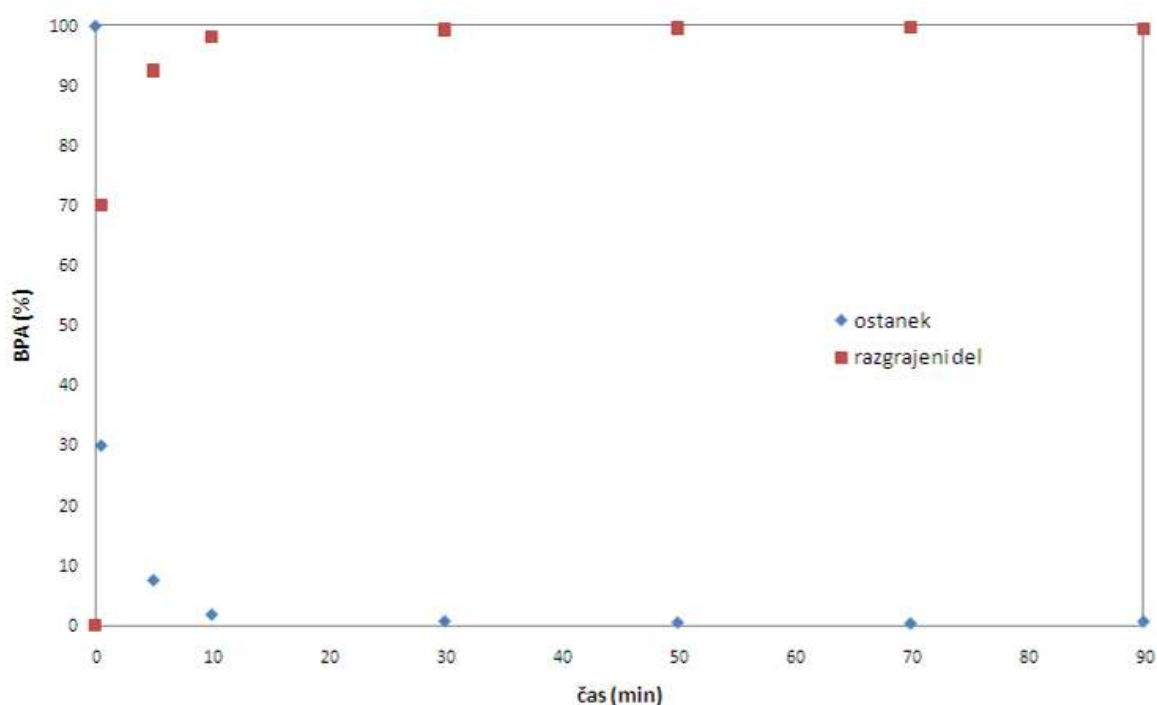
Slika 18: Primer kromatogramov po analizi SPME/GC-MS za vse vzorce (PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90) za razmerje 1 : 10 (2) pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l). Vodoravna os prikazuje retencijski čas, navpična pa površino pod krivuljo. Vsaka krivulja predstavlja posamezen vzorec.

#### 4.3.2.1 Razmerje reagentov 1 : 0,5 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju reagentov 1 : 0,5 razgradnje ni bilo (podatki niso prikazani).

#### 4.3.2.2 Razmerje reagentov 1 : 10 pri Fentonovi oksidaciji

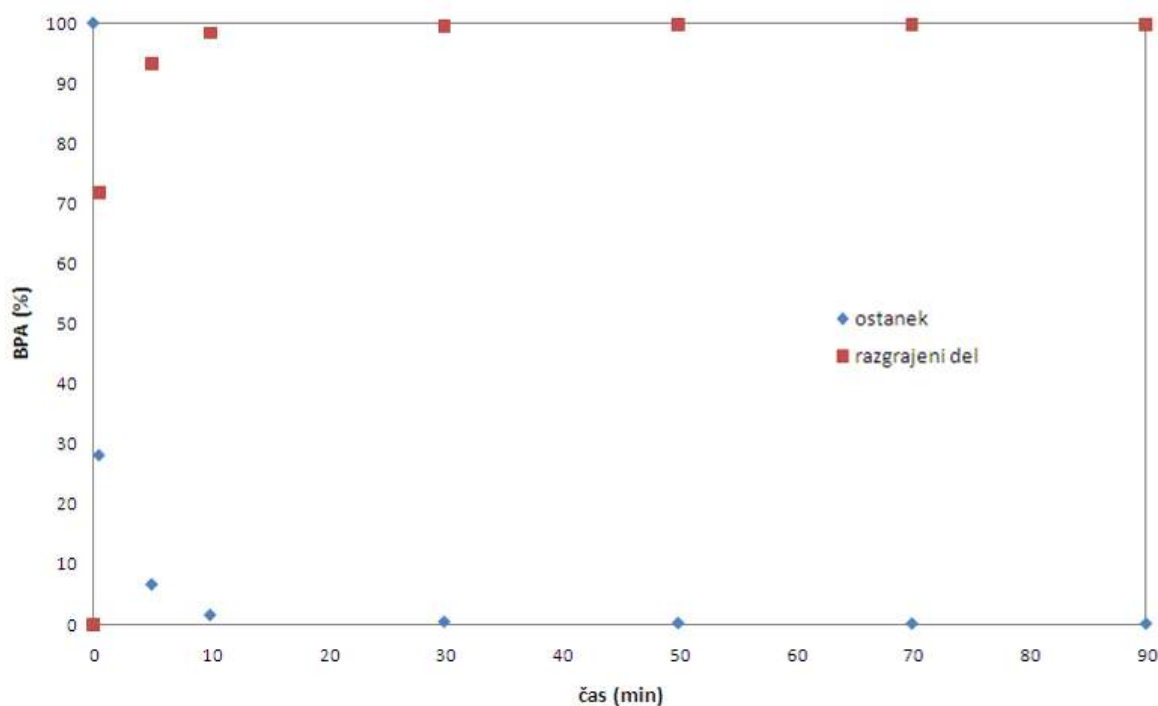
Pri razmerju reagentov 1 : 10 je s slike 19 razvidno, da je bila razgradnja BPA eksponentna in največja v prvih 10 minutah, ko se je razgradilo kar 98 % BPA, potem pa se je razgradnja upočasnila in je ostanek v obdobju med 30 in 90 minutami znašal manj kot 1 %.



Slika 19: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 10 pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90

#### 4.3.2.3 Razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju reagentov 1 : 10 (2) je s slike 20 razvidno, da je bila razgradnja BPA eksponentna in največja v prvih 10 minutah, ko se je razgradilo 93 % BPA, potem pa se je razgradnja upočasnila in po 30 minutah dosegla 100 %.

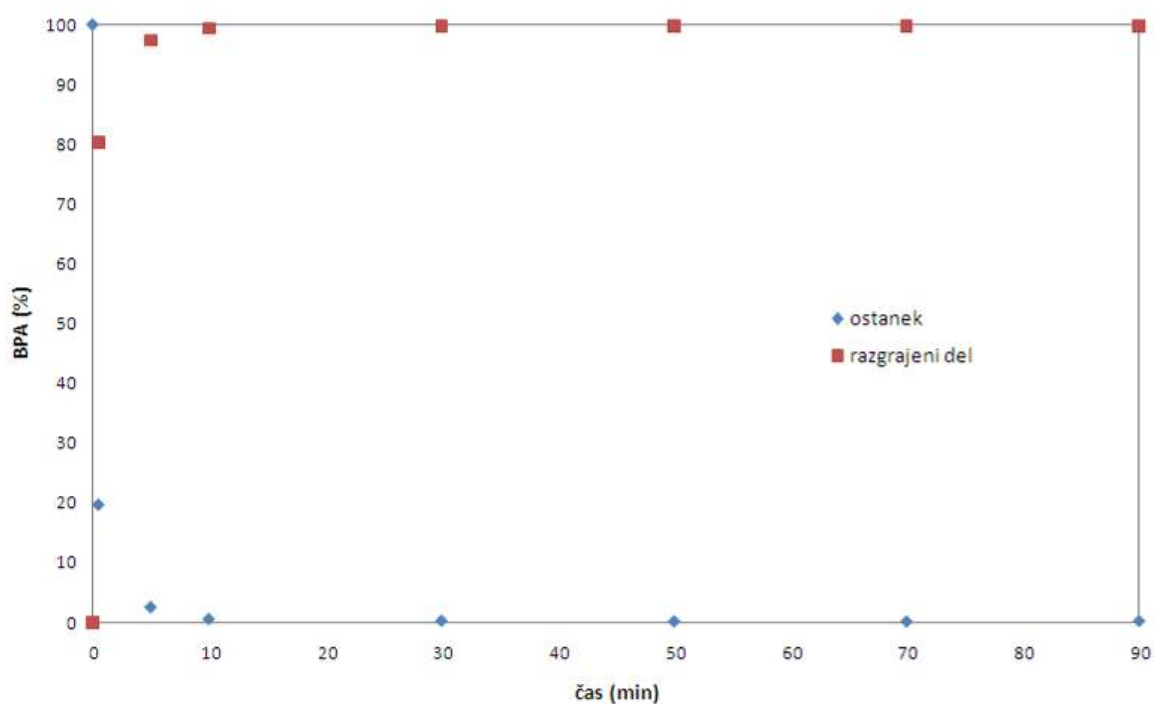


Slika 20: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 10 (2) pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90

#### 4.3.2.4 Razmerje reagentov 1 : 20 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju reagentov 1 : 20 je s slike 21 razvidno, da je bila razgradnja BPA eksponentna in največja v prvih 5 minutah, ko se je razgradilo kar 97 % BPA, potem pa se je razgradnja upočasnila in po 30 minutah dosegla 100 %.



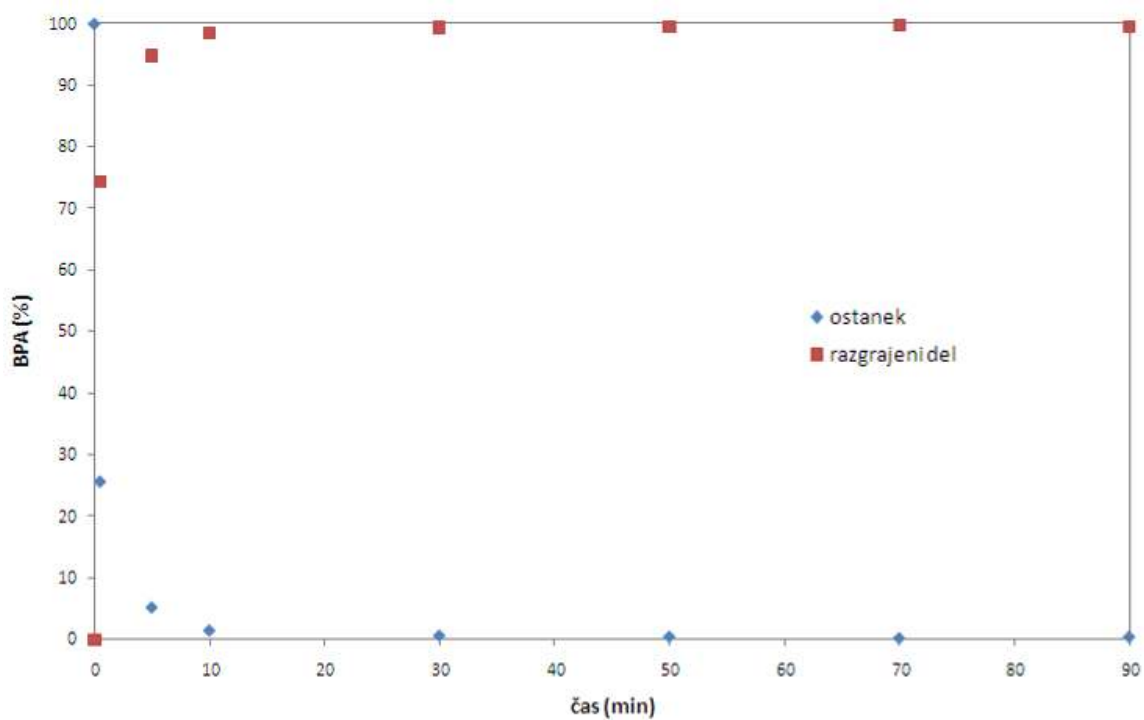


Slika 21: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 20 pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90

#### 4.3.2.5 Razmerje reagentov 1 : 33 pri Fentonovi oksidaciji

Pri razmerju reagentov 1 : 33 je s slike 22 razvidno, da je bila razgradnja BPA eksponentna in največja v prvih 10 minutah, ko se je razgradilo kar 98 % BPA, potem pa se je razgradnja upočasnila in po 30 minutah dosegla 100 %.

Brglez V. Ugotavljanje učinkovitosti zmanjševanja ... bisfenola A v procesu Fentonove oksidacije.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2010



Slika 22: Odstotek ostanka in razgrajenega BPA v odvisnosti od časa za razmerje reagentov 1 : 33 pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) za vzorce PRED, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 90

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Estrogensko aktivnost raztopin z BPA po postopku Fentonove oksidacije smo zaznavali s testom YES, stopnjo razgradnje pa s SPME/GC-MS, s čimer smo določali učinkovitost Fentonove oksidacije pri odstranjevanju BPA iz vode.

Pri manjši koncentraciji BPA estrogenske aktivnosti nismo dokazali pri nobenem vzorcu in pri nobenem razmerju reagentov pri Fentonovi oksidaciji (podatki niso prikazani), kar je posledica tega, da je bila že začetna koncentracija BPA zelo nizka (0,228 mg/l) in zato pod mejo detekcije s testom YES, saj ta za BPA znaša približno 1 mg/l (Li in sod., 2004).

Razgradnjo BPA pri manjši koncentraciji (0,228 mg/l) smo spremljali s SPME/GC-MS. Tu smo opazili razlike med različnimi razmerji reagentov.

Izkazalo se je, da je razmerje 1 : 0,5 ( $\text{Fe}^{2+}$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) popolnoma neprimerno, saj se količina zaznanega BPA ni spreminjala (podatki niso prikazani), torej razgradnje ni bilo. Razmerje je verjetno slabo zaradi preveč  $\text{Fe}^{2+}$ , saj se zaradi reakcije (4) zmanjša koncentracija hidroksilnih radikalov in posledično učinkovitost procesa (Deng in Englehardt, 2006). Pri višjem razmerju (več  $\text{Fe}^{2+}$ ) namreč prevladuje koagulacija (Neyens in Baeyens, 2003), kar se je pokazalo tudi v praksi, saj je bila količina nastale usedline železovih kompleksov bistveno večja kot pri drugih razmerjih, kar velja za obe začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l in 22,8 mg/l). Usedlina železovih kompleksov pa je problematična zaradi adsorbcije BPA nanjo, s čimer se zmanjša dejanska razgradnja, saj se del BPA preprosto prenese v drugo fazo, s čimer je učinkovitost odstranjevanja zmanjšana, kar je na primeru BPA in Fentonove oksidacije vzporedno raziskoval Pevec (2010). Ugotovil je, da je adsorbcija večja, če je na voljo več usedline železovih oksidov in hidroksidov nedefinirane sestave, ki nastane med Fentonovo oksidacijo. S povečevanjem količine usedline se namreč poveča število aktivnih mest, kamor se veže aktivni center adsorbata. Če torej med Fentonovo oksidacijo nastane več usedline, adsorbcija lahko znatno prispeva k celotnemu deležu odstranitve hormonskega motilca. Rezultati kažejo, da je lahko adsorbcija na usedlino pri manjši koncentraciji BPA (0,228 mg/l) do 40 %, odvisno od količine usedline (Pevec,

2010). To se sklada z našimi rezultati, saj je pri razmerju 1 : 0,5 nastalo največ usedline pri obeh začetnih koncentracijah BPA (0,228 mg/l in 22,8 mg/l), torej je za rezultate z metodo SPME/GC-MS verjetno kriva adsorbcija BPA na usedlino. Posledično je morebitna dejanska oksidacija prikrita, saj namesto oksidacije prevladuje adsorbcija, kar lahko delno razberemo le iz testa YES pri enakem razmerju in večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l).

Pri razmerju reagentov 1 : 10 in manjši začetni koncentraciji BPA (slika 12) je bila razgradnja zelo enakomerna in hitra, torej je to razmerje zelo primerno tako glede hitrosti (v prvih 10 minutah se je razgradilo 95 % BPA) kot učinkovitosti razgradnje (pri 90 minutah je ostalo 1,9 % nerazgrajenega BPA).

Pri razmerju reagentov 1 : 10 (2) (slika 13) je bila razgradnja prav tako zelo hitra, saj se je količina BPA hitro močno zmanjšala. Razmerje je enako učinkovito kot 1 : 10, saj je na koncu ostalo le za približno odstotek več nerazgrajenega BPA. Dobro je tudi vidna podobnost rezultatov med 1 : 10 in 1 : 10 (2), kar je logično, saj gre za enako razmerje, le da ima 1 : 10 (2) polovično količino reagentov na enako koncentracijo BPA.

Razmerje reagentov 1 : 20 (slika 14) se je izkazalo kot manj primerno v primerjavi z 1 : 10 in 1 : 10 (2), saj je bila razgradnja sicer enakomerna, a ne tako hitra in je na koncu ostalo še 10 % nerazgrajenega BPA.

Razmerje reagentov 1 : 33 (slika 15) je podobno 1 : 20, saj je bila razgradnja počasnejša in je na koncu ostalo še 9 % nerazgrajenega BPA.

Razmerji 1 : 20 in 1 : 33 sta se verjetno izkazali kot nekoliko slabši, ker se pri previsoki koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nekaj hidroksilnih radikalov porabi v reakciji (3), kar zmanjša učinkovitost (Deng in Englehardt, 2006).

Estrogenska aktivnost (slika 17) je bila pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) pri vseh razmerjih pri vzorcu PRED manjša od 100 %, kar je posledica izgube pri nadaljnjih procesih (filtriranje, postopek SPE). Kot smo dokazali s testom izkoristka, je estrogenska aktivnost koncentriranih vzorcev z enako začetno koncentracijo značilno nižja od nekoncentriranih (preglednica 1). Postopek SPE je glavni vir izgub, saj se pri posamezni

koloni enaka količina BPA lahko adsorbira v različni meri, pa tudi pri eluciji lahko na koloni ostane vezan BPA. Zaradi naštetega je pomembno, da je pretok vzorca pri postopku SPE za vse vzorce konstanten in dovolj počasen, da se BPA lahko adsorbira na polnilo kolone. Enako velja za elucijo, saj mora biti hitrost prav tako konstantna (Chang in sod., 2009). Zaradi variabilnosti je tudi širši interval standardne deviacije. Kljub temu lahko na podlagi testa izkoristka sklepamo, da postopek SPE, ki je v tem primeru edini dejavnik variabilnosti, statistično značilno zmanjša izkoristek – za od 65 do 88 %. Naši izkoristki ekstrakcije na kolonah Oasis<sup>®</sup> HLB<sup>®</sup> so višji, kot navajajo Gatidou in sod. (2007) – manj kot 10 %.

Pri razmerju 1 : 0,5 večje koncentracije BPA (22,8 mg/l) smo estrogensko aktivnost zaznali pri vseh vzorcih razen 1 in 5, medtem ko je pri vzorcih 10, 30, 50, 70 in 90 minut znašala med 5 in 25 % (slika 17). Kljub neestrogenosti vzorcev 1 in 5 lahko sklepamo, da ker je estrogenost še vedno prisotna pri poznejših časih in relativno podobna med vzorci, to razmerje ni najbolj primerno, saj bi estrogenska aktivnost v idealnih razmerah morala izginiti. Estrogenska aktivnost poznejših vzorcev je značilno nižja od vzorca PRED (61 %), kar nakazuje bodisi na razgradnjo BPA in nastanek stranskih estrogensko aktivnih razgradnih produktov bodisi na adsorbcijo BPA na usedlino železovih kompleksov, ki v prvi stopnji zmanjša estrogensko aktivnost, in poznejšo desorbcijo, s čimer se estrogenska aktivnost spet poveča. Rezultati SPME/GC-MS kažejo, da sta deleža razgrajenega in nerazgrajenega BPA ostajala približno konstantna, torej razgradnje sploh ni bilo (podatki niso prikazani). S testom YES torej lahko dokažemo, da se estrogenska aktivnost dejansko zmanjša, a je to glede na rezultate SPME/GC-MS bolj verjetno posledica adsorbcije BPA na usedlino, torej gre za zmanjšanje estrogenske aktivnosti zaradi prenosa v drugo fazo (adsorbcije) in ne razgradnje (oksidacije). To se sklada z ugotovitvami Pevca (2010), da lahko adsorbcija pri večji koncentraciji BPA znaša do 35 %, odvisno od količine usedline. Sklenemo lahko, da razmerje očitno ni primerno. Rezultati SPME/GC-MS se ujemajo z ugotovitvami pri manjši koncentraciji BPA (0,228 mg/l).

Pri razmerju 1 : 10 estrogenske aktivnosti nismo zaznali pri vzorcih 1, 5, 30 in 90 minut. Estrogensko aktivnost smo zaznali pri vzorcih 50 in 70 minut, pri katerih je znašala 19 oziroma 11 % (slika 17), kar nakazuje na nastanek estrogensko aktivnih razgradnih

produktov v procesu Fentonove oksidacije. Nekateri razgradni produkti BPA so sicer poznani: monohidroksiliran-4-isopropenilfenol, 4-isopropenilfenol, 4-isopropilfenol, p-hidroksiacetofenon, dihidroksiliran BPA (2-(4-hidroksifenil)-2-(2',4',5'-trihidroksifenil)propan), kinon dihidroksiliranega BPA, meta- in orto- monohidroksiliran BPA (2-(4-hidroksifenil)-2-(2',4'-dihidroksifenil)propan in 2-(4-hidroksifenil)-2-(3',4'-dihidroksifenil)propan) ter kinon monohidroksiliranega BPA. Vsi ti stranski produkti imajo krajši retencijski čas kot BPA, torej so bolj hidrofilni. Nadalje iz teh nastanejo še bolj preproste spojine: katehol, p-hidrokinon (4-(1-hidroksi-1-metil-etil)-fenol), benzokinon, resorcinol, 4-hidroksimandelična kislina, 4-hidroksibenzojska kislina, 2-butenedionska kislina, 4-oksobutenojska kislina, očetna kislina in mravljinčna kislina (Gözmen in sod., 2003; Torres in sod., 2007; Katsumata in sod., 2004). Kljub velikemu številu različnih metabolitov, z izjemo p-hidroksiacetofenona (Ike in sod., 2002), zanje estrogenska aktivnost na testu YES še ni bila določena. Rezultati SPME/GC-MS (slika 19) ne nasprotujejo hipotezi o nastanku estrogensko aktivnih produktov, saj je bila razgradnja BPA zelo hitra (v prvih 10 minutah se je razgradilo 98 % BPA) in učinkovita ter bi samo na podlagi SPME/GC-MS lahko sklepali, da je razmerje zelo primerno. Sicer se rezultat SPME/GC-MS ujema s tistim pri manjši koncentraciji BPA (0,228 mg/l).

Rezultati testa YES za razmerje 1 : 10 (2) nakazujejo, da gre za zelo primerno razmerje, saj smo estrogensko aktivnost zaznali le pri vzorcu PRED (slika 17). Odlično razgradnjo potrjuje tudi rezultat SPME/GC-MS (slika 20), saj je bila razgradnja BPA zelo podobna kot pri razmerju 1 : 10, torej hitra (v prvih 10 minutah se je razgradilo 93 % BPA) in učinkovita, zato to razmerje na osnovi testa YES in SPME/GC-MS ocenjujemo kot zelo primerno. Ocena se tudi ujema s tisto pri manjši koncentraciji BPA (0,228 mg/l). Dobro je tudi vidna podobnost rezultatov med 1 : 10 in 1 : 10 (2), saj je logično, ker gre za enako razmerje, le da ima 1 : 10 (2) polovično količino reagentov na enako koncentracijo BPA.

Pri razmerju 1 : 20 estrogenske aktivnosti nismo zaznali (slika 17), zato bi razmerje na podlagi testa YES ocenili kot zelo primerno. Tej oceni pritrjujejo tudi rezultati SPME/GC-MS (slika 21), saj je bila razgradnja BPA enako kot pri razmerjih 1 : 10 in 1 : 10 (2) zelo hitra (v prvih 5 minutah se je razgradilo 97 % BPA) in učinkovita, torej je razmerje v celoti zelo primerno. Rezultati pri manjši koncentraciji BPA (0,228 mg/l) kažejo, da je bila

razgradnja BPA glede na analizo SPME/GC-MS nekoliko slabša, počasnejša in na koncu je ostalo več nerazgrajenega BPA.

Pri razmerju 1 : 33 smo estrogensko aktivnost zaznali le pri vzorcu PRED, pri preostalih pa ne (slika 17), torej je to razmerje glede na test YES zelo primerno, saj je razgradnja očitno hitra in popolna. Tej ugotovitvi pritrjuje tudi rezultat analize SPME/GC-MS (slika 22), ki kaže, da je razgradnja enako kot pri prejšnjih treh razmerjih hitra (v prvih 10 minutah se je razgradilo 98 % BPA) in učinkovita, torej razmerje v celoti ocenjujemo kot zelo primerno. Tudi v tem primeru se – enako kot pri razmerju 1 : 20 – rezultati analize SPME/GC-MS ne ujemajo s tistimi pri manjši koncentraciji BPA (0,228 mg/l), pri kateri je bila razgradnja slabša, počasnejša in na koncu je ostalo več nerazgrajenega BPA.

Razmerji 1 : 20 in 1 : 33 sta se na podlagi analize SPME/GC-MS izkazali kot bolj primerni pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) v primerjavi z manjšo (0,228 mg/l) verjetno zaradi tega, ker smo pri večji koncentraciji BPA imeli količinsko več reagentov, zato je nastalo več usedline železovih kompleksov, torej je bila površina za adsorbcijo večja, zaradi česar se je več BPA vezalo na usedlino, kar je ugotovil tudi Pevec (2010) v vzporednih poskusih. Pomen sinergizma med oksidacijo in adsorbcijo so opisali že številni avtorji (Deng, 2007; Neyens in Baeyens, 2003; Zhang in sod., 2005). Razgradnja, ki smo jo s pomočjo SPME/GC-MS določili na podlagi preostale raztopine pri večji koncentraciji BPA (22,8 mg/l), je bila torej verjetno lažno visoka, saj nismo upoštevali adsorbcije.

Sicer so rezultati pri SPME/GC-MS za obe začetni koncentraciji BPA primerljivi, kar je logično, saj so bila razmerja povsod enaka. Z izjemo razmerij 1 : 20 in 1 : 33, za kateri smo ugotovili, da so razlike verjetno nastale zaradi drugačnega deleža adsorbcije, pa še v tem primeru razlike niso zelo velike, koncentracija BPA očitno ne vpliva na učinkovitost Fentonove oksidacije, seveda ob predpostavki, da koncentraciji BPA prilagodimo količino reagentov. Pri testu YES primerjava estrogenske aktivnosti med obema koncentracijama BPA ni mogoča, saj je manjša koncentracija BPA (0,228 mg/l) pod mejo detekcije testa YES, zato estrogenosti nismo zaznali pri nobenem vzorcu.

Hitrost razgradnje je eden izmed najpomembnejših faktorjev pri odstranjevanju hormonskih motilcev v industrijskem merilu. Kot so dokazali Zhang in sod. (2005), se

večina hormonskih motilcev razgradi v prvih 20 minutah, kar drži tudi za naše poskuse pri razmerjih, ki so se izkazala kot primerna. Pri razmerjih, ki so se izkazala kot najprimernejša, je bila razgradnja še celo hitrejša (npr. 1 : 10 (2) pri obeh koncentracijah BPA). Ker pa adsorbcija očitno pomembno prispeva k odstranjevanju BPA, je pomembna tudi dinamika adsorbcije. Kot je ugotovil Pevec (2010), se največ BPA adsorbira v prvih 10 minutah, nato pa se proces zaradi zasedenosti prostih mest upočasni oziroma ustali pri določeni vrednosti. Zhang in sod. (2005) so kot čas, primeren za Fentonovo oksidacijo v bioreaktorjih z enkratnim polnjenjem, navedli 30 minut, kar bi bil primeren čas tudi glede na naše rezultate, saj se pri ustreznih razmerjih večina razgradnje zgodi v prvih 10 minutah. S podaljšanjem časa se razgradnja sicer poveča, a le do neke mere, ko kljub podaljšanju časa reakcije stopnja razgradnje ostaja enaka (Zhang in sod., 2005).

Po navadi se kot primerna izkažejo razmerja  $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2$  v območju med 1 : 10 in 1 : 40 (Tang in Huang, 1997, cit. po Katsumata in sod., 2004), kar se sklada z našimi rezultati, ko so se na splošno gledano kot primerna izkazala vsa razmerja razen 1 : 0,5. Optimalno molsko razmerje v Fentonovi oksidaciji tako predstavlja tisto razmerje, pri katerem imamo minimalno porabo reagentov ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ob sočasnem minimalnem nastajanju odpadne usedline, ki vodi k najmanjši možni adsorbciji (Pevec, 2010). Če torej upoštevamo še željo po čim manjši porabi reagentov, bi bilo najprimernejše razmerje 1 : 10 (2), saj vsebuje le polovično količino reagentov glede na razmerje 1 : 10, a učinkovitost s tem ni zmanjšana. Zaradi manjše količine dodanih reagentov je tudi manjša verjetnost, da del neporabljenih reagentov ostane v vodi po procesu čiščenja, s čimer je zmanjšano tudi tveganje za okolje.

Na splošno se naši rezultati skladajo z literaturo. Katsumata in sod. (2004) so npr. izvedli fotorazličico Fentonove oksidacije z začetno koncentracijo BPA 10 mg/l in detekcijo s HPLC-UV ter identifikacijo stranskih produktov z GC-MS. Dokazali so, da se učinkovitost poveča z večjo koncentracijo  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{Fe}^{2+}$ ; pri ugodnem razmerju je večina reakcije potekla že v prvih 20 minutah. Z analizo GC-MS so ugotovili 6 razgradnih produktov BPA. Ioan in sod. (2007) so primerjali razgradnjo BPA z začetno koncentracijo 25 mg/l pri navadni in ultrazvočni izvedbi Fentonove reakcije s kvantifikacijo BPA z LC-UV, pri čemer sta se kot uspešnejši izkazali večja koncentracija  $\text{Fe}^{2+}$  in izvedba z ultrazvočno sonikacijo. Zhou in sod. (2004) so med drugim dokazali, da je razgradnja BPA ob enaki



količini reagentov višja pri manjši začetni koncentraciji BPA. Rodriguez in sod. (2010) so za svoje analize uporabljali enako opremo kot mi: GC-MS Agilent HP6890, za SPE kolone Waters® Oasis® HLB; njihova začetna koncentracija BPA pa je bila 11,4 mg/l in razmerje med  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 : 20 (0,00005 M : 0,001 M). Izmed 18 preizkušenih naprednih oksidacijskih postopkov se je Fentonova oksidacija v navadni in fotoizvedbi izkazala kot najuspešnejša pri razgradnji BPA. Pri fotoizvedbi so dokazali, da vsi vmesni fenolni produkti izginejo po 5 minutah reakcije.

Prednosti Fentonove oksidacije so torej hitra razgradnja biološko nerazgradljivega materiala, reagenti so poceni in nestrupeni, proces je eksotermen (dovajanje energije ni potrebno), preprosto vodenje procesa. Slabosti so nastanek velikih količin usedlin železovih kompleksov, ki otežujejo in podražijo čiščenje, poleg tega se nanje lahko adsorbira del BPA; potrebna je velika količina kisline za znižanje pH, ki predstavlja problem zaradi korozije in varnosti; pri temperaturah, nižjih od 18,3 °C, je razgradnja manj učinkovita in počasnejša (Deng in Englehardt, 2006).

Za bolj popolno odstranjevanje bi bila morda smiselna kombinacija Fentonove oksidacije in drugih procesov, kot so npr. biološka razgradnja, drugi napredni oksidacijski procesi in podobno. Tako imata npr. ultrazvočna sonikacija in Fentonova oksidacija podobno učinkovitost (Torres in sod., 2007), le da prva deluje tudi pri nevtralnem pH, zato so že poskušali obe metodi združiti, zraven pa so vključili tudi obsevanje s sončno svetlobo (fotoizvedba Fentonove reakcije), ki k povečani učinkovitosti pripomore s fotoregeneracijo  $\text{Fe}^{2+}$  prek fotoredukcije  $\text{Fe}^{3+}$ , pri čemer nastanejo dodatni hidroksilni radikali (Torres in sod., 2008). Pogosta je tudi kombinacija z obsevanjem z UV-svetlobo (Chen in sod., 2006; Katsumatu in sod., 2004).

Test YES se je izkazal kot primerna metoda za določanje estrogenosti raztopine BPA po Fentonovi oksidaciji, vendar ima vseeno določene pomanjkljivosti. Tako npr. nismo mogli zaznati manjše koncentracije BPA (0,228 mg/l), saj je meja detekcije za BPA približno 1 mg/l. V tem primeru bi bil verjetno boljši drug biološki test, npr. ELRA, ki ima nekoliko večjo občutljivost tako na BPA kot standardni E2. Problem je tudi v tem, da ima BPA precej nižjo afiniteto do hER in je zato njegova potencia v primerjavi z E2 (100 %) bistveno manjša (0,009 %) (Li in sod., 2004). BPA pri koncentraciji nad 3 nM sproži tudi

proliferacijo celic MCF-7 (Shimizu in sod., 2002). Perez in sod. (2002) so pri treh celičnih linijah (celice HeLa s hER $\alpha$  in hER $\beta$ , celice PALM s humanim androgenim receptorjem) dokazali večjo aktivnost receptorjev hER $\alpha$  (EC<sub>50</sub> je 0,2  $\mu$ M) in hER $\beta$  (EC<sub>50</sub> je 0,3  $\mu$ M) pri povišani koncentraciji BPA in zmanjšano aktivnost androgenega receptorja (IC<sub>50</sub> je 7  $\mu$ M) pri povišani koncentraciji BPA.

## 5.2 SKLEPI

- Pri manjši koncentraciji BPA (0,228 mg/l) pri testu YES estrogenske aktivnosti ni bilo, saj je bila že začetna koncentracija BPA pred Fentonovo oksidacijo pod mejo detekcije testa YES.
- Pri manjši koncentraciji BPA (0,228 mg/l) sta se kot najprimernejši razmerji reagentov pri Fentonovi oksidaciji na podlagi analize SPME/GC-MS izkazali razmerji 1 : 10 in 1 : 10 (2), pri katerih je bila razgradnja najhitrejša in je na koncu ostalo najmanj nerazgrajenega BPA.
- Pri večji koncentraciji BPA (22,8 mg/l) se je na podlagi testa YES pokazalo, da se estrogenska aktivnost raztopine z BPA po Fentonovi oksidaciji značilno zmanjša, a je zmanjšanje odvisno od uporabljenega razmerja reagentov pri Fentonovi oksidaciji.
- Pri večji koncentraciji BPA (22,8 mg/l) so se kot najprimernejša razmerja reagentov glede na rezultate testa YES in estrogensko aktivnost izkazala razmerja 1 : 10 (2), 1 : 20 in 1 : 33, a se je tudi pri preostalih razmerjih estrogenska aktivnost v splošnem zmanjšala zaradi razgradnje v procesu Fentonove oksidacije in/ali adsorbcije na usedlino.
- Pri večji koncentraciji BPA (22,8 mg/l) so se kot primerna razmerja reagentov na podlagi analize SPME/GC-MS izkazala vsa razmerja razen 1 : 0,5, saj je bila pri vseh preostalih razgradnja BPA hitra in popolna.
- Pri večji koncentraciji BPA (22,8 mg/l) se je pokazalo, da v procesu Fentonove oksidacije pri nekaterih razmerjih reagentov (1 : 10) zelo verjetno nastanejo

estrogeni stranski produkti, kar smo zaznali z nenavadno povišano estrogensko aktivnostjo nekaterih vzorcev glede na predhodne vzorce.

- Razmerje 1 : 0,5 se je izkazalo kot povsem neprimerno pri obeh koncentracijah (0,228 mg/l in 22,8 mg/l) ter na podlagi obeh analiz: testa YES in SPME/GC-MS, saj razgradnje ni bilo, estrogenska aktivnost pa je bila zmanjšana verjetno zaradi adsorbcije na usedlino železovih kompleksov, ki nastanejo med Fentonovo oksidacijo, in ne oksidacije. Usedline je bilo pri tem razmerju namreč več kot pri drugih razmerjih, kar razloži povečan delež adsorbcije v škodo oksidacije.
- Rezultati SPME/GC-MS pri razmerju 1 : 0,5 za obe koncentraciji ter 1 : 20 in 1 : 33 kot primerjava med obema koncentracijama prav tako kažejo na problem nastajanja usedline železovih kompleksov in posledične adsorbcije BPA nanjo, kar zmanjša učinkovitost Fentonove oksidacije, saj se BPA, namesto da bi se razgradil, le prenese v drugo fazo, torej na usedlino. To pa z okoljskega vidika ni sprejemljivo, saj s tem hormonskega motilca ne odstranimo in problem njegovega odstranjevanja le prenesemo na nov medij.
- Pri nadaljnjih raziskavah bi bilo treba poiskati druge primerne napredne oksidacijske procese za razgradnjo BPA.

Na podlagi naštetih sklepov lahko:

1. potrdimo hipotezo, da s Fentonovo oksidacijo delno oz. popolno zmanjšamo estrogensko aktivnost BPA;
2. potrdimo hipotezo, da sta zmanjšanje estrogenske aktivnosti in razgradnja BPA med procesom Fentonove oksidacije odvisna od reakcijskih razmer.

## 6 POVZETEK

Hormonski motilci so snovi, ki vplivajo na rast, razvoj in razmnoževanje organizma in mu s tem škodijo. Mednje spadajo tako naravni in sintetični hormoni kot snovi, ki oponašajo delovanje hormonov. Eden izmed hormonskih motilcev je BPA, ki se med drugim uporablja pri proizvodnji plastike in zaradi dokazanih negativnih učinkov predstavlja tveganje za zdravje, zato je njegovo odstranjevanje nujno.

Za določanje estrogenske aktivnosti in spojin z estrogenskim delovanjem se uporabljajo tako kemijske metode kot biološki testi. Kemijske metode so natančnejše in omogočajo tako identifikacijo kot kvantifikacijo, medtem ko biološke metode dajo dejanski biološki odziv organizma.

Za odstranjevanje hormonskih motilcev iz vode se uporabljajo različne metode, kot so separacijske metode, adsorbcija ter biološke in kemijske metode. Fentonova oksidacija, ki spada med napredne oksidacijske procese, je metoda, ki v primernih razmerah popolnoma oksidira organsko snov, pri čemer se kot oksidant uporablja  $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$  pa služi kot katalizator in iniciator reakcije.

V nalogi smo preverjali učinkovitost zmanjševanja estrogenske aktivnosti BPA glede na različna razmerja in količine reagentov  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  in  $H_2O_2$  pri Fentonovi oksidaciji (1 : 0,5, 1 : 10, 1 : 10 (2), 1 : 20 in 1 : 33), in sicer za dve začetni koncentraciji BPA (0,228 mg/l in 22,8 mg/l). Najprej smo izvedli postopek Fentonove oksidacije, nato smo vzorce skoncentrirali s postopkom SPE in naredili biološki test YES, s katerim smo s pomočjo gensko spremenjenih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* določili estrogensko aktivnost vzorcev. Razgradnjo BPA smo določili tudi s kemijsko metodo SPME/GC-MS.

Rezultati so pokazali, da estrogenske aktivnosti po Fentonovi oksidaciji pri vzorcih z manjšo začetno koncentracijo BPA (0,228 mg/l) ni, saj je bila že začetna koncentracija BPA pod mejo detekcije. Pri večji začetni koncentraciji BPA (22,8 mg/l) so se rezultati med razmerji precej razlikovali, v splošnem pa smo pri vseh razmerjih zaznali upad estrogenske aktivnosti, le pri nekaterih vzorcih se je pozneje spet pojavila, verjetno zaradi nastanka estrogenih stranskih produktov v Fentonovi oksidaciji.

Analiza SPME/GC-MS je pokazala, da je razgradnja pri vseh razmerjih razen 1 : 0,5, ki se je izkazalo kot povsem neprimerno pri obeh koncentracijah BPA, zelo hitra (večinoma se BPA razgradi že v prvih 10 minutah) in je na koncu ostalo le malo nerazgrajenega BPA, kar velja za razmerja 1 : 10 in 1 : 10 (2) pri obeh koncentracijah ter dodatno 1 : 20 in 1 : 33 pri večji koncentraciji BPA. Zadnji dve razmerji sta bili pri manjši koncentraciji BPA nekoliko manj učinkoviti, kar je posledica večje adsorbcije BPA na usedline železovih kompleksov pri večji koncentraciji BPA.

Na podlagi rezultatov lahko sklenemo, da lahko s Fentonovo oksidacijo razgradimo BPA in se estrogenska aktivnost po Fentonovi oksidaciji zaradi razgradnje BPA večinoma zmanjša, a je učinkovitost razgradnje odvisna od reakcijskih razmer v Fentonovi oksidaciji. Zaradi adsorbcije BPA na usedlino železovih kompleksov in nastanka estrogenih stranskih produktov pri nekaterih razmerjih reaktantov Fentonova oksidacija z vidika varstva okolja ni najprimernejša.

## 7 VIRI

- Alexander H.C., Dill D.C., Smith L.W., Guiney P.D., Dorn P.B. 1988. Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7, 1: 19–26
- Andersen H.L., Andersson A.M., Arnold S.F., Autrup H., Barfoed M., Beresford N.A., Bjeregaard P., Christiansen L.B., Gissel B., Hummel R., Jørgensen E.B., Korsgaard B., Le Guevel R., Leffers H., McLchlan J., Møller A., Nielsen B.J., Olea N., Oles-Kalasko A., Pakdel F., Pedersen K.L., Perez P., Skakkeboek N.E., Sonnenschein C., Soto A.M., Sumpter J.P., Thorpe S.M., Grandjean P. 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107, 1: 89–108
- Arnold S.M., Hickey W.J., Harris R.F. 1995. Degradation of Atrazine by Fenton's Reagent: Condition Optimization and Product Quantification. *Environmental Science & Technology*, 29, 8: 2.083–2.089
- Barceló D. 2003. Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 10: XIV–XVI
- Ben-Jonathan N., Steinmetz R. 1998. Xenoestrogens: The Emerging Story of Bisphenol A. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 9, 3: 124–128
- Brotons J.A., Olea-Serrano M.F., Villalobos M., Pedraza V., Olea N. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental Health Perspectives*, 103, 6: 608–612
- Bulletin 210 – Guide to solid phase extraction. 1998. Bellefonte, USA, Sigma-Aldrich: 11 str.
- Chang H.S., Choo K.H., Lee B., Choi S.J. 2009. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 1: 1–12

- Chemicals purported to be endocrine disrupters: A compilation of published lists. 2005. Insitute for Environment and Health.  
<http://www.cranfield.ac.uk/health/researchareas/environmenthealth/ieh/ieh%20publications/w20.pdf> (19. jul. 2010)
- Chen P.J., Linden K.G., Hinton D.E., Kashiwada S., Rosenfeldt E.J., Kullman S.W. 2006. Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation. *Chemosphere*, 65, 7: 1.094–1.102
- Colborn T., Vom Saal F.S., Soto A.M. 1993. Developmental effects of previous termendocrinext term-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101, 5: 378–384
- Commission Directive 2002/72/EC of 6 August 2002 relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities L 220/18*, 18. 6. 2002.
- Deng Y. 2007. Physical and oxidative removal of organics during Fenton treatment of mature municipal landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 1–2: 334–340
- Deng Y., Englehardt J.D. 2006. Treatment of landfill leachate by the Fenton process. *Water Research*, 40, 20: 3.683–3.694
- Diaz A., Ventura F., Galceran M.T. 2002. Simultaneous Determination of Estrogenic Short Ethoxy Chain Nonylphenols and Their Acidic Metabolites in Water by an In-Sample Derivatization/Solid-Phase Microextraction Method. *Analytical Chemistry*, 74, 15: 3.869–3.876
- Djozan D., Ebrahimi B. 2008. Preparation of new solid phase micro extraction fiber on the basis of atrazine-molecular imprinted polymer: Application for GC and GC/MS screening of triazine herbicides in water, rice and onion. *Analytica Chimica Acta*, 616, 2: 152–159
- Dodds E.C., Lawson W. 1936. Synthetic Œstrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*, 137: 996

Dodge J.A., Glasebrook A.L., Magee D.E., Phillips D.L., Sato M., Short L.L., Bryant H.U. 1996. Environmental estrogens: Effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 2: 155–161

Endocrine Disruptor Screening Program. 1996. U. S. EPA.

<http://www.epa.gov/endo/index.htm> (19. jul. 2010)

Fan Z., Casey F.X.M., Hakk H., Larsen G.L. 2007. Persistence and fate of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone in agricultural soils. *Chemosphere*, 67, 5: 886–895

Food Quality Protection Act. 1996. U. S. EPA.

<http://www.epa.gov/pesticides/regulating/laws/fqpa/> (19. jul. 2010)

Fürhacker M., Scharf S., Weber H. 2000. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, 41, 5: 751–756

Gatidou G., Thomaidis N.S., Stasinakis A.S., Lekkas T.D. 2007. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1.138, 1–2: 32–41

Gözmen B., Oturan M.A., Oturan N., Erbatur O. 2003. Indirect Electrochemical Treatment of Bisphenol A in Water via Electrochemically Generated Fenton's Reagent. *Environmental Science Technology*, 37: 3.716–3.723

Hamblen E.L., Cronin M.T.D., Schultz T.W. 2003. Estrogenicity and acute toxicity of selected anilines using a recombinant yeast assay. *Chemosphere*, 52: 1.173–1.181

Ike M., Chen Y., Jin C.S., Fujita M.M. 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol-A, *Environmental Toxicology*, 17: 457–461

Ioan I., Wilson S., Lundanes E., Neculai A. 2007. Comparison of Fenton and sono-Fenton bisphenol A degradation. *Journal of Hazardous Materials*, 142, 1–2: 559–563



- Johnson A.C., Belford A., Di Corcia A. 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent, *The Science of the Total Environment*, 256: 163–173
- Kang J.H., Kondo F., Katayama Y. 2006. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226, 2–3: 79–89
- Katsumata H., Kawabe S., Kaneco S., Suzuki T., Ohta K. 2004. Degradation of bisphenol A in water by the photo-Fenton reaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 162, 2–3: 297–305
- Kim J.H., Kim S.J., Lee C.H., Kwon H.H. 2009. Removal of Toxic Organic Micropollutants with FeTsPc-Immobilized Amberlite/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Effect of Physicochemical Properties of Toxic Chemicals. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, 3: 1.586–1.592
- Korach K.S., McLachlan J.A. 1995. Techniques for Detection of Estrogenicity. *Environmental Health Perspectives*, 103: 5–8
- Krishnan A.V., Stathis P, Permuth S.F., Tokes L., Feldman D. 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132, 6: 2.279–2.286
- Kuch H.M., Ballschmiter K. 2001. Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC–(NCI)–MS in the Picogram per Liter Range. *Environmental Science Technology*, 35, 15: 3.201–3.206
- Legler J., Zeinstra J.M., Schuitemaker F., Lanser P.H., Bogerd J., Brouwer A., Vethaak A.D., DeVoogt P., Murk A.J., Van der Burg B. 2002. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environmental Science & Technology*, 36, 20: 4.410–4.415

- Li W., Seifert M., Xu Y., Hock B. 2004. Comparative study of estrogenic potencies of estradiol, tamoxifen, bisphenol-A and resveratrol with two in vitro bioassays. *Environment International*, 30, 3: 329–335
- Liu Z., Kanjo Y., Mizutani S. 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of The Total Environment*, 407, 2: 731–748
- Louch D., Motlagh S., Pawliszyn J. 1992. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry*, 64, 10: 1.187–1.199
- Maniero M.G., Bila D.M., Dezotti M. 2008. Degradation and estrogenic activity removal of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by ozonation and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Science of The Total Environment*, 407, 1: 105–115
- McMaster M.C. 2008. *GC/MS: a practical user's guide*. 2nd. ed. New Jersey, USA, John Wiley & Sons, Inc.: 180 str.
- Murk A.J., Legler J., Van Lipzig M.M.H., Meerman J.H.N., Belfroid A.C., Spenkelink A., Van der Burg B., Rijs G.B.J., Vethaak D. 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1: 16–23
- Nagel S.C., Vom Saal F., Thayer K.A., Dhar M.G., Boechler M., Welshons W.V. 1997. Relative Binding Affinity-Serum Modified Access (RBA-SMA) Assay Predicts the Relative In Vivo Bioactivity of the Xenoestrogens Bisphenol A and Octylphenol. *Environmental Health Perspectives*, 105, 1: 70–76
- Neamtu M., Frimmel F.H. 2006. Degradation of endocrine disrupting bisphenol A by 254nm irradiation in different water matrices and effect on yeast cells. *Water Research*, 40, 20: 3.745–3.750

Brglez V. Ugotavljanje učinkovitosti zmanjševanja ... bisfenola A v procesu Fentonove oksidacije. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2010

---

- Neyens E., Baeyens J. 2003. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials*, 98, 1–3: 33–50
- Nishihara T., Nishikawa J.I., Kanayama T., Dakeyama F., Saito K., Imagawa M. Takatori S., Kitagawa Y., Hori S., Utsumi H. 2000. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay, *Journal of Health Science*, 46, 4: 282–298
- Oasis HLB cartridges and 96-well plates – care and use manual. 2008. Milford, USA, Waters: 6 str.
- Olea N., Pulgar R., Perez P., Olea-Serrano F., Rivas A., Novillo-Fertrell A., Pedraza V., Soto A.M., Sonnenschein C. 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives*, 104, 3: 298–305
- Paris F., Balaguer P., Térouanne B., Servant N., Lacoste C., Cravedi J.P., Nicolas J.C., Sultan C. 2002. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit  $\alpha$  and  $\beta$  estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193, 1–2: 43–49
- Perez P., Pulgar R., Olea-Serrano F., Villalobos M., Rivas A., Metzler M., Pedraza V., Olea N. 1998. The Estrogenicity of Bisphenol A-related Diphenylalkanes with Various Substituents at the Central Carbon and the Hydroxy Groups. *Environmental Health Perspectives*, 106, 3: 167–174
- Pevec M. 2010. Adsorpcija bisfenola A med Fentonovo oksidacijo. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 71. str.
- Pluchino N., Luisi M., Lenzi E., Centofanti M., Begliuomini S., Freschi L., Ninni F., Genazzani A.R. 2006. Progesterone and progestins: Effects on brain, allopregnanolone and  $\beta$ -endorphin. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102, 1–5: 205–213
- Rodríguez E.M., Fernández G., Klamerth N., Maldonado I.M., Álvarez P.M., Malato S. 2010. Efficiency of different solar advanced oxidation processes on the oxidation of bisphenol A in water. *Applied Catalysis B: Environmental*, 95, 3–4: 228–237

Brglez V. Ugotavljanje učinkovitosti zmanjševanja ... bisfenola A v procesu Fentonove oksidacije. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2010

---

Routledge E.J., Sumpter J.P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 3: 241–248

Rykowska I., Wasiak W. 2006. Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives. *Acta Chromatographica*, 16: 7–27

Safe Drinking Water Act. 1996. U. S. EPA.

<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-104publ182/pdf/PLAW-104publ182.pdf>  
(19. jul. 2010)

Safe S. 2004. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. *Toxicology*, 205, 1–2: 3–10

Shimizu M., Ohta K., Matsumoto Y., Fukuoka M., Ohno Y., Ozawa S. 2002. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicology in Vitro*, 16, 5: 549–556

Sumpter J.P. 2008. The ecotoxicology of hormonally active micropollutants. *Water Science & Technology*, 57, 1: 125–130

Sumpter J.P., Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspectives*, 103: 173–178

Torres R.A., Abdelmalek F., Combet E., Pétrier C., Pulgarin C. 2007. A comparative study of ultrasonic cavitation and Fenton's reagent for bisphenol A degradation in deionised and natural waters. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 3: 546–551

Torres R.A., Sarantakos G., Combet E., Pétrier C., Pulgarin C. 2008. Sequential helio-photo-Fenton and sonication processes for the treatment of bisphenol A. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 199, 2–3: 197–203

- Vethaak A.D., Lahr J., Schrap S.M., Belfroid A.C., Rijs G.B.J., Gerritsen A., De Boer J., Bulder A.S., Grinwis G.C.M., Kuiper R.V., Legler J., Murk T.A.J., Peijnenburg W., Verhaar H.J.M., De Voogt P. 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of the Netherlands. *Chemosphere*, 59, 4: 511–524
- Walling C. 1975. Fenton's reagent revisited. *Accounts of Chemical Research*, 8, 4: 125–131
- Westerhoff P., Yoon Y., Snyder S., Wert E. 2005. Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes. *Environmental Science & Technology*, 39, 17: 6.649–6.663
- WHO. 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, WHO/PCS/EDC/02.2.  
[http://www.who.int/ipcs/publications/new\\_issues/endocrine\\_disruptors/en/index.html](http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/index.html)  
(19. jul. 2010)
- Yamaguchi A., Awano T., Oryaizu K., Yuasa M. 2006. Surface-Modified Mesoporous Silicas as Recyclable Adsorbents of an Endocrine Disrupter, Bisphenol A. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 6: 1689–1694
- Zhang H., Choi H.J., Huang C.P. 2005. Optimization of Fenton process for the treatment of landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials*, 125, 1–3: 166–174
- Zhou D., Wu F., Deng N., Xiang W. 2004. Photooxidation of bisphenol A (BPA) in water in the presence of ferric and carboxylate salts. *Water Research*, 38, 19: 4.107–4.116

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici dr. Romani Marinšek Logar, somentorici dr. Tatjani Tišler in Mirjani Bistan za vodenje, pomoč in svetovanje pri opravljanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi svoji družini za vso podporo v času študija.