

Beata Maria Czarczyńska-Goślińska

**Oznaczanie w wybranych matrycach
związków z grup parabenów i bisfenoli**

rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych



Promotor: dr hab. inż. Agnieszka Zgoła-Grześkowiak

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku

Poznań, 2019

Beata Maria Czarczyńska-Goślińska

Determination of parabens and bisphenols in selected matrices

PhD thesis



Supervisor: Agnieszka Zgoła-Grześkowiak, D.Sc., Ph.D. Eng.

Poznan University of Medical Sciences
Faculty of Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology

Poznań, 2019

Słowa kluczowe:

Parabeny

Bisfenole

HPLC - FD

Ekstrakcja do fazy stałej SPE

QuEChERS

Dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej dSPE

LC-MS/MS

Składam serdeczne podziękowania

- *Pani dr hab. inż. Agnieszce Zgoła-Grzeškowiak za podjęcie się roli promotora, przekazaną wiedzę, cierpliwość, zaangażowanie, życzliwość i wszelkie wsparcie,*
- *Pani prof. dr hab. Janinie Lulek za wyrażenie zgody na współpracę z Wydziałem Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, cenne rady i wskazówki dotyczące organizacji badań nad mlekiem kobiecym oraz redagowania pracy,*
- *Pani dr Justynie Werner za cenne uwagi podczas badań kosmetyków,*
- *Panu mgr inż. Robertowi Frankowskiemu za pomoc w laboratorium podczas wykonywania badań,*
- *Panu prof. PP dr. hab. inż. Grzegorzowi Milczarkowi za udostępnienie aparatury,*
- *Koleżankom i Kolegom z Zakładu Chemii Ogólnej i Analitycznej Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej za miłą atmosferę oraz pomoc podczas wykonywania badań,*
- *Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego za wsparcie i życzliwość podczas realizacji pracy,*
- *Pani prof. dr hab. Jadwidze Mielcarek za zainteresowanie mnie naukami farmaceutycznymi podczas pracy magisterskiej, przekazaną wiedzę i nieustające wsparcie.*

Pracę dedykuję Igorkowi i Jasiowi

Rodzinie dziękuję za wiarę i wsparcie

Część eksperymentalna pracy została wykonana we współpracy z:

- Zakładem Chemii Ogólnej i Analitycznej Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej.

Badania wykonano dzięki środkom finansowym przyznanych na utrzymanie potencjału badawczego:

- Katedry i Zakładu Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego

oraz

- Zakładu Chemii Ogólnej i Analitycznej Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej.

Część badań przedstawionych w pracy opublikowano w:

- Grześkowiak T., **Czarczyńska-Goślińska B.**, Zgoła-Grześkowiak A. *Current approaches in sample preparation for trace analysis of selected endocrine-disrupting compounds: Focus on polychlorinated biphenyls, alkylphenols, and parabens*. Trends Anal. Chem. 2016, 75, 209-226.
IF = 7,474, Pkt. Min. Nauki = 50
- Zgoła-Grześkowiak A., Werner J., Jeszka-Skowron M., **Czarczyńska-Goślińska B.** *Determination of parabens in cosmetic products using high performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Anal. Methods 2016, 8, 3903-3909.
IF = 1,915, Pkt. Min. Nauki = 25
- Zgoła-Grześkowiak A., Jeszka-Skowron M., **Czarczyńska-Goślińska B.**, Grześkowiak T., *Determination of parabens in Polish river and lake water as a function of season*. Anal. Lett. 2016, 49, 1734-1747.
IF = 1,088, Pkt. Min. Nauki = 15
- **Czarczyńska-Goślińska B.**, Zgoła-Grześkowiak A., Jeszka-Skowron M., Frankowski R., Grześkowiak T. *Detection of bisphenol A, cumylphenol and parabens in surface waters of Greater Poland Voivodeship*. J. Environ. Manage. 2017, 204, 50-60.
IF = 4,005, Pkt. Min. Nauki = 35
- Grześkowiak T., **Czarczyńska-Goślińska B.**, Zgoła-Grześkowiak A. *Biodegradation of selected endocrine disrupting compounds. Toxicity and biodegradation testing*. Red. Bidoia E.D, Montagnolli R.N. New York: Humana Press, 2018, str. 1-27 (Seria: *Methods in Pharmacology and Toxicology*)
Pkt. Min. Nauki = 5

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- BCF** - współczynnik biokoncentracji
- BFDGE** - żywice epoksydowe na bazie eteru diglicydyłowego bisfenolu F
- bis-GMA** - bisfenol A- metakrylan glicydyłu
- BP** - butyloparaben
- BPA** - bisfenol A
- BPAF** - bisfenol AF
- BPF** - bisfenol F
- BPS** - bisfenol S
- BSTFA** - N,O bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid
- BzP** - benzyloparaben
- CE** - elektroforeza kapilarna (*Capillary Electrophoresis*)
- CLARITY-BPA** - Konsorcjum Łączące Informacje Naukowe i Prawne na temat toksyczności BPA
- CP** - kumylofenol
- DAD** - detektor diodowy (*Diode Array Detector*)
- DHT** - dihydroksytestosteron
- dSPE** - dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej, dSPE (*Dispersive Solid Phase Extraction*)
- EDCs** - związki zaburzające właściwe funkcjonowanie układu endokrynnego (*Endocrine Disruptive Chemicals*)
- DLLME** - dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (*Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction*)
- DVB** - diwinylobenzen
- E2** - 17 β -estradiol
- EE2** - 17 α -etynyloestradiol
- EER γ** - receptor estrogenowy typu gamma
- EFSA** - Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
- EP** - etyloparaben
- Era** - receptor estrogenowy typu alfa
- FDA** - Agencja Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*)
- FID** - detektor płomieniowo jonizacyjny (*Flame Ionization Detector*)
- HPLC-FD** - wysokosprawną chromatografią cieczową z detekcją fluorescencyjną (*High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*)
- GC** - chromatografia gazowa (*Gas Chromatography*)
- GPR30** - jeden z typów receptora sprzężonego z białkiem G
- LC-MS/MS** - chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
- LOD** - granica wykrywalności (*Limit of Detection*)
- LOQ** - granica oznaczalności (*Limit of Quantification*)
- MIP** - polimer odwzorowany molekularnie (*Molecularly Imprinted Polymer*)
- MnP** - peroksydaza manganowa
- MP** - metyloparaben
- MRM** - monitorowanie wybranych reakcji następczych (*Multiple Reaction Monitoring*)
- NIEHS** - Narodowy Instytut Nauk Zdrowia Środowiskowego (*National Institute of Environmental Health Sciences*)
- NIOSH** - Narodowy Instytut Bezpieczeństwa i Zdrowia Zawodowego (*National Institute for Occupational Safety and Health*)
- NOGE** - eter glicydyłowy typu nowolakowego
- 4-n-OP** - 4-n-oktylofenol

NTP - Narodowy Program Toksykologiczny
PCB - polichlorowane bifenyle
PCW - polichlorek winylu
PDMS - polidimetylosiloksan
PES - polieterosulfon
PHBA - kwas parahydroksybenzoesowy
PP - propyloparaben
ROS - reaktywne formy tlenu
QqQ - potrójny kwadrupol
QuEChERS - technika ekstrakcyjna ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
SBSE - ekstrakcja z ruchomym elementem sorpcyjnym (*Stir-Bar Sorptive Extraction*)
SDME - mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (*Single Drop Micro Extraction*)
SPE - ekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Extraction*)
SPME - mikroekstrakcja do fazy stałej (*Solid-Phase MicroExtraction*)
S-PEKES - poli(eteroketoeterosulfon)
SULT - sulfotransferaza
T3 - trójiodotyronina
TDI - dopuszczalne dzienne spożycie (*Total Daily Intake*)
TMCS - trimetylochlorosilan
TOF - analizator czasu przelotu (*Time of Flight*)
4-t-OP - 4-*tert*-oktylofenol
TSH - tyreotropina
UDPGT - transferaza urydylodifosforoglukuronowa
UGT - glukuronylotransferaza
WWA - wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

Spis treści

1. WSTĘP	10
2. CEL PRACY	12
3. CZĘŚĆ LITERATUROWA	14
3.1. CHARAKTERYSTYKA PARABENÓW	14
3.1.1. Informacje ogólne	14
3.1.2. Otrzymywanie, zastosowanie, właściwości fizykochemiczne	15
3.1.3. Metabolizm i degradacja	16
3.1.4. Aktywność biochemiczna i toksykologiczna	17
3.1.5. Narażenie człowieka	18
3.1.6. Kwestie legislacyjne	19
3.2. PARABENY W ŚRODOWISKU	19
3.2.1. Występowanie w wodach powierzchniowych i osadach dennych, wodzie pitnej i ściekach	19
3.2.2. Występowanie w ludzkich płynach ustrojowych	21
3.3. CHARAKTERYSTYKA BISFENOLI	21
3.3.1. Informacje ogólne	21
3.3.2. Otrzymywanie, wykorzystanie, właściwości fizykochemiczne	22
3.3.3. Metabolizm i degradacja	23
3.3.4. Aktywność biochemiczna i toksykologiczna	27
3.3.5. Narażenie człowieka.....	29
3.3.6. Kwestie legislacyjne	33
3.4. BISFENOLE W ŚRODOWISKU	34
3.4.1. Występowanie w wodach powierzchniowych i osadach dennych, wodzie pitnej i ściekach	34
3.4.2. Występowanie w ludzkich płynach ustrojowych	35
3.5. METODY EKSTRAKCJI	38
3.5.1. Ekstrakcja do fazy stałej	38
3.5.2. Dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz – ciecz	40
3.5.3. Mikroekstrakcja do fazy stałej	41
3.5.4. QuEChERS	41
3.5.5. Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli	42
3.5.6. Ekstrakcja z ruchomym elementem sorpcyjnym	43

3.6. METODY ANALIZY	44
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	49
4.1. Zakres pracy doświadczalnej	49
4.2. Odczynniki	51
4.3. Szkło i drobny sprzęt laboratoryjny	52
4.4. Aparatura badawcza	53
4.5. Oznaczanie parabenów w kosmetykach – zadanie I	54
4.5.1. Próbkki rzeczywiste	54
4.5.2. Oznaczanie parabenów w kosmetykach metodą HPLC-FD	55
4.5.3. Oznaczanie parabenów w kosmetykach metodą LC – MS/MS	56
4.6. Oznaczanie parabenów, BPA i kumylofenolu w wodach powierzchniowych Wielkopolski – zadanie II	57
4.6.1. Próbkki rzeczywiste	57
4.6.2. Ekstrakcja do fazy stałej	59
4.6.3. Oznaczanie wybranych zanieczyszczeń środowiska w wodach powierzchniowych metodą LC-MS/MS	60
4.6.3.1. Oznaczanie parabenów w wodach powierzchniowych metodą LC – MS/MS	61
4.6.3.2. Oznaczanie parabenów, BPA i CP w wodach powierzchniowych metodą LC – MS/MS	62
4.7. Oznaczanie parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym – zadanie III	63
4.7.1. Zebranie próbek mleka kobiecego	63
4.7.2. Wydzielanie analitów metodą QuEChERS	64
5. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE	68
5.1. Oznaczanie parabenów w próbkach kosmetyków – zadanie I	68
5.1.1. Analiza próbek kosmetyków	70
5.1.2. Omówienie wyników zawartości parabenów w kosmetykach	71
5.2. Oznaczanie zawartości parabenów, bisfenolu A i kumylofenolu w próbkach wód powierzchniowych – zadanie II	75
5.2.1. Oznaczanie zawartości parabenów	75
5.2.1.1. Analiza LC – MS/MS	76
5.2.1.2. Opracowanie metody ekstrakcji parabenów do fazy stałej	77
5.2.1.3. Efekt matrycy	80
5.2.1.4. Liniowość, granica wykrywalności i oznaczalności metody	81

5.2.2. Wyniki oznaczania zawartości parabenów w wodach powierzchniowych Wielkopolski (maj-grudzień 2014)	82
5.2.3. Oznaczanie zawartości parabenów, bisfenolu A i kumylofenolu	85
5.2.4. Wyniki oznaczania zawartości parabenów, BPA i kumylofenolu w wodach powierzchniowych Wielkopolski (w okresie od marca 2015 do września 2016)	88
5.3. Oznaczanie parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym – zadanie III	103
5.3.1. Analiza próbek techniką LC-MS/MS	103
5.3.2. Opracowanie metody ekstrakcji parabenów i bisfenoli techniką QuEChERS.....	106
5.3.3. Oznaczanie całkowitej zawartości bisfenoli i parabenów w próbkach mleka	106
5.3.4. Wyniki oznaczania zawartości parabenów i bisfenoli w próbkach mleka kobiecego ..	110
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	133
7. STRESZCZENIE	135
8. SUMMARY.....	137
9. LITERATURA	139
10. WYKAZ TABEL.....	158
11. WYKAZ RYCIN	160
12. SUPLEMENT	162

1. WSTĘP

Zanieczyszczenie środowiska jest poważnym problemem w wielu krajach świata, związanym z rosnącą produkcją zróżnicowanych substancji chemicznych. Wśród zanieczyszczeń istotną grupę stanowią związki chemiczne, które oddziałują na układ endokryny ze względu na strukturalne podobieństwo do hormonów. Substancje te wnikają do komórek, gdzie naśladują lub blokują aktywność hormonów. Są podejrzewane o wpływ na reprodukcję, rozwój, metabolizm, a nawet indukowanie powstawania nowotworów. Dotychczas wykazano, że wśród związków pochodzenia antropogenicznego oddziałujących na środowisko, w tym także na ludzi, znajdują się m.in.: polichlorowane i polibromowane bifenyle, alkilofenole i ich krótkołańcuchowe etoksylaty, dioksyne, furany, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, bisfenole, parabeny itp.

Ostatnie z wymienionych znalazły szerokie zastosowanie jako środki konserwujące, głównie w kosmetykach, ale także w produktach farmaceutycznych, ponieważ powszechnie są uważane za substancje bezpieczne. Ich duża różnorodność sprawia, że są związkami, z którymi człowiek ma najczęstszy kontakt. Niestety, ostatnie doniesienia wskazują, że niektóre z parabenów wykrywane są w tkankach nowotworowych guza piersi, co zwróciło uwagę na konieczność śledzenia losów tych związków w środowisku i organizmie ludzkim. Ponadto prowadzone są badania umożliwiające ustalenie, czy parabeny mogą przyczynić się do powstawania alergii. Parabeny są krystalicznymi ciałami stałymi o charakterze lipofilowym. Trafiają do środowiska naturalnego wraz ze ściekami przemysłowymi i domowymi, pomimo procesu uzdatniania wody w oczyszczalniach ścieków. W środowisku naturalnym ich estry znajdują się m.in. w wodach rzecznych, ściekach, jeziorach, glebach i osadach dennych.

Powszechnie występującymi w ekosystemach zanieczyszczeniami są również bisfenole. Chociaż zdecydowanie najczęściej wykrywany jest bisfenol A (BPA), to jego analogi, takie jak bisfenol AF (BPAF), bisfenol S (BPS) i bisfenol F (BPF) są także często oznaczane w środowisku naturalnym. Wykrywanie bisfenoli wprowadzono z uwagi na liczne doniesienia o toksyczności BPA, mimo że ich wpływ na środowisko nie jest jeszcze gruntownie udokumentowany. Uważa się, że przenikają one do środowiska naturalnego wraz ze ściekami. Bisfenol A występuje w tworzywach sztucznych, opakowaniach do żywności, papierze termicznym używanym w kasach do nadruku paragonów. BPA należy do ksenobiotyków podejrzewanych o działanie zakłócające funkcje układu hormonalnego organizmów żywych [1].

Analityka wybranych ksenobiotyków dotyczy ich oznaczania, zarówno w produktach hadlowych (kosmetyki, żywność) jak i w środowisku naturalnym (wody, osady, gleby, powietrze) oraz w płynach ustrojowych organizmów żywych (mocz, krew, mleko matki). Oznaczanie zawartości parabenów w kosmetykach wymaga ich wyizolowania, najczęściej za pomocą odpowiedniej metody ekstrakcji, a następnie dokonania pomiaru stężenia z zastosowaniem odpowiedniej techniki analitycznej, np. wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV lub spektrometrią mas, a także chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną, fotojonizacyjną lub spektrometrią mas. Najczęściej stosowaną techniką wydzielania i zatężania jest ekstrakcja do fazy stałej, natomiast do oznaczania najpowszechniej jest wykorzystywana wysokosprawna chromatografia cieczowa w połączeniu z tandemową spektrometrią mas [2].

Z uwagi na ryzyko zagrożenia zdrowia człowieka wywołane dużą ekspozycją na parabeny i bisfenole w środowisku, prowadzi się coraz więcej badań dotyczących ich zawartości we krwi, moczu, mleku kobiecym i różnych tkankach (np. tkance tłuszczowej). Z uwagi na złożoność matryc biologicznych, bardzo ważny jest właściwy dobór techniki ekstrakcji. Parabeny i bisfenole występują w próbkach biologicznych w formie wolnej i związanej. W celu oznaczenia ilości ksenobiotyków w obu formach, niezbędne jest przeprowadzenie hydrolizy, np. z użyciem enzymu β -glukuronidazy [3].

Zarówno zagadnienia dotyczące narażenia ludzi na wymienione ksenobiotyki, występujące powszechnie w otaczającym środowisku, jak i aspekty czysto poznawcze, skłoniły mnie do podjęcia tej tematyki w niniejszej dysertacji.

2. CEL PRACY

Celem części literaturowej pracy doktorskiej było zebranie informacji na temat: charakterystyki parabenów i bisfenoli, metod ich otrzymywania, wykorzystania, właściwości fizykochemicznych, metabolizmu, aktywności biochemicznej i toksykologicznej, narażenia organizmów żywych wraz z kwestiami legislacyjnymi. W kontekście zaplanowanych badań niezmiernie istotne było także uwzględnienie problemu oddziaływania parabenów i bisfenoli na środowisko, występowanie w wodach powierzchniowych i osadach dennych, wodzie pitnej i ściekach, a także obecność w ludzkich płynach ustrojowych. Z uwagi na przewidywane zastosowania różnorodnych metod ekstrakcyjnych postanowiono dokonać przeglądu piśmiennictwa dotyczącego metod ekstrakcji i analizy wymienionych ksenobiotyków. Założono, że zebrane studia literaturowe przyczynią się do lepszego skonkretyzowania hipotezy badawczej postawionej w części doświadczalnej pracy.

Celem części eksperymentalnej niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie metod identyfikacji i oznaczania wybranych parabenów i bisfenoli z wykorzystaniem zaawansowanych technik analitycznych oraz zastosowanie opracowanych procedur do określenia poziomów tych ksenobiotyków w różnego typu matrycach począwszy od próbek kosmetyków, poprzez wody różnego pochodzenia, skończywszy na próbkach mleka kobiecego. Realizacja założonego celu miała obejmować następujące etapy:

- opracowanie i walidacja procedury oznaczania parabenów w roztworach techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną oraz jej zastosowanie do oznaczenia poziomu ksenobiotyków w próbkach wybranych kosmetyków,
- opracowanie i walidacja metody oznaczania parabenów, bisfenolu A i kumylofenolu w wodach powierzchniowych techniką LC-MS/MS z uwzględnieniem etapu wyodrębnienia analitów z matrycy i oczyszczania ekstraktów oraz zastosowanie opracowanej procedury do oceny poziomów wybranych analitów w próbkach środowiskowych,
- opracowanie i walidacja metody oznaczania parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym techniką LC-MS/MS z uwzględnieniem etapów wyodrębnienia analitów z matrycy i oczyszczania uzyskanych ekstraktów techniką QuEChERS oraz zastosowanie opracowanej procedury do oceny poziomów wybranych analitów w próbkach mleka kobiet z regionu Wielkopolski.

Prowadzone badania miały pozwolić na opracowanie procedur analitycznych spełniających wymagania stawiane tzw. zielonej chemii oraz umożliwiającymi szybkie,

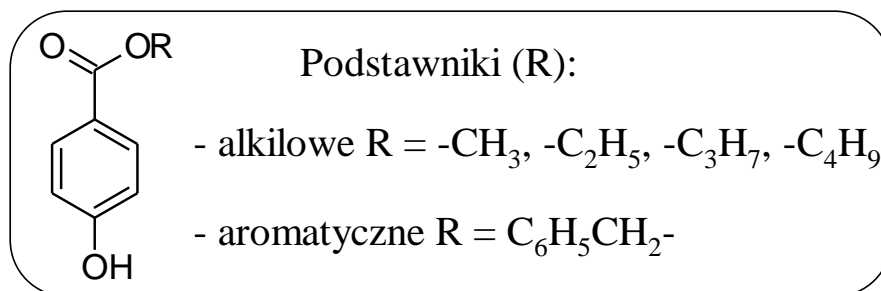
dokładne i precyzyjne oznaczenie badanych ksenobiotyków mogące znaleźć zastosowanie w monitorowaniu poziomów tych związków. Uzyskanie tego rodzaju informacji jest istotne ze względu na ocenę, czy związki te stanowią zagrożenie dla środowiska.

3. CZĘŚĆ LITERATUROWA

3.1. CHARAKTERYSTYKA PARABENÓW

3.1.1. Informacje ogólne

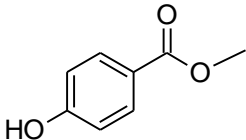
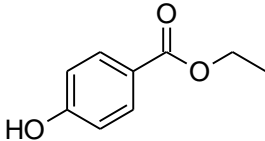
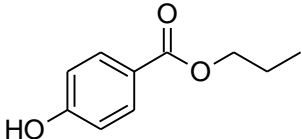
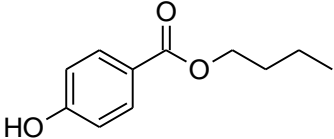
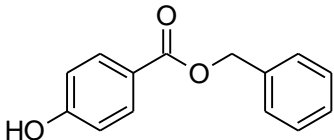
Parabeny to estry kwasu p-hydroksybenzoesowego, posiadające w grupie estrowej podstawniki alkilowe – metylowy, etylowy, propylowy, butylowy lub podstawnik aromatyczny – benzylowy. Ogólny wzór strukturalny parabenów przedstawiono na **Rycinie 1** [4]:



Ryc. 1. Ogólny wzór strukturalny parabenów

Od powyższych podstawników pochodzą nazwy poszczególnych parabenów i są to odpowiednio – metyloparaben (MP), etyloparaben (EP), propyloparaben (PP), butyloparaben (BP) i benzyloparaben (BzP), przedstawione w **Tabeli 1**. Wykorzystywanie tych związków zapoczątkowano w latach dwudziestych dwudziestego wieku [5] jako środków konserwujących w różnych postaciach leków (maści, żele, syropy, czopki, aerozole, kapsułki miękkie), w kosmetykach (toniki, wody micelarne, kremy, perfumy), a także czasami w żywności [6]. Parabeny występują również naturalnie w przyrodzie. Metyloparaben wykryto w owocach maliny moroszki i ekstrakcie waniliowym Bourbon. Propyloparaben zidentyfikowano w nadziemnych częściach rośliny *Stocksia brahuica* [7]. Parabeny są również obecne w ściekach, wodach powierzchniowych, glebie i kurzu, jak również w ludzkich tkankach i płynach ustrojowych.

Tab. 1. Nazwy i wzory strukturalne parabenów [8]

Nazwa zwyczajowa (Skrót)	Nazwa systematyczna	Wzór strukturalny
Metyloparaben (MP)	Ester metylowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4-hydroksybenzoesan metylu)	
Etyloparaben (EP)	Ester etylowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4-hydroksybenzoesan etylu)	
Propyloparaben (PP)	Ester propylowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4-hydroksybenzoesan propylu)	
Butyloparaben (BP)	Ester butylowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4-hydroksybenzoesan butylu)	
Benzyloparaben (BzP)	Ester benzylový kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4-hydroksybenzoesan benzylu)	

3.1.2. Otrzymywanie, zastosowanie, właściwości fizykochemiczne

Parabeny są otrzymywane w reakcji estryfikacji kwasu p-hydroksybenzoesowego z nadmiarem odpowiedniego alkoholu, w obecności katalizatora np. kwasu siarkowego(VI). Kwas jest następnie zobojętniany wodorotlenkiem sodu, a uzyskany produkt krystalizuje się i rozdrabnia na drodze mielenia.

Benzyloparaben jest często otrzymywany w reakcji chlorku benzylu i p-hydroksybenzoesanu sodu. Synteza parabenów jest tania, przy jednoczesnej wysokiej skuteczności przeciwbakteryjnej, co przyczynia się do ich szerokiego wytwarzania i stosowania.

Związki te uważane są za niemal idealne konserwanty z uwagi na szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej, brak działania drażniącego i uczulającego, niską toksyczność, stabilność w szerokim zakresie pH i rozpuszczalność w wodzie. Parabeny wykazują w niskich stężeniach aktywność przeciwgrzybiczą

i przeciwbakteryjną, z czego bardziej skuteczne są w odniesieniu do grzybów, ponadto silniej działają na bakterie Gram-dodatnie niż Gram-ujemne.

Ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w obrębie grupy estrowej wzrasta współczynnik podziału olej/woda, tendencja do kumulacji w tkance tłuszczowej i aktywność przeciwbakteryjna, ale maleje rozpuszczalność w wodzie. Z tego względu najczęściej stosowanymi parabenami są metyloparaben i etyloparaben [9]. Parabeny są skuteczne w środowisku kwasowym, obojętnym i lekko zasadowym, a powyżej pH=8 ich skuteczność zmniejsza się wskutek hydrolizy. Wartości stałej dysocjacji kwasowej (pKa) [10,11] przyjmują wartości w zakresie 8,17 i 8,50 w zależności od rodzaju parabenów. Właściwości fizykochemiczne parabenów przedstawiono w **Tabeli 2**.

