

Analiza bisfenola a u termokromnim tiskarskim bojama, njihovim otiscima na papiru i uzorcima tla tijekom anaerobne razgradnje papira

Vinković, Kristinka

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:260968>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KRISTINKA VINKOVIĆ

**ANALIZA BISFENOLA A U
TERMOKROMNIM TISKARSKIM BOJAMA,
NJIHOVIM OTISCIMA NA PAPIRU I
UZORCIMA TLA TIJEKOM ANAEROBNE
RAZGRADNJE PAPIRA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

KRISTINKA VINKOVIĆ

**ANALYSIS OF BISPHENOL A IN
THERMOCHROMIC PRINTING INKS,
THEIR PRINTS ON PAPER AND SOIL
SAMPLES DURING THE ANAEROBIC
PAPER DEGRADATION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KRISTINKA VINKOVIĆ

**ANALIZA BISFENOLA A U
TERMOKROMNIM TISKARSKIM BOJAMA,
NJIHOVIM OTISCIMA NA PAPIRU I
UZORCIMA TLA TIJEKOM ANAEROBNE
RAZGRADNJE PAPIRA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, 2019.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

KRISTINKA VINKOVIĆ

**ANALYSIS OF BISPHENOL A
IN THERMOCHROMIC PRINTING INKS,
THEIR PRINTS ON PAPER AND SOIL
SAMPLES DURING THE ANAEROBIC
PAPER DEGRADATION**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Nives Galić, Professor

Zagreb, 2019

ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Nives Galić na pruženoj mogućnosti za izadu ove disertacije na Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta te savjetima i podršci u znanstvenom radu.

Prof. dr. sc. Mireli Rožić i dr. sc. Marini Vukoje s Grafičkog fakulteta zahvaljujem na ustupljenim uzorcima termokromnih boja, otiscima termokromnih boja na papiru te provedenom eksperimentu anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiscima u tlu.

Dr. sc. Nikoli Cindru zahvaljujem na velikodušom ustupanju instrumenata i pribora za rad, osobito tijekom analize tla.

Roditeljima i prijateljima zahvaljujem na podršci i razumijevanju.

Sadržaj

SAŽETAK	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD	1
1.1. Svrha i cilj rada.....	5
§ 2. LITERATURNI PREGLED	7
2.1. Termokromne boje.....	9
2.1.1. Termokromne boje na bazi tekućih kristala.....	10
2.1.2. Termokromne leuko-boje.....	10
2.1.3. Primjena termokromnih boja.....	12
2.1.4. Sigurnost uporabe termokromnih boja.....	14
2.2. Bisfenol A.....	16
2.2.1. Svojstva i uporaba bisfenola A.....	16
2.2.2. Toksičnost bisfenola A.....	17
2.2.3. Metode određivanja bisfenola A.....	18
2.3. Benzofenon.....	20
2.3.1. Svojstva i uporaba benzofenona.....	20
2.3.2. Toksičnost benzofenona.....	21
2.3.3. Metode određivanja benzofenona.....	22
2.4. Bisfenol A u papiru.....	23
2.4.1. Transdermalna izloženost bisfenolu A.....	24
2.4.2. Određivanje bisfenola A u papiru.....	26
2.5. Bisfenol A u tlu.....	30
2.5.1. Izvori zagađenja i razgradnja bisfenola A.....	30
2.5.2. Metode analize bisfenola A u tlu.....	33
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	37
3.1. Kemikalije.....	39
3.2. Instrumenti i pribor.....	39
3.3. Programi za upravljanje instrumentima i obradu podataka.....	40
3.4. Uzorci.....	41
3.4.1. Uzorci termokromnih boja.....	41

3.4.2. Uzorci papira s otiskom termokromne boje.....	42
3.4.3. Uzorci tla nakon anaerobne razgradnje papira s otiskom termokromne boje.....	44
3.5. Razvoj metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama.....	45
3.5.1. Priprava standardnih otopina i uzoraka za razvoj metode.....	45
3.5.2. Uvjeti tekućinskokromatografske analize bisfenola A i benzofenona.....	46
3.5.3. Priprava otopina za optimiranje ekstrakcije bisfenola A i benzofenona iz termokromnih boja.....	46
3.6. Validacija metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama.....	48
3.6.1. Priprava uzoraka i standardnih otopina za kalibraciju.....	48
3.6.2. Priprava otopina za određivanje selektivnosti tekućinskokromatografske analize.....	49
3.6.3. Priprava standardnih otopina za određivanje linearnosti odziva UV-detektora.....	49
3.6.4. Priprava otopina za određivanje točnosti metode.....	49
3.6.5. Priprava otopina za određivanje granice detekcije i određivanja.....	50
3.6.6. Analiza termokromnih boja vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa.....	50
3.7. Razvoj metode za određivanje bisfenola A u otiscima termokromne boje na papiru.....	51
3.7.1. Uvjeti tekućinskokromatografske analize BPA ekstrahiranog iz papira s termokromnim otiscima.....	51
3.7.2. Priprava uzoraka za odabir otapala i optimiranje vremena ekstrakcije.....	52
3.7.3. Priprava modelnih otopina znoja.....	52
3.7.4. Priprava uzoraka za ispitivanje ekstrakcije s papira uzimanjem brisa	53
3.7.5. Priprava otopina za ispitivanje ekstrakcije s papira mućkanjem.....	53
3.8. Validacija metode za određivanje bisfenola A u otiscima termokromne boje na papiru.....	53
3.8.1. Priprava uzoraka.....	53

3.8.2. Priprava standardnih otopina za kalibraciju i određivanje linearnosti odziva UV-detektora	54
3.8.3. Priprava otopina za određivanje točnosti metode.....	54
3.8.4. Priprava otopina za određivanje granice detekcije i određivanja.....	55
3.9. Razvoj metode za određivanje bisfenola A u tlu.....	56
3.9.1. Uvjeti tekućinskokromatografske analize BPA ekstrahiranog iz tla.....	56
3.9.2. Priprava uzoraka uz uparavanje pri sniženom tlaku.....	56
3.10. Validacija metode za određivanje bisfenola A u tlu.....	59
3.10.1. Priprava ekstrakta tla.....	59
3.10.2. Priprava standardnih otopina za kalibraciju i određivanje linearnosti odziva UV-detektora.....	60
3.10.3. Priprava ekstrakta modelnih uzoraka tla za određivanje preciznosti metode.....	60
3.10.4. Priprava ekstrakta uzoraka tla za određivanje točnosti metode.....	61
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	63
4.1. Određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama.....	65
4.1.1. Razvoj metode.....	65
4.1.2. Validacija metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama.....	70
4.1.3. Analiza termokromnih boja vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa.....	84
4.1.4. Analiza uzoraka termokromnih boja.....	89
4.2. Određivanje bisfenola A u različitim vrstama papira s termokromnim otiskom.....	91
4.2.1. Razvoj metode.....	91
4.2.2. Validacija metode.....	96
4.2.3. Analiza uzoraka papira s otiscima termokromne boje.....	109
4.3. Određivanje bisfenola A u tlu tijekom anaerobne razgradnje papira.....	115
4.3.1. Razvoj metode.....	115
4.3.2. Validacija metode za određivanje bisfenola A u tlu.....	122
4.3.3. Analiza uzoraka tla nakon anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiskom.....	131
§5. ZAKLJUČAK.....	137

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	141
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	145
§ 8. DODATAK.....	XVII
8.1. Kromatogrami uzoraka termokromnih boja.....	XIX
8.2. UV-spektri karakterističnih kromatografskih krivulja i analiza njihove učestalosti.....	XXIII
8.3. HPLC-ESI-MS kromatogrami uzoraka termokromnih boja.....	XXVI
§ 9. ŽIVOTOPIS.....	XXIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ANALIZA BISFENOLA A U TERMOKROMNIM TISKARSKIM BOJAMA, NJIHOVIM OTISCIMA NA PAPIRU I UZORCIMA TLA TIJEKOM ANAEROBNE RAZGRADNJE PAPIRA

Kristinka Vinković

Zavod za analitičku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a,
10000 Zagreb, Hrvatska

Termokromne boje su materijal čija je uporaba u porastu, a glavne komponente često su im pseudoestrogeni bisfenol A i benzofenon. Za identifikaciju i kvantifikaciju ovih spojeva u termokromnim bojama razvijena je tekućinskokromatografska metoda obrnutih faza s UV-detekcijom. Tri od analiziranih petnaest uzoraka boja sadržavali su bisfenol A s masenim udjelima oko 2 %, a dva uzorka benzofenon s masenim udjelima od 0,34 % i 0,66 %. Termokromna boja koja sadrži bisfenol A i koju je moguće tiskati u laboratorijskim uvjetima otisnuta je na različite vrste papira. Razvijena je tekućinskokromatografska metoda za određivanje bisfenola A u termokromnim otiscima na papiru ekstrakcijom metanolom. Maseni udio bisfenola A u papirima bio je od 0,126 mg g⁻¹ do 0,778 mg g⁻¹. Otisci termokromne boje koja sadrži bisfenol A podvrgnuti su anaerobnoj razgradnji u tlu čime su simulirani uvjeti razgradnje na deponiju otpada. Razvijena je tekućinskokromatografska metoda s UV-detekcijom kojom je određen maseni udio bisfenola A u tlu u vremenu od 14 do 150 dana razgradnje papira i procijenjena brzina njegova raspada. Tijekom anaerobne razgradnje maseni udio bisfenola A u termokromnim papirima smanjio se do vrijednosti bliske granici određivanja metode od 0,0025 mg g⁻¹. Maseni udio bisfenola A u tlu tijekom anaerobne razgradnje se povećavao i nakon 150 dana razgradnje bio je od 3,21 ng g⁻¹ do 35,1 ng g⁻¹.

(156 + XXXII stranice, 57 slika, 66 tablica, 105 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: benzofenon/ bisfenol A/ papir/ tekućinska kromatografija visoke
djelotvornosti/ termokromne tiskarske boje/ tlo/ UV-detekcija

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Rad prihvaćen: 5. prosinac 2018.

Ocjenitelji:

1. dr. sc. Vlasta Drevenkar, nasl. red. prof., PMF, Zagreb
2. izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger, FKIT, Zagreb
3. izv. prof. dr. sc. Ines Primožič, PMF, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

ANALYSIS OF BISPHENOL A IN THERMOCHROMIC PRINTING INKS, THEIR PRINTS ON PAPER AND SOIL SAMPLES DURING THE ANAEROBIC PAPER DEGRADATION

Kristinka Vinković

Division of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Horvatovac 102a,
HR-10000 Zagreb, Croatia

Thermochromic inks, materials increasingly used, may contain pseudo-estrogens bisphenol A and benzophenone as main ingredients. To identify and quantify these compounds, reversed-phase liquid chromatographic method with UV-detection was developed. Three out of 15 analyzed samples contained bisphenol A in mass fractions of about 2 %. Two samples contained benzophenone with mass fractions of 0,34 % and 0,66 %. Thermochromic ink that contains bisphenol A and was applicable in laboratory conditions was printed on various types of papers. Liquid chromatographic method for determination of bisphenol A extracted in methanol was developed. Mass fraction of bisphenol A in papers was from 0,126 mg g⁻¹ to 0,788 mg g⁻¹. Prints of thermochromic ink containing bisphenol A were subjected to anaerobic degradation in soil to simulate the conditions at a landfill site. Reversed-phase liquid chromatographic method with UV-detection was developed to determine mass fraction of bisphenol A in soil at time intervals from 14 to 150 days, and the rate of its degradation was estimated. During the anaerobic degradation, mass fraction of bisphenol A in papers decreased to value close to detection limit of the method of 0,0025 mg g⁻¹. Mass fraction of bisphenol A in soil increased during the anaerobic degradation, and after 150 days ranged from 3,21 ng g⁻¹ to 35,1 ng g⁻¹.

(156 + XXXII pages, 57 figures, 66 tables, 105 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: benzophenone/ bisphenol A/ high performance liquid chromatography/ paper/ soil/ thermochromic printing inks/ UV-detection

Supervisor: Dr. Nives Galić, Professor

Thesis accepted: December 5th 2018

Reviewers: 1. Dr. Vlasta Drevenkar, Adjunct Professor, PMF, Zagreb
2. Dr. Danijela Ašperger, Associate Professor, FKIT, Zagreb
3. Dr. Ines Primožič, Associate Professor, PMF, Zagreb

§ 1. UVOD

Termokromne boje su smjese koje grijanjem ili hlađenjem mijenjaju boju pri tzv. aktivacijskoj temperaturi. Koriste se u različitim vrstama „pametne“ ambalaže, za sigurnosni tisak, u komercijalne svrhe te za različite vrste temperaturnih indikatora. Postoje u dva oblika: kao tekući kristali i leuko-boje.^{1,2} Termokromne leuko-boje sastoje se od tri komponente: bojila, razvijaa i otapala. Bojila su obično elektron-donirajuće molekule kao npr. spirolaktoni, fluorani, spiropirani i fulgidi. Kao razvijaa obično se koriste tipične slabe kiseline kao što su bisfenol A, galati, fenoli, hidroksibenzoati i derivati hidroksikumarina. Alkoholi i esteri preferiraju se kao otapala, a talište otapala određuje aktivacijsku temperaturu.^{2,3}

Reverzibilna promjena boje događa se uslijed kompetitivnih reakcija između boje i razvijaa te razvijaa i otapala. Na nižim temperaturama, kada je otapalo u krutom stanju prevladava obojeni kompleks nosioca boje i razvijaa. Na višoj temperaturi otapalo prelazi u tekuće stanje i otapa razvijaa zbog čega se obojeni kompleks raspada i obezboji.^{2,3}

Bisfenol A komercijalno je najvažniji razvijaa za termokromne boje jer se njime postižu žarke boje i promjene s velikim kontrastom,^{2,4} no istraživanja su pokazala da bisfenol A agonistički djeluje na receptore estrogena te je klasificiran kao ksenobiotik koji ometa hormonsku ravnotežu kod ljudi i životinja.^{5,6} Smatra se da ima estrogeno djelovanje i u vrlo niskim koncentracijama od 1 ng L^{-1} , a najosjetljivije skupine su fetusi, dojenčad i djeca.⁷ Rana izloženost bisfenolu A povezuje se s povećanim rizikom raka prostate i dojke.^{6,8}

Bisfenol A u hranu i okoliš može dospjeti s proizvoda u kojima je u molekulskom obliku te lučenjem s polikarbonata i drugih polimera. Koncentracija bisfenola A do sada je određivana u širokom spektru matrica kao što su plastične bočice za dječju hranu, hrana i napitci u limenkama, gotova jela, alkoholna i bezalkoholna pića, mlijeko, med, polikarbonatna plastika, papir, urin, ljudsko mlijeko, krv, krvni serum, voda za piće.⁹⁻¹⁹ Bisfenol A je u okolišu analiziran u uzorcima riječnih i jezerskih voda, morskoj vodi, otpadnim vodama, sedimentu, kanalizacijskom mulju i tlu.²⁰⁻²³ Za separaciju najčešće je korištena tekućinska kromatografija obrnutih faza s oktadecilsilicijevim dioksidom kao nepokretnom fazom (kolona C₁₈),^{10,14-18,20,21} a najčešća detekcijska tehnika bila je apsorpcija ultraljubičastog zračenja.^{10,13,14,16,20} Sljedeća po zastupljenosti bila je fluorescencijska detekcija koja je u pravilu značajno osjetljivija.^{18,21} Zadnjih godina se za osjetljivo određivanje bisfenola A u složenim matricama najviše koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa.^{11,12,14,17,19,22} Granice detekcije i određivanja ovise o vrsti matrice i načinu pripreme uzorka

no uobičajeno se uz detekciju tandemnom spektrometrijom masa postižu niže vrijednosti nego drugim detekcijskim tehnikama.

Neke termokromne boje suše se pomoću djelovanja UV-zračenja te zbog toga sadrže fotoinicijatore kao što su npr. benzofenon, 4-metilbenzofenon i izopropiltioksanton.²⁴ Istraživanja su pokazala da benzofenon ima slabu estrogenu aktivnost. Povezuje se s povećanim rizikom od raka dojke, estrogenim djelovanjem na reproduktivni sustav, kosti i jetru.²⁵⁻²⁷ Benzofenon je do sada određivan u ambalaži za hranu, kozmetičkim proizvodima, urinu, tkivu posteljice, otpadnim i površinskim vodama te morskoj vodi. U svim navedenim slučajevima separacija je provedena na koloni C₁₈, a detekcijske tehnike bile su apsorpcija UV-zračenja i spektrometrija masa.^{28,30-31}

Proizvođači termokromnih boja objavljuju samo minimalno potrebne podatke o njihovom sastavu. Pregledom literature ustanovljeno je da do sada nije objavljen niti jedan rad o analizi toksičnih komponenti u termokromnim bojama kao što su npr. bisfenol A, benzofenon i njihovi derivati. Također, nisu pronađeni podaci o istraživanju mogućeg prijenosa bisfenola A s tiskane površine termokromne boje u hranu ili na kožu ljudi kao niti o razgradnji toksičnih komponenti termokromnih boja u okolišu. Ekstrakcija bisfenola A s papira istraživana je u termalnom papiru za printanje, indigo papiru, novčanicama i drugim vrstama papira. Primijenjene separacijske i detekcijske tehnike bile su plinska kromatografija s plameno-ionizacijskom detekcijom i spektrometrijom masa te tekućinska kromatografija s UV-detekcijom, fluorescencijskom detekcijom i tandemnom spektrometrijom masa.³²⁻³⁶ U literaturi nisu pronađeni podaci o istraživanju ekstrakcije bisfenola A s otisaka termokromnih boja na papiru.

Bisfenol A je u tlu do sada određivan u vrlo malom broju radova u odnosu na ukupan broj objavljenih radova. Primijenjene separacijske i detekcijske tehnike bile su plinska kromatografija spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa te tekućinska kromatografija uz UV ili fluorescencijsku detekciju ili spregnuta sa spektrometrijom masa.³⁷⁻⁴⁰ U literaturi nisu pronađeni podaci o analizi ostataka bisfenola A u tlu tijekom razgradnje papira s otiskom termokromne boje.

1.1. Svrha i cilj rada

Svrha ovog rada bila je razviti selektivnu tekućinskokromatografsku metodu za određivanje bisfenola A u termokromnim tiskarskim bojama kako bi se mogle identificirati boje koje ga sadrže. Primjena metode dodatno je proširena i na određivanje benzofenona koji je pronađen u nekim uzorcima. Sljedeći korak bio je razviti osjetljivu i selektivnu tekućinskokromatografsku metodu za određivanje bisfenola A u papiru s otiskom termokromne boje koja sadrži bisfenol A te u modelnim otopinama ljudskog znoja nakon ekstrakcije s papira. Cilj je bio odrediti maksimalnu količinu bisfenola A u raznim vrstama papira s termokromnim otiscima te istražiti mogućnost prijenosa ovog spoja s papira na kožu ljudi. Zadnji dio istraživanja bio je razviti osjetljivu i selektivnu tekućinskokromatografsku metodu za određivanje bisfenola A u tlu tijekom anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiscima kako bi se procijenilo zaostajanje bisfenola A u tlu u anaerobnim uvjetima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Termokromne boje

Tinte za printanje koje mijenjaju boju pod određenim uvjetima nazivaju se kromogene tinte. Promjenu boje mogu uzrokovati različiti vanjski utjecaji kao što su temperatura (termokromne boje), tlak (piezokromne boje), biokemijske reakcije (biokromne boje), svjetlo (fotokromne boje), električno polje (elektrokromne boje) ili pH-vrijednost (halokromne boje). Od navedenih najširu primjenu imaju termokromne boje.^{1,2}

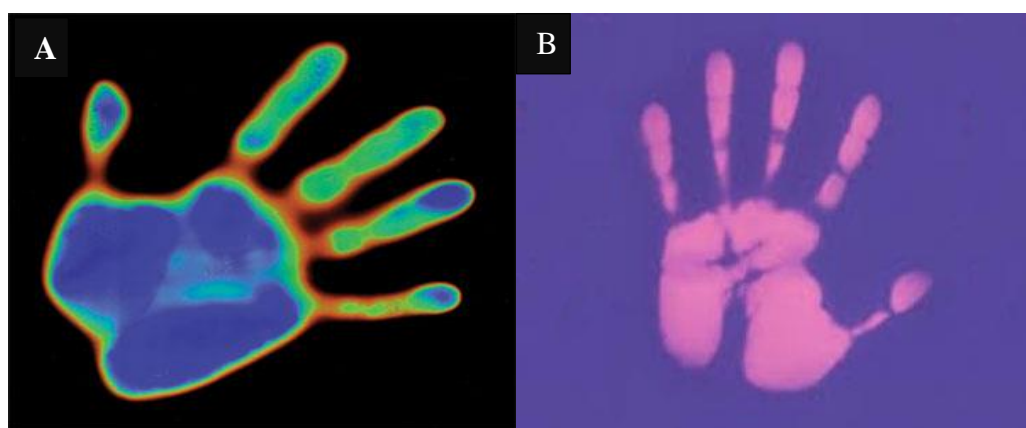
Termokromne boje su bojila (smjese) koje grijanjem ili hlađenjem pri određenoj temperaturi mijenjaju boju. Promjena može biti iz obojenog u bezbojno stanje ili iz jedne boje u drugu. Također, promjena boje može biti reverzibilna i ireverzibilna. Temperatura pri kojoj se događa promjena boje zove se aktivacijska temperatura i adekvatnim odabirom komponenti boje može se podesiti na točno određeno temperaturno područje. Termokromne boje postoje u dva oblika: kao tekući kristali i leuko-boje.^{2,41} U Tablici 2.1 navedeni su primjeri aktivacijskih temperatura i primjene termokromnih boja proizvođača *Sun Chemical*.⁴¹

Tablica 2.1. Primjeri aktivacijskih temperatura i primjene termokromnih boja

Komercijalna oznaka	Aktivacijska temperatura / °C	Primjena
<i>Arctic</i>	-18	Duboko smrzavanje
<i>Freeze</i>	-10	Smrzavanje
<i>Ice</i>	0	Ledište
<i>Cold</i>	10	Hladna pića
<i>Cellar</i>	15	Bijelo vino
<i>Room</i>	20	Crveno vino
<i>Touch</i>	28	Kontakt s kožom
<i>Warm</i>	40	Topli napitci
<i>Hot</i>	60	Voskovi za depiliranje

2.1.1. Termokromne boje na bazi tekućih kristala

Za razliku od većine obojenih supstancija koje apsorbiraju dio spektra, termokromne boje na bazi tekućih kristala reflektiraju upadnu svjetlost u prilično uskom spektralnom području. To je posljedica selektivne refleksije svjetla na kiralnim centrima u molekuli koji mijenjaju konformaciju ovisno o temperaturi. Reflektirano svjetlo daje monokromatsku prelijevajuću boju sličnu dugi koja se s temperaturom kontinuirano mijenja od crvenog do plavog dijela spektra. Ovaj efekt poznat je kao „igra boja“ (Slika 2.1).¹ Prednost termokromnog efekta tekućih kristala je da se događa u prilično uskom temperaturnom području, od oko 3 do 5 °C. Zbog toga su tekući kristali puno osjetljiviji nego leuko-boje koje pokazuju određenu histerezu tijekom uporabe. Nedostatak efekta je slaba vidljivost što se može poboljšati nanošenjem na crnu površinu.¹



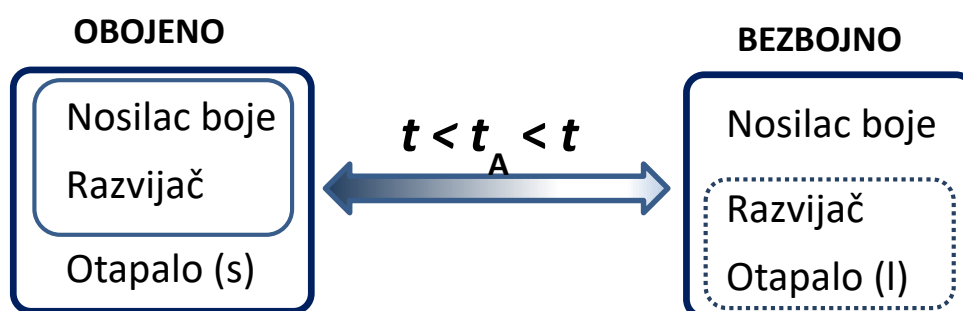
Slika 2.1. Termokromna boja na bazi tekućih kristala (A) i termokromne leuko-boje (B). Preuzeto s: www.hwsands.com/category/110.aspx

2.1.2. Termokromne leuko-boje

Termokromne leuko-boje sastoje se od tri komponente: bojila osjetljivog na promjenu pH-vrijednosti, proton-donora koji ima ulogu razvijaa i hidrofobnog, nehlapljivog otapala. Nosioci boje obično su elektron-donirajuće leuko-boje kao npr. spiro-laktoni, fluorani, spiropirani i fulgidi. S promjenom boje tih spojeva mijenja se i pH-vrijednost te se može reći da je efekt i halokroman. Često je korištena kombinacija kristalno-ljubičastog laktone (engl. *crystal violet lactone*) i timolftaleina. Kao razvijaači obično se koriste tipične slabe kiseline kao

što su bisfenol A, galati, fenoli, hidroksibenzoati i derivati hidroksikumarina. Alkoholi i esteri se preferiraju kao razvijajući, no mogu se koristiti i druga polarna otapala. Talište otapala određuje temperaturu na kojoj se mijenja boja.^{2,3}

Reverzibilna promjena boje događa se uslijed dviju kompetitivnih reakcija: između boje i razvijajuća te između razvijajuća i otapala. Prva prevladava na temperaturama nižim od aktivacijske temperature (t_A) kada je otapalo u krutom stanju te nastaje obojeni kompleks nosioca boje i razvijajuća. Na temperaturi višoj od t_A otapalo prelazi u tekuće stanje i u njemu se otapa razvijajući zbog čega se obojeni kompleks raspada i obezboji (Slika 2.2).^{2,3}



Slika 2.2. Shematski prikaz djelovanja termokromnih boja

Otapalo je obično hidrofobna supstancija s dugim ugljikovodičnim lancem. Po kemijskom sastavu to je najčešće masna kiselina, amid ili alkohol. Zbog relativno niskog tališta otapalo ima ulogu medija u kojemu nosilac boje i razvijajući reagiraju. Ako je smjesa dobro formulirana, trenutna promjena boje iz obojenog u bezbojno događa se pri grijanju smjese iznad tališta otapala. Originalna boja vraća se nakon hlađenja ispod temperature taljenja. Promjena omjera komponenti kao i uporaba različitih otapala pokazale su uvijek isti efekt: promjenu boje određenu talištem otapala.⁴

Tipične formulacije termokromnih boja sadrže kiseli razvijajući i bojilo na bazi spiroolaktona, spirooksozina i spiropirana. Promjena boje, odnosno obojenje događa se kad se prstenasta forma, koja je bezbojna, otvori te nastane obojenje. Kod nekih molekula kao što su *bis*-spiropirani prsten se može otvoriti na dva mjesta pri različitim temperaturama pa nastaju dvije različite boje. Otvaranje prstena može se postići adicijom protona ili povećanjem polarnosti ili afiniteta prema vezanju protona u okolini. Reakcija je potpuno reverzibilna.^{2,4}

Fazna promjena ima glavnu ulogu u mehanizmu termokromizma. U rastaljenom stanju nema obojenja jer su nosilac boje i razvijajući otopljeni u otapalu. Okoliš kromogene

supstancije je relativno nepolaran što podupire laktonizaciju te je ravnoteža na strani bezbojne spirolaktonske strukture sa zatvorenim prstenom. Hlađenjem se smanjuje topljivost nosioca boje i razvijaača te se na kraju ove komponente odjeljuju od monodisperznog sustava prijelazom u kruto stanje. U ovoj fazi nosilac boje je u polarnijem okruženju i kontaktu s razvijaačem što rezultira otvaranjem prstena i nastankom obojenja. Ponovnim grijanjem kruta i tekuća faza se spajaju i nosilac boje se vraća u bezbojnu spirolaktonsku formu.^{2,4}

Razvijaač mora biti dovoljno topljiv u primijenjenom otapalu da se potpuno otopi, ali slabo topljiv u hladnom kompozitu da fazno razdjeljenje bude maksimalno. Također, mora biti i odgovarajuće bazičnosti. Bojilo mora biti kompatibilno s razvijaačem jer će se inače kompleks tih dvaju spojeva raspasti nakon skrućivanja smjese i time uzrokovati gubitak boje.⁴

2.1.3. Primjena termokromnih boja

Jedna od prvih komercijalnih primjena ireverzibilnih termokromnih boja bila je u papirima za telefaks, a termalni papir za printanje i dalje je najzastupljeniji proizvod u kojemu se primjenjuju. Prva uporaba reverzibilnih leuko-boja bila je u tzv. „prstenima raspoloženja“ koji su mijenjali boju ovisno o tjelesnoj temperaturi.^{4,41} U početku su termokromne boje korištene prvenstveno za bojanje plastike i tekstila, dok se danas primjenjuju na svim vrstama površina različitim načinima tiska.^{41,42}

Tekući kristali upotrebljavaju se u proizvodnji termometara, a leuko-boje u raznim vrstama „pametne“ ambalaže (indikatori svježine i temperature proizvoda), za sigurnosni tisak (čekovi, ulaznice, recepti za lijekove, potvrda identiteta proizvođača), u komercijalne svrhe (promotivni materijali, dekorativne svrhe, dizajnerska rješenja) te za različite vrste temperaturnih indikatora (Slika 2.3).^{1,41}

Područje primjene ovih boja znatno je prošireno primjenom mikroinkapsulacije kako bi se sustav zaštitio od neželjenih utjecaja okoliša. Svaka kapsula ili tzv. pigment leuko-boje sadrži sve komponente potrebne za promjenu boje. Termokromna tinta mješavina je termokromnih pigmenata i veziva. Veličina mikrokapsula je od 2 μm do 10 μm za leuko-boje te od 10 μm do 15 μm za tekuće kristale što je oko 10 puta veće od standardnih pigmenata, pa je sloj boje deblji i grublji. Mikrokapsule moraju biti otporne na postupke koji se provode tijekom miješanja i aplikacije. Česta je uporaba melaminformaldehida za proizvodnju tvrdih,

termostabilnih granula, netopljivih u većini otapala, ali propusnih. Ako se mikroinkapsulacija uništi, gube se termokromna svojstva.^{3,41,42}

Općenito, kaže se da se termokromna tinta sastoji od pigmenta (mikrokapsula) i nosioca koji prenosi i veže pigment na supstrat. Nosilac može sadržavati smolu, vosak, lak ili neki drugi polimer, reducense, poliglikolna otapala, površinski aktivne tvari, ugušćivače, higroskopne tvari, UV-inhibitore, manganove i kromove spojeve. Tvari koje mogu narušiti termokromni efekt, odnosno inkapsulaciju, su alkoholi (dioli), aldehidi, ketoni, amino-smole, kiseline, amonijak, aromati te općenito otopine pH-vrijednosti niže od 6 i više od 8.⁴²



Slika 2.3. Primjeri primjene termokromnih leuko-boja*

Obzirom na matricu i način sušenja, na tržištu postoje tri vrste termokromnih boja: na bazi otapala, na bazi vode i UV-sušeće boje. UV-sušeće boje osim već navedenih komponenti sadrže prepolimere, monomere i fotoinicijatore. Boje se suše djelovanjem UV-zračenja pri čemu tekući monomeri i prepolimeri potaknuti djelovanjem fotoinicijatora prave kruti polimerni film. Molekule koje proizvođači koriste kao fotoinicijatore, zbog zaštite patenata obično se navode pod šiframa, međutim poznato je da se mogu koristiti benzofenon, 4-metilbenzofenon i izopropiltioksanton.^{24,43}

*Preuzeto s: www.hunedrangwala.com/screen-printing-inks.html
inkwithfeelings.wordpress.com/2012/10/06/thermochromic-inks-what-they-are-how-they-are-and-why-they-are-way-cool/
<http://v-doc.co/nano-sandbox/upgrade/jupgrade/authentication-products/security-printing-consumables/security-printing-inks#thermochromic>

Obzirom na vrstu tiska postoje boje za sitotisak, ofsetni tisak, fleksotisak i duboki tisak. Reverzibilne termokromne boje mogu se tiskati na najviše načina (fleksotiskom, sitotiskom i ofsetnim tiskom), dok se ireverzibilne termokromne leuko-boje mogu nanositi samo sitotiskom. Boje na bazi tekućih kristala mogu se tiskati sitotiskom i dubokim tiskom.⁴¹

Trajnost (sirovih) termokromnih boja je od 3 do 6 mjeseci, no nakon tiska mogu trajati godinama. Otiske mogu oštetiti agresivna otapala, temperature iznad 120 °C te izloženost UV-zračenju što je glavni razlog zašto se ne koriste na oglasnim panoima i kao boje za automobile.⁴¹ Kako bi se poboljšala otpornost termokromnih boja na UV-zračenje istraženi su su razni tipovi stabilizatora. Spojevi za komercijalnu uporabu koji sadrže apsorbirajuće skupine podijeljeni su prema literaturnim podacima ili u četiri skupine: derivati cimetne kiseline, esteri fenola, hidroksifenilbenzotriazoli i 2-hidroksifenoni,⁴⁴ ili u tri skupine: benzotriazoli, benzofenoni i cijanoakrilati.⁴⁵ Derivati benzofenona štite boju od UV-zračenja apsorpcijom i pretvorbom u toplinsku energiju, koja se troši na brzu tautomerizaciju vodikovog atoma s hidroksilne na keto-skupinu.⁴⁴

2.1.4. Sigurnost uporabe termokromnih boja

Informacije o sigurnosti uporabe termokromnih tinti u prehrambenoj industriji vrlo su ograničene. Za dobivanje odobrenja za korištenje Europskoj agenciji za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Agency*, EFSA) potrebno je dostaviti dokumentaciju o komponentama boje te se zatim testira njihova migracija prema propisanim kriterijima.⁴¹

Proizvođač *Sun Chemical* navodi mogućnost migracije toksičnih spojeva iz termokromnih tinti te da zato treba izbjegavati izravan kontakt s hranom. Treba ih nanositi na staklo ili metal, a upitna je primjena na plastici. Proizvođač *CTI (Chromatic Technologies, Inc.)* također tvrdi da ne smije biti izravnog kontakta termokromnih tinti s hranom te da mora postojati „barijera“ kao što su metal ili staklo. Papir i plastika smatraju se nedovoljnima da spriječe migraciju. Proizvođač *LCR Hallcrest* tvrdi da testiraju materijal koji će se moći primjenjivati i u izravnom kontaktu s prehrambenim proizvodima bez barijere. Ipak, odgovornost za sukladnost sa člankom 3 uredbe EC No 1934/2004 je na proizvođaču ambalaže, a ne boje.⁴¹

Europska udruga za tiskarske tinte (engl. *European Printing Ink Association*, EuPIA) tvrdi da se i tinte koje još nisu odobrene za primjenu na ambalaži i u direktnom kontaktu s hranom, mogu koristiti ako se dokaže da je migracija toksičnih komponenti niža od dozvoljene. Prema njihovim smjernicama, procjenjuje se migracija spojeva molekulske mase manje od 1000 Da. Ako je migracija manja od 10 ppb tvar se može upotrebljavati. Ako je migracija veća od 10 ppb, a manja od 50 ppb treba procijeniti njenu genotoksičnost te se može upotrebljavati samo ako nije genotoksična.^{41,45,46}

Proizvođači pakiranja trebaju testirati proizvode kako bi dokazali da su termokromne boje pogodne za uporabu u kontaktu s prehrambenim proizvodima. Europska komisija održava bazu podataka s tvarima koje mogu biti korištene u kontaktu s hranom.⁴⁷

Većina termokromnih boja sadržava barem jednu tvar nužnu za postizanje termokromnog efekta koja je toksična ili kancerogena kao što su: soli teških metala, leuko-boje koje mogu sadržavati bisfenol A, derivati diazapentalena, politiofeni ili polidiacetileni. To je najveća prepreka za uporabu termokromnih boja u medicini i prehrambenoj industriji.⁴⁸

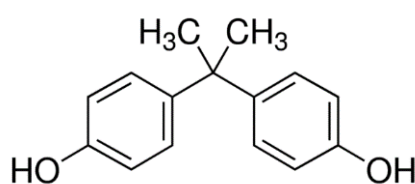
Dosad su objavljeni podaci samo o jednom netoksičnom i nekancerogenom termokromnom kompozitu.⁴⁸ Sintetiziran je kao polimer mliječne kiseline u kombinaciji s prirodnom bojom cijanidin-kloridom i aditivima dodecil-galatom i heksadekanskom kiselinom. Mogućnost primjene ovakvog kompozita vrlo je ograničena zbog slabo vidljive promjene boje iz vinski crvene u ljubičastu.

Proizvođači termokromnih boja objavljuju minimalne podatke o sastavu termokromnih boja, vjerojatno zbog patentne zaštite. Pregledom dostupne literature ustanovljeno je da do sada nije objavljen niti jedan rad o analizi toksičnih komponenti u termokromnim bojama kao što su npr. bisfenol A, benzofenon i njihovi derivati. Fotoinicijatori 2-izopropiltioksanton (ITX), benzofenon i 4-metilbenzofenon pronađeni su do sada u mlijeku u prahu i žitaricama te je ustanovljeno da se radilo o njihovoj migraciji iz boja koje su nakon toga zabranjene za uporabu u prehrambenoj industriji.⁴⁹ Nisu pronađeni podaci o ispitivanju migracije bisfenola A s tiskane površine termokromne boje u hranu ili na kožu kao niti razgradnji toksičnih komponenti termokromnih boja u okolišu.

2.2. Bisfenol A

2.2.1. Svojstva i uporaba bisfenola A

Bisfenol A (2,2'-bis(4-hidroksifenil)propan ili 4,4'-izopropildendifenol, BPA) prvi je put sintetiziran 1905. godine. Molekulska formula mu je $C_{15}H_{16}O_2$ ($M_r = 228,29 \text{ g mol}^{-1}$), a strukturna je prikazana na Slici 2.4. Slabo je topljiv u vodi (oko 300 mg L^{-1} na sobnoj temperaturi), a dobro u organskim otapalima. Vrijednost konstante disocijacije (pK_a) mu je od 9,9 do 10,2.⁵⁰



Slika 2.4. Strukturna formula bisfenola A

Bisfenol A komercijalno je najvažniji razvijatelj za termokromne boje jer daje žarke boje i promjene s velikim kontrastom.^{2,51} Osim u termokromnim bojama bisfenol A se u molekularnom obliku koristi i u drugim tintama te kao antioksidans u ljepilima i plasticima. Bisfenol A se kao sirovina koristi za proizvodnju polikarbonatne plastike, epoksi smola, nezasićenih poliesteri i polisulfona.⁷ Trenutni prihvatljivi dnevni unos (*engl. Tolerable Daily Intake, TDI*) mu je $0,05 \mu\text{g}$ po kilogramu tjelesne težine, no vode se rasprave i o štetnosti nižih doza.^{52,53} Polimeri na bazi bisfenola A koriste se za proizvodnju plastičnih posuda, uključujući i bočice za dječju hranu, medicinski pribor za dijalizu i oksigenaciju krvi, za prevlačenje unutarnjeg sloja limenki za prehrambene proizvode te za plombe u stomatologiji. Globalna proizvodnja bisfenola A je nekoliko milijuna tona godišnje, a najviše se proizvodi u SAD-u.^{7,54} Zbog široke uporabe bisfenol A je sveprisutan onečišćivač okoliša. U riječnim vodama pronađen je u koncentracijama od 1 ng L^{-1} do 628 ng L^{-1} , u sedimentu od $3,94 \text{ ng g}^{-1}$ do $2,2 \times 10^6 \text{ ng g}^{-1}$ suhe mase, u postrojenjima za obradu otpadnih voda od 10 ng L^{-1} do 80 ng L^{-1} te u kanalizacijskom mulju od $0,42 \text{ ng g}^{-1}$ do $25,6 \mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase. Utvrđeno je da ispusti iz postrojenja za obradu otpadnih voda povećavaju koncentraciju BPA u riječnim vodama za faktor 3,8.⁵⁴

2.2.2. Toksičnost bisfenola A

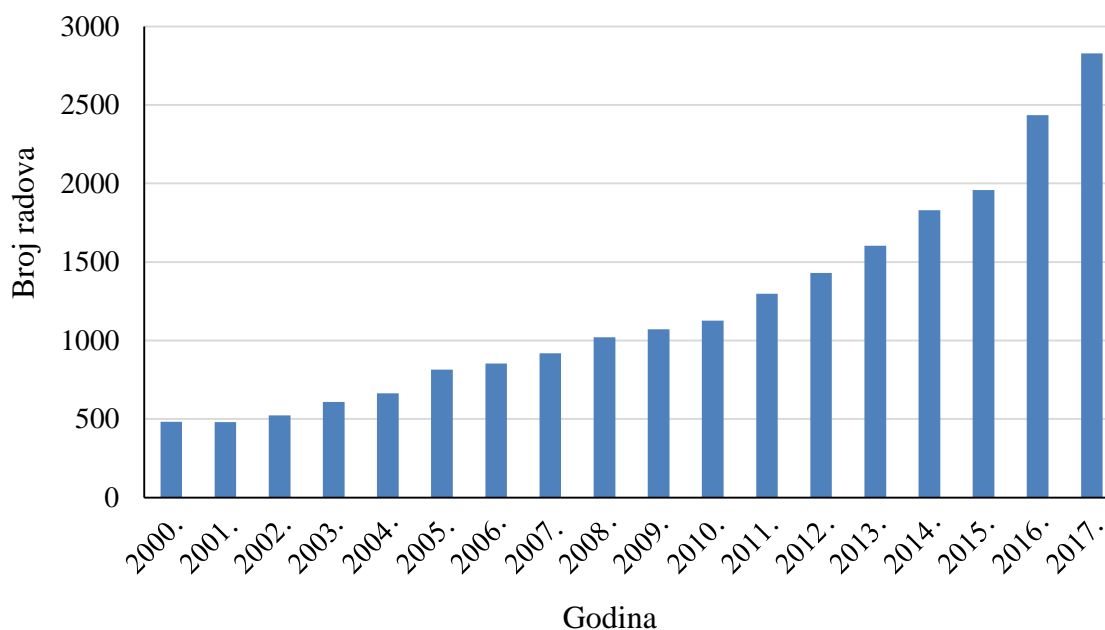
Estrogeno djelovanje bisfenola A otkriveno je još 1936. godine⁵⁵ no njegovo štetno djelovanje kao endokrino aktivne tvari primijećeno je mnogo kasnije. Godine 1996. Europska komisija proglasila je bisfenol A štetnim za ljudsko zdravlje.⁷

Nedavne studije pokazale su da postoji nekoliko mehanizama toksičnosti bisfenola A te da njegovi toksični učinci mogu biti jednaki učincima 17- β -estradiola.⁵⁶ Zbog djelovanja kao endokrino aktivna tvar koja je karcinogena, mutagena i reproduktivno toksična, francuska agencija REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) predlaže da se bisfenol A klasificira kao supstancija vrlo visokog rizika (engl. *substance of very high concern*, SVHC). Istraživanja su pokazala da bisfenol A ima agonističko djelovanje na receptore estrogena te je klasificiran kao ksenobiotik koji ometa hormonsku ravnotežu kod ljudi i životinja.^{5,6} Smatra se da ima estrogeno djelovanje i u vrlo niskim koncentracijama od 1 ng L⁻¹, a najosjetljivije skupine su fetusi, dojenčad i djeca.⁷ Rana izloženost bisfenolu A povezuje se s povećanim rizikom raka prostate i dojke.^{6,8} Studije na životinjama pokazale su da bisfenol A utječe na promjene u prostati i urinarnom traktu,⁵⁷ na razvoj mozga⁵⁸ te na metabolizam masti što povećava rizik od dijabetesa i pretilosti.⁵⁹ Niske doze bisfenola A kod životinja ubrzale su početak puberteta u ženki, narušile kvalitetu sperme, povezane su s pretilošću i razinama reproduktivnih hormona. Novija istraživanja pokazuju da izloženost bisfenolu A može povećati rizik kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa i kod ljudi.⁶⁰

Bisfenol A u hranu i okoliš može dospjeti s proizvoda u kojima je u molekulskom obliku te lučenjem s polikarbonata i drugih polimera kroz dva procesa: difuzijom ostatnog bisfenola A u polikarbonatu nakon procesa proizvodnje i hidrolizom polimera koja se može katalizirati hidroksidom.⁶¹ Zbog toksičnosti zabrinjavajuća je sveprisutnost bisfenola A u okolišu. U Europskoj uniji je od 2011. zabranjena njegova uporaba u proizvodnji dječjih bočica. Neke zemlje EU, kao što su Belgija, Švedska, Danska i Francuska proširile su zabranu korištenja na materijale koji dolaze u kontakt s hranom. Francuska je zabranila uporabu bisfenola A u svim materijalima za pakiranje hrane. Zbog estrogene aktivnosti regulatorne agencije prate korištenje bisfenola A, pa su proizvođači počeli uvoditi strukturne analoge o čijim toksičnim učincima se malo zna. Odnedavno se osim unosa hranom i pićem istražuju i drugi putevi ljudske izloženosti bisfenolu A kao što je npr. unos preko kože.⁶¹

2.2.3. Metode određivanja bisfenola A

Broj objavljenih radova koji uključuju bisfenol A zadnjih je godina u porastu. Na Slici 2.5 prikazan je broj radova po godinama od 2000. prema bazi podataka *Science Direct*.



Slika 2.5. Broj radova u kojima se proučava bisfenol A po godinama od 2000. do 2018. prema bazi podataka *Science Direct*

Koncentracija bisfenola A do sada je određivana u širokom spektru matrica kao što su plastične bočice za dječju hranu, hrana i napitci u limenkama, gotova jela, alkoholna i bezalkoholna pića, mlijeko, med, polikarbonatna plastika, papir za printanje, gel za tuširanje, urin, ljudsko mlijeko, krv, krvni serum, kanalizacijski mulj, morska i riječna voda, voda za piće te tlo.⁹⁻²³

Obzirom na strukturu i konstantu disocijacije, bisfenol A se u različitim matricama najčešće određuje tekućinskom kromatografijom obrnutih faza s nepokretnom fazom C₁₈.^{10-21,62-65}

Kao pokretna faza uglavnom se koriste smjese acetonitrila i vode te metanola i vode koje imaju sličnu selektivnost, a pH-vrijednost im je nešto ispod 7, što je znatno niže od pK_a vrijednosti bisfenola A. U nekim slučajevima pH-vrijednost eluensa podešena je puferom na niže vrijednosti, npr. 3^{14,15} ili 5,5.¹⁸ Najčešća detekcijska tehnika je apsorpcija ultraljubičastog zračenja pri nekoliko različitih valnih duljina: 224 nm, 226 nm, 275 nm i

280 nm što je u skladu s dva apsorpcijska maksimuma bisfenola A na oko 226 nm i 275 nm.^{13,16,20,34} U nekim je slučajevima korišten UV-detektor s nizom fotodioda i sniman cijeli apsorpcijski spektar.^{10,14} Pri određivanju bisfenola A u vrućoj vodi u polikarbonatnim bocama primijenjena je derivatizacija klenbuterolom i detekcija pri 410 nm što je povećalo granicu detekcije za 2,5 puta u odnosu na UV-detekciju bez derivatizacije.⁶⁵

Sljedeća po zastupljenosti je fluorescencijska detekcija koja je obično znatno osjetljivija. Primjeri kombinacija valnih duljina ekscitacije i emisije su 350 nm i 475 nm,¹⁸ 275 nm i 300 nm²¹ te 235 nm i 317 nm.⁶⁴

Za vrlo osjetljivo i specifično određivanje korišten je i elektrokemijski detektor¹⁵ te multielektrodni elektrokemijski detektor kojim su postignute vrlo niske granice detekcije za izravno određivanje bisfenola A u vodi (0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$) i krvnom serumu (0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$).⁶³

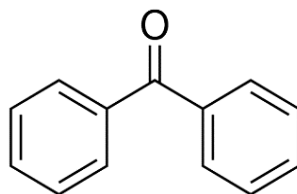
Zadnjih godina se za vrlo osjetljivo određivanje bisfenola A u složenim matricama najviše koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa.^{11,12,14,17,19,22,62,66,67} Za poboljšanje osjetljivosti i selektivnosti koriste se različiti načini pripreme uzoraka kao što su ekstrakcija na čvrstoj fazi^{11,14,17,66} i tlačna ekstrakcija otapalom.²² U nekim slučajevima bisfenol A je derivatiziran s piridin-3-sulfonil-kloridom što omogućava veću osjetljivost pri određivanju uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem.^{11,12} Kao nepokrenta faza najčešće su korištene kolone C₈ i C₁₈.^{14,22,66,67} U nekim slučajevima korištene su kolone s polarnijom nepokretnom fazom pentafluorfenil-propilom,^{11,12} fenil-heksilna kolona^{19,62} te hibridna etil-amidna kolona.¹⁷ Kao pokretna faza korištene su smjese acetonitrila i vode te metanola i vode uz dodatak reagensa za poboljšanje ionizacije. Ovisno o načinu ionizacije korišten je amonijev formijat,^{14,17} mravlja kiselina,^{11,12} amonijev acetat^{17,19,66} i amonijak.^{22,67} Bisfenol A je obzirom na strukturu najčešće određivan uz negativnu ionizaciju^{14,17,19,22,62,66,67} osim u slučajevima kad je derivatiziran piridin-3-sulfonil-kloridom.^{11,12} U slučaju negativne ionizacije karakteristični fragmenti tj. molekulski prijelazi koji su korišteni za kvantifikaciju i potvrdu identiteta bili su m/z 227 \Rightarrow m/z 211 i m/z 227 \Rightarrow m/z 133.^{19,22,62,66,67} U nekim slučajevima za kvantifikaciju su korišteni izotopno označeni standardi d₈-BPA, d₁₆-BPA i ¹³C₁₂-BPA čime se eliminira utjecaj matrice, ali povećava cijena analize.^{11,12,19,22} Granice određivanja i detekcije ovise o vrsti matrice i načinu pripreme uzoraka, no uobičajeno se tandemnom spektrometrijom masa postižu niže vrijednosti nego detekcijom BPA apsorpcijom ultraljubičastog zračenja.

Pregledom dostupne literature utvrđeno je da nema objavljenih radova o analizi bisfenola A u termokromnim bojama niti drugim vrstama boja kao niti u uzorcima sa sličnom matricom visoke viskoznosti i visokim koncentracijama ugljikovodika. Ekstrakcija bisfenola A s papira istraživana je do sada u najvećem broju radova u termalnom papiru za tiskanje,^{16,32-35} te u brojnim drugim papirnatim predmetima (karte, novčanice, ubrusi),³⁶ ali nisu pronađeni radovi o određivanju BPA u papirima s otiscima termokromne boje i mogućnosti njegova transdermalnog prijenosa. U do sada objavljenim metodama za određivanje bisfenola A u okolišu analizirani su uzorci riječnih, morskih i otpadnih voda, sedimenta, kanalizacijskog mulja i tla.²⁰⁻²³ Od svih navedenih matrica, najmanje je objavljenih radova o analizi bisfenola A u tlu, svega šest do 2015. godine, te postoji potreba za daljnjim istraživanjem razgradnje bisfenola A u tlu.

2.3. Benzofenon

2.3.1. Svojstva i uporaba benzofenona

Benzofenon (difetil-keton, difetil-metanon, BFN) bijela je kristalinična supstancija molekulske formule $C_{13}H_{10}O$ ($M_r = 182,22$). Strukturna formula prikazana je na Slici 2.6.



Slika 2.6. Strukturna formula benzofenona

Topljivost u vodi mu je 137 mg L^{-1} pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ što je manje od topljivosti bisfenola A. Benzofenon je odlično topljiv u acetonu, octenoj kiselini, ugljikovu disulfidu te dobro topljiv u benzenu i metanolu.⁶⁸ Kisik na benzofenonu protonira se tek pri pH-vrijednosti nižoj od 3 te je stoga za njegovo određivanje pogodna tekućinska kromatografija obrnutih faza jer je BFN neutralna molekula pri za tu tehniku uobičajenim pH-vrijednostima pokretne faze od 3 do 9.

Benzofenon je kemikalija koja se proizvodi u velikim količinama. U SAD proizvodi se npr. oko 500 tona godišnje. BFN ima vrlo veliku industrijsku uporabu u sintezi raznih spojeva. Koristi se kao fotoinicijator u UV-sušećim bojama, apsorbens UV-zračenja u raznim proizvodima, npr. sunčanim naočalama, prozirnoj plastici, kremama za zaštitu od sunca; sirovina je u industriji ljepila i brtvila; nalazi se u tonerima, antihistaminicima, hipnoticima i insekticidima. Supstituirani derivati benzofenona oksibenzoni i dioksibenzoni koriste se također kao zaštita od UV-zračenja, a benzofenon u njihovoj proizvodnji.⁶⁹

2.3.2. Toksičnost benzofenona

Benzofenon može ući u organizam preko kože, hranom i inhalacijom. Najznačajnijim se smatra rizik unošenja hranom, jer UV-sušeće boje u kojima se koristi u znatnim količinama kao fotoinicijator, mogu doći u kontakt s hranom i pićem. Zabilježena je migracija srodnog spoja 4-metilbenzofenona s kartonske ambalaže u žitarice.²⁸ Europska agencija za sigurnost hrane postavila je graničnu vrijednost za migraciju benzofenona s ambalaže od $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$, a ako je u kombinaciji sa svojim derivatom 4-metilbenzofenonom ukupna migracija oba spoja mora biti manja od navedene vrijednosti.^{28,46}

Istraživanja na životinjama pokazala su da benzofenon ima slabu estrogenu aktivnost, no u vodi pod djelovanjem UV-zračenja može prijeći u 3-hidroksibenzofenon i 4-hidroksibenzofenon koji imaju znatno veću estrogenu aktivnost. Benzofenon i njegovi derivati povezuju se s povećanim rizikom od raka dojke, estrogenim djelovanjem na reproduktivni sustav, kosti i jetru.²⁵⁻²⁷

Benzofenoni općenito imaju kritična svojstva za kontaminaciju okoliša: jako su lipofilni, otporni i akumuliraju se u okolišu i živim organizmima. Dokazano je da štetno utječu na reprodukciju i hormonalnu ravnotežu u riba.⁷⁰ Benzofenon ima jače estrogenu i antiandrogenu djelovanje od svojih derivata. U prisutnosti nekih derivata, kao što je 2-hidroksi-4'-metoksibenzofenon (BP-3) estrogenu djelovanje mu se pojačava. Benzofenoni se mogu u organizmu konjugirati s β -D-glukuronidom i sulfatom što im smanjuje bioaktivnost i potiče izlučivanje urinom.^{71,72}

2.3.3. Metode određivanja benzofenona

Benzofenon, 4-metilbenzofenon i 7 srodnih spojeva koji se također koriste kao fotoinicijatori analizirani su u raznim pakiranjima hrane tekućinskom kromatografijom obrnutih faza uz uporabu UV-detektora s nizom fotodioda.²⁸ Korištena je kolona C₁₈ dimenzija 250 mm × 4,6 mm. Analiti su eluirani gradijentno smjesom vode i acetonitrila. Maksimum apsorpcije benzofenona bio je pri 256 nm, a postignuta je granica detekcije od 0,046 mg L⁻¹ i granica određivanja od 0,14 mg L⁻¹. Identitet analita potvrđen je analizom plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Od 46 analiziranih uzoraka benzofenon je pronađen u više od pola, a 4-metilbenzofenon u 30 % uzoraka. Benzofenon i 4-metilbenzofenon nisu detektirani u istim uzorcima što sugerira da se međusobno zamjenjuju.

Razvijena je metoda za određivanje benzofenona i tri njegova derivata koji se koriste kao filtri UV-zračenja u realnim uzorcima: morskoj vodi, otpadnim vodama, kozmetičkim proizvodima i urinu.³⁰ Kako bi se postigla dovoljna koncentracija analita u ovom su radu optimirani uvjeti i adsorbensi za mikroekstrakciju uzoraka na štapiću (magnetskom miješalu) presvučenom prikladnim adsorbensom nakon čega je slijedila desorpcija u metanolu i acetonitrilu. Ekstrakt je uparen do suha, a ostatak otopljen u 200 µL metanola. Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom uz primjenu UV-detektora s nizom fotodioda. Analiti su odijeljeni na koloni C₁₈ uz eluiranje smjesom metanola i vode. Benzofenon je detektiran pri valnoj duljini od 250 nm. Granica detekcije za benzofenona bila je 10 µg L⁻¹, a granica određivanja 33 µg L⁻¹. Od navedenih uzoraka benzofenon je pronađen jedino u otpadnim vodama u koncentraciji do 2,5 µg L⁻¹.

Hidroksilirani derivati benzofenona, koji se koriste kao UV-apsorberi, analizirani su u površinskim vodama tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa.³¹ Uzorci su ukoncentrirani ekstrakcijom na čvrstoj nepolarnoj fazi, eluirani metanolom, injektirani na kolonu C₁₈ i gradijentno eluirani smjesom vode i metanola. Analiti su ionizirani elektroraspršenjem, a snimani su pozitivni i negativni ioni jer je analizirano šest derivata benzofenona s raznim funkcionalnim skupinama. U radu je istražen utjecaj mravlje kiseline i amonijevog acetata kao modifikatora pokretne faze. Snimanjem odziva karakterističnih iona produkata svakog analita postignute su granice određivanja od 0,2 µg L⁻¹ do 4 µg L⁻¹ u uzorku. Analizom površinskih i otpadnih voda detektirani su derivati benzofenona čime je dokazana njihova sveprisutnost u okolišu.

Derivati benzofenona određivani su i u ljudskoj posteljici tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa.²⁹ Analiti su iz uzoraka ekstrahirani etil-acetatom, a kao unutarnji standard korišten je d₁₀-BFN. Analiti su odijeljeni na koloni C₁₈ uz uporabu vode i metanola za gradijentno eluiranje te dodatak od 0,1 % amonijaka. Sniman je odziv pozitivnih iona zbog veće osjetljivosti za sve analite. Za svaki analit praćena su dva karakteristična fragmenta, jedan za kvantifikaciju, a drugi za potvrdu te su postignute granice detekcije od 0,07 ng g⁻¹ do 0,3 ng g⁻¹. Metoda je primijenjena na 16 uzoraka tkiva posteljice u kojima je pronađeno od jednog do tri derivata benzofenona u masenim udjelima do 9,8 ng g⁻¹.

2.4. Bisfenol A u papiru

Bisfenol A česti je sastojak papira za termalno tiskanje (računi, potvrde i sl.) gdje ima funkciju ireverzibilnog razvijaa termokromne boje nanese na papir.³⁵ Također, može biti sastojak reverzibilne termokromne boje otisnute na novčanice, etikete, karte i sl. (Slika 2.3) ili na njih dospjeti uslijed prijenosa tijekom kontakta s termalnim papirom za tiskanje. Tragovi BPA mogu se pronaći u recikliranom papiru u koji dospijevaju tijekom postupka recikliranja.^{36,73}

Zbog estrogene aktivnosti regulatorne agencije prate korištenje bisfenola A. Odnedavno se osim preko plastičnih materijala istražuju i drugi putevi ljudske izloženosti bisfenolu A. Termalni papiri za tiskanje i termokromne boje značajan su izvor kontaminacije jer je u njima bisfenol A najčešći razvijaa s masenim udjelom do nekoliko postotaka. Dnevna prihvatljiva doza bisfenola A je 0,05 µg kg⁻¹ tjelesne težine,^{52,53} a Europska granica specifične migracije iz ambalaže prehrambenih proizvoda u hranu je 0,06 mg kg⁻¹.⁷³ Količina bisfenola A korištena u termalnom papiru za printanje u EU npr. u razdoblju 2005/2006 bila je 1890 t. Dakle, radi se o ogromnim količinama bisfenola A koje preko papira mogu doći u kontakt s kožom, hranom i okolišem. U termokromnim bojama bisfenol A je prisutan u molekulskom obliku i zato se lako otpušta u okoliš. U recikliranom papiru može biti prisutan u znatno manjoj količini jer u njega dospijeva tijekom postupka recikliranja s termalnog papira za tiskanje. Procjenjuje se da 30 % termalnog papira dospijeva u proces recikliranja.³⁶ U termalnim papirima do sada su pronađeni maseni udjeli bisfenola A do 42,6 mg g⁻¹, a u recikliranom papiru oko 1000 puta manje, do 46 µg g⁻¹.⁵⁶ U prosincu 2016. Europska komisija stavila je bisfenol A

na popis supstancija s ograničenom uporabom te se od 2020. zabranjuje uporaba bisfenola A u termalnom papiru za tiskanje u masenim udjelima većim od 0,02 %. Kao reakcija proizvođača očekuje se uporaba sličnih spojeva koji još nisu na popisu zabranjenih, od kojih se trenutno najviše upotrebljava bisfenol S. Problem je što i ti spojevi mogu imati ili je već dokazano da imaju estrogeno djelovanje.⁵⁶

2.4.1. Transdermalna izloženost bisfenolu A

Termalni papir koji se koristi za tiskanje (računi, potvrde, karte) sastoji se od dva sloja: osnovnog papira uobičajenog sastava i termo-osjetljivog sloja koji sadrži tri glavne komponente: termokromnu boju, razvijatelj koji je obično slaba kiselina (najčešće bisfenol A) i otapalo (obično dugolančana alifatska molekula kao što su masne kiseline, amidi i alkoholi). Kada se termo-osjetljivi sloj tijekom tiskanja zagrije iznad tališta otapala, bisfenol A reagira s termokromnom bojom tako da joj donira protone što otvara prsten molekule boje, povećava konjugiranost sustava te nastaje obojenje.²

Transdermalni prijenos smatra se mogućim izvorom ljudske izloženosti bisfenolu A.⁷⁴ Do sada je apsorpcija bisfenola A preko kože dokazana na goveđim vimenima, ali bez kvantifikacije⁷⁵ te u svinjskoj koži.⁷⁶ Istraživanje na svinjskoj koži napravljeno je *in vitro* pomoću Franzove difuzijske ćelije. Nakon 10 h izloženosti otopini bisfenola A, 5,4 % primijenjene doze pronađeno je u epidermisu, 8,8 % u dermisu i 0,7 % u otopini s unutrašnje strane kože. Istraživanje je prekinuto nakon 10 h jer je eksperiment simulirao transdermalnu izloženost tijekom radnog vremena.⁷⁶ U nekoliko radova je do sada istraživana dermalna izloženost bisfenolu A radnika na blagajnama i određena je dnevna izloženost do 218,3 µg dnevno.⁵⁶ Prijenos bisfenola A s termalnog papira na prste istražen je pod različitim uvjetima. Određeno je da tijekom 5 sekundi s računala na suhe prste prijeđe otprilike 1,13 µg BPA te da prisutnost vlage i masnoće povećava ekstrakciju više od 10 puta, a etanol pospješuje upijanje u kožu. Ako je bisfenol A nanesen na kožu u otopini etanola, odmah nakon nanošenja moglo se ekstrahirati 95 % bisfenola A, dok je nakon 60 min bilo moguće ekstrahirati samo 10 % što dokazuje apsorpciju BPA u kožu.³⁵ Još se razmatra utječe li transdermalna izloženost na ukupnu unutarnju izloženost bisfenolu A. Još nije dokazano ostaje li bisfenol A apsorbiran u koži dok se taj sloj kože ne potroši ili migrira kroz dermis u organizam. Do sada je o tome napravljen

mali broj studija s kontradiktornim rezultatima.⁵⁶ Trenutno je prihvatljivi transdermalni dnevni unos bisfenola A (engl. *transdermal Tolerable Daily Intake*, t-TDI) $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne težine⁷³ što je npr. dva reda veličine više od procijenjenog dnevnog unosa (engl. *Estimated Daily Intake*, EDI) za unos prehrambenim proizvodima koji iznosi $44,6 \text{ ng kg}^{-1}$ tjelesne težine dnevno za odraslu populaciju u SAD-u.⁷⁷

Uobičajena praksa u toksikološkim istraživanjima koja do sada nije primijenjena na ekstrakciju bisfenola A s papira je određivanje u odgovarajućoj modelnoj otopini kao što su urin, znoj i slina. Na primjer transdermalna izloženost ftalatima, koji su kao i bisfenol A aromatski spojevi s kisikom, preko papirnatih pelena istraživana je u modelnim uzorcima urina i znoja,⁷⁸ dok je migracija ftalata s dječjih igračaka istraživana u modelnoj otopini sline i znoja.^{79,80}

Postoji veliki broj komercijalno dostupnih modelnih otopina znoja obzirom na namjenu, klimatsko područje, vrstu analize i dr. Ekstrakcija u modelnim otopinama često je opisana normiranim metodama, a otopine se nabavljaju već pripravljene od proizvođača koji ne navode točan kemijski sastav nego samo normiranu metodu ili namjenu.⁷⁸ U ovom radu odabrane su dvije, često upotrebljavane modelne otopine propisane prema normama ISO 3160-2 i EN 1811.⁸⁰⁻⁸² Odabrane otopine međusobno se razlikuju po pH-vrijednosti i koncentraciji soli, pa se može vidjeti utječu li ti uvjeti na ekstrakciju.

Vrijeme ekstrakcije obično se određuje obzirom na očekivano vrijeme kontakta. Na primjer, kod ispitivanja transdermalne izloženosti ftalatima preko papirnatih pelena, vrijeme ekstrakcije modelnom otopinom urina i znoja bilo je 8 h, dok je kod ispitivanja ekstrakcije ftalata s dječjih igračaka u modelnoj otopini sline vrijeme ekstrakcije bilo 30 min u ultrazvučnoj kupelji.^{78,79} Ekstrakcija ftalata iz dječjih igračaka u modelnu otopinu znoja ispitivana je na rotacijskoj miješalici tijekom 120 min pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$.⁸⁰

2.4.2. Određivanje bisfenola A u papiru

Bisfenol A određivan je u termalnom papiru za tiskanje^{16,20,32,33,35,83,84} te u drugim vrstama papirnatih proizvoda kao što su papirnata ambalaža koja dolazi u kontakt s hranom,⁸⁵ papir za kopiranje,³⁴ novčanice,⁷⁴ izvorni i reciklirani papir za tiskanje, časopisi, letci, karte za javni prijevoz, omotnice, papirne maramice, ubrusi, toaletni papir i dr.^{64,65,86} Primijenjene separacijske i detekcijske tehnike bile su plinska kromatografija s plamenoionizacijskom detekcijom uz derivatizaciju analita⁵⁹ te sa spektrometrijom masa^{61,64} i tekućinska kromatografija s UV-detekcijom,^{42,54,60} fluorescencijskom detekcijom^{56,58} i spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa.^{87,88}

U objavljenim radovima u kojima je uglavnom određivan bisfenol A u termalnim papirima za tiskanje primijenjeno je nekoliko ekstrakcijskih postupaka s otapalima umjerene polarnosti: acetonitrilom,⁸³ metanolom,^{33–36,74} i etanolom.^{32,87,88} Volumeni otapala bili su od 5 mL do 100 mL ovisno o masi uzorka koja je bila od 15 mg do 1000 mg. Metode su koristile različito trajanje ekstrakcije, od 20 min do više sati preko noći. Ekstrakcijske tehnike bile su mućkanje na 35 °C, miješanje pomoću vortex-miješalice, ekstrakcija pomognuta ultrazvukom i mikroekstrakcija na kapi. Pokazano je da se bisfenol A brzo ekstrahira u otapala jednostavnim ekstrakcijskim tehnikama kao što su mućkanje, vorteksiranje ili ultrazvučna ekstrakcija.^{16,34–36,56,74,84,87}

Dvjesto dva uzorka različitih vrsta papira i papirnatih proizvoda analizirano je tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem.³⁶ Sto tri uzorka bili su termo-papiri, a ostali su podijeljeni u sljedeće skupine: letci, časopisi, karte za javni prijevoz, omotnice, novine, ambalaža za prehrambene proizvode, papiri za tiskanje, posjetnice, papirne maramice, ubrusi i toaletni papir. Uzorci su pripremljeni tako da je alikvot uzorka od oko 17 mg narezan na komadiće i ekstrahiran 3 puta u metanolu mućkanjem tijekom 30 min: prvi put s 5 mL metanola, a drugi i treći s 3,5 mL metanola. Nakon toga, uzorak je uparen u struji dušika na 10 mL, te razrijeđen u omjeru 1:2000 s metanolom te je dodan ¹³C₁₂-BPA kao unutarnji standard. Termalni papiri sadržavali su najviše bisfenola A, do 13,9 mg g⁻¹, no niski maseni udjeli do 14,4 µg g⁻¹ pronađeni su i u svim drugim vrstama papira. Uz istu pripravu i instrumentaciju određivan je i maseni udjel bisfenola A u novčanicama.⁷³ Detektirani udjeli BPA bili su od 0,001 µg g⁻¹

do $82,7 \mu\text{g g}^{-1}$, a granica detekcije bila je $0,5 \text{ ng g}^{-1}$. Pretpostavlja se da bisfenol A na novčanice dospijeva tijekom kontakta s termalnim papirom računa.

Bisfenol A određivan je u termalnim papirima i tekućinskom kromatografijom uz UV-detekciju pri 280 nm uz primjenu mikroekstrakcije na kapi.¹⁶ Cilj je bio izbjeći ekstrakciju analita s velikim volumenom metanola ili etanola što je bio slučaj u ranijim radovima. Primijenjena tehnika omogućila je ekstrakciju, koncentriranje i unos uzorka u jednom koraku što je utjecalo na nižu cijenu analize i zanemarivu potrošnju otapala. Bisfenol A je najprije ekstrahiran iz uzoraka u 2 %-tnoj otopini NaOH nakon čega je primijenjen 1-oktanol kao ekstrakcijsko otapalo. Uzorci su pripremljeni tako da je odvagano oko 0,1 g papira i narezano na komadiće. Dodano je 10 mL 2 %-tnog NaOH te je uzorak ekstrahiran u ultrazvučnoj kupelji 3 h uz temperaturu od 25 °C. Nakon ekstrakcije pH-vrijednost uzoraka podešena je na 7 s otopinom HCl. Dodana je voda da volumen uzorka bude 25 mL. Po 10 mL tako pripremljenih otopina uzoraka preneseno je u bočicu u kojoj je provedena mikroekstrakcija na kapi. Uzorci su ekstrahirani u NaOH jer alkalni medij povećava topljivost BPA u vodenoj otopini. Razvijena metoda primijenjena je za određivanje bisfenola A u 7 vrsta termalnih papira. Rezultati su bili u rasponu od $0,53 \text{ mg g}^{-1}$ do $20,9 \text{ mg g}^{-1}$.¹⁶

U termalnom i indigo papiru bisfenol A je određivan tekućinskom kromatografijom obrnutih faza uz UV-detekciju pri 275 nm.³⁴ Uzorci su analizirani prema dva protokola: digestija (za određivanje ukupnog masenog udjela BPA) i migracija (za procjenu dermalne izloženosti). Za ispitivanje digestije 200 mg uzorka stavljeno je u 20 mL metanola tijekom 3 h na sobnoj temperaturi. Otopina je nakon toga profiltrirana u bočicu i analizirana. Migracija je ispitana tako da je vatni štapić namočen metanolom. Vlažni štapić je prevučen preko površine termotermalnog papira od 200 mg. Štapić je stavljen u 20 mL metanola tijekom 3 h na sobnoj temperaturi. Otopina je nakon toga profiltrirana i analizirana.

U radu Babu i suradnika⁸³ bisfenol A također je određivan u računima otisnutim na termalnom papiru tekućinskom kromatografijom obrnutih faza uz UV-detekciju pri 234 nm. Pokretna faza bila je smjesa vode i acetonitrila, a eluiranje gradijentno. Uzorci su pripremljeni ekstrakcijom u acetonitrilu preko noći na 50 °C. Identitet BPA u uzorcima dodatno je potvrđen plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Bisfenol A sadržavalo je 168 od 170 uzoraka u rasponu od 0,4 % do 4,25 %. Granica detekcije bila je $22,5 \mu\text{g g}^{-1}$.

Dermalna izloženost bisfenolu A s termalnog papira praćena je tekućinskom kromatografijom obrnutih faza s fluorescencijskom detekcijom uz vodu i acetonitril kao

eluens.³⁵ Granica određivanja u ekstraktu bila je $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Maseni udjel bisfenola A u termalnim papirima određen nakon ekstrakcije u metanolu preko noći na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ bio je od 8 mg g^{-1} do 17 mg g^{-1} . Masa bisfenola A prenesena s termalnih papira na prste tijekom 5 s bila je od $0,2 \mu\text{g}$ do $6 \mu\text{g}$.

U istraživanju provedenom u Turskoj maseni udjel bisfenola A u termalnim papirima bio je od $0,11 \text{ mg g}^{-1}$ do $21,65 \text{ mg g}^{-1}$.⁸⁴ Uzorci su pripremljeni tako da je 20 mg papira narezano na komadiće i ekstrahirano 60 min u 50 mL čiste vode na sobnoj temperaturi. Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom na koloni C_{18} uz fluorescencijsku detekciju. Granica detekcije u ekstraktu bila je $3,3 \mu\text{g L}^{-1}$.

Za određivanje bisfenola A u otpadnom papiru iz domaćinstava primijenjena je tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa uz pokretnu fazu vodu i metanol.⁸⁷ Uzorci su pripremljeni tako da je od 1 g do 4 g papira ekstrahirano u 100 mL etanola 1 h pod refluksom. Granica detekcije BPA bila je $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ za sve papire osim termalnih u kojima je bila $2 \mu\text{g g}^{-1}$. Maseni udjel bisfenola A u otpadnim papirima kućanstva bio je od $0,31 \mu\text{g g}^{-1}$ do $17600 \mu\text{g g}^{-1}$. Najviši maseni udjel BPA pronađen je u papiru računara ($8300 \mu\text{g g}^{-1}$) i termalnom papiru ($17600 \mu\text{g g}^{-1}$).

Osim određivanja tekućinskom kromatografijom s UV i fluorescencijskom detekcijom ili spregnutom sa spektrometrijom masa, bisfenol A je u papirima određen i plinskom kromatografijom uz plameno-ionizacijsku detekciju te detekciju spektrometrijom masa.^{32,87}

U radu u kojemu je primijenjena plinska kromatografija s plamenoionizacijskom detekcijom, bisfenol A je u uzorcima termalnog papira pronađen u masenim udjelima do 17 mg g^{-1} .³² Postignute su granice detekcije od $0,9 \text{ mg g}^{-1}$ te određivanja od $2,6 \text{ mg g}^{-1}$. Uzorci su pripremljeni tako da je 200 mg uzorka ekstrahirano uz mućkanje u 20 mL bezvodnog etanola na $35 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 1 h. Ovisnost djelotvornosti o vremenu ekstrakcije istražena je do 24 h, ali potvrđeno je da je ekstrakcija potpuna nakon 1 h. Etanolni ekstrakt odvojen je od papira i uparen nakon čega je suhi ostatak uzorka otopljen u piridinu i derivatiziran.

Vinggaard i suradnici⁸⁷ analizirali su bisfenol A u 20 vrsta kuhinjskih ubrusa od kojih je 9 bilo od recikliranog papira. U uzorcima je najprije *in vitro* kvalitativno određena estrogena aktivnost testom sa stanicama kvasca koje nose aktivne gene za ljudski receptor estrogena α . Prisutnost estrogeno-aktivnih tvari određena je u devet uzoraka od kojih je sedam bio reciklirani papir. Uzorci koji su pokazali estrogenu aktivnost podvrgnuti su kvantitativnoj analizi plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa i plinskom kromatografijom s

plamenoionizacijskim detektorom. Za plinskokromatografsku (GC) analizu uzorci su pripremljeni tako da je 5 g uzorka zagrijavano u 160 mL etanola uz refluks tijekom 1 h. Uzorak je koncentriran uparavanjem etanola do volumena od 1 mL za GC analizu. Bisfenol A je pronađen u sedam uzoraka recikliranog papira u masenim udjelu od $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ do $24 \mu\text{g g}^{-1}$, dok ga uzorci izvornog papira nisu sadržavali. Pretpostavlja se da su uzorci izvornog papira bili pozitivni na estrogenu aktivnost zbog prisutnosti propil-parabena.

Za određivanje bisfenola A u papirima u kontaktu s hranom, uzorci su ekstrahirani metanolom dva puta po 30 min.⁸⁵ Ekstrakti su podvrgnuti ekstrakciji s metil-*tert*-butil-eterom nakon čega je uslijedila ekstrakcija na čvrstoj fazi radi pročišćavanja. Ekstrakt s čvrste faze je uparen, derivatiziran i analiziran tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa. Granica određivanja BPA bila je $0,3 \text{ ng g}^{-1}$. Bisfenol A je pronađen u 82 % uzoraka papira u rasponu od granice određivanja do 83 ng g^{-1} .

Za sada ne postoji standardizirana metoda za određivanje bisfenola A u papiru. Glavni nedostatak plinske kromatografije s plamenoionizacijskom detekcijom je derivatizacija koja zahtijeva dodatno vrijeme i optimiranje uvjeta. Određivanje tekućinskom kromatografijom uz mikroekstrakciju na kapi uključuje prilično dugotrajan postupak pripreme uzorka. Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa superiorna je radi svoje osjetljivosti i selektivnosti, ali se radi o složenoj i teže dostupnoj instrumentaciji. Za određivanje visokog sadržaja bisfenola A u termalnim papirima prikladne su sve primijenjene tehnike, a tekućinska kromatografija s UV-detekcijom je optimalna tehnika. Za određivanje niskih masenih udjela bisfenola A, npr. u recikliranom papiru ili za procjenu transdermalnog prijenosa potrebne su tehnike veće osjetljivosti među kojima prednost obzirom na dostupnost i jednostavnost izvedbe ima tekućinska kromatografija s fluorescencijskom detekcijom.

2.5. Bisfenol A u tlu

2.5.1. Izvori zagađenja i razgradnja bisfenola A

Bisfenol A u okoliš može dospjeti tijekom proizvodnje samog spoja te materijala i predmeta u čijem se sastavu nalazi. Mogu ga sadržavati otpad i otpadne vode postrojenja u kojima se sintetizira ili koristi. Izvor zagađenja može biti i transport bisfenola A i materijala u kojima se nalazi. Također, u okoliš može dospjeti i nakon uporabe materijala i predmeta u kojima se nalazi preko otpada, komunalnih otpadnih voda, ispiranjem kontaminiranog tla, npr. odlagališta otpada, spaljivanjem otpada, razgradnjom plastike i drugih materijala koji ga sadrže u molekulskom ili polimernom obliku.

Raspodjela organskih tvari u okolišu može se predvidjeti prema njihovoj topljivosti u vodi, tlaku para i koeficijentu razdjeljenja između *n*-oktanola i vode. Hlapljivost i topljivost u vodi bisfenola A vrlo su niske. Kao lipofilan spoj može biti apsorbiran preko kože ili sluznice i nakupljati se u tkivima. Koeficijenti razdjeljenja upućuju da je bisfenol A sklon adsorpciji na organsku tvar.⁵⁴ Smatra se da je umjereno sklon bioakumulaciji, ali njegove razgradne puteve, bioakumulaciju i toksičnost u okolišu još treba istražiti. Utvrđeno je npr. da je vrijeme poluraspada bisfenola A na zraku uz fotooksidaciju samo 0,2 dana. Usprkos brzom razgradnji tragovi bisfenola A pronađeni su u mnogim uzorcima iz okoliša: vodi, tlu i zraku te tkivima biljaka, životinja i ljudi. Bisfenol A se u vodi određuje već oko 25 godina o čemu je objavljeno najviše radova. Pronađen je u koncentracijama do 370 $\mu\text{g L}^{-1}$, a najzastupljenije analitičke tehnike bile su plinska i tekućinska kromatografija spregnute sa spektrometrijom masa. Po učestalosti slijedi analiza sedimenta s 50 objavljenih radova do 2015. te analiza kanalizacijskog mulja s 20 radova. Očekivano, u kanalizacijskom mulju pronađeni su najviši maseni udjeli bisfenola A u okolišu: od 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 10 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ suhe tvari. U svim ispitivanim uzorcima utvrđena je vrlo brza razgradnja i znatno opadanje masenog udjela bisfenola A tijekom nekoliko dana.^{50,89}

BPA je u zemlji analiziran znatno rjeđe nego u ostalim matricama iz okoliša. O sadržaju BPA u tlu objavljeno do 2015. godine samo šest radova.⁸⁸ Izvori kontaminacije tla bisfenolom A bili su kanalizacijski mulj, navodnjavanje otpadnim vodama, procjeđivanje s odlagališta otpada i odlaganje i recikliranje elektroničkog otpada. Maseni udjeli BPA u tlu varirali su nekoliko redova veličine, od 0,01 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 1 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.^{37,38,86,89} Utvrđeno je da

je bisfenol A u tlu slabo mobilan zbog visokog koeficijenta razdjeljenja između tla i vode čiji je raspon od 314 do 1524. Bisfenol A s komponentama tla pravi stabilne spojeve koji se ne mogu ekstrahirati, a vrijeme poluraspada u tlu mu je oko 3 dana, kao i u vodi.^{21,23} Sorpcija u tlo i sediment jako ovisi o količini organske tvari u zemlji i veličini čestica.³⁸ Bisfenol A se može ionizirati samo u ekstremnim uvjetima ako se pH-vrijednost zemlje približi njegovoj pK_a vrijednosti od oko 10. U tom se slučaju može iz tla isprati u podzemne vode. Transport i bioraspoloživost aniona bisfenola A i njegovih spojeva s komponentama tla nisu još dovoljno istraženi.^{23,37,38,86,89,90}

Utvrđeno je da se mnoge bakterije mogu razmnožavati koristeći bisfenol A kao jedini izvor ugljika i energije. One mogu biti Gram-pozitivne i Gram-negativne, aerobne i anaerobne. Predloženo je više složenih mehanizama biorazgradnje bisfenola A u tlu.⁹¹

Razgradnja bisfenola A u tlu praćena je izotopno obilježenim ^{14}C -BPA u aerobnim laboratorijskim uvjetima prema međunarodnim smjernicama na četiri različita uzorka zemlje.²³ Utvrđeno je da bisfenol A u zemlji prelazi u pet različitih metabolita kao i da se znatna količina veže na postojeće organske spojeve u tlu koji zaostaju u tlu i nakon višestruke ekstrakcije organskim otapalima. Napravljena je korelacijska analiza koja je pokazala da je glavna komponenta za apsorpciju bisfenola A organska tvar u tlu koju su ispitivani uzorci sadržavali u masenim udjelima od 1,5 % do 3,63 %, tj. preračunano na organski ugljik od 0,92 % do 2,11 %. Svojstvo uspostavljanja veza s organskim tvarima karakteristično je za fenole, aniline i mnoge pesticide, a udio vezanja može biti i do 90 %. Utvrđeno je da se mnogi od tih spojeva vežu kovalentnim vezama s organskim tvarima u tlu, a neki čak i polimeriziraju ili se vežu kationskom izmjenom. Ovako čvrsto vezani bisfenol A teško se prenosi dalje u okoliš, ali se ipak može ako se ubrza mineralizacija organske tvari u tlu npr. oranjem ili dodavanjem supstrata s ugljikom kao pri gnojenju umjetnim gnojivima. Nakon 120 dana razgradnje ^{14}C -BPA u laboratorijskim uvjetima izmjerena je znatna doza radioaktivnosti, oko 20 % od početne u obliku $^{14}\text{CO}_2$. Udjeli radioaktivnosti tvari koje se iz zemlje ekstrahiraju u smjesu metanola i vode, radioaktivnosti preostale krute tvari nakon ekstrakcije i radioaktivnosti $^{14}\text{CO}_2$ bili su podjednaki za sve uzorke bez obzira na sastav tla. Eksperimenti su pokazali da se radioaktivnost krute tvari koju nije moguće ekstrahirati s vremenom smanjuje, a radioaktivnost $^{14}\text{CO}_2$ povećava pa se pretpostavlja da bisfenol A, čvrsto vezan na organsku tvar u zemlji, s vremenom prelazi u CO_2 .²³

Za ^{14}C -BPA određeni su visoki koeficijenti sorpcije normalizirani na udjel organskog ugljika u tlu (K_{oc}) srednje vrijednosti $K_{oc} \approx 796$ te se prema uobičajenoj klasifikaciji McCalla i suradnika iz 1980. BPA smatra slabo mobilnim u svih testiranim tlima. Nakon što je proučavanim vodenim suspenzijama tla dodan biocid HgCl_2 , transformacija bisfenola A i ugradnja u matricu tla je usporena što znači da procesu doprinose bakterije.⁹²

Za procjenu mogućnosti prijenosa antropogenog otpada iz tla u žive organizme analizirane su gliste koje su živjele u poljoprivrednom tlu gnojenjem kontaminiranom sa 77 toksičnih tvari, uključujući i bisfenol A. Nakon 4 mjeseca provedenih u takvom tlu, u tkivu glista nije pronađen bisfenol A, pa nije bilo moguće izračunati njegov bioakumulacijski faktor, koji je očito bio vrlo nizak.⁸⁶

Put biorazgradnje bisfenola A proučavan je u soju Gram-negativne aerobne bakterije izolirane iz mulja u pročištaču otpadnih voda postrojenja za proizvodnju plastike. I ova bakterija koristila je bisfenol A kao jedini izvor ugljika i energije. Utvrđeno je da je 60 % bisfenola A razgrađeno do CO_2 , 20 % je ugrađeno u bakterijsku masu, a 20 % je prevedeno u topljive organske spojeve. Identificirana su četiri glavna metabolita tijekom razgradnje bisfenola A: 4-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksiacetofenon, 2,2-bis(4-hidroksifenil)-1-propanol i 2,3-bis(4-hidroksifenil)-1,2-propandiol koji se razgrađuju do CO_2 ili ugrađuju u bakterijsku biomasu.⁹³ Još jedno istraživanje bakterijske razgradnje bisfenola A Gram-negativnim aerobnim bakterijama potvrdilo je da su glavni razgradni produkti 4-hidroksibenzojeva kiselina i 4-hidroksiacetofenon, koji nastaju oksidativnim pregradnjama u molekuli.⁹⁴ Zhang i suradnici⁹⁵ proučavali su razgradnju bisfenola A sojem Gram-negativnih aerobnih bakterija *Achromobacter xylosoxidans* koji je izoliran iz procjednih voda komunalnog odlagališta otpada. Glavni razgradni produkti u ovom slučaju bili su 4-hidroksibenzaldehid, 4-hidroksibenzojeva kiselina i *p*-hidrokinon. Dodgen i suradnici³⁹ istraživali su razgradnju BPA u modelnim uzorcima zagađenog tla i kao razgradne produkte detektirali 4-hidroksibenzaldehid, 4-hidroksibenzojevu kiselinu i 4-hidroksiacetofenon.

Uspoređena je brzina razgradnje bisfenola A u riječnoj i morskoj vodi.²¹ U riječnoj vodi u koju je dodano $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ bisfenola A, već nakon 5 dana razgradnje koncentracija je bila ispod granice detekcije od $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ uz znatan porast broja bakterija. Vrijeme polurazgradnje bilo je, kao i u zemlji oko 3 dana. Koncentracija bisfenola A mjerena je u autoklaviranoj i neautoklaviranoj morskoj vodi. U autoklaviranoj vodi je koncentracija BPA bila konstantna tijekom svih 60 dana eksperimenta. U neautoklaviranoj morskoj vodi

koncentracija bisfenola A bila je konstantna 30 dana tijekom kojih se smanjio broj bakterija. Koncentracija se snizila tek nakon 40 odnosno 60 dana uz porast broja bakterija. Utvrđeno je da se bisfenol A znatno sporije razgrađuje u morskoj vodi, jer sastav morske vode vjerojatno ometa razgradnju i razmnožavanje bakterija.

Proučavanjem bakterijske razgradnje bisfenola A u vodi utvrđeno je da u nekim bakterijama prelazi u glikozid koji se može akumulirati u biljkama i algama.⁹⁶ Prehranom može dospjeti u životinjsko crijevo gdje ga β -glikozidaza može razgraditi ponovo u bisfenol A. Zbog ovoga se smatra da je za procjenu utjecaja ispuštanja bisfenola A u okoliš potrebno obratiti dodatnu pažnju na koncentraciju glikozida bisfenola A, a ne samo na brzo snižavanje koncentracije izvornog spoja.

Za buduće istraživanje razgradnje papira s termokromnim otiscima korisna informacija može biti da lakaza, izozim iz gljive *Grifola frondosa*, efikasno razgrađuje sintetičke boje i bisfenol A.⁹⁷ Glavni produkt razgradnje bisfenola A je 4-izopropenilfenol. Lakaza je ligninolitski enzim koji ima veliki kapacitet oksidiranja spojeva sličnih ligninu kao i bisfenola A, policikličkih aromatskih ugljikovodika i sintetskih boja. Zbog toga može biti korisna za bioremedijaciju, osobito u slučaju razgradnje termokromnih boja s bisfenolom A.

2.5.2. Metode analize bisfenola A u tlu

Pregledom literature utvrđeno je da je bisfenol A u kanalizacijskom mulju i riječnom sedimentu, koji su matrice donekle slične zemlji, određivan isključivo tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa i detektiran uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Najniža granica detekcije postignuta u objavljenim radovima bila je $0,004 \text{ ng g}^{-1}$, no uobičajena vrijednost bila je u području nekoliko ng g^{-1} . Za ekstrakciju je korišten 1 g ili manje suhih uzoraka koji su najčešće ekstrahirani etil-acetatom, smjesom metanola i vode ili acetonom uz pomoć ultrazvuka, mikrovalova ili tlaka. U nekim slučajevima primijenjena je ekstrakcija na čvrstoj fazi za uklanjanje interferencija, a u nekima je ekstrakt odmah uparavan te je zatim suhi ostatak otapan, najčešće u 0,5 mL pokretne faze. Točnosti metoda bile su najviše uz primjenu ekstrakcije etil-acetatom, od 87 % do 107 %, dok su uz druga otapala bile niže.^{22,98,99}

U radu u kojemu je istraživana utjecaj veličine čestica na adsorpciju bisfenola A u tlu, za analizu je primijenjena tekućinska kromatografija s fluorescencijskom detekcijom te UV-detekcijom za uzorke s višom koncentracijom BPA. Granica detekcije BPA uz fluorescencijsku detekciju bila je $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Uzorci su injektirani na kolonu C_{18} i eluirani smjesom vode i acetonitrila kao pokretnom fazom.³⁸ Fluorescencijska detekcija primijenjena je i u praćenju razgradnje bisfenola A u riječnoj i morskoj vodi gdje je granica detekcije bila $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, te također u istraživanju adsorpcije bisfenola A na sediment gdje su analizirani modelni uzorci više koncentracije i nije navedena granica detekcije. U oba slučaja korištena je kolona C_{18} te voda i acetonitril kao pokretna faza.^{21,90}

U radu koji je proučavao put transformacije i uklanjanja bisfenola A iz tla, uzorci ekstrakta su koncentrirani iz velikog volumena otapala od čak 1200 mL vode s 5 % metanola, ekstrahirani na čvrstoj fazi te uparavani na volumen od 250 μL . Analizirani su na koloni C_{18} , eluirani pokretnom fazom sastavljenom od vode i acetonitrila te detektirani apsorbacijom UV-zračenja. Granica detekcije nije navedena obzirom da se i ovdje radilo o modelnim uzorcima s visokom koncentracijom bisfenola A od 10 mg L^{-1} u otopini koja je injektirana na kolonu.³⁹

Bisfenol A određivan je u tlu i plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa.¹⁰⁰ Tijekom razvoja metode uspoređena je djelotvornost ekstrakcije iz tla s više otapala: acetonom, metanolom, etil-acetatom i diklormetanom. Aceton i etil-acetat bili su podjednako djelotvorna otapala. Ekstrakcija je pomognuta ultrazvukom i provođena 4 puta po 15 min sa 4 do 5 mL otapala dodanih na 5 g tla. Nakon ekstrakcije otapalom primijenjena je ekstrakcija na čvrstoj fazi radi uklanjanja interferencija. Ekstrakt s čvrste faze uparen je do malog volumena, a analit je derivatiziran *N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil)trifluoracetamidom. Granica određivanja BPA u tlu bila je $0,4 \text{ ng g}^{-1}$, a točnost metode $94,5 \pm 2,5 \%$ uz $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ BPA u tlu. Metoda je primijenjena za analizu BPA u tlu s golf terena u južnoj Kaliforniji koji je zaljevan recikliranim otpadnim vodama. Maseni udio bisfenola A u navedenom tlu bio je od $0,55 \text{ ng g}^{-1}$ do $9,08 \text{ ng g}^{-1}$ suhe zemlje.

U tlu različitih područja Španjolske bisfenol A je također određivan plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa.¹⁰¹ Uzorci su pripremljeni tako da je 5 g tla ekstrahirano u 5 mL etil-acetata u ultrazvučnoj kupelji po 15 min u dva navrata. Ekstrakt je zatim uparen u struji dušika na volumen od 1 mL nakon čega je slijedila derivatizacija s *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoracetamidom. Točnost metode bila je od 88,1 % do 107,7 %.

Granica detekcije BPA bila je $0,03 \text{ ng g}^{-1}$, a određivanja $0,12 \text{ ng g}^{-1}$. Metoda je primijenjena za analizu BPA u više tipova poljoprivrednog i industrijskog tla u Španjolskoj. Maseni udjel bisfenola A u poljoprivrednom tlu bio je od $0,7 \text{ ng g}^{-1}$ do $4,6 \text{ ng g}^{-1}$, a u industrijskom od $0,2 \text{ ng g}^{-1}$ do $44,5 \text{ ng g}^{-1}$.

Prijenos bisfenola A proučavan je i u tlu odlagališta elektroničkog otpada u južnoj Kini.³⁷ Uzorci su analizirani plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Pripravljani su tako da je 10 g tla ekstrahirano sa 150 mL etil-acetata u uređaju po Soxhletu tijekom 48 h. Svaki uzorak je uparen na 1 mL pri sniženom tlaku te zatim pročišćen ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz primjenu Na_2SO_4 , silikata i neutralnog aluminija kao adsorbensa. Uzorak je ekstrahirano s 20 mL etil-acetata te uparen na 200 μL . Dodani su izotopno obilježeni analiti kao interni standardi i uzorak je derivatiziran. Točnost određivanja BPA bila je od 91,6 % do 106 %, a granica određivanja $0,10 \text{ ng g}^{-1}$. Na mjestima gdje je elektronički otpad spaljivan pronađeno je od $38,02 \text{ ng g}^{-1}$ do $182,04 \text{ ng g}^{-1}$ bisfenola A u tlu, na mjestima gdje je otpad rastavljan od $11,34 \text{ ng g}^{-1}$ do $34,1 \text{ ng g}^{-1}$, a na mjestima gdje je samo odložen od $1,89 \text{ ng g}^{-1}$ do $7,92 \text{ ng g}^{-1}$. U ovom području je i okoliš bio kontaminiran bisfenolom A, pa je u tlu rižinih polja pronađeno od $1,44 \text{ ng g}^{-1}$ do $5,60 \text{ ng g}^{-1}$ bisfenola A, a u sedimentu jezera od $0,93 \text{ ng g}^{-1}$ do $1,74 \text{ ng g}^{-1}$.

U Francuskoj je bisfenol A određivan u sklopu analize steroida, veterinarskih i humanih lijekova u tlima tretiranim gnojem ili muljem.⁴⁰ Analiza je provedena tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa. Uzorci su pripremljeni po principu metodologije QuEChERS (engl. *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) tako da je 5 g tla ekstrahirano 10 mL vode i 15 mL acetonitrila mućkanjem na Vortex-miješalici. Zatim je dodan acetatni pufer i suspenzija u tikvici promućkana je ručno, pomoću Vortex-miješalice i homogenizatora uzorka. Uzorak je centrifugiran nakon čega je odvojeno 10 mL ekstrakta i upareno do suha u struji dušika. Suhi ostatak je otopljen u smjesi limunske kiseline i metanola te je uzorak pročišćen ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz primjenu anionsko-izmjenjivačkog i polimernog sorbensa. Ekstrakt je zatim ponovo uparen do suha i otopljen u 200 μL smjese metanola i vode. Uzorci su analizirani na koloni C_{18} . Pokretna faza bila je smjesa metanola, vode i mravlje kiseline, a eluiranje gradijentno. Granica detekcije bisfenola A u tlu bila je $0,52 \text{ ng g}^{-1}$, a granica određivanja $0,94 \text{ ng g}^{-1}$. Točnost metode bila je od 47 % do 82 % što je vjerojatno posljedica jakog supresijskog utjecaja matrice koja je bila od -55 % do -67 %.

Metoda je primijenjena za analizu BPA u šest tala tretiranih muljem i različitim vrstama prirodnog gnoja. Bisfenol A nije pronađen niti u jednom uzorku.

Postoji i službena metoda međunarodne organizacije za standardizaciju *ASTM International* (engl. *American Society for Testing and Materials, ASTM*) za određivanje bisfenola A u tlu tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa.¹⁰² Prema dostupnim podacima uzorci se pripremaju tlačnom ekstrakcijom otapalom, a granica detekcije BPA u tlu je $2,8 \text{ ng g}^{-1}$.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Bisfenol A standard 99,8 % (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka), benzofenon 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), acetonitril i metanol za tekućinsku kromatografiju te fosforna kiselina 85 % (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska), etil-acetat za tekućinsku kromatografiju (Fisher Scientific, Leicestershire, UK), aceton p.a. (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, SAD), voda (destilirana i deionizirana, otpor manji od 18,2 MΩ pri 25 °C), natrijev acetat, natrijev klorid, natrijev hidroksid, amonijev klorid, urea i mliječna kiselina min. $w = 88$ %, sve p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), octena kiselina min. $w = 99,5$ % p. a. (Odczynniki Chemiczne s.a., Gliwice, Poljska), natrijev dihidrogenfosfat monohidrat p. a. (Merck, Darmstadt, Njemačka), otopina amonijaka 25 % p. a. (TTT d.o.o. Sveta Nedelja, Hrvatska), pH-standardi pH = 7,00 ± 0,02 i pH = 4,01 ± 0,02 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska), dušik 99,999 % (Messer, Bad Soden, Njemačka)

3.2. Instrumenti i pribor

- Tekućinski kromatograf 1220 Infinity LC sastavljen od linijskog otplinjača, binarne pumpe, automatskog uzorkivača, termostiranog prostora za kolonu i UV-detektora (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Modularni tekućinski kromatograf Agilent 1100 sastavljen od linijskog otplinjača, dvije binarne pumpe, automatskog uzorkivača, termostiranog prostora za kolonu i UV-detektora s nizom fotodioda (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Modularni tekućinski kromatograf Agilent 1200 sastavljen od otplinjača, dvije binarne pumpe, automatskog uzorkivača i UV-detektora s nizom fotodioda spregnut sa spektrometrom masa 6420 triple quad LC-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Magnetska miješalica IKA-KMO (IKA-Werk, Staufen, Njemačka)
- Analitička vaga AT 261 DeltaRange (Mettler, Schwarzenbach, Švicarska)
- Tehnička vaga Adventurer Pro (OHAUS, Parsippany, NJ, SAD)
- Digitalni pH-metar MP220 (Mettler, Schwerzenbach, Švicarska)
- Sušionik ST-05 (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- Centrifuga IO-72 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

- Ultrazvučne kupelji Soonis 4 (Iskra pio d.o.o., Ljubljana, Slovenija) i Sonorex RK 510H (Brandelin, Berlin, Njemačka)
- Tresilica Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Uređaj za uparavanje pod sniženim tlakom Laborota 4000 efficient (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Generator dušika N110DR (Peak Scientific, Glasgow, UK)
- PTFE filtri veličine pora 0,22 μm (Marcherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- Automatski pipetori Pipet – Lite XLS, Rainin (Mettler Toledo, Schwerzenbach Švicarska)
- Kolone za tekućinsku kromatografiju:
 1. Zorbax Eclipse XDB C₁₈, 150 mm \times 4,6 mm (unutarnji promjer, u. p.) s predkolonom dimenzija 10 mm \times 4,6 mm, punilo oktadecilsilicijev dioksid C₁₈, veličina čestica 5 μm , pH područje od 2 do 9 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
 2. Zorbax Eclipse XDB C₁₈, 75 mm \times 4,6 mm u. p., punilo oktadecilsilicijev dioksid C₁₈, promjer čestica 3,5 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)

3.3. Programi za upravljanje instrumentima i obradu podataka

- ChemStation for LC, 3D Systems B.03.02-SR2 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- OpenLab CDS c.01.05[35] (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Excell 14.0.4760.1000 (Microsoft, Redmond, SAD)
- Masshunter B.04.00 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)

3.4. Uzorci

3.4.1. Uzorci termokromnih boja

Maseni udio bisfenola A i benzofenona analiziran je u petnaest uzoraka termokromnih boja triju različitih proizvođača. Prema proizvođaču, načinu sušenja i tiska, uzorci su podijeljeni u sedam skupina s jednim do četiri predstavnika po skupini (Tablica 3.1).

Svi uzorci imaju oblik gušće ili rjeđe paste viskoznosti od 18 Pas do 200 Pas. Neki uzorci se stajanjem razdvajaju na rjeđu i gušću komponentu te ih je prije uzorkovanja bilo potrebno dobro promiješati. Uzorci mogu u većoj količini sadržavati miješane ugljikovodike (10 % – 20 %), bisfenol A (1 % – 10 %), petrolej (1 % – 10 %), izotridekanol (1 % – 10 %), fenol, melamin, galnu kiselinu, benzofenon i hidroksikumarin, a u manjoj formaldehid (< 0,07 %), manganove spojeve (0,3 % – 0,5 %), kobaltove spojeve (0,3 % – 0,4 %), glikolni eter (0,2 % – 0,4 %).

Tablica 3.1. Uzorci termokromnih tinti analizirani u ovom radu

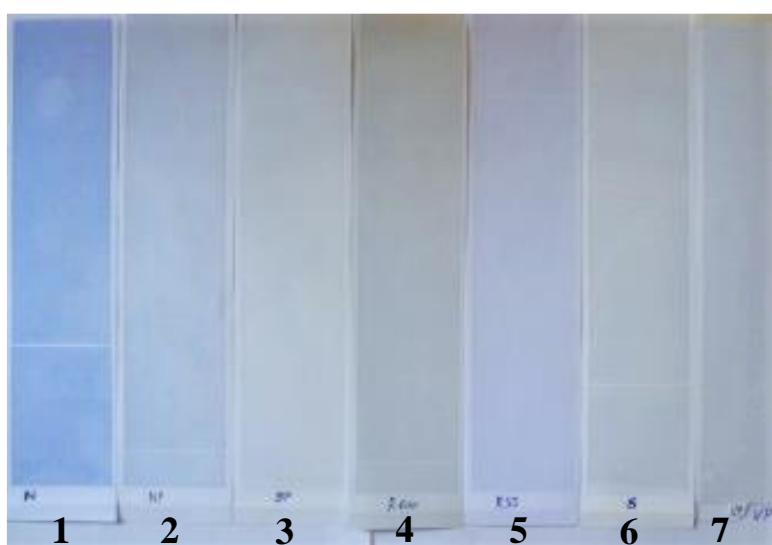
Skupina	Uzorak	Oznaka uzorka	Proizvođač	Sušenje	Tisak
I	1.1.	<i>Offset blue Chameleon 27 °C</i>	<i>TMC⁽¹⁾</i>	Zrak	Ofset
II	2.1.	<i>Magenta room voda-UV</i>	<i>Sun Chemical</i>	UV	Nepoznato
	2.2.	<i>Blue-cold</i>			znato
III	3.1.	<i>Offset burgundy to blue 63 °C</i>	<i>CTI⁽²⁾</i>	Zrak	Ofset
	3.2.	<i>Offset green to yellow</i>			
IV	4.1.	<i>Wet offset blue 45 °C</i>	<i>CTI</i>	Zrak	Mokri ofset
	4.2.	<i>Wet offset magenta 31 °C</i>			
V	5.1.	<i>UV purple to pink 31 °C</i>	<i>CTI</i>	UV	Nepoznato
	5.2.	<i>UV orange to yellow 12 °C</i>			znato
VI	6.1.	<i>Screen UV blue 31 °C</i>	<i>CTI</i>	UV	Sitotisak
	6.2.	<i>Screen UV red 31 °C</i>			
	6.3.	<i>Screen UV black 15 °C</i>			
	6.4.	<i>Screen UV magenta 31 °C</i>			
VII	7.1.	<i>Flexo UV magenta 15 °C</i>	<i>CTI</i>	UV	Flekso
	7.2.	<i>Flexo UV aqua green 15 °C</i>			

⁽¹⁾ *Thermochromic Measurements Ltd.*

⁽²⁾ *Chromatic Technologies Inc.*

3.4.2. Uzorci papira s otiskom termokromne boje

Boja 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* koja sadrži bisfenol A u masenom udjelu od 1,96 % otisnuta je na sedam vrsta papira: *navigator*, *bezdrvni premazani*, *bezdrvni nepremazani*, *reciklirani 100 %*, *reciklirani 33 %*, *voluminozni* i *sintetički* (Slika 3.1). Karakteristike papira prikazane su u Tablici 3.2. Na papiru *navigator* napravljene su dvije vrste otiska: *N*, i *tcb-1-cm³*. U ovim uzorcima određena je količina bisfenola A ekstrahiranog s površine otiska u modelne otopine znoja prema standardima EN 1811 i ISO 3160-2 te maksimalna količina bisfenola A ekstrakcijom metanolom.

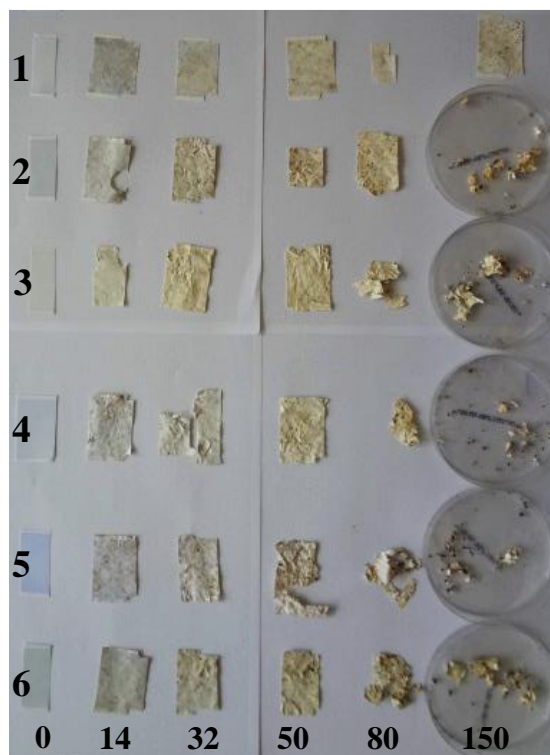


Slika 3.1. Papiri s otiskom termokromne boje *Offset blue Chameleon 27 °C*: *navigator* (1), *bezdrvni nepremazani* (2), *bezdrvni premazani* (3), *reciklirani 100 %* (4), *reciklirani 33 %* (5), *sintetički* (6) i *voluminozni* (7)

Tablica 3.2. Vrste papira na kojima su napravljene otisci termokromne boje

Br.	Vrsta papira	Oznaka	Proizvođač	Specifična težina / g m ⁻²	Opis
1	<i>Navigator</i>	N	Navigator	80	Uredski papir bez drvenjače
2	<i>Bezdrvni premazani</i>	BP	Maxi Satin	115	Papir s premazom, visokokvalitetni
3	<i>Bezdrvni nepremazani</i>	BN	Amber Graphic	80	Papir bez premaza
4	<i>100 % reciklirani</i>	100R	Evercopy / Clairfontaine	80	Sadrži 100 % recikliranih vlakana
5	<i>33 % reciklirani</i>	33R	Mondi	80	Sadrži 33 % recikliranih vlakana
6	<i>Sintetički</i>	S	Yupo	73	Otisnut od granula polipropena
7	<i>Voluminozni</i>	V	Munken Print White	80	Sadrži pulpu bez drvenjače i više od 10 % mehaničke pulpe s drvenjačom

Šest vrsta papira (*bezdrvni premazani, bezdrvni nepremazani, reciklirani 100 %, reciklirani 33 %, voluminozni i sintetički*) s otiskom termokromne boje podvrgnuto je anaerobnoj razgradnji u zemlji. Uzorci papira dimenzija 4 cm × 5 cm stavljeni su u staklenku između dva sloja zemlje uzete sa šumske lokacije u Samoborskom gorju. Tlo je navlaženo tako da vlažnost u svim staklenkama bude oko 20 %. Staklenke su hermetički zatvorene i pohranjene na sobnoj temperaturi. Za svaku vrstu papira anaerobna razgradnja prekinuta je nakon 14, 32, 50, 80 i 150 dana. Papiri su izvađeni i očišćeni od ostatka zemlje (Slika 3.2) te je u njima određen preostali maseni udjel bisfenola A. Uzorci su između prekida anaerobne razgradnje i analize pohranjeni na –15 °C. Otiske termokromne boje na različitim vrstama papira i simulaciju anaerobne razgradnje napravila je dr. sc. Marina Vukoje na Grafičkom fakultetu.



Slika 3.2. Papiri s otiskom termokromne boje tijekom 150 dana anaerobne razgradnje: *sintetički* (1), *voluminozni* (2), *bezdrvni premazani* (3), *bezdrvni nepremazani* (4) *reciklirani 33 %* (5), *reciklirani 100 %* (6)

3.4.3. Uzorci tla nakon anaerobne razgradnje papira s otiskom termokromne boje

Papiri s otiskom boje 1.1. *Offset blue Chameleon 27C* koja sadrži bisfenol A podvrgnuti su anaerobnoj razgradnji u tlu uzetom sa šumske lokacije u Samoborskom gorju. Vrijednost pH tla bila je 7,6, udio humusa 8,4 %, vlaga 13,3 %, a gubitak mase žarenjem na 1000 °C 51,4 %. Razgradnja u anaerobnim uvjetima ispitana je na šest vrsta papira s termokromnim otiskom: *sintetičkom*, *voluminoznom*, *recikliranom 33 %*, *recikliranom 100 %*, *bezdrvnom premazanom* i *bezdrvnom nepremazanom*. Za svaku vrstu papira simulirana je anaerobna razgradnja tijekom 14, 32, 50, 80 i 150 dana. Pojedinačni eksperiment anaerobne razgradnje proveden je tako da je papir s termokromnim otiskom, veličine 4 cm × 5 cm, stavljen u staklenku između dva sloja tla. Tiskana strana svih papira bila je okrenuta prema gore. Tlo je navlaženo tako da vlažnost bude oko 20 %. Staklenke su hermetički zatvorene i pohranjene na sobnoj temperaturi. Nakon zaustavljanja anaerobne razgradnje u definiranom vremenu posebno

je prikupljen sloj tla iznad otiska, a posebno ispod kako bi se vidjela razlika u raspodjeli bisfenola A. Masa papira podvrgnutih anaerobnoj razgradnji bila je od 170 mg do 260 mg, a masa tla u kojem su trulili od 88 g do 177 g. Uzorci su do sušenja odnosno analize pohranjeni na temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Simulaciju anaerobne razgradnje napravila je dr. sc. Marina Vukoje na Grafičkom fakultetu.

3.5. Razvoj metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama

3.5.1. Priprava standardnih otopina i uzoraka za razvoj metode

Izvorna otopina (IOB) bisfenola A i benzofenona nazivne koncentracije 400 mg L^{-1} pripravljena je otapanjem 10 mg standarda bisfenola A i benzofenona u 25 mL smjese acetonitrila i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$]. Otapanje je pospješeno djelovanjem ultrazvuka tijekom 10 min. Otopine za kalibraciju pripravljene su razrjeđivanjem izvorne otopine otapalom kao što je prikazano u Tablici 3.3.

Tablica 3.3. Priprava standardnih otopina za razvoj metode

Otopina	V(IOB) / mL	Ukupni volumen / mL	Nazivna koncentracija $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	
			BPA	BFN
SB1	0,25	25	4	4
SB2	0,50	10	20	20
SB3	1,50	10	60	60

Otopine uzoraka pripravljene su tako da je u odmjernu tikvicu od 25 mL odvagano oko 50 mg uzorka, dodano oko 15 mL smjese acetonitrila i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$] i stavljeno 30 min u ultrazvučnu kupelj. Nakon hlađenja otopine, tikvica je dopunjena otapalom, a otopina uzorka profiltrirana kroz PTFE-filtar u bočicu za analizu.

3.5.2. Uvjeti tekućinskokromatografske analize bisfenola A i benzofenona

Bisfenol A i benzofenon su od ostalih komponenti uzorka razdvojeni na koloni Zorbax Eclipse XDB C₁₈, 150 mm × 4,6 mm. uz uporabu predkolone s istom nepokretnom fazom. Temperatura kolone i predkolone bila je 30 °C, volumen injektiranja bio je 5 µL, a vrijeme analize bilo je 28 min. Analize su provedene pomoću tekućinskih kromatografa Infinity LC 1220 i 1100. uz detekciju analita apsorpcijom ultraljubičastog zračenja pri 226 nm za bisfenol A i 254 nm za benzofenon te potvrdu identiteta analita snimanjem apsorpcijskih spektara. Pokretna faza bila je ultračista voda u kanalu A i acetonitril u kanalu B uz gradijentno ispiranje opisano u Tablici 3.4. Protok pokretne faze bio je 1 mL min⁻¹.

Tablica 3.4. Uvjeti gradijentnog ispiranja pri analizi bisfenola A i benzofenona na koloni Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (150 mm × 4,6 mm)

<i>t</i> / min	Sastav pokretne faze		Ispiranje
	$\varphi(\text{A})$ / %	$\varphi(\text{B})$ / %	
0 – 3	53	47	Izokratno
3 – 11	53 – 25	47 – 75	Linearni gradijent
11 – 23	25	75	Izokratno
23 – 23,5	25 – 53	75 – 47	Linearni gradijent
23,5 – 28	53	47	Izokratno

3.5.3. Priprava otopina za optimiranje ekstrakcije bisfenola A i benzofenona iz termokromnih boja

3.5.3.1. Ekstrakcija smjesom acetonitrila i vode i smjesom acetonitrila i pufera

Pripravljen je acetatni pufer koncentracije 0,1 mol L⁻¹ te mu je pH-vrijednost podešena na 5. U osam odmjernih tikvica od 25 mL odvagano je oko 50 mg uzorka boje 1.1. *Offset blue Chameleon* 27 °C. U prve četiri dodano je po 15 mL smjese acetonitrila i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$], a u preostale 15 mL smjese acetonitrila i acetatnog pufera (pH = 5) [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$]. Po jedan pripravljeni uzorak sa svakim od otapala ekstrahiran je u ultrazvučnoj kupelji tijekom 15, 30, 45 i 60 min. Nakon hlađenja tikvice su dopunjene otapalom do oznake i profiltrirane kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.5.3.2. Ekstrakcija acetonitrilom i acetonom

U šest odmjernih tikvica od 25 mL odvagano je oko 100 mg uzorka boje 1.1. *Offset blue Chameleon* 27 °C. U prve četiri dodano je 15 mL acetonitrila, a u preostale dvije 15 mL acetona. Tikvice s acetonitrilom stavljene su u ultrazvučnu kupelj tijekom 15, 30, 45 i 60 min, a tikvice s acetonom tijekom 30 i 60 min. Nakon hlađenja tikvice su dopunjene početnim otapalom do oznake. Po 5 mL svake otopine uzorka pipetirano je u odmjernu tikvicu od 10 mL i dopunjeno vodom do oznake radi usklađivanja s početnim uvjetima eluiranja tijekom tekućinskokromatografske analize. Dodatkom vode u otopinama uzoraka nastaje talog. Nakon miješanja i slijeganja nastalog taloga, otopine su profiltrirane kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.5.3.3. Ekstrakcija acetonom uz uparavanje

U četiri staklene čaše od 50 mL odvagano je oko 50 mg uzorka boje 1.1. *Offset blue Chameleon* 27 °C, dodano je 25 mL acetona i stavljeno u ultrazvučnu kupelj tijekom 15, 30, 45 i 60 min. Dobivene otopine kvantitativno su prelivene u kivete i centrifugirane 10 min na 560 g. Supernatanti su dekantirani u čaše i uparavani u vodenoj kupelji na oko 60 °C dok aceton nije potpuno ispario. U čaše je zatim dodano oko 15 mL smjese acetonitrila i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$]. Čaše su stavljene u ultrazvučnu kupelj tijekom 10 min. Otopine uzoraka prelivene su u odmjerne tikvice od 25 mL, čaše su dodatno isprane s 5 mL otapala te su odmjerne tikvice dopunjene otapalom do oznake. Otopine uzoraka su profiltrirane kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.5.3.4. Ekstrakcija acetonitrilom i metanolom uz optimiranje pripreme uzorka opisane pod 3.5.3.2.

U osam odmjernih tikvica od 50 mL odvagano je oko 100 mg uzorka boje 1.1. *Offset blue Chameleon* 27 °C. U četiri je dodano 30 mL acetonitrila, a u četiri 30 mL metanola. Uzorci su ekstrahirani u ultrazvučnoj kupelji tijekom 15, 30, 45 i 60 min. Nakon hlađenja otopine tikvice su dopunjene vodom do oznake. Nakon hlađenja i slijeganja taloga uzorci su profiltrirani kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.5.3.5. Priprava otopina za optimiranje ekstrakcije bisfenola A i benzofenona

Napravljeno je po šest odvaga uzoraka boja 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C*, 2.1. *Magenta room voda-UV* i 2.2. *Blue-cold* u odmjerne tikvice od 50 mL. U svaku tikvicu dodano je po 30 mL metanola te su uzorci ekstrahirani u ultrazvučnoj kupelji do 150 min u intervalima od 30 min. Nakon hlađenja odmjerne tikvice su dopunjene vodom do oznake. Nakon dodatnog hlađenja i slijeganja taloga otopine uzoraka profiltrirane su kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.6. Validacija metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama

3.6.1. Priprava uzoraka i standardnih otopina za kalibraciju

U procesu validacije i analize uzoraka, uzorci su pripremljeni tako da je oko 100 mg uzorka termokromne boje odvagano u odmjernu tikvicu od 50 mL i otapano u 30 mL metanola u ultrazvučnoj kupelji tijekom 120 min. Nakon hlađenja, tikvica je dopunjena vodom do oznake. Nakon dodatnog hlađenja i slijeganja taloga otopina uzorka profiltrirana kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

Izvorna otopina pripravljena je tako da je u odmjernu tikvicu od 25 mL odvagano oko 10 mg bisfenola A i benzofenona i otapano u metanolu u ultrazvučnoj kupelji tijekom 10 min (otopina IOB nazivne koncentracije 400 mg L⁻¹ BPA i BFN). Otopine za kalibraciju pripravljene su razrjeđenjem izvorne otopine smjesom metanola i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$] kao što je prikazano u Tablici 3.5.

Tablica 3.5. Priprava kalibracijskih otopina za određivanje bisfenola A i benzofenona

Otopina	V(IOB) / mL	Ukupni volumen / mL	Nazivna koncentracija γ / mg L ⁻¹	
			BPA	BFN
CB1	0,25 (CB3)	10	1	1
CB2	0,25	10	10	10
CB3	1,00	10	40	40
CB4	2,50	10	100	100

3.6.2. Priprava otopina za određivanje selektivnosti tekućskokromatografske analize

Otopine za provjeru razlučivanja analita pripravljene su tako da je 470 μL otopina uzorka boja 3.2. *Offset green to yellow*, 4.2. *Wet offset magenta 31 °C*, 5.1. *UV purple to pink 31 °C*, 6.2. *Screen UV red 31 °C* i 7.1. *Flexo UV magenta 15 °C* pomiješano s 30 μL izvorne otopine nazivne koncentracije 400 mg L^{-1} bisfenola A i benzofenona.

3.6.3. Priprava standardnih otopina za određivanje linearnosti odziva UV-detektora

Izvorna otopina (IOB) pripravljena je tri puta otapanjem po 20 mg bisfenola A i benzofenona u 50 mL metanola. Od svake izvorne otopine napravljeno je devet razrjeđenja u smjesi metanola i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,5$] kao što je prikazano u Tablici 3.6.

Tablica 3.6. Priprava otopina bisfenola A i benzofenona za određivanje linearnosti odziva UV-detektora

Otopina	V(IOB) / mL	Ukupni volumen / mL	Nazivna koncentracija $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	
			BPA	BFN
CB1	0,125	100	0,5	0,5
CB2	0,125	50	1	1
CB3	0,25	50	2	2
CB4	0,25	25	4	4
CB5	0,25	10	10	10
CB6	0,5	10	20	20
CB7	1,0	10	40	40
CB8	1,5	10	60	60
CB9	2,5	10	100	100

3.6.4. Priprava otopina za određivanje točnosti metode

U jednu odmjernu tikvicu od 50 mL odvagano je 19,92 mg bisfenola A, a u drugu 19,30 mg benzofenona te otopljeno u metanolu. Napravljeno je šest odvaga uzorka boje 2.2. *Blue-cold* te tri odvage uzorka boje 4.1. *Wet offset blue 45 °C*. U tri odvagana uzorka boje 2.2. *Blue-cold* dodano je 5 mL otopine bisfenola A i 10 mL otopine benzofenona, a u preostale tri 1,5 mL

otopine bisfenola A i 4 mL benzofenona. Odvaganim uzorcima boje 4.1. *Wet offset blue 45 °C* dodano je po 0,5 mL otopina bisfenola A i benzofenona. Uzorcima je dodan metanol do ukupnog volumena od 30 mL te su stavljeni u ultrazvučnu kupelj tijekom 120 min. Tikvice su dopunjene vodom, a otopine uzoraka profiltrirane kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.6.5. Priprava otopina za određivanje granice detekcije i određivanja

Otopina za potvrdu granice određivanja pripravljena je miješanjem 900 μL otopine uzorka boje 4.1. *Wet offset blue 45 °C*, pripremljenog prema postupku 3.6.1., sa 100 μL standardne otopine $\gamma(\text{BPA}) = 9,79 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma(\text{BFN}) = 9,83 \text{ mg L}^{-1}$. Otopina za potvrdu granice detekcije u uzorcima pripravljena je miješanjem 965 μL otopine istog uzorka s 35 μL gore navedene standardne otopine te razrjeđenjem 300 μL dobivene otopine sa 600 μL otapala. Konačne koncentracije bisfenola A i benzofenona u otopini za potvrdu granice određivanja bile su $0,98 \text{ mg L}^{-1}$, a u otopini za potvrdu granice detekcije $0,11 \text{ mg L}^{-1}$.

3.6.6. Analiza termokromnih boja vezanim sustavom tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa

Uzorci termokromnih boja analizirani su na koloni Zorbax Eclipse XDB pri sobnoj temperaturi. Volumen injektiranja bio je 10 μL , a vrijeme analize 18 min. Analize su provedene pomoću tekućinskog kromatografa Agilent 1200 spregnutog sa spektrometrom masa 6420 triple quad.

Pokretna faza bila je ultračista voda u kanalu A i metanol u kanalu B uz gradijentno ispiranje opisano u Tablici 3.7. Protok pokretne faze bio je $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.

Tablica 3.7. Uvjeti gradijentnog ispiranja pri analizi bisfenola A i benzofenona na koloni Zorbax Eclipse XDB (75 mm \times 4,6 mm)

t / min	Sastav pokretne faze		Ispiranje
	$\varphi(\text{A}) / \%$	$\varphi(\text{B}) / \%$	
0 – 8	40 – 0	60 – 100	Linearni gradijent
8 – 15	0	100	Izokratno
15 – 15,1	0 – 40	100 – 60	Linearni gradijent
15,1 – 18	40	60	Izokratno

Za detekciju spojeva korištena je ionizacija elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom načinu rada. Temperatura ionskog izvora bila je 300 °C, a napon kapilare 3000 V. Plin za nebulizaciju bio je dušik (30 psi). Dušik pri tlaku od 3,5 bara korišten je kao kolizijski plin. Uvjeti ionizacije i fragmentiranja optimirani su za svaki analit. Potencijal fragmentora pri analizi bisfenola A iznosio je 135 V, a pri analizi benzofenona 100 V. Odgovarajuće kolizijske energije bile su 20 eV, odnosno 10 eV. Pretražno vrijeme za oba analita bilo je 100 ms. Od početka analize do 9,5 min bilježeni su negativno nabijeni ioni, a od 9,2 do kraja analize pozitivno nabijeni ioni čime je povećana osjetljivost određivanja.

3.7. Razvoj metode za određivanje bisfenola A u otiscima termokromne boje na papiru

3.7.1. Uvjeti tekućinskokromatografske analize BPA ekstrahiranog iz papira s termokromnim otiscima

Bisfenol A je od ostalih komponenti uzoraka razdvojen na koloni Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (75 mm × 4,6 mm) uz uporabu predkolone s istom nepokretnom fazom. Temperatura kolone i predkolone bila je 30 °C, volumen injektiranja bio je 50 µL, a vrijeme analize je bilo 28 min. Analize su provedene pomoću tekućinskih kromatografa Infinity LC 1220 i 1100 uz detekciju analita apsorpcijom ultraljubičastog zračenja pri 226 nm.

Pokretna faza bila je ultračista voda u kanalu A i acetonitril u kanalu B uz gradijentno ispiranje opisano u Tablici 3.8. Protok pokretne faze bio je 1 mL min⁻¹.

Tablica 3.8. Uvjeti gradijentnog ispiranja pri analizi bisfenola A na koloni Zorbax Eclipse XDB (150 mm × 4,6 mm)

<i>t</i> / min	Sastav pokretne faze		Ispiranje
	$\varphi(\text{A})$ / %	$\varphi(\text{B})$ / %	
0 – 3	53	47	Izokratno
3 – 11	53 – 25	47 – 75	Linearni gradijent
11 – 25	25	75	Izokratno
25 – 25,5	25 – 53	75 – 47	Linearni gradijent
25,5 – 28	53	47	Izokratno

3.7.2. Priprava uzoraka za odabir otapala i optimiranje vremena ekstrakcije

Uzorci za optimiranje vremena ekstrakcije i odabir najboljeg otapala pripremljeni su tako da je napravljeno 15 odvaga papira navigator s termokromnim otiskom i tri odvage papira navigator bez boje mase od 25 mg do 35 mg. Odvagani uzorci papira narezani su na komadiće veličine oko $2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ u odmjerne tikvice od 10 mL. Uzorci su podijeljeni u tri skupine. U svakoj skupini bio je po jedan papir bez boje i pet papira s bojom. Svako skupini uzoraka dodano je po 6 mL odgovarajućeg otapala: metanola, acetona ili acetonitrila. Uzorci su stavljeni u ultrazvučnu kupelj. Tikvice s papirima bez boje bile su u ultrazvučnoj kupelji tijekom 150 min, a ostale tijekom 30, 60, 90, 120 i 150 min za svako otapalo. Nakon hlađenja tikvice su dopunjene vodom do oznake, a otopine uzoraka profiltrirane u bočice za analizu kroz PTFE-filtre.

Uzorci za optimiranje vremena ekstrakcije u modelnim otopinama znoja prema normama EN 1811⁸⁰ i ISO 3160-2^{81,82} pripremljeni su tako da je napravljeno 10 odvaga papira *Navigator* s termokromnim otiskom mase od 30 mg do 35 mg. Uzorci papira narezani su na komadiće dimenzija oko $2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ u odmjerne tikvice od 10 mL. U pet odmjernih tikvica dodano je 6 mL modelne otopine znoja prema normi EN 1811, a u pet prema normi ISO 3160-2. Svaka serija uzoraka ekstrahirana je u ultrazvučnoj kupelji do 150 min s intervalima od 30 min. Nakon hlađenja tikvice su dopunjene odgovarajućim otopinama znoja, a uzorci profiltrirani kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.7.3. Priprava modelnih otopina znoja

Modelna otopina znoja prema normi EN 1811 (DIN V 53160-2) pripravljena je tako da je u odmjernoj tikvici od 500 mL u vodi otopljeno 2,5 g NaCl, 0,5 g uree i 0,47 mL 88 %-tne mliječne kiseline. Vrijednost pH podešena je na $6,5 \pm 0,1$ s 1 %-tnom otopinom amonijaka.⁸⁰

Modelna otopina znoja prema ISO 3160-2 standardu pripravljena je tako da je u odmjernoj tikvici od 500 mL u vodi otopljeno 10 g NaCl, 8,8 g NH₄Cl, 2,5 mL ledene octene kiseline i 7 mL 88 %-tne mliječne kiseline. Vrijednost pH podešena je na $4,7 \pm 0,1$ s 3 mol L⁻¹ otopinom NaOH.^{81,82}

3.7.4. Priprava uzoraka za ispitivanje ekstrakcije s papira uzimanjem brisa

Uzorci za ispitivanje ekstrakcije uzimanjem brisa s površine papira pripremljeni su tako da je odvagano uzorak veličine oko 3 cm × 3 cm (oko 100 mg). Površina uzorka obrisana je vatenim štapićem prethodno namočenim u metanol. Kraj štapića s vatom odrezan je i stavljen u odmjernu tikvicu od 5 mL u kojoj je bilo 3 mL metanola. Nakon ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji tijekom 45 min tikvica je dopunjena vodom i uzorak profiltriran kroz PTFE-filtar u bočicu za analizu.

3.7.5. Priprava uzoraka za ispitivanje ekstrakcije s papira mućkanjem

Uzorci za ekstrakciju bisfenola A u modelne otopine znoja u tresilici pri sobnoj temperaturi pripremljeni su tako da je odvaga od oko 30 mg papira narezana na komadiće u odmjernu tikvicu od 25 mL. Dodano je 9 mL odgovarajuće otopine znoja i stavljeno na tresilicu 1 h na 125 Hz. Nakon ekstrakcije otopina je preko cjedila i lijevka prenesena u odmjernu tikvicu od 10 mL, dopunjena odgovarajućom otopinom znoja do oznake i profiltrirana kroz PTFE-filtar u bočicu za analizu.

3.8. Validacija metode za određivanje bisfenola A u otiscima termokromne boje na papiru

3.8.1. Priprava uzoraka

Uzorci za ultrazvučnu ekstrakciju bisfenola A metanolom i modelnim otopinama znoja pripremljeni su tako da je oko 30 mg papira narezano na komadiće veličine oko 2 mm × 2 mm u odmjernu tikvicu od 10 mL. Dodano je 6 mL medija te su uzorci ekstrahirani u ultrazvučnoj kupelji tijekom 60 min. U slučaju ekstrakcije metanolom, tikvice su nakon hlađenja dopunjene vodom, a u slučaju ekstrakcije s modelnim otopinama znoja, odgovarajućom otopinom. Svi uzorci su profiltrirani kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.8.2. Priprava standardnih otopina za kalibraciju i određivanje linearnosti odziva UV-detektora

Za svaku ekstrakcijsku otopinu (metanol, znoj EN 1811 i znoj ISO 3160-2) napravljene su po tri odvage bisfenola A od 10 mg u odmjernu tikvicu od 50 mL i otopljene u metanolu (IOP1, IOP2 i IOP3). Od svake izvorne otopine napravljeno je osam razrjeđenja u smjesi metanola i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,5$] kao što je prikazano u Tablici 3.9. Za modelne otopine znoja standardne otopine za kalibraciju pripravljene se razrjeđenjem izvorne otopine s odgovarajućom modelnom otopinom. Pripravljena su sva razrjeđenja prikazana u Tablici 3.9 osim CP4.

Tablica 3.9. Priprava kalibracijskih otopina bisfenola A za ispitivanje linearnosti

Kalibracijska otopina	Pipetirani volumen / mL	Pipetirana otopina	Ukupni volumen / mL	Nazivna koncentracija $\gamma(\text{BPA}) / \text{mg L}^{-1}$
CP1	1,00	CP4	10	0,005
CP2	2,00	CP4	10	0,010
CP3	4,00	CP4	10	0,020
CP4	0,25	CP8	25	0,050
CP5	0,20	CP8	10	0,100
CP6	1,00	CP8	10	0,500
CP7	2,00	CP8	10	1,000
CP8	0,625	IOP	25	5,000

3.8.3. Priprava otopina za određivanje točnosti

Otopine za određivanje točnosti metode pripravljene su dodatkom standardne otopine bisfenola A u uzorke za ekstrakciju na tri koncentracijska nivoa. Za svaku ekstrakcijsku otopinu i za svaku koncentraciju pripravljena su po tri uzorka. Za ispitivanje djelotvornosti ekstrakcije metanolom pripravljene su tri odvage papira *reciklirani 33 %* bez termokromnog otiska i šest odvaga istog papira s termokromnim otiskom. Svi uzorci narezani su na komadiće u odmjerne tikvice od 10 mL. U prve tri tikvice (papir bez otiska) dodano je 0,2 mL standardne otopine bisfenola A u metanolu masene koncentracije 5 mg L^{-1} , u sljedeće tri dodan je po 1 mL, a u zadnje tri 5 mL. Zatim je u prve tri tikvice dodano 5,8 mL metanola, u sljedeće tri 5 mL, a u zadnje tri 1 mL tako da ukupni volumen otapala za ekstrakciju bude 6 mL.

Za ispitivanje djelotvornosti ekstrakcije s modelnim otopinama znoja pripravljeno je šest odvaga papira *reciklirani 100 %* bez termokromnog otiska te 12 odvaga istog papira s termokromnim otiskom. Svi uzorci narezani su na komadiće u odmjerne tikvice od 10 mL. U svaku tikvicu dodana je standardna otopina bisfenola A masene koncentracije 5 mg L^{-1} pripravljena u odgovarajućim modelnim otopinama znoja. U uzorke papira bez termokromnog otiska dodano je 0,2 mL standardne otopine bisfenola A u modelnoj otopini znoja prema normi EN 1811, a u tri 0,2 mL standardne otopine u modelnoj otopini znoja prema normi ISO 3610-2. Svakom uzorku dodano je po 5,8 mL odgovarajuće modelne otopine znoja. Za ispitivanje točnosti metode na srednjem koncentracijskom nivou, u tri uzorka papira s termokromnim otiskom dodan je 1 mL standardne otopine bisfenola A u odgovarajućoj modelnoj otopini znoja te 5 mL iste modelne otopine. Za ispitivanje točnosti metode na najvišem koncentracijskom nivou, u tri uzorka papira s termokromnim otiskom dodano je 4 mL standardne otopine bisfenola A u odgovarajućoj modelnoj otopini znoja i 2 mL iste modelne otopine.

Tako pripremljeni uzorci stavljeni su u ultrazvučnu kupelj 1 h te zatim dopunjeni odgovarajućim otapalom (metanolom ili modelnim otopinama znoja) i profiltrirani kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.8.4. Priprava otopina za određivanje granice detekcije i određivanja

Za određivanje granice detekcije uzorak papira bez termokromnog otiska pripremljen je prema postupku opisanom pod 3.8.1. Otopini uzorka dodana je otopina standarda koncentracije $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ u volumnom omjeru 1:4 da se dobije masena koncentracija od $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$ u otopini odnosno $w(\text{BPA}) = 0,0008 \text{ mg g}^{-1}$ u uzorku. Otopina za određivanje granice određivanja pripravljena je tako da je uzorak papira bez termokromnog otiska pripremljen kao što je opisano pod 3.8.1. Otopini uzorka dodana je otopina standarda koncentracije $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ u volumnom omjeru 3:37 (30 μL otopine standarda + 370 μL slijepi uzorak). Masena koncentracija bisfenola A u otopini bila je $0,0075 \text{ mg L}^{-1}$, a maseni udjel u uzorku $0,0025 \text{ mg g}^{-1}$.

3.9. Razvoj metode za određivanje bisfenola A u tlu

3.9.1. Uvjeti tekućinskokromatografske analize BPA ekstrahiranog iz tla

Bisfenol A je od ostalih komponenti uzorka razdvojen na koloni Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (150 mm × 4,6 mm) uz uporabu predkolone s istom nepokretnom fazom. Temperatura kolone i predkolone bila je 30 °C, volumen injektiranja bio je 100 µL, a vrijeme analize je bilo 38 min. Analize su provedene pomoću tekućinskih kromatografa Infinity LC 1220 i 1100 uz detekciju analita apsorpcijom ultraljubičastog zračenja pri 226 nm. Pokretna faza bila je ultračista voda u kanalu A i acetonitril u kanalu B uz gradijentno ispiranje opisano u Tablici 3.10. Protok pokretne faze bio je 1 mL min⁻¹.

Tablica 3.10. Uvjeti gradijentnog ispiranja pri analizi bisfenola A na koloni Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (150 mm × 4,6 mm)

<i>t</i> / min	Sastav pokretne faze		Ispiranje
	$\varphi(\text{A})$ / %	$\varphi(\text{B})$ / %	
0 – 3	53	47	Izokratno
3 – 11	53 – 20	47 – 80	Linearni gradijent
11 – 35	20	80	Izokratno
35 – 35,5	20 – 53	80 – 47	Linearni gradijent
35,5 – 38	53	47	Izokratno

3.9.2. Priprava uzoraka uz uparavanje pri sniženom tlaku

3.9.2.1. Odabir otapala prikladnog za ekstrakciju

U šest odmjernih tikvica od 50 mL odvagano je oko 5 g suhog tla. U dvije tikvice dodano je 25 mL metanola, u dvije 25 mL acetona i u dvije 25 mL etil-acetata. Uzorci su ekstrahirani u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 min, ekstrakt je od taloga odvojen centrifugiranjem 10 min na 1258 g te zatim oddekantiran, uparen do suha na rotirajućem isparivaču pri sniženom tlaku. Suhi ostatak otopljen je u 1,5 mL metanola i 1,5 mL vode uz pomoć ultrazvuka te profiltriran kroz PTFE-filtar u bočicu za analizu.

3.9.2.2. Priprava modelnih uzoraka za određivanje djelotvornosti višekratne ekstrakcije

U 6 odmjernih tikvica od 50 mL odvagano je po 5 g suhog tla koje nije bilo u doticaju s papirima s termokromnim otiscima. U svaku tikvicu dodano je 100 μ L standardne otopine bisfenola A koncentracije 5,47 mg L⁻¹ i 2,5 mL etil-acetata. Nastala suspenzija s tlom promiješana je i ostavljena na zraku 24 h da se osuši. Nakon sušenja, u tri je tikvice dodano 15 mL, a u tri 25 mL etil-acetata. Sve tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj tijekom 30 min. Ekstrakt iz tikvica s 15 mL etil-acetata je oddekantiran te je dodano još 10 mL etil-acetata. Tikvica je ponovo stavljena u ultrazvučnu kupelj 30 minuta nakon čega su ekstrakti spojeni. Sve otopine centrifugirane su 10 min na 1258 g. Ekstrakti u etil-acetatu preneseni su u okrugle tikvice od 100 mL i upareni do suha. Preostala suha tvar otopljen je u 1,5 mL metanola i 1,5 mL vode u ultrazvučnoj kupelji te profiltrirana kroz PTFE-filtar u bočicu za analizu.

3.9.2.3. Priprava modelnih uzoraka za ispitivanje utjecaja volumena etil-acetata na djelotvornost ekstrakcije

U 9 odmjernih tikvica od 50 mL odvagano je po 5 g suhog tla koje nije bilo u doticaju s papirima s termokromnim otiscima. U svaku tikvicu dodano je 100 μ L standardne otopine bisfenola A koncentracije 5,47 mg L⁻¹ i 2,5 mL etil-acetata. Nastala suspenzija s tlom promiješana je i ostavljena na zraku 24 h da se osuši. Nakon sušenja u tri je tikvice dodano po 15 mL etil-acetata, u tri po 25 mL te u tri po 35 mL. Sve tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 min. Sve su otopine centrifugirane 10 min na 1258 g. Ekstrakti u etil-acetatu preneseni su u okrugle tikvice od 100 mL i upareni do suha. Preostala suha tvar otopljen je u 1,5 mL metanola i 1,5 mL vode u ultrazvučnoj kupelji te profiltrirana kroz PTFE-filtar u bočicu za analizu.

3.9.2.4. Priprava modelnih uzoraka za odabir otapala za otapanje suhog ostatka nakon uparavanja ekstrakta

U 9 odmjernih tikvica od 50 mL odvagano je po 5 g suhog tla koje nije bila u doticaju s papirima s termokromnim otiscima. U svaku tikvicu dodano je 100 μ L standardne otopine BPA koncentracije 4,86 mg L⁻¹ i 2,5 mL etil-acetata. Nastala suspenzija s tlom promiješana je i ostavljena na zraku 24 h da se osuši. Nakon sušenja, u sve tikvice dodano je po 25 mL etil-acetata te su tikvice stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 min. Nakon ekstrakcije, sadržaj svake tikvice je centrifugiran 10 min na 1258 g. Ekstrakti u etil-acetatu su preneseni u okrugle tikvice

od 100 mL i upareni do suha. Preostala suha tvar u prve tri tikvice otopljena je u 2,5 mL acetona, u druge tri u 2,5 mL metanola, a u zadnje tri u 2,5 mL acetonitrila. Nakon 2 min otapanja suhe tvari u ultrazvučnoj kupelji u sve je tikvice dodano po 2,5 mL vode, te je ponovljena ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji tijekom 2 min. Otopine uzoraka profiltrirane su kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.9.2.5. Priprava modelnih uzoraka za optimiranje volumena otapala za otapanje suhog ostatka nakon uparavanja ekstrakta

U 9 odmjernih tikvica od 50 mL odvagano je po 5 g suhog tla koje nije bila u doticaju s papirima s termokromnim otiscima. U svaku tikvicu dodano je 100 μ L standardne otopine bisfenola A koncentracije 4,86 mg L⁻¹ i 2,5 mL etil-acetata. Nastala suspenzija s tlom promiješana je i ostavljena 24 h na zraku da se osuši. Nakon sušenja u sve tikvice dodano je po 25 mL etil-acetata te su tikvice stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 min. Nakon ekstrakcije, sadržaj svake tikvice centrifugiran je 10 min na 1258 g. Ekstrakti u etil-acetatu preneseni su u okrugle tikvice od 100 mL i upareni do suha. Preostala suha tvar u prve tri tikvice otopljena je u 1,5 mL metanola i 1,5 mL vode, sljedeće tri tikvice u 2 mL metanola i 2 mL vode, a u zadnje tri tikvice u 2,5 mL metanola i 2,5 mL vode. Otopine uzoraka profiltrirane su kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.9.2.6. Priprava standardnih otopina za ispitivanje utjecaja matrice na odziv UV-detektora

Kako bi se skupio dovoljni volumen ekstrakta tla za pripravu standardnih otopina u matrici dva su uzorka tla, koje nije bilo u kontaktu s papirima, ekstrahirana prema konačnom definiranom postupku za pripravu uzoraka opisanom pod 3.10.1. Izvorna otopina bisfenola A (IOZ) pripravljena je otapanjem 5 mg standarda u 25 mL metanola ($\gamma(\text{BPA}) = 200 \text{ mg L}^{-1}$). Standardna otopina (SOZ) bisfenola A masene koncentracije 5 mg L⁻¹ pripravljena je razrjeđenjem 0,625 mL izvorne otopine na 25 mL sa smjesom metanola i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,5$]. Standardne otopine za kalibraciju u pripravljene su razrjeđenjem otopine SOZ smjesom metanola i vode kao što je prikazano u Tablici 3.11. Standardne otopine za kalibraciju u matrici pripravljene su razrjeđenjem otopine SOZ i otopine MSZ4 s matricom kao što je prikazano u Tablici 3.12.

Tablica 3.11. Priprava standardnih otopina bisfenola A za ispitivanje utjecaja matrice na odziv UV-detektora

Standardna otopina	Pipetirani volumen SOZ / μL	Ukupni volumen / mL	Nazivna koncentracija $\gamma(\text{BPA}) / \text{mg L}^{-1}$
SZ1	20	10	0,01
SZ2	40	5	0,04
SZ3	200	5	0,20
SZ4	500	5	0,50
SZ5	1000	5	1,00

Tablica 3.12. Priprava standardnih otopina bisfenola A u ekstraktu zemlje (matrici)

Standardna otopina	Pipetirani volumen / μL	Pipetirana otopina	Volumen matrice / μL	Nazivna koncentracija $\gamma(\text{BPA}) / \text{mg L}^{-1}$
MSZ1	25	MSZ4	475	0,01
MSZ2	100	MSZ4	400	0,04
MSZ3	40	SOZ	960	0,20
MSZ4	50	SOZ	450	0,50
MSZ5	100	SOZ	400	1,00

3.10. Validacija metode za određivanje bisfenola A u tlu

3.10.1. Priprava ekstrakta tla

U odmjernu tikvicu od 50 mL odvagano je 5 g suhog tla. Dodano je 25 mL etil-acetata i stavljeno u ultrazvučnu kupelj 30 min. Nakon ekstrakcije sadržaj svake tikvice je centrifugiran 10 min na 1258 g. Supernatant je oddekantiran u okruglu tikvicu od 100 mL i uparen do suha pri sniženom tlaku pomoću rotirajućeg isparivača. Preostala suha tvar otopljena je u 1,5 mL metanola tijekom 2 min u ultrazvučnoj kupelji nakon čega je dodano 1,5 mL vode i ponovo otapano 2 min u ultrazvučnoj kupelji. Otopina je profiltrirana kroz PTFE-filtar u bočice za analizu.

3.10.2. Priprava standardnih otopina za kalibraciju i određivanje linearnosti odziva UV-detektora

Izvorna otopina bisfenola A (IOZ) pripravljena je otapanjem 5 mg bisfenola A u 25 mL smjese metanola i vode [$\rho(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,5$]. Standardna otopina (SOZ) koncentracije 5 mg L⁻¹ pripravljena je tako da je 0,625 mL izvorne otopine razrijeđeno na 25 mL smjesom metanola i vode. Standardne otopine za kalibraciju pripravljene su razrjeđenjem otopine SOZ kao što je prikazano u Tablici 3.13.

Tablica 3.13. Priprava standardnih otopina za određivanje bisfenola A u tlu

Kalibracijska otopina	Pipetirani volumen / μL	Pipetirana otopina	Ukupni volumen / μL	$\gamma(\text{BPA}) / \text{mg L}^{-1}$	$w(\text{BPA}/\text{tlo}) / \mu\text{g g}^{-1}$
SZ1/8	2500	S1	5	0,00125	0,00075
SZ1/4	2500	S1	10	0,0025	0,0015
SZ1	20	SOZ	10	0,0100	0,0060
SZ2	40	SOZ	5	0,0400	0,0240
SZ3	200	SOZ	5	0,2000	0,1200
SZ4	500	SOZ	5	0,5000	0,3000
SZ5	1000	SOZ	5	1,0000	0,6000

3.10.3. Priprava ekstrakta modelnih uzoraka tla za određivanje preciznosti metode

U 6 odmjernih tikvica od 50 mL odvagano je 5 g suhog tla koje nije bilo u doticaju s papirima s termokromnim otiscima. U svaku tikvicu dodano je 100 μL otopine standarda bisfenola A koncentracije 5 mg L⁻¹ i 2,5 mL etil-acetata. Nastala suspenzija s tlom je promiješana i ostavljena na zraku 24 h da se osuši. Nakon sušenja, u sve je tikvice dodano 25 mL etil-acetata te su tikvice stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 min. Nakon ekstrakcije sadržaj svake tikvice je centrifugiran 10 min na 1258 x g. Ekstrakti u etil-acetatu preneseni su u okrugle tikvice od 100 mL i upareni do suha. Preostala suha tvar otopljena je u 1,5 mL metanola i 1,5 mL vode u ultrazvučnoj kupelji te je otopina profiltrirana kroz PTFE-filtre u bočice za analizu.

3.10.4. Priprava ekstrakta modelnih uzoraka tla za određivanje točnosti metode

U 9 odmjernih tikvica od 50 mL odvagano je 5 g suhog tla koja nije bilo u doticaju s papirima s termokromnim otiskom. U prve tri tikvice dodano je 60 μL standardne otopine SZ4 masene koncentracije 0,5 mg L⁻¹. U sljedeće tri tikvice dodano je 60 μL otopine SOZ masene koncentracije 5 mg L⁻¹, a u zadnje tri 500 μL iste otopine. Priprava standardnih otopina opisana je pod 3.10.2. U sve tikvice dodano je po 2,5 mL etil-acetata. Nastale suspenzije tla su promiješane i ostavljene 24 h na zraku da se osuše. Nakon sušenja, u sve tikvice je dodano 25 mL etil-acetata te su tikvice stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 min. Nakon ekstrakcije sadržaj svake tikvice je centrifugiran 10 min na 1258 x g. Ekstrakti u etil-acetatu preneseni su u okrugle tikvice od 100 mL i upareni do suha. Preostala suha tvar otopljena je u 1,5 mL metanola i 1,5 mL vode u ultrazvučnoj kupelji. Otopina je profiltrirana kroz PTFE-filtar u bočicu za analizu.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama

Cilj ovog dijela rada bio je razviti i validirati metodu kojom će se moći odrediti sadrži li neka termokromna boja bisfenol A i benzofenon i u kojoj količini, kako bi se kasnije znalo u kojim se otiscima boje na papiru i uzorcima tla mogu očekivati ovi analiti.

Tekućinska kromatografija obrnutih faza na koloni C₁₈ uz UV-detekciju odabrana je za analizu BPA i benzofenona u termokromnim bojama na temelju velikog broja radova u kojima su bisfenol A i benzofenon već određivani ovom tehnikom.^{10,13–16,18,20,21,28,30,34,63–65} Očekivani maseni udjeli oba analita u termokromnim bojama su prema literaturi reda veličine postotka pa osjetljivost određivanja u ovom slučaju nije bila kritična.^{2,3} Trebalo je obratiti pažnju da razrjeđenje uzorka bude takvo da koncentracija analita ne preopterećuje kolonu i da je u linearnom području odziva detektora. Koliko nam je poznato, do razvoja ove metode nije bilo objavljenih radova u kojima su bisfenol A i benzofenon simultano određivani. Također, nije bilo objavljenih radova o analizi toksičnih komponenti termokromnih boja. Usprkos velikom broju objavljenih radova o analizi bisfenola A, nije bilo radova o njegovoj analizi u sličnim matricama velike viskoznosti i s visokim udjelom raznih ugljikovodika.

Za ovo istraživanje odabran je uzorak od petnaest termokromnih boja renomiranih svjetskih proizvođača. Prema proizvođaču, načinu sušenja i tiska boje su podijeljene u sedam skupina s jednim do četiri predstavnika po skupini kao što je prikazano u Tablici 3.1. Zbog patentne zaštite te stoga što se ne radi o prehrambenim niti farmaceutskim proizvodima, proizvođači ne navode i nisu obavezni navoditi točan kemijski sastav termokromnih boja. O vrlo složenim uzorcima proizvođači navode samo okvirne informacije. Jedino je za uzorak 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* bio dostupan podatak da sadrži 2 % bisfenola A što je korišteno kao ciljana vrijednost tijekom razvoja metode.

4.1.1. Razvoj metode

4.1.1.1. Uzorkovanje i otapanje uzoraka

Prvi problem u razvoju metode bilo je kvantitativno uzorkovanje. Zbog velike viskoznosti (18 Pas do 200 Pas) uzorke nije bilo moguće prenijeti u odmjernu tikvicu uobičajenim metodama npr. spatulom ili pipetom, čak niti nakon zagrijavanja uzorka do temperature od

oko 60 °C. Uzorkovanje boje riješeno je pomoću plastične brizgalice od 1 mL u koju se uvuče mala količina uzorka, vanjska strana brizgalice se obriše od ostatka uzorka staničevinom i uzorak se unese u odmjernu tikvicu. Uzorak se dodaje kap po kap do željene mase. Zbog mase kapi viskoznog uzorka koja je bila oko 30 mg, priprava je podešena tako da se oko 100 mg uzorka odvaže u odmjernu tikvicu od 50 mL. To je bila minimalna masa pri kojoj su odvage uzoraka bile ujednačene (od 85 mg do 115 mg). Volumen otapala u kojemu su uzorci otapani usklađen je obzirom na koncentraciju analita u uzorku i optimalnu količinu uzorka i analita koja se može injektirati na kolonu.

Sljedeći korak bio je odabir odgovarajućeg otapala i optimalnih uvjeta pri kojima će se bisfenol A i benzofenon ekstrahirati iz boje u otopinu. U prvoj seriji pokusa topljivost uzoraka ispitana je u acetonitrilu, smjesi acetonitrila i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$] te u acetonu uz obradu u ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 min. Aceton se u početku činio kao bolje otapalo jer prema literaturi razara melaminsku inkapsulaciju termokromne boje unutar koje se nalazi razvijatelj bisfenol A i postojala je mogućnost da razaranje inkapsulacije utječe na učinkovitost ekstrakcije BPA.⁴² Neki uzorci su se potpuno degradirali u svim ispitanim otapalima, dok je kod nekih otapanjem u acetonitrilu i smjesi acetonitrila i vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$] u otopini zaostala grudasta nakupina nepolarnog materijala. Analize su pokazale da su kromatogrami uzoraka otopljenih u acetonitrilu i u acetonu jednaki osim velike kromatografske krivulje acetona na početku kromatograma stoga je acetonitril bio prikladnije otapalo za HPLC analizu bez potrebe dodatnog uparavanja uzorka i otapanja u pokretnoj fazi.

Ispitana je topljivost uzoraka i u smjesi acetonitrila i fosfatnog pufera (pH = 3) [$\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,5$] zbog eventualnog utjecaja razaranja inkapsulacije na djelotvornost ekstrakcije BPA.⁴² Navedeni pufer primijenjen je i kao polarna komponenta pokretne faze, no kromatografske krivulje su bile vrlo razvučene i asimetrične.

U uzorcima koji su otopljeni samo u acetonitrilu ili acetonu, dodatkom vode nastao je talog zbog čega je konačni sastav otopine uzorka trebalo prilagoditi početnom sastavu pokretne faze. Početna priprava uzoraka i kalibracijskih otopina otapanjem boje u smjesi acetonitrila i vode opisana je pod 3.5.1. Uz navedenu pripravu maseni udio bisfenola A u uzorku 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* bio je oko 0,5 %. Ova priprava korištena je za podešavanje kromatografskih uvjeta kako bi se postigla odgovarajuća selektivnost analize bisfenola A i drugih komponenata uzoraka.

4.1.1.2. Optimiranje kromatografskih uvjeta

Metoda za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama razvijena je na koloni Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (150 × 4,6 mm). Uz standardni protok pokretne faze od 1 mL min⁻¹ te podešavanje gradijentnog eluiranja smjesom vode i acetonitrila dobiveni su kromatogrami u kojima je bisfenol A potpuno razlučen od drugih komponenti i dovoljno udaljen od vremena zadržavanja nezadržanog sastojka. Blizu vremena zadržavanja benzofenona u nekim se uzorcima eluiraju dvije neidentificirane komponente, ali s različitim maksimumima apsorpcije UV-zračenja (Slike 8.2 do 8.8 u Dodatku). Nizom eksperimenata modifikacije gradijentnog eluiranja dokazano je da uz kolonu ove selektivnosti nije moguće postići bolje razdvajanje. Gradijentno eluiranje podešeno je tako da se sve jako zadržane komponente eluiraju s kolone u optimalnom vremenu od 28 min.

Temperatura kolone bila je 30 °C što je malo iznad sobne temperature kako bi se osigurala ujednačenost tijekom svih analiza. Viša temperatura nije bila potrebna jer je razlučivanje bisfenola A dobro uz optimalno trajanje analize, a znatnije povišenje temperature utječe i na trajnost kolone. Obzirom da se u termokromnim bojama određuju maseni udjeli bisfenola A i benzofenona u postocima, dovoljna količina analita unesena je u kolonu relativno malim volumenom injektiranja od 5 µL. Valna duljina detekcije bisfenola A bila je 226 nm što je u skladu s podacima iz literature,²⁰ a benzofenona 254 nm što je blizu podacima pronađenim u literaturi gdje je benzofenon određivan pri 256 nm i 250 nm.^{28,30} Obje valne duljine detekcije određene su snimanjem UV-spektra pomoću detektora s nizom fotodioda tijekom analize čime je obuhvaćen i utjecaj matrice koja može malo utjecati na promjenu valne duljine apsorpcijskog maksimuma. Snimanjem UV-spektara tijekom cijele analize svih uzoraka, ustanovljeno je da niti jedan uzorak ne sadrži u značajnoj koncentraciji komponente koje bi zbog bliskog maksimuma apsorpcije ometale analizu bisfenola A i benzofenona. U više je navrata tijekom analize primijećeno eluiranje komponenata s maksimumom apsorpcije pri valnoj duljini nižoj od 200 nm što odgovara deklariranom sastavu uzoraka koji sadrže od 10 % do 20 % miješanih ugljikovodika. Ove bi komponente mogle podizanjem osnovne linije ometati određivanje vrlo niskih koncentracija analita.

Pokretna faza sastavljena od vode i acetonitrila bila je jednostavna za pripremu i prikladna za održavanje kolone i instrumenta te za naknadnu analizu tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Vrijednost pH ove pokretne faze bila je oko 6,5 i pri njoj su oba analita u neutralnom obliku, pogodnom za određivanje

kromatografijom obrnutih faza. Također, uz odabranu pokretnu fazu sve su kromatografske krivulje bile simetrične, dok su uz uporabu fosfatnog pufera pH-vrijednosti 3 kromatografske krivulje bile razvučene i asimetrične. Kromatografski uvjeti primjenjeni za daljnji razvoj i validaciju metode opisani su pod 3.5.2. Nakon podešavanja optimalnih kromatografskih uvjeta pristupilo se daljnjoj razradi uvjeta ekstrakcije bisfenola A iz uzorka boje 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* kako bi se postiglo da analizirana vrijednost bude što bliža deklariranoj. Napravljen je niz eksperimenata s otapalima tipičnim za kromatografiju obrnutih faza u kojima je topljivost analita bila dobra.

4.1.1.3. Optimiranje pripreve uzoraka za određivanje bisfenola A i benzofenona

Udio bisfenola A u uzorku boje 1.1 *Offset blue Chameleon 27 °C* određen uz početnu pripravu bio je 0,5 %, dok u drugim uzorcima nije pronađen ni bisfenol A niti benzofenon. Prema sigurnosno-tehničkom listu i informaciji dobivenoj od proizvođača *Thermochromic Measurements Ltd.* uzorak 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* sadrži oko 2 % bisfenola A. Zbog razlike deklariranih podataka i rezultata analize dodatno je provjerena djelotvornost ekstrakcije bisfenola A različitim otapalima.

Ultrazvučna ekstrakcija bisfenola A iz uzorka boje 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* provedena je s više različitih otapala te smjesama otapala uz različito trajanje ekstrakcije. Odabrana otapala bila su acetonitril, smjesa acetonitrila i vode, smjesa acetonitrila i acetatnog pufera, aceton i metanol. Acetonitril i metanol odabrani su kao tipična otapala u tekućinskoj kromatografiji, a aceton i acetatni pufer pH-vrijednosti 5 na temelju literaturnih podataka da ketoni i pH-vrijednost niža od 6 razaraju inkapsulaciju termokromnih boja.⁴² Nedostatak otapanja uzoraka u acetatnom puferu i acetonu je apsorpcija ultraljubičastog zračenja obiju komponenti zbog čega je na početku kromatograma ovih uzoraka zabilježena velika dodatna kromatografska krivulja. Zbog toga je za ekstrakciju uzoraka acetonom napravljen i eksperiment s uparavanjem acetona te otapanjem suhog ekstrakta u pokretnoj fazi. Ova priprava uzorka bila je vrlo dugotrajna, a rezultati niži od rezultata postignutih bez uparavanja acetona ili ekstrakcije u metanolom (Tablica 4.1).

Tijekom optimiranja ekstrakcije acetonitrilom i metanolom pojednostavljena je priprava uzoraka. Uzorci boje odvagani su u odmjernu tikvicu od 50 mL umjesto od 25 mL i ekstrakcija je provedena s većim volumenu otapala, 30 mL umjesto 15 mL. Stavljanjem uzorka u tikvicu većeg volumena i dopunjavanjem vodom nakon ekstrakcije otapalom izbjegava se

naknadno razrjeđivanje uzorka vodom u posebnoj tikvici što pojednostavljuje i skraćuje vrijeme pripreme. Ujedno je i ekstrakcija analita učinkovitija zbog većeg volumena primijenjenog otapala.

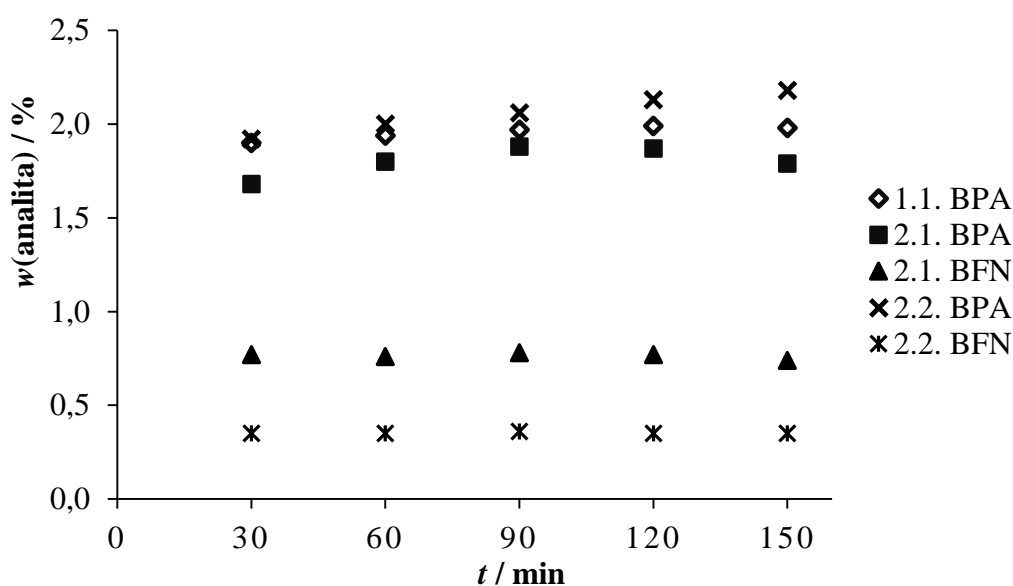
Rezultati ekstrakcije bisfenola A iz uzorka boje u različitim otapalima prikazani su u Tablici 4.1. Rezultati najbliži deklariranoj vrijednosti od 2 % bisfenola A izmjereni su nakon ultrazvučne ekstrakcije acetonom i metanolom u trajanju od 60 min. Zbog već navedenog nedostatka pripreme uzorka ekstrakcijom s acetonom, eksperimenti s duljim vremenom ultrazvučne ekstrakcije napravljeni su samo za otapala acetonitril i metanol. Bisfenol A najdjelotvornije se ekstrahirao metanolom uz ekstrakciju u ultrazvučnoj kupelji tijekom 120 min. Maseni udio BPA u uzorku boje 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* bio je 1,87 % što je blizu vrijednosti od 2 % koju navodi proizvođač.

Tablica 4.1. Maseni udio bisfenola A u uzorku boje 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* određen ultrazvučnom ekstrakcijom s različitim otapalima i uz različito vrijeme ekstrakcije

Otapalo	Postupak	$\gamma_{\text{uzorak}} / \text{g L}^{-1}$	$w(\text{BPA}) / \%$							
			$t_{\text{ekstrakcije}} / \text{min}$							
			15	30	45	60	75	90	105	120
Acetonitril i voda	3.5.3.1.	3,3	0,53	0,64	1,07	1,27	–	–	–	–
Acetatni pufer i acetonitril	3.5.3.1.	3,3	0,51	0,77	0,83	0,88	–	–	–	–
Aceton	3.5.3.2.	6,7	–	1,69	–	1,75	–	–	–	–
Aceton + uparavanje	3.5.3.3.	2,0	1,03	1,22	1,29	1,10	–	–	–	–
Acetonitril	3.5.3.2.	6,7	0,40	1,17	1,43	1,56	1,52	1,62	1,58	1,58
Acetonitril	3.5.3.4.	3,3	1,05	1,54	1,56	1,61	–	–	–	–
Metanol	3.5.3.5.	3,3	1,39	1,49	1,71	1,78	1,79	1,85	1,83	1,87

Nakon odabira najdjelotvornijeg postupka za ekstrakciju bisfenola A iz uzorka boje 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C*, uzorci svih ostalih boja ekstrahirani su metanolom i analizirani uz optimalne kromatografske uvjete. Bisfenol A pronađen je i u uzorcima 2.1. *Magenta room voda-UV* i 2.2. *Blue-cold* proizvođača *Sun Chemical* u kojima je također pronađen i benzofenon kao fotoinicijator u bojama koje se suše uz djelovanje UV-zračenja.²⁴ Obzirom na toksičnost benzofenona, koji uopće nije naveden u deklaraciji proizvođača

primjena razrađene metode proširena je i na određivanje benzofenona. Uspoređena je djelotvornost ekstrakcije bisfenola A i benzofenona metanolom iz tri uzorka boja postignuta uz vrijeme ekstrakcije od 30 do 150 minuta. Rezultati su prikazani na Slici 4.1. Ovim eksperimentom potvrđeno je da je optimalno vrijeme ekstrakcije bisfenola A 120 min, dok je za ekstrakciju benzofenona dovoljno i kraće vrijeme. U nastavku rada vrijeme ekstrakcije analita iz uzoraka bilo je 120 min.



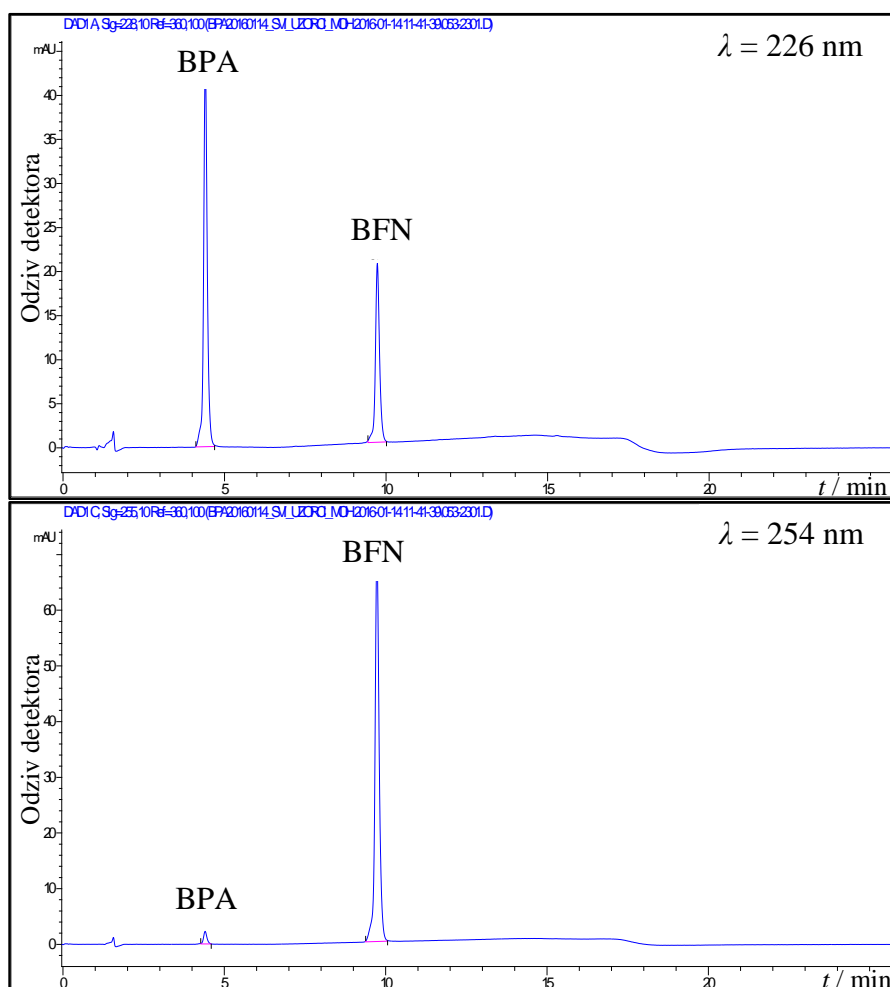
Slika 4.1. Ovisnost djelotvornosti ultrazvučne ekstrakcije bisfenola A i benzofenona metanolom iz uzoraka 1.1. *Offset blue Chameleon* 27 °C, 2.1. *Magenta room voda-UV* i 2.2. *Blue-cold* o vremenu

4.1.2. Validacija metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama

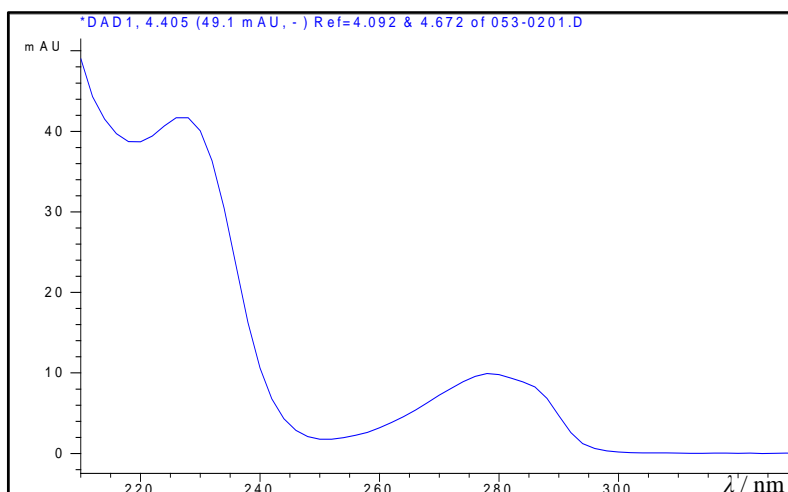
Nakon optimiranja kromatografskih uvjeta i priprave uzoraka, metoda je validirana prema smjernicama međunarodnih organizacija kako bi se potvrdili i dokazali svi potrebni pokazatelji primjenjivosti metode.^{103,104}

Selektivnost metode podešena je tako da je bisfenol A tekućinskom kromatografijom u potpunosti razdvojen od drugih komponenti uzoraka. Uz benzofenon koeluiraju dvije komponente, ali s maksimumom apsorpcije UV-zračenja na nižim valnim duljinama (230 nm te niže od 200 nm), dok se pri 254 nm može detektirati samo benzofenon (Slike 8.1 do 8.8 u

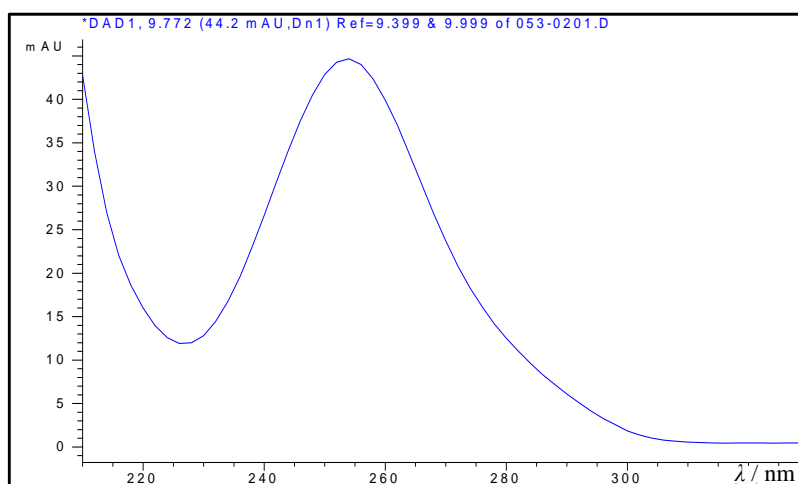
Dodatku). Uz kromatografske uvjete navedene pod 3.5.2. vrijeme zadržavanja bisfenola A bilo je 4,4 min, a benzofenona 9,7 min. Specifičnost određivanja analita razvijenom metodom potvrđena je snimanjem apsorpcijskih UV-spektara bisfenola A i benzofenona u otopini standarda i otopinama uzoraka (Slike 4.2 do 4.4). Identitet analita u uzorcima dodatno je potvrđen analizom tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnim spektrometrom masa čime je potvrđeno postojanje signala odgovarajućih molekulskih iona i karakterističnih fragmenata analita u spektrima masa standarda i uzoraka što će biti opisano pod 4.1.3.



Slika 4.2. Kromatogrami standardne otopine BPA i BFN pri valnim duljinama 226 nm i 254 nm, $\gamma(\text{BPA}) = 10 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma(\text{BFN}) = 10 \text{ mg L}^{-1}$



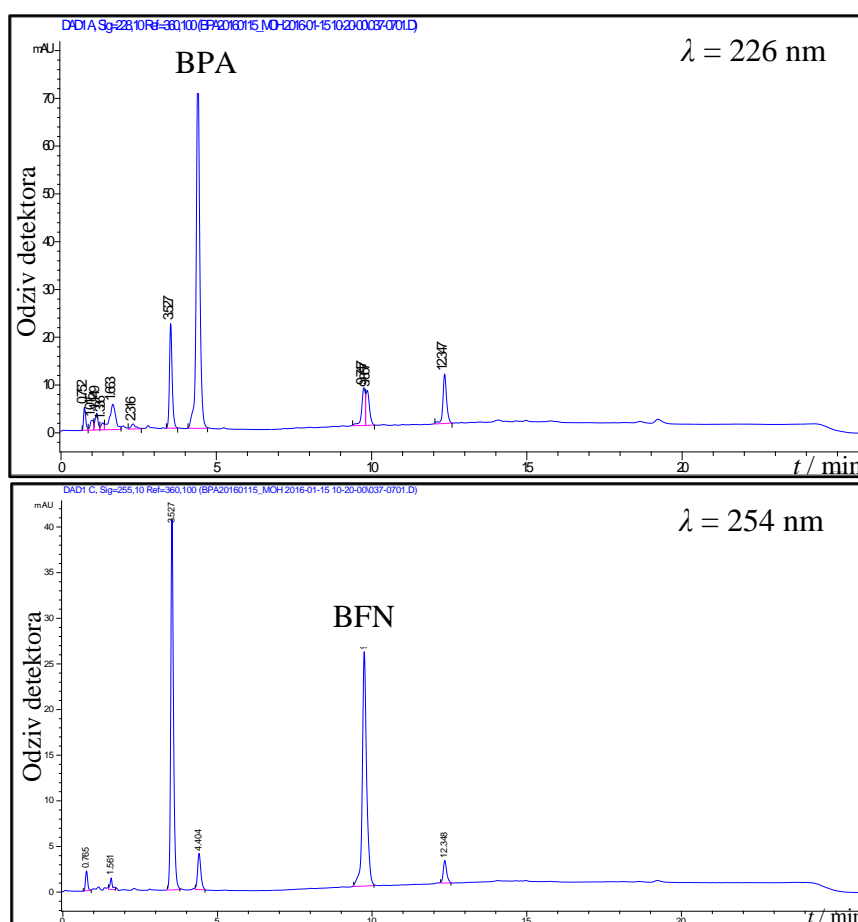
Slika 4.3. UV-apsorpcijski spektar bisfenola A masene koncentracije 10 mg L^{-1} u smjesi vode i acetonitrila [$\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 0,53$] (pokretna faza)



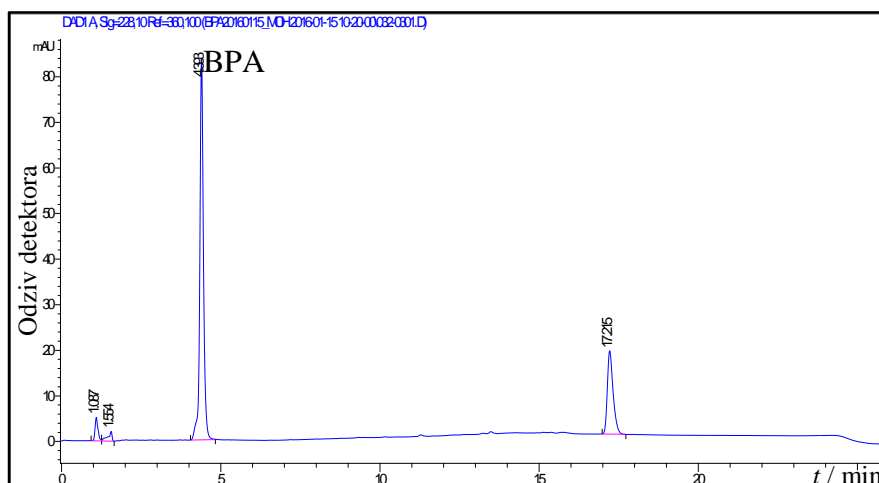
Slika 4.4. UV-apsorpcijski spektar benzofenona masene koncentracije 10 mg L^{-1} u smjesi vode i acetonitrila [$\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 0,3$] (pokretna faza)

Obzirom da nije bilo moguće dobiti podatke o točnom kemijskom sastavu termokromnih boja, nije bilo moguće jednoznačno opisati matricu te pripremiti univerzalnu otopinu za provjeru razlučivanja bisfenola A i benzofenona od ostalih komponenti uzorka. Za uzorke koji sadrže bisfenol A i benzofenon, selektivnost metode potvrđena je promatranjem razlučivanja kromatografskih krivulja bisfenola A i benzofenona u odnosu na ostale kromatografske krivulje u kromatogramima. Tijekom razvoja metode i analize svih uzoraka uočena je sličnost matrice u uzorcima grupiranim po proizvođaču, načinu tiskanja i sušenja kao što je napravljeno u Tablici 3.1. Za uzorke koji ne sadrže bisfenol A i benzofenon selektivnost je potvrđena dodatkom standardne otopine bisfenola A i benzofenona u uzorak jednog predstavnika svake

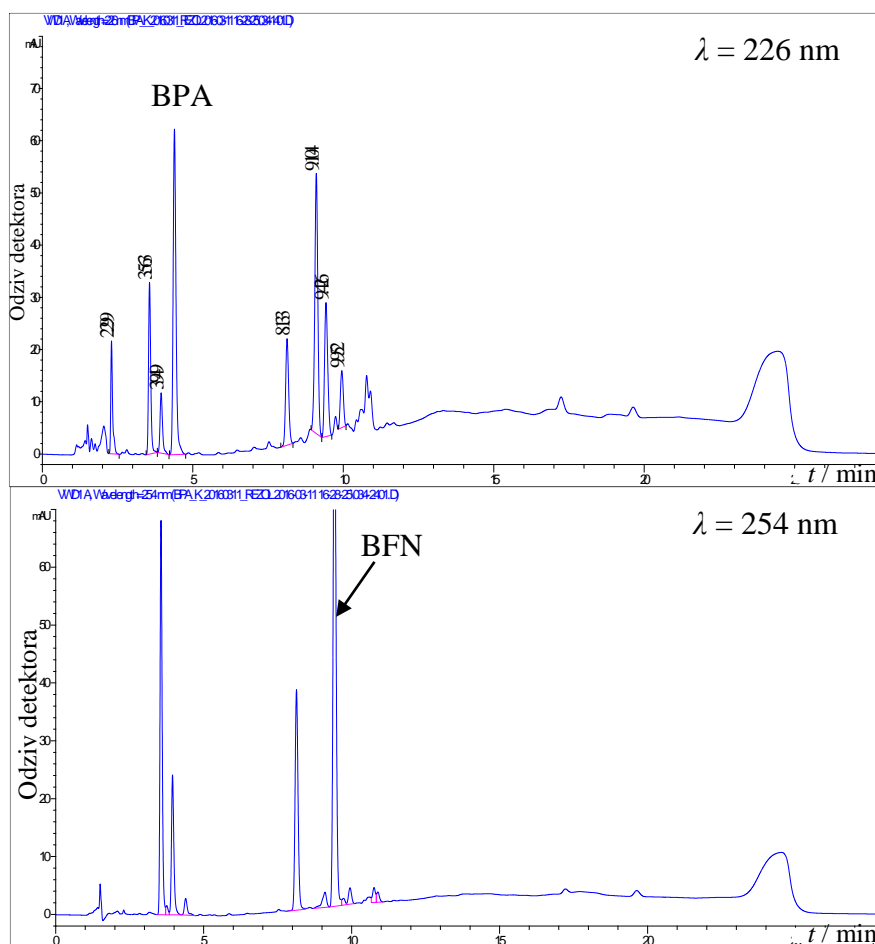
grupe. Kromatogrami uzorka boje 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* i 2.1. *Magenta room voda-UV*, koji sadrže određivane analite, prikazani su na Slikama 4.5 i 4.6. Na Slici 4.7 prikazan je kromatogram uzorka 5.1. *UV purple to pink 31 °C* koji je sastavom matrice najstroženiji i ne sadrži ciljane analite, pa mu je dodana otopina standarda bisfenola A i benzofenona. Kromatogram uzorka 2.2. *Blue-cold* te kromatogrami po jednog uzorka tipičnog za svaku skupinu (III-VII) kao i UV-spektri koji odgovaraju karakterističnim kromatografskim krivuljama prikazani su na Slikama 8.1 do 8.8 u Dodatku. Faktori razlučivanja bisfenola A i benzofenona u odnosu na najbliže kromatografske krivulje matrice prikazani su po skupinama uzorka u Tablici 4.2. U svim je slučajevima razlučivanje kromatografskih krivulja analita u odnosu na okolne kromatografske krivulje bilo je zadovoljavajuće, tj. faktor razlučivanja bio je veći od 1,5.



Slika 4.5. Kromatogrami uzorka 2.1. *Magenta room voda-UV*, pri 226 i 254 nm, $w(\text{BPA}) = 1,9 \%$, $w(\text{BFN}) = 0,77 \%$



Slika 4.6. Kromatogram uzorka 1.1. *Offset blue Chameleon* 27 °C pri 226 nm, $w(\text{BPA}) = 2,0 \%$

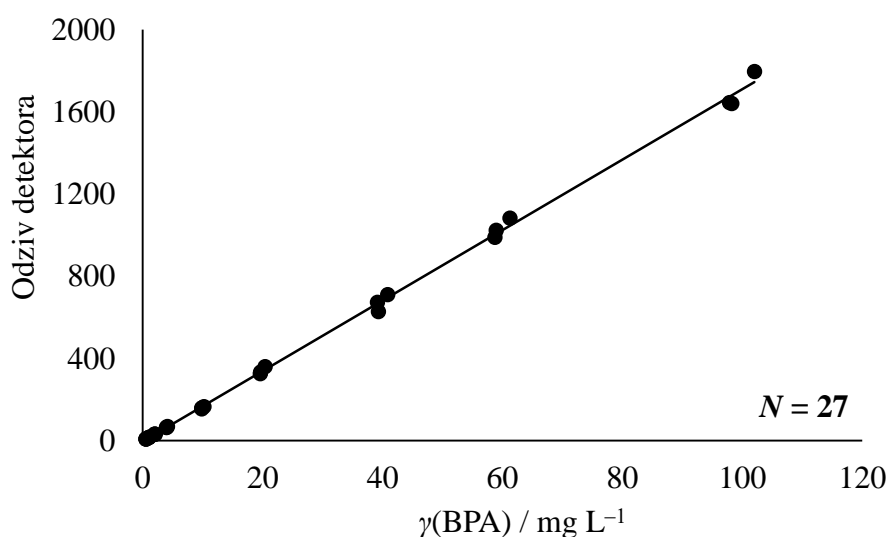


Slika 4.7. Kromatogrami uzorka 5.1. *UV purple to pink* 31 °C u koji je dodana standardna otopina BPA i BFN pri 226 nm i 254 nm. $w(\text{BPA}) = 1,2 \%$, $w(\text{BFN}) = 1,2 \%$

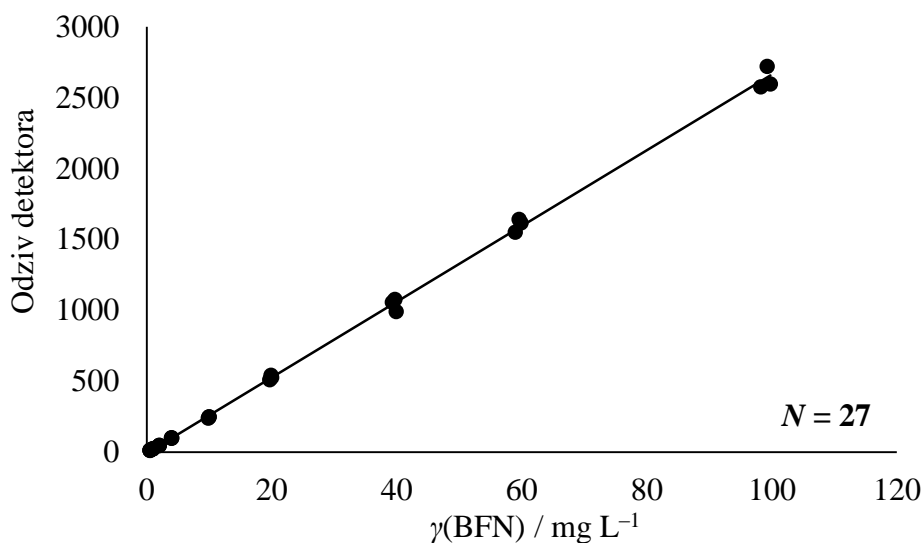
Tablica 4.2. Razlučivanje krivulja bisfenola A i benzofenona u kromatogramima otopina uzoraka koji sadrže ciljane analite i otopinama u koje su analiti dodani radi provjere razlučivanja

Skupina	Oznaka	Uzorak	$R_s(\text{BPA})$	$R_s(\text{BFN})$
I	1.1.	<i>Offset blue Chameleon 27 °C</i>	47	–
II	2.2.	<i>Blue-cold</i>	4,9	24,5
III	3.2.	<i>Offset green to yellow</i>	2,8	1,8
IV	4.2.	<i>Wet offset magenta 31 °C</i>	2,9	1,8
V	5.1.	<i>UV purple to pink 31 °C</i>	2,9	1,5
VI	6.2.	<i>Screen UV red 31 °C</i>	2,7	1,7
VII	7.1.	<i>Flexo UV magenta 15 °C</i>	2,9	1,7

Područje ispitivanja linearnog odziva detektora i primjene metode odabrano je obzirom na ciljani maseni udio bisfenola A u uzorku od 2 % te činjenicu da za druge uzorke nema definirane ciljane vrijednosti, pa je područje određivanja znatno prošireno na više i niže vrijednosti. Linearnost odziva detektora potvrđena je u rasponu masenih koncentracija obaju analita od $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ do 100 mg L^{-1} , odnosno masenih udjela u uzorku boje od 0,025 % do 5,00 %. Obzirom na širok raspon koncentracija, za potvrdu linearnosti pripravljene su i analizirane po tri standardne otopine BPA i BFN na devet koncentracijskih nivoa. Baždarni pravci prikazani su na Slikama 4.8 i 4.9.



Slika 4.8. Ovisnost površine kromatografske krivulje bisfenola A o masenoj koncentraciji bisfenola A, N = ukupni broj mjerenja



Slika 4.9. Ovisnost površine kromatografske krivulje benzofenona o masenoj koncentraciji benzofenona, N = ukupni broj mjerenja

Odziv UV-detektora bio je linearan u cijelom ispitivanom području koncentracija. Jednadžba baždarnog pravca za određivanje bisfenola A bila je $y = 17,133 x - 2,8915$, a koeficijent korelacije $r = 0,9994$. Faktori odziva detektora za bisfenol A, izraženi kao omjer površine kromatografske krivulje i masene koncentracije, bili su u rasponu od 15,3 do 17,7. Srednja vrijednost faktora odziva bila je 16,6 s relativnom standardnom devijacijom od 4,4 %. Jednadžba baždarnog pravca za određivanje benzofenona bila je $y = 26,698 x - 6,2802$, a koeficijent korelacije $r = 0,9994$. Faktori odziva detektora za benzofenon bili su u rasponu od 22,6 do 27,6 sa srednjom vrijednošću od 25,2 i relativnom standardnom devijacijom od 6,0 %.

Preciznost kromatografskog mjerenja bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama određena je na temelju šest uzastopnih injektiranja uzorka 2.2. *Blue-cold* koji sadrži oba analita. Preciznost određivanja (ponovljivost pripreve uzorka) bisfenola A i benzofenona određena je na temelju rezultata izmjerenih u šest uzastopno pripremljenih uzoraka iste boje. Međupreciznost (intermedijarna preciznost) određena je analizom šest uzastopno pripremljenih uzoraka iste boje, koje je pripremio drugi analitičar. Ti su uzorci analizirani na drugom instrumentu i koloni i drugi dan u odnosu na uzorke za ispitivanje preciznosti određivanja. Preciznost mjerenja izražena je kao relativna standardna devijacija površine kromatografske krivulje analita, a preciznost određivanja kao relativna standardna devijacija izmjerenih masenih udjela analita u uzorku. Međupreciznost je izražena kao razlika rezultata

eksperimenata ponovljivosti i međupreciznosti podijeljena srednjom vrijednošću rezultata oba eksperimenta (Tablice 4.3 do 4.5).

Tablica 4.3. Preciznost kromatografskog mjerenja bisfenola A i benzofenona u uzorku 2.2. *Blue-cold*

Br. injeckiranja	Površina krivulje/ rel. jedinice	
	BPA	BFN
1	684,1	141,3
2	689,0	143,8
3	703,0	143,2
4	691,8	141,4
5	704,0	142,1
6	688,7	141,1
Srednja vrijednost	693,4	142,2
RSD / %	1,2	0,8

Tablica 4.4. Ponovljivost određivanja (pripreve uzorka) bisfenola A i benzofenona u uzorku 2.2. *Blue-cold*

Priprava	w(BPA) / %	w(BFN) / %
1	1,84	0,35
2	1,82	0,35
3	1,88	0,36
4	1,85	0,35
5	1,85	0,35
6	1,86	0,35
Srednja vrijednost	1,85	0,35
RSD / %	1,1	0,9

Tablica 4.5. Međupreciznost određivanja bisfenola A i benzofenona u uzorku 2.2. *Blue-cold*

Priprava	w(BPA) / %	w(BFN) / %
1	2,00	0,38
2	1,94	0,38
3	1,91	0,38
4	1,91	0,38
5	1,93	0,38
6	1,93	0,38
Srednja vrijednost	1,94	0,38
RSD / %	1,8	0,3
Međupreciznost / %	4,8	8,2

Preciznost mjerenja i pripreve uzorka bila je vrlo visoka za bisfenol A i za benzofenon. Metoda je pokazala odličnu međupreciznost bez obzira na složenost uzorka, te probleme s homogenošću i kvantitativnim uzorkovanjem.

Točnost određivanja bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama određena je na tri koncentracijska nivoa koji obuhvaćaju područje primjene metode. Za svaki koncentracijski nivo pripravljena su po tri uzorka u koje je dodana standardna otopina bisfenola A i benzofenona. Za nisko koncentracijsko područje odabran je uzorak boje 4.1. *Wet offset blue 45 °C*, koja ne sadrži niti jedan analit, a za srednje i visoko koncentracijsko područje uzorak boje 2.2. *Blue-cold* koji sadrži 1,96 % bisfenola A i 0,35 % benzofenona. Točnost određivanja izračunana je kao omjer izmjerenog i dodanog masenog udjela bisfenola A odnosno benzofenona i izražena u postotcima. Rezultati su prikazani u Tablici 4.6.

Tablica 4.6. Točnost određivanja bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama

Uzorak	w(BPA) / %			Točnost / %	w(BFN) / %			Točnost / %		
	P ⁽¹⁾	P + D ⁽²⁾	A ⁽³⁾		P	P + D	A			
4.1. <i>Wet offset blue 45 °C</i>		0,24	0,26	98		0,23	0,22	93		
	0,00	0,19	0,23	102	0,00	0,19	0,19	96		
		0,18	0,21	103		0,18	0,17	95		
2.2. <i>Blue-cold</i>	1,96		2,52	100	0,34		1,81	1,82	101	
			2,60	102			2,01	2,05	102	
			2,57	2,54		103		1,94	1,95	100
			4,00	3,89		103		4,31	4,38	102
			4,01	3,98		106		4,32	4,42	102
			4,10	4,07		105		4,49	4,47	100
		Srednja vrijednost		102	Srednja vrijednost		99			
		RSD / %		2,3	RSD / %		3,4			

⁽¹⁾ Početni maseni udio analita

⁽²⁾ Dodani maseni udio analita

⁽³⁾ Maseni udio analita određen analizom

Točnost određivanja bila je u rasponu od 98 % do 106 % za bisfenol A sa srednjom vrijednošću od 102 %, te od 93 % do 102 % za benzofenon sa srednjom vrijednošću od 99 % što je zadovoljavajuća točnost za određivanje obaju analita.

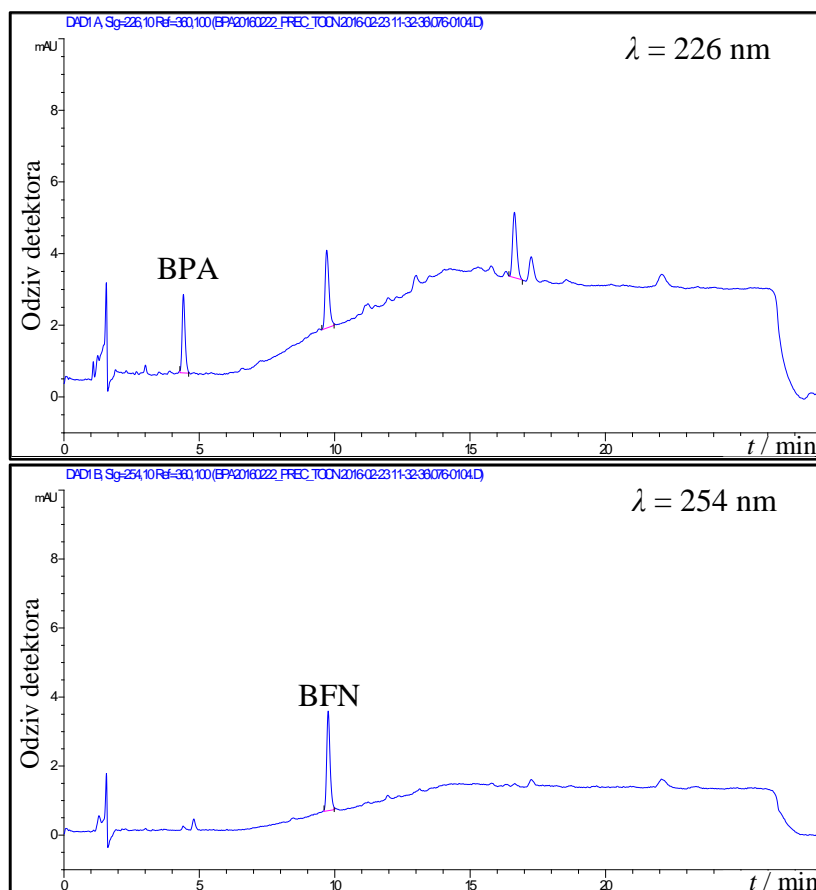
Granica određivanja bisfenola A i benzofenona određena je dodatkom standardne otopine bisfenola A i benzofenona uzorku 4.1. *Wet offset blue 45 °C* tako da je koncentracija analita u otopini bila 1 mg L^{-1} što odgovara masenom udjelu u uzorku od 0,05 %. Pripravljena otopina injektirana je u kromatografsku kolonu šest puta. Omjeri visine kromatografske krivulje i šuma osnovne linije (S/N) i rezultati preciznosti mjerenja pri granici određivanja prikazani su u Tablici 4.7, a reprezentativni kromatogrami na Slici 4.10.

Tablica 4.7. Preciznost kromatografskog mjerenja na granici određivanja, $\gamma(\text{BPA}) = \gamma(\text{BFN}) = 1 \text{ mg L}^{-1}$

Br. injektiranja	BPA		BFN	
	Površina krivulje	S/N	Površina krivulje	S/N
1	17,0	20	25,4	38
2	16,6	16	25,1	39
3	16,6	16	25,2	30
4	16,8	15	25,1	23
5	17,2	17	25,5	22
6	16,7	15	25,5	25
Srednja vrijednost	16,8	17	25,3	30
RSD / %	0,2	1,9	0,2	7,5

Granica detekcije određena je također dodatkom standardne otopine BPA i BFN uzorku 4.1. *Wet offset blue 45 °C* tako da je konačna koncentracija analita u otopini uzorka bila $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, odnosno maseni udio u uzorku boje 0,005 %. Pri navedenoj koncentraciji omjer visine kromatografske krivulje i šuma osnovne linije bio je 2,8 za bisfenol A te 3,5 za benzofenon (Slika 4.11).

Granica detekcije određena je po uobičajenim parametrima za validaciju analitičkih metoda da je omjer signala analita i šuma osnovne linije oko 3. Pokazatelji koji definiraju granicu detekcije pri ispitanoj koncentraciji u otopini odnosno masenom udjelu analita u boji zadovoljavaju taj zahtjev. Obzirom da je u uzorcima očekivani maseni udio analita u postotcima nije bilo potrebno postići nižu vrijednost.

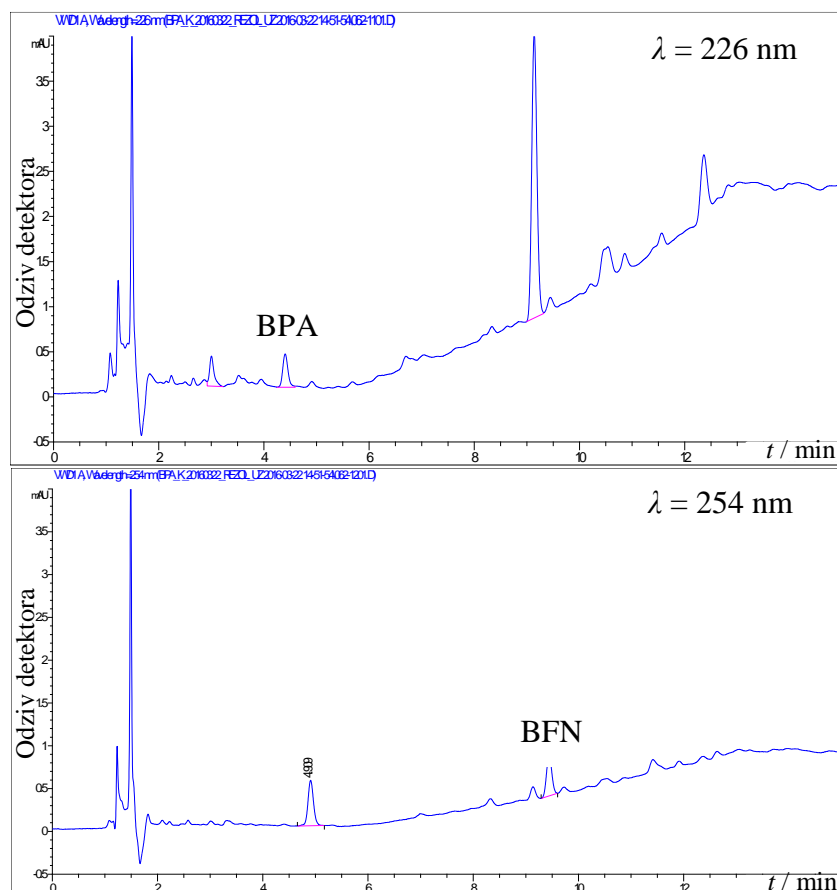


Slika 4.10. Kromatogrami uzorka termokromne boje 4.1. *Wet offset blue 45* °C kojem su dodani bisfenol A i benzofenon u masenom udjelu jednakom granici određivanja, $\gamma(\text{BPA}) = \gamma(\text{BFN}) = 1 \text{ mg L}^{-1}$.

Područje primjene metode definirano je obzirom na masene koncentracije analita u otopljenim uzorcima te podatke o linearnosti, preciznosti i točnosti metode za određivanje bisfenola A i benzofenona. Za oba je spoja metoda primjenjiva u rasponu masenih udjela od 0,05 % do 5,00 % u uzorcima termokromnih boja (Tablica 4.8).

Tablica 4.8. Granice detekcije i određivanja BPA i BFN te područje primjene metode

	Granica detekcije	Granica određivanja	Područje primjene
$\gamma(\text{BPA}) / \text{mg L}^{-1}$	0,1	1,0	1,0 – 100,0
$\gamma(\text{BFN}) / \text{mg L}^{-1}$	0,1	1,0	1,0 – 100,0
$w(\text{BPA}) / \%$	0,005	0,05	0,05 – 5,00
$w(\text{BFN}) / \%$	0,005	0,05	0,05 – 5,00



Slika 4.11. Kromatogrami uzorka termokromne boje 4.1. *Wet offset blue* 45 °C kojem su dodani bisfenol A i benzofenon u masenom udjelu jednakom granici detekcije, $\gamma(\text{BPA}) = \gamma(\text{BFN}) = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$.

Robusnost metode ispitana je variranjem kromatografskih uvjeta koji su relativno lako podložni promjenama ili manjim pogreškama, a mogli bi utjecati na rezultat mjerenja. Varirani su temperatura kolone, te protok i sastav pokretne faze. Temperatura kolone i protok mijenjani su za $\pm 10 \%$, a sastav pokretne faze za $\pm 5 \%$. Promatrano je vrijeme zadržavanja i razlučivanje analita u odnosu na susjedne kromatografske krivulje u kromatogramu uzorka 4.1. *Wet offsetblue* 45 °C kojem je dodana standardna otopina bisfenola A i benzofenona. Vrijednosti u Tablici 4.9 pokazuju da manje promjene u temperaturi kolone, protoku i sastavu pokretne faze ne utječu znatno na djelotvornost i selektivnost kromatografske analize.

Tablica 4.9. Ovisnost vremena zadržavanja bisfenola A i benzofenona te razlučivanja o temperaturi kolone, protoku i sastavu pokretne faze

Kromatografski uvjeti			BPA		BFN	
t (kolone) / °C	Protok / mL min ⁻¹	Sastav pokretne faze	t_R / min	R_s	t_R / min	R_s
30	1,0		4,4	5,3	9,4	1,5
27	1,0		4,5	5,4	9,5	1,5
33	1,0	Prema 3.5.2.	4,3	4,9	9,3	2,9
30	0,9		4,9	5,4	10,5	1,8
30	1,1		4,0	4,7	8,9	1,6
30	1,0	+ 5 % CH ₃ CN	3,9	3,9	8,7	2,0
30	1,0	+ 5 % H ₂ O	5,0	5,4	10,2	2,1

Kako bi se utvrdilo koliko je dugo nakon pripreve moguće koristiti kalibracijske otopine i otopine uzoraka, provjerena je njihova stabilnost tijekom 288 sati (Tablice 4.10 i 4.11).

Tablica 4.10. Stabilnost standardne otopine bisfenola A i benzofenona: ovisnost površine kromatografskih krivulja o vremenu proteklom od pripreve

t / h	BPA		BFN	
	Površina	Površina u odnosu na početnu / %	Površina	Površina u odnosu na početnu / %
0	367,4	–	562,1	–
24	372,6	101	564,3	100
48	372,7	101	564,6	100
120	371,3	101	557,7	99
144	374,5	102	560,3	100
168	363,3	99	554,8	99
288	370,5	101	548,1	98

Tablica 4.11. Stabilnost otopine uzorka: ovisnost površine kromatografskih krivulja o vremenu proteklom od pripreve

t / h	BPA		BFN	
	Površina	Površina u odnosu na početnu / %	Površina	Površina u odnosu na početnu / %
0	762,7	–	518,8	–
24	762,8	100	520,1	100
48	770,5	101	523,5	101
120	764,4	100	533,7	103
144	755,5	99	533,5	103
168	759,0	100	547,3	105
288	773,8	101	557,9	108

Period u kojemu su otopine stabilne određen je na temelju promjene površine kromatografske krivulje analita od 5 % u odnosu na početnu. Dokazano je da je otopina standarda stabilna na sobnoj temperaturi 288 sati, odnosno 12 dana od pripreve. Otopina uzorka je na sobnoj temperaturi stabilna 168 sati, tj. 7 dana od pripreve.

Svi validacijski parametri metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama bili su zadovoljavajući. U Tablici 4.12 rezultati validacije uspoređeni su s općim validacijskim smjernicama za farmaceutsku i prehrambenu industriju.^{103,104} Svi rezultati validacije metode zadovoljavaju čak i ove znatno strože kriterije nego što je potrebno za analizu komponenata termokromne boje.

Tablica 4.12. Validacijski parametri i rezultati validacije metode za određivanje BPA i BFN u termokromnim bojama

Validacijski parametar	Kriterij prihvatljivosti	Validacijski rezultati	
		Bisfenol A	Benzofenon
Selektivnost	$R_S \geq 1,5$	$R_S \geq 1,5$	$R_S \geq 1,5$
Linearnost	$r \geq 0,997$	$r = 0,9994$	$r = 0,9994$
	$RSD_{RF}^a \leq 10 \%$	$RSD_{RF} = 4,4 \%$	$RSD_{RF} = 6,0 \%$
Preciznost	Ponovljivost: $RSD \leq 5 \%$	$RSD = 1,1 \%$	$RSD = 0,9 \%$
	Međupreciznost: $\leq 10 \%$	$RSD = 4,8 \%$	$RSD = 8,2 \%$
Točnost	Analitički povrat $90 \% - 110 \%$	$98 \% - 106 \%$	$93 \% - 102 \%$
Granica određivanja	$S/N \geq 10$	$S/N = 17; w^b = 0,05 \%$	$S/N = 30; w = 0,05 \%$
	$RSD \leq 1 \%$	$RSD = 0,2 \%$	$RSD = 0,2 \%$
Granica detekcije	$S/N \geq 3$	$S/N = 2,8;$ $w^c = 0,005 \%$	$S/N = 3,5;$ $w = 0,005 \%$

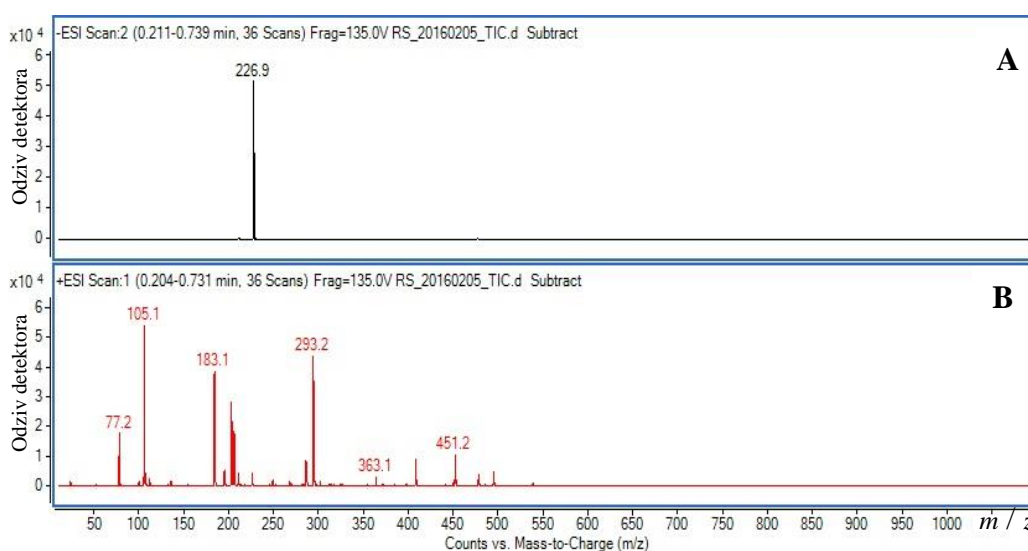
^a RF : faktor odziva = $\gamma(\text{analita}) / \text{površina krivulje}$

^bmaseni udio analita na granici određivanja

^cmaseni udio analita na granici detekcije

4.1.3. Analiza termokromnih boja vezanim sustavom tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa

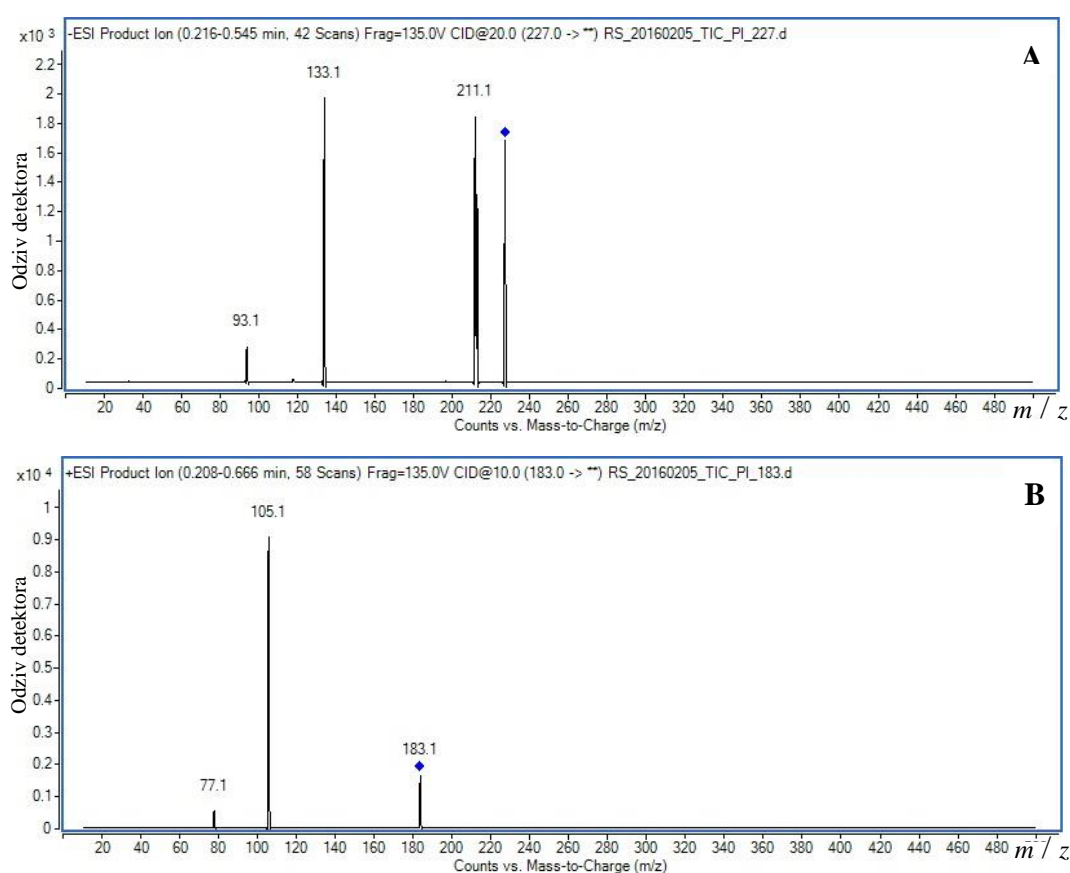
Kako bi se nedvojbeno identificirali ciljani analiti, bisfenol A i benzofenon, ekstrakti termokromnih boja analizirani su vezanim sustavom tekućinska kromatografija - spektrometrija masa. Snimljeni su kromatogrami ukupne ionske struje otopine standarda bisfenola A i benzofenona i zabilježeni pripadni spektri masa (Slika 4.12). Bisfenol A (točna molekulska masa = 228,1) sniman je uz negativnu ionizaciju te je signal jednostruko nabijenog molekulskog iona zabilježen pri m/z 226,9. Signal benzofenona (točna molekulska masa = 182,1) snimljenog uz pozitivnu ionizaciju uočen je pri m/z 183,1. Spektri masa standarda snimljeni tandemnom spektrometrijom masa prikazani su na Slici 4.13, a predložene sheme fragmentiranja na Slikama 4.14 i 4.15.



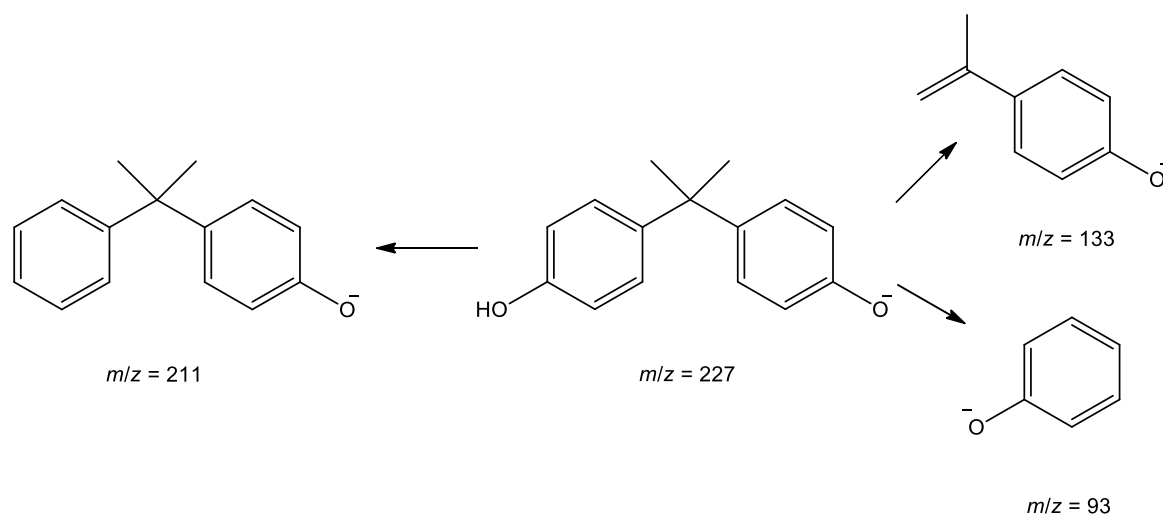
Slika 4.12. ESI-MS spektri otopine standarda BPA i BFN snimljeni uz negativnu (A) i pozitivnu (B) ionizaciju. Signali jednostruko nabijenih molekulskih iona uočeni su pri $m/z = 226,9$ za bisfenola A te pri $m/z = 183,1$ za benzofenon

U MS/MS spektru masa bisfenola A uočeni su signali iona produkata pri vrijednostima m/z 211, 133 i 93. Ion $m/z = 211$ nastaje cijepanjem veze uz heteroatom i gubitkom mase 16. Ako se cijepa C–C veza između fenila i ugljikovog atoma u premoštenju, te ovisno o tome koji fragment zadržava naboj, nastaju ioni fragmenta vrijednosti m/z 133 i 93. Nastali ioni produkti u skladu su s podacima objavljenim u ranijim istraživanjima vezanim za određivanje BPA u

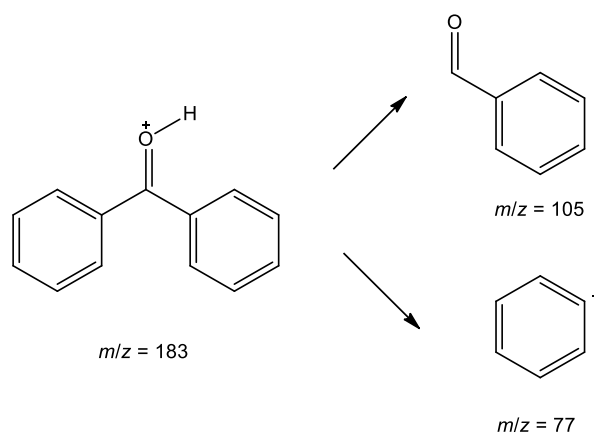
krvi, urinu, morskoj vodi, papirima i drugim matricama.^{19,21,22,62,66,67,88} Pri fragmentiranju benzofenona puca veza između fenilnog prstena i karbonilnog ugljikovog atoma te nastaju ioni čiji signali su pri vrijednostima m/z 77 i 105, što je također u skladu s podacima objavljenim u literaturi za cijepanje hidroksiliranih i alkoksiliranih benzofenona. Produkt ion m/z 105 praćen je i tijekom određivanja hidroksiliranih derivata benzofenona u apsorbensima UV-zračenja u vodi te u tkivu posteljice.^{29–31} Na temelju intenziteta signala u MS/MS-spektrima odabrani su optimalni uvjeti snimanja i izbor iona prekursora, odnosno iona produkta (Tablica 4.13).



Slika 4.13. MS/MS-spektar bisfenola A uz negativnu ionizaciju i kolizijsku energiju od 20 eV(A) i benzofenona uz pozitivnu ionizaciju i kolizijsku energiju od 10 eV (B).



Slika 4.14. Predloženi mehanizam fragmentacije bisfenola A (ESI-)



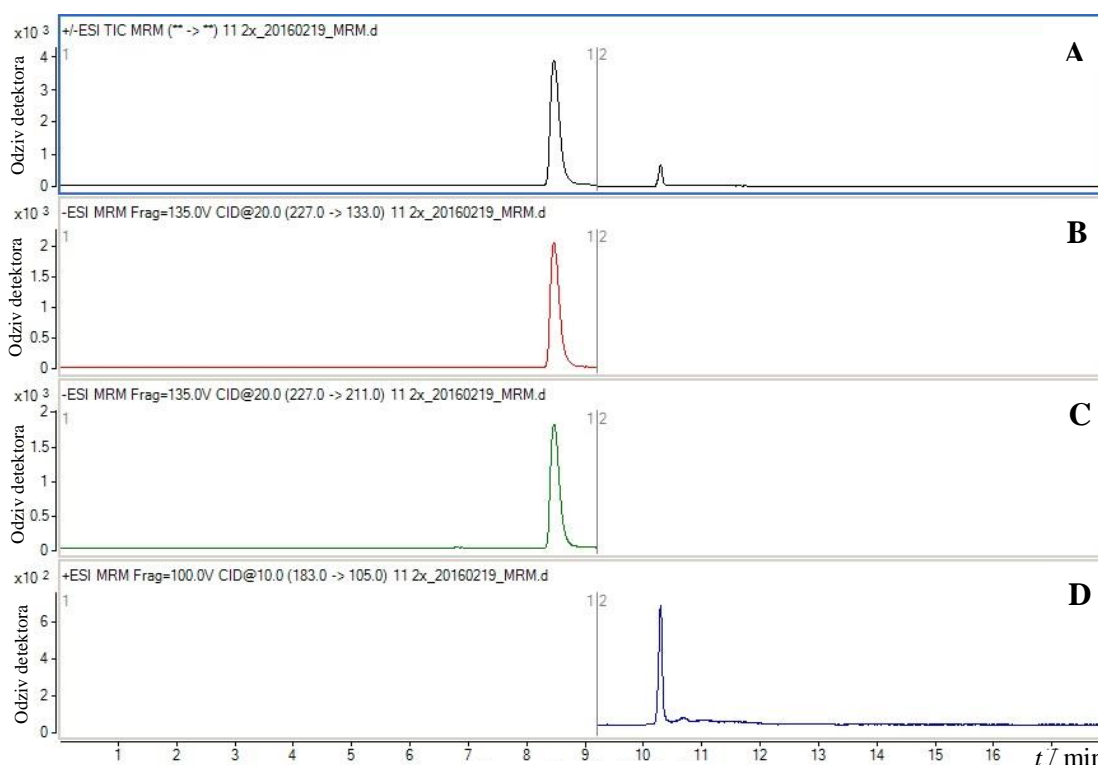
Slika 4.15. Predloženi mehanizam fragmentacije benzofenona (ESI+)

Tablica 4.13. Molekulski ioni i fragmenti (ioni produkti) BPA i BFN

	BPA	BFN
M_r	228	182
m/z	227	183
Ionizacija	-	+
MRM1	227 → 133	183 → 105
MRM2	227 → 211	-

Kromatografski uvjeti podešeni su tako da se bisfenol A i benzofenon eluiraju s kolone u optimalnom vremenu do 18 min. Uz uvjete navedene pod 3.6.6. vrijeme zadržavanja BPA bilo je 8,5 min, a BFN 10,6 min. Radi osjetljivijeg određivanja snimanje je podešeno tako da se od početka analize do 9,2 min bilježe samo negativni ioni za određivanje BPA, a od 9,2 min do kraja analize samo pozitivni ioni za određivanje BFN. Protok pokretne faze bio je

0,3 mL min⁻¹ obzirom da je analitička kolona bila manjih dimenzija, a manji volumen otapala doprinosi i bržem uparavanju pri ulasku u spektrometar masa. Zbog smanjenog protoka povećan je volumni udio metanola u pokretnoj fazi kako bi se analiti i ostale komponente uzoraka ispirali s kolone u optimalnom vremenu. Metanol je primijenjen umjesto acetonitrila kao nepolarnija komponenta pokretne faze, jer se pokazalo da je odziv spektrometra masa za benzofenon znatno veći nego uz acetonitril, vjerojatno zbog izvora iona za protoniranje s metanola. Kromatogram uzorka boje 2.2. *Blue-cold*, koji sadrži oba analita, prikazan je na Slici 4.16. BPA i BFN detektirani su na temelju vrijednosti m/z , a potvrđeni na temelju odgovarajućih iona produkata koji su bili u skladu s literaturnim podacima. Kromatogrami uzoraka 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* i 2.1. *Magenta room voda-UV* prikazani su na Slikama 8.9 i 8.10 u Dodatku.



Slika 4.16. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka 2.2. *Blue-cold*, $\gamma(\text{BPA})_{\text{otopina}} = 42 \text{ mg L}^{-1}$, $w(\text{BPA})_{\text{uzorak}} = 1,96 \%$; $\gamma(\text{BFN})_{\text{otopina}} = 2 \text{ mg L}^{-1}$, $w(\text{BFN})_{\text{uzorak}} = 0,34 \%$ (A). MRM kromatogram bisfenola A (B i C) i benzofenona (D). Uvjeti analize opisani su pod 3.6.6. ¹² prijelaz između negativne i pozitivne ionizacije.

Za kvantifikaciju analita u uzorcima termokromnih boja tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa presudan ograničavajući faktor bio je utjecaj matrice. Pokazalo se da matrice nekih uzoraka povećavaju (engl. *enrichment*), ili smanjuju (engl. *suppression*) odziv detektora i to ne jednako za svaki analit. Npr. snimljen je kromatogram ukupne ionske struje otopine s koncentracijom obaju analita od 80 mg L^{-1} pripremljen u matrici uzorka 6.1. *Screen UV blue 31 °C* koji izvorno ne sadrži te analite. U ovoj matrici krivulja benzofenona potpuno se deformirala (Slika 8.11 u Dodatku). Ovaj rezultat nije neočekivan obzirom da je sastav matrica termokromnih boja izuzetno složen. Snimanje kromatograma potvrdilo je da uzorci boja istih proizvođača i načina sušenja imaju sličan sastav matrice, ali da između grupa postoje znatne razlike. Može se zaključiti da bi za kvantitativno određivanje BPA i BFN u uzorcima boja trebalo primijeniti metodu standardnog dodatka ili koristiti izotopno označene standarde za svaki uzorak ili skupinu uzoraka.

Dodatno je procijenjena moguća granica određivanja analita u smjesi metanola i vode injektiranjem otopine masene koncentracije $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ bisfenola A i benzofenona. Omjer signala i šuma osnovne linije bio je za bisfenol A bolji za molekulski prijelaz $m/z 227 \rightarrow m/z 133$ nego za $m/z 227 \rightarrow m/z 211$ i iznosio je 15,5. Pri analizi benzofenona omjer signala i šuma osnovne linije bio je 23,6 za molekulski prijelaz $m/z 183 \rightarrow m/z 105$. Obzirom na omjer signala i šuma osnovne linije te mogućnost povećanja volumena injektiranja, vjerojatno je da se mogu postići granice određivanja na razini $\mu\text{g L}^{-1}$ što je koristan podatak za eventualno određivanje BPA i BFN u uzorcima koji imaju ujednačeniju matricu kao što su je npr. papir.

4.1.4. Analiza uzoraka termokromnih boja

Nakon uspješno provedene validacije, metodom za određivanje bisfenola A i benzofenona analizirano je svih petnaest uzoraka termokromnih boja. Bisfenol A pronađen je u tri, a benzofenon u dva uzorka. Rezultati određivanja prikazani su u Tablici 4.14. Benzofenon je u skladu s teorijskim podacima pronađen u uzorcima koji se suše pomoću UV-zračenja.

Tablica 4.14. Maseni udjeli bisfenola A i benzofenona u uzorcima termokromnih boja

Uzorak	Oznaka uzorka	Proizvođač	Suše- nje	w(BPA) / %	w(BFN) / %
1.1.	<i>Offset blue Chameleon 27 °C</i>	TMC ⁽¹⁾	zrak	1,95	–
2.1.	<i>Magenta room voda-UV</i>	Sun Chemical	UV	1,78	0,66
2.2.	<i>Blue-cold</i>	Sun Chemical	UV	1,96	0,34

⁽¹⁾ *Thermochromic Measurements Ltd.*

Kromatogrami uzoraka 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* i 2.1. *Magenta room voda-UV* prikazani su na Slikama 4.5 i 4.6. Kromatogram uzorka 2.2. *Blue-cold* te kromatogrami po jednog predstavnika za svaku od preostalih skupina boja nalaze se na Slikama 8.1 do 8.6 u Dodatku.

Tijekom analize uzoraka termokromnih boja snimljeni su apsorpcijski UV-spektri svih krivulja koje se pojavljuju u svim uzorcima. Pokazalo se da boje unutar jedne skupine imaju iste karakteristične komponente. Primijećeno je da krivulje nepoznatih komponenti s istim vremenom zadržavanja imaju iste UV-spektre u svim uzorcima i ako se radi o različitim proizvođačima i načinima sušenja uzoraka. Učestalost i pregled pojavljivanja poznatih i nepoznatih komponenti u uzorcima termokromnih boja prikazana je u Tablici 8.1, a UV-spektri karakterističnih krivulja prikazani su na Slikama 4.3 i 4.4, te 8.7 i 8.8 u Dodatku. Primijećeno je i da neke krivulje s različitim vremenima zadržavanja imaju vrlo slične UV-spektre. Najznačajnije su sličnosti UV-spektra spoja s vremenom zadržavanja 9,6 min [Slika 8.7 (F)] s UV-spektrom bisfenola A (Slika 4.3) te UV-spektra spoja s vremenom zadržavanja 8,2 min [Slika 8.7 (E)] i UV-spektra benzofenona (Slika 4.4). Primijećeno je da svi uzorci u kojima nije detektiran bisfenol A sadrže nepolarniju komponentu ($t_R = 9,6$ min) sa sličnim spektrom (Tablica 8.1 u Dodatku). Moguće je da se radi o nekom derivatu bisfenola A koji umjesto njega ima ulogu razvijaa. Također, sve boje koje se suše uz djelovanje UV zračenja, a ne sadrže

benzofenon imaju polarniju komponentu koja eluira na 8,2 min sa spektrom vrlo sličnim benzofenonu (Slika 8.7 i Tablica 8.1 u Dodatku). U ovom je slučaju moguće da se radi o spoju srodnom benzofenonu koji ima ulogu fotoinicijatora. U objavljenim radovima već je primijećen trend zamjene do sad najzastupljenijih pseudoestrogena njihovim srodnim spojevima kao što su bisfenol S, bisfenol E, bisfenol B, 4-metilbenzofenon, 2-hidroksibenzofenon i drugi.^{11,12,22,28,56,71,72,83,88,98}

Obzirom na patentnu zaštitu i namjenu proizvođači ne navode i nisu obavezni navesti točan kemijski sastav termokromnih boja. Također, vjerojatno zbog toga što je bisfenol A već registriran kao endokrino aktivna tvar, a benzofenon ima taj potencijal te u vodi prelazi u 3-hidroksibenzofenon i 4-hidroksibenzofenon sa znatno jačim endokrinim djelovanjem,²⁵⁻²⁷ proizvođači nastoje u formulacije ugraditi srodne spojeve koji još nisu na popisu opasnih tvari. Prema Europskoj udruzi za tiskarske tinte mogućnost migracije toksičnih komponenti s tinte u prehrambene proizvode treba testirati proizvođač pakiranja,⁴⁶ ali nema propisa o ispitivanju migracije toksičnih komponenti na kožu kao niti o njihovoj razgradnji u različitim uvjetima u okolišu.

Metoda za određivanje bisfenola A i benzofenona u uzorcima termokromnih boja razvijena je kako bi se znalo u kojim papirima s termokromnim otiscima treba pratiti maseni udjel, migraciju i razgradnju tih analita. U budućnosti metoda se može koristiti u sustavu kontrole kvalitete proizvođača termokromnih boja, ambalaže i drugih korisnika koji bi trebali voditi računa o toksičnim komponentama pri donošenju odluke o aplikaciji i zbrinjavanju viška boje i proizvoda s apliciranim bojama.

4.2. Određivanje bisfenola A u različitim vrstama papira s termokromnim otiskom

Cilj ovog dijela rada bio je odrediti ukupni maseni udjel bisfenola A u papirima s termokromnim otiskom kako bi se mogao pratiti njegov sadržaj u papirima tijekom anaerobne razgradnje i ispitati ekstrakcija bisfenola A s otisaka termokromne boje na papiru u modelne otopine znoja kao doprinos procjeni dermalne izloženosti. Termokromna boja 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* koja sadrži bisfenol A, otisnuta je na sedam vrsta papira (Slika 3.1, Tablica 3.2). U literaturi nisu pronađena istraživanja koja ispituju ekstrakciju bisfenola A s otisaka termokromnih boja u bilo kojem mediju. U usporedbi s do sada objavljenim radovima o određivanju bisfenola A u uzorcima papira, u ovom radu ispitana je ekstrakcijom metanolom te s dvije modelne otopine znoja pripravljene prema normama ISO 3160-2 i EN 1811.⁸⁷⁻⁸⁹ Šest vrsta papira s termokromnim otiskom (sve osim uredskog papira *Navigator*) stavljeno je u tlo te je praćena anaerobna razgradnja tijekom 150 dana. Tekućinska kromatografija obrnutih faza s UV-detekcijom bila je tehnika izbora za analizu uzoraka s relativno visokim masenim udjelom bisfenola A obzirom da je već i primjenjivana za analizu papira.^{16,34,83}

4.2.1. Razvoj metode

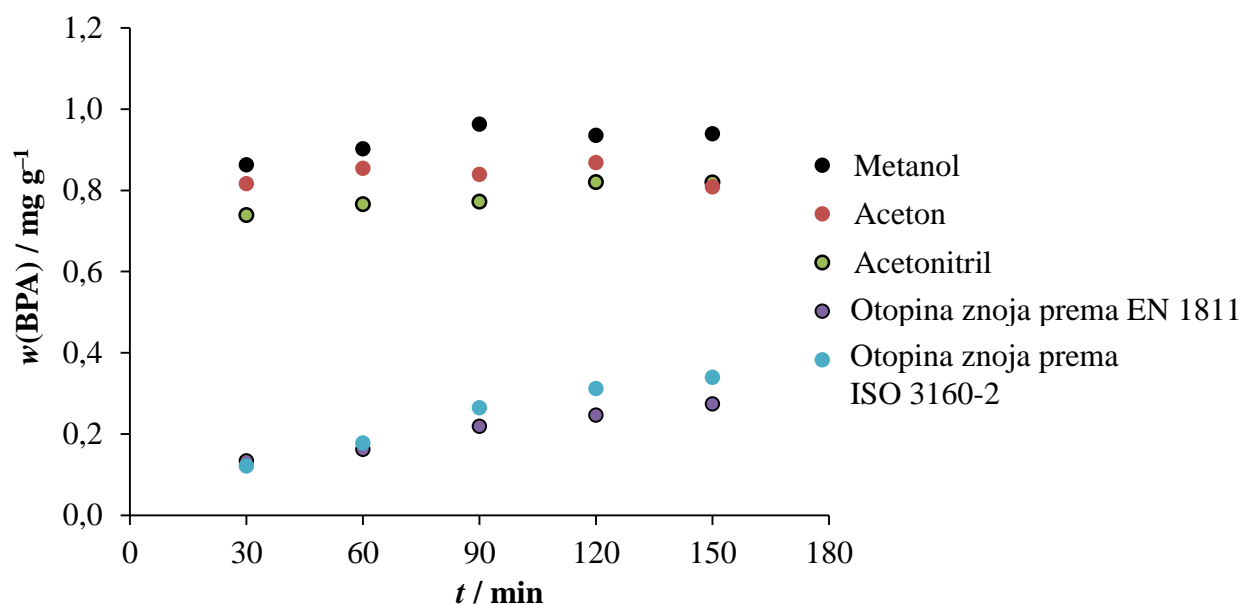
4.2.1.1. Podešavanje kromatografskih uvjeta

Obzirom da je maseni udjel bisfenola A u papirima bio znatno niži nego u termokromnim bojama volumen injektiranja otopine uzorka u kromatografsku kolonu povećan je na 50 μL . Vrijeme eluiranja uz visok udio acetonitrila u pokretnoj fazi malo je produljeno zbog jače zadržanih komponenti uzorka koje se ekstrahiraju iz papira tijekom pripreve, pa je ukupno vrijeme analize bilo 30 minuta. Kromatogrami su snimani samo na valnoj duljini od 226 nm jer je na različite vrste papira tiskana termokromna boja 1.1. *Offset blue Chameleon 27 °C* koja sadrži samo bisfenol A.

4.2.1.2. Odabir otapala i vremena ekstrakcije pomognute ultrazvukom

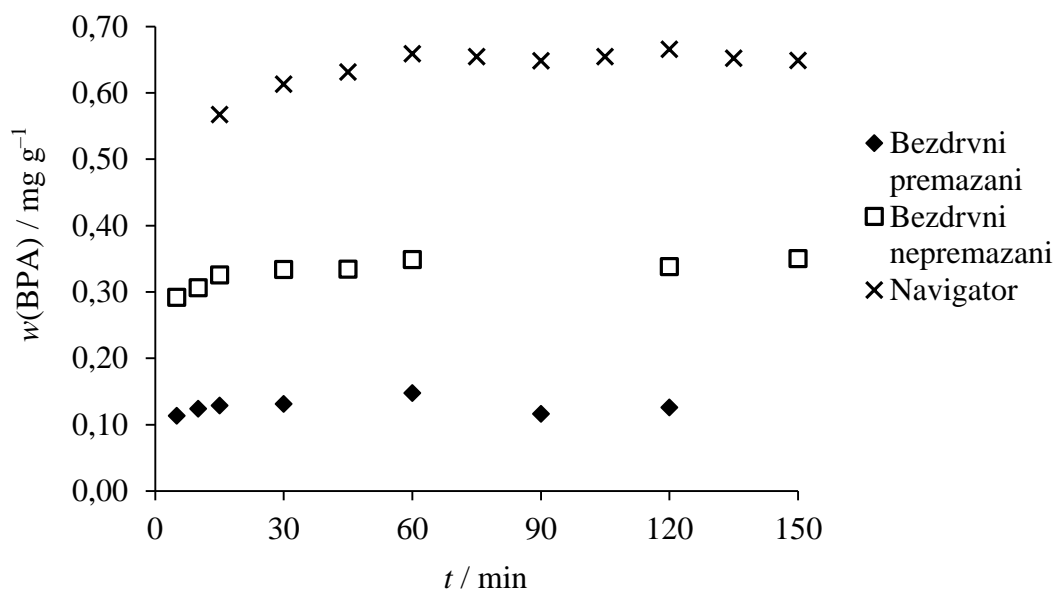
Obzirom na podatke u literaturi,^{32,34-36,61,73,83} za određivanje maksimalne koncentracije BPA u uzorcima ispitana je učinkovitost ekstrakcije BPA s površine otiska termokromne boje na

papiru metanolom, acetonom i acetonitrilom tijekom 150 min u vremenskim intervalima od po 30 min. Paralelno je napravljena i ekstrakcija papira bez otiska termokromne boje sa svim otapalima tijekom maksimalnog vremena, kao slijepa proba. Pokazalo se da u papirima bez otiska termokromne boje nema tragova bisfenola A. Također ispitana je i djelotvornost ekstrakcije bisfenola A s modelnim otopinama znoja uz različito trajanje ekstrakcije. Rezultati izraženi u miligramima ekstrahiranog bisfenola A u odnosu na masu uzorka papira tijekom vremena prikazani su na Slici 4.17.



Slika 4.17. Ovisnost djelotvornosti ultrazvučne ekstrakcije bisfenola A s različitim otapalima iz uzoraka papira s termokromnim otiskom o vremenu

Na temelju rezultata prikazanih na Slici 4.17 može se zaključiti da je najdjelotvornija ekstrakcija bisfenola A metanolom. Nakon odabira metanola kao najboljeg otapala, eksperiment ekstrakcije ponovljen je s više vrsta papira kako bi se odredilo vrijeme potrebno za potpunu ekstrakciju. Vrijeme ekstrakcije od 1 h u ultrazvučnoj kupelji pokazalo se dovoljnim za tri vrste papira s različitim masenim udjelima bisfenola A. Rezultati su prikazani na Slici 4.18. Vrijeme najdjelotvornije ekstrakcije podudara se s optimalnim vremenom ekstrakcije BPA s etanolom iz uzoraka termalnih papira.³² U više objavljenih radova optimalno vrijeme ekstrakcije nije ispitano.^{16,34,36,74,84}



Slika 4.18. Ovisnost djelotvornosti ultrazvučne ekstrakcije bisfenola A s metanolom iz uzoraka papira s termokromnim otiskom o vremenu

Količina ekstrahiranog bisfenola A s modelnim otopinama znoja povećavala se i nakon 60 minuta trajanja ekstrakcije. BPA je bilo moguće detektirati već nakon 15 i manje minuta. Međutim, uz kratko vrijeme ekstrakcije teško je postići zadovoljavajuću ponovljivost, jer u tom slučaju i kratko vrijeme tijekom pripreve, kada su neki uzorci dulje, a neki kraće u kontaktu s otopinom, znatno utječe na rezultat. Za modelne otopine znoja, sline i sl. vrijeme ekstrakcije se obično određuje prema namjeni, odnosno očekivanom vremenu kontakta s predmetom na kojemu se ispituje ekstrakcija, npr. pelene, dječje igračke, metalni predmeti i sl.^{78–81} U ovom slučaju to nije bilo moguće definirati, jer je ovo prvo istraživanje ekstrakcije BPA s termokromnih otisaka kojima namjena nije određena. U ovom je istraživanju vrijeme ultrazvučne ekstrakcije od 60 minuta za termokromne otiske modelnim otopinama znoja odabrano kao referentna točka, koja je uspoređena s maksimalnom količinom bisfenola A ekstrahiranom metanolom tijekom istog vremena.

4.2.1.3. Ekstrakcija bisfenola A s površine papira uzimanjem brisa

Ispitana je mogućnost određivanja bisfenola A ekstrahiranog s površine otiska uzimanjem brisa pomoću vatenog štapića prethodno namočenog u metanol prema postupku opisanom u literaturi.³⁴ Utvrđeno je da se uzimanjem brisa s papira veličine oko 3 × 3 cm ekstrahira količina bisfenola A koju je moguće detektirati, no ponovljivost pripreve uzorka nije bila

zadovoljavajuća. Rezultati analize BPA u šest priprava istog uzorka varirali su od 0,0224 mg g⁻¹ do 0,0406 mg g⁻¹ uz relativnu standardnu devijaciju od 24 % (Tablica 4.15). Uzrok tome vjerojatno je premala površina s koje se uzima bris. Međutim, za uzorkovanje s veće površine papira i daljnji razvoj ovog postupka nije bilo dovoljno uzoraka.

Tablica 4.15. Ponovljivost određivanja BPA uzimanjem brisa s površine papira i ekstrakcijom metanolom

Mjerenje	w(BPA) / mg g ⁻¹
1	0,0406
2	0,0251
3	0,0344
4	0,0281
5	0,0242
6	0,0224
Sr. vrijednost	0,0291
RSD / %	24

4.2.1.4. Ekstrakcija bisfenola A s papira mućkanjem u modelnim otopinama znoja

Cilj ovog eksperimenta bio je ispitati ekstrakciju BPA modelnim otopinama znoja pri blažim uvjetima od ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji. Ekstrakcija uzorka papira narezanog na komadiće u 9 mL medija u odmjernoj tikvici većeg volumena (25 mL) omogućila je efikasnije mućkanje. Nakon mućkanja ekstrakt je procijeđen u odmjernu tikvicu od 10 mL i dopunjen do volumena od 10 mL kako bi se papiri s otiskom termokromne boje odvojili od otopine i ekstrakcija zaustavila.

U svim ranijim eksperimentima korištene su svježe pripravljene modelne otopine znoja, no uz mućkanje pri sobnoj temperaturi tijekom 60 min ekstrahirana količina BPA iz većine uzoraka bila je vrlo niska. Daljnjim eksperimentima ispitana je količina ekstrahiranog bisfenola A svježe pripremljenim modelnim otopinama znoja i modelnim otopinama starim 40 dana uz 1 h mućkanja na sobnoj temperaturi. Količina bisfenola A ekstrahirana svježe pripremljenim modelnim otopinama bila je vrlo niska, u nekim ekstraktima i ispod granice detekcije. Koncentracija bisfenola A ekstrahiranog tijekom 1 h mućkanja na sobnoj temperaturi modelnim otopinama znoja starim 40 dana bila je reda veličine koncentracije bisfenola A ekstrahiranog metanolom. Rezultati ekstrakcije bisfenola A modelnim otopinama znoja različite starosti prikazani su u Tablici 4.16. Pretpostavka je da se stajanjem modelnih otopina

znoja razvijaju bakterije te se svojstva otopina mijenjaju što nije moguće detektirati niti kontrolirati, a pridonosi ekstrakciji bisfenola A. Mjerenjem pH-vrijednosti modelnih otopina znoja starih 40 dana utvrđeno je da se pH-vrijednost modelne otopine pripravljene prema normi EN 1811 snizila sa 6,5 na 5,3, dok je pH-vrijednosti modelne otopine pripravljene prema normi ISO 3160-2 ostala podjednaka $4,7 \pm 0,1$.

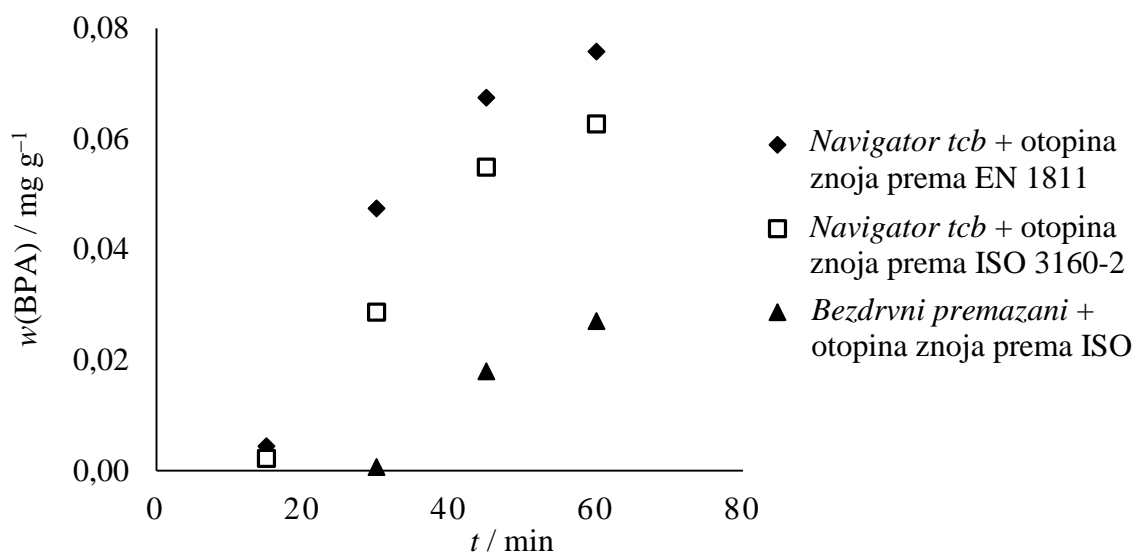
Tablica 4.16. Usporedba masenih udjela bisfenola A ekstrahiranog s papira modelnim otopinama znoja uz mućkanje i pomoću ultrazvuka

Modelna otopina znoja	Papir	$w(\text{BPA})_{\text{MUĆKANJE}} / \text{mg g}^{-1}$		$w(\text{BPA})_{\text{UZV}} / \text{mg g}^{-1}$
		Svježa otopina	Otopina stara 40 dana	
ISO 3160-2	Navigator	< GD ⁽¹⁾	0,122	0,158
	Navigator tcb 1cm ³	< GO ⁽²⁾	0,105	
	Voluminozni		0,036	0,108
	Sintetički	< GD	0,096	0,073
	Reciklirani 100 %	< GD		0,089
	Reciklirani 33 %		0,057	0,083
	Bezdrvni nepremazani	< GD	0,044	0,064
	Bezdrvni premazani	< GD	0,049	0,122
EN 1811	Navigator	0,0023	0,111	0,167
	Voluminozni	< GO		
	Sintetički	< GO	0,093	0,076

⁽¹⁾ Granica detekcije

⁽²⁾ Granica određivanja

Dodatno su uspoređene djelotvornosti ekstrakcije bisfenola A tijekom vremena iz otiska na papiru *navigator tcb-1-cm³* s obje modelne otopine znoja i ekstrakcije iz otiska na papiru *bezdrvni premazani* za koji je u modelnoj otopini znoja pripravljenoj prema normi ISO 3160-2 određen najniži maseni udjel BPA. Korištene su modelne otopine stare 4 tjedna, a ovisnost djelotvornosti ekstrakcije tijekom vremena prikazana je na Slici 4.19.



Slika 4.19. Ovisnost djelotvornosti ekstrakcije BPA iz papira s termokromnim otiskom mućkanjem s modelnim otopinama znoja o vremenu

Ispitana je i preciznost pripreve uzoraka u svježoj modelnoj otopini znoja prema normi ISO 3160-2 te u modelnoj otopini znoja prema normi EN 1811 staroj 4 tjedna. Preciznost pripreve bila je zadovoljavajuća, 5,7 % u svježoj modelnoj otopini i 9,3 % u modelnoj otopini staroj 4 tjedna. Međutim, obzirom da se svježim modelnim otopinama iz većine uzoraka nije ekstrahirala dovoljna količina BPA tijekom 60 min, a promjene otopina stajanjem nije bilo moguće specificirati i korelirati s rezultatima, ekstrakcija bisfenola A mućkanjem nije dalje ispitivana.

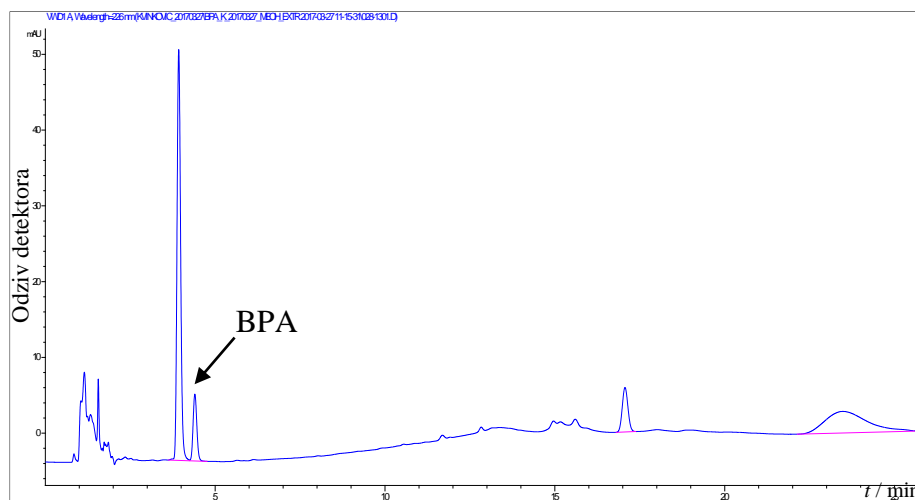
4.2.2. Validacija metode

Svi kritični parametri metode razvijene za određivanje BPA u metanolnom ekstraktu papira s termokromnim otiskom kao i ekstraktu pripremljenom u dvije modelne otopine znoja validirani su prema smjernicama međunarodnih regulatornih agencija.^{103,104}

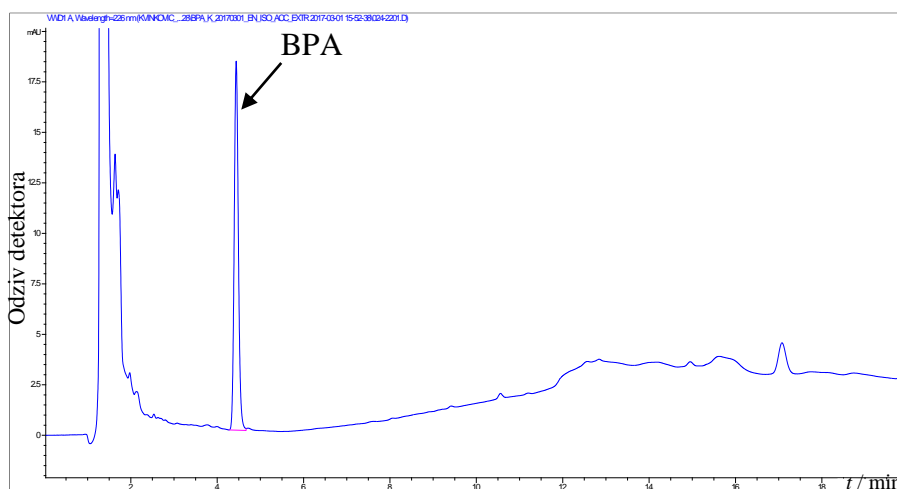
4.2.2.1. Selektivnost i specifičnost

Tipični kromatogrami BPA ekstrahiranog iz uzoraka papira metanolom i modelnim otopinama znoja prikazani su na Slikama 4.20 do 4.22. Identitet BPA potvrđen je usporedbom njegova vremena zadržavanja u kromatogramima otopina uzorka i standarda te snimanjem

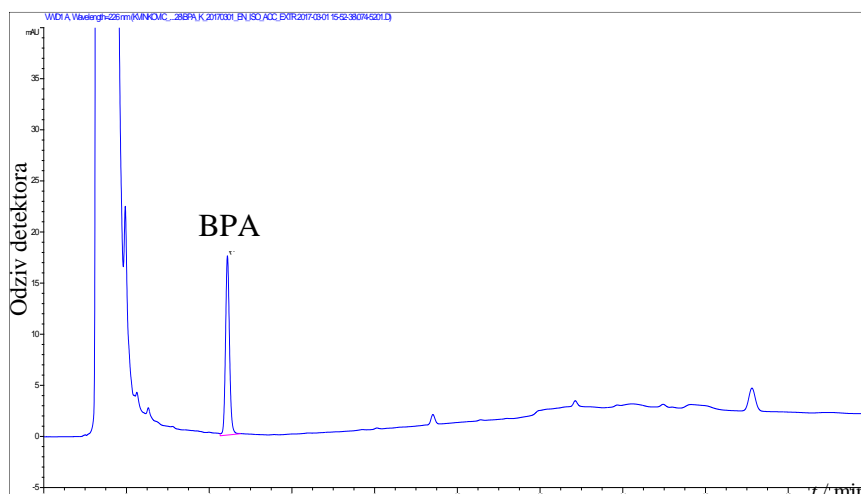
UV-spektra analita tijekom kromatografske analize pomoću detektora s nizom fotodioda (Slika 4.23).



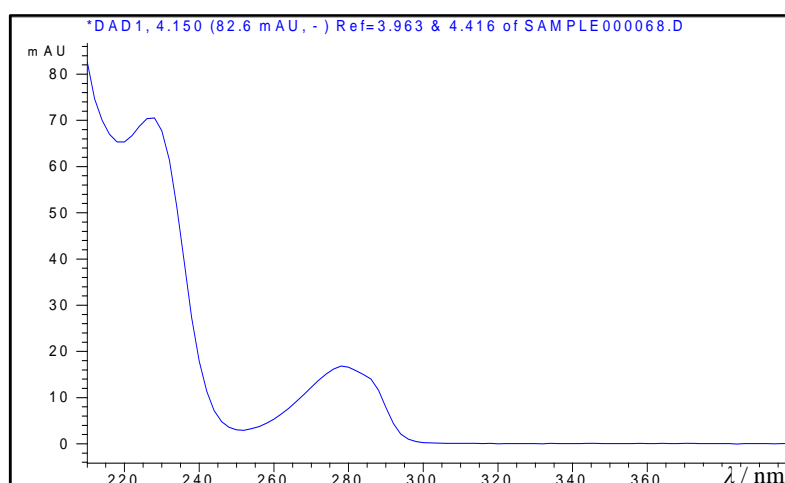
Slika 4.20. Kromatogram BPA ekstrahiranog metanolom iz uzorka papira *bezdrvni premazani* s termokromnim otiskom, $w(\text{BPA}) = 0,122 \text{ mg g}^{-1}$



Slika 4.21. Kromatogram BPA ekstrahiranog iz uzorka papira *navigator* s termokromnim otiskom modelnom otopinom znoja pripremljenom prema normi EN 1811, $w(\text{BPA}) = 0,167 \text{ mg g}^{-1}$



Slika 4.22. Kromatogram BPA ekstrahiranog iz uzorka papira *navigator* s termokromnim otiskom modelnom otopinom znoja pripravljenom prema normi ISO 3160-2, $w(\text{BPA}) = 0,158 \text{ mg g}^{-1}$

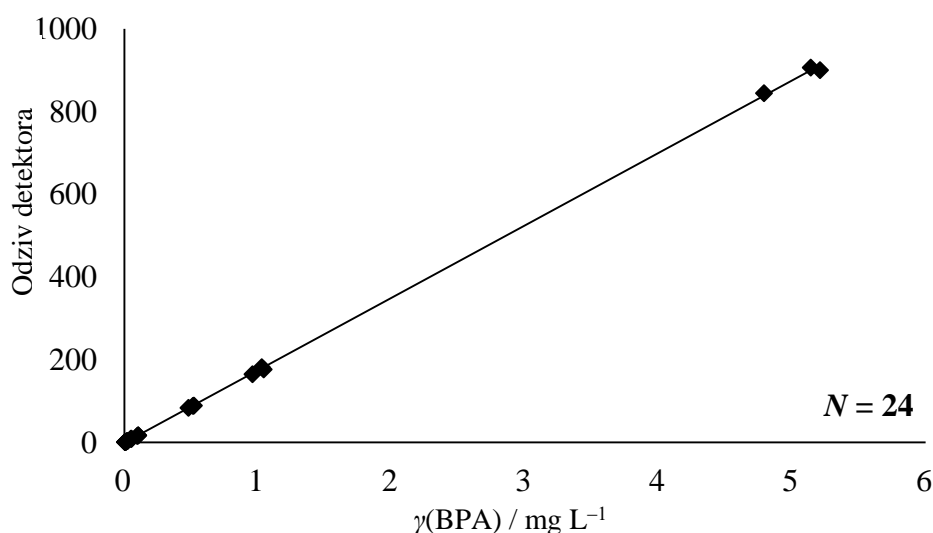


Slika 4.23. UV-spektar BPA ekstrahiranog metanolom iz uzorka papira *navigator* s termokromnim otiskom, pokretna faza: smjesa vode i acetonitrila [$\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 0,53$]

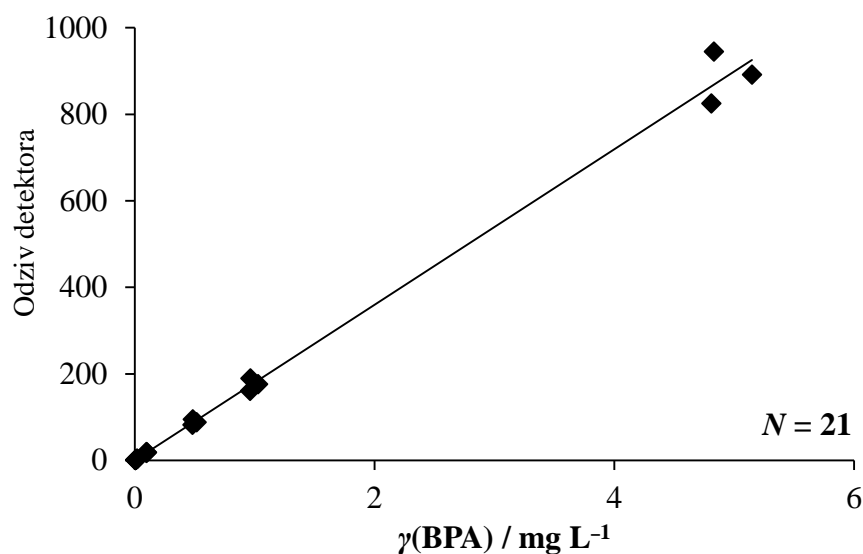
Analize BPA u ekstraktima svih uzoraka papira pokazale su da je gradijentno ispiranje prethodno razvijeno za analizu termokromnih boja odgovarajuće i za analizu termokromnih otisaka na papiru. Sve kromatografske krivulje koje su se pojavljivale u kromatogramima ekstrakata papira s termokromnim otiscima bile su potpuno razlučene od krivulje bisfenola A.

4.2.2.2. Linearnost

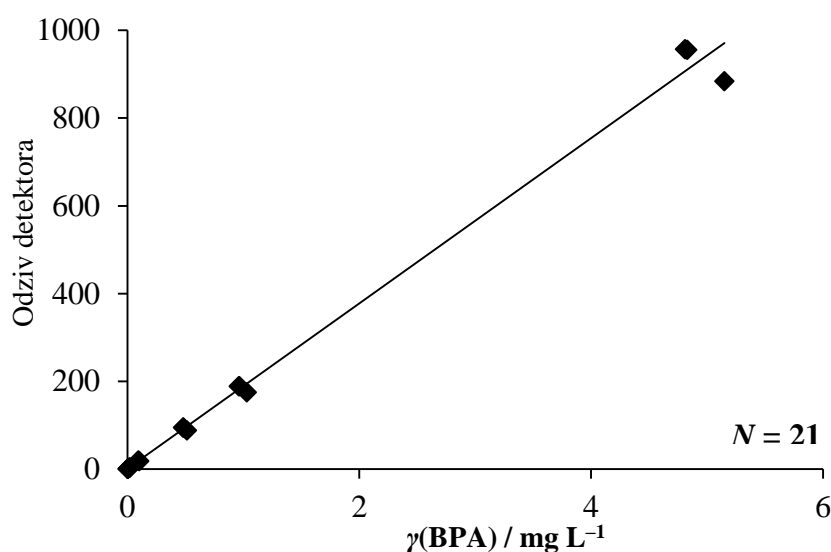
Kako bi se provjerila linearnost odziva UV-detektora za određivanje bisfenola A u metanolnom ekstraktu papira analiziran je niz od 24 standardne otopine, tj. po tri pripreve na osam koncentracijskih razina u rasponu masenih koncentracija bisfenola A u otopini od $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ do 5 mg L^{-1} , odnosno masenih udjela od $0,0017 \text{ mg g}^{-1}$ do $1,7 \text{ mg g}^{-1}$. Linearnost metode za određivanje ekstrakcije bisfenola A u modelnim otopinama znoja ispitana je pripravom standardnih otopina u istom rasponu masenih koncentracija odnosno masenih udjela kao i za ekstrakciju metanolom. U ovom slučaju za svaku modelnu otopinu znoja napravljene su po tri pripreve na sedam koncentracijskih razina. Ovisnosti površine kromatografske krivulje BPA o masenoj koncentraciji u standardnim otopinama prikazane su na Slikama 4.24 do 4.26. Odziv detektora bio je podjednak za iste koncentracije bisfenola A u svim ekstrakcijskim otopinama.



Slika 4.24. Ovisnost površine krivulje bisfenola A o masenoj koncentraciji u standardnim otopinama pripremljenim u smjesi vode i metanola [$\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 0,5$], N = ukupni broj mjerenja



Slika 4.25. Ovisnost površine krivulje bisfenola A o masenoj koncentraciji u modelnoj otopini znoja pripravljenoj prema normi ISO 3160-2, N = ukupni broj mjerenja



Slika 4.26. Ovisnost površine krivulje bisfenola A o masenoj koncentraciji u modelnoj otopini znoja pripravljenoj prema normi EN 1811; N = ukupni broj mjerenja.

Jednadžbe baždarnih pravaca, koeficijenti korelacije, srednje vrijednosti i relativne standardne devijacije faktora odziva prikazane su u Tablici 4.17. Faktori odziva izraženi su kao omjer površine kromatografske krivulje i masene koncentracije bisfenola A u otopini. Rezultati ispitivanja linearnosti odziva detektora podjednaki su za sve ekstrakcijske otopine BPA i zadovoljavajući za primjenu metode u ispitivanom koncentracijskom području.

Tablica 4.17. Parametri ispitivanja linearnosti odziva detektora za određivanje BPA u različitim ekstrakcijskim otopinama

Ekstrakcijska otopina	Koeficijent korelacije	Jednadžba pravca	R_F - srednja vrijednost	$RSD(R_F)$ / %
Metanol	0,9999	$y = 175,1 x - 0,560$	173	3,9
Znoj ISO 3160-2	0,9976	$y = 179,7 x - 0,0237$	184	7,6
Znoj EN 1811	0,9969	$y = 188,6 x + 0,294$	197	8,4

R_F = faktor odziva

4.2.2.3. Preciznost

Preciznost mjerenja bisfenola A ekstrahiranog iz papira s termokromnim otiskom metanolom i modelnim otopinama znoja određena je na temelju šest uzastopnih injektiranja otopine uzorka u kromatografsku kolonu i izražena kao relativna standardna devijacija površine kromatografske krivulje. Ponovljivost pripreve uzorka određena je na temelju rezultata izmjerenih analizom šest pripreva istog uzorka i izražena kao relativna standardna devijacija masenih udjela bisfenola A. Za ispitivanje preciznosti određivanja BPA ekstrakcijom metanolom korišten je papir *navigator* s termokromnim tiskom $tcb-1-cm^3$, a za ispitivanje preciznosti ekstrakcijom modelnim otopinama znoja papir *navigator* sa standardnim termokromnim otiskom. Rezultati su prikazani u Tablicama 4.18 i 4.19.

Tablica 4.18. Preciznost kromatografskog mjerenja bisfenola A ekstrahiranog iz papira s termokromnim otiskom metanolom i modelnim otopinama znoja

Mjerenje	Površina krivulje BPA		
	Metanol	Znoj ISO 3160-2	Znoj EN 1811
1	323,9	87,1	109,3
2	323,4	86,7	111,0
3	323,7	87,0	108,2
4	323,7	86,9	109,0
5	323,9	87,0	110,8
6	324,9	86,7	108,3
<i>Sr. vrijednost</i>	323,9	86,9	109,4
<i>RSD / %</i>	0,2	0,2	1,1

Tablica 4.19. Ponovljivost pripreve uzorka za određivanje bisfenola A u papiru s termokromnim otiskom ekstrakcijom metanolom i modelnim otopinama znoja

Priprava	$w(\text{BPA})_{\text{PAPIR}} / \text{mg g}^{-1}$		
	Metanol	Znoj ISO 3160-2	Znoj EN 1811
1	0,678	0,143	0,161
2	0,652	0,160	0,172
3	0,649	0,147	0,164
4	0,650	0,169	0,164
5	0,642	0,172	0,169
6	0,637	0,158	0,171
Sr. vrijednost	0,652	0,158	0,167
RSD / %	2,2	7,3	2,7

4.2.2.4. Točnost

Točnost metode za određivanje BPA u termokromnim otiscima na papiru ekstrakcijom metanolom ispitana je na uzorcima 33 % *recikliranog* papira s termokromnim otiskom i bez njega. Točnost metode za određivanje BPA ekstrahiranog s papira modelnim otopinama znoja ispitana je na uzorcima 100 % *recikliranog* papira s termokromnim otiskom i bez njega. Za svaku ekstrakcijsku otopinu pripravljeno je po devet uzoraka u koje je dodana standardna otopina bisfenola A na tri koncentracijske razine koje pokrivaju područje primjene metode. Za određivanje najniže koncentracije BPA korišten je papir bez otiska boje, a za određivanje srednje i visoke koncentracije papir s otiskom boje. Točnost metode za određivanje BPA ekstrahiranog s otiska boje na papiru metanolom bila je od 88 % do 109 % s prosječnom vrijednošću od 98 %. Točnost metode za određivanje BPA u modelnoj otopini znoja pripravljenoj prema normi ISO 3160-2 bila je od 89 % do 100 % s prosječnom vrijednošću od 93 %, a točnost u modelnoj otopini znoja pripravljenoj prema normi EN 1811 od 83 % do 92 % s prosječnom vrijednošću od 88 %. Rezultati su prikazani u Tablicama 4.20 i 4.21.

Tablica 4.20. Točnost metode za određivanje BPA ekstrahiranog s papira s termokromnim otiskom metanolom

Priprava	$w(\text{BPA}) / \text{mg g}^{-1}$		Točnost / %
	Dodano	Mjereno	
1	0,032	0,034	107
2	0,032	0,035	109
3	0,033	0,036	109
4	0,540	0,482	89
5	0,527	0,466	89
6	0,540	0,474	88
7	1,048	1,015	97
8	1,034	1,010	98
9	1,079	1,015	94
Srednja vrijednost			98
RSD / %			8,9

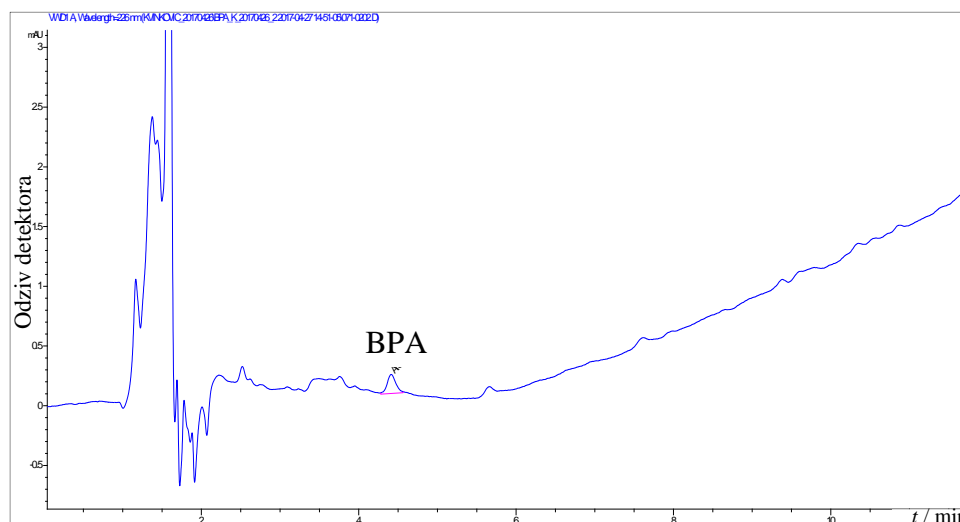
Tablica 4.21. Točnost metode za određivanje BPA ekstrahiranog s papira s termokromnim otiskom modelnim otopinama znoja

Priprava	ISO 3160-2			EN 1811			
	$w(\text{BPA}) / \text{mg g}^{-1}$		Točnost / %	$w(\text{BPA}) / \text{mg g}^{-1}$		Točnost / %	
Dodano	Mjereno	Dodano		Mjereno			
1	0,031	0,031	100	0,032	0,029	92	
2	0,031	0,030	95	0,035	0,032	91	
3	0,032	0,030	96	0,032	0,026	83	
4	0,242	0,228	94	0,278	0,250	90	
5	0,237	0,217	92	0,257	0,226	88	
6	0,238	0,216	91	0,263	0,238	91	
7	0,755	0,668	89	0,785	0,673	86	
8	0,735	0,667	91	0,772	0,665	86	
9	0,745	0,685	92	0,797	0,689	87	
Srednja vrijednost			93	Srednja vrijednost			88
RSD / %			3,6	RSD / %			3,3

4.2.2.5. Granica detekcije i određivanja

Pripravljen je ekstrakt papira *bezdrvni nepremazani* bez otiska termokromne boje u koji je dodana otopina standarda BPA. Masena koncentracija BPA u otopini za određivanje granice detekcije bila je $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$ što odgovara $w(\text{BPA}) = 0,0008 \text{ mg g}^{-1}$ u uzorku papira (Slika 4.27). Masena koncentracija BPA u otopini za ispitivanje granice određivanja bila je $0,0075 \text{ mg L}^{-1}$ što odgovara $w(\text{BPA}) = 0,0025 \text{ mg g}^{-1}$ u uzorku papira. Otopina s masenom

koncentracijom analita na granici određivanja injektirana je u kromatografsku kolonu šest puta. U Tablici 4.22 prikazane su površine krivulja BPA i omjeri signala i šuma osnovne linije te njihove relativne standardne devijacije. Standardne devijacije površine krivulja na granici kvantifikacije su u skladu sa zahtjevima manje od 10 %.



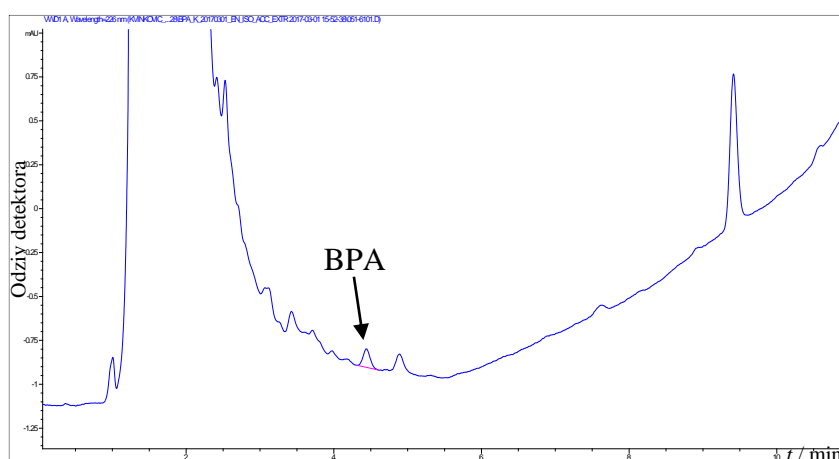
Slika 4.27. Kromatogram metanolnog ekstrakta otopine uzorka papira koncentracije BPA na granici detekcije, $\gamma(\text{BPA}) = 0,0025 \text{ mg L}^{-1}$, $w(\text{BPA}) = 0,0008 \text{ mg g}^{-1}$ ($S/N = 3,4$)

Tablica 4.22. Površina krivulje BPA i omjeri signala i šuma osnovne linije (S/N) u kromatogramu metanolnog ekstrakta uzorka papira koncentracije BPA na granici određivanja metode

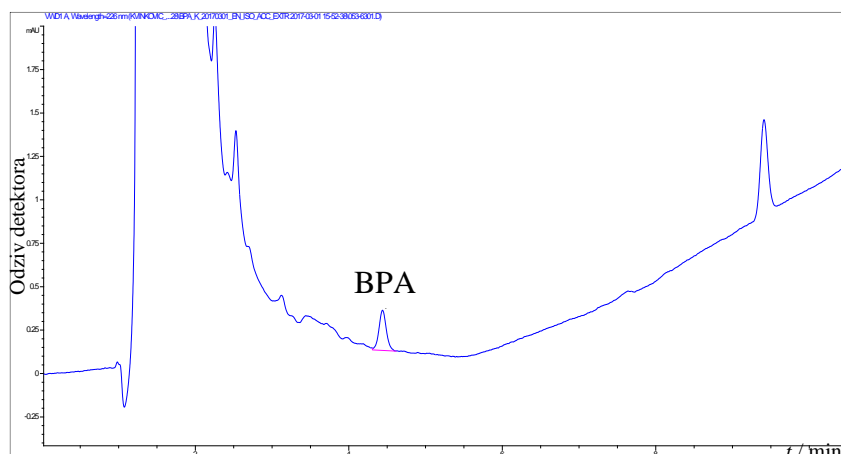
Redni br. injektiranja	Površina krivulje	S/N
1	1,24	13,0
2	1,22	12,7
3	1,17	14,7
4	1,20	10,5
5	1,02	15,6
6	1,18	13,2
Srednja vrijednost	1,17	13,4
RSD / %	7,5	13,2

Za određivanje granice detekcije i određivanja BPA ekstrahiranog iz papira modelnim otopinama znoja pripravljene su otopine 100 % recikliranog papira bez termokromnog otiska u koje je dodana odgovarajuća koncentracija otopine standarda. Ovaj uzorak papira odabran je zato što je na početku kromatograma zabilježena najveća kromatografska krivulja što može

interferirati određivanju BPA. Granica detekcije BPA u obje modelne otopine znoja bila je ista kao i granica postignuta ekstrakcijom metanolom, $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$ BPA u otopini, odnosno $0,0008 \text{ mg g}^{-1}$ u uzorku papira (Slika 4.28). Granice određivanja BPA također su bile iste kao i za ekstrakciju metanolom, $0,0075 \text{ mg L}^{-1}$ bisfenola A u otopini uzorka odnosno $0,0025 \text{ mg g}^{-1}$ u uzorku papira (Slika 4.29). Pokazalo se da komponente modelnih otopina znoja čije se kromatografske krivulje pojavljuju u kromatogramima ne smanjuju omjer signala i šuma osnovne linije i ne interferiraju s krivuljom bisfenola A. Otopine s masenom koncentracijom analita na granici određivanja injektirane su u kromatografsku kolonu šest puta. U Tablici 4.23 prikazane su površine kromatografskih krivulja bisfenola A i omjeri signala i šuma osnovne linije te njihove relativne standardne devijacije. Standardne devijacije površine kromatografskih krivulja na granici kvantifikacije zadovoljavaju zahtjev da su manje od 10 %. Relativna standardna devijacija vrijednosti S/N nešto je veća od 10 %, ali to nije kriterij prihvatljivosti za potvrdu granice određivanja.



Slika 4.28. Uvećani dio kromatograma BPA ekstrahiranog iz uzorka papira modelnom otopinom znoja pripremljenom prema normi ISO 3160-2; masena koncentracija BPA dodana otopini uzorka na granici detekcije: $\gamma(\text{BPA}) = 0,0025 \text{ mg L}^{-1}$, $w(\text{BPA}) = 0,0008 \text{ mg g}^{-1}$ ($S/N = 4,1$)



Slika 4.29. Uvećani dio kromatograma BPA ekstrahiranog iz uzorka papira modelnom otopinom znoja pripremljenom prema normi ISO 3160-2; masena koncentracija BPA dodanog otopini uzorka na granici određivanja: $\gamma(\text{BPA}) = 0,0075 \text{ mg L}^{-1}$, $w(\text{BPA}) = 0,0025 \text{ mg g}^{-1}$ ($S/N = 13,3$)

Tablica 4.23. Površina kromatografskih krivulja BPA i omjeri signala i šuma osnovne linije (S/N) u kromatogramima uzoraka papira ekstrahiranog modelnim otopinama znoja pri koncentraciji BPA na granici određivanja

Redni br. injektiranja	ISO 3160-2		EN 1811	
	Površina krivulje	S/N	Površina krivulje	S/N
1	1,16	13	1,20	12
2	1,20	13	1,16	13
3	1,18	15	1,13	15
4	1,16	10	1,15	14
5	1,13	16	1,17	11
6	1,16	14	1,19	12
Srednja vrijednost	1,17	13	1,17	13
RSD / %	2,0	13	2,2	13

4.2.2.6. Robusnost

Robusnost metode ispitana je variranjem uvjeta tekućinskokromatografske analize koji su relativno lako podložni promjenama ili manjim pogreškama, a mogli bi utjecati na rezultat mjerenja. Varirani su temperatura kolone, protok i sastav pokretne faze za $\pm 10 \%$. Promatrano je vrijeme zadržavanja i razlučivanje analita u odnosu na početnu krivulju u kromatogramima koja je ujedno bila i najbliža. Analizirane su otopine uzorka papira *navigator* s otiskom boje.

Vrijednosti u Tablici 4.24 pokazuju da manje promjene u temperaturi kolone, protoku i sastavu pokretne faze ne utječu znatno na djelotvornost i selektivnost kromatografske analize niti za jednu ekstrakcijsku otopinu.

Tablica 4.24. Robusnost metode za određivanje BPA u papiru s otiskom termokromne boje ekstrakcijom metanolom i modelnim otopinama znoja normama ISO 3160-2 i EN 1811

Ekstrakcijska otopina			Metanol		ISO 3160-2		EN 1811	
Kromatografski uvjeti								
t (kolone) / °C	Protok / mL min ⁻¹	Sastav pokretne faze	t_R (BPA)/ min	R_S	t_R (BPA)/ min	R_S	t_R (BPA)/ min	R_S
30	1,0		4,4	9,1	4,4	14,8	4,4	14,4
30	0,9	Prema	4,9	6,8	4,9	14,8	4,9	14,9
30	1,1	3.7.1.	4,0	7,8	4,0	14,5	4,0	14,6
30	1,0	+ 10 % H ₂ O	6,1	27,3	6,1	21,6	6,1	22,0
30	1,0	+ 10 % CH ₃ CN	3,4	6,1	3,4	9,2	3,4	10,7
27	1,0	Prema	4,5	16,7	4,5	14,1	4,5	14,9
33	1,0	3.7.1.	4,3	6,9	4,3	13,7	4,3	14,0

4.2.2.7. Stabilnost otopina

Stabilnost analiziranih otopina BPA ispitana je analizom otopine standarda koncentracije 1 mg L⁻¹ i ekstrakata uzorka papira *navigator* s termokromnim otiskom metanolom i modelnim otopinama znoja. Otopine su tijekom ispitivanja pohranjene u automatskom uzorkivaču na sobnoj temperaturi i nisu bile izložene svjetlu. Kriterij za stabilnost otopine je promjena površine kromatografske krivulje manja od 5 % u odnosu na početnu. Otopina standarda pripravljena u smjesi metanola i vode bila je stabilna tijekom svih 212 h pokusa (8,8 dana), a otopina uzorka tijekom 165 h (6,9 dana). Rezultati su prikazani u Tablici 4.25. Otopine standarda u obje modelne otopine znoja bile su stabilne tijekom svih 330 h sati ispitivanja (13 dana i 18 h, tj. skoro 2 tjedna). Ekstrakt uzorka papira u modelnoj otopini pripravljenoj prema normi ISO 3160-2 bio je stabilan tijekom svih 215 sati ispitivanja, a ekstrakt uzorka papira u modelnoj otopini znoja pripravljenoj prema normi EN 1811 tijekom 78 h ispitivanja nakon čega je pokus prekinut zbog premale količine uzorka. Rezultati su prikazani u Tablicama 4.26 i 4.27.

Svi rezultati validacije metode bili su zadovoljavajući i metoda je primijenjena za analizu BPA u papiru s termokromnim otiscima.

Tablica 4.25. Stabilnost BPA u otopini standarda i metanolnog ekstrakta uzorka papira s termokromnim otiskom pri sobnoj temperaturi

<i>t</i> / h	Standard		Uzorak	
	<i>P</i> (BPA)*	% početne površine	<i>P</i> (BPA)	% početne površine
0	174,6	100,0	340,3	100,0
43	176,4	101,0	341	100,2
116	176,4	100,0	341,8	100,2
165	176,7	100,2	345,3	100,9
212	177,7	100,6	–	

* površina kromatografske krivulje BPA

Tablica 4.26. Stabilnost standardnih otopina BPA u modelnim otopinama znoja pri sobnoj temperaturi

<i>t</i> / h	Otopina znoja prema normi			
	ISO 3160-2		EN 1811	
	<i>P</i> (BPA)*	% početne površine	<i>P</i> (BPA)	% početne površine
0	176,8	100,0	175,4	100,0
24	176,7	99,9	174,6	99,5
42	178,6	101,0	174,9	99,7
62	176,1	99,6	175,5	100,1
90	175,8	99,4	175,8	100,2
186	176,9	100,1	175,2	99,9
211	175,7	99,4	176,2	100,5
236	177,4	100,3	177,9	101,4
258	178,1	100,7	179,3	102,2
330	177,9	100,6	179,4	102,3

* površina kromatografske krivulje BPA

Tablica 4.27. Stabilnost BPA ekstrahiranog iz uzorka papira s termokromnim otiskom modelnim otopinama znoja pri sobnoj temperaturi

<i>t</i> / h	Otopina znoja prema normi			
	ISO 3160-2		EN 1811	
	<i>P</i> (BPA)*	% početne površine	<i>P</i> (BPA)	% početne površine
0	84,3	100,0	77,5	100,0
19	84,2	99,9	76,3	98,5
46	84,6	100,4	78,2	100,9
142	84,3	100,0	78,1	100,8
166	84,4	100,1		
193	85,1	100,9		
215	84,5	100,2		

* površina kromatografske krivulje BPA

4.2.3. Analiza uzoraka papira s otiscima termokromne boje

4.2.3.1. Papiri bez otisaka boje

Uzorci svih vrsta papira bez otiska termokromne boje analizirani su razvijenom metodom. Niti u jednom uzorku koncentracija bisfenola A nije bila viša od granice određivanja, uključujući i reciklirani papir. Ovime je dokazano da rezultatima izmjerenim ekstrakcijom bisfenola A s otiska termokromne boje na papiru ne doprinose eventualni tragovi bisfenola A koje je moguće detektirati u recikliranim papirima osjetljivijim analitičkim tehnikama.^{87,88}

4.2.3.2. Određivanje bisfenola A ekstrahiranog s papira s termokromnim otiskom

Validirana metoda primijenjena je za određivanje maksimalnog masenog udjela bisfenola A u različitim vrstama papira s termokromnim otiskom ekstrakcijom metanolom, a ekstrakcija modelnim otopinama znoja za ispitivanje mogućeg prijenosa BPA s papira na kožu ljudi. Svaki uzorak pripremljen je u duplikatu, a kao konačni rezultat uzeta je srednja vrijednost dviju analiza. Rezultati su prikazani u Tablici 4.28. Usporedba ekstrakcije bisfenola A s metanolom i modelnim otopinama znoja pokazuje da se metanolom ekstrahira prosječno 4 puta više bisfenola A nego modelnim otopinama znoja (Tablica 4.29.). Najmanja razlika između ekstrakcije metanolom i modelnim otopinama znoja uočena je za *bezdrvni premazani* papir koji ima najmanji udio bisfenola A. Znojem se iz tog papira ekstrahiralo oko 2 puta manje BPA nego metanolom. Razlika u ekstrakciji najveća je za *voluminozni* papir i papir *navigator*, iz kojih se znojem ekstrahiralo oko 5 puta manje BPA nego metanolom. Ne može se pouzdano tvrditi je li učinkovitost ekstrakcije modelnim otopinama znoja proporcionalna masenom udjelu bisfenola A u papiru s termokromnim otiskom jer *voluminozni* papir sadrži znatno manje bisfenola A od papira *navigator*, a ekstrahirani udio je podjednak. Međutim, *voluminozni* papir sadrži znatno više bisfenola A od *bezdrvnog premazanog* papira pa učinkovitost ekstrakcije ovisi o masenom udjelu bisfenola A u papiru, ali i o vrsti papira. Ekstrakcijom bisfenola A modelnim otopinama znoja pripremljenim prema normama EN 1811 i ISO 3160-2 dobivaju se podjednaki rezultati (Tablica 4.29).

Tablica 4.28. Ekstrakcija bisfenola A s otiska termokromne boje na različitim vrstama papira metanolom i modelnim otopinama znoja

Br.	Uzorak	$w(\text{BPA}) / \text{mg g}^{-1}$		
		Metanol	Otopina znoja prema ISO 3160-2 EN 1811	
1	<i>Navigator N</i>	0,778	0,158	0,167
2	<i>Navigator TCB 1 cm³</i>	0,652	0,122	0,167
3	<i>Bezdrvni premazani</i>	0,126	0,064	0,047
4	<i>Bezdrvni nepremazani</i>	0,346	0,089	0,081
5	<i>Reciklirani 100 %</i>	0,354	0,083	0,098
6	<i>Reciklirani 33 %</i>	0,381	0,108	0,103
7	<i>Voluminozni</i>	0,373	0,073	0,076
8	<i>Sintetički</i>	0,460	0,151	0,175

Tablica 4.29. Usporedba djelotvornosti ekstrakcije bisfenola A iz papira s termokromnim otiskom metanolom i modelnim otopinama znoja

Br.	Uzorak	$w(\text{BPA})_1 / w(\text{BPA})_2^*$		
		Metanol/ ISO 3160-2	Metanol/ EN 1811	ISO 3160-2/ EN 1811
1	<i>Navigator N</i>	4,9	4,7	1,0
2	<i>Navigator TCB 1 cm³</i>	5,3	3,9	0,7
3	<i>Bezdrvni premazani</i>	2,0	2,7	1,4
4	<i>Bezdrvni nepremazani</i>	3,9	4,7	1,1
5	<i>Reciklirani 100 %</i>	4,3	3,6	0,9
6	<i>Reciklirani 33 %</i>	3,5	3,7	1,1
7	<i>Voluminozni</i>	5,1	4,9	1,0
8	<i>Sintetički</i>	3,1	2,6	0,9
Srednja vrijednost		4,0	3,9	1,0

* omjer masenih udjela BPA u navedenim otapalima

Može se zaključiti da različita pH-vrijednost i ionska jakost dviju modelnih otopina znoja ne utječu na količinu bisfenola A ekstrahiranog s papira s termokromnim otiskom. Maseni udjeli bisfenola A u papirima analiziranim u ovom radu znatno su viši od do sada određenih u uzorcima recikliranih i svih drugih vrsta papira, osim termalnih papira za tiskanje. Visoki maseni udjeli bisfenola A ekstrahiranog s površine termokromnog otiska na papiru znojem mogu predstavljati rizik za ljudsko zdravlje preko transdermalne izloženosti, kao i termalni papiri. U slučaju tiskanja termokromne boje s bisfenolom A na papir za neku konkretnu namjenu potrebno je dodatno ispitati mogućnost njegova prijenosa s papira na kožu ljudi obzirom na uvjete i vrijeme izloženosti.

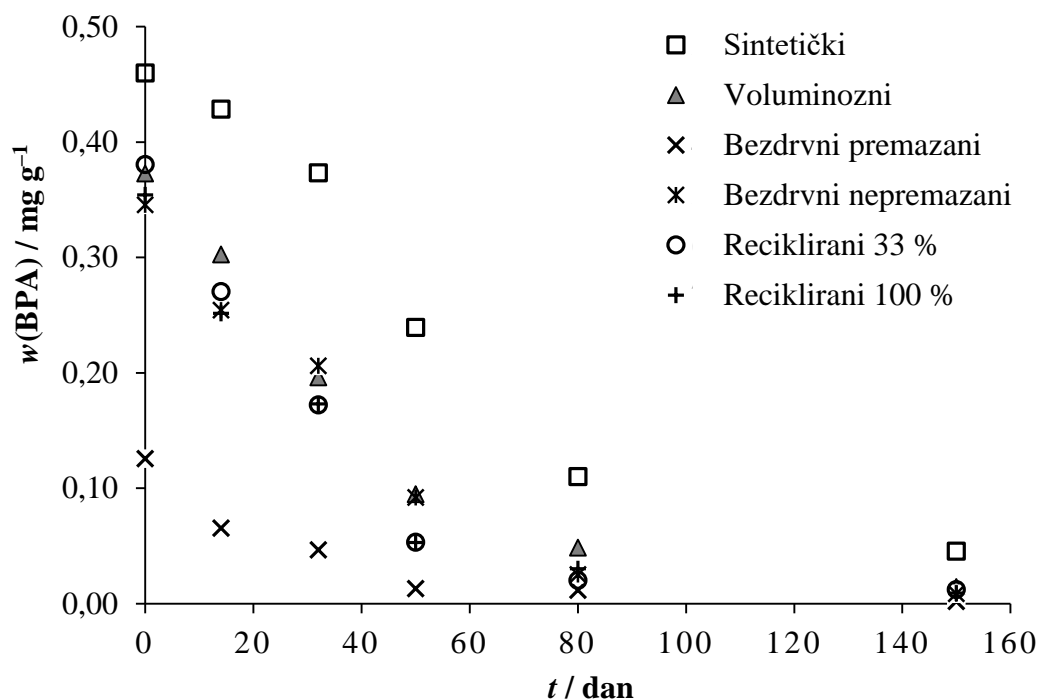
4.2.3.3. Određivanje bisfenola A u papirima s otiskom termokromne boje tijekom anaerobne razgradnje u tlu

Razvijena i validirana metoda primijenjena je za određivanje bisfenola A u otiscima termokromne boje na šest vrsta papira tijekom 150 dana anaerobne razgradnje papira u tlu što je simuliralo uvjete razgradnje na deponiju smeća. Komadi papira stavljeni su između dva sloja tla vlažnosti oko 20 % i zatvoreni u posude. Nakon 14, 32, 50, 80 i 150 dana papiri su izvađeni iz posuda, očišćeni od tla i analizirani. Vidljive promjene papira tijekom razgradnje prikazane su na Slici 3.2. Rezultati određivanja masenih udjela bisfenola A u papirima tijekom anaerobne razgradnje u tlu prikazani su u Tablici 4.30 i na Slici 4.30.

Tablica 4.30. Maseni udio bisfenola A u 5 vrsta papira s termokromnim otiscima tijekom 150 dana anaerobne razgradnje u tlu

Vrijeme razgradnje / dan	Sinte- tički	Volumi- nozni	$w(\text{BPA}) / \text{mg g}^{-1}$			
			Bezdrvni prema- zani	Bezdrvni nepre- mazani	Recikli- rani 33 %	Recikli- rani 100 %
0	0,460	0,373	0,126	0,346	0,381	0,354
14	0,429	0,302	0,066	0,254	0,270	0,251
32	0,373	0,196	0,047	0,206	0,172	0,173
50	0,239	0,095	0,013	0,092	0,053	0,053
80	0,110	0,049	0,012	0,025	0,020	0,030
150	0,045	0,014	< GO*	0,009	0,012	0,009

*GO = granica određivanja



Slika 4.30. Grafički prikaz ovisnosti masenog udjela bisfenola A u papiru s termokromnim otiscima o vremenu anaerobne razgradnje u tlu

Vidljivo je da se maseni udjel bisfenola A tijekom 150 dana razgradnje u svim papirima konstantno snižava do vrlo niskih vrijednosti bliskih granici određivanja. Već nakon 32 dana anaerobne razgradnje u tlu udio bisfenola A u papirima snizio se na prosječno 51 % početne vrijednosti (od 37 % do 81 %). Nakon 80 dana prosječna preostala količina bisfenola A u papirima bila je 11 % (od 5 % do 24 %). Na kraju razdoblja od 150 dana anaerobne razgradnje u tlu prosječna vrijednost bisfenola A preostalog u papirima s termokromnim otiscima bila je 4 % početne vrijednosti (od < GO do 10 %). Sniženje masenog udjela BPA bilo je najbrže u *bezdrvnom premazanom* papiru koji je sadržavao najmanje bisfenola A, a najsporije u *sintetičkom* papiru koji je sadržavao najviše bisfenola A. Sporija razgradnja sintetičkog papira može biti uzrokovana i njegovim porijeklom. To je jedini od ispitivanih papira koji ne sadrži celulozu nego je proizveden od polipropena. Na Slici 3.2 vidljivo je da se tijekom razgradnje jedino sintetički papir nije raspao na manje komadiće. Analiza uzoraka tla pokazat će je li BPA ostao u tlu u nepromijenjenom obliku ili se možda razgradio ili povezao s organskom tvari.

U Tablici 4.31. uspoređene su granice detekcije i određivanja BPA postignute u ovom radu s podacima u objavljenim radovima postignutim različitim analitičkim tehnikama. Dodan je i pregled vrsta uzoraka koji su analizirani te rasponi pronađenih koncentracija ili masenih udjela bisfenola A.

Tablica 4.31. Pregled analitičkih tehnika, granica detekcije i određivanja i izmjerenih masenih udjela bisfenola A u raznim vrstama papira

Litera- turna refe- rencija	Tehnika	GD*	GO**	Uzorci i rezultati
Ovaj rad	HPLC-UV	$\gamma = 2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $w = 0,8 \mu\text{g g}^{-1}$	$\gamma = 7,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $w = 2,5 \mu\text{g g}^{-1}$	Otisci TKB na papiru (0,126 – 0,778) mg g^{-1}
16	HPLC-UV			Termalni papiri (0,53 – 20,9) mg g^{-1}
34	HPLC-UV	$\gamma = 0,6 \text{ mg L}^{-1}$	$\gamma = 2 \text{ mg L}^{-1}$	Računi 10 mg g^{-1}
83	HPLC-UV		$w = 22,5 \mu\text{g g}^{-1}$	Računi (4,5 – 42,5) mg g^{-1}
35	HPLC-FD		$\gamma = 5 \mu\text{g L}^{-1}$	Računi (8 – 17) mg g^{-1}
84	HPLC-FD	$\gamma = 3,3 \mu\text{g L}^{-1}$		Termalni papiri (0,11 – 21,65) mg g^{-1}
74	LC- MS/MS	$w = 0,5 \text{ ng g}^{-1}$		Termalni papiri (0,014 – 13,6) mg g^{-1} Novčanice (0,001 – 82,7) $\mu\text{g g}^{-1}$
88	LC- MS/MS	$w = 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$		Otpadni papir u domaćinstvu (0,31 – 17600) $\mu\text{g g}^{-1}$
85	LC- MS/MS		$w = 0,3 \text{ ng g}^{-1}$	Papirnata ambalaža za hranu <GO – 28,2 ng g^{-1}
32	GC-FID	$w = 0,9 \text{ mg g}^{-1}$	$w = 2,6 \text{ mg g}^{-1}$	Termalni papiri do 17 mg g^{-1}
87	GC-MS		$w = 4 \text{ ng g}^{-1}$	Reciklirani papir (0,6 – 24) $\mu\text{g g}^{-1}$

*GD = granica detekcije

**GO = granica određivanja

Granice detekcije i određivanja BPA u papiru s termokromnim otiskom postignute u ovom radu znatno su bolje od ranije postignutih granica uz analizu tekućinskom kromatografijom s UV-detekcijom i usporedive s rezultatima postignutim uz znatno osjetljiviju fluorescencijsku detekciju.^{34,35,83,84} Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa i dalje je znatno osjetljivija analitička tehnika kojom su postignute tri do četiri reda veličine niže granice detekcije i određivanja.^{73,85,88} Plinskom kromatografijom uz plamenoionizacijski detektor postignute su oko 300 puta više granice detekcije i određivanja, dok je uz upotrebu spektrometra masa kao detektora ova tehnika znatno osjetljivija i omogućava granicu određivanja BPA oko 600 puta nižu od granice postignute metodom razvijenom u ovom radu.^{32,87}

Uspoređeni su rezultati određivanja bisfenola A u papirima s termokromnim otiscima i raznim drugim papirima. Maseni udjeli bisfenola A u papirima računa bili su znatno viši nego u papirima s otiscima termokromne boje.^{34,35,83} Maseni udjeli bisfenola A u termalnom papiru podjednaki su udjelima bisfenola A u papirima s termokromnim otiskom,^{16,32,73,84} dok je u novčanicama, papirnoj ambalaži za hranu i recikliranom papiru maseni udjel BPA bio znatno niži.^{73,87,88}

4.3. Određivanje bisfenola A u tlu tijekom anaerobne razgradnje papira

4.3.1. Razvoj metode

Tekućinska kromatografija obrnutih faza s UV-detekcijom bila je jedina dostupna analitička tehnika za praćenje količine bisfenola A u uzorcima tla tijekom anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiskom, no pronađen je i literaturni podatak da je ova metodologija već korištena za analizu modelnih uzoraka tla s višim masenim udjelom bisfenola A.^{38,39} U svim objavljenim radovima o analizi tla tekućinskom kromatografijom bisfenol A je od ostalih komponenti uzorka odjeljivan na koloni C₁₈. Također, u svim analizama uz primjenu optičkih detektora (fluorescencijski i UV) pokretna faza bila je smjesa vode i acetonitrila, kao i u metodi primijenjenoj u ovom radu.^{21,38,39,90}

Na osnovi rezultata određivanja masenog udjela bisfenola A u papirima izračunana je masa bisfenola A koja je mogla dospjeti u tlo tijekom anaerobne razgradnje papira. Ako nije bilo bakterijske razgradnje, masa bisfenola A prenesenog u tlo mogla je biti od 0,0321 mg do 0,0845 mg. Izračunan je teorijski raspon masenih udjela bisfenola A u tlu tako da je masa bisfenola A podijeljena s ukupnom masom suhog tla u staklenci. Mogući maseni udjeli u slučaju potpunog prijenosa BPA s papira u tlo bili su u rasponu od 0,235 $\mu\text{g g}^{-1}$ do 1,389 $\mu\text{g g}^{-1}$. Najmanja masa bisfenola A u uzorku tla od 5 g u slučaju potpunog prijenosa (bez razgradnje) bila je 1,175 μg . Nakon što se uzorak tla ekstrahira etil-acetatom, ekstrakt upari do suha i suhi ostatak otopi u malom volumenu otapala, teorijska masena koncentracija bisfenola A u otopini uzorka koji se injektira u kolonu bila je oko 0,40 mg L^{-1} . Ova vrijednost znatno je viša od granice određivanja postignute metodom za analizu bisfenola A u papiru, koja je bila 0,0075 mg L^{-1} . Za dodatno povećanje osjetljivosti, volumen injektiranja povećan je s 50 μL na 100 μL . Procijenjeno je da je određivanje bisfenola A tekućinskom kromatografijom s UV-detekcijom dovoljno osjetljivo za određivanje BPA u tlu tijekom anaerobne razgradnje papira jer je najmanja očekivana koncentracija u otopini za injektiranje u slučaju potpunog prijenosa bisfenola A s papira u tlo bila oko 100 puta viša od ranije granice određivanja. Smatralo se da ova razlika ostavlja dovoljno prostora za praćenje postupnog prijelaza s papira i razgradnje bisfenola A u tlu.

U slučaju pripreve uzorka ekstrakcijom 5 g tla, ali bez uparavanja ekstrakta najniža koncentracija bisfenola A u otopini za injektiranje bila bi u slučaju potpunog prijelaza BPA u

tlo $0,0235 \text{ mg L}^{-1}$ što je samo tri puta više od granice određivanja i ne ostavlja puno prostora za praćenje koncentracije bisfenola A tijekom anaerobne razgradnje papira. Stoga je u nastavku rada u pripremu uzoraka nakon ekstrakcije uključen postupak koncentriranja uzoraka uparavanjem pri sniženom tlaku.

Početni kromatografski uvjeti podešeni za određivanje bisfenola A u termokromnim bojama i papirima pokazali su se zadovoljavajućim i za analizu tla. Produljeno je ispiranje kolone pokretnom fazom s visokim udjelom acetonitrila. Maksimalni udio acetonitrila u pokretnoj fazi povećan je na 80 % kako bi se s kolone isprale sve jako zadržane komponente.

Pregled literature o analizi tla pokazao je da su uzorci tla za analizu BPA sušeni od 3 h na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ do 24 h na sobnoj temperaturi.^{22,23,39,40,101,102} U ovom radu uzorci tla sušeni su u sušioniku na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ nekoliko sati do konstantne mase kao u radu Dorival-Garcie i suradnika.²² Bisfenol A je termički stabilan, tali se na $158 \text{ }^\circ\text{C}$, pa je sušenje na blago povišenoj temperaturi smatrano prihvatljivim. Povišena temperatura odabrana je kako bi vrijeme sušenja bilo što kraće da bi se izbjegla razgradnja bisfenola A u tlu. Utvrđeno vrijeme poluraspada BPA u tlu je oko 3 dana.²³ Nakon sušenja, tlo je prosijano kroz sito veličine pora 1 mm da se dobije homogeni uzorak. Prije i nakon sušenja uzorci su pohranjeni u hladnjaku na $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za analizu kromatografijom standardnih dimenzija (engl. *standard-bore chromatography*) najčešće je korištena masa od 5 g tla.^{40,100,101} To je bila optimalna masa i u ovom radu obzirom na ukupnu dostupnu masu uzoraka. Ultrazvučna ekstrakcija provedena je jednokratno ili višekratno od 5 do 15 min, a etil-acetat bio je najčešće otapalo.^{98,100,101} Tijekom razvoja metode u ovom radu najbolje otapalo za ekstrakciju odabrano je između otapala korištenih u ranijim metodama (metanol, etil-acetat i aceton).¹⁰⁰ Ispitano je vrijeme potrebno za ekstrakciju te utjecaj dvokratne ekstrakcije na njenu djelotvornost. Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani i uparavani pri sniženom tlaku uz zagrijavanje na $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pomoću rotirajućeg uparivača što je također već opisano u literaturi.³⁷ Volumen i vrsta otapala u kojemu je otopljen suhi ostatak nakon uparavanja ekstrakta također su optimirani tijekom razvoja metode.

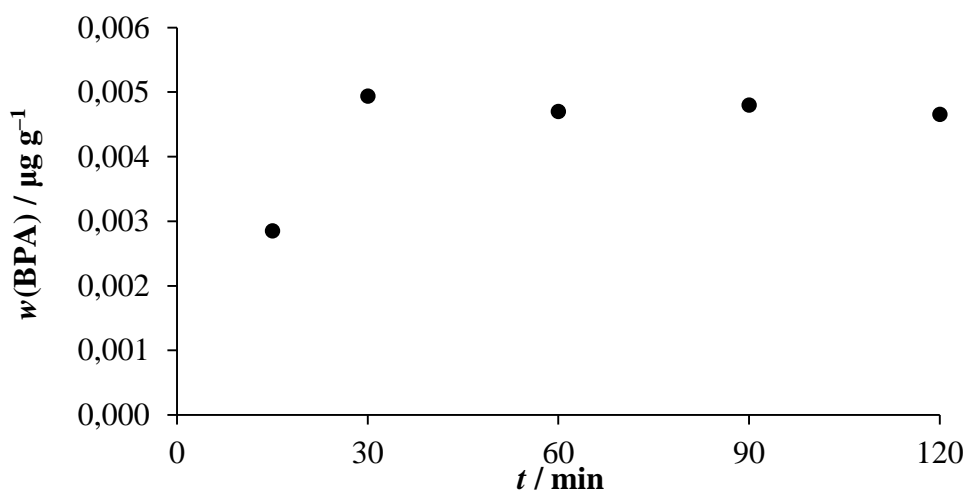
U prvoj fazi optimiranja pripreme uzoraka uz uparavanje određeno je otapalo prikladno za ekstrakciju bisfenola A iz tla. Pripravljene su po dvije pripreve istog uzorka tla za ekstrakciju metanolom, acetonom i etil-acetatom. Količina bisfenola A ekstrahiranog metanolom i etil-acetatom bila je podjednaka (Tablica 4.32), no kromatogram uzorka ekstrahiranog metanolom imao je na početku znatno više komponenti koje bi mogle interferirati pri analizi

bisfenola A. U slučaju ekstrakcije etil-acetatom na početku kromatograma ekstrakta bilo je znatno manje eluiranih komponenti. Stoga je etil-acetat odabran kao pogodno otapalo za ekstrakciju BPA iz tla.

Tablica 4.32. Usporedba djelotvornosti ekstrakcije BPA iz tla različitim otapalima

Otapalo	$w(\text{BPA}) / \mu\text{g g}^{-1}$
Metanol	0,47
Aceton	0,42
Etil-acetat	0,48

U nastavku je ispitana ovisnost djelotvornosti ekstrakcije bisfenola A o vremenu ekstrakcije od 15 do 120 minuta. Ekstrahiran je uzorak tla nakon anaerobne razgradnje papira *bezdrvni premazani* u vremenu od 150 dana. Maksimalna ekstrakcija postignuta je već nakon 30 minuta (Slika 4.31)



Slika 4.31. Ovisnost djelotvornosti ekstrakcije bisfenola A iz tla etil-acetatom o vremenu

Tijekom početnih eksperimenata razvoja metode pokazalo se da neće biti dovoljno realnih uzoraka za razvoj i validaciju metode. Ostatak razvoja i validacije metode napravljen je na modelnim uzorcima koji su pripremljeni tako da je uzorku tla s iste lokacije, a koji nije bio u kontaktu s papirom s termokromnim otiskom dodana standardna otopina bisfenola A. Maseni udio bisfenola A u tlu koji treba postići dodatkom standardne otopine BPA u modelnim uzorcima procijenjen je u odnosu na područje očekivanih masenih udjela na oko $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ suhog tla.

Tijekom razvoja metode ispitan je utjecaj višekratne ekstrakcije tla etil-acetatom na rezultate određivanja BPA (Tablica 4.33). Napravljen je t-test neovisnih uzoraka: t -vrijednost bila je 0,57 što je manje od f -vrijednosti koja je 2,132 za $\alpha = 0,05$ i 4 stupnja slobode. Prema tome srednje vrijednosti rezultata određivanja BPA u tlu dobivenih jednokratnom i dvokratnom ekstrakcijom etil-acetatom statistički se značajno ne razlikuju. Razvoj metode nastavljen je uz jednokratno ekstrahiranje tla etil-acetatom. U računu su uspoređivane površine krivulje bisfenola A, jer je u sve uzorke tla dodana ista količina analita i na kraju su sve pripreve otopljene u istom volumenu otapala.

Tablica 4.33. Usporedba jednokratne i dvokratne ekstrakcije tla etil-acetatom s obzirom na rezultat određivanja BPA

Ekstrakcija	Priprava	$P(\text{BPA})^*$	Srednja vrijednost
Dvokratna	1	21,9	23,2
	2	24,1	
	3	23,7	
Jednokratna	1	20,7	22,5
	2	23,9	
	3	23,0	

* površina kromatografske krivulje BPA

U nastavku je ispitan utjecaj volumena otapala za ekstrakciju na rezultat određivanja BPA u tlu. Modelni uzorci tla ekstrahirani su s 15, 25 i 35 mL etil-acetata. Rezultati su prikazani u Tablici 4.34.

Tablica 4.34. Utjecaj volumena otapala na ekstrakciju bisfenola A iz tla

$V(\text{Et-Ac}) / \text{mL}$	Priprava	$w(\text{BPA})_{\text{tlo}} / \mu\text{g g}^{-1}$	Srednja vrijednost
15	1	0,0778	0,077
	2	0,0792	
	3	0,0743	
25	1	0,0888	0,091
	2	0,0912	
	3	0,0924	
35	1	0,0947	0,091
	2	0,0918	
	3	0,0863	

Ekstrakcijom s 15 mL otapala određeni su znatno niži maseni udjeli BPA u tlu nego ekstrakcijom s većim volumenom otapala. Značajna razlika potvrđena je neovisnim t-testom. Izračunana *t*-vrijednost bila je 26,7 što je znatno više od *f*-vrijednosti koja je 2,132 za $\alpha = 0,05$ i 4 stupnja slobode. Srednja vrijednost masenih udjela BPA određenih ekstrakcijom s 25 mL i 35 mL etil-acetata je ista, pa je zaključeno da je volumen od 25 mL otapala dovoljan za djelotvornu ekstrakciju.

Razvoj metode nastavljen je odabirom najboljeg otapala za otapanje suhog ostatka nakon uparavanja ekstrakta. Ispitano je otapanje u acetonu, metanolu i acetonitrilu. Volumen otapala bio je 2,5 mL što je više nego u prethodnim eksperimentima (u kojima je korišten 1,5 mL metanola i 1,5 mL vode) da bi se dodatno pospješila topljivost bisfenola A i preostale suhe tvari. Kako bi se sastav otapala ujednačio s početnim udjelom vode u pokretnoj fazi, nakon otapanja suhe tvari u otapalu dodano je 2,5 mL vode što je uzrokovalo nastajanje taloga. Zbog toga su otopine za analizu profiltrirane kroz PTFE-filtre u bočice za analizu. Površine i visine kromatografskih krivulja BPA u pripadnim kromatogramima prikazane su u Tablici 4.35.

Tablica 4.35. Utjecaj otapala za otapanje suhog ostatka nakon uparavanja ekstrakta na površinu i visinu kromatografske krivulje bisfenola A ekstrahiranog iz tla

Otapalo	Priprava	<i>P</i> (BPA)*	Srednja vrijednost	<i>h</i> (BPA)**	Srednja vrijednost
Aceton	1	28,3	27,4	3,5	3,5
	2	27,5		3,6	
	3	26,4		3,4	
Metanol	1	26,1	26,9	3,5	3,6
	2	27,4		3,6	
	3	27,3		3,4	
Acetonitril	1	28,0	28,2	2,8	2,9
	2	28,1		2,9	
	3	28,7		2,9	

* površina kromatografske krivulje bisfenola A

** visina kromatografske krivulje bisfenola A

U usporedbi s otapanjem suhog ostatka u metanolu ili acetonu, otapanje u acetonitrilu rezultira krivuljom BPA veće površine, ali 20 % manje visine, tj. krivulja bisfenola A u acetonitrilu znatno je šira od krivulja BPA otopljenog u acetonu i metanolu. Obzirom da je visina krivulje bitna za omjer signala i šuma osnovne linije tj. za utvrđivanje granice određivanja, acetonitril nije bio prikladan otapalo za nastavak eksperimenata. U kromatogramima uzoraka otopljenih u

acetonu pojavljuje se mala krivulja koeluirajućeg sastojka što nije zabilježeno u kromatogramima uzoraka otopljenih u metanolu. Metanol je potvrđen kao najbolje otapalo suhog ostatka nakon uparavanja ekstrakta zemlje.

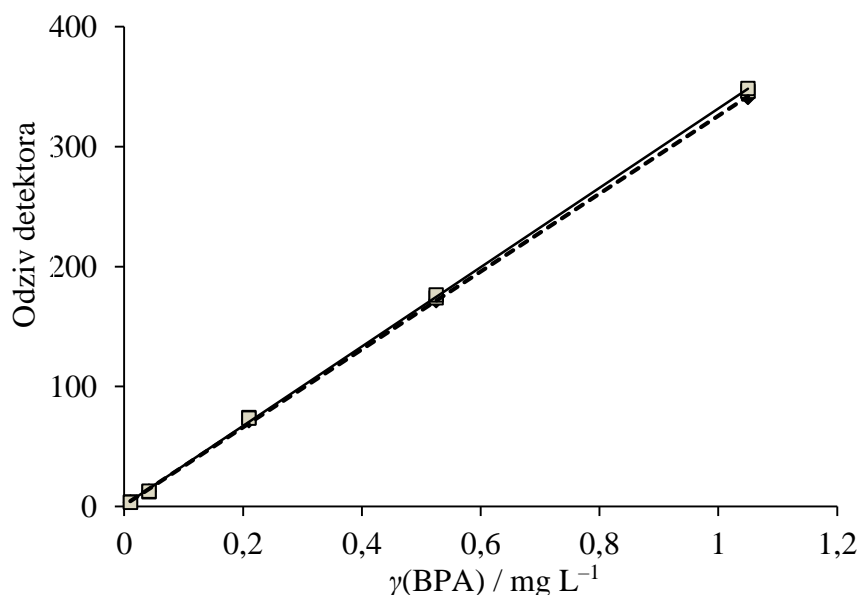
U nastavku je ispitan optimalni volumen otapala za suhi ostatak nakon uparavanja ekstrakta. Volumen otapala trebao je biti čim manji radi postizanja niže koncentracije analita, ali dovoljan da se njime može isprati okrugla tikvica od 100 mL i otopiti preostala suha tvar zajedno s analitom. Također, ukupni volumen otopine morao je biti dovoljan za filtraciju kroz PTFE-filtar. Na svaki početni volumen metanola dodan je jednaki volumen vode kako bi se sastav otopine prilagodio početnom sastavu pokretne faze čime se sprječava taloženje nepolarnih komponenti na koloni. Rezultati analize prikazani su u Tablici 4.36.

Tablica 4.36. Ovisnost rezultata određivanja bisfenola A u tlu o volumenu otapala za otapanje suhog ostatka nakon uparavanja ekstrakta

Volumen otapala	Priprava	$m(\text{BPA}) / \text{mg}$	Srednja vrijednost
1,5 mL metanol + 1,5 mL voda	1	0,40	0,41
	2	0,41	
	3	0,41	
2,0 mL metanol + 2,0 mL voda	1	0,41	0,41
	2	0,40	
	3	0,43	
2,5 mL metanol + 2,5 mL voda	1	0,36	0,38
	2	0,38	
	3	0,39	

Rezultati prikazani kao masa bisfenola A detektirana u pojedinom uzorku pokazuju da je ukupni volumen otapala od 3 mL (1,5 mL metanol + 1,5 mL voda) dovoljan za otapanje bisfenola A i suhe tvari zaostale nakon uparavanja ekstrakta. Manji volumen otapala nije bio dovoljan za efikasno ispiranje tikvice od 100 mL. Vrijeme otapanja suhe tvari u definiranom volumenu otapala u ultrazvučnoj kupelji uz rotiranje tikvice bilo je 2 min u metanolu i 2 min u vodi kako bi se suha tvar što bolje otopila. Dulje otapanje pomognuto ultrazvukom nije bilo moguće, jer se otopina zagrijava i počinje isparavati što znatno utječe na točnost i ponovljivost mjerenja BPA obzirom na mali volumen otapala.

U nekim je istraživanjima utvrđeno da prisutnost huminskih kiselina u ekstraktu tla smanjuje odziv UV-detektora.¹⁰⁵ Da bi se ispitaio utjecaj matrice uzorka na odziv detektora za bisfenol A u ovom su radu pripravljene standardne otopine u ekstraktu tla i otapalu te je uspoređen odziv UV-detektora za BPA u tim otapalima. Rezultati su prikazani na Slici 4.32.



Slika 4.32. Ovisnost površine krivulje BPA o masenoj koncentraciji u standardnim otopinama pripravljenim u smjesi metanola i vode (ravna linija) i u ekstraktu tla (isprekidana linija)

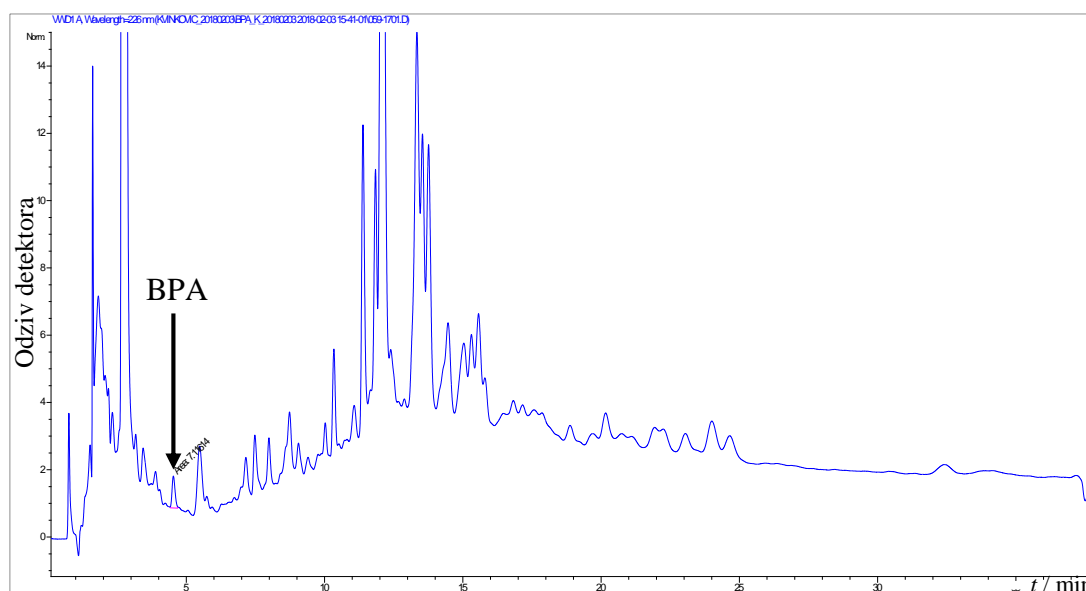
Jednadžba baždarnog pravca za otopine pripravljene u smjesi metanola i vode bila je $y = 330,62x + 1,0258$ s koeficijentom korelacije 0,9997, a jednadžba baždarnog pravca za otopine pripravljene u ekstraktu tla $y = 324,86x + 0,9427$ s koeficijentom korelacije 0,9998. Slika 4.32 i razlika u koeficijentima smjera baždarnih pravaca pokazuju da matrica uzorka nema značajan utjecaj na odziv UV-detektora za BPA te da se standardne otopine za određivanje BPA u tlu mogu pripravljeti u smjesi metanola i vode.

4.3.2. Validacija metode za određivanje bisfenola A u tlu

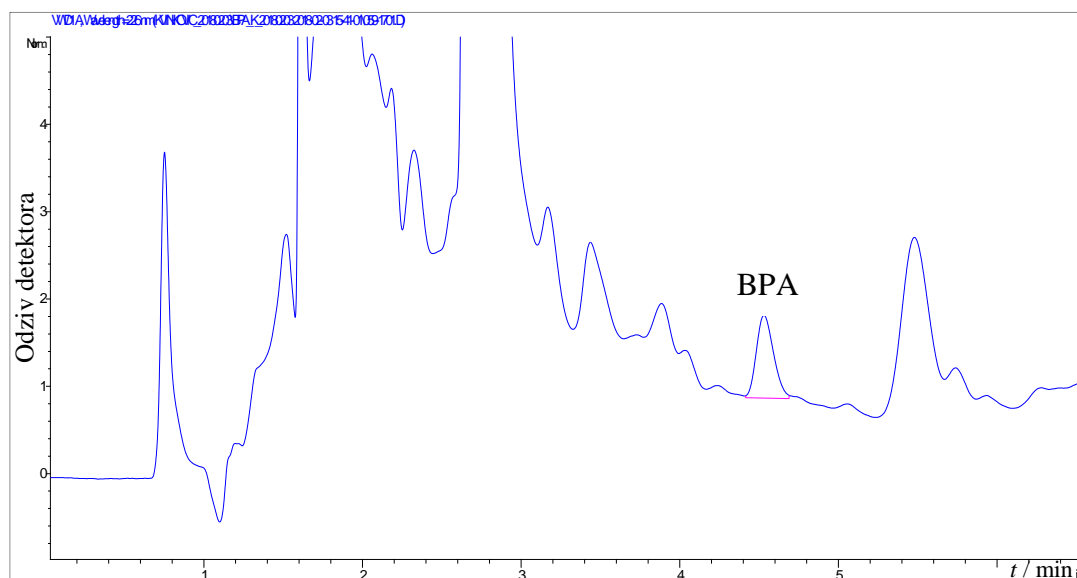
Metoda razvijena za određivanje BPA u tlu validirana je prema smjericama međunarodnih regulatornih agencija kako bi se dokazalo da je odgovarajuća i pouzdana za primjenu.^{103,104}

4.3.2.1. Selektivnost i specifičnost

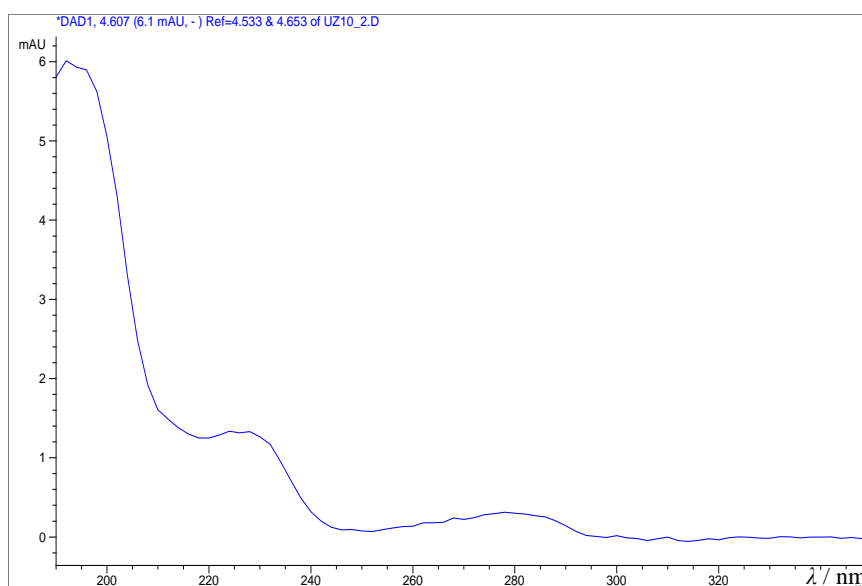
Tipični kromatogram ekstrakta uzorka tla pripremljenog prema postupku opisanom pod 3.10.1. prikazan je na Slikama 4.33 i 4.34. Identitet bisfenola A potvrđen je usporedbom njegova vremena zadržavanja u kromatogramima otopine uzorka i standarda te snimanjem UV-spektra analita tijekom kromatografske analize pomoću detektora s nizom fotodioda (Slika 4.35).



Slika 4.33. Kromatogram ekstrakta gornjeg sloja tla u kojemu je bio voluminozni papir 150 dana, $w(\text{BPA}) = 0,0152 \mu\text{g g}^{-1}$



Slika 4.34. Uvećani dio kromatograma ekstrakta gornjeg sloja tla u kojemu je bio voluminozni papir 150 dana, $w(\text{BPA}) = 0,0152 \mu\text{g g}^{-1}$

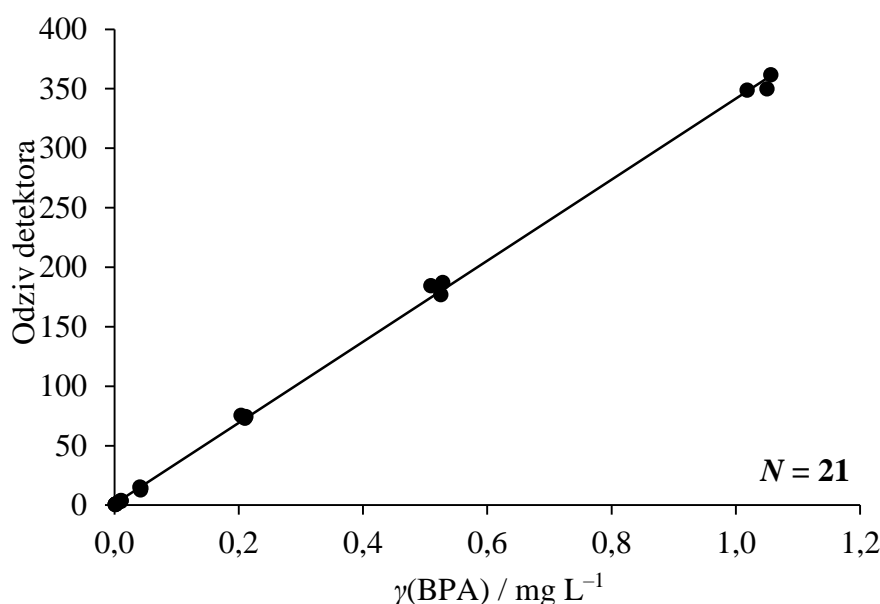


Slika 4.35. UV-apsorpcijski spektar bisfenola A ekstrahiranog iz uzorka gornjeg sloja tla u kojemu je bio voluminozni papir 150 dana; pokretna faza: smjesa voda i acetonitrila [$\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 0,53$]

U kromatogramima ekstrakata svih uzoraka tla razlučivanje krivulje bisfenola A u odnosu na okolne krivulje bilo je zadovoljavajuće, tj. veće od 1,5.

4.3.2.2. Linearnost

Linearnost odziva UV-detektora za određivanje bisfenola A u uzorcima tla ispitana je analizom standardnih otopina pripremljenih u smjesi metanola i vode na sedam koncentracijskih nivoa. Pripremljena su tri seta standardnih otopina BPA iz tri izvorne otopine. Masene koncentracije BPA u standardnim otopinama bile su u rasponu od $0,00125 \text{ mg L}^{-1}$ do $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ bisfenola A, što odgovara masenim udjelima BPA u tlu od $0,75 \text{ ng g}^{-1}$ do $0,6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Ovisnost površina krivulja BPA o masenoj koncentraciji u standardnim otopinama prikazana je na Slici 4.36.



Slika 4.36. Ovisnost površine krivulje BPA o masenoj koncentraciji u standardnim otopinama pripremljenim u smjesi metanola i vode, N = ukupni broj mjerenja.

Jednadžba baždarnog pravca bila je $y = 340,81 x + 1,0308$, a koeficijent korelacije 0,9995. Relativna standardna devijacija faktora odziva izraženih kao omjer površine kromatografske krivulje i masene koncentracije bisfenola A u otopini bila je 9,8 %.

4.3.2.3. Preciznost

Preciznost mjerenja bisfenola A ekstrahiranog iz tla određena je na temelju šest uzastopnih injektiranja otopine uzorka u kromatografsku kolonu i izražena kao relativna standardna devijacija masenog udjela BPA. Ponovljivost pripreve uzorka određena je na temelju rezultata izmjerenih analizom šest priprava modelnog uzorka i izražena kao relativna standardna devijacija masenih udjela BPA određenih u tlu. Rezultati prikazani u Tablicama 4.37 i 4.38.

Tablica 4.37. Preciznost kromatografskog mjerenja bisfenola A ekstrahiranog iz tla

Mjerenje	$w(\text{BPA/tlo}) / \mu\text{g g}^{-1}$
1	47,2
2	46,6
3	46,8
4	46,5
5	46,6
6	46,6
<i>Sr. vrijednost</i>	46,7
<i>RSD / %</i>	0,6

Tablica 4.38. Ponovljivost pripreve uzorka za određivanje bisfenola A u tlu

Priprava	$w(\text{BPA/tlo}) / \mu\text{g g}^{-1}$
1	0,0754
2	0,0813
3	0,0824
4	0,0846
5	0,0849
6	0,0844
<i>Sr. vrijednost</i>	0,0822
<i>RSD / %</i>	4,4

4.3.2.4. Točnost

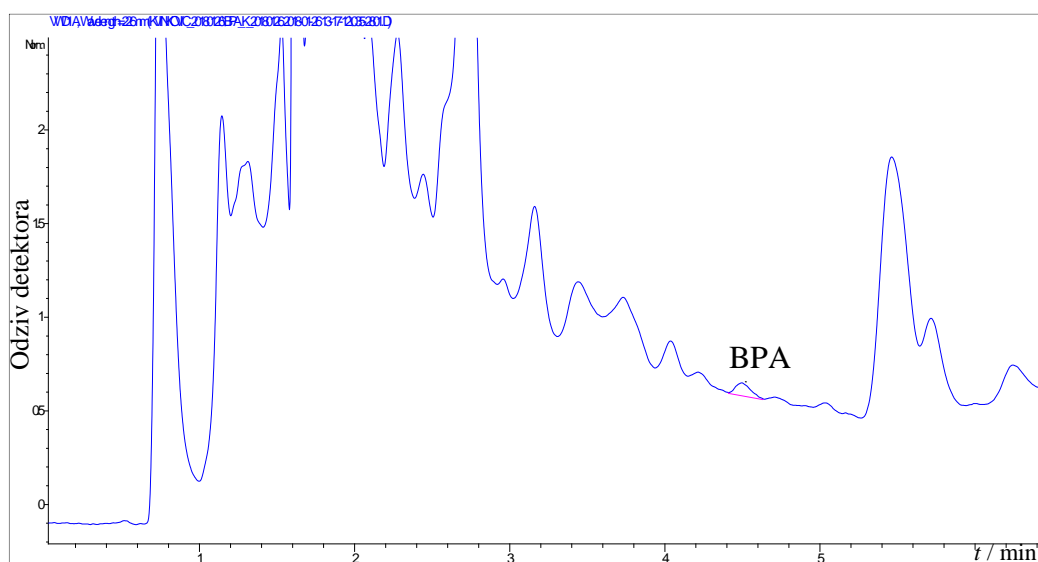
Točnost metode ispitana je na modelnim uzorcima u koje je dodana otopina standarda bisfenola A na tri koncentracijska nivoa koji pokrivaju područje primjene metode. Točnost metode za određivanje bisfenola A u tlu bila je od 72,5 % do 90,1 % s prosječnom vrijednošću od 82,5 %. Točnost je u svim slučajevima bila manja od 100 % što pokazuje da se tijekom složenog procesa pripreve uzorka gubi dio analita, no postignuta točnost je i dalje zadovoljavajuća za primjenu metode. Rezultati su prikazani u Tablici 4.39.

Tablica 4.39. Točnost metode za određivanje bisfenola A u tlu

Priprava	$w(\text{BPA}) / \mu\text{g g}^{-1}$		Točnost / %
	Dodano	Mjereno	
1	0,0063	0,0046	73
2	0,0063	0,0046	73
3	0,0062	0,0056	90
4	0,0629	0,0534	85
5	0,0626	0,0513	82
6	0,0623	0,0523	84
7	0,5248	0,4144	79
8	0,5255	0,4733	90
9	0,5211	0,4563	88
Srednja vrijednost			83
RSD / %			8,1

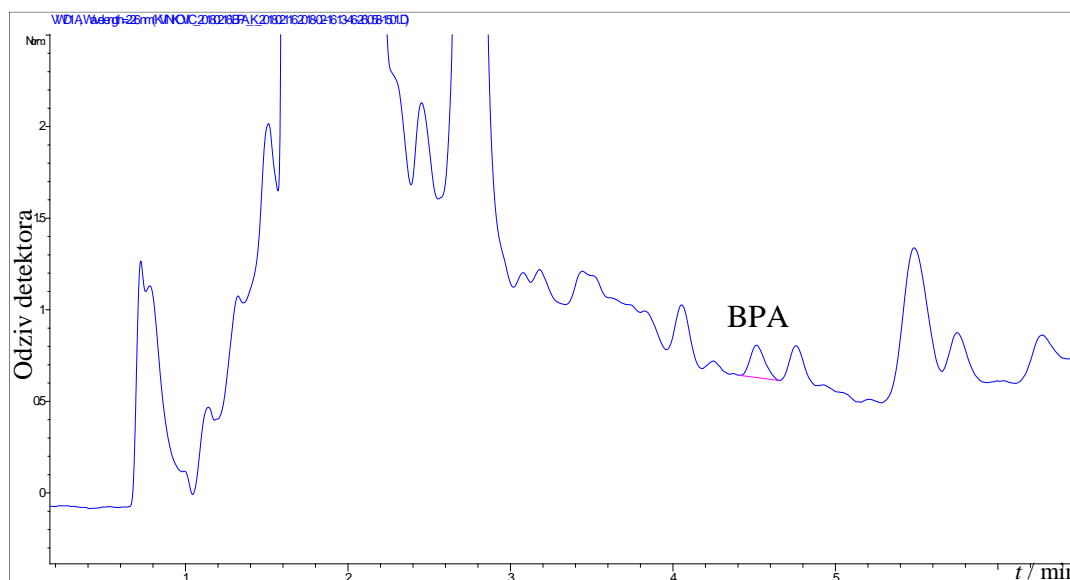
4.3.2.5. Granice detekcije i određivanja

Granica detekcije određena je tijekom analize realnih uzoraka te definirana kao maseni udio bisfenola A u uzorku tla od $0,0009 \mu\text{g g}^{-1}$ pri kojem je omjer signala i šuma osnovne linije 3 kao u kromatogramu uzorka prikazanom na Slici 4.37.



Slika 4.37. Uvećani dio kromatograma ekstrakta uzorka gornjeg sloja tla u kojemu je bio *sintetički papir* s termokromnim otiskom tijekom 50 dana, $w(\text{BPA}) = 0,0009 \mu\text{g g}^{-1}$

Granica određivanja također je određena analizom realnih uzoraka kao maseni udio bisfenola A u tlu od $0,0028 \mu\text{g g}^{-1}$ (Slika 4.38). Površine kromatografskih krivulja bisfenola A i vrijednosti S/N u kromatogramima ekstrakta uzorka gornjeg sloja tla u kojemu je bio papir *reciklirani 33 %* s termokromnim otiskom tijekom 50 dana prikazane su u Tablici 4.40.



Slika 4.38. Uvećani dio kromatograma ekstrakta uzorka gornjeg sloja tla u kojemu je bio papir *reciklirani 33 %* tijekom 50 dana, $w(\text{BPA}) = 0,0028 \mu\text{g g}^{-1}$

Tablica 4.40. Površina krivulje BPA i vrijednosti S/N u kromatogramima ekstrakta tla s masenim udjelom BPA na granici određivanja, $w(\text{BPA}) = 0,0028 \mu\text{g g}^{-1}$

Redni br. injeckiranja	Površina krivulje	S/N
1	1,26	12,1
2	1,32	12,6
3	1,38	13,7
4	1,24	11,2
5	1,21	10,9
6	1,28	13,2
Srednja vrijednost	1,28	12,3
RSD / %	4,7	9,0

4.3.2.6. Robusnost

Robusnost metode ispitana je variranjem uvjeta kromatografske analize koji su relativno lako podložni promjenama ili manjim pogreškama, a mogli bi utjecati na rezultat mjerenja. Varirani su temperatura kolone, protok i sastav pokretne faze za $\pm 10\%$. Promatrano je vrijeme zadržavanja i razlučivanje krivulje analita u odnosu na najbližu lijevu i desnu krivulju u kromatogramu. Analiziran je jedan od modelnih uzoraka pripremljen za ispitivanje preciznosti mjerenja BPA ekstrahiranog iz tla. Vrijednosti u Tablici 4.41 pokazuju da manje promjene u temperaturi kolone i protoku pokretne faze ne utječu znatno na djelotvornost i selektivnost metode. Jedino je povećanje početnog volumnog udjela acetonitrila u pokretnoj fazi za 10% smanjilo razlučivanje krivulje bisfenola A u odnosu na prethodnu krivulju ispod 1 te stoga treba voditi računa o točnim početnim uvjetima eluiranja.

Tablica 4.41. Robusnost metode za određivanje bisfenola A u tlu

Uvjeti	$t_R(\text{BPA}) / \text{min}$	$R_S(\text{L})^{(1)}$	$R_S(\text{D})^{(2)}$
Prema 3.9.1.	4,5	3,1	2,7
Protok $0,9 \text{ mL min}^{-1}$	5,0	3,0	3,3
Protok $1,1 \text{ mL min}^{-1}$	4,1	2,9	2,5
+ $10\% \text{ H}_2\text{O}$	6,2	2,1	2,2
+ $10\% \text{ CH}_3\text{CN}$	3,5	0,9	1,9
$t(\text{kolone}) = 27 \text{ }^\circ\text{C}$	4,6	1,6	1,8
$t(\text{kolone}) = 33 \text{ }^\circ\text{C}$	4,4	2,9	2,3

(1) $R_S(\text{L})$ razlučivanje u odnosu na najbližu krivulju lijevo
(2) $R_S(\text{D})$ razlučivanje u odnosu na najbližu krivulju desno

4.3.2.7. Stabilnost otopina

Stabilnost otopina ispitana je na standardnoj otopini koncentracije BPA $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ i na otopini ekstrakta uzorka donjeg sloja tla u kojemu je bio *voluminozni papir* tijekom 150 dana. Otopine su tijekom ispitivanja bile u automatskom uzorkivaču na sobnoj temperaturi i nisu bile izložene svjetlu. Kriterij za stabilnost otopina je promjena površine krivulje do 5% u odnosu na početnu. Otopina standarda pripravljena u smjesi metanola i vode bila je stabilna tijekom 267 h ispitivanja (11 dana), a otopina ekstrakta uzorka tijekom 60 h (2,5 dana). Rezultati su prikazani u Tablicama 4.42 i 4.43.

Tablica 4.42. Stabilnost BPA u standardnoj otopini za analizu tla

<i>t</i> / h	Površina krivulje	% početne površine
0	65,7	
23	66,0	100,5
28	66,1	100,6
54	66,7	101,5
76	67,2	102,3
83	67,7	103,0
111	68,2	103,8
120	66,9	101,8
245	68,3	104,0
267	67,2	102,3
395	74,5	113,4

Tablica 4.43. Stabilnost BPA u otopini ekstrakta uzorka tla

<i>t</i> / h	Površina krivulje	% početne površine
0	3,4	
24	3,4	100,0
47	3,5	102,9
60	3,5	102,9
143	3,8	111,8

Rezultati validacije metode za određivanje bisfenola A u tlu bili su zadovoljavajući za primjenu metode. U Tablici 4.44 uspoređeni su parametri metode razvijene u ovom radu s parametrima metoda objavljenih u literaturi.

Tablica 4.44. Usporedba validacijskih parametara metoda za određivanje bisfenola A u tlu

Literaturna referencija	Tehnika	Granica detekcije	Granica određivanja	Točnost
Ovaj rad	HPLC-UV	0,9 ng g ⁻¹ 1,5 µg L ⁻¹	2,8 ng g ⁻¹ 4,5 µg L ⁻¹	(72,5 – 90,1) %
38	HPLC-FD	20 µg L ⁻¹		
100	GC-MS		0,4 ng g ⁻¹	94,5 % ± 2,5 %
101	GC-MS	0,03 ng g ⁻¹	0,12 ng g ⁻¹	(88,1 – 107,7) %
37	GC-MS		0,10 ng g ⁻¹	(91,6 – 106) %
40	HPLC-MS/MS	0,52 ng g ⁻¹	0,94 ng g ⁻¹	(47 – 82) %
102	HPLC-MS/MS	2,8 ng g ⁻¹		

U literaturi nisu pronađeni podaci o granici detekcije i određivanja te točnosti metode za određivanje BPA u tlu tekućinskom kromatografijom uz UV-detekciju. Granica detekcije BPA metodom razvijenom u ovom radu niža je 13 puta od granice detekcije za određivanje bisfenola A u modelnim uzorcima tla tekućinskom kromatografijom s fluorescencijskom detekcijom.³⁸ U navedenom radu proučavana je sorpcija bisfenola A u tlu i sedimentu različitih veličina čestica. Analizirani su modelni uzorci visoke koncentracije BPA (do 4 mg L⁻¹) pa vjerojatno nije bilo potrebe za razvojem metode veće osjetljivosti.³⁸ Granice određivanja bisfenola A u tlu plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa i tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa niže su od tri do trideset puta od granice određivanja postignute metodom razvijenom u ovom radu. Očekivano je da tekućinskokromatografska odjeljivanja uz detekciju analita spektrometrijom masa rezultiraju nižim granicama određivanja nego uz UV-detekciju. Metodom razvijenom u ovom radu postignuta je izuzetno niska granica detekcije BPA za ovu tehniku. Točnost metode razvijene u ovom radu nešto je manja nego u metodama s primjenom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa, ali i bolja od točnosti deklarirane za primjenu tekućinske kromatografije spregnute s tandemnom spektrometrijom masa.

U Tablici 4.45 uspoređeni su najbitniji parametri validacije metoda za određivanje BPA u sve tri matrice: termokromnim bojama, papirima s termokromnim otiskom i tlu. Svim metodama postignuta je zadovoljavajuća selektivnost i potvrđena specifičnost analize. Koeficijent korelacije za baždarni pravac bio je podjednak za sve metode. Relativna standardna devijacija faktora odziva povećavala se s porastom kompleksnosti matrice i pripreve uzorka te snižavanjem koncentracijskog područja primjene metode. Ponovljivost pripreve također je niža za složenije matrice i niže koncentracijsko područje, no u svim je metodama prihvatljiva. Točnost metode očekivano je manja za određivanje bisfenola A u tlu zbog složenog postupka pripreve uzorka i niskih masenih udjela analita. Granica određivanja bisfenola A u tlu bila je 0,0028 µg g⁻¹ što je vrlo niska vrijednost, osobito bez koraka ekstrakcije na čvrstoj fazi radi uklanjanja interferencija.

Tablica 4.45. Usporedba rezultata validacije metoda za određivanje BPA u termokromnim bojama, papirima s termokromnim otiskom i tlu tijekom anaerobne razgradnje papira

Validacijski parametar	Termokromne boje	Papiri s otiskom termokromne boje			Tlo
		Metanol	Znoj prema ISO 3160-2	Znoj prema EN 1811	
Selektivnost, R_s	$\geq 1,5$	$\geq 1,5$	$\geq 1,5$	$\geq 1,5$	$\geq 1,5$
Linearnost, r					
RSD_{RF}^a	0,9994	0,9999	0,9976	0,9969	0,9995
	4,4 %	3,9 %	7,6 %	8,4 %	9,8 %
Ponovljivost pripreve uzorka, RSD					
	1,1 %	2,2 %	7,3 %	2,7 %	4,4 %
Točnost	98 % – 106 %	88 % – 109 %	89 % – 100 %	83 % – 92 %	73 % – 90 %
Granica određivanja, w^b	0,05 %		0,0025 mg g ⁻¹		0,0028 µg g ⁻¹
Granica detekcije, w^c	0,005 %		0,0008 mg g ⁻¹		0,0009 µg g ⁻¹
Područje primjene, $w(\text{BPA})$	0,05 – 5,00 %		0,0017 mg g ⁻¹ – 1,7 mg g ⁻¹		0,003 µg g ⁻¹ – 0,6 µg g ⁻¹

^aRF: faktor odziva = $\gamma(\text{analita}) / \text{površina krivulje}$

^bmaseni udjel BPA na granici određivanja

^cmaseni udjel BPA na granici detekcije

4.3.3. Analiza uzoraka tla nakon anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiskom

Uzorci tla pripremljeni su u duplikatu i analizirani validiranom metodom. Izmjerena masena koncentracija bisfenola A u ekstraktu tla preračunana je na maseni udio u gornjem i donjem sloju suhog tla. Zatim je za svaku vrstu papira izračunana masa bisfenola A u gornjem i donjem sloju tla da bi se utvrdilo je li više bisfenola A prešlo u gornji ili donji sloj. Nakon izračuna raspodjele mase bisfenola A između slojeva tla određena je ukupna masa bisfenola A detektiranog u tlu nakon određenog vremena razgradnje pojedine vrste papira. Izračunana masa uspoređena je s maksimalnom masom bisfenola A koja je mogla biti određena u tlu obzirom na masu papira stavljenog na truljenje i maseni udio bisfenola A u toj vrsti papira. Rezultati za sve vrste papira prikazani su u Tablicama 4.46 do 4.51.

Tablica 4.46. Maseni udjel BPA u tlu tijekom anaerobne razgradnje *sintetičkog* papira s termokromnim otiskom

Vrijeme razgradnje / dani	Sloj tla	$w(\text{BPA})/\mu\text{g g}^{-1}$	$m(\text{tla})/\text{g}$	$m(\text{BPA})_Z^{(1)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{UK}}^{(2)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{PAP}}^{(3)}/\mu\text{g}$	$w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})^{(4)}/\%$
14	gornji	0,071	24,62	0,1754	0,3891	78,89	0,49
	donji	0,0036	59,57	0,2137			
32	gornji	0,0121	32,88	0,3964	0,3964	76,96	0,52
	donji	< GO ⁽⁵⁾	64,32	< GO			
50	gornji	0,0052	83,56	0,4337	0,4337	84,46	0,51
	donji	< GO	66,26	< GO			
80	gornji	0,01	38,17	0,3830	0,3830	76,27	0,50
	donji	< GD ⁽⁶⁾	41,24	< GD			
150	gornji	0,0351	33,04	1,1595	1,3353	79,99	1,67
	donji	0,072	24,56	0,1759			

⁽¹⁾ $m(\text{BPA})_Z$ = masa BPA u uzorku tla

⁽²⁾ $m(\text{BPA})_{\text{UK}}$ = ukupna masa BPA u gornjem i donjem sloju tla

⁽³⁾ $m(\text{BPA})_{\text{PAP}}$ = masa BPA u papiru s termokromnim otiskom podvrgnutom anaerobnoj razgradnji

⁽⁴⁾ $w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})$ = maseni udjel BPA analiziranog u tlu u odnosu na masu BPA u papiru s termokromnim otiskom

⁽⁵⁾ GO = granica određivanja

⁽⁶⁾ GD = granica detekcije

Tablica 4.47. Maseni udjel BPA u tlu tijekom anaerobne razgradnje *voluminoznog* papira s termokromnim otiskom

Vrijeme razgradnje dani	Sloj tla	$w(\text{BPA})/\mu\text{g g}^{-1}$	$m(\text{tla})/\text{g}$	$m(\text{BPA})_Z^{(1)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{UK}}^{(2)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{PAP}}^{(3)}/\mu\text{g}$	$w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})^{(4)}/\%$
14	gornji	< GO ⁽⁵⁾	38,56	< GO	< GO	66,47	< GO
	donji	< GO	45,90	< GO			
32	gornji	0,0038	42,40	0,1598	0,1598	66,43	0,24
	donji	< GO	56,68	< GO			
50	gornji	0,0031	38,08	0,1199	0,6074	69,04	0,88
	donji	0,0065	75,27	0,4875			
80	gornji	0,0048	59,85	0,2882	0,5412	66,54	0,81
	donji	0,0064	39,34	0,2530			
150	gornji	0,0152	43,52	0,6604	0,9098	63,60	1,43
	donji	0,0058	42,84	0,2494			

⁽¹⁾ $m(\text{BPA})_Z$ = masa BPA u uzorku tla

⁽²⁾ $m(\text{BPA})_{\text{UK}}$ = ukupna masa BPA u gornjem i donjem sloju tla

⁽³⁾ $m(\text{BPA})_{\text{PAP}}$ = masa BPA u papiru s termokromnim otiskom podvrgnutom anaerobnoj razgradnji

⁽⁴⁾ $w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})$ = maseni udjel BPA analiziranog u tlu u odnosu na masu BPA u papiru s termokromnim otiskom

⁽⁵⁾ GO = granica određivanja

Tablica 4.48. Maseni udjel BPA u tlu tijekom anaerobne razgradnje *bezdrvnog nepremazanog* papira s termokromnim otiskom

Vrijeme razgradnje, dani	Sloj tla	$w(\text{BPA})/\mu\text{g g}^{-1}$	$m(\text{tla})/\text{g}$	$m(\text{BPA})_Z^{(1)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{UK}}^{(2)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{PAP}}^{(3)}/\mu\text{g}$	$w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})^{(4)}/\%$
14	gornji	0,00297	43,82	0,1301	0,1301	60,86	0,21
	donji	< GO ⁽⁵⁾	44,91	< GO			
32	gornji	0,00278	53,50	0,1487	0,1487	60,34	0,25
	donji	< GO	45,11	< GO			
50	gornji	0,0040	85,77	0,3456	0,3456	62,80	0,55
	donji	< GO	45,40	< GO			
80	gornji	0,00883	53,89	0,4758	0,7905	60,76	1,30
	donji	0,00626	50,24	0,3147			
150	gornji	0,01784	32,25	0,5753	1,1521	62,04	1,86
	donji	0,01328	43,42	0,5767			

⁽¹⁾ $m(\text{BPA})_Z$ = masa BPA u uzorku tla⁽²⁾ $m(\text{BPA})_{\text{UK}}$ = ukupna masa BPA u gornjem i donjem sloju tla⁽³⁾ $m(\text{BPA})_{\text{PAP}}$ = masa BPA u papiru s termokromnim otiskom podvrgnutom anaerobnoj razgradnji⁽⁴⁾ $w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})$ = maseni udjel BPA analiziranog u tlu u odnosu na masu BPA u papiru s termokromnim otiskom⁽⁵⁾ GO = granica određivanja**Tablica 4.49.** Maseni udjel BPA u tlu tijekom anaerobne razgradnje *bezdrvnog premazanog* papira s termokromnim otiskom

Vrijeme razgradnje, dani	Sloj tla	$w(\text{BPA})/\mu\text{g g}^{-1}$	$m(\text{tla})/\text{g}$	$m(\text{BPA})_Z^{(1)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{UK}}^{(2)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{PAP}}^{(3)}/\mu\text{g}$	$w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})^{(4)}/\%$
14	gornji	0,00418	22,09	0,0922	0,2471	32,34	0,76
	donji	0,00285	54,41	0,1549			
32	gornji	< GO ⁽⁵⁾	52,71	< GO	< GO	31,90	< GO
	donji	< GO	83,09	< GO			
50	gornji	< GO	62,37	< GO	0,2182	32,10	0,68
	donji	0,00363	60,20	0,2182			
80	gornji	0,00883	42,59	0,3762	0,5082	32,32	1,57
	donji	0,00240	55,14	0,1321			
150	gornji	0,00321	51,56	0,1653	0,5808	32,92	1,76
	donji	0,00624	66,61	0,4155			

⁽¹⁾ $m(\text{BPA})_Z$ = masa BPA u uzorku tla⁽²⁾ $m(\text{BPA})_{\text{UK}}$ = ukupna masa BPA u gornjem i donjem sloju tla⁽³⁾ $m(\text{BPA})_{\text{PAP}}$ = masa BPA u papiru s termokromnim otiskom podvrgnutom anaerobnoj razgradnji⁽⁴⁾ $w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})$ = maseni udjel BPA analiziranog u tlu u odnosu na masu BPA u papiru s termokromnim otiskom⁽⁵⁾ GO = granica određivanja

Tablica 4.50. Maseni udjel BPA u tlu tijekom anaerobne razgradnje papira *recikliranog 33 %* s termokromnim otiskom

Vrijeme razgradnje / dani	Sloj tla	$w(\text{BPA})/\mu\text{g g}^{-1}$	$m(\text{tla})/\text{g}$	$m(\text{BPA})_Z^{(1)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{UK}}^{(2)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{PAP}}^{(3)}/\mu\text{g}$	$w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})^{(4)}/\%$
14	gornji	< GO ⁽⁵⁾	25,62	< GO	< GO	72,31	< GO
	donji	< GO	42,93	< GO			
32	gornji	0,00373	57,07	0,2130	0,2130	69,42	0,31
	donji	< GO	66,99	< GO			
50	gornji	< GO	49,28	< GO	0,1939	72,54	0,27
	donji	0,00284	68,2	0,1939			
80	gornji	0,00331	59,81	0,1980	0,5603	73,11	0,77
	donji	0,00499	72,62	0,3622			
150	gornji	0,00708	48,39	0,3427	0,6604	74,71	0,88
	donji	0,00710	44,77	0,3177			

⁽¹⁾ $m(\text{BPA})_Z$ = masa BPA u uzorku tla

⁽²⁾ $m(\text{BPA})_{\text{UK}}$ = ukupna masa BPA u gornjem i donjem sloju tla

⁽³⁾ $m(\text{BPA})_{\text{PAP}}$ = masa BPA u papiru s termokromnim otiskom podvrgnutom anaerobnoj razgradnji

⁽⁴⁾ $w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})$ = maseni udjel BPA analiziranog u tlu u odnosu na masu BPA u papiru s termokromnim otiskom

⁽⁵⁾ GO = granica određivanja

Tablica 4.51. Maseni udjel BPA u tlu tijekom anaerobne razgradnje papira *recikliranog 100 %* s termokromnim otiskom

Vrijeme razgradnje / dani	Sloj tla	$w(\text{BPA})/\mu\text{g g}^{-1}$	$m(\text{tla})/\text{g}$	$m(\text{BPA})_Z^{(1)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{UK}}^{(2)}/\mu\text{g}$	$m(\text{BPA})_{\text{PAP}}^{(3)}/\mu\text{g}$	$w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})^{(4)}/\%$
14	gornji	0,00321	44,47	0,1429	0,1429	69,21	0,21
	donji	< GO ⁽⁵⁾	58,99	< GO			
32	gornji	0,00582	45,98	0,2674	0,4272	65,07	0,66
	donji	0,00247	64,75	0,1598			
50	gornji	0,00626	63,56	0,3978	0,5997	65,24	0,92
	donji	0,00327	61,83	0,2019			
80	gornji	0,00949	31,78	0,3015	0,5573	67,97	0,82
	donji	0,00443	57,75	0,2558			
150	gornji	0,00806	46,17	0,3719	0,6953	66,41	1,05
	donji	0,00500	64,63	0,3234			

⁽¹⁾ $m(\text{BPA})_Z$ = masa BPA u uzorku tla

⁽²⁾ $m(\text{BPA})_{\text{UK}}$ = ukupna masa BPA u gornjem i donjem sloju tla

⁽³⁾ $m(\text{BPA})_{\text{PAP}}$ = masa BPA u papiru s termokromnim otiskom podvrgnutom anaerobnoj razgradnji

⁽⁴⁾ $w_{\text{BPA}}(\text{tlo/papir})$ = maseni udjel BPA analiziranog u tlu u odnosu na masu BPA u papiru s termokromnim otiskom

⁽⁵⁾ GO = granica određivanja

Podaci u tablicama pokazuju da je masa bisfenola A u gornjem sloju tla u većini uzoraka veća nego u donjem sloju. Obzirom da su svi papiri stavljeni u tlo tako da je strana s termokromnim otiskom bila okrenuta prema gore, ovi rezultati su očekivani. U manjem broju uzoraka masa bisfenola A je ipak bila veća u donjem sloju. U tim slučajevima je djelovanje gravitacije očito nadjačalo utjecaj kapilarnosti i više koncentracije bisfenola A na gornjoj strani papira. Raspodjela bisfenola A između gornjeg i donjeg sloja tla mogla bi se bolje proučiti da su papiri razrezani na dva dijela te da je pola papira tijekom razgradnje bilo okrenuto prema gore, a pola prema dolje.

Maseni udjel bisfenola A određen u uzorcima tla tijekom anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiskom bio je znatno manji od maksimalnog udjela izračunanog za slučaj da sav bisfenol A prijeđe iz papira u tlo. Maseni udjeli BPA u tlu bili su u rasponu od ispod granice određivanja do najviše 1,86 %. U većini uzoraka masa bisfenola A u tlu pravilno se povećavala s vremenom razgradnje. Jedino odstupanje bio je uzorak tla u kojemu je razgrađivan *bezdrvni premazani* papir tijekom 32 dana. Izmjereni maseni udjel bisfenola A je u ovom uzorku bio niži od granice određivanja, tj. bisfenol A je detektiran, ali nije kvantificiran. U ovom slučaju radilo se o papiru u kojemu je maseni udio bisfenola A bio najniži, a oko papira stavljena je relativno velika masa tla (oko 135 g) zbog čega krivulja BPA u analiziranom ekstraktu nije bila dovoljno velika za kvantifikaciju. Najviši maseni udjeli bisfenola A u tlu tijekom razgradnje svih vrsta papira izmjereni su nakon 150 dana i bili su u rasponu od 3,21 ng g⁻¹ do 35,1 ng g⁻¹ što odgovara od 0,88 % do 1,86 % mase bisfenola A sadržane u papiru s termokromnim otiskom. Najviši maseni udio bisfenola A u uzorcima tla nakon 150 dana razgradnje papira je očekivan, jer se u tom periodu papir skoro potpuno raspadne (Slika 3.2), a preostali maseni udio bisfenola A u takvom papiru je minimalan (Tablica 4.31, Slika 4.30). To znači da je nakon 150 dana maksimalna količina bisfenola A prešla s papira u tlo. Činjenica da je u tlu pronađeno samo do 1,86 % bisfenola A od maksimalno raspoložive mase potvrđuje zaključke ranijih istraživanja da se bisfenol A u tlu brzo veže na organsku tvar i bakterijski razgrađuje.^{21,23,39,92-96} Bakterije brzo razgrađuju većinu bisfenola A do CO₂ i drugih manje toksičnih spojeva.^{39,93,94,96} Dio bisfenola A brzo se kovalentno veže na organsku tvar u tlu²³ no pitanje je koliko dugo ostaje vezan i pod kojim uvjetima se može osloboditi. Neka istraživanja već upućuju na mogućnost oslobađanja kovalentno vezanog bisfenola A iz glikozida u probavnom sustavu nakon što u prehrambeni lanac uđe iz tla preko biljaka.⁹⁶ U svim objavljenim radovima o razgradnji bisfenola A u tlu istraživana je aerobna razgradnja.^{23,39,93-95} Prema dostupnim

podacima ovo je prvo istraživanje anaerobne razgradnje bisfenola A u tlu i prvo istraživanje razgradnje papira s termokromnim otiscima. Anaerobni uvjeti odabrani su jer simuliraju uvjete u dubljim slojevima otpada na odlagalištu.

Maseni udjeli bisfenola A u tlu nakon 150 dana razgradnje papira s termokromnim otiskom u rasponu od $3,21 \text{ ng g}^{-1}$ do $35,1 \text{ ng g}^{-1}$ niži su od masenih udjela bisfenola A određenih u tlu ilegalnog odlagališta elektroničkog otpada u Kini gdje su bili u rasponu od $1,89 \text{ ng g}^{-1}$ do $182,04 \text{ ng g}^{-1}$.³⁷ U poljoprivrednom zemljištu u Španjolskoj nađeno je od $0,7 \text{ ng g}^{-1}$ do $4,6 \text{ ng g}^{-1}$ bisfenola A, a u industrijskom od $0,2 \text{ ng g}^{-1}$ do $44,5 \text{ ng g}^{-1}$ što je usporedivo s vrijednostima izmjerenim u ovom radu.¹⁰¹ Može se zaključiti da se bisfenol A tijekom 150 dana anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiscima u tlu znatno razgradio. Preostala količina bisfenola A manja je od 2 % od početne mase BPA u svih šest ispitivanih vrsta papira. Maseni udio bisfenola A u tlu nakon 150 dana razgradnje papira reda je veličine masenih udjela koji se mogu detektirati u industrijskim tlima u Europi. Trebalo bi istražiti opada li daljnjom razgradnjom maseni udio bisfenola A u tlu na još niže vrijednosti. U slučaju daljnje razgradnje bisfenola A, tlo u kojemu su razgrađivani otisci papira s termokromnim bojama moglo bi se nakon vremena potrebnog za potpunu razgradnju koristiti i u poljoprivredne svrhe. Za sigurnu uporabu tla onečišćenog bisfenolom A potrebno je dodatno istražiti i uvjete pod kojima se kovalentno vezani bisfenol A može osloboditi iz organske tvari u tlu.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu razvijena je i validirana metoda za određivanje endokrino aktivnih tvari bisfenola A i benzofenona u termokromnim tiskarskim bojama. Razvijenom metodom analizirano je petnaest termokromnih boja različitih proizvođača i načina sušenja. Bisfenol A pronađen je u tri uzorka s masenim udjelom oko 2 %. Benzofenon je pronađen u dva uzorka s masenim udjelom od 0,34 % i 0,66 %. Uzorci u kojima je pronađen benzofenon suše se pomoću UV-zračenja te BFN u njima ima ulogu fotoinicijatora. Metoda za određivanje bisfenola A i benzofenona u uzorcima termokromnih boja razvijena je kako bi se znalo u kojim papirima s termokromnim otiscima treba pratiti maseni udjel, migraciju i razgradnju tih analita. U budućnosti se razvijena metoda može koristiti u sustavu kontrole kvalitete proizvođača termokromnih boja, ambalaže i drugih korisnika koji bi trebali voditi računa o toksičnim komponentama pri donošenju odluke o aplikaciji i zbrinjavanju viška boje i proizvoda s apliciranim bojama.

Razvijena je i validirana metoda za određivanje bisfenola A u otiscima termokromne boje na papiru ekstrakcijom metanolom. Metoda je primijenjena za određivanje udjela BPA u otiscima termokromne boje na različitim vrstama papira. Maksimalna ekstrahirana količina BPA metanolom uspoređena je s količinom ekstrahiranom pri istim uvjetima u modelne otopine znoja pripravljene prema normama ISO 3160-2 i EN 1811. Utvrđeno je da je količina BPA ekstrahiranog s papira metanolom oko četiri puta veća od količine ekstrahirane modelnim otopinama znoja. Djelotvornost ekstrakcije s dvije različite modelne otopine znoja se ne razlikuje bez obzira na različitu pH-vrijednost i ionsku jakost otopina.

Ispitivanje ekstrakcije bisfenola A s otiska termokromne boje u modelne otopine znoja uz mućkanje pri sobnoj temperaturi pokazalo je da se svježim modelnim otopinama tijekom 60 min ne ekstrahira količina bisfenola A koja se može detektirati u svim uzorcima. Dermalna izloženost bisfenolu A na osnovi rezultata ekstrakcije modelnim otopinama znoja u ultrazvučnoj kupelji ne može se izračunati, jer nije poznata uporaba otisaka termokromne boje na papirima pa se ne može odrediti očekivano vrijeme kontakta. U ovom radu napravljena su preliminarna istraživanja kojima je pokazano da postoji mogućnost pijelaza BPA s termokromnog otiska na kožu.

Ispitana je i mogućnost određivanja ekstrakcije bisfenola A u modelnim otopinama pri blažim uvjetima. Uzimanjem brisa vatenim štapićem namočenim u metanol s površine termokromnog otiska ekstrahirana je količina bisfenola A koju je bilo moguće detektirati no

raspoloživa količina papira bila je premala da bi se bris mogao uzeti s dovoljno velike površine za reproducibilno određivanje.

Metoda za određivanje bisfenola A u papirima primijenjena je za određivanje masenog udjela bisfenola A u papiru tijekom anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiskom u tlu. Dokazano je da se udio bisfenola A u papirima tijekom anaerobne razgradnje brzo snižava i nakon 150 dana približava vrijednosti granice određivanja od $0,0025 \text{ mg g}^{-1}$.

Zadnji dio istraživanja bio je razvoj i validacija metode za određivanje bisfenola A u tlu tijekom anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiscima. Za analizu je primijenjena tekućinska kromatografija obrnutih faza s UV-detekcijom. Obzirom na djelotvornost i moguće interferencije najbolji rezultati postignuti su ekstrakcijom tla etil-acetatom. Radi povećanja osjetljivosti metode etil-acetatni ekstrakt tla je uparen, a suhi ostatak je za kromatografsku analizu otopljen u malom volumenu metanola i vode. Postignuta granica detekcije BPA bila je $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ u injektiranoj otopini, odnosno $0,9 \text{ ng g}^{-1}$ u tlu. Granica određivanja bila je $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ bisfenola A u otopini, odnosno $2,8 \text{ ng g}^{-1}$ u tlu. Granice detekcije i određivanja postignute u ovom radu uz UV-detekciju analita više su nego pri analizi uzoraka tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa ili plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Međutim, osjetljivost razvijene metode bila je zadovoljavajuća za određivanje bisfenola A u tlu tijekom anaerobne razgradnje papira s termokromnim otiskom. Uzorci tla analizirani su tijekom anaerobne razgradnje šest vrsta papira s termokromnim otiscima u vremenskim intervalima od 14, 32, 50, 80 i 150 dana. Rezultati analiza pokazali su da se maseni udio bisfenola A u tlu povećava s vremenom razgradnje. Maksimalni udjeli bisfenola A u tlu, nakon 150 dana razgradnje, bili su od $3,21 \text{ ng g}^{-1}$ do $35,1 \text{ ng g}^{-1}$. Omjer izmjerenih masenih udjela BPA u tlu i pojedinom papiru podvrgnutom razgradnji pokazao je da je u tlu pronađeno od 0,88 % do 1,86 % mase BPA sadržanog u papiru s termokromnim otiskom. Ove niske vrijednosti u skladu su s dosadašnjim saznanjima objavljenim u literaturi o brzom bakterijskoj razgradnji bisfenola A i brzom vezanju na organsku tvar u zemlji.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

ASTM	Ameriĉko druŝtvo za testiranje i materijale (engl. <i>American Society for Testing and Materials</i>)
BPA	bisfenol A
BFN	benzofenon
CTI	(engl. <i>Chromatic Technologies Inc.</i>)
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (engl. <i>European Food Safety Agency</i>)
EuPIA	Europska udruga za tiskarske tinte (engl. <i>European Printing Ink Association</i>)
GC	Plinska kromatografija (engl. <i>Gas Chromatography</i>)
GC-FID	Plinska kromatografija s plamenoionizacijskim detektorom
GC-MS	Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-FD	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s fluorescencijskom detekcijom
HPLC-UV	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV-detekcijom
ITX	2-izopropiltioksanton
LC-MS/MS	Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa
MS/MS	Tandemna spektrometrija masa
MRM	Praćenje viŝestrukih reakcija (engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
m/z	Omjer mase i naboja
REACH	Registracija, evaluacija, autorizacija i restrikcija kemikalija (engl. <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>)
SDME	Mikro-ekstrakcija u kapi (engl. <i>single-drop microextraction</i>)
SVHC	Supstancija vrlo visokog rizika (engl. <i>substance of very high concern</i>)
t_A	Aktivacijska temperatura
TDI	Prihvatljivi dnevni unos (engl. <i>tolerable daily intake</i>)
t -TDI	Prihvatljivi transdermalni dnevni unos (engl. <i>transdermal tolerable daily intake</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Jakovljević, M. Friškovec, M. Klanjšek Gunde, B. Lozo, Optical properties of thermochromic liquid crystal printing inks, 5th International Scientific Conference "Printing Future Days" 2013 Berlin, 2013, Zbornik radova str. 169–173.
2. P. Baumfield, *Chromic Phenomena, The Technological Applications of Colour Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, str 8, 33–36.
3. R. Klučar, M. Friškovec, N. Hauptman, A. Vesel, M. Klanjšek Gunde, Colorimetric properties of reversible thermochromic printing inks, *Dyes Pigm.* **86** (2010) 271–277.
4. S. M. Burkinshaw, J. Griffiths, A. D. Towns, Reversibly thermochromic systems based on pH-sensitive spirolactone-derived functional dyes, *J. Mater. Chem.* **8** (1998) 2677–2683.
5. K. Moriyama, T. Tagami, T. Akamizu, Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87** (2002) 5185–5190.
6. S. H. Dairkee, J. Seok, S. Champion, A. Sayed, M. Mindrinos, W. Xiao, R. W. Davis, W. H. Goodson, Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients, *Cancer Res.* **68** (2008) 2076–2080.
7. I. Rykoska, W. Wasiak, Properties threats and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives, *Acta Chromatogr.* **16** (2006) 7–27.
8. G. Murray, M. Maffini, A. Ucci, C. Sonnenschein, A. Soto, Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure, *Reprod. Toxicol.* **23** (2007) 383–390.
9. C. Brede, P. Fjeldal, I. Skjevrak, H. Herikstad, Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing, *Food Addit. Contam.* **20** (2003) 684–689.
10. S. Sungur, M. Koroglu, A. Ozkan, Determination of bisphenol A migrating from canned food and beverages in market, *Food Chem.* **142** (2014) 87–91.
11. J. Regueiro, T. Wenzl, Development and validation of a stable-isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of bisphenols in ready-made meals, *J. Chromatogr. A* **1414** (2015) 110–121.
12. J. Regueiro, T. Wenzl, Determination of bisphenols in beverages by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1422** (2015) 230–238.
13. E. M. Reyes-Gallardo, R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel, Dispersive micro-solid phase extraction of bisphenol A from milk using magnetic nylon 6 composite and its final determination by HPLC-UV, *Microchem. J.* **124** (2016) 751–756.

14. E. Herrero-Hernandez, R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, Use of bisphenol A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta.* **650** (2009) 195–201.
15. J. Sajiki, J. Yonekubo, Leaching of bisphenol A (BPA) from polycarbonate plastic to water containing amino acids and its degradation by radical oxygen species, *Chemosphere* **55** (2004) 861–867.
16. L. Gao, J. Zou, H. Liu, J. Zeng, Y. Wang, X. Chen, Determination of bisphenol A in thermal printing papers treated by alkaline aqueous solution using the combination of single-drop microextraction and HPLC, *J. Sep. Sci.* **36** (2013) 1298–1303.
17. Z. Z. Hauck, K. Huang, G. Li, R. B. Van Breemen, Determination of bisphenol A-glucuronide in human urine using ultrahigh-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **30** (2016) 400–406.
18. Y. Sun, M. Irie, N. Kishikawa, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima, Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection, *Biomed. Chromatogr.* **18** (2004) 501–507.
19. D. A. Markham, J. M. Waechter, M. Wimber, N. Rao, P. Connoly, J. C. Chuang, S. Hentges, R. N. Shiotsuka, S. Dimond, A. H. Chapelle, Development of a method for the determination of bisphenol A at trace concentrations in human blood and urine and elucidation of factors influencing method accuracy and sensitivity, *J. Anal. Toxicol.* **34** (2010) 293–303.
20. M. Rezaee, Y. Yamini, S. Shariat, A. Esrafil, M. Shamsipur, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples, *J. Chromatogr. B* **1216** (2009) 1511–1514.
21. J.-H. Kang, F. Kondo, Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water, *Chemosphere* **60** (2005) 1288–1292.
22. N. Dorival-Garcia, A. Zafra-Gomez, A. Navalon, J. L. Vilchez, Improved sample treatment for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* **101** (2012) 1–10.
23. G. Fent, W. J. Hein, M. J. Moendel, R. Kubiak, Fate of ¹⁴C-bisphenol A in soils, *Chemosphere* **51** (2003) 735–746.
24. Z. Wan, W. Xianfu, H. Beiqing, L. Chao, The effect of photoinitiator on UV screen printing photochromic ink's curing performance, *Adv. Mat. Res.* **174** (2010) 433–436.

25. M. Schlumpf, B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann, W. Lichtensteiger, *In vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens, *Environ. Health. Perspect.* **109** (2001) 239–244.
26. C. Schlecht, H. Klammer, H. Jarry, W. Wuttke, Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats, *Toxicology* **205** (2004) 123–130.
27. D. Siedlova-Wuttke, H. Jarry, W. Wuttke, Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone, *Toxicology* **205** (2004) 103–112.
28. R. Koivikko, S. Pastorelli, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, R. Paseiro-Cerrato, P. Paseiro-Losada, C. Simoneau, Rapid multi-analyte quantification of benzophenone, 4-methylbenzophenone and related derivatives from paperboard food packaging, *Food. Addit. Contam.* **27** (2010) 1478–1486.
29. F. Vela-Soria, I. Jimenez-Diaz, B. Rodriguez-Gomez, A. Zafra-Gomez, O. Ballesteros, A. Navalon, J. L. Vilchez, M. F. Fernandez, N. Olea, Determination of benzofenones in human placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* **85** (2011) 1848–1855.
30. C. Almeida, A. Stepkowska, A. Alegre, J. M. F. Nogueira, Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases, *J. Chromatogr. A* **1311** (2013) 1–10.
31. N. Negreira, I. Rodriguez, M. Ramil, E. Rubi, R. Cela, Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* **654** (2009) 162–170.
32. T. Mendum, E. Stoler, H. VanBenschoten, J. C. Warner, Concentration of bisphenol A in thermal paper, *Green Chem. Lett. Rev.* **4** (2011) 81–86.
33. T. Geens, L. Goeyens, K. Kannan, H. Neels, A. Covaci, Levels of bisphenol A exposure in thermal paper receipts from Belgium and estimation of human exposure, *Sci. Total Environ.* **435–436** (2012) 30–33.
34. A. Dang, M. Sieng, J. J. Pesek, M. T. Matyska, Determination of bisphenol A in receipts and carbon paper by HPLC-UV, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **38** (2015) 438–442.
35. S. Biedermann, P. Tschudin, K. Grob, Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin, *Anal. Bioanal. Chem.* **298** (2010) 571–576.
36. C. Liao, K. Kannan, Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: Implications for human exposure, *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 9372–9379.

37. D. Y. Huang, H. Q. Zhao, C. P. Liu, C. X. Sun, Characteristics, sources, and transport of tetrabromobisphenol A and bisphenol A in soils from a typical e-waste recycling area in South China, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21** (2014) 5815–5826.
38. K. Sun, J. jin, B. Gao, Z. Zhang, Z. Wang, Z. Pan, D. Xu, Y Zhao, Sorption of 17 α -ethinyl estradiol, bisphenol A and phenanthrene to different size fractions of soil and sediment, *Chemosphere* **88** (2012) 577–583.
39. L. K. Dodgen, J. Li, X. Wu, Z. Lu, J. J. Gan, Transformation and removal pathways of four common PPCP/EDCs in soil, *Environ. Pollut.* **193** (2014), 29–36.
40. M. V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé, Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *J. Chromatogr. A* **1245** (2012) 122–133.
41. Thermochromic inks and reducing household food waste <http://www.wrap.org.uk/sites/files/wrap/Using%20thermochromic%20inks%20to%20reduce%20household%20food%20waste.pdf> (preuzeto 30. travnja 2018.)
42. Thermochromic inf formulations, nail lacquer and methods of use, Patent PCT/US95/12510, filed Sep. 9, 1995.
43. P. Gevaert, L. Bouteau, P. Cahen, M. Heylen, Self-curing acrylate resin for UV consumer product printing and coating applications, RadTech - The Global Conference & Expo for UV and EB Curing Technology, Illinois, 2014. <http://radtech.org/2014proceedings/papers/technical-conference/Formulating%20for%20Printing%20&%20Packaging/Heylen%20-%20Self-curing%20acrylate%20resin%20for%20UV%20consumer%20product%20printing%20and%20coating%20applications.pdf> (preuzeto 10. lipnja 2016.)
44. H. Oda, New developments in the stabilization of leuco dyes: effect of UV absorbers containing an amphoteric counter-ion moiety on the light fastness of color formers, *Dyes Pigm.* **66** (2005) 103–108.
45. Ultraviolet-curable thermochromic ink composition, Patent US 5500040 A (1996), <https://www.google.ch/patents/US5500040> (preuzeto 8. lipnja 2016.)
46. EuPIA Guideline on Printing Inks applied to the non-food contact surface of food packaging materials and articles, 2011, http://www.eupia.org/uploads/tx_edm/2011-11-14_EuPIA_Guideline_for_Food_Packaging_Inks_-_November_2011__corr_July_2012.pdf (preuzeto 10. lipnja 2016.)
47. Baza podataka o dodacima hrani: https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/food_contact_materials_en (preuzeto 9. lipnja 2016.)

48. A. Seeboth, D. Lotzch, R. Ruhmann, First example of a non-toxic thermochromic polymer material – based on a novel mechanism, *J. Mater. Chem. C* **1** (2013) 2811–2816.
49. B. Horemans, J. De Block, H. De Ruyck, New understanding of ink components migrating from packaging material into foodstuffs, http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/_documents/2014-02_labinfo11-p23_en.pdf (preuzeto 11. lipnja 2016.)
50. C. A. Staples, P. B. Dorn, G. M. Klecka, S. T. O'Block, L. R. Harris, A Review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A, *Chemosphere* **36** (1998) 2149–2173.
51. J. Griffiths (ur), Colour Science, Vol. 1: S. M. Burkinshaw, J. Griffiths, A. D. Towns, Dye and Pigment Chemistry, University of Leeds, Leeds, 1998, str. 174–183.
52. EFSA (2006) Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on bisphenol A, *The EFSA Journal* **428** (2006) 1–75.
53. EFSA (2008) Toxicokinetics of bisphenol A, *The EFSA Journal* **759** (2008) 1–10.
54. W. T. Tsai, Human health risk on environmental exposure to bisphenol A: a review, *J. Environ. Sci. Health C* **24** (2006) 225–255.
55. E. C. Doods, W. Lawson, Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus, *Nature* (June 13, 1936) 996.
56. M. K. Björnsdotter, J. de Boer, A. Ballesteros-Gómez, Bisphenol A and replacements in thermal paper: a review, *Chemosphere* **182** (2017) 691–706.
57. B. Timms, K. Howdeshell, L. Barton, S. Bradley, C. Richter, F. Vom Saal, Estrogenic chemicals in plastics and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 7014–7019.
58. C. Leranth, T. Hajszan, K. Szigetl-Buck, J. Bober, N. MacLusky, Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (2008) 14187–14191.
59. N. Ben-Jonathon, E. Hugo, T. Brendenberg, Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome, *Mol. Cell. Endocrin.* **304** (2009) 49–54.
60. I. A. Lang, T. S. Galloway, A. Scarlet, W. E. Henley, M. Depledge, R. B. Wallace, D. Melzer, Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults, *JAMA* **300** (2008) 1303–1310.

61. E. J. Hoekstra, C. Simoneau, Release of bisphenol A from polycarbonate – a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53** (2013) 386–402.
62. C. Esteve, L. Herrero, B. Gomara, J. E. Quintanilla-Lopez, Fast end simultaneous determination of endocrine disrupting compounds by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* **146** (2016) 326–334.
63. K. Inoue, K. Kato, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa, Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* **749** (2000) 17–23.
64. J. E. Biles, T. P. McNeal, T. H. Begley, H. C. Hollifield, Determination of bisphenol A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 3541–3544.
65. Y. Zhuang, M. Zhou, J. Gu, X. Li, Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic methods for sensitive determination of bisphenol A, *Spectrochim. Acta Part A* **122** (2014) 153–157.
66. J. L. Coughlin, B. Winnik, B. Buckley, Measurement of bisphenol A, Bisphenol A β -D-glucuronide, genistein, and genistein 4'- β -D-glucuronide via SPE and HPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* **401** (2011) 995–1002.
67. S.-H. Zhang, Y.-X. Zhang, G.-X. Ji, H.-Z. Xu, J.-N. Liu, L.-L. Shi, Determination of bisphenol A, Tetrabromobisphenol A and 4-tert-octylphenol in children and adults urine using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chin. J. Anal. Chem.* **44** (2016) 19–24.
68. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzophenone> (preuzeto 30. travnja 2018.)
69. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-007.pdf> (preuzeto 18. svibnja 2018.)
70. N. Parks, UV-stabilizing chemicals contaminating Japan's marine environment *Environ. Sci. Technol.* **43** (2009) 6896–6897.
71. K. Morohoshi, H. Yamamoto, R. Kamata, F. Shiraishi, T. Koda, M. Morita, Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by *in vitro* assays, *Toxicol. in vitro* **19** (2005) 9–17.
72. Y. Kawamura, Y. Ogawa, T. Nishimura, Y. Kikuchi, J. Nishikawa, T. Nishihara, K. Tanamoto, Estrogenic activities of UV Stabilizers used in food contact plastics and benzophenone derivatives tested by the yeast two-hybrid assay, *J. Health Sci.* **49** (2003) 205–212.
73. Scientific opinion on the risks to public health to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: executive summary, *EFSA J.* 2015 13 (1) 3978.

74. C. Liao, K. Kannan, High levels of bisphenol A in paper currencies from several countries, and implications for dermal exposure, *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 67612–6768.
75. M. Kietzmann, P. Kränke, M. Möder, S. Schrader, M. Wahren, Application of deuterated compounds for investigations of percutaneous absorption substances, *Isotopes Environ. Health. Stud.* **35** (1999) 127–134.
76. N. Kaddar, C. Harthé, H. Déchaud, E. Mappus, M. Pugeat, Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin, *J. Toxicol. Environ. Health* **71** (2008) 471–473.
77. C. Liao, K. Kannan, Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 4655–4662.
78. S. Ishii, R. Katagiri, Y. Minobe, I. Kuribara, T. Wada, M. Wada, S. Imai, Investigation of the amount of transdermal exposure of newborn babies in paper diapers and certification of the safety of paper diapers, *Regul. Toxicol. Pharm.* **73** (2015) 85–92.
79. E. T. Özer, S. Güçer, Determination of some phthalate acid esters in artificial saliva by gas chromatography–mass spectrometry after activated carbon enrichment, *Talanta* **84** (2011) 362–367.
80. E. T. Özer, S. Güçer, Determination of di(2-ethylhexyl) phthalate migration from toys into artificial sweat by gas chromatography–mass spectrometry after activated carbon enrichment, *Polym. Test.* **31** (2012) 474–480.
81. R. J. Rathish, S. Rajendran, J. Lydia Christy, B. Shyamala Devi, S. Johnmary, M. Manivannan, K. Rajam, P. Rengan, Corrosion behaviour of metals in artificial sweat, *Open Corrosion J.* **3** (2010) 38–44.
82. US patent: Artificial skin surface film liquids
<http://www.google.com/patents/US20080311613> (preuzeto 10. ožujka 2017.)
83. S. Babu, S. N. Uppu, B. Martin, O. A. Agu, R. M. Uppu, Unusually high levels of bisphenol A (BPA) in thermal paper cash register receipts (CRs): development and application of a robust LC-UV method to quantify BPA in CRs, *Toxicol. Mech. Methods* **25** (2015) 410–416.
84. M. S. Yalcin, C. Gecgel, D. Battal, Determination of bisphenol A in thermal paper receipts, *JOTCSA* **3** (2016) 167–174.
85. Y. Zhou, M. Chen, F. Zhao, D. Mu, Z. Zhang, J. Hu, Ubiquitous occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A and nonylphenol in bleached food containing papers and their implications for human exposure, *Environ. Sci. Technol.* **49** (2015) 7218–7226.

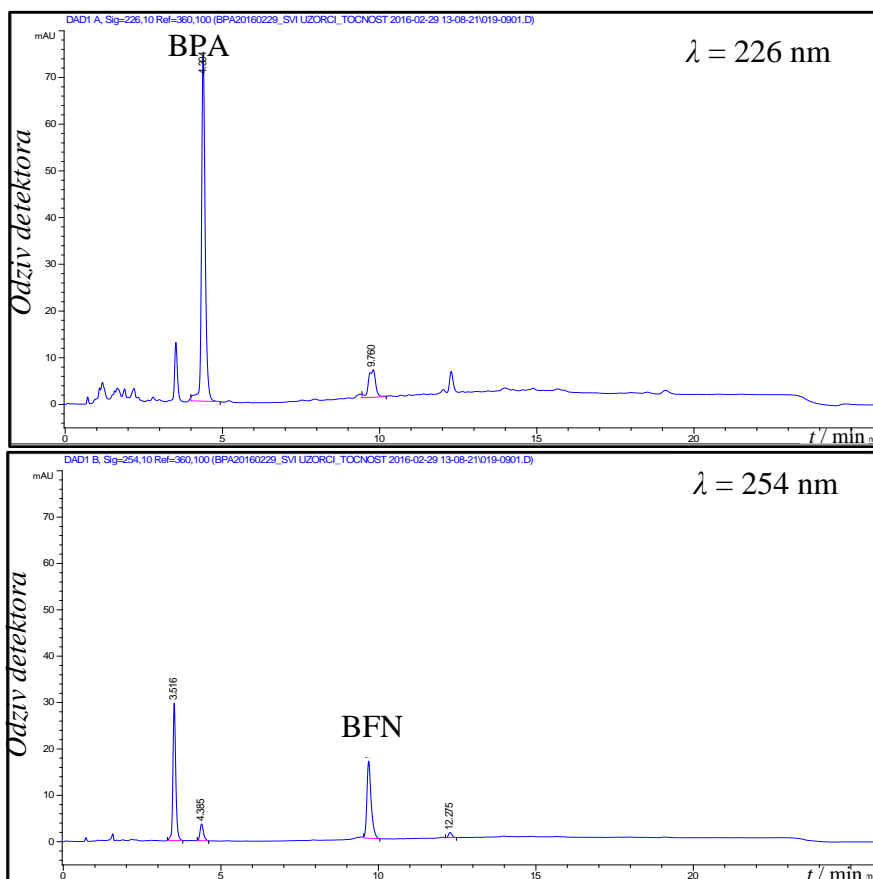
86. C. A. Kinney, E. T. Furlong, D. W. Kolpin, M. R. Burkhardt, S. D. Zaugg, S. L. Werner, J. P. Bossio, M. J. Benotti, Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure, *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 1863–1870.
87. A. M. Vinggaard, W. Koerner, K. H. Lund, U. Bolz, J. H. Petersen, Identification and quantification of estrogenic compounds in recycled and virgin paper for household use as determined by an *in vitro* yeast estrogen screen and chemical analysis, *Chem. Res. Toxicol.* **13** (2000) 1214–1222.
88. K. Pivnenko, G. A. Pedersen, E. Erikson, T. F. Astrup, Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper, *Waste Manage.* **44** (2015) 39–47.
89. J. Corrales, L. A. Kristofco, W. B. Steele, B. S. Yates, C. S. Breed, E. S. Williams, B. W. Brooks, Global Assessment of bisphenol A in the environment: review and analysis of its occurrence and bioaccumulation, *Dose-Response* **July-September** (2015) 1–29.
90. G. Zeng, C. Zhang, G. Huang, J. Yu, Q. Wang, J. Li, B. Xi, H. Liu, Adsorption behavior of bisphenol A on sediments in Xiangjiang river, central-south China, *Chemosphere* **65** (2006) 1490–1499.
91. A. Careghini, A. F. Mastorgio, S. Saponaro, E. Sezenna, Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22** (2015) 5711–5741.
92. P. J. McCall, R. L. Swann, D. A. Laskowski, S. M. Unger, S. A. Vrona, H. J. Dishburger, Estimation of chemical mobility in soil from liquid chromatographic retention times, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **24** (1980) 190–195.
93. J. H. Lobos, T. K. Leib, T. M. Su, Biodegradation of bisphenol A and other phenols by gram-negative aerobic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1992) 1823–1831.
94. J. Spivack, T. K. Leib, J. H. Lobos, Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 7323–7329.
95. C. Zhang, G. Zeng, L. Yuan, J. Yu, J. Li, G. Huang, B. Xi, H. Liu, Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste, *Chemosphere* **68** (2007) 181–190.
96. N. Nakajima, T. Teramoto, F. Kasai, T. Sano, M. Tamaoki, M. Aono, A. Kubo, H. Kamada, Y. Azumi, H. Saji, Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae, *Chemosphere* **69** (2007) 934–941.
97. T. Nitheranont, A. Watanabe, T. Suzuki, T. Katayama, Y. Asada, Decolorization of synthetic dyes and biodegradation of bisphenol A by laccase from the edible mushroom, *Grifola frondosa*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75** (2011) 1845–1847.

98. N. Caballero-Casero, L. Lunar, S. Rubio, Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids, a review, *Anal. Chim. Acta* **908** (2016) 22–53.
99. N. Dorival-Garcia, A. Zafra-Gomez, A. Navalon, J. L. Vilchez, Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples, comparison of the efficiency of three extraction techniques, *J. Chromatogr. A* **1253** (2012) 1–10.
100. J. Xu, L. Wu, W. Chen, A. C. Chang, Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1202** (2008) 189–195.
101. C. Sanchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo, Determination of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A and bisphenol A in soil by ultrasonic assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 5497–5503.
102. <https://www.astm.org/Standards/D7858.htm> (preuzeto 6. svibnja 2018.)
103. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf 2005 (preuzeto 15. siječnja 2018.).
104. G. A. Shabir (ur.), Step-by-step analytical method validation and protocol in the quality system compliance industry. Analytical methods validation, Institute of validation technology, Duluth MN, 2006, str. 4–14.
105. S. Stipičević, S. Fingler, L. Zupančić-Kralj, V. Drevenkar, Comparison of gas and high performance liquid chromatography with selective detection for determination of triazine herbicides and their degradation products extracted ultrasonically from soil, *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 1237–1246.

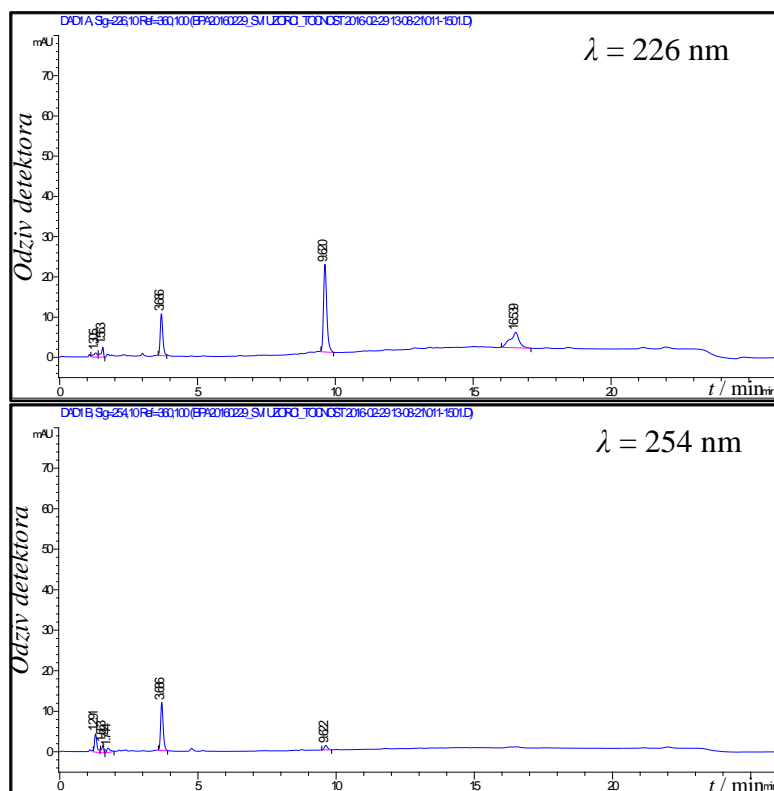
§ 8. DODATAK

8.1. Kromatogrami uzoraka termokromnih boja

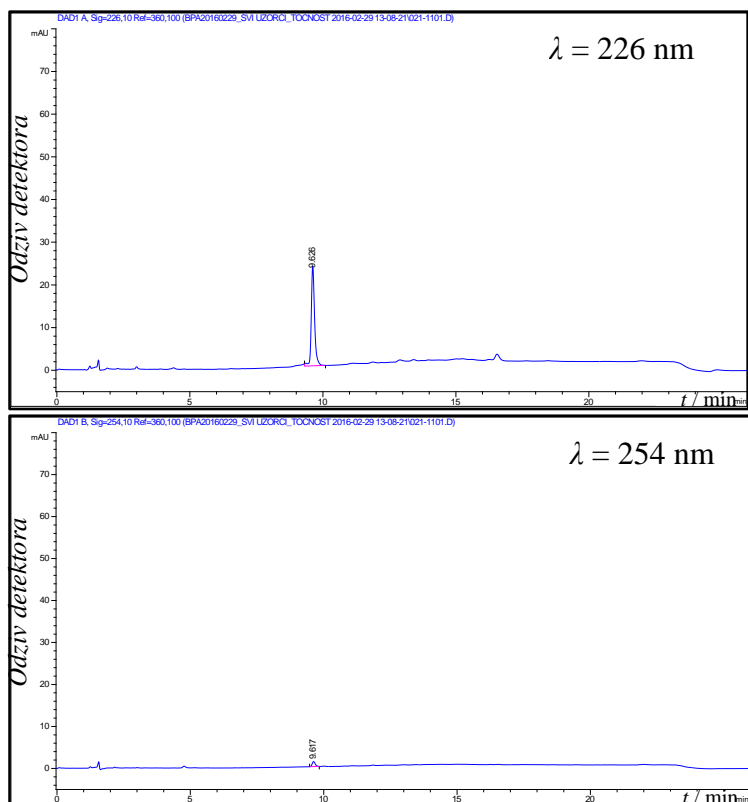
Uzorci su pripremljeni prema postupku opisanom pod 3.6.1. i analizirani prema kromatografskim uvjetima opisanim pod 3.5.2.



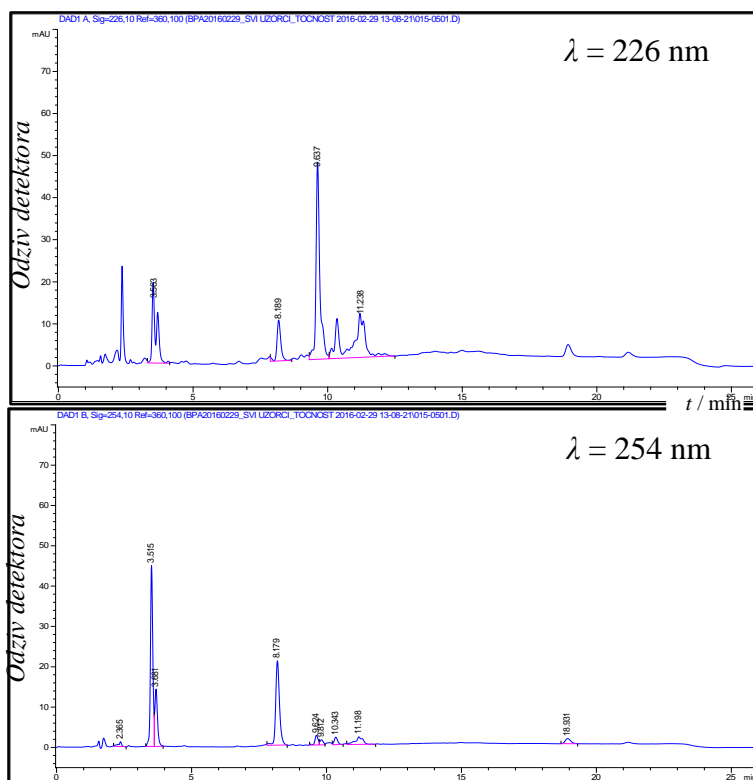
Slika 8.1. Kromatogrami uzorka termokromne boje 2.2. *Blue-cold* pri 226 nm i 254 nm, $w(\text{BPA}) = 2,0 \%$, $w(\text{BFN}) = 0,34 \%$



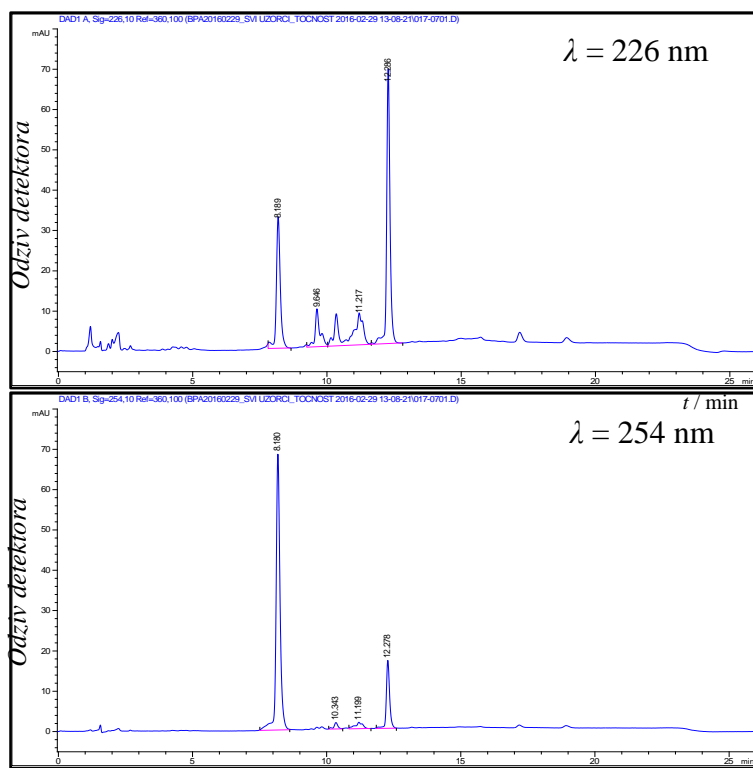
Slika 8.2. Kromatogrami uzorka termokromne boje 3.1. *Offset burgundy to blue* 63 °C pri 226 nm i 254 nm



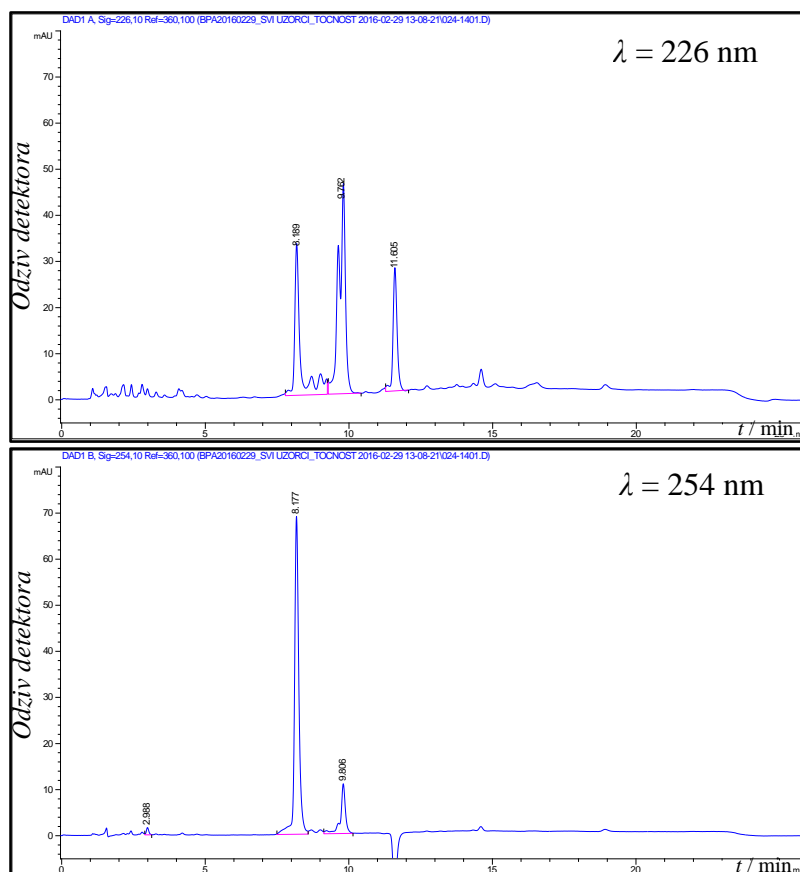
Slika 8.3. Kromatogrami uzorka termokromne boje 4.2. *Wett offset magenta* 31 °C pri 226 nm i 254 nm



Slika 8.4. Kromatogrami uzorka termokromne boje 5.2. *UV orange to yellow* 12 °C pri 226 i 254 nm



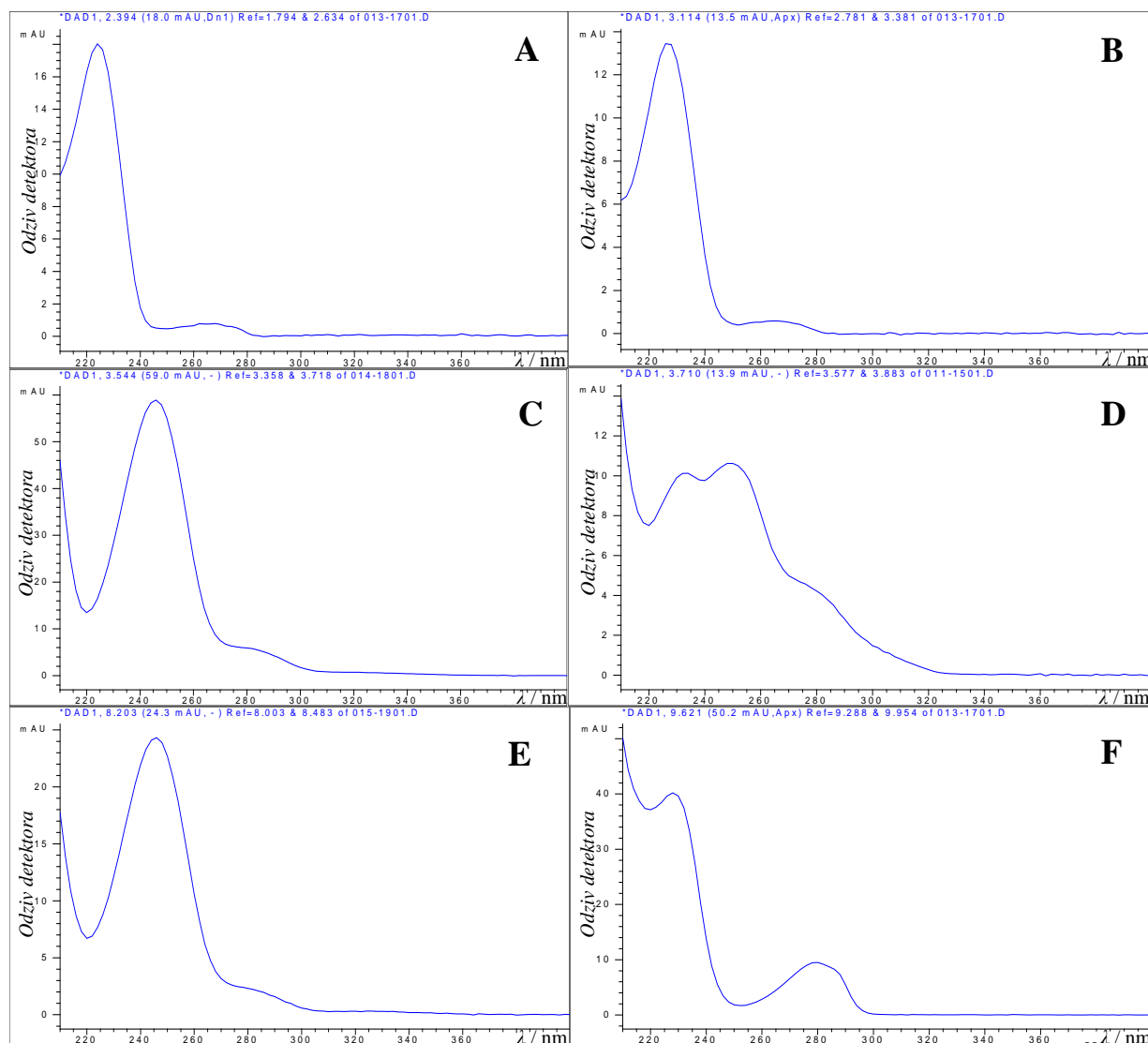
Slika 8.5. Kromatogrami uzorka termokromne boje 6.1. *Screen UV blue* 31 °C pri 226 nm i 254 nm.



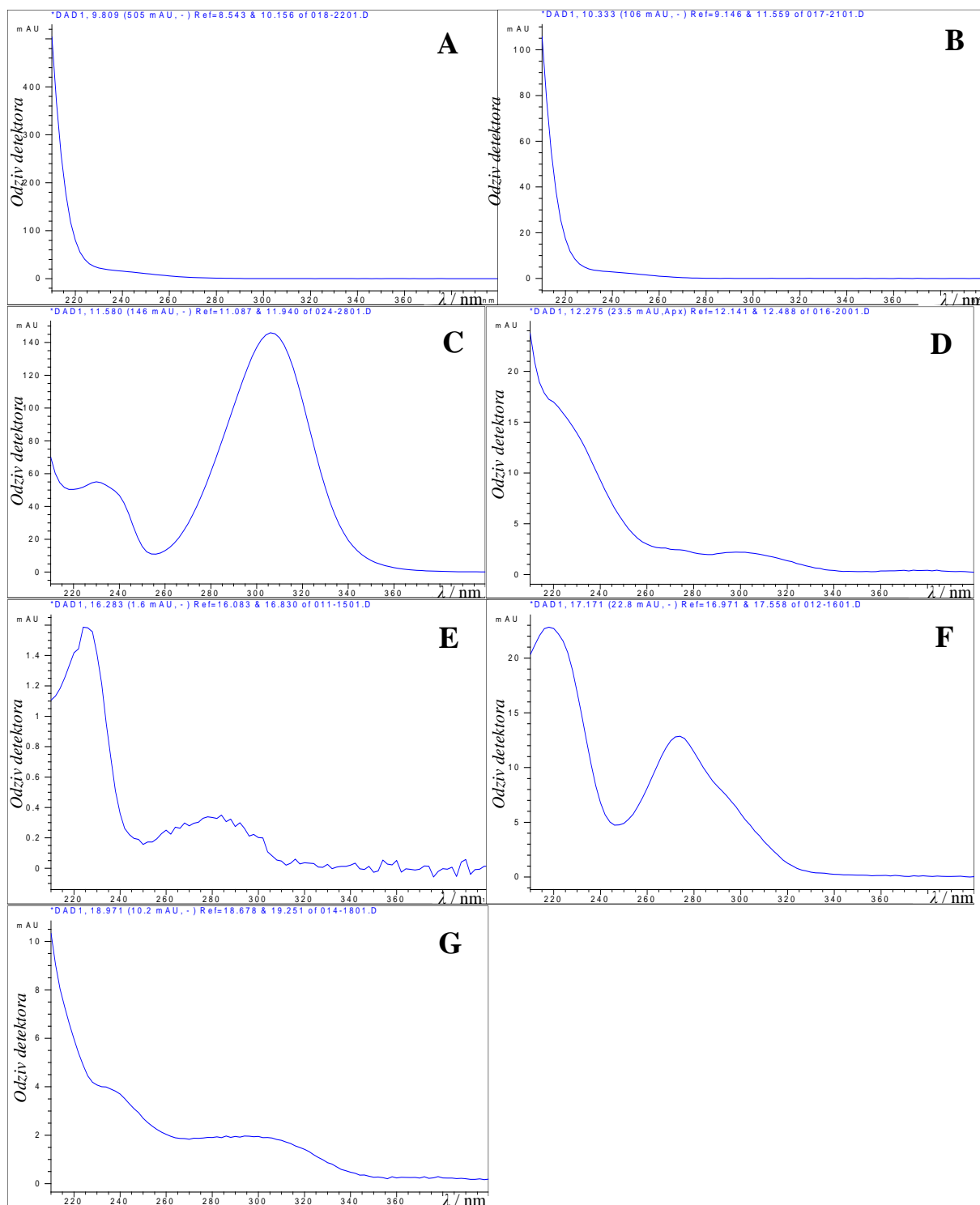
Slika 8.6. Kromatogrami uzorka termokromne boje 7.1. *Flexo UV magenta* 15 °C pri 226 nm i 254 nm.

8.2. UV spektri karakterističnih kromatografskih krivulja i analiza njihove učestalosti

Tijekom analize uzoraka termokromnih boja snimljeni su apsorpcijski UV-spektri svih krivulja koje se pojavljuju u svim uzorcima. Primijećeno je da nepoznate krivulje s istim vremenom zadržavanja imaju iste UV-spektre u svim uzorcima, čak ako se radi o različitim proizvođačima i načinima sušenja uzoraka. Primijećeno je i da neke krivulje s različitim vremenima zadržavanja imaju vrlo slične UV-spektre. Najznačajnijom su se smatrale sličnosti UV-spektra krivulje s vremenom zadržavanja 9,5 min [Slika 8.7(F)] s UV-spektrom bisfenola A (Slika 4.3) i sličnost UV-spektra krivulje s vremenom zadržavanja 8,2 min [Slika 8.7(E)] s UV-spektrom benzofenona (Slika 4.4).



Slika 8.7. Apсорpcijski UV-spektri kromatografskih krivulja s vremenom zadržavanja 2,3 min (A), 3,1 min (B), 3,5 min (C), 3,7 min (D), 8,2 min (E) i 9,6 min (F)



Slika 8.8. Apsorpcijski UV-spektri kromatografskih krivulja s vremenom zadržavanja 9,8 min (A), 10,3 min (B), 11,6 min (C), 12,3 min (D), 16,6 min (E), 17,2 min (F) i 19,0 min (G)

Tablica 8.1. Broj i vremena zadržavanja kromatografskih krivulja spojeva detektiranih u kromatogramima termokromnih boja

Uzo- rak	Proiz- vođač	Suše- nje	Tisak	<i>t_R</i> karakterističnih krivulja / min																	
				2,3	3,1	3,5	3,7	4,4 ⁽¹⁾	8,2 ⁽²⁾	9,6 ⁽³⁾	9,7 ⁽⁴⁾	9,8	10,3	11,2	11,6	12,3	16,6	17,3	19,0		
1.1.	CTI	Zrak	Ofset					+											+		
2.1.	Sun Chemical	UV				+		+			+	+					+				
2.2.					+		+			+	+								+		
3.1.	TMC	Zrak	Ofset				+			+								+			
3.2.				+	+					+									+		
4.1.	TMC	Zrak	Mokri ofset							+								+	+		
4.2.										+									+		
5.1.	TMC	UV		+		+			+	+			+	+				+	+		
5.2.				+		+	+		+	+				+	+					+	
6.1.	TMC	UV	Sito- tisak						+	+			+	+	+		+		+		
6.2.						+		+	+			+	+	+		+				+	
6.3.									+	+			+	+	+		+				+
6.4.									+	+			+	+	+		+				+
7.1.	TMC	UV	Flekso						+	+			+			+			+		
7.2.									+	+			+			+				+	
Br. uzoraka u kojima se krivulja pojavljuje				3	1	4	3	3	8	12	2	10	7	7	2	7	4	3	7		
λ_{MAX}				225 265	225 265	250	255 235	226 278	250	230 280	254	< 210	< 210	< 210	310 230	< 210 300	230 280	220 270	< 210 300		

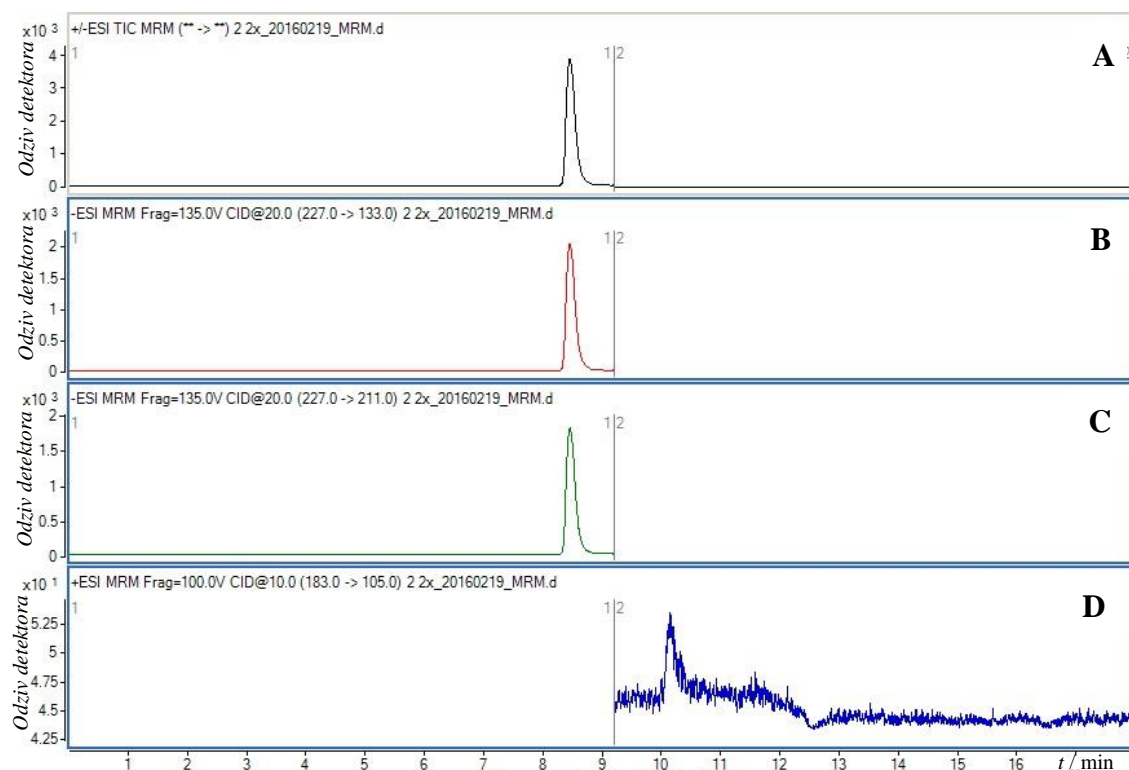
(1) Bisfenol A ■

(2) Spoj srodan benzofenonu ■

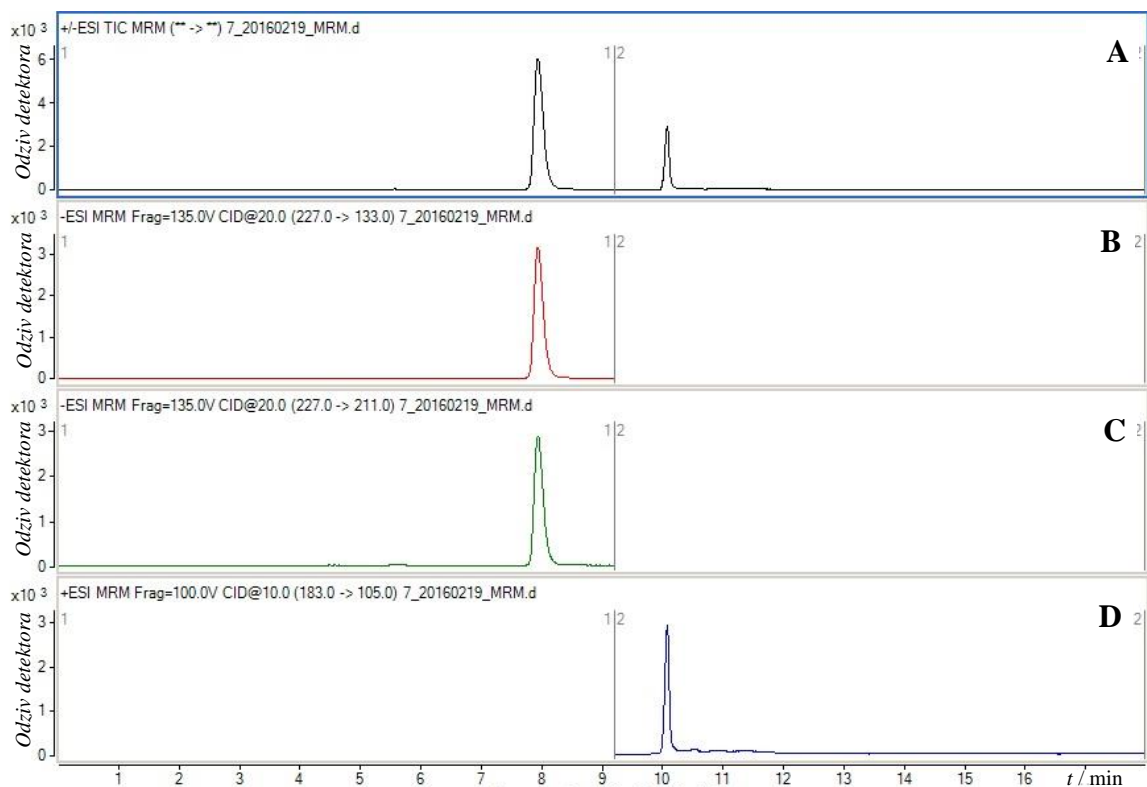
(3) Spoj srodan bisfenolu A ■

(4) Benzofenon ■

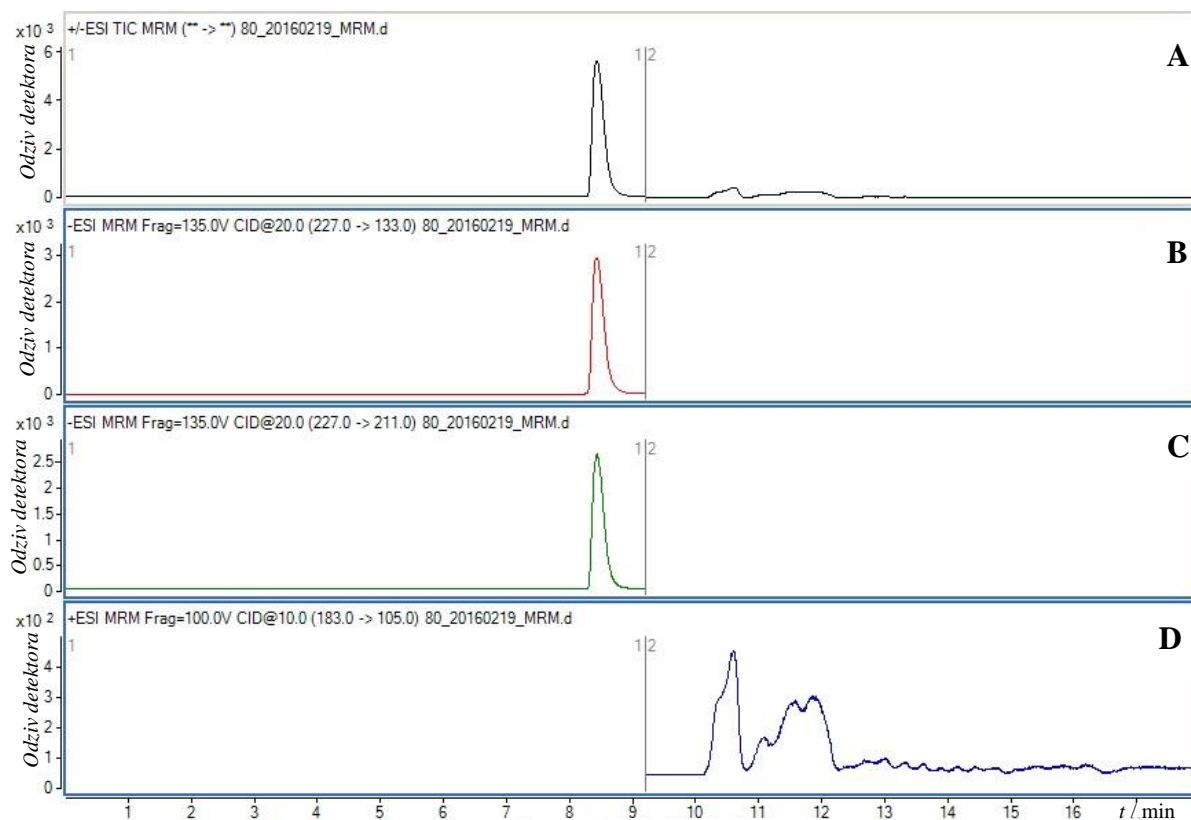
8.3. HPLC-ESI-MS kromatogrami uzorka termokromnih boja



Slika 8.9. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka 1.1. *Offset blue Chameleon 27* °C $\gamma(\text{BPA})_{\text{OT}} = 46 \text{ mg L}^{-1}$, $w(\text{BPA})_{\text{uz}} = 1,95 \%$ (A). MRM kromatogram bisfenola A (B i C) i benzofenona (D). Uvjeti analize opisani su pod 3.6.6. ¹₂ prijelaz između negativne i pozitivne ionizacije.



Slika 8.10. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka 2.1. *Magenta room voda-UV*
 $\gamma(\text{BPA})_{\text{OT}} = 33 \text{ mg L}^{-1}$, $w(\text{BPA})_{\text{uz}} = 1,78 \%$, $\gamma(\text{BFN})_{\text{OT}} = 12 \text{ mg L}^{-1}$, $w(\text{BFN})_{\text{uz}} = 0,66 \%$
(A). MRM kromatogram bisfenola A (B i C) i benzofenona (D). Uvjeti analize opisani su pod 3.6.6. 1^2 prijelaz između negativne i pozitivne ionizacije.



Slika 8.11. Kromatogram ukupne ionske struje otopine standarda bisfenola A i benzofenona u otopini uzorka 6.1. *Screen UV blue 31 °C*, $\gamma(\text{BPA}) = 80 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma(\text{BFN}) = 20 \text{ mg L}^{-1}$ (A). MRM kromatogram bisfenola A (B i C) i benzofenona (D). Uvjeti analize opisani su pod 3.6.6. ^{12}C prijelaz između negativne i pozitivne ionizacije.

Kristinka Vinković rođena je 25. prosinca 1974. u Karlovcu gdje je završila osnovnu školu i Gimnaziju prirodoslovno-matematičkog usmjerenja. Studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala je 1993. godine te tijekom studija položila sve predmete sa smjerova dipl. ing. i prof. kemije. Diplomirala je 2000. godine s radom „Kristalna struktura kompleksa piromelitne kiseline i 4,4'-dipiridil-*N,N'*-dioksida“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Zorice Popović uz neposredno vodstvo izv. prof. dr. sc. Draginje Mrvoš Sermek. Poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, smjer kemija, polje analitička kemija upisala je 2001. godine. Magistarski rad s naslovom „Određivanje azida u proteinskim uzorcima ionskom kromatografijom“ obranila je 2007. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlaste Drevenkar.

Od 1999. do 2003. godine bila je zaposlena u Medicinskoj školi u Karlovcu, od 2003. do 2008. u Pliva – istraživanje i razvoj te od 2008. do 2012. u tvrtci Kemolab d.o.o. Od 2013. godine ponovo radi kao profesor kemije u srednjoj školi, trenutno u Školi za modu i dizajn u Zagrebu. Doktorski studij kemije, smjer analitička kemija upisala je 2015. godine uz mentorstvo prof. dr. sc. Nives Galić. Tijekom studija sudjelovala je u izvođenju višeg praktikuma iz analitičke kemije i bila neposredni voditelj diplomskog rada jednoj studentici.

Tijekom 2016. i 2017. godine bila je na znanstvenom usavršavanju na Institutu za farmaceutsku kemiju u Grazu kao dobitnica jednomjesečnih stipendija u okviru mreže za razmjenu studenata CEEPUS. Članica je Hrvatskog kemijskog društva.

Popis znanstvenih publikacija

1. K. Vinković, N. Galić, M. Schmid, Micro-HPLC-UV analysis of cocaine and its adulterants in illicit cocaine samples seized by Austrian police from 2012 to 2017, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **41** (2018) 6–13.
 2. K. Vinković, M. Rožić, N. Galić, Development and validation of an HPLC method for the determination of endocrine disruptors bisphenol A and benzophenone in thermochromic printing inks, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **40** (2017) 959–966.
 3. M. Rožić, M. Vukoje, K. Vinković, N. Galić, M. Jukić, Degradation of inkjet ink by greensand and ultrasonic sonification, *Acta Graphica* **28** (2017), 25-34.
 4. K. Vinković, V. Drevenkar: Ion chromatography of azide in pharmaceutical protein samples with high chloride concentration using suppressed conductivity detection, *J. Chromatogr. B*, **864** (2008) 102-108.
-

Pregledni rad

K. Vinković: Mogućnosti primjene ionske kromatografije za analizu kemijskih onečišćenja u vodi za piće, *Kvalitet voda*, 7 (2009), 18 – 25. (izdavač PMF, Novi Sad)

Pozvana predavanja

1. K. Vinković: Possibilities of Pesticide Determination by Ion Chromatography, 12th International school of ion chromatography, 30. lipanj 2011, FKIT Zagreb, Book of abstracts str. 12.
2. K. Vinković, C. Crey Desbiolles, D. Jensen: Nitrite and Nitrate in Tobacco – A Case study in IC method development, 11th International school of ion chromatography, 9. srpanj 2010, FKIT Zagreb
3. K. Vinković: *Determination of azide ion in protein samples*, 9th International School of Ion Chromatography 6. listopad 2006. Primošten, Book of abstracts str. 149-162.

Znanstvena i stručna predavanja

1. K. Vinković, N. Galić, M. G. Schmid: Micro-HPLC-UV analysis of cocaine and its adulterants seized by Austrian police in period from 2012 to 2017, 18th International Chromatography School, 15. lipanj 2018, FKIT Zagreb
 2. K. Vinković: *Mala škola ionske kromatografije: Osnove rukovanja kromatografskim sistemom radi dobivanja pouzdanih rezultata i produljenja vijeka instrumenta i kolone*, Kemolab korisnički seminar: Tuheljske toplice 18. 12. 2008.
 3. K. Vinković, M. Cindrić: *Optimization of chromatographic conditions for f-Met rhGCSF determination in Neupogen*, Young Scientists Lecture Session on 13th International symposium on separation sciences, Strbske Pleso (SK), June 28, 2007. Book of abstracts
 4. K. Vinković: *Primjena pulsne amperometrijske detekcije u ionskoj kromatografiji za određivanje biološki važnih spojeva u složenim matricama*, Znanstveni kolokvij, Pliva – Istaživanje i razvoj, Zagreb, 14. 4. 2006.
 5. K. Vinković: *Solving the Mystery of azide by Ion Chromatography and Other Applications...* 3rd Scientific day, Pliva R & D, Zagreb, 1. 12. 2005.
-