Tab. 2. Właściwości fizykochemiczne parabenów [12]

Charakterystyka	MP	EP	PP	BP	BzP
Wzór chemiczny	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Masa molowa [g/mol]	152,16	166,18	180,21	194,23	228,25
pKa	8,17	8,22	8,35	8,37	-
Współczynnik podziału oktanol/woda	1,66	2,19	2,71	3,24	3,56
Rozpuszczalność w wodzie w temp. 25°C [g/100 ml]	2,00	0,86	0,30	0,15	0,05

3.1.3. Metabolizm i degradacja

W środowisku naturalnym parabeny są obecne zarówno w wodach, powietrzu, jak i glebie. Obecność parabenów w wodach ocenia się na podstawie wartości współczynnika biokoncentracji (BCF), wyznaczonego doświadczalnie z udziałem organizmów wodnych [13]. Wartość ta dla propyloparabenu wynosi 44 i wskazuje na umiarkowany potencjał biokoncentracji w przeciwieństwie do dużo silniej kumulującego się butyloparabenu o wartości BCF=110.

W powietrzu występują w postaci aerozoli w parze wodnej w postaci cząsteczkowej i są degradowane w wyniku fotochemicznej reakcji z rodnikami hydroksylowymi. Okres półtrwania metyloparabenu w tego typu reakcji jest szacowany na jeden dzień. Cząsteczka metyloparabenu zawiera w swojej strukturze chromofor absorbujący fale promieniowania

o długości powyżej 290 nm i dlatego jest podatna na bezpośredni rozpad pod wpływem światła słonecznego [13].

Jeśli parabeny dostają się do gleby, wówczas mogą przenikać w głąb w różnym stopniu w zależności od współczynnika adsorpcji w glebie, który wynosi od 119 dla bardziej mobilnych do 2100 dla silniej zaadsorbowanych parabenów. Parabeny uchodzą za związki łatwo biodegradowalne w środowisku. Po zastosowaniu testu Zahna-Wellensa zaobserwowano całkowitą biodegradację metyloparabenu w ciągu 6 dni [13].

Abbas i wsp. [14] przeanalizowali metabolizm parabenów w oparciu o reakcje hydrolizy i glukuronidacji w ludzkich mikrosomach wątroby i osoczu. Metyloparaben i etyloparaben pozostały w osoczu w 95% po 24 godz., podczas gdy stężenia propylo-, butylo- i benzyloparabenu zmniejszyły się o połowę. Z kolei reakcje hydrolizy w wątrobie zachodziły wolniej ze wzrostem długości łańcucha alkilowego parabenów. Wszystkie parabeny były metabolizowane w ludzkich mikrosomach wątroby na drodze reakcji hydrolizy z udziałem esteraz i glukuronidacji z udziałem izoform glukuronylotransferazy UGT. Nie zaobserwowano także kumulacji parabenów w tkankach ludzkich.

Parabeny są dobrze wchłaniane po podaniu doustnym i podskórnym [15]. Po aplikacji na skórę są szybko i niemal całkowicie hydrolizowane do kwasu para-hydroksybenzoesowego (PHBA), dlatego małe ilości macierzystego związku dostają się do organizmu [11]. Jednak badania biotransformacji są kontrowersyjne, gdyż niektórzy autorzy wykazali ogólnoustrojową absorpcję butyloparabenu u ludzi [16], czego nie odnotowano w badaniach wykonanych na szczurach. Jakość dostępnych danych na temat oceny wchłaniania przez skórę została uznana za wątpliwą przez Komitet Naukowy do Spraw Bezpieczeństwa Konsumenta Unii Europejskiej, z uwagi na różnice w absorpcji skórnej i metabolizmie wyjściowego związku w skórze między ludźmi i gryzoniemi. Komitet Naukowy przyjął wartość 3,7% dla butyloparabenu w oparciu o badania *in vitro* skórnej absorpcji przeprowadzone przez Fasano [17].

3.1.4. Aktywność biochemiczna i toksykologiczna

Parabeny działają jako Endocrine Disruptive Chemicals (EDCs), czyli związki zaburzające właściwe funkcjonowanie układu endokrynnego organizmów żywych. Mają one zdolność wiązania z ludzkimi receptorami estrogenowymi, regulowania ekspresji genów oraz wzrostu komórek reagujących na estrogeny. Parabeny działają także jako antagoniści androgenów w komórkach reagujących na androgeny, blokują sulfotransferazy oraz wpływają na przemiany steroidów [18]. Mogą one także zakłócać lizosomalne i mitochondrialne

mechanizmy, uszkadzać DNA i nasilać uszkodzenia wywołane promieniowaniem UVB przez produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) i tlenku azotu [19]. Efekty estrogenne parabenów rosną ze wzrostem długości i stopnia rozgałęzienia łańcucha [20-22]. Jednak związki te wykazują od 10 tys. do 100 tys. razy słabszy efekt od naturalnego 17 β -estradiolu po podskórnym podaniu u szczurów [22], co potwierdziły także późniejsze wyniki badań, w których równolegle wykazano również brak efektów estrogenu w testach wzrostu macicy przeprowadzonych na myszach [23]. Wykrycie parabenów w guzkach piersi przez Darbre i wsp. [24] rzuciło podejrzenie na te związki jako potencjalnie rakotwórcze i wywołało dyskusję w świecie naukowym, gdyż jakość przedstawionego badania była krytykowana. W kolejnych studiach, w których oceniono profile ekspresji genów stwierdzono, że wpływ parabenów na komórki różni się od wpływu 17 β -estradiolu [25]. W obszernym przeglądzie literatury Golden i współpracownicy doszli do wniosku, że parabeny nie mogą zwiększać ryzyka procesów zależnych od estrogenów, w tym nie wpływają na męski układ rozrodczy ani indukcję raka piersi. Ponadto przy założeniu największej możliwej ekspozycji na parabeny wiąże się ona z mniejszym ryzykiem niż ekspozycja na naturalny fitoestrogen daidzeinę występującą w diecie [26]. Wpływ parabenów na męski układ rozrodczy jest kontrowersyjny. Wyniki prac pozostają we wzajemnej sprzeczności. Większość z nich pochodzi z badań wykonywanych na zwierzętach, co sprawia trudności w przełożeniu obserwowanych efektów na organizm ludzki [27].

3.1.5. Narażenie człowieka

Ekspozycja na parabeny zachodzi w wyniku kontaktu przez skórę (kosmetyki, kąpiele w wodach powierzchniowych), układ oddechowy lub pokarmowy, po spożyciu określonych produktów, a także zastosowaniu leków.

Do organizmu przeciętnej osoby ważącej 60 kg trafia codziennie 76 mg lub 1,26 mg/kg/dzień parabenów, z czego najwięcej z kosmetyków - około 50 mg/dzień, z leków 25 mg/dzień i z żywności około 1 mg/dzień [11]. Poza tym parabeny wykrywane są w wodach powierzchniowych, glebie, osadach, organizmach żywych, powietrzu wewnątrz pomieszczeń i w kurzu [12]. W najwyższych stężeniach i najczęściej wykrywany jest metyloparaben. Oznaczono go w większości próbek w badaniach kumulacji parabenów w tkankach ryb z obszaru Wielkich Jezior, wód stanu Nowy Jork i wód przybrzeżnych Florydy, ptaków z Atolu Midway, z obszaru Wielkich Jezior i innych rejonów USA oraz ssaków – czarnych niedźwiedzi z Michigan. Najwyższy poziom metyloparabenu zmierzono w próbce wątroby bielika amerykańskiego z Michigan - 796 ng/g [28]. Z kolei w badaniach

przeprowadzonych na terenie Japonii najwyższe stężenia wykryto dla metyloparabenu 670 ng/l, a niższe dla propyloparabenu 207 ng/l i butyloparabenu 163 ng/l z działów wodnych bez systemu kanalizacji w rejonie Tokushima [29]. Podobnie w osadach ściekowych pobranych z oczyszczalni ścieków w strefach miejskich, wiejskich i przemysłowych okolic Madrytu w 95% próbek oznaczono metyloparaben na poziomie między 5,1 ng/g a 26,2 ng/g suchej masy, a propyloparaben w 74% próbek w stężeniach sięgających 44,1 ng/g suchej masy [30].

3.1.6. Kwestie legislacyjne

Stosowanie parabenów jest akceptowane przez Amerykański Panel Ekspertów ds. Przeglądu Składników Kosmetycznych (American Cosmetic Ingredient Review Expert Panel) [31], Agencję ds. Żywności i Leków (the Food and Drug Administration) [32] i Komitet Naukowy Unii Europejskiej ds. Bezpieczeństwa Konsumentów. Jednak ten ostatni zaleca obniżenie maksymalnego stężenia sumy PP i BP z 0,4% do 0,19%. Aktualnie ustawodawstwo unijne zezwala na użycie w produkcie kosmetycznym MP i jego soli w stężeniu do 0,4%, EP do 0,4%, sumy PP i BP do 0,14% i mieszaniny parabenów do 0,8% [33]. Jedynie w Danii, z obawy o potencjalny wpływ na niemowlęta i małe dzieci, zakazano w 2011 roku używania PP, izopropyloparabenu, BP i izobutyloparabenu w kosmetykach dla dzieci do lat trzech [34].

3.2. PARABENY W ŚRODOWISKU

3.2.1. Występowanie w wodach powierzchniowych i osadach dennych, wodzie pitnej i ściekach

Parabeny są oznaczane w wodach powierzchniowych, osadach, ściekach, wodach morskich i lodzie morskim [35-38]. Metyloparaben i propyloparaben są najczęściej wykrywane w zbiornikach słodkowodnych [10]. Stężenia parabenów w rzekach Południowej Walii sięgały do 0,15 µg/l [39], w szwajcarskich rzekach do 0,017 µg/l [40], w rzekach Indii osiągały maksymalnie 0,18 µg/l [41], a w japońskich strumieniach były na poziomie od 0,163 dla butyloparabenu do 0,67 µg/l dla metyloparabenu [29]. Metyloparaben, propyloparaben i butyloparaben wykrywano także w morskich wodach i lodzie Antarktyki [38]. Stężenia parabenów w wodach głębokich i rezerwuuarowych w sąsiedztwie składowisk odpadów komunalnych w Chinach zmniejszają się wraz z oddalaniem się od tych składowisk [42].

Parabeny są wykrywane w ściekach, z czego najwięcej oznacza się metyloparabenu do poziomu 30 000 ng/l i propyloparabenu do 20 000 ng/l [10,39,40,43-48]. Etyloparaben, butyloparaben i izobutyloparaben są również stale wykrywane, ale na dużo niższych poziomach. Częstotliwość wykrywania benzyloparabenu jest bardzo mała, a stężenia zwykle nie przekraczają kilkudziesięciu ng/l [40,49,50]. W swoich badaniach z rejonu Walencji hiszpańscy naukowcy [51] porównywali zawartość wybranych parabenów w wodach rzecznych, osadach rzecznych, wodzie mineralnej, wodzie z kranu oraz w ściekach wpływających i wypływających z oczyszczalni, co przedstawiono w **Tabeli 3**. Podobnie, najwięcej i najczęściej wykryto metyloparaben w próbkach wody pochodzących z wszystkich wspomnianych źródeł, chociaż na 200 razy niższym poziomie od najwyższego cytowanego przez Hamana i wsp. [10].

Tab. 3. Przegląd zawartości parabenów w różnych próbkach wody [51]

Związek	Woda rzeczna - 22 próbki		Osad rzeczny - 22 próbki	
	Stężenie ng/l	Częstotliwość występowania w próbkach	Stężenie ng/l	Częstotliwość występowania w próbkach
MP	119	17	152	22
EP	16	13	23	19
PP	145	18	9	14
BP	14	10	3	14

Związek	Woda mineralna - 11 próbek		Woda z kranu - 8 próbek	
	Stężenie ng/l	Częstotliwość występowania w próbkach	Stężenie ng/l	Częstotliwość występowania w próbkach
MP	40	11	12	6
EP	2	2	Nie wykryto	0
PP	23	11	9	5
BP	36	9	28	5

Związek	Ścieki wpływające do oczyszczalni - 21 próbek		Ścieki wypływające z oczyszczalni - 21 próbek	
	Stężenie ng/l	Częstotliwość występowania w próbkach	Stężenie ng/l	Częstotliwość występowania w próbkach
MP	334	21	11	21
EP	72	21	Nie wykryto	0
PP	163	21	Nie wykryto	0
BP	15	21	Nie wykryto	0

3.2.2. Występowanie w ludzkich płynach ustrojowych

Parabeny są wykrywane w osoczu krwi, mleku kobiecym, moczu i tkankach ludzkich. W swoich badaniach amerykańscy naukowcy [52], którzy zanalizowali zaledwie 4 próbki mleka kobiecego oznaczyli wolny metyloparaben od < LOD do 3,04 ng/ml, sumę wolnego i związanego metyloparabenu od 0,53 ng/ml do 3,0 ng/ml, wolny propyloparaben od < LOD do 0,32 ng/ml, sumę wolnego i związanego propyloparabenu od < LOD do 0,33 ng/ml. W 160 próbkach tkanki z piersi pobranych po mastektomii Barr i wsp. [53] uzyskali mediany stężenia (i zakresy stężeń) dla MP 16,6 (od 0 do 5102,9), EP 3,4 (od 0 to 499,70), PP 16,8 (od 0 do 2052,7) i BP 5,8 (od 0 do 95,4) ng/g. Z kolei kanadyjscy naukowcy zbadali zawartość parabenów w ludzkim moczu i uzyskali dla 28 kobiet, w tym 9 w ciąży w ng/ml – wartości mediany MP 25,45; EP – 10,17; PP – 2,80 i BP – 0,30. W przypadku kilku osób stwierdzono stężenia nawet 966,46 ng/ml MP; 220,6 ng/ml EP; 612,73 ng/ml PP i 22,9 ng/ml BP [54].

W badaniach Hondy i wsp. [55] dotyczących zawartości parabenów w próbkach moczu od dawców z Chin, Indii, Japonii, Korei, Kuwejt, Arabii Saudyjskiej, Wietnamu, Grecji i USA wykrywano etyloparaben, metyloparaben i propyloparaben często w 100; 98,0; i 80,3%; odpowiednio, z medianą stężenia 0,68; 7,02 i 1,21 ng/ml, dla wszystkich dziewięciu krajów. Próbki moczu kobiet zawierały znacznie wyższe stężenia parabenów (mediana 32,3 ng/ml) od tych stwierdzonych w moczu mężczyzn (5,46 ng/ml). Próbki moczu od dawców koreańskich (mediana: 227 ng/ml) były najwyższe, o jeden, dwa rzędy wyższe od stężeń wykrytych w próbkach z innych krajów (3,67-29,1 ng/ml). Oszacowane dzienne spożycie parabenów (na podstawie stężeń w moczu) było bardzo zróżnicowane, a kilka próbek wskazywało na ekspozycję na propyloparaben powyżej dopuszczalnej wartości dziennej dawki.

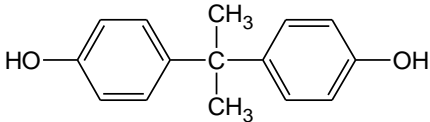
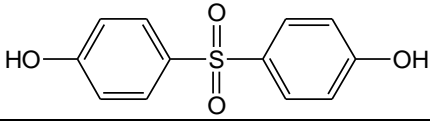
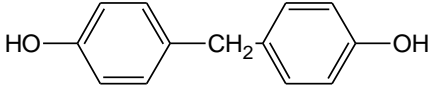
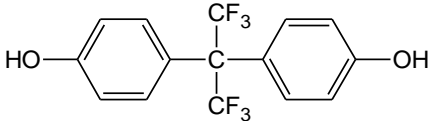
3.3. CHARAKTERYSTYKA BISFENOLI

3.3.1. Informacje ogólne

Bisfenole są związkami bardzo szeroko stosowanymi w przemyśle. Pierwsza żywica epoksydowa do celów przemysłowych, w której półproduktem i plastyfikatorem był bisfenol A (BPA), została otrzymana w latach 40-tych XX wieku [56]. W 1957, firmy Bayer i General Electric odkryły, że w czasie polimeryzacji BPA tworzy się twardy plastik zwany poliwęglanem [57], który powszechnie zastosowano do produkcji opakowań do napojów i żywności, w tym butelek dla niemowląt. Inne bisfenole zwane są analogami bisfenolu A i posiadają wspólną strukturę dwóch 4-hydroksyfenylowych grup funkcyjnych. Należą do

nich m.in. bisfenol S, bisfenol F i bisfenol AF. Ich wzory i nazwy przedstawiono w **Tabeli 4**. Mają one również szeroki zakres zastosowań w produkcji materiałów i uważa się, że częściowo zastąpią one BPA w przemyśle, stanowiąc być może bardziej bezpieczną alternatywę dla środowiska [58].

Tab. 4. Wybrane bisfenole – wzory strukturalne i nazewnictwo [35]

Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Wzór strukturalny
bisfenol A BPA	4-[2-(4-hydroksyfenylo)propan-2-ylo]fenol	
bisfenol S BPS	4-(4-hydroksyfenylo)sulfonylofenol	
bisfenol F BPF	4-[(4-hydroksyfenylo)metylo]fenol	
bisfenol AF BPAF	4-[1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-(4-hydroksyfenylo)propan-2-ylo]fenol	

3.3.2. Otrzymywanie, wykorzystanie, właściwości fizykochemiczne

BPA otrzymuje się w reakcji kondensacji fenolu z acetonem w niskim pH i przy wysokich temperaturach w obecności katalizatora. Uzyskany BPA oczyszcza się np. przez destylację i suszy [59]. Fluorowane bisfenole otrzymuje się w reakcji fenolu z fluorowanym prekursorem złożonym z fluorowanego aldehydu lub fluorowanego ketonu w reakcji katalizowanej kwasem sulfonowym [60], a BPS powstaje w reakcji fenolu z kwasem siarkowym(VI). BPA stał się jedną z najczęściej stosowanych substancji na rynku w produkcji wytrzymałych i odpornych na ciepło pojemników, rur do wody, ochronnych i korekcyjnych okularów, sprzętu medycznego i sportowego, papieru termicznego i wielu artykułów - plastikowych zabawek, płyt CD [1,61]. BPA może służyć jako dodatek do usuwania nadmiaru kwasu chlorowodorowego przy produkcji polichlorku winylu (PCW), a także pełnić funkcję przeciwutleniacza i inhibitora w procesie polimeryzacji tego typu tworzyw sztucznych [62]. Roczna produkcja najpopularniejszego bisfenolu - BPA jest szacowana na 8 milionów ton i prognozuje się wyprodukowanie 10,6 milionów ton do roku 2022.

Z kolei BPF, BPS i BPAF są głównymi substytutami BPA w produkcji tworzyw poliwęglanowych i żywic epoksydowych [63]. Natomiast BPF znajduje zastosowanie w lakierach, wykładzinach, klejach, tworzywach sztucznych i rurach do wody, a także wypełnieniach dentystycznych, urządzeniach protetycznych, powłokach wyściełających opakowania do żywności [63].

BPS jest powszechnie używany w klejach epoksydowych, powłokach puszek i termicznych paragonach, a także w sulfonowanych poli(eteroketoeterosulfonach) (S-PEKES) i jako dodatek w barwnikach i garbnikach [63].

BPAF jest stosowany jako środek sieciujący fluoroelastomery, w elektronice i włóknach światłowodowych, a także wysoko wydajnych monomerach do wytwarzania poliimidów, poliamidów, poliestrów, kopolimerów poliwęglanowych oraz innych specjalistycznych polimerów. BPAF znajduje również zastosowanie w specjalnych polimerach, w tym plastikowych światłowodach i falowodach [63]. Właściwości fizykochemiczne bisfenoli zestawiono w **Tabeli 5**.

Tab. 5. Właściwości fizykochemiczne bisfenoli [59,64,65]

Bisfenol	BPA	BPS	BPF	BPAF
Wzór chemiczny	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	C ₁₂ H ₁₀ SO ₄	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	C ₁₅ H ₁₀ F ₆ O ₂
Masa molowa [g/mol]	228,12	250,03	200,08	336,06
pKa	9,78–10,39	7,42–8,03	9,84–10,45	9,13–9,74
Współczynnik podziału oktanol/woda	3,4–4,04	1,2–2,32	2,9–3,46	4,77
Rozpuszczalność w wodzie w temp. 20-25°C [mg/l]	300	1100	543	-

3.3.3. Metabolizm i degradacja

W przypadku podania doustnego BPA u ludzi, jest on dobrze wchłaniany i podlega całkowitemu metabolizmowi pierwszego przejścia w wątrobie do glukuronianu BPA jako głównego metabolitu, który jest dalej szybko wydalany z moczem z okresem półtrwania poniżej 6 godzin [66,67]. Siarczan BPA jest uznawany za główny metabolit BPA w moczu u człowieka [68,69]. Metabolizm pierwszego przejścia jest tak skuteczny, że dostępność ogólnoustrojowa BPA jest bardzo niska po podaniu doustnym. Glukuronian BPA i siarczan BPA nie zakłócają hormonalnej regulacji układu rozrodczego [70-72], a reakcje sprzęgania reprezentują szlaki detoksykacji.

U szczurów, BPA jest w małym stopniu sprzęgany z siarczanem, natomiast znacznie częściej z glukuronianem [73], wydzielanym z wątroby z żółcią do przewodu pokarmowego, gdzie ulega ponownej hydrolizie do BPA i zwrotnemu wchłonięciu do krwi. W ten sposób zachodzi cykl wątrobowo-jelitowy, odpowiadający za wolniejszą eliminację BPA u gryzoni niż u człowieka [74], z końcowymi okresami półtrwania między 20 a 80 godzin i z wyższymi stężeniami wolnego BPA w osoczu. To zróżnicowanie odzwierciedla także różnice międzygatunkowe progów eliminacji ksenobiotyków z żółcią. Masa molowa glukuronianu BPA (484 D) jest dużo wyższa od wartości progowych u szczurów (300-400 D), ale znacznie poniżej wartości progowej u ludzi (500-600 D) [75-77].

U noworodków pewne szlaki metaboliczne zachodzą z mniejszą wydajnością np. glukuronidacja zachodzi 2-5 razy wolniej u wcześniaków. Dodatkowo inaczej zachodzą pewne funkcje wydalnicze, jak np. filtracja kłębuszkowa jest 1,7 razy mniejsza niż u dorosłych. Jednak z wiekiem w ciągu roku i siedmiu miesięcy po urodzeniu te funkcje osiągają już pełne możliwości [78-81].

U szczurów aktywność transferazy urydylo-difosforoglukuronowej (UDPGT) jest także niska po urodzeniu [82] i zachowuje [78,83] zmniejszoną aktywność przez dłuższy okres w porównaniu do równoważnego okresu rozwoju u ludzi.

W odróżnieniu od UDPGT, sulfotransferazy (SULT), które często współdzielą ksenobiotyczne substraty, są bardzo aktywne w rozwijającym się płodzie i działają w pełni od urodzenia [84-88].

BPA jest substratem dla różnych sulfotransferaz ludzkich SULT, które katalizują tworzenie siarczanów BPA [89,90]. Poziomy ludzkiej glukuronozylotransferazy difosforanu urydyny UDPGT stopniowo wzrastają podczas płodowego i noworodkowego rozwoju.

Różne badania przeprowadzone na gryzoniach wykazały, że aktywność procesów glukuronidacji w wątrobie matki jest niższa w czasie ciąży. Obniżona zdolność wątroby ciężarnej do prowadzenia reakcji sprzęgania, może powodować znikome narażenie płodu na wolny BPA. Jednakże u szczurów profile metabolizmu ciężarnych, jak i nieciążarnych zwierząt są podobne, co wskazuje na ogólnoustrojową dostępność wolnego BPA [91] i ewentualność znacznego narażenia płodu na wolny BPA. U szczurzych noworodków BPA podany doustnie (1 lub 10 mg BPA/kg masy ciała w 4, 7 lub 21 dniu po urodzeniu) jest metabolizowany do glukuronianu BPA niezależnie od wieku. Stężenia glukuronianów BPA i BPA w osoczu były wyższe, a eliminacja glukuronianu z osocza następowała szybciej u nowonarodzonych zwierząt niż u dorosłych. U nowonarodzonych szczurów obserwowano

zależność biotransformacji BPA do jego glukuronianu w zależności od dawki i wystarczającą zdolność do skutecznego metabolizowania niskich dawek BPA (1 mg/kg masy ciała) [92].

Zakłada się, że biotransformacja BPA u ludzkich noworodków może być interpretowana w oparciu o dane toksykokinetyczne określone dla ksenobiotyków metabolizowanych do siarczanów i/lub glukuronianów, takich jak np. paracetamol [93,94]. U osób dorosłych metabolizm paracetamolu, wyrażony w % dawki doustnej, opiera się na glukuronidacji na poziomie 50-60% biotransformacji, wraz z utworzeniem siarczanów na poziomie 25-40%, podczas gdy na utlenianie i wydalanie przez nerki przypada około 15%. U noworodków biotransformacja paracetamolu z utworzeniem siarczanów i glukuronianów zależy od dawki. Tworzenie siarczanów jest silniej zaznaczone (65-68% dawki) po przyjęciu wyższej dawki doustnej (10-12 mg/kg m.c.). Mimo to, glukuronidacja pozostaje ważną ścieżką biotransformacji (18-22%) [95,96]. Po ekspozycji na paracetamol z mleka kobiecego w dawkach ok. 0,3 mg/kg m.c. glukuronidacja okazała się głównym szlakiem (54%) biotransformacji u noworodków, a pochodne siarczanowe stanowiły jedynie 11% [97]. W badaniach prowadzonych na ludzkich noworodkach stwierdzono, że mimo niższej aktywności UDPGT, znacząco zwiększa się pojemność biotransformacji ksenobiotyków. Siarczany BPA były tworzone w pierwotnych hepatocytach, natomiast różne enzymy typu SULT katalizowały powstawanie siarczanów BPA, które są głównym metabolitem w ludzkim moczu [98]. Tłumaczy to obserwacja, dlaczego tworzenie siarczanów BPA u płodów i noworodków prowadzi do skutecznej detoksykacji.

W badaniach metabolizmu BPAF zidentyfikowano jego koniugaty w moczu i żółci. Związek był usuwany z hepatocytów wolniej niż BPA u poszczególnych ssaków w następującej kolejności: szczur, mysz, człowiek. Stwierdzono, że BPAF jest wydalany głównie z kałem po 72 godzinach po podaniu doustnym przez szczury (65-80%) i myszy (63-72%), podczas gdy wydalanie z moczem jest drugorzędną drogą eliminacji [99-101]. Wysokie poziomy BPAF wykryto w próbkach wątroby, nerki i surowicy po podaniu doustnym szczurom [101].

BPF, podobnie jak BPA, jest wchłaniany drogą doustną i dystrybuowany do całego organizmu, w tym do dróg rodnych i płodu przekraczając barierę łożyskową, zaś wydalany jest głównie z moczem. Stwierdzono jednak, że 7-9% dawki BPF występuje w tkankach 96 godz. po podaniu pojedynczej dawki doustnej szczurom [102]. Biotransformacja BPF *in vivo* prowadziła do 6 różnych metabolitów z głównym metabolitem w moczu - siarczanem BPF. Podobnie biotransformacja *in vitro* z użyciem frakcji mikrosomalnej wątroby ludzkiej i szczurzej prowadziła do powstania glukuronidu i siarczanu BPF. Jednak uzyskanie

di-, orto- i meta-hydroksyloowanych metabolitów BPF okazało się głównym szlakiem metabolicznym. Także tworzenie dimerów BPF zostało udokumentowane w pracy Cabatona i współautorów [103].

Skledar i wsp. [104] wykazali, że glukuronidacja jest dominującym szlakiem metabolicznym BPS u ludzi i przypuszczalnie zwiększy również szybkość wydalania BPS z organizmu. W przeciwieństwie do BPS, jego glukuronid jest nieaktywny względem receptorów estrogenowych, androgenowych i tarczycowych. Z kolei badania metabolizmu BPS po podaniu doustnym u myszy pokazały, że BPS i metabolity II fazy są wydalone z moczem, zaś glukuronian BPS okazał się głównym metabolitem zarówno w moczu, jak i w kale [105].

BPA może być biodegradowany [106] przez mikroorganizmy występujące w środowisku oraz metabolizowany przez enzymy roślinne i zwierzęce, co prowadzi do detoksykacji. Bakterie biodegradujące BPA zidentyfikowano w glebie, wodach rzecznych i oczyszczalniach ścieków [59,107-110]. Bakterie rzeczne w większości są w stanie rozkładać BPA, ale tylko niektóre z nich całkowicie. Do bakterii o wysokiej zdolności biodegradacji BPA (>90%) należą *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas putida* i *Streptomyces sp.*, stąd nadają się do przemysłowego oczyszczania wód [111]. Biodegradacja BPA zachodzi szybciej w warunkach tlenowych niż w beztlenowych, podobnie przebiega szybciej w wodach rzecznych niż w wodach morskich [112,113]. Grzyby są w stanie rozkładać BPA, ale jak w przypadku bakterii, niewiele szczepów potrafi przeprowadzać takie procesy efektywnie. Degradacja zachodzi głównie z udziałem enzymów rozkładających ligninę – peroksydazy manganowej MnP i lakazy podstawczaków wywołujących białą zgniliznę [114]. Rośliny absorbują BPA szybko z wody przez korzenie i metabolizują go do różnych pochodnych glikozydowych, najczęściej z udziałem peroksydazy i oksydazy fenolowej [115].

Z bardzo nielicznych badań dotyczących degradacji BPAF wynika, że związek ten podlega powolnej degradacji mikrobiologicznej i posiada wysokie powinowactwo sorpcyjne, co może prowadzić do wzrostu jego poziomu w środowisku, zwłaszcza jeśli będzie zastępował BPA. W porównaniu z degradacją BPA i BPS, BPAF jest znacznie bardziej trwały, z obserwowanym okresem półtrwania wynoszącym odpowiednio 32,6 dnia w glebach leśnych i 24,5 dnia w glebach gospodarczych [116].

BPS przez długi czas uchodził za związek niedegradowalny w warunkach aerobowych i prawdopodobnie kumulujący się w środowisku wodnym [117,118]. Do tej pory *Sphingobium fuliginis* OMI jest pierwszym zidentyfikowanym szczepem, który ma zdolność rozkładu BPS [119].

Dla BPF zidentyfikowano ścieżkę degradacji opisaną dla tlenowych bakterii występujących w glebie *Sphingobium yanoikuyae* FM-2. W wyniku wieloetapowych reakcji chemicznych powstają mineralizowane metabolity i pewna ilość 1,4-benzochinonu [120]. Ścieżka degradacji BPF przez *Sphingobium yanoikuyae* TYF-1, wyizolowanych z *P. australis rhizosphere*, wydaje się być częściowo podobna do tej poznanej dla szczepu FM-2, a jej kluczowym etapem jest oksydacja [121].

3.3.4. Aktywność biochemiczna i toksykologiczna

Bisfenole zaliczane są do EDCs, czyli związków zaburzających właściwe funkcjonowanie układu endokrynnego organizmów żywych. BPA jest analogiem estrogenu, zbudowanym z dwóch pierścieni 4-hydroksyfenylowych, podejrzewanym o wpływ na rozmnażanie, rozwój i metabolizm organizmów żywych. BPA wykazuje 10 tys. razy mniejsze powinowactwo wiązania do klasycznych receptorów błonowych estrogenowych α i β niż 17β -estradiol [122]. Jednakże jego siła działania nawet w bardzo niskich stężeniach (piko- i nanomolowych) jest porównywalna z estradiolem [123]. Niskie poziomy BPA wpływają na komórki przysadki mózgowej przyczyniając się do wydzielania prolaktyny [124]. Z kolei BPA i dietylostilbestrol w stężeniach 10^{-9} M powodowały zaburzenia w wydzielaniu glukagonu przez trzustkę [125]. BPA oddziałuje na transbłonowe receptory sprzężone z białkiem G (GPR30), które wykryto w komórkach raka sutka, wysepkach Langerhansa trzustki i adypocytach. Niskie, nanomolowe stężenia wystarczają do stymulacji proliferacji nasienia *in vitro* [126]. BPA ma także zdolność wiązania się z receptorami estrogenowymi typu gamma $ERR\gamma$ (estrogen-related receptor γ), znajdującymi się w mózgu płodów i łożysku [127]. Co więcej, metabolity BPA wykazywały silniejszą aktywność estrogenową niż związki macierzyste [128].

W badaniach na zwierzętach z użyciem dawek BPA odpowiadających narażeniu ludzi stwierdzono: przedwczesne dojrzewanie, zmniejszenie wagi pochwy, wzrost ekspresji receptora estrogenowego $ER\alpha$ i progesteronowego PR (receptora progesteronu) w endometrium płodów żeńskich myszy podczas ich rozwoju po urodzeniu. U płodów myszy płci męskiej BPA nasilił wzrost prostaty [129-131].

Wyniki badań na ludziach wykazały odwrotną zależność między BPA w moczu a estradiolem w surowicy i zdolność BPA do zmieniania poziomów hormonów u mężczyzn [132]. Ekspozycja na BPA przyczyniająca się do wysokich poziomów krążącego estradiolu, testosteronu i hormonu luteinizującego prowadziła do zmniejszenia ruchliwości plemników [133].

BPA działa jako antagonist receptorów hormonów tarczycy (TR), hamując aktywność transkrypcyjną stymulowaną przez hormon tarczycy T3 (trójjodotyroninę) [134,135]. BPA już w tak niskich dawkach jak 10^{-9} mol/l wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w syntezę hormonów tarczycy [136]. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że BPA może wywierać działanie antagonistyczne względem hormonów tarczycy, szczególnie względem receptorów dla hormonów tarczycy typu β niezależnie od swoich estrogenowych efektów podwyższających poziomy T4 w surowicy [137]. Podobnie, wyższe poziomy BPA w ludzkim moczu towarzyszące zwiększonym stężeniom trójjodotyroniny potwierdziły jego antagonistyczny charakter do receptorów dla hormonów tarczycy. Obniżone poziomy tyreotropiny (TSH) świadczą o blokowaniu wydzielania tego hormonu w przysadce mózgowej [138]. Ponadto korelacja wzrostu stężenia BPA w moczu ciężarnych kobiet z niskim poziomem tyreotropiny w surowicy pępowinowej noworodków jedynie płci żeńskiej potwierdziła związek między ekspozycją na BPA i zmienionymi poziomami hormonów tarczycy [139].

BPA wykazuje działanie antagonistyczne względem receptorów androgenowych [140], zaburzając normalny rozwój i funkcjonowanie męskiego układu rozrodczego. BPA zależnie od dawki tłumi aktywność transkrypcji indukowanej przez 5α -dihydrokortykosteron (DHT) [141]. Z kolei jako agonista receptorów dla kortykosteroidów, wywołuje efekty biologiczne podobne do tych hormonów [142]. Dlatego BPA jest także promotorem adipogenezy i może mieć związek z występowaniem otyłości i cukrzycy [143].

Wpływ BPA na ludzkie płodowe fibroblasty płuc został skrupulatnie oceniony. Wyniki wykazały niekorzystny wpływ BPA na zdrowe płuca płodu i rozwój dróg oddechowych spowodowany wysokim stężeniem BPA w pokarmie matki. Chociaż wyniki badań toksyczności czasami są sprzeczne lub trudne do korelowania z modelami zwierzęcymi, to BPA przyczynia się do prenatalnego i pourodzeniowego rozwoju astmy. Ponadto BPA może być związany z cukrzycą, otyłością, rakiem, chorobami układu krążenia i nerek [144].

BPAF w porównaniu z BPA okazał się bardziej toksyczny dla organizmów wodnych *Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Desmodesmus subspicatus* oraz szczurów [145]. Po podaniu doustnym u gryzoni, BPAF kumulował się w surowicy i innych tkankach z najwyższymi stężeniami w nerkach, wątrobie i tkance tłuszczowej [146]. BPAF wiąże się mocniej od BPA z receptorami estrogenowymi, co może prowadzić do niekorzystnych zmian rozwojowych i rozrodczych [147]. BPAF po podaniu doustnym szczurom powodował wzrost poziomu hormonu luteinizującego i folikulotropowego oraz hamowanie syntezy testosteronu [148].

Ponadto BPAF przejawia zdolność skracania życia erytrocytów w mechanizmie zjawiska eryptozy [149] i neurotoksyczność.

U ludzi, BPF wykryto w moczu w stężeniach i z częstotliwością porównywalną do BPA [150]. Badania *in vitro* wykazały, że BPF był cytotoksyczny, genotoksyczny, estrogeny i androgeny [151,152]. Co więcej, wykazywał takie efekty *in vitro*, jak uszkodzenie DNA, chromosomalne aberracje i dysfunkcje komórkowe [153-157]. U szczurów, którym podawano BPF przez sondę dożołądkową, wzrastała masa tarczycy i zmieniały się stężenia hormonów tarczycy. Również obserwowano zmiany parametrów hematologicznych, ekspresji enzymów [158] i potencjalne niekorzystne skutki BPF i BPS w mózgu ssaków. BPA i BPS wpływały na 5 α -reduktazę, kluczowy enzym zaangażowany w neurosteroidogenezę, a także dotyczący genów związanych z dopaminą i serotoniną kory przedczołowej nieletnich samic szczurów [159].

Badania dotyczące ekspozycji *Danio rerio* na BPS wykazały, że ksenobiotyk ten zaburza wczesny rozwój ryby. Niski poziom ekspozycji na BPS powodował zaburzenia dojrzewania, płodności i ekspresji genów związanych z reprodukcją, prowadząc do przedwczesnego dojrzewania i nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu rozrodczego. Ponadto stwierdzono, że receptory hormonów tarczycy częściowo pośredniczą w działaniach stymulujących BPS i BPA na układ rozrodczy [160]. Inne badanie z *D. rerio* wykazało, że ekspozycja ryb na BPS spowodowała zwiększenie stosunku płci żeńskiej do męskiej, zmniejszenie masy ciała, długości, zmiany poziomów testosteronu, estradiolu i witellogeniny. Ponadto doszło do zmniejszenia produkcji jajeczek, wydłużenia czasu ich wyklucia, a także zmniejszenia liczby plemników [161]. U nicienia *C. elegans* zaobserwowano wzrost śmiertelności zarodkowej i spadek płodności [63,162]. Sugeruje się, że BPS może wpływać na adipogenezę, ponieważ jest w stanie indukować gromadzenie lipidów i różnicowanie w pierwotnych ludzkich preadipocytach [163]. Ponadto BPS, podobnie jak BPA, wykazuje najszersze spektrum efektów promujących tworzenie nowotworów w wyniku zakłócenia funkcji centrosomu i organizacji mikrotubuli [164].

3.3.5. Narażenie człowieka

BPA jest szeroko stosowany w życiu codziennym, więc narażenie na tę substancję może zachodzić drogą pokarmową, przezskórną czy wziewną. Głównymi źródłami ekspozycji na BPA są opakowania do żywności i zawarta w nich żywność, kurz, papier termiczny, materiały stomatologiczne, sprzęt medyczny oraz artykuły dla dzieci i niemowląt. Polimery wykonane z BPA mogą hydrolizować pod wpływem wysokich temperatur, kwasowego lub zasadowego

pH, powodując jego przedostawanie się do wody, pojemników do żywności czy butelek dla niemowląt [165, 166]. BPA może występować w świeżych produktach spożywczych, takich jak mleko, mięso czy jajka, jeśli zwierzęta są hodowane w zanieczyszczonym środowisku [167].

BPA jest używany w produkcji wewnętrznych stron puszek do żywności i zakrętek do słoików [168, 169], aby uniknąć bezpośredniego kontaktu żywności z metalem oraz zapewnić stabilność termiczną i wytrzymałość mechaniczną puszek [170]. Wewnętrzne pokrycia metalowych powierzchni stykających się z żywnością są przeważnie wykonane z żywicy epoksydowych. Około 9% BPA produkowanego rocznie stosuje się do wyścielenia takich opakowań [169]. Podgrzewanie tego typu puszek w celu przygotowania jedzenia lub sterylizacji może prowadzić do wydostawania się BPA z wewnętrznego pokrycia wykonanego z żywicy epoksydowej do zawartości puszek i zwiększa ryzyko spożycia BPA [171]. Najwyższe stężenie BPA zaobserwowano po ogrzewaniu produktu w temperaturze 121°C przez 90 minut, przy czym dla migracji BPA istotniejsza okazała się temperatura, niż czas trwania tego procesu [172]. Sterylizacja puszek z żywnością przyczynia się do migracji 80-100% wolnego BPA do zawartości puszek i zależy od warunków prowadzenia procesu i składników produktu [173]. W żywności o niższym pH i wyższej zawartości tłuszczu BPA występuje w wyższych stężeniach [174]. Zanieczyszczenie BPA może być spowodowane jego migracją do żywności przechowywanej w opakowaniach z tworzyw poliwęglanowych, w tym butelek dla dzieci i niemowląt [175].

BPA może trafiać do kurzu z paneli podłogowych, klejów zawierających żywice epoksydowe, farb i domowego sprzętu elektronicznego [176]. Substancję tę wykryto w 95% z 56 badanych próbek kurzu, w stężeniach pomiędzy < 0,5 do 10 200 ng/g (średnia: 843 ng/g) [177]. Ekspozycję z kurzu szacuje się na mniej niż 5% całkowitej ekspozycji na BPA [178]. Narażenie wynikające z zanieczyszczonego powietrza jest mniejsze niż 0,4 ng/kg masy ciała na dzień u dorosłych, a u niemowląt szacuje się na 5,3 ng/kg masy ciała na dzień [177].

Materiały dentystyczne zawierają BPA, zwłaszcza w formie bis-GMA (bisfenol A - metakrylan glicydyli). Ta substancja jest często uwalniana z wypełnień i materiałów używanych do odbudowy korony zęba [179]. Najwyższe stężenie BPA oznaczono w ślinie pacjenta zaraz po wykonaniu wypełnienia. Jednakże nie można wykluczać stałego narażenia na małe dawki BPA uwalnianego się z materiałów dentystycznych przez dłuższy czas [180]. Po rekonstrukcji korony zęba stwierdzono uwalnianie się aż 13 mg do 30 mg BPA na dzień, co wskazuje na duże narażenie tym związkami w wyniku leczenia stomatologicznego [167].

Niewielkie ilości BPA (0,3-0,35 mg) mogą uwalniać się z różnych sprzętów medycznych, zawierających poliwęglany lub plastyfikatory polisulfonowe, takie jak: szkła kontaktowe, sondy, inhalatory, dożylnie kaniule, cewniki, inkubatory lub aparaty do hemodializy [166,181,182].

BPA jest używany w produkcji papieru do termicznego nadruku w kasach i terminalach kart płatniczych. Narażenie na BPA z papieru termicznego wynika z bezpośredniego kontaktu niemytych rąk z jedzeniem lub ustami oraz przez skórę. Wyniki badań pokazują, że u kasjerów mających dłuższy kontakt z takimi wydrukami zmierzono wyższe stężenia w moczu w porównaniu z ogólną populacją. Stężenie BPA wynosiło 3,54 µg/l w próbkach kontrolnych, a 8,92 µg/l w próbkach moczu kasjerów [183].

Ogólna ekspozycja na BPA migrujący z papieru termicznego zależy od częstotliwości i czasu używania takich druków oraz czystości rąk. Narażenie zawodowe kasjera po 10 godzinach pracy oszacowano na 71 mg na dzień, podczas gdy w ogólnej populacji szacuje się je na 7,1 mg do 42,6 mg na dzień [184]. Choć nieznana jest szybkość penetracji BPA przez skórę, to badanie ochotników narażonych na częsty kontakt z rachunkami na papierze termicznym udowodniło znaczny wzrost wolnego BPA w surowicy u tych osób [185].

Długoterminowa ekspozycja może wynikać z kontaktu z zabawkami i innymi artykułami przeznaczonymi dla małych dzieci i niemowląt, takich jak smoczki i gryzaki, które są wkładane do ust na kilka godzin dziennie. W ślinie pobranej z grzechotek oznaczono po 24 godzinnym kontakcie stężenie BPA na poziomie od 0,14 do 2,1 mg/l, a ze smoczków od 0,11 do 14 mg/l [62].

W przypadku obecności BPA w powietrzu badano powietrze zewnętrzne i powietrze wewnątrz mieszkań, miejsc pracy w biurach oraz fabrykach tworzyw sztucznych stanowiących narażenie zawodowe. Najwyższe stężenia BPA w powietrzu wewnątrz budynków odnotowano w fabrykach żywic w Chinach (>50 000 ng/m³), podczas gdy niższe ilości (<100 ng/m³) wykryto w biurach i budynkach mieszkalnych [186]. Fu i Kawamura [187] badali atmosferyczne stężenie BPA w wielu lokalizacjach. W miejskich obszarach Indii, Chin, Japonii, Nowej Zelandii i Stanów Zjednoczonych, poziomy BPA były w zakresie 0,004 do 17 ng/m³, podczas gdy w wiejskich obszarach Chin i Niemiec wynosiły od 0,005 do 0,2 ng/m³ [187].

Naukowcy są zgodni, że główną drogą narażenia ludzi jest spożycie produktów z konserw. Carwile i wsp. zaobserwowali wzrost stężenia BPA w moczu o 1200% po spożyciu jednej porcji konserwy zupy w porównaniu ze świeżą żywnością w okresie 5 dni [188]. Eliminacja potraw w puszkach z diety znacznie zmniejsza stężenie BPA

w moczu [189]. Hoekstra i Simoneau [190] doszli do wniosku, że czas kontaktu, temperatura i pH są głównymi wyznacznikami migracji BPA do żywności. W przypadku dzieci szacunkowy zakres narażenia wynosi od 0,01 do 13 mg/kg/dzień, przy czym najwyższe wartości dotyczą dzieci karmionych butelką. Dla dorosłych najwyższa szacunkowa ekspozycja wynosiła 4,2 mg/kg/dzień [166].

Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) zastosował wysokie marginesy bezpieczeństwa w ustalaniu poziomu bezpieczeństwa bisfenolu A, tzw. dopuszczalnego dziennego spożycia (TDI). Po uwzględnieniu współczynnika bezpieczeństwa 150 dla potencjalnych niepewności ustalono wartość TDI na poziomie 4 µg/kg masy ciała/dzień. Dla osoby o masie 60 kg ten współczynnik TDI odpowiada bezpiecznemu dziennemu spożyciu 240 µg trwającemu przez całe życie, a za typowe dzienne spożycie dla takiej osoby przyjmuje się 8 µg [191].

BPS występuje w produktach do pielęgnacji ciała [192], artykułach spożywczych (napoje, produkty mleczne, ryby i owoce morza, zboża, mięso i produkty mięsne oraz owoce w puszkach i warzywa) [193,175], kurzu wewnątrz pomieszczeń [194], wodach rzecznych, ściekach, osadach i szlamie, co wskazuje na źródła narażenia tą substancją w środowisku [195-197]. BPS w stężeniach od kilku ng/g do kilku mg/g wykryto w paragonach termicznych zebranych z różnych miast USA, Korei, Wietnamu i Japonii. Szacunkowa dzienna absorpcja przez skórę wynosi 0,00418 mg/kg mc/dzień dla ogólnej populacji i 0,312 mg/kg mc/dzień w przypadku osób narażonych zawodowo [198].

Pozostałości BPF znaleziono w produktach spożywczych pakowanych w pojemniki z powłokami epoksydowymi, takimi jak eter glicydyłowy Novolak (NOGE), a także w wodzie pitnej wypompowywanej z rur, do których renowacji zastosowano żywice epoksydowe na bazie eteru diglicydyłowego bisfenolu F (BFDGE) [199,200]. Ponadto BPF został zarejestrowany jako dominujące zanieczyszczenie z grupy bisfenoli w produktach żywnościowych (warzywa, ryby i owoce morza, produkty mięsne, napoje itp.) stanowiące 17% całkowitego stężenia bisfenoli [193,201,202]. BPF był także wykrywany w kurzu pomieszczeń [194] oraz w produktach higieny osobistej [192]. Wydostawanie się BPF z powłok i produktów konsumpcyjnych do powietrza prowadzi do codziennej ekspozycji ludzi. Stąd BPF wykryto w 55% próbkach moczu zebranych między 2009 a 2012 o medianie stężenia 0,08 mg/l [150,203]. Żywice epoksydowe na bazie BPF są podejrzewane o wywoływanie kontaktowego zapalenia skóry [204,205]. Z uwagi na obecność BPF na różnych poziomach w wodach powierzchniowych, ściekach, osadach, szlamie, gnojowicy, wodzie kompostowej, komunalnych odciekach ze składowisk, można uznać go za

zanieczyszczenie środowiska [196, 197, 206-210]. Stwierdzono ponadto dominujący udział tego bisfenolu w szlamie z oczyszczalni ścieków [211]. Z kolei BPAF wykryto w ludzkim moczu [203], w 76% przypadków w próbkach kurzu z wnętrza [194], wodach powierzchniowych (wodzie rzecznej, ściekach) i próbkach stałych (osad, szlam) [196,197,212].

3.3.6. Kwestie legislacyjne BPA

W przepisach Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej zamieszczono wytyczne na temat ograniczeń stosowania BPA [213]. Mają one związek z obecnością tej substancji w tworzywach sztucznych mających bezpośredni kontakt z żywnością lub w butelkach do karmienia niemowląt. Przepis 321/2011 zakazywał obecności BPA w poliwęglanowych butelkach do karmienia niemowląt. W kolejnej regulacji 10/2011 ustalono specyficzny limit migracji BPA 0,6 mg/kg dla tworzyw mających kontakt z żywnością, a najnowszy przepis zaostrzył ten limit do 0,05 mg/kg i rozszerzył zakaz stosowania BPA w butelkach dla niemowląt o poliwęglanowe kubeczki do picia dla małych dzieci. Ustalono też specyficzny limit migracji BPA (0,05 mg/kg) z lakierów i powłok. W najnowszej ocenie, Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności stwierdził, że BPA [214] nie stanowi ryzyka zdrowotnego w obecnie spotykanych stężeniach dla konsumentów w dowolnej grupie wiekowej (w tym dla nienarodzonych dzieci, niemowląt i młodzieży).

W latach 2003-2004 [215] w Stanach Zjednoczonych Centra Kontroli i Zapobiegania Chorobom przeprowadziły ankiety, w których okazało się, że w 2517 próbkach moczu 93% Amerykanów w wieku od 6 lat znaleziono wykrywalne poziomy BPA. Inny powód do niepokoju stanowią raporty z badań laboratoryjnych na zwierzętach o niewielkich zmianach rozwojowych u płodów i nowonarodzonych zwierząt, które były ekspozowane na BPA. W 2008 roku Narodowy Program Toksykologiczny (NTP) w oparciu o zebraną literaturę naukową dokonał oceny możliwych efektów BPA na rozwój i reprodukcję człowieka. W opublikowanym raporcie wyciągnięto wnioski, że należy poświęcić uwagę badaniom wpływu BPA na mózg, zachowanie i gruczoł prostaty u płodów, noworodków i dzieci przy obecnych poziomach ekspozycji BPA. FDA zakazała w 2012 użycia poliwęglanów w butelkach dla dzieci.

W latach 2013-2014 w badaniach NTP oraz Narodowego Instytutu Bezpieczeństwa i Zdrowia Zawodowego (*National Institute for Occupational Safety and Health*, NIOSH) u 78 osób narażonych na BPA w miejscu pracy wykryto w próbkach moczu stężenia 70 razy

wyższe niż średnio u dorosłych. Dominującą drogą ekspozycji była droga inhalacyjna i przeskórna. FDA w raporcie bezpieczeństwa przyjęła punkt widzenia NTP, chociaż uznaje BPA jako bezpieczny na obecnych poziomach w żywności. Jednak, żeby dokładnie zbadać wpływ narażenia na BPA i uzyskać wyniki badań do podjęcia decyzji prawnych Narodowy Instytut Nauk Zdrowia Środowiskowego (*National Institute of Environmental Health Sciences*, NIEHS), NTP i FDA powołały program badawczy zwany Konsorcjum Łączącym Informacje Naukowe i Prawne na temat toksyczności BPA (CLARITY-BPA). Program ten objął część podstawową - dwuletnie badania potencjalnej toksyczności BPA u szczurów wg federalnych przepisów i wytycznych ustawowych dotyczących badań toksyczności oraz część dodatkową prowadzoną przez naukowców akademickich, badających m.in. wpływy genetyczne, choroby układu krążenia, otyłość i zachowania.

3.4. BISFENOLE W ŚRODOWISKU

3.4.1. Występowanie w wodach powierzchniowych i osadach dennych, wodzie pitnej i ściekach

Bisfenol A zaczęto wykrywać w wodzie pod koniec lat 90-tych. Opierając się na danych dostępnych z Europy, Ameryki Północnej i Azji zaobserwowano, że stężenia wahały się w ściekach od niewykrywalnych do 370 mg/l, a w większości przypadków występowały na poziomie niższym niż 5 mg/l [186]. Natomiast w wodach powierzchniowych stężenia BPA kształtowały się w przedziale od niewykrywalnych do 56 mg/l. W Morzu Bałtyckim próbki wód powierzchniowych zawierały najwyższe stężenia BPA (193 ng/l), w porównaniu z niewiele niższymi obserwacjami (39 ng/l) dla wód podpowierzchniowych i warstw głębszych [216]. Nieco niższe poziomy BPA zbadano dla 291 próbek wody z kranu [217] ze średnim poziomem 14 ng/l i maksymalnym 1,3 mg/l. BPA stanowi powszechne zanieczyszczenie osadów ściekowych w ilościach oscylujących pomiędzy 10 mg/kg suchej masy dla większości osadów ze ścieków komunalnych do ponad 100 000 mg/kg suchej masy w przypadku osadów z wód pochodzących z zakładów, które oczyszczają bardziej zanieczyszczone ścieki [218]. BPA jest także obecny w glebie w szerokim zakresie stężeń (<0,01-1000 mg/kg) i może pochodzić z osadów ściekowych [219,220], odcieków ze składowisk śmieci [221], utylizacji i recyklingu odpadów elektronicznych [222]. Gdy BPA trafia do gleby, względnie utrzymuje się tam z uwagi na wysoki współczynnik podziału gleba-woda (od 314 do 1524) [221], może tworzyć w ciągu trzech dni nieusuwalne pozostałości. Sorpcja do gleby i osadów zależy od stężeń substancji organicznych i wielkości cząstek [223]. Jonizacja BPA może wystąpić w skrajnych przypadkach w glebie, jeśli

wartości pH zbliżają się do pKa [224], co może skutkować przesiąkaniem do wód gruntowych. Los, transport i biodostępność anionu bisfenolanu lub nieusuwalne pozostałości w glebie BPA nie zostały dokładnie zbadane. Stężenia BPA wykrywane w osadach są różne i zależne od ilości tego związku w ściekach komunalnych i przemysłowych. Stężenia między 100 a 1000 mg/kg suchej masy były powszechnie raportowane w dolnych nurtach wód w gęsto zaludnionych obszarach miejskich, przy oczyszczalniach ścieków i w rejonach przemysłowych [225, 226].

Bisfenol A charakteryzuje się pKa wynoszącym $10,29 \pm 0,69$, co powoduje zwiększoną sorpcję przy niższych wartościach pH i wyższą rozpuszczalność lub desorpcję przy wartościach pH bliskich pKa. Przy niższych wartościach pH ($\text{pH} < 7$) zachodzi wysalanie BPA, dzięki czemu wzrasta siła jonowa i sorpcja do osadów [224, 227], podczas, gdy odwrotne zjawisko występuje przy pH bliższym pKa np. $\text{pH} = 8$ [228]. Na morskich terenach Pacyfiku, Atlantyku i Oceanu Indyjskiego wykrywano BPA w stężeniach między 0,001 a 0,03 ng/m^3 , z najwyższymi poziomami w miejskich regionach wybrzeży. Ponadto w próbkach aerozoli zebranych z regionów polarnych stężenie BPA mieściło się w zakresie od 0,001 do 0,017 ng/m^3 . Chociaż BPA jest związkiem syntetycznym i najwyższych stężeń należy spodziewać się na obszarach miejskich, to jest on również obecny w odległych częściach globu.

W oznaczeniach bisfenoli w jeziorze Taihu w Chinach zidentyfikowano BPA, BPS i BPAF w każdej próbce. Spośród dziewięciu analogów bisfenolowych te trzy wspomniane dominowały i stanowiły 93,2%. Stężenia całkowite związków bisfenolowych mieściły się w zakresie od 49,7 do 3480 ng/l , ze średnią wartością 389 ng/l [229]. Z kolei stężenia BPF w próbkach wody z rzeki i morza pobranych w Japonii, Korei i Chinach, były wyższe od stężeń BPA i BPS. Przekraczały one 1000 ng/l w kilku badanych miejscach, np. dochodziły aż do 2850 ng/l w tokijskiej rzece Tamagawie [230]. Z kolei Lee i wsp. zaobserwowali, że w osadach z domowych oczyszczalni ścieków występowały podwyższone poziomy BPF, a BPA dominował w osadach z oczyszczalni ścieków przemysłowych [211].

3.4.2. Występowanie w ludzkich płynach ustrojowych

Obecność BPA w moczu, surowicy, osoczu, a także mleku kobiecym jest wykorzystywana do tzw. biomonitoringu tego związku [231]. Ponieważ BPA jest szybko i prawie całkowicie wydalany z moczem w postaci koniugatów, mocz jest matrycą z wyboru do prowadzenia oznaczania tego ksenobiotyku [166]. Długoterminowe codzienne spożycie BPA prowadzi do ustabilizowanych stężeń BPA w zakresie ng/ml w próbkach biologicznych [232].

Stężenia całkowitego (wolnego i sprzężonego) BPA w moczu często były używane do oceny ekspozycji na BPA ze wszystkich źródeł narażenia [233]. Ze względów praktycznych badania moczu na ogół bazują na próbkach z pojedynczych punktów czasowych, a nie próbkach zbieranych w ciągu 24 godzin. Z powodu krótkiego okresu półtrwania BPA stężenia związku w próbce odzwierciedlają przede wszystkim ekspozycję z relatywnie krótkiego okresu przed pobraniem moczu [234]. Wyniki badań, dotyczących monitoringu obecności BPA w moczu, prowadzonych w Ameryce Północnej, Azji i Europie ujawniły powszechne narażenie na ten związek. W badaniach obejmujących 2514 uczestników z USA i 5476 z Kanady wykazano wszechobecną ekspozycję na BPA z częstotliwością wykrywania ponad 90% w grupie badanych w każdym kraju [235,236]. Również w siedmiu krajach azjatyckich wykryto BPA w 94% próbek [237]. W badaniu amerykańskim najwyższe stężenia w moczu wykryto u młodzieży (12-19 lat), następnie u dzieci (6-11 lat) i dorosłych (> 19 lat). Po przeliczeniu BPA w μg na g kreatyniny, u dzieci stwierdzono najwyższy poziom stężenia BPA, a następnie w grupie młodzieży i dorosłych [236]. Również w badaniu kanadyjskim [235] poziomy BPA w przeliczeniu na kreatyninę były wyższe w najmłodszej kategorii wiekowej (6-11 lat), niż w pozostałych kategoriach wiekowych. Wyniki niemieckich badań środowiskowych pokazały wyższe stężenia BPA u dzieci w wieku 3-5 lat niż 6-14 lat [233,238], a także wskazywały na fakt największego narażenia małych dzieci na BPA.

Bardzo ciekawe badanie dokumentujące mierzalne poziomy BPA w moczu kobiet z Meksyku dostarczyło wstępnych dowodów na to, że kobiety w ciąży, które urodziły dziecko przed terminem (<37 tygodnia ciąży) miały wyższe stężenie BPA od kobiet, które urodziły po 37 tygodniu [239].

Oznaczanie BPA we krwi jest dużo bardziej skomplikowane, a uzyskane wyniki są bardzo rozbieżne. Wg Völkela [231] badania dotyczące oznaczania BPA w próbkach krwi wydają się wątpliwe, gdyż autorzy walidujący czułe metody obserwowali różne poziomy zanieczyszczenia próbek, których nie oznaczyli ilościowo przy wolnym BPA. Inna grupa badawcza w 2016 roku [240] oznaczyła BPA w niektórych próbkach osocza na poziomie 0,25-0,51 ng/ml, ale nie wykazała związku jego obecności w osoczu z obecnością w próbkach moczu tych samych dawców. W badaniu Schönfeldera [241] i współpracowników dotyczącym zawartości BPA w osoczu ciężarnych kobiet i osoczu pępowinowym uzyskano zakres stężenia od 0,3 do 18,9 ng/ml w osoczu matek, od 0,2 do 9,2 ng/ml w osoczu płodu, aż do 104 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w tkance łożyska. Wyniki te mogły być zawyżone z powodu braku wzorca znakowanego izotopowo, ewentualności zastosowania przy porodzie materiału infuzyjnego zawierającego BPA i niejasności, czy w metodzie oznaczano wolny BPA, czy całkowity po

hydrolizie. Wg sugestii Völkela [231] zmienność wyników można wyjaśnić efektem matrycy, wydajnością derywatywacji lub bardzo niską granicą wykrywalności. W badaniach Arisa [242] dotyczących oznaczenia stężeń BPA u 61 ciężarnych kobiet, ich noworodków i 26 zdrowych kobiet we wschodniej Kanadzie, próbowano korelować zależności między obecnością BPA we krwi matki i płodu, a obecnością tego ksenobiotyku we krwi obwodowej i w płynie otrzewnowym kobiet nieciążarnych. U kobiet ciężarnych zawartość BPA w osoczu kształtowała się od poziomu niewykrywalnego do 4,46 ng/ml i u noworodków od niewykrywalnego do 4,60 ng/ml. Typowa zawartość BPA w osoczu kobiet mieściła się w zakresie od 1,30 do 8,17 ng/ml i od 0,19 do 13,45 ng/ml w płynie otrzewnowym.

Lee i wsp. [243] zmierzili poziomy BPA w moczu i surowicy matek, łożysku, mleku kobiecym, surowicy pępowinowej i moczu noworodków, celem oceny dystrybucji BPA u kobiet w ciąży i ich płodów. Zebrali próbki od 318 kobiet i ich dzieci z 6 szpitali klinicznych w Korei. BPA wykryto w 79,5–100% próbek pochodzących od matek i noworodków. Zgodnie z ich badaniami mediana stężenia BPA w próbkach malała w następującej kolejności: mocz noworodków (4,75 ng/ml), mocz matek (2,86 ng/ml), surowica pępowinowa (1,71 ng/ml), surowica matki (1,56 ng/ml), mleko matki (0,74 ng/ml) i łożysko (0,53 ng/g). W badaniach dotyczących ilości BPA w mleku kobiecym Mendonca i wsp. [244] stwierdzili średnie stężenie analitu 0,8 µg/l, które okazało się porównywalne z innymi wartościami literaturowymi, z wyjątkiem średniego stężenia BPA uzyskanego przez koreańskich naukowców. Wyniki oznaczeń BPA w mleku kobiecym zestawiono w **Tabeli 6**.

Tab. 6. Przegląd zawartości BPA w mleku kobiecym

Całkowity BPA	Wolny BPA	Kraj zamieszkania badanej populacji kobiet	Ilość próbek	Źródło
Średnia: 0,61 µg/l Mediana: 0,61 µg/l	-	Japonia	23	[247]
Średnia: 1,9 µg/l Mediana: 1,1 µg/l	Średnia: 1,3 µg/l Mediana: 0,4 µg/l	Stany Zjednoczone	20	[69]
Średnia: 3,41 µg/l	-	Japonia	101	[248]
Mediana: 10,4 µg/l	Mediana: 6,6 µg/l	Korea	100	[249]
Średnia: 0,8 µg/l Mediana: 0,8 µg/l	Średnia: 0,4 µg/l Mediana: <LOD	Stany Zjednoczone	23	[244]
-	Średnia: 3,13 µg/l Mediana: 0,68 µg/l	Stany Zjednoczone	21	[250]

Niewiele jest doniesień na temat oceny stężenia analogów BPA w płynach ustrojowych. BPS wykryto [56] w większości próbek moczu uzyskanych od osób z USA i siedmiu krajów azjatyckich, aż w 81% ze średnią pozwalającą oszacować dzienne spożycie w wysokości 0,93 mg/dzień. Najwyższe dzienne spożycie uzyskano w Japonii, a następnie USA [245]. W innym badaniu wykryto BPS w 78% próbek moczu w USA [150]. Wskaźnik wykrywania BPS w ludzkich matrycach był aż 81% w moczu i 3% w mleku matki [246].

3.5. METODY EKSTRAKCJI

W analityce próbek środowiskowych i biologicznych, w których ksenobiotyki występują w śladowych ilościach, kluczowe jest prawidłowe przygotowanie próbki, co wiąże się z doбором odpowiedniej techniki ekstrakcji. Metody ekstrakcyjne mają w tym względzie istotne znaczenie. Pozwalają na wyizolowanie oznaczanych analitów z próbki, czyli matrycy pierwotnej, poprzez przeniesienie ich do matrycy wtórnej o prostszym i znanym składzie. Ponadto dzięki wzbogacaniu analitów zwiększają się do poziomu przekraczającego granicę oznaczalności stosowanej metody. Przygotowanie próbek służy również ich oczyszczeniu z substancji przeszkadzających, celem zminimalizowania ich wpływu na końcowy wynik [251].

Wybór techniki ekstrakcji zależy od wielu czynników, takich jak pochodzenie biologiczne, środowiskowe czy komercyjne próbki, właściwości fizykochemicznych substancji ekstrahowanych oraz matrycy, a także końcowego celu stosowanego procesu [252].

W zależności od potrzeb można stosować różne metody ekstrakcji, np. takie jak: ekstrakcja do fazy stałej, mikroekstrakcja do fazy stałej, dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz, QuEChERS, ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa, ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym, mikroekstrakcja do pojedynczej kropli, ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego.

3.5.1. Ekstrakcja do fazy stałej

Ekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Extraction, SPE*) jest prawdopodobnie najpopularniejszą techniką wydzielania analitów. Została ona po raz pierwszy zastosowana w USA w 1949 roku, a jej gwałtowny rozwój nastąpił w latach 90 tych XX wieku [253]. Jest ona powszechnie używana z uwagi na prostotę, szybkość i niewysokie koszty. W porównaniu z ekstrakcją ciecz-ciecz pozwala na zmniejszenie czasu analizy i objętości używanych rozpuszczalników, a co za tym idzie redukcję szkodliwych odpadów. Dzięki możliwości znacznego wzbogacenia SPE pozwala na opracowanie metod analitycznych o wysokiej

czułości. Technika ta stwarza możliwość przechowywania analitów wzbogaconych na stałym sorbencie (anality na sorbencie mogą być transportowane i przechowywane, co pozwala na przeprowadzenie analizy w odpowiednim czasie i warunkach). Ekstrakcja SPE umożliwia izolację analitów o średniej i niskiej lotności, a tworzenie emulsji nie stanowi problemu. Wadą tej techniki jest możliwość niskich odzysków z powodu interakcji pomiędzy sorbentem i matrycą próbki lub przekroczenie krytycznej objętości. Czasami odtwarzalność jest niska na skutek różnic między seriami sorbentów. Złoże sorbentu może również zostać zablokowane przez cząstki materii zawieszonych w próbce [254].

Technika SPE umożliwia izolację analitów w układzie ciecz – ciało stałe, wykorzystując zjawisko podziału analitu i jego adsorpcję na stałym sorbencie. W technice tej stosuje się różne adsorbenty np. żel krzemionkowy, krzemionkę modyfikowaną grupami alkilowymi (np. C-18), różne modyfikacje polimeru diwinylobenzenu (DVB), polimery z odwzorowaniem molekularnym. Sorbentem o największym znaczeniu w technice SPE jest krzemionka. Jej modyfikacja przez zastąpienie wolnych, powierzchniowych grup silanolowych grupą cyjanową (-CN), aminową (-NH₂) czy diolową (-CHOHCH₂OH) osłabia oddziaływanie silnie polarnych związków z krzemionką i umożliwia ich ekstrakcję. Z kolei zastąpienie grup silanolowych grupami oktylowymi (C-8), oktadecylowymi (C-18) czy alkilofenyłowymi (R-C₆H₅) nadaje krzemionce cechy sorbentu niepolarnego i prowadzi do powstania silnych, odwracalnych oddziaływań niepolarnych lub słabo polarnych substancji z krzemionką, umożliwiając ekstrakcję analitów z polarnego rozpuszczalnika. Po kondycjonowaniu sorbentu odpowiednim rozpuszczalnikiem, analizowaną próbkę przepuszcza się przez kolumnę. Anality są wówczas zatrzymywane na powierzchni sorbentu. Następnym krokiem w procedurze SPE jest ich odzyskanie, najczęściej przez wymycie rozpuszczalnikami organicznymi, takimi jak np. metanol, acetonitryl, aceton, izopropanol, dichlorometan, pentan. Przed analizą próbki są zatężane.

Ekstrakcja do fazy stałej składa się z kilku niezbędnych etapów:

- a) zwilżanie i kondycjonowanie – aktywacja złoża przed zadowaniem próbki,
- b) naniesienie na kolumnę próbki i jej przepływ wskutek podciśnienia,
- c) przemycie złoża i suszenie strumieniem powietrza,
- d) elucja – wymycie zatrzymanych na złożu analitów małą porcją odpowiedniego rozpuszczalnika [252].

SPE jest łatwo łączona z takimi technikami instrumentalnymi jak: GC, GC-MS, HPLC i LC-MS. Zastosowanie techniki SPE umożliwia oznaczenie podczas jednej ekstrakcji nawet 60 ksenobiotyków o działaniu zaburzającym układ endokryny [255]. Istnieje bardzo szeroki

zakres substancji, które można ekstrahować za pomocą SPE. Są to pestycydy [256], 17β -estradiol, 17α -etynyloestradiol i bisfenol A [257, 258], estriol, estron, progesteron, mestranol, dietylostilbestrol i fenole, takie jak liniowy 4-nonylofenol, 4-*tert*-oktylofenol [258]. Gosetti i wsp. zastosowali tę technikę ekstrakcji do oznaczania 25 ksenobiotyków o działaniu zaburzającym układ endokryny (m.in. bisfenoli, alkilofenoli, ftalanów i parabenów), które pochodziły z urządzeń medycznych [259]. Z kolei hiszpańscy naukowcy oznaczali z użyciem SPE parabeny, alkilofenole, fenylofenole, BPA i triklosan w wodzie pitnej, rzecznej, ze studni, stawu, basenu i ścieków [260] oraz w ludzkim moczu [261, 262], krwi i mleku kobiecym [262].

3.5.2. Dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz

Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (*Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction*, DLLME) polega na wstrzykiwaniu odpowiedniej mieszaniny rozpuszczalników ekstrakcyjnych i dyspergujących do wodnego roztworu próbki zawierającej anality. Ekstrahujący rozpuszczalnik ulega następnie rozproszeniu w wodnej próbce do małych kropelek, w których anality są wzbogacane, a następnie po odwirowaniu znajdują się w dolnej lub górnej fazie, która jest pobierana do ich oznaczania przy użyciu odpowiednich technik instrumentalnych [263]. Technika DLLME cechuje się łatwością stosowania, szybkością, niskimi kosztami, dużym odzyskiem, dużą wartością liczbową współczynnika wzbogacenia i przyjaznością dla środowiska, ze względu na małe ilości odczynników stosowanych do ekstrakcji. DLLME ma również swoje wady, które wynikają głównie z wymagań związanych z rozpuszczalnikiem ekstrahującym i rozpuszczalnikiem dyspergującym. Rozpuszczalnik ekstrahujący musi charakteryzować się zdolnością do ekstrakcji analitu, odpowiednio niską rozpuszczalnością w fazie wodnej oraz musi być kompatybilny ze sprzętem analitycznym. Musi również spełniać specjalne wymagania procedury DLLME, a mianowicie mieć odpowiednią gęstość, celem prostego oddzielenia ekstraktu po odwirowaniu oraz tworzyć mętny roztwór w obecności rozpuszczalnika dyspergującego. Dlatego liczba rozpuszczalników do ekstrakcji dostępnych do stosowania w tym sposobie jest ograniczona, a wybór rozpuszczalnika ekstrahującego i jego toksyczność staje się zatem główną wadą metody. Z kolei odpowiedni rozpuszczalnik dyspergujący musi ulegać mieszanii z fazami wodną i organiczną w celu zapewnienia kontaktu pomiędzy dwoma fazami, co ułatwia ekstrakcję. Niemniej jednak rozpuszczalnik dyspergujący może skomplikować proces rozdzielania faz. Z tego powodu wirowanie - uważane za najbardziej czasochłonny etap - musi być stosowane w większości konwencjonalnych procedur DLLME [264]. Metoda ta ma

coraz szersze zastosowanie na etapie izolacji analitów z próbek środowiskowych i żywności. Jest stosowana do ekstrakcji pestycydów, związków z grup wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) i polichlorowanych bifenyli (PCB), jonów metali [265], parabenów [263,266], fenolowych EDC [267] i syntetycznych hormonów [268], bisfenoli, benzofenonów, triklokarbanu [266] i parabenów [269].

3.5.3. Mikroekstrakcja do fazy stałej

Mikroekstrakcja do fazy stałej (*Solid-Phase MicroExtraction*, SPME) jest techniką ekstrakcji cieszącą się zainteresowaniem naukowców ze względu na prostotę oraz możliwość jednoczesnego oczyszczania próbki i wzbogacania w niej analitów [256]. Technika ta pozwala na eliminację rozpuszczalnika i krótki czas analizy, jest stosunkowo tania i łatwa do automatyzacji [254]. Polega na sorpcji mikroilości związków organicznych w cienkiej, cylindrycznej warstwie fazy stacjonarnej, pokrywającej włókno szklane lub kwarcowe. Podstawę tej techniki stanowią strzykawki do mikroekstrakcji do fazy stałej. Włókno z naniesionym polimerowym sorbentem znajduje się w igle ze stali nierdzewnej i można je z niej wysuwać na czas adsorpcji lub desorpcji [252]. Niestety koszt włókien i ograniczony czas ich użytkowania stanowi mankament tej techniki. Niekorzystna jest także możliwość sorpcji zanieczyszczeń na włóknie przed analizą, co zaburza czułość ekstrakcji. Składniki próbki mogą ulec rozkładowi pod wpływem temperatury podczas desorpcji termicznej [270].

Ten rodzaj ekstrakcji stosuje się do izolacji różnych EDC, w tym fenoli (na przykład 4-*tert*-butylofenolu, 4-*tert*-oktylofenolu) [271], pozostałości pestycydów [256], chlorofenoli, androsteronu, DHT, 19-noretyndronu, trichlorosilanu i BPA [272], N-nitrozoamin [273], substancji zapachowych z kosmetyków [274,275]. Technikę tę można stosować w połączeniu z każdym chromatografem gazowym [252].

3.5.4. QuEChERS

Pierwotnie technikę QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) opracowano w 2003 roku do oznaczeń pozostałości pestycydów w owocach i warzywach, ale szybko zyskała popularność w izolowaniu analitów z różnych matryc – środowiskowych, biologicznych czy żywności. Od tego czasu opracowywano wiele metod analitycznych, jednakże tylko wspomniana technika stwarza możliwości jednoczesnego uzyskania wielu wysokiej jakości wyników dla szerokiej gamy pestycydów [276].

Technika QuEChERS polega na wstrząsaniu próbki wody z acetonitrylem oraz dodatkiem MgSO₄ i NaCl. Anality są ekstrahowane do fazy organicznej i oczyszczone

metodą d-SPE. Ta metoda okazała się szybsza niż standardowa SPE i pozwoliła na usuwanie niektórych elementów polarnej matrycy [256]. Do substancji zaburzających gospodarkę hormonalną, które mogą być ekstrahowane przy użyciu tej metody należą także bisfenol A i parabeny, oznaczane np. w rybach z hiszpańskich rzek [277] oraz w próbkach mleka krowiego [278], kobiecego [279-281] i przetworach mlecznych [282].

Procedura QuEChERS ma wiele zalet w stosunku do większości tradycyjnych metod ekstrakcji. Są to wysokie odzyski (> 85%) osiągnięte dla związków z szerokiego zakresu polarności i lotności, bardzo dokładne wyniki uzyskiwane dzięki wewnętrznemu wzorcowi, niskie zużycie rozpuszczalników i mało odpadów, brak chlorowanych rozpuszczalników, odporność metody, niewysokie koszty reagentów i dość proste przygotowanie próbki [276].

3.5.5. Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli

Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (*Single Drop Microextraction, SDME*) posiada wiele zalet: zmniejsza zużycie rozpuszczalników organicznych, umożliwia oczyszczenie próbki i wyróżnia się wysokim współczynnikiem wzbogacenia, jest prosta i niedroga, nie wymaga specjalnej aparatury do wytwarzania kropli [283]. Technika ta ma niestety również pewne ograniczenia. Objętość kropli ekstrahenta jest mała, często nie większa niż 5 μ l, co ogranicza ilość ekstrahowanych analitów i wpływa na wydajność ekstrakcji. Kropla jest niestabilna i często odrywa się z końcówki igły mikrostrzykawki z powodu przedłużonego czasu ekstrakcji, szybkiego tempa mieszania i bardziej złożonej matrycy. Wybór ekstrahenta jest często trudny, ponieważ musi on spełniać pewne warunki, takie jak nie mieszać się z wodą i posiadać odpowiednią gęstość. Odtwarzalność SDME jest często słaba z powodu znacznego rozpuszczenia ekstrahenta organicznego, który ma małą objętość i dużą powierzchnię kontaktu z roztworem próbki. Ze względu na małą wielkość kropli rozpuszczalnika integracja SDME z instrumentami analitycznymi jest ograniczona [284].

Ocaña-González i wsp. [2] opisali technikę mikroekstrakcji do pojedynczej kropli na przykładzie oznaczania parabenów w wodnych produktach kosmetycznych [285]. W tej metodzie kroplę octanu heksylu pozostawiano w zawieszynie na końcu mikrostrzykawki i zanurzano w próbce poddawanej mieszaniu. Po ekstrakcji, kropla rozpuszczalnika organicznego została wycofana do mikrostrzykawki, a wyekstrahowane parabeny zderywatyzowano za pomocą N,O-bis(trimetylosililo)acetamidu przed nastrzyknięciem do chromatografu GC-MS. Zarówno do ekstrakcji, jak i derywatyzacji potrzebna jest bardzo niska objętość rozpuszczalnika organicznego, ze wskaźnikami wzbogacenia w zakresie 23-150. Jednakże, technika SDME powinna być stosowana do próbek rozcieńczonych,

przefiltrowanych, gdyż duża zawartość cząstek stałych destabilizowałaby kroplę rozpuszczalnika organicznego.

3.5.6. Ekstrakcja z ruchomym elementem sorpcyjnym

Ekstrakcję z ruchomym elementem sorpcyjnym (*Stir-Bar Sorptive Extraction*, SBSE) pokrytym polidimetylosiloksanem (PDMS) wprowadzono w 1999 roku jako bezrozpuszczalnikową metodę przygotowania próbek, która stała się popularną techniką analityczną do wstępnego wzbogacania związków organicznych. Technika ta jest szeroko stosowana w analizie środowiskowej, biomedycznej i żywności. Opiera się na dwuetapowej procedurze. Anality są początkowo adsorbowane na powierzchni mieszadła magnetycznego. W drugim etapie anality są desorbowane za pomocą rozpuszczalników organicznych (do oznaczania technikami GC i HPLC) lub poprzez desorpcję termiczną (do oznaczania techniką GC) [286]. Główne zalety SBSE wynikają z faktu, że technika ta jest łatwa do zastosowania i wysoce elastyczna. To samo urządzenie do SBSE można stosować do pobierania próbek w fazach gazowych, ciekłych, ale także do heterogenicznych próbek wodnych. Technika SBSE jest bardzo czuła, odporna, powtarzalna i odpowiednia dla próbek analitów o bardzo różnej strukturze chemicznej [287]. Z drugiej strony ruchomy element sorpcyjny nie może być poddawany bezpośredniej desorpcji w chromatografii gazowej niewyposażonym w urządzenie do desorpcji termicznej i analit musi być ponownie ekstrahowany do odpowiedniego rozpuszczalnika, co stanowi dodatkowy krok w ogólnej metodzie analitycznej. Ponadto czynności takie, jak wyjęcie ruchomego elementu sorpcyjnego, wypłukanie i osuszenie lub opcjonalnie desorpcja rozpuszczalnikiem są wykonywane ręcznie, co może prowadzić do błędów. Automatyzacja tych kroków powodowałaby wzrost kosztów i złożoności metody. Jednakże główne ograniczenie stanowi rodzaj powłoki ruchomego elementu sorpcyjnego, ponieważ liczba komercyjnie dostępnych powłok jest ograniczona. Odzysk polarnych analitów jest często niski, co wymaga wprowadzenia etapu derywatywacji *in situ* w celu zwiększenia wydajności ekstrakcji. Niezbędne jest zatem zaprojektowanie nowych elementów sorpcyjnych pokrytych materiałami o lepszym powinowactwie do związków polarnych, co poprawiłoby selektywność SBSE przy zachowaniu zdolności wzbogacania [286].

SBSE jest stosowana do oznaczania parabenów w kosmetykach [288] i w wielu matrycach środowiskowych – glebach, osadach [289] i wodach [290, 291]. Również bisfenole można oznaczać z zastosowaniem tej techniki. Cacho i wsp. [292] zastosowali ją do badania bisfenoli w napojach w puszkach i płynach obecnych w puszkach z warzywami. Metoda

wykorzystywała desorpcję termiczną i chromatografię gazową do oznaczania bisfenoli po derywatywacji do pochodnych arylowych.

3.6. METODY ANALIZY

Ze względu na bardzo niskie stężenia związków o działaniu zaburzającym układ endokryny w próbkach rzeczywistych oraz dużą złożoność matryc środowiskowych i biologicznych, po skutecznym doczyszczeniu próbek, kluczową rolę w oznaczeniu tych związków odgrywa dobór metody analitycznej o wysokiej czułości i selektywności [293]. Niezmiernie ważne jest zastosowanie odpowiedniej kolumny, fazy ruchomej i wybór stosownego detektora [294].

Bardzo często stosowaną techniką w oznaczaniu parabenów i bisfenoli jest chromatografia cieczowa [293,295], nadająca się bardziej dla związków mniej lotnych i o większej polarności niż chromatografia gazowa. Do analizy parabenów stosuje się kolumny z krzemionką modyfikowaną powierzchniowo zawierającą łańcuchy oktadecylowe lub oktylowe. Używa się kolumn o różnych średnicach, długościach i uziarnieniu wypełnienia krzemionkowego. Fazę ruchomą stanowią odpowiednio dobrane mieszaniny rozpuszczalników zapewniające rozdzielenie analitów na wybranej kolumnie. Chromatograf cieczowy wyposażony jest najczęściej w detektor absorpcji w nadfiolecie (tj. detektor UV lub DAD) lub też jest on sprzężony ze spektrometrem mas. Do oznaczania parabenów zastosowanie znalazł również detektor fluorescencyjny [6], charakteryzujący się wysoką czułością, ale nadający się jedynie do oznaczeń substancji wykazujących fluorescencję, a więc zdolnych po wzbudzeniu do oddawania energii w postaci światła o określonej długości fali [294]. Jego zaletą jest też stosunkowo duża selektywność, z uwagi na to, że większość związków nie wykazuje fluorescencji.

Za pomocą chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas możliwe jest wykonanie analizy o bardzo wysokiej czułości i selektywności, a także jednoczesne potwierdzenie tożsamości analitów przez porównanie ich widm mas z widmami substancji wzorcowych. W szczególności korzystne jest wykorzystanie tandemowego spektrometru mas pracującego w trybie monitorowania wybranych reakcji następczych (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) z uwagi na odrzucanie większości jonów przeszkadzających w analizie. Wadą detekcji z użyciem spektrometrów mas jest występujący często efekt matrycy przyczyniający się do wzmocnienia lub tłumienia niektórych jonów, np. w wyniku występowania reakcji pomiędzy analitami i substancjami obecnymi w matrycy.

Ponadto ogromny koszt spektrometrów mas stanowi nadal barierę dla ich szerszego upowszechnienia [295].

Wysokosprawna chromatografia cieczowa jest często stosowana w oznaczaniu związków zakłócających równowagę hormonalną. Przykładowo Zhou i wsp. opracowali metodę oznaczania BPA, 4-*n*-nonylofenolu i 4-*tert*-oktylofenolu w próbkach wody pochodzących z drenażów, ścieków, rzeki lub stopionego śniegu. Po przeprowadzeniu dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz w kontrolowanej temperaturze analizowali próbki z wykorzystaniem HPLC-FD, uzyskując wartości LOD od 0,23 do 0,48 µg/l [296]. Z kolei inna grupa chińskich badaczy [150] opracowała w pełni zautomatyzowaną metodę oznaczania BPA, BPF, BPS, 2,4- i 2,5-dichlorofenolu, 2,4,5- i 2,4,6-trichlorofenolu, o-fenylofenolu, benzofenonu, triklosanu, MP, EP, PB i BP w ludzkim moczu. W tej metodzie, po ekstrakcji próbek techniką SPE, przeprowadzano analizy metodą LC-MS/MS o wysokiej czułości i dokładności. Ye i wsp. [52] zastosowali system on-line SPE-LC-MS/MS do pomiaru stężeń pięciu parabenów (metylo-, etylo-, propylo-, butylo- i benzyloparabenu) w ludzkim mleku. W źródle spektrometru mas autorzy zjonizowali anality przez fotojonizację indukowaną ciągłą wiązką promieniowania ultrafioletowego w obecności toluenu. Granice wykrywalności dla większości analitów występowały poniżej 1 ng/ml przy wykorzystaniu próbek mleka o objętości zaledwie 100 µl. Metoda LC-MS/MS z chemiczną jonizacją pod ciśnieniem atmosferycznym została wykorzystana do oznaczania fenoli i parabenów w moczu, natomiast z fotojonizacją pod ciśnieniem atmosferycznym została użyta do oznaczenia fenoli i parabenów w próbkach mleka od karmiących kobiet z Północnej Karoliny [297]. Rodríguez-Goméz i wsp. [298] oznaczali parabeny w próbkach kobiecego mleka z użyciem UHPLC z różnymi detektorami. Rozdzielone anality oznaczali metodą z użyciem detektora z matrycą diodową pracującego przy długości fali 254 nm i spektrometru mas z potrójnym kwadrupolem (QqQ) z ortogonalnym elektrorozpylaniem Z-spray™. Zastosowanie UHPLC-MS/MS zwiększyło czułość i selektywność w porównaniu z detektorem DAD.

Inną często stosowaną techniką oznaczania ksenobiotyków jest chromatografia gazowa (*Gas Chromatography*, GC), przeważnie stosowana w sprzężeniu z detektorem MS lub MS/MS. Jednak wykorzystanie chromatografii gazowej wymaga termostabilności analitów i dodatkowej ich derywatyzacji w celu zwiększenia lotności, a tym samym poprawy intensywności pików i ich rozdzielania. Powszechnymi odczynnikami derywatyzującymi są: bezwodnik octowy, N-metylo-N-(*tert*-butylodimetylosililo)trifluoroacetamid, mieszanina N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidu (BSTFA) i trimetylochlorosilanu (TMCS). Czasami wykorzystywana jest technika GC w połączeniu z detektorem płomieniowo

jonizacyjnym (*Flame Ionization Detector*, FID) [295]. Ogólnie rzecz biorąc, metody GC-FID mają przewagę związaną z niższym kosztem (w porównaniu z MS) i wysoką odpornością. Z drugiej strony, systemowi detekcji brakuje jednoznacznej zdolności analitycznej identyfikacji technik MS [2]. W przypadku stosowania techniki GC-FID do analizy parabenów najczęściej przeprowadza się derywatyzację (10-20 minut) z użyciem bezwodnika octowego. W przypadku derywatywacji *in situ* (jednoczesnej z ekstrakcją analitu) wykonywanej do oznaczeń w kosmetykach, proces ten przyczynia się do lepszego rozdzielania chromatograficznego, krótszego czasu trwania procedury, łatwości usuwania nadmiaru reagenta oraz możliwości przeprowadzenia reakcji w środowisku wodnym. Parabeny w próbkach środowiskowych i kosmetykach można oznaczać również bez uprzedniej derywatywacji, ale związki są wówczas gorzej rozdzielone i mają mniej symetryczne piki niż po zastosowaniu derywatywacji. Z kolei technika GC-MS ma zalety w porównaniu z HPLC-MS, takie jak jednoznaczna identyfikacja analitów i niskie granice wykrywalności, co pozwala na oznaczanie substancji o niskich stężeniach (jak w przypadku próbek środowiskowych) i stwarza możliwość jednoczesnego oznaczenia związków o różnym charakterze. Technika ta najczęściej wiąże się z derywatyzacją na drodze reakcji acylowania lub silylowania. GC-MS w porównaniu z HPLC-MS ma wyższą rozdzielczość, niższe koszty i mniejszą ilość odpadów rozpuszczalników. Do tego typu oznaczeń stosuje się różne analizatory mas - głównie kwadrupol i potrójny kwadrupol, ale również pułapkę jonową i detektor czasu przelotu (TOF) [2].

Ros i wsp. z wykorzystaniem chromatografii gazowej oraz ciekowej dokonali oznaczeń BPA, mieszaniny technicznej nonylofenolu, 4-*tert*-oktylofenolu (4-*t*-OP), 4-*n*-oktylofenolu (4-*n*-OP), 17 β -estradiolu (E2) i 17 α -etynyloestradiolu (EE2) w próbkach ścieków i wody z ujścia rzeki. Ocenili przydatność do ekstrakcji analitów rurki polietersulfonowej (PES) i porównali wyniki oznaczeń analitów uzyskane technikami GC-MS oraz LC-MS/MS. W przypadku techniki GC-MS analizę poprzedzał etap desorpcji za pomocą octanu etylu lub metanolu oraz derywatywacja BSTFA i 1 % TMCS. Analizę LC-MS/MS przeprowadzono bez derywatywacji. Metoda ta okazała się więc szybsza, a LOQ wynosiło 3–63 ng/l. Niestety nie nadawała się do analizy nonylofenolu o niskich stężeniach z uwagi na niedostateczną precyzję. W porównaniu z LC-MS/MS, GC-MS pozwoliło na jednoczesne oznaczenie wszystkich badanych związków z odpowiednią powtarzalnością i dokładnością. Chociaż GC-MS zapewnia wyższą rozdzielczość dla oznaczania BPA, to technika ta jest rzadziej stosowana głównie ze względu na żmudną procedurę przygotowania próbki, potrzebę jej doczyszczania oraz niezbędną derywatywację analitu, co jest szczególnie niedogodne

w analizie dużej ilości próbek [299]. Rodríguez-Goméz i wsp. [300] dla związków o działaniu zaburzającym układ endokryny występujących w mleku kobiecym opracowali metodę, która obejmowała procedurę ekstrakcji z ruchomym elementem sorpcyjnym (SBSE), a następnie desorpcję rozpuszczalnikiem przed analizą GC-MS/MS lub UHPLC-MS/MS. W metodzie GC anality wykrywano i oznaczano ilościowo za pomocą spektrometru mas z potrójnym kwadropolem. Autorzy przeprowadzili derywatyzację analitów za pomocą mieszaniny octanu etylu i BSTFA/1% TMCS. W metodzie UHPLC-MS/MS stosowali tandemowy spektrometr mas działający w trybie MRM i z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI). Parametry walidacyjne, takie jak liniowość, dokładność, czułość i selektywność były satysfakcjonujące dla obu metod. Limity oznaczalności mieściły się w zakresach od 0,3 do 5,0 ng/ml dla GC i od 0,2 do 1,0 ng/ml dla LC. RSD było poniżej 15%, a odzyski mieściły się od 92 do 114% we wszystkich przypadkach, jednak były mniej korzystne w przypadku chromatografii cieczowej.

Do oznaczeń zawartości związków o działaniu zaburzającym układ endokryny stosuje się oprócz technik chromatografii cieczowej i gazowej również elektroforezę kapilarną (CE). Elektroforeza kapilarna służąca do rozdzielania składników próbki ze względu na ich rozmiary i ładunki, uchodzi za technikę przyjazną środowisku, zużywającą małe ilości rozpuszczalników, o wysokiej zdolności rozdzielczej i krótkim czasie analizy [295]. Elektroforeza kapilarna jest jednak techniką bardzo wrażliwą na warunki środowiska, a szczególnie na zmiany pH, temperatury. Niewłaściwe warunki mogą spowodować przyklejanie się próbki do ścian kapilar, mały rozdział, niespójne czasy retencji i niestabilność analitów. Kapilary do CE mają dwie główne wady. Jedną z nich jest adsorpcja białka, która zmniejsza rozdzielczość, a drugą krótka ścieżka światła zmniejszająca czułość [301]. Elektroforeza kapilarna znajduje ostatnio coraz większe zastosowanie w analizie jakościowej związków optycznie czynnych, zwłaszcza do określenia czystości enancjomerycznej.

Zhang i wsp. zastosowali technikę CE do oznaczania BPA. Przygotowali polimerowe mikrosfery z odwzorowanym molekularnie BPA i zastosowali je jako sorbent SPE do ekstrakcji BPA. W porównaniu z SPE na krzemionce z łańcuchami C18, uzyskano wyższą selektywność i odzysk. W połączeniu z CE, odzyski mieściły się w przedziale 95,2–105,4%, a limit wykrywalności wynosił zaledwie 1,8 µg/l [302]. W późniejszych badaniach ta sama grupa badawcza zaproponowała szybką metodę opartą na molekularnie odwzorowanym SPE (MIP-SPE) sprzężonym z CE do oznaczania śladowych ilości BPA w złożonych próbkach, takich jak woda z kranu, woda rzeczna, napoje i mocz. Kolumna koncentrator MIP-SPE została po raz pierwszy przygotowana przez powlekanie materiałem MIP

bezpośrednio na kapilarze separacyjnej. W zoptymalizowanych warunkach, liniowy zakres BPA wynosił 3-300 ng/ml, a LOD wynosił 0,8 ng/ml. W porównaniu do znanych metod w trybie off-line, omawiana metoda MIP-SPE-CE ma zalety ekstrakcji online i cechuje ją łatwość automatyzacji [303].

Wśród detektorów stosowanych w połączeniu z techniką elektroforezy kapilarnej jest również spektrometr mas. Zeng i wsp. zastosowali technikę CE sprzężoną ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (TOF) do oznaczania polarnych jonowych metabolitów w moczu szczurów, którym podawano BPA [304]. Po usunięciu białek przez filtrację odśrodkową, hydrofilowe ekstrakty moczu zanalizowali metodą CE-TOF/MS. Próbkę moczu zostały najpierw rozdzielone w kapilarze ze stopionej krzemionki w temperaturze 20°C, a następnie zanalizowane przez TOF-MS po kolei w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Badanie wykazało, że sprzężenie takiej techniki analitycznej ze spektrometrem mas pozwala lepiej zbadać zaburzenia metaboliczne wywołane przez BPA. Produkty pośrednie metabolizmu zaangażowane w glikolizę, szlak pentozofosforanowy i cykl kwasów trikarboksylowych są związkami, które z zastosowaniem omawianej metody analitycznej można oznaczyć z niezwykłą selektywnością. Metoda jest korzystna z uwagi na małą objętość nastrzyku, redukcję zanieczyszczeń po analizie w wyniku przepłukiwania kapilary i lepsze rozdzielanie metabolitów przy przepływie tłokowym niż przy przepływie laminarnym, któremu towarzyszy rozciąganie pików w chromatografii cieczonej. Jednak użycie nowatorskiego połączenia elektroforezy kapilarnej z jonizacją przez elektrorozpylanie, która wykorzystuje współosiowy przepływ płynu wprowadzanego przez rurkę koncentryczną z kapilarą rozdzielania może potencjalnie pogarszać czułość tych oznaczeń [304].

Technika elektroforezy kapilarnej jest rzadko stosowana do analizy próbek ludzkiego mleka. Tą technikę wykorzystali tureccy naukowcy [305] do oznaczania czterech parabenów w mleku kobiecym i próbkach żywności po wcześniejszej dyspersyjnej mikroekstrakcji cieczy z zastosowaniem chloroformu jako rozpuszczalnika ekstrahującego. Ekstrakcja parabenów z chloroformu do roztworu wodorotlenku sodu poprzedzała bezpośrednie wstrzyknięcie do CE. Anality rozdzielono przy odpowiedniej temperaturze i napięciu za pomocą elektrolitu – buforu boranowego zawierającego 5% acetonitrylu. Zastosowano detektor z matrycą diodową przy długości fali 298 nm. Współczynniki wzbogacenia mieściły się w zakresie 4,3-10,7; a granice wykrywalności wynosiły od 0,1 do 0,2 µg/ml. Wykazano, że DLLME-CE jest prostą i szybką metodą oznaczania parabenów w mleku ludzkim i żywności.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Zakres pracy doświadczalnej

Realizację prac badawczych podzielono na następujące etapy:

- I.** Oznaczanie parabenów (MP, EP, PP, BP, BzP) w kosmetykach jako ogólnodostępnym i szeroko stosowanym źródle ekspozycji na związki oddziałujące na układ endokryny.
- II.** Oznaczanie parabenów (MP, EP, PP, BP, BzP), BPA i kumylofenolu (CP) w wodach powierzchniowych Wielkopolski.
- III.** Oznaczanie parabenów (MP, EP, PP, BP, BzP) i bisfenoli (A, F, S, AF) w mleku kobiecym.

I. Oznaczanie parabenów w kosmetykach jako ogólnodostępnym i szeroko stosowanym źródle ekspozycji na związki oddziałujące na układ hormonalny

Kosmetyki stanowią ogromne i ogólnodostępne źródło ekspozycji na szereg związków mających wpływ na układ hormonalny człowieka. Wśród nich znajdują się parabeny, które stosowane są jako popularne konserwanty. Związki te uważane są za bezpieczne, jednakże w ostatnich latach liczba publikacji poświęconych ich negatywnemu wpływowi na organizmy żywe zdecydowanie wzrasta.

W ramach prowadzonych badań opracowano i zwalidowano metodę oznaczania parabenów (MP, EP, PP, BP, BzP) w wybranych kosmetykach z użyciem techniki HPLC z detekcją fluorescencyjną. Zastosowanie detektora fluorescencyjnego jest rozwiązaniem innowacyjnym, ponieważ nie spotkano dotychczas w piśmiennictwie doniesień na ten temat. Zastosowana procedura nie tylko zwiększyła czułość detekcji w porównaniu z najczęściej używanym detektorem absorpcji w nadfiolecie, ale także zwiększyła selektywność.

Oceniono szereg kosmetyków (toniki, płyny micelarne, wody toaletowe) pod kątem zgodności zawartości parabenów z wartościami obowiązującymi w prawodawstwie Unii Europejskiej. Sprawdzone również, czy obecne są tylko parabeny deklarowane przez producentów na etykietach. Otrzymane wyniki potwierdzono przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS.

II. Oznaczanie parabenów, bisfenolu A i kumylofenolu w wodach powierzchniowych Wielkopolski

Parabeny, jak wiele innych związków pochodzenia antropogenicznego, szczególnie produkowanych w znacznych ilościach, przedostają się do wód powierzchniowych. Źródłem zanieczyszczenia mogą być np. kosmetyki, ale również niektóre produkty lecznicze. Należy również podkreślić, że ze względu na specyfikę stosowania produktów kosmetycznych, znaczna ilość jest zmywana z powierzchni ciała podczas kąpieli w zbiornikach wodnych, a tylko część trafia do oczyszczalni ścieków.

W ramach prowadzonych badań opracowano i zwalidowano metodę oznaczania parabenów w wodach powierzchniowych Wielkopolski. Do wydzielania analitów zastosowano technikę ekstrakcji do fazy stałej, a do oznaczania wykorzystano technikę LC-MS/MS. Ze względu na fakt, że w okresie od maja do grudnia 2014 roku stwierdzono znaczne zróżnicowanie stężeń wskazujące na sezonowość zmian, w celu jej potwierdzenia postanowiono zastosować przedłużony monitoring od marca 2015 do września 2016. Opracowano i zwalidowano nową metodę analityczną służącą do oznaczania parabenów, a także bisfenolu A i kumylofenolu.

III. Oznaczanie parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym

Ze względu na powszechność stosowania parabenów i bisfenoli oraz istniejące doniesienia literaturowe na temat obecności ich pozostałości w organizmie ludzkim, trzeci etap badań dotyczył oceny zawartości w mleku kobiecym. Zbieranie próbek mleka od dobrowolnych dawczyń przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwały nr 313/16 i 1013/16). Próbki mleka uzyskano od kobiet karmiących pierwsze dziecko pomiędzy 2-7 tygodniem po porodzie oraz między 3 a 4 miesiącem po porodzie. Od pobrania do czasu wykonania analizy próbki były zamrażane.

W celu oznaczenia parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym opracowano procedurę analityczną zapewniającą wydzielenie analitów. Do realizacji tego zadania wykorzystano technikę QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) polegającą na ekstrakcji analitów za pomocą acetonitrylu w obecności bezwodnego $MgSO_4$ i $NaCl$ z fazy wodnej do fazy organicznej i oczyszczeniu ekstraktów z użyciem odpowiednich sorbentów. Poziomy zawartości parabenów i bisfenoli oznaczano z użyciem techniki LC-MS/MS.

4.2. Odczynniki

Związki oznaczane

- Metyloparaben, analytical standard, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Etyloparaben, analytical standard, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Propyloparaben, analytical standard, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Butyloparaben, analytical standard, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Benzyloparaben, analytical standard, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Bisfenol A, 99%, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Bisfenol AF, 99%, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Bisfenol F, 98%, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Bisfenol S, 96%, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- 4-Kumylofenol, 99%, Sigma Aldrich, Japonia,
- Bisfenol A-d₁₆, czystość izotopowa 98% D, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Metyloparaben ¹³C₆ roztwór, 50 µg/ml w acetonie, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone.

Odczynniki stosowane w procesie ekstrakcji i analizie chromatograficznej

- Metanol do HPLC – Super gradient, POCH, Polska,
- Metanol do LC-MS, Merck, Niemcy,
- Acetonitryl do LC-MS, Merck, Niemcy,
- Octan amonu do HPLC, ≥ 99%, Fluka Analytical, Szwajcaria,
- Chlorek sodu, 99,5%, Avantor, Polska,
- Bezwodny siarczan(VI) magnezu, Acros, Belgia,
- Kwas octowy do LC-MS, Merck, Niemcy,
- β-glukuronidaza z *Helix pomatia* (≥ 300 000 jednostek/g), Sigma Aldrich, Niemcy,
- β-D-glukuronid 4-metyloumbeliferonu, 98%, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- 4-metyloumbeliferon, ≥ 98%, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- woda została oczyszczona w procesie odwróconej osmozy przy użyciu systemu Demiwa firmy Watek (Republika Czeska), a następnie poddana podwójnej destylacji.

Sorbenty stosowane w SPE i dSPE

- Żel krzemionkowy modyfikowany łańcuchami oktadecylowymi, C18 Polar Plus, 30 mg/1 ml, J.T. Baker, Holandia,
- Grafityzowana sadza, ENVI-Carb SPE Tubes, 30 mg/1 ml, 120/400 MESH, 100 m²/g, Supelco, Stany Zjednoczone,
- Nanorurki węglowe funkcjonalizowane grupami karboksylowymi > 8%, 30mg/1 ml, średnia 9,5 nm, długość 1,5 μm, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone,
- Kopolimer styren-diwinylbenzen, Strata SDB-L, 30 mg/1 ml, 100 μm, 260 Å, Phenomenex, Stany Zjednoczone,
- Kopolimer diwinylbenzen-N-metylopirolidon, Oasis HLB, 30 mg/1 ml, Waters, Stany Zjednoczone,
- Kopolimer metakrylan metylu-diwinylbenzen, ABS Elut-Nexus, 30 mg/1 ml, 70 μm, 450 Å, Agilent Technologies, Stany Zjednoczone,
- Kopolimer metakrylan metylu-diwinylbenzen, ABS Elut-Nexus, 60 mg/3 ml, 70 μm, 450 Å, Agilent Technologies, Stany Zjednoczone,
- Zestaw dSPE QUECHERS do próbek tłustych, 2ml, mieszanina bezwodnego siarczanu(VI) magnezu z sorbentami na bazie żelu krzemionkowego modyfikowanego łańcuchami oktadecylowymi C18 i krzemionki modyfikowanej pierwszo-drugorzędową aminą PSA, Bond Elut, Agilent Technologies, Stany Zjednoczone.

4.3. Szkło i drobny sprzęt laboratoryjny

- Fiolki szklane o objętościach: 2, 4, 20 ml,
- Fiolki ze szklaną wkładką o objętości 300 μl,
- Cylindry miarowe o objętości 100 ml,
- Kolby miarowe o objętościach: 1, 2, 5, 10, 25, 250 ml,
- Lejki szklane,
- Pipety automatyczne (0,1-2,5 μl, 10-100 μl, 20-200 μl, 100-1000 μl; Eppendorf, Niemcy),
- Sączki bibułowe firmy Filtrak (Niemcy) o średnicy 390 mm, cechujące się wolnym sączeniem,
- Filtry strzykawkowe średnica 17 mm, membrana PTFE; 0,2 μm, TITAN, ThermoFisher Scientific, Stany Zjednoczone,

- Probówki wirówkowe 17 ml,
- Waga elektroniczna AB 256 – S/FACT, Mettler Toledo, Stany Zjednoczone,
- Zestaw do ekstrakcji do fazy stałej, SPE, J.T. Baker, Holandia,
- Zamrażarka, lodówka,
- Wytrząsarka typu Vortex Genius 3 firmy IKA, Niemcy,
- Wirówka EBA 20 firmy Hettich, Niemcy,
- Wysokoobrotowa miniwirówka D2012 Plus, firmy DLAB, Polska,
- Inkubator firmy ChemLand, Polska,
- Pompa infuzyjna Harvard Apparatus, Stany Zjednoczone.

4.4. Aparatura badawcza

W pracy do oznaczania analitów zastosowano dwa wysokosprawne chromatografy cieczowe pracujące z trzema różnymi detektorami:

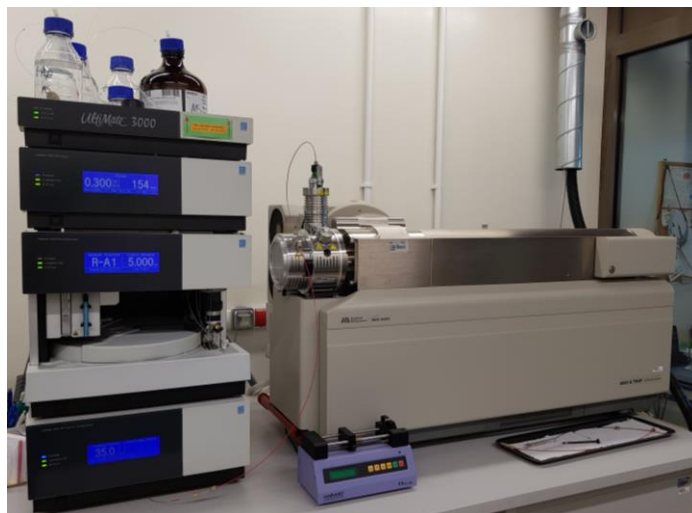
- chromatograf cieczowy Summit firmy Dionex (Stany Zjednoczone), w skład którego wchodzi następujące moduły: zbiorniki eluentów, pompa gradientowa niskociśnieniowa P580 ALPG, automatyczny podajnik próbek ASI-100, termostat kolumny typu STH 585, detektor fluorescencyjny RF 2000, detektor UV-Vis/DAD oraz komputer zbierający i przetwarzający dane. Sprzęt przedstawiono na **Rycinie 2**.



Ryc. 2. Chromatograf cieczowy z detektorem fluorescencyjnym

- chromatograf cieczowy do szybkiej chromatografii UltiMate 3000 firmy Dionex (Stany Zjednoczone) sprzężony ze spektrometrem mas API 4000 QTRAP firmy Applied Biosystems/MSD Sciex (Stany Zjednoczone). W skład aparatu wchodzi następujące moduły:

pompa binarna wysokociśnieniowa typu HPG -3000RS, automatyczny podajnik próbek typu WPS - 3000RS, termostat kolumny typu TCC - 3000RS, źródło typu elektrosprej - TurboIonSpray® (ESI). Stosowany sprzęt przedstawiono na **Rycinie 3**.



Ryc. 3. Chromatograf cieczerw sprężony ze spektrometrem mas

4.5. Oznaczenie parabenów w kosmetykach – zadanie I

4.5.1. Próbki rzeczywiste

Zawartość parabenów oznaczano w próbkach toników, płynów micelarnych i wód perfumowanych, wyprodukowanych w różnych krajach i różniących się ceną (od tanich, powszechnie stosowanych kosmetyków do droższych kosmetyków uznanych światowych marek). Próbki przed analizą HPLC-FD oraz LC-MS/MS zostały rozcieńczone.

Zestawienie badanych próbek przedstawiono w **Tabeli 7**.

Tab. 7. Próbki rzeczywiste - produkty kosmetyczne

Oznaczenie próbki	Rodzaj kosmetyku	Deklarowana zawartość parabenów
T1	Tonik	MP, EP, PP, BP
T2, T3		MP, EP
T4		MP, PP
T5, T6, T7, T8		MP
T9, T10		-
M1	Płyn micelarny	MP, PP
M2		MP
M3, M4		-
E1, E2, E3	Woda perfumowana	MP

4.5.2. Oznaczanie parabenów w kosmetykach metodą HPLC-FD

Warunki analizy chromatograficznej zastosowane w oznaczaniu parabenów przy użyciu detektora fluorescencyjnego podano w **Tabeli 8**.

Tab. 8. Warunki analizy HPLC-FD

CHROMATOGRAF CIECZOWY (HPLC)			
Kolumna chromatograficzna: Hypersil Gold C18 Thermo Scientific	Długość		150 mm
	Średnica wewnętrzna		4,6 mm
	Wielkość ziaren wypełnienia		5 µm
Przedkolumna: Hypersil Gold C18 Thermo Scientific	Długość		4 mm
	Średnica wewnętrzna		4,6 mm
	Wielkość ziaren wypełnienia		5 µm
Temperatura kolumny	35 °C		
Objętość nastrzyku	5 µl		
Skład fazy ruchomej	Faza A		woda
	Faza B		metanol
Gradient	Czas [min]	% A	% B
	-4	60	40
	0	60	40
	8	15	85
	9	0	100
	12	0	100
Prędkość przepływu fazy ruchomej	1,5 ml/min		
DETEKTOR FLUORESCENCYJNY (FD)			
Wzbudzenie	254 nm		
Emisja	310 nm		

4.5.3. Oznaczanie parabenów w kosmetykach metodą LC-MS/MS

Warunki analizy chromatograficznej zastosowane w oznaczaniu parabenów z wykorzystaniem spektrometru mas jako detektora przedstawiono w **Tabeli 9**.

Tab. 9. Warunki analizy chromatograficznej LC-MS/MS

CHROMATOGRAF CIECZOWY (LC)			
Kolumna chromatograficzna: Hypersil Gold C18 Thermo Scientific	Długość		100 mm
	Średnica wewnętrzna		2,1 mm
	Wielkość ziaren wypełnienia		1,9 μ m
Filtr ochronny przed kolumną	Średnica wewnętrzna		2,1 mm
	Rozmiar porów		0,2 μ m
Temperatura kolumny	35 °C		
Objętość nastrzyku	5 μ l		
Skład fazy ruchomej	Faza A		Roztwór 5 mM octanu amonu
	Faza B		metanol
Gradient	Czas [min]	% A	% B
	-3	50	50
	0	50	50
	4	20	80
	8	5	95
	10	0	100
Prędkość przepływu fazy ruchomej	0,22 ml/min		

W zestawie chromatograf cieczowy został połączony ze spektrometrem mas Applied Biosystems/MDS Sciex API 4000 QTRAP przez źródło jonów Turbo Ion Spray, które pracowało w trybie jonów ujemnych, w przypadku oznaczania wszystkich związków. Analizę przeprowadzono stosując monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji (tryb MRM, ang. *multiple reaction monitoring*). Czas przeznaczony na monitorowanie każdego przejścia w trybie MRM wynosił 200 ms. Wszystkie anality oznaczano przy zastosowaniu następujących wartości parametrów dla źródła i spektrometru mas: ciśnienie gazu osłonowego 20 psi, ciśnienie gazu wspomagającego rozpylanie 45 psi, ciśnienie gazu pomocniczego 45 psi, temperatura 450°C, gaz kolizyjny na poziomie średnim oraz napięcie przyłożone do

igły rozpylającej –4500 V. Parametry pracy spektrometru dla poszczególnych analitów przedstawiono w **Tabeli 10**.

Tab. 10. Warunki oznaczania parabenów techniką LC-MS/MS

Związek	DP* [V]	MRM 1 [m/z]	CE** [eV]	MRM 2 [m/z]	CE** [eV]
Metyloparaben	-50	151 → 92	-30	151 → 136	-25
Etyloparaben	-50	165 → 92	-30	165 → 136	-19
Propyloparaben	-70	179 → 92	-32	179 → 136	-21
Butyloparaben	-80	193 → 92	-35	193 → 136	-22

* - DP (*declustering potential*) – potencjał rozbitcia klastrów

** - CE (*collision energy*) – energia kolizji

MRM - tryb monitorowania wybranych reakcji fragmentacji

4.6. Oznaczanie parabenów, BPA i kumylofenolu w wodach powierzchniowych Wielkopolski – zadanie II

4.6.1. Próbki rzeczywiste

W celu oznaczenia wybranych zanieczyszczeń w wodach powierzchniowych Wielkopolski wytypowano miejsca, z których pobrano próbki środowiskowe w różnych miesiącach 2014 roku, co miało zapewnić sprawdzenie sezonowości występowania parabenów. Szczegółowe informacje dotyczące lokalizacji miejsc pobierania próbek zamieszczono w **Tabeli 11**. Spośród testowanych jezior, trzy znajdują się na terenie Puszczy Noteckiej (Jezioro Kubek), Sierakowskiego Parku Krajobrazowego (Jezioro Białokoskie) i w ich sąsiedztwie (Jezioro Tuczo). W tym obszarze nie są odprowadzane ścieki. Samica Kierska i Kanał Szymanowo-Grzybno są małymi ciekami wodnymi w obszarze wiejskim. Warta jest trzecią najdłuższą rzeką Polski, a punkty pobrania próbek były zlokalizowane we względnie czystych regionach. Rogusko jest wioską oddaloną około 25 km od Warciańskiego Parku Krajobrazowego i 40 km od Konina (populacja 80 tys.) oraz 20 km za dopływem rzeki Proсны 60 km od Kalisza (populacja 100 tys.). Radzewice leżą w słabo zaludnionym terenie, a Wiórek znajduje się w odległości 1-5 km poniżej napływu wód z dwóch małych lokalnych oczyszczalni ścieków (dla populacji 10 tys. - 15 tys.) w sąsiedztwie Wielkopolskiego Parku Narodowego. Próbki w Poznaniu pobierano w pobliżu miejsca, gdzie rzeka wpływa do miasta (550 tys. mieszkańców). Mściszewo to niewielka wieś położona 15 km od Poznania.

W celu dokładniejszego zbadania sezonowych zmian stężenia badanych parabenów, a także bisfenolu A i 4-kumylofenolu w wodach powierzchniowych zastosowano przedłużony

monitoring od marca 2015 do września 2016. Miejsca pobrania próbek wody rzecznej znajdowały się blisko Poznania. Trzy punkty były w różnych odcinkach Warty (Wiórek, Poznań, Mściszewo), dwa na rzece Głównej (Poznań i Janikowo), jedno miejsce na rzece Samie, Samicy i Kamionce w Sierakowskim Parku Krajobrazowym. Samica Stęszewska (wieś Krosinko) i Kanał Mosiński (Mosina) są małymi ciekami wodnymi bez istotnej utylizacji ścieków. Rzeką Główna (Poznań) jest dopływem Warty, płynącym przez Janikowo, małą wioskę koło Poznania. Rzeką Sama w pobliżu Szamotuł (populacja około 7 tys.) i rzeka Kamionka w pobliżu wsi Bielsko znajdują się na północny zachód od Poznania. Próbkę wód jeziornych pobrano z jezior Wielkopolski z większego obszaru (5-70 km od Poznania) niż miejsca pobrania próbek rzecznych. Jedno jezioro – Jezioro Bnińskie znajduje się na terenie Równiny Wrzesińskiej, następne cztery dość blisko Poznania (Jezioro Lusowskie, Śremskie, Pamiątkowskie, Bytyńskie), a ostatnie Jezioro Wierzbiczańskie najdalej na wschód, w pobliżu Gniezna.

Tab. 11. Lokalizacja miejsc pobierania próbek środowiskowych

Miejsce pobrania	Położenie	
	długość geograficzna	szerokość geograficzna
Jeziora		
Tuczno	15,850482	52,590866
Białokoskie	16,227031	52,575876
Kubek	16,079556	52,684103
Śremskie (L1)	16,048980	52,609218
Bytyńskie (L2)	16,508516	52,495460
Pamiątkowskie (L3)	16,681337	52,549614
Lusowskie (L4)	16,691896	52,430577
Bnińskie (L5)	17,114209	52,200053
Wierzbiczańskie (L6)	17,731816	52,527986
Rzeki		
Samica Kierska Niemieczkowo	16,702183	52,653311
Warta Rogusko	17,343356	52,092467
Warta Radzewice	16,977519	52,216444
Kanał Szymanowo Grzybno	16,906700	52,217442
Warta (Mściszewo)	16,954311	52,580153
Kamionka (Bielsko) (R1)	15,936665	52,613777
Sama (Szamotuły) (R2)	16,581448	52,617847
Samica (Stęszew) (R3)	16,626716	52,329572
Mosiński Kanał (R4)	16,847476	52,244176
Warta Wiórek (R5)	16,906206	52,306183
Warta Poznań (R6)	16,917233	52,355000
Warta Mściszewo (R7)	16,954311	52,580153
Główna (Poznań) (R8)	16,966010	52,425538
Główna (Janikowo) (R9)	17,034393	52,439933

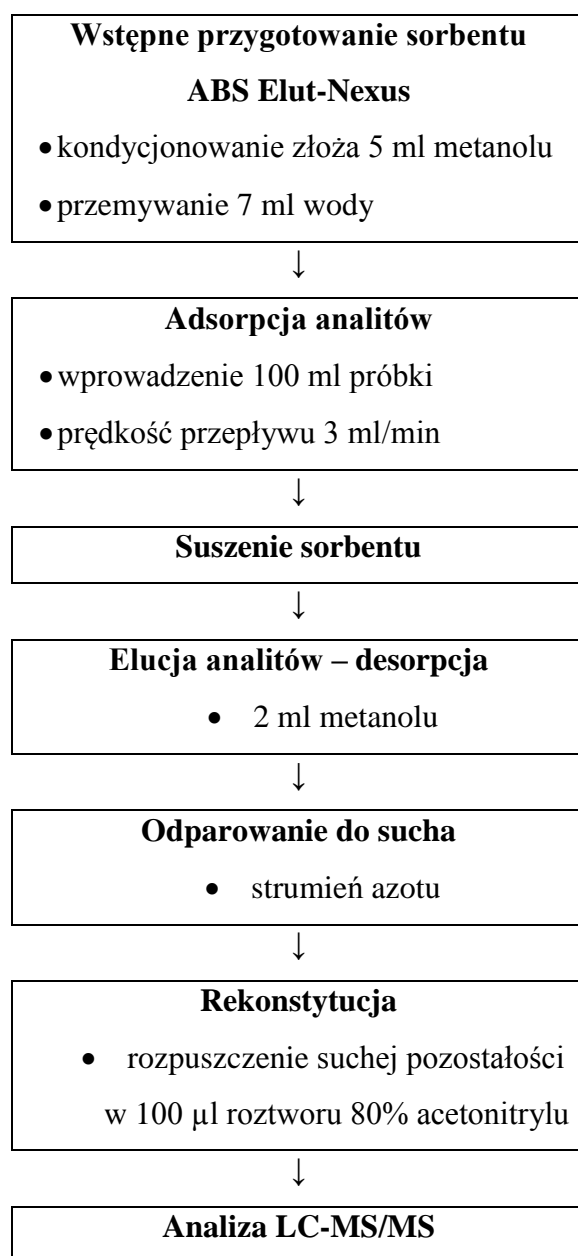
Próbki wody z rzek pobierano ze środka nurtu, natomiast z jezior na środku akwenu, do butelek z tworzywa sztucznego i chłodzono lodem podczas transportu do laboratorium, gdzie przechowywano je w ciemności w temperaturze -18°C w celu zabezpieczenia przed biodegradacją. Przed analizą próbki pozostawiono do ogrzania do temperatury pokojowej i sączono przez bibułę filtracyjną.

4.6.2. Ekstrakcja do fazy stałej

Oznaczenie parabenów w próbkach wodnych pochodzących ze środowiska wymaga zmiany matrycy, tzn. przeprowadzenia analitów do rozpuszczalnika organicznego przy jednoczesnym ich wzbogaceniu. Próbki przed analizą poddano ekstrakcji do fazy stałej. Przeprowadzono szereg doświadczeń umożliwiających opracowanie metody wydzielenia parabenów z matrycy wodnej o maksymalnej wydajności procesu. W celu wskazania najbardziej odpowiedniego sorbentu przetestowano kolumnienki ekstrakcyjne z sześcioma różnymi złożami, z których trzy były komercyjnie dostępne, a trzy przygotowane w laboratorium. Testowane sorbenty:

- żel krzemionkowy modyfikowany łańcuchem oktadecylowym (C18),
- grafityzowana sadza (GCB),
- nanorurki węglowe funkcjonalizowane grupami karboksylowymi (NR),
- kopolimer styren-diwinylbenzen (Strata SDB-L),
- kopolimer diwinylbenzen-N-metylopirolidon (Oasis HLB),
- kopolimer metakrylan metylu-diwinylbenzen (ABS Elut-Nexus).

Do elucji zaadsorbowanych analitów zastosowano dwa różne rozpuszczalniki: metanol i acetonitryl. Odzysk sprawdzono dla różnych objętości eluentu oraz różnych objętości próbek. Dobór optymalnych warunków ekstrakcji przeprowadzono dla próbek modelowych z wykorzystaniem mieszaniny poszczególnych analitów. Opracowaną procedurę ekstrakcji do fazy stałej przedstawiono na **Rycinie 4**.



Ryc. 4. Schemat procedury wydzielenia analitów techniką ekstrakcji do fazy stałej

4.6.3. Oznaczanie wybranych zanieczyszczeń środowiska w wodach powierzchniowych metodą LC-MS/MS

Analiza próbek wód powierzchniowych obejmowała początkowo tylko oznaczanie parabenów. Z uwagi na otrzymane wyniki, które wskazywały na sezonowość pojawiania się parabenów, procedurę rozszerzono oznaczając dodatkowo bisfenol A i CP, tj. substancje z innej grupy związków, także zakłócających równowagę hormonalną. Należy podkreślić,

że dla bisfenolu A i CP nie napotkano doniesień literaturowych, dotyczących ich wprowadzania do środowiska w sposób sezonowy.

4.6.3.1. Oznaczanie parabenów w wodach powierzchniowych metodą LC-MS/MS

Do analizy zastosowano aparat UltiMate 3000 sprzężony ze spektrometrem mas API 4000 QTRAP ze źródłem jonów Turbo Ion Spray, pracującym w trybie jonów ujemnych. Warunki analizy chromatograficznej przedstawiono w **Tabeli 12**.

Tab. 12. Warunki analizy chromatograficznej LC-MS/MS

CHROMATOGRAF CIECZOWY (LC)			
Kolumna chromatograficzna: Fenyl-heksyl Agilent Technologies	Długość		50 mm
	Średnica wewnętrzna		3 mm
	Wielkość wypełnienia		1,8 μm
Temperatura kolumny	35 °C		
Objętość nastrzyku	5 μl		
Skład fazy ruchomej	Faza A		Roztwór 5 mM octanu amonu
	Faza B		acetonitryl
Gradient	Czas [min]	% A	% B
	-3	70	30
	0	70	30
	2	70	30
	4	10	90
	5	0	100
Przepływ fazy ruchomej	0,5 ml/min		

Eluat wypływający z kolumny chromatograficznej był kierowany do spektrometru mas poprzez źródło jonizacji elektrosprej. Czas przeznaczony na monitorowanie każdego przejścia w trybie MRM wynosił 50 ms. Wszystkie anality oznaczane były przy zastosowaniu następujących parametrów dla źródła i spektrometru mas: ciśnienie gazu osłonowego 20 psi, ciśnienie gazu wspomagającego rozpylanie 45 psi, ciśnienie gazu pomocniczego 50 psi, temperatura 500°C, gaz kolizyjny na poziomie wysokim oraz napięcie przyłożone do igły rozpylającej -4500 V. Parametry pracy spektrometru dla poszczególnych analitów przedstawiono w **Tabeli 14**.

4.6.3.2. Oznaczanie parabenów, BPA i kumylofenolu w wodach powierzchniowych metodą LC-MS/MS

W ramach przedłużonego monitoringu zmiany stężenia parabenów, a także bisfenolu A i kumylofenolu oznaczano w wodach powierzchniowych od marca 2015 do września 2016. Na bazie już istniejącej metody opracowano i zwalidowano zmodyfikowaną metodę analityczną opartą na opisanej procedurze SPE służącą do jednoczesnego oznaczania wszystkich analitów. Do analizy zastosowano chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas jak podano w pkt 4.4. Warunki analizy chromatograficznej parabenów, BPA i kumylofenolu przedstawiono w Tabeli 13.

Tab. 13. Warunki analizy chromatograficznej LC-MS/MS

CHROMATOGRAF CIECZOWY (LC)			
Kolumna chromatograficzna: Hypersil Gold C18 Thermo Scientific	Długość		100 mm
	Średnica wewnętrzna		2,1 mm
	Wielkość ziaren wypełnienia		1,9 μm
Filtr ochronny przed kolumną	Średnica wewnętrzna		2,1 mm
	Rozmiar porów		0,2 μm
Temperatura kolumny	35 °C		
Objętość nastrzyku	5 μl		
Skład fazy ruchomej	Faza A		Roztwór 5 mM octanu amonu
	Faza B		Metanol
Gradient	Czas [min]	% A	% B
	-3	50	50
	0	50	50
	4	20	80
	8	5	95
	10	0	100
Prędkość przepływu fazy ruchomej	0,2 ml/min		

Wszystkie anality oznaczano z uwzględnieniem następujących parametrów dla źródła i spektrometru mas: ciśnienie gazu osłonowego 15 psi, ciśnienie gazu wspomagającego rozpylanie 40 psi, ciśnienie gazu pomocniczego 450 psi, temperatura 450°C, gaz kolizyjny ustawiony na poziomie średnim oraz napięcie -4500 V przyłożone do igły rozpylającej. Parametry pracy spektrometru mas zastosowane dla oznaczania parabenów, bisfenolu A

i kumylofenolu z wykorzystaniem obu metod chromatograficznych przedstawiono w Tabeli 14.

Tab. 14. Warunki oznaczania parabenów, BPA i kumylofenolu metodą LC-MS/MS

Związek	DP* [V]	MRM 1 [m/z]	CE** [eV]	CXP*** [V]	MRM 2 [m/z]	CE** [eV]	CXP*** [V]
MP	-60	151 → 92	-30	-10	151 → 136	-25	-10
EP	-60	165 → 92	-30	-10	165 → 136	-19	-10
PP	-60	179 → 92	-32	-10	179 → 136	-21	-10
BP	-70	193 → 92	-35	-10	193 → 136	-22	-10
BzP	-70	227 → 92	-34	-10	227 → 136	-21	-10
4-CP	-70	211 → 195	-40	-10	211 → 133	-33	-10
BPA	-70	227 → 211,6	-26	-3	227 → 133	-35	-9
BPA – d ₁₆	-65	241 → 141,8	-38	-9	-	-	-
MP ¹³ C ₆	-60	157 → 98	-30	-10	-	-	-

* - DP (*declustering potential*) – potencjał rozbicia klastrów

** - CE (*collision energy*) – energia kolizji

*** - CXP (*collision cell exit potential*) – potencjał wyjścia z komory zderzeń

MRM - tryb monitorowania wybranych reakcji fragmentacji

4.7. Oznaczanie parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym – zadanie III

Analizę próbek mleka kobiecego przeprowadzono pod kątem zawartości parabenów (MP, EP, PB, BP, BzP) i bisfenoli (BPA, BPS, BPF, BPAF).

4.7.1. Zbieranie próbek mleka kobiecego

Próbki do analizy stanowiło mleko kobiece, które otrzymano od wolontariuszek, za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwały nr 313/16 i 1013/16). Próbki umieszczono w pojemnikach do przechowywania mleka dla niemowląt wykonanych z tworzywa sztucznego z deklaracją producenta, że tworzywo nie zawiera BPA. Próbki mleka pozyskano dwukrotnie między sierpniem 2016, a czerwcem 2017 od tych samych kobiet z obszaru Wielkopolski karmiących pierwsze dziecko między 2-7 tygodniem po porodzie, a następnie między 3 a 4 miesiącem po porodzie. Po pobraniu próbki zamrażano w celu zabezpieczenia przed rozkładem.

4.7.2. Wydzielanie analitów metodą QuEChERS

Do oznaczenia parabenów i bisfenoli techniką LC-MS/MS w próbkach mleka należało związki te wydzielić z matrycy i oczyścić pozbywając się tłuszczu. W tym celu zastosowano technikę QuEChERS, która oznacza szybką (ang. *Quick*), prostą (ang. *Easy*), tanią (ang. *Cheap*), efektywną (ang. *Effective*), odporną (ang. *Rugged*) oraz bezpieczną (*Safe*) technikę ekstrakcji. Technika ta spełnia wymagania stawiane zielonej chemii, ponieważ cechuje ją niewielkie zużycie odczynników.

Przygotowanie próbki mleka do analizy obejmowało:

- ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym,
- wysolenie,
- oczyszczenie ekstraktu za pomocą dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej.

W celu opracowania metody ekstrakcji opartej na technice QuEChERS przeprowadzono szereg eksperymentów prowadzących do optymalnej wydajności ekstrakcji.

Zoptymalizowana metoda polegała na wprowadzeniu 1 ml próbki mleka do próbówki wirówkowej, a następnie dodaniu 1 ml acetonitrylu zawierającego 1% CH₃COOH.

Do próbówki wprowadzono 0,2 g NaCl i 0,4 g MgSO₄, aby doprowadzić do wysolenia i lepszej wydajności ekstrakcji badanych związków oraz otrzymania dwóch faz woda – acetonitryl. Całość wytrząsano przez 3 minuty, a następnie odwirowano w czasie 9 minut przy 5000 obr./min. Po rozdzieleniu faz, warstwę acetonitrylową pobierano strzykawką szklaną z igłą o objętości 2500 µl i poddawano oczyszczeniu z zastosowaniem dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej dSPE (ang. *dispersive solid phase extraction*). W tym celu pobrany ekstrakt wprowadzano do fiolki, która zawierała mieszaninę sorbentów i soli o następującym składzie:

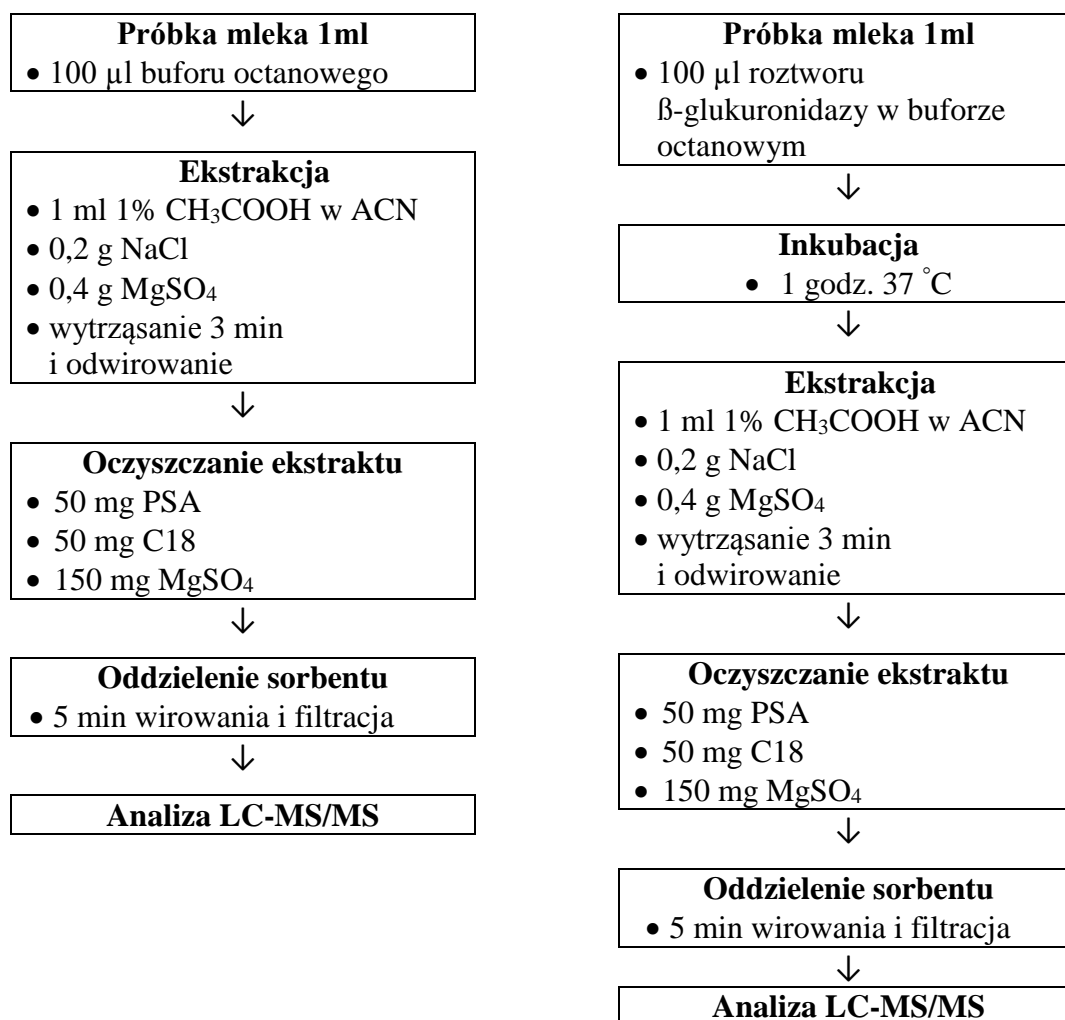
- 50 mg sorbentu PSA, czyli krzemionka modyfikowana pierwszo-drugorzędowymi grupami aminowymi. Zastosowany sorbent użyto, aby usunąć cukry, kwasy organiczne, kwasy tłuszczowe i niektóre pigmenty;
- 50 mg sorbentu C18 - żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi, użyty do usuwania związków tłuszczowych o długich łańcuchach, steroli i innych niepolarnych związków;
- 150 mg MgSO₄ - sól wiążąca pozostałości wody w fazie acetonitrylowej.

Zawartość fiolki wstrząsano przez 3 minuty, a następnie ekstrakt po oczyszczeniu odwirowywano przez 5 minut z prędkością 10000 obr./min przy użyciu mikrowirówki.

Próbka przed poddaniem analizie LC-MS/MS została przesączona przez filtr strzykawkowy 0,2 μm z membraną wykonaną z PTFE.

W próbkach mleka kobiecego oznaczano anality w formie wolnej i całkowitej, która jest sumą związku w formie wolnej i związanej z glukuronidem. W tym celu każda próbka mleka była przygotowana do analizy dwoma różnymi sposobami. Pierwszy polegał na ekstrakcji tylko form wolnych, a drugi na ekstrakcji całkowitej zawartości analitów, po przeprowadzeniu hydrolizy glukuronidu za pomocą enzymu β -glukuronidazy. Reakcję hydrolizy przeprowadzano w obecności buforu octanowego o $\text{pH}=5$ przez 1 godzinę w temperaturze 37°C w inkubatorze.

Schemat przygotowania próbek mleka do analizy chromatograficznej przedstawiono na Rycinie 5.



Ryc. 5. Schemat procedury wydzielenia analitów techniką ekstrakcji do fazy stałej

Do oznaczeń wspomnianych związków zastosowano aparat UltiMate 3000 RSLC sprzężony ze spektrometrem mas API 4000. Warunki analizy chromatograficznej przedstawiono w **Tabeli 15**.

Tab. 15. Warunki analizy chromatograficznej LC-MS/MS

CHROMATOGRAF CIECZOWY (LC)			
Kolumna chromatograficzna: Hypersil Gold C18 Thermo Scientific	Długość		100 mm
	Średnica wewnętrzna		2,1 mm
	Wielkość ziaren wypełnienia		1,9 µm
Filtr ochronny przed kolumną	Średnica wewnętrzna		2,1 mm
	Rozmiar porów		0,2 µm
Temperatura kolumny	35 °C		
Objętość nstrzyku	5 µl		
Skład fazy ruchomej	Faza A		Woda
	Faza B		Acetonitryl
Gradient	Czas [min]	% A	% B
	-3	57	43
	0	57	43
	1	50	50
	3	0	100
	4,6	0	100
Prędkość przepływu fazy ruchomej	0,2 ml/min		

Eluat wypływający z kolumny chromatograficznej był kierowany do spektrometru mas poprzez źródło jonów typu TurboIonSpray® pracujące w trybie jonów ujemnych z przyłożonym napięciem elektrorozpylania -4500 V. Spektrometr pracował w trybie monitorowania wybranych produktów reakcji fragmentacji, stosując następujące parametry źródła: ciśnienie gazu nebulizującego równe 40 psi, ciśnienie gazu pomocniczego równe 45 psi, ciśnienie gazu osłonowego równe 15 psi, temperatura 450°C, gaz kolizyjny ustawiony na poziomie średnim, a potencjał wejścia -10 V.

W **Tabeli 16** przedstawiono warunki oznaczania parabenów oraz bisfenoli w mleku kobiecym.

Tab. 16. Warunki oznaczania poszczególnych parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym metodą LC-MS/MS

Związek	DP* [V]	MRM 1 [m/z]	CE** [eV]	CXP*** [V]	MRM 2 [m/z]	CE** [eV]	CXP*** [V]
MP	-60	151 → 92	-30	-20	151 → 136	-20	-6
EP	-60	165 → 92	-30	-8	165 → 137	-20	-6
PP	-60	179 → 92	-35	-10	179 → 137	-22	-7
BP	-60	193 → 92	-36	-9	193 → 137	-23	-6
BzP	-50	227 → 92	-37	-10	227 → 136	-22	-6
BPA	-85	227 → 133	-37	-10	227 → 211	-42	-3
BPF	-85	199 → 93	-31	-6	199 → 123	-29	-9
BPS	-70	249 → 108	-38	-4	249 → 92	-50	-6
BPAF	-75	335 → 265	-30	-3	335 → 315	-29	-6

* - DP (*declustering potential*) – potencjał rozbicia klastrow

** - CE (*collision energy*) – energia kolizji

*** - CXP (*collision cell exit potential*) – potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń

MRM - tryb monitorowania wybranych reakcji fragmentacji

V. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

5.1. Oznaczanie parabenów w próbkach kosmetyków – zadanie I

Parabeny są związkami, które można znaleźć w ogromnej liczbie produktów kosmetycznych. W ostatnich latach ukazały się europejskie przepisy prawne ograniczające stosowanie parabenów [33]. Potwierdzenie obecności tych związków w produktach kosmetycznych można przeprowadzić stosując wiele technik analitycznych takich jak HPLC-UV czy LC-MS. Niemniej jednak zastosowanie pierwszej z nich może być problematyczne z uwagi na bogatą matrycę, obecną w kosmetykach, a tym samym negatywnie wpływającą na wynik oznaczania. Natomiast zastosowanie chromatografii cieczowej ze spektrometrem mas może być dobrą alternatywą, chociaż droższą i nadal niedostępną w wielu laboratoriach.

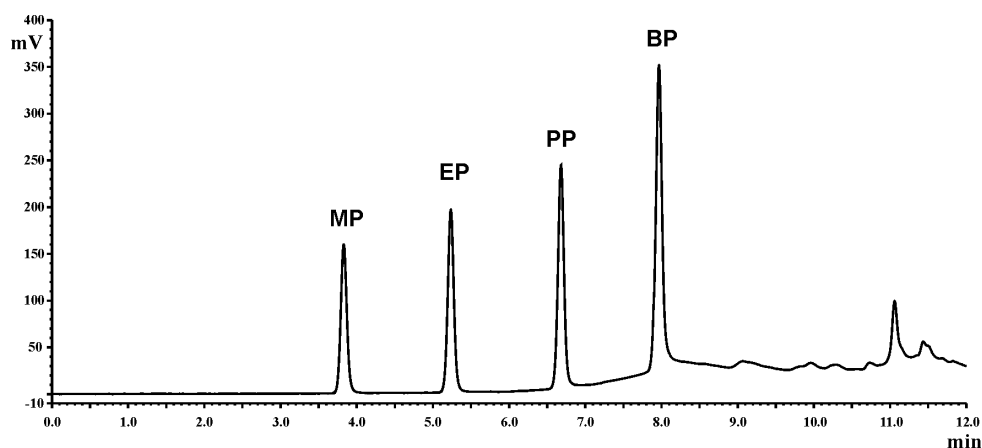
Celem niniejszej rozprawy było opracowanie metody analitycznej opartej o detekcję fluorescencyjną, która jest możliwa do zastosowania ze względu na obecność grup 4-hydroksyfenylowych w strukturze parabenów. Użycie detektora fluorescencyjnego zapewnia lepszą selektywność i czułość w stosunku do detektora absorpcji w nadfiolecie, a tym samym uproszczenie etapu przygotowania próbki do analizy.

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano doniesień dotyczących zastosowania detektora fluorescencyjnego do oznaczeń parabenów, dlatego też badania rozpoczęto od ustalenia warunków pracy detektora. Jak wiadomo działanie tego rodzaju detektora opiera się na zjawisku fluorescencji, czyli emisji światła oznaczanej substancji, wzbudzonej wysokoenergetycznym promieniowaniem UV. Wysoka selektywność jest uzyskiwana poprzez zastosowanie odpowiedniej długości fali wzbudzenia (λ_{ex}) oraz długości fali fluorescencji (λ_{em}).

W związku z tym, w celu wyznaczenia analitycznej długości fali wzbudzenia parabenów (λ_{ex}) wykorzystano detektor z matrycą fotodiodową (DAD – *diode array detector*) pozwalający na otrzymanie widma w zakresie od 200 do 950 nm. Na podstawie uzyskanego widma dla parabenu wybrano długość fali odpowiadającą maksimum absorpcji promieniowania $\lambda=254$ nm. Znając długość fali wzbudzenia wyznaczono długość fali emisji, która wynosiła 310 nm.

Po ustaleniu warunków detekcji, zoptymalizowano warunki analizy chromatograficznej, umożliwiające rozdzielenie parabenów.

Przykładowy chromatogram mieszaniny parabenów zamieszczono na **Rycinie 6**.



Ryc. 6. Chromatogram HPLC-FD uzyskany dla roztworu wzorcowego mieszaniny parabenów

Pierwszym krokiem w analizie ilościowej było sprawdzenie, w jakim zakresie stężeń parabenów występuje zależność liniowa pomiędzy wskazaniem detektora a stężeniem parabenów. W tym celu przygotowano szereg roztworów wzorcowych o znanych stężeniach i wykazano, że zakres ten wynosi od 0,05 – 20 $\mu\text{g/ml}$.

Granice wykrywalności i oznaczalności oszacowano na podstawie pomiaru stosunku sygnału do szumu (S/N). Dla granicy wykrywalności przyjęto trzykrotną wartość tego ilorazu, a dla granicy oznaczalności dziesięciokrotną. Odzysk i precyzję zbadano dla próbek o dwóch poziomach stężeń.

Otrzymane wyniki dla parametrów walidacyjnych zamieszczono w **Tabeli 17**.

Tab. 17. Parametry walidacyjne opracowanej metody HPLC-FD

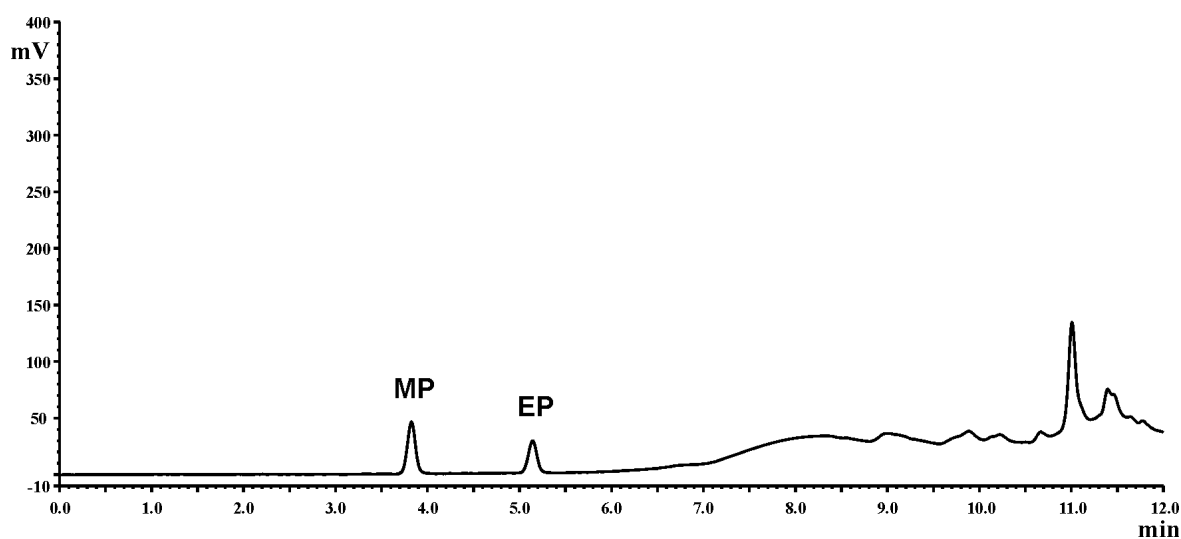
Parametry	MP	EP	PP	BP
Zakres liniowości [$\mu\text{g/ml}$] instrumentalny	0,05-20	0,05-20	0,05-20	0,05-10
Współczynnik korelacji (r^2)	1,0000	1,0000	0,9999	0,9998
Limit wykrywalności [$\mu\text{g/ml}$] instrumentalny	0,014	0,013	0,011	0,007
Limit oznaczalności [$\mu\text{g/ml}$] instrumentalny	0,046	0,042	0,037	0,024
Limit wykrywalności [$\mu\text{g/ml}$] metody	14	13	11	7
Limit oznaczalności [$\mu\text{g/ml}$] metody	46	42	37	24
Odzysk [%] (przy 0,2 $\mu\text{g/ml}$)	94,8	98,0	99,6	94,9
Odzysk [%] (przy 2 $\mu\text{g/ml}$)	98,2	98,1	99,4	97,1
Precyzja [%] (przy 0,2 $\mu\text{g/ml}$)	0,4	1,3	2,2	0,8
Precyzja [%] (przy 2 $\mu\text{g/ml}$)	1,0	2,5	0,6	1,7

Otrzymane wielkości odzysku i precyzja dla wyższych poziomów wzbogacania były zadowalające i mieściły się w zakresie od 97,1% do 99,4%. Precyzja, którą wyrażono jako względne odchylenie standardowe, również osiągała akceptowalne wartości poniżej 2,5%. Dla niższych poziomów wzbogacania, odzysk mieścił się w zakresie od 94,8% do 99,6% z zadowalającą precyzją, tj. względnym odchyleniem standardowym mniejszym od 2,2% - **Tabela 17**.

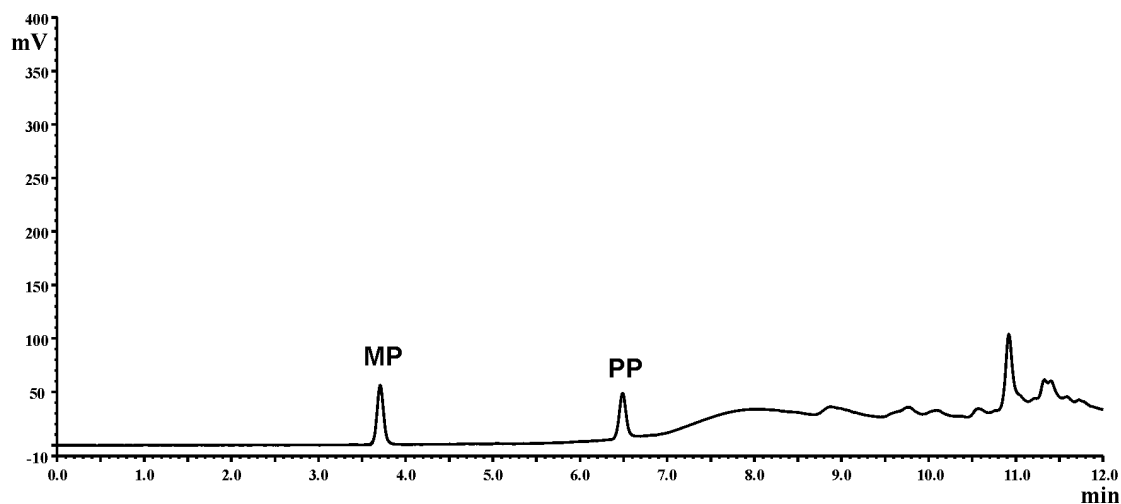
5.1.1. Analiza próbek kosmetyków

Oznaczenie zawartości parabenów w próbkach rzeczywistych przeprowadzono dwoma metodami - z zastosowaniem techniki chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną oraz metodą LC-MS/MS. Przetestowano trzy grupy produktów kosmetycznych, w tym 10 toników, 4 wody micelarne i 8 wód toaletowych.

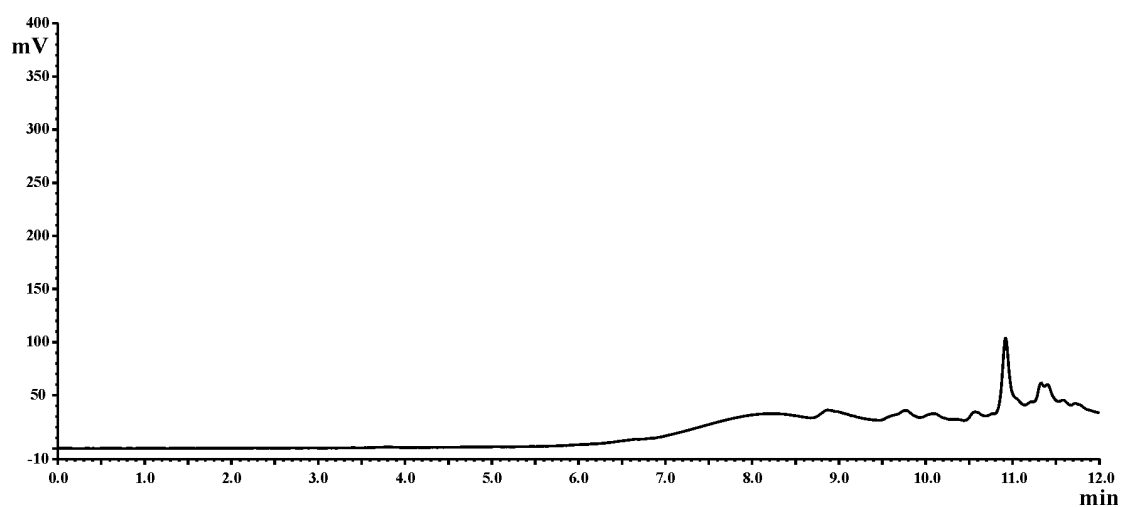
Wyniki badań przedstawiono w **Tabeli 18** (z wyjątkiem 5 próbek wody toaletowej, w których nie wykryto parabenów), a przykładowe chromatogramy próbek kosmetyków przedstawiono na **Rycinach 7-9**.



Ryc. 7. Chromatogram HPLC-FD uzyskany dla próbki toniku



Ryc. 8. Chromatogram HPLC-FD uzyskany dla próbki wody micelarnej



Ryc. 9. Chromatogram HPLC-FD uzyskany dla ślepej próby

5.1.2. Omówienie wyników zawartości parabenów w kosmetykach

Zawartość parabenów deklarowanych przez producenta na opakowaniu oraz oznaczonych metodami HPLC-FD i LC-MS/MS w próbkach produktów kosmetycznych przedstawiono w **Tabeli 18**.

W celu porównania zawartości oznaczonych parabenów w próbkach rzeczywistych - z limitami zawartymi w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady - uzyskane wartości w $\mu\text{g/ml}$ wyrażono jako stężenie %. Dopuszczalne stężenia parabenów w krajach UE wynoszą odpowiednio: po 0,4% dla MP i EP, dla sumy PP i BP 0,14%, a dla sumy wszystkich parabenów 0,8%.

Tab. 18. Zawartość parabenów w próbkach rzeczywistych (n=3)

Próbka (deklarowane parabeny)	Metoda detekcji	Stężenie parabenów [µg/ml]			
		MP	EP	PP	BP
T1 (MP, EP, PP, BP)	FD	1704 ±5	-	-	-
	MS/MS	1708 ±4	-	-	-
T2 (MP, EP)	FD	781 ± 2	130± 2	-	-
	MS/MS	778 ± 2	135± 1	-	-
T3 (MP, EP)	FD	1681±2	826±0,3	-	-
	MS/MS	1686±4	898±2	-	-
T4 (MP, PP)	FD	1499±1	-	173 ±1	-
	MS/MS	1559±2	-	178 ±1	-
T5 (MP)	FD	1949±2	-	-	-
	MS/MS	2091±3	-	-	-
T6 (MP)	FD	1604±1	-	-	-
	MS/MS	1628±6	-	-	-
T7 (MP)	FD	862±3	-	-	-
	MS/MS	863±1	-	-	-
T8 (MP)	FD	1593±2	-	-	-
	MS/MS	1606±3	-	-	-
T9 (brak)	FD	-	-	-	-
	MS/MS	-	-	-	-
T10 (brak)	FD	-	-	-	-
	MS/MS	-	-	-	-
M1 (MP, PP)	FD	1734 ±3	-	902±2	-
	MS/MS	1720±0,2	-	943±3	5,8±0,01
M2 (MP)	FD	2269±7	-	-	-
	MS/MS	2326±2	-	-	-
M3 (brak)	FD	-	-	-	-
	MS/MS	-	-	-	-
M4 (brak)	FD	-	-	-	-
	MS/MS	-	-	-	-
E1 (MP)	FD	-	-	-	-
	MS/MS	14±0,01	-	-	-
E2 (MP)	FD	-	-	-	-
	MS/MS	22±0,01	-	-	-
E3 (MP)	FD	-	-	-	-
	MS/MS	21±0,01	-	-	-

T1-T10 – próbki toników;

M1-M4 – próbki płynów micelarnych;

E1-E3 – próbki wód perfumowanych;

FD – detekcja fluorescencyjna;

MS/MS - detekcja z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas.

W **Tabeli 19** zamieszczono sumaryczną zawartość parabenów w próbkach, w których zostały one oznaczone.

Tab. 19. Sumaryczna zawartość parabenów w próbkach kosmetyków oznaczona metodą HPLC-FD.

Symbol próbki	Parabeny zadeklarowane przez producenta	Sumaryczne stężenie parabenów [% w/w]	Dopuszczalne stężenie parabenów w UE [% w/w]
T1	MP, EP, PP, BP	0,17	0,8
T2	MP, EP	0,09	0,8
T3	MP, EP	0,25	0,8
T4	MP, PP	0,16	0,8
T5	MP	0,19	0,4
T6	MP	0,16	0,4
T7	MP	0,09	0,4
T8	MP	0,16	0,4
M1	MP, PP	0,26	0,8
M2	MP	0,23	0,4

T1-T8 – próbki toników;

M1-M2 – próbki płynów micelarnych;

Jak wynika z **Tab. 18** stężenia parabenów były zgodne z wymaganiami Unii Europejskiej, a większość badanych toników i płynów micelarnych zawierała tylko substancje deklarowane. W próbce toniku T1 z parabenów wymienionych na opakowaniu MP, EP, PP, BP, stwierdzono obecność tylko MP. Najwyższe stężenie pojedynczego parabenu oznaczono w płynie micelarnym M2, który zawierał $2269 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0,23%) metyloparabenu, co jednocześnie nie przekraczało dopuszczalnej zawartości 0,4%.

Norma europejska została ustalona na dość wysokim poziomie 0,4 %, ponieważ uwzględniono, że rozpuszczalność MP w znacznym stopniu zależy od odczynu środowiska (wzrasta ze wzrostem pH), rodzaju rozpuszczalnika (wzrasta w obecności etanolu, gliceryny, glikolu propylenowego), obecności związków powierzchniowo czynnych. Wymienione substancje są bardzo często składnikami kosmetyków z wyjątkiem płynów micelarnych, bazujących głównie na wodzie.

Próbka M2 miała lekko kwasowy odczyn (pH=4,8) i zawierała glicerynę, glikol butylenowy i surfaktanty, które zwiększają rozpuszczalność MP w matrycy wodnej. Limity

sumy stężenia PP i BP (0,14%), a także całkowita zawartość parabenów nie zostały przekroczone w próbkach kosmetyków, gdzie deklarowano ich obecność. PP oznaczono tylko w dwóch próbkach (T4 i M1), a BP w ogóle nie wykryto. Dlatego sumaryczne stężenie PP i BP w próbce M1 określono na poziomie 902 $\mu\text{g/ml}$, tj. 0,09%. Najwyższe całkowite stężenie parabenów określone przy użyciu opracowanej metody HPLC-FD stwierdzono w próbkach T3 i M1. Tonik T3 zawierał MP i EP o sumarycznym stężeniu 0,25%, a w wodzie micelarnej M1 stwierdzono sumaryczne stężenie MP i PP na poziomie 0,26%. W próbce wody micelarnej M1 oznaczono BP za pomocą LC-MS/MS, ale nie wykryto go przy użyciu opracowanej metody HPLC-FD. W 3 próbkach wody toaletowej (E1, E2 i E3) oznaczono MP tylko przy użyciu LC-MS/MS, ponieważ stężenia parabenów, takich jak BP w M1 oraz MP w E1, E2 i E3 były poniżej zakresu oznaczalności metody HPLC-FD.

Podsumowując, główną zaletą opracowanej metody HPLC-FD jest krótki czas przygotowania próbki. W matrycach trzech rodzajów testowanych kosmetyków przeważa faza wodna w porównaniu do innych rodzajów produktów (np. kremów), a detektor fluorescencyjny zastosowany w tym badaniu jest znacznie bardziej selektywny i czuły niż szeroko stosowany detektor UV. Próbki były więc jedynie rozcieńczane, co zajmuje nie więcej niż 2 minuty na próbkę. Ponadto wprowadzenie na kolumnę chromatograficzną bardzo rozcieńczonych próbek wydłuża czas jej eksploatacji.

Porównanie tej metody z innymi stosowanymi do oznaczania parabenów w kosmetykach wyraźnie pokazuje, że jest tu mniej etapów przygotowania próbki (zwykle były 4 etapy) i mniej czasu jest wymagane do przygotowania jednej próbki (ok. 2 minut zamiast 45 minut). W większości procedur analitycznych do oznaczania parabenów w kosmetykach dodawano rozpuszczalnik, stosowano ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami. W wielu przypadkach także wstępnie wzbogacono i oczyszczano próbki kosmetyków przy użyciu: ekstrakcji do fazy stałej [306], mikroekstrakcji do pojedynczej kropli rozpuszczalnika [285], mikroekstrakcji do fazy stałej [307, 308], ekstrakcji za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego [288] i innych technik. Skomplikowane metody przygotowania próbki były stosowane nawet w przypadku stosunkowo prostych matryc, takich jak kosmetyki do demakijażu, żele, roztwory do płukania jamy ustnej i żele do włosów [285]. Pod tym względem prostota opracowanej metody stwarza mniejsze możliwości generowania błędów.

Należy podkreślić, że w przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy zastosowano metodę HPLC-FD do oznaczania parabenów w produktach kosmetycznych. Detektor fluorescencyjny oferuje zarówno wyższą selektywność jak i czułość w porównaniu z detektorem absorpcji w nadfiolecie. Z tego względu możliwym okazało się opracowanie

prostej procedury przygotowania próbki, polegającej na jej 1000-krotnym rozcieńczeniu, a uzyskane wyniki dla badanych kosmetyków potwierdzono metodą LC-MS/MS. Metodę HPLC-FD wykorzystano do analizy kosmetyków takich jak toniki, płyny micelarne i wody toaletowe. Wszystkie testowane próbki zawierały parabeny na poziomie zgodnym z obowiązującymi przepisami, nawet jeśli niektóre z nich zawierały związki, których nie zadeklarowano na etykietach. Proponowana procedura może być stosowana w wielu laboratoriach ze względu na swoją prostotę i brak konieczności posiadania drogiego sprzętu jakim jest LC-MS/MS.

5.2. Oznaczanie zawartości parabenów, bisfenolu A i kumylofenolu w próbkach wód powierzchniowych – zadanie II

Analiza próbek wód powierzchniowych w pierwszym kroku obejmowała dobór warunków ekstrakcji do fazy stałej. Przy użyciu opracowanej metody oznaczono MP, EP, PP, BP i BzP w wodach pochodzących z jezior i rzek. Na podstawie uzyskanych wyników, które wskazywały na sezonowość pojawiania się tych związków w większym stężeniu w miesiącach ciepłych, postanowiono przedłużyć okres testowania do 18 miesięcy. W okresie przedłużonego monitoringu oprócz parabenów oznaczano dodatkowo bisfenol A oraz kumylofenol. Miało to ułatwić interpretację wyników, przez odniesienie stężenia do znanego z literatury wpływu zakłócającego działanie układu endokrynnego.

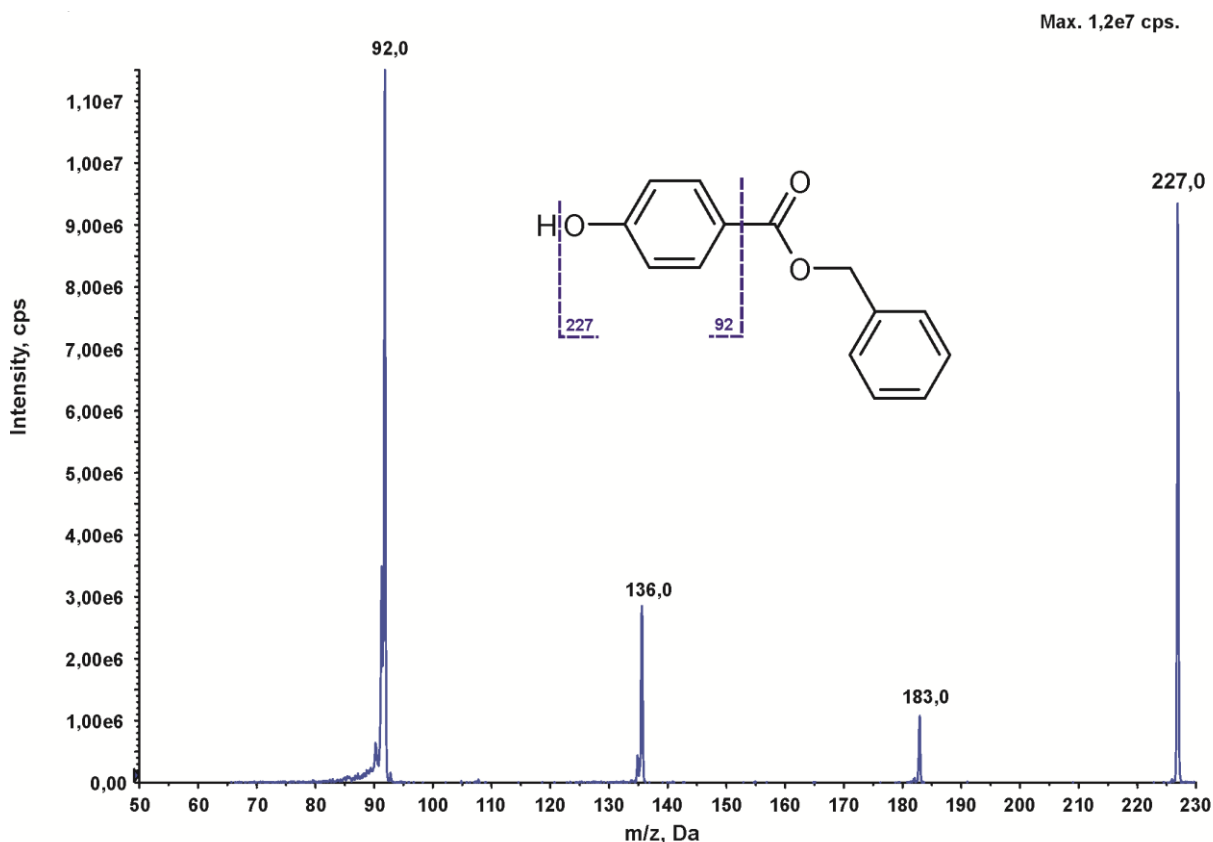
5.2.1. Oznaczanie zawartości parabenów

Przed przystąpieniem do analiz próbek środowiskowych w pierwszej kolejności należało opracować metodę oznaczania parabenów przy użyciu chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas, a w kolejnym etapie opracować procedurę ekstrakcji analitów z matrycy wodnej.

5.2.1.1. Analiza LC-MS/MS

Pierwszym krokiem w opracowaniu metody analitycznej wykorzystującej chromatografię do rozdzielania składników mieszaniny jest ustalenie warunków pracy detektora, w tym przypadku spektrometru mas. W tym celu przygotowano roztwory wzorcowe oznaczanych związków w 80% metanolu z dodatkiem $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ i za pomocą pompy infuzyjnej firmy Harvard Apparatus wprowadzono roztwory do źródła jonizacji spektrometru mas. W pierwszej kolejności wyznaczono potencjał rozbicia klastrow (DP) dla poszczególnych związków, a następnie zarejestrowano widma fragmentacji dla poszczególnych protonowanych cząsteczek i na tej podstawie wybrano odpowiednie pary jonów do analizy w trybie monitorowania wybranych reakcji rozpadu (MRM). Następnie zoptymalizowano potencjał wyjścia (CXP) oraz dobrano energię kolizji (CE) tak, aby uzyskać jak najwyższy sygnał analityczny.

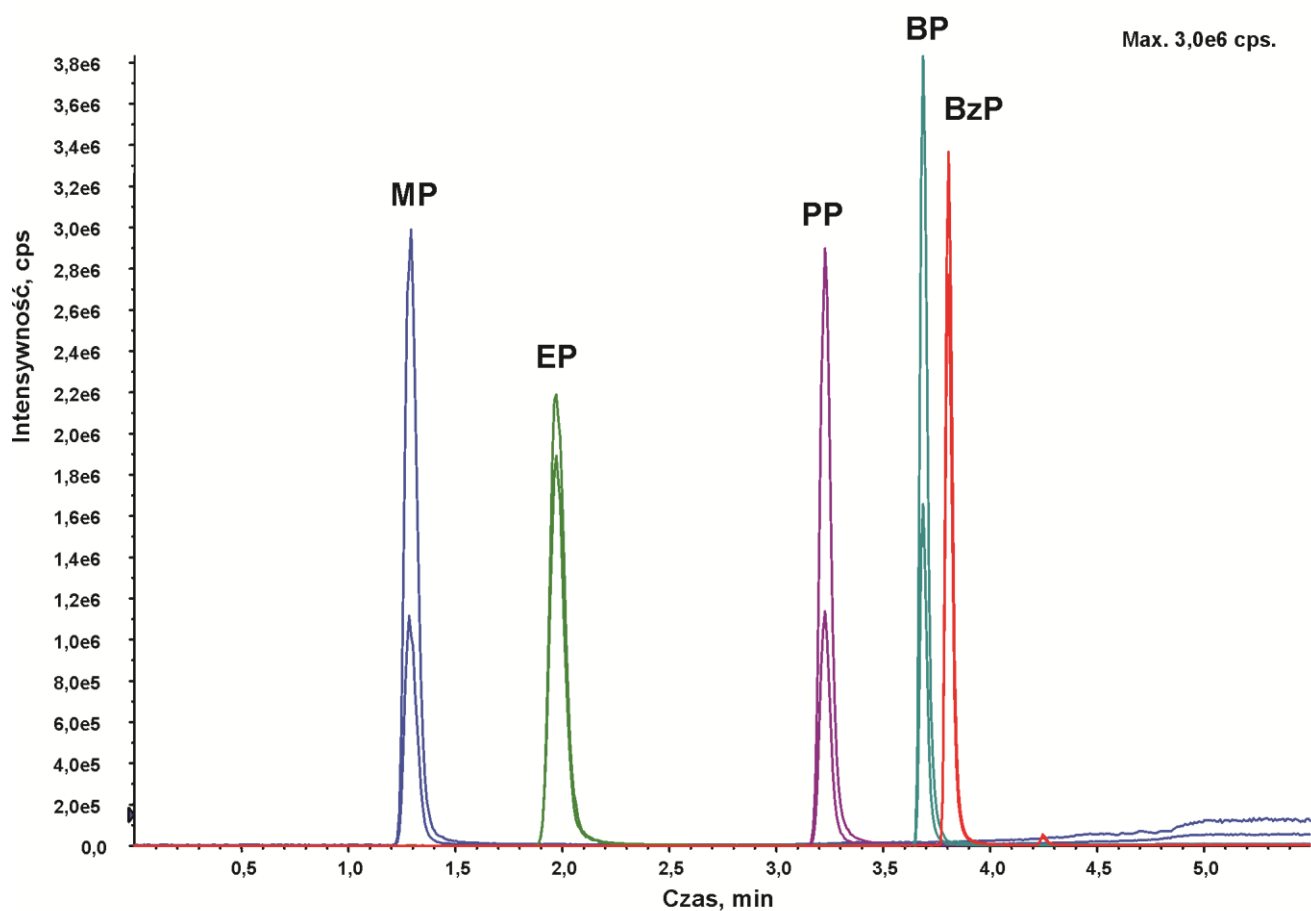
Przykładowe widmo rozpadu benzyloparabenu wraz z proponowaną fragmentacją przedstawiono na **Rycinie 10**. Ustalone warunki pracy spektrometru mas dla parabenów zamieszczono w **Tabeli 14**.



Ryc. 10. Widmo rozpadu benzyloparabenu przy energii kolizji -20 eV

Po ustaleniu warunków pracy detektora przystąpiono do opracowania warunków rozdzielania chromatograficznego mieszaniny pięciu parabenów. Okazało się, że zastosowanie jako fazy stacjonarnej krzemionki modyfikowanej łańcuchami oktadecylowymi, nie pozwoliło na rozdzielenie butyloparabenu i benzyloparabenu, na chromatogramie nie uzyskano wyraźnego rozdzielenia pików. Z tego względu analizę chromatograficzną prowadzono z zastosowaniem kolumny zawierającej sorbent z grupami fenylheksylowymi.

Warunki analizy przedstawione zostały w **Tabeli 12**. Przykładowy chromatogram mieszaniny parabenów przedstawiono na **Rycinie 11**.



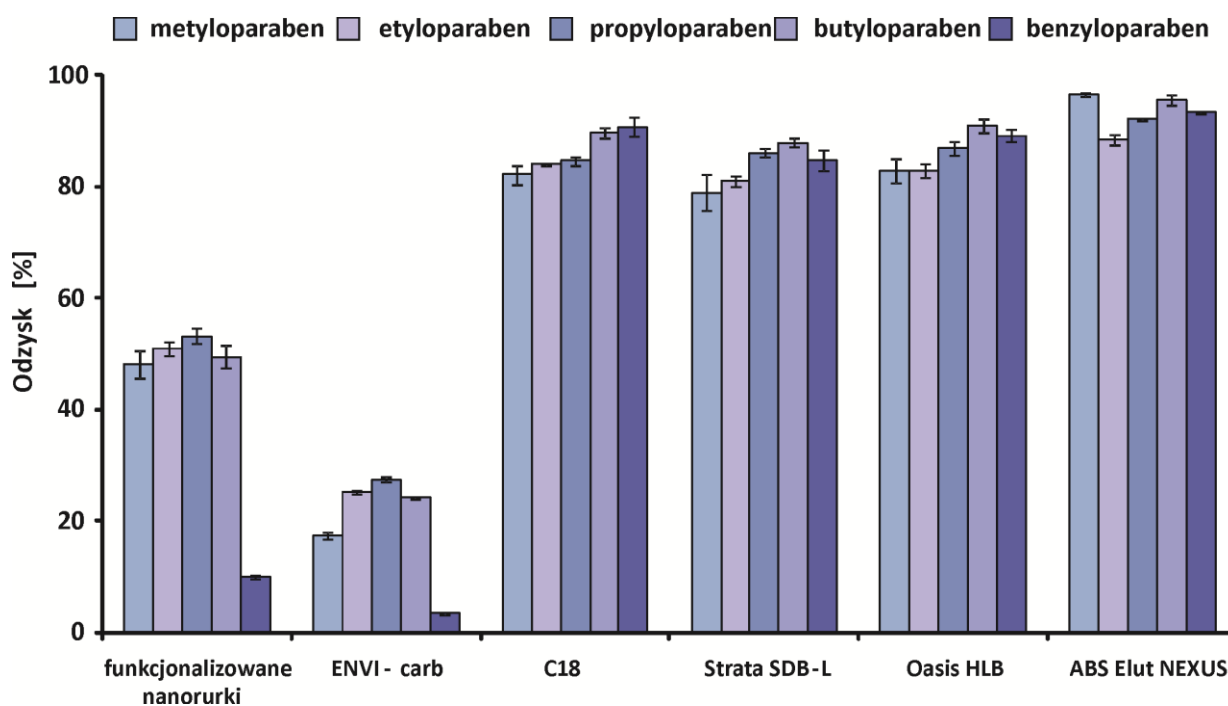
Ryc. 11. Chromatogram mieszaniny parabenów

5.2.1.2. Opracowanie metody ekstrakcji parabenów do fazy stałej

Ekstrakcja do fazy stałej to technika, która zapewnia wysoki stopień wzbogacenia analitów. Bardzo ważnymi parametrami dla opracowania metody ekstrakcji z użyciem tej techniki jest zarówno problem odpowiedniego doboru sorbentu, jak i rozpuszczalnika do elucji związków analizowanych. Parabeny są substancjami, w których wraz ze wzrostem

długości łańcucha bocznego zwiększa się ich charakter niepolarny, co należy uwzględnić przy doborze odpowiedniego sorbentu. Przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu wybranie złoża, które zapewni najlepszy odzysk analitów. Przetestowano komercyjnie dostępne kolumny ekstrakcyjne o pojemności 1 ml i masie złoża 30 mg oraz kolumny przygotowane w laboratorium o identycznych parametrach objętości i masy. Kolumny komercyjnie dostępne zawierały złoża polimerowe, takie jak: Strata SDB-L (kopolimer styren - diwinylobenzen), Oasis HLB (kopolimer diwinylobenzen - N-metylopirolidon), ABS Elut NEXUS (kopolimer metakrylan metylu - diwinylobenzen) oraz krzemionkowe modyfikowane z powierzchniowymi łańcuchami oktadecylowymi (C18 Polar Plus). Z kolei kolumny przygotowane w laboratorium zawierały: grafityzowaną sadzę (z kolumny ENVI-Carb) oraz nanorurki funkcjonalizowane grupami karboksylowymi.

Otrzymane odzyski dla parabenów na poszczególnych złożach przedstawiono na **Rycinie 12**.



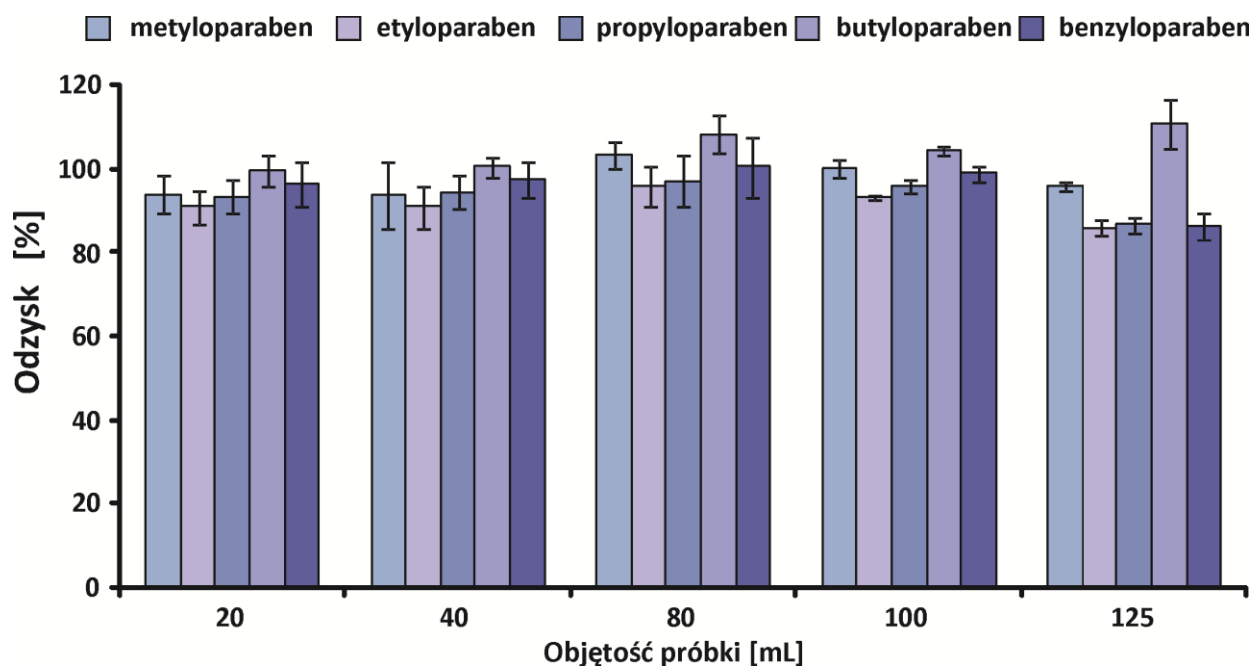
Ryc. 12. Odzyski parabenów uzyskane z użyciem różnych sorbentów. Objętość próbki 10 ml, elucja 2 ml metanolu

Odzyski parabenów przy użyciu złoża grafityzowanej sadzy ENVI-carb były najniższe. Wyższe wartości uzyskano dzięki zastosowaniu nanorurek węglowych funkcjonalizowanych grupami karboksylowymi. Niestety dla większości parabenów wynosiły one około 50%, a dla benzyloparabenu poniżej 10%. Zastosowanie innych sorbentów pozwoliło uzyskać

korzystniejsze wyniki. Odzyski parabenów ze złoża krzemionki modyfikowanej powierzchniowo łańcuchami C18, Strata SDB-L i Oasis HLB wynosiły 80–90%. Natomiast najlepsze wyniki otrzymano po zastosowaniu złoża ABS Elut-Nexus i dlatego kolumnienki wypełnione tym złożem wykorzystano do dalszych analiz.

W kolejnym etapie optymalizacji metody wybrano rozpuszczalnik do elucji zaadsorbowanych analitów. Do testów zastosowano metanol i acetonitryl. Na podstawie zebranych wyników stwierdzono, że odzysk parabenów jest lepszy przy elucji metanolem. W związku z tym do dalszych badań używano metanolu.

W następnym badaniu przetestowano odzyski poszczególnych związków dla różnych objętości próbek przy jednakowej zawartości parabenów wprowadzanych na sorbent. Wyniki odzysku parabenów przedstawiono na **Rycinie 13**.



Ryc. 13. Odzyski parabenów uzyskane z użyciem złoża ABS Elut-Nexus dla różnych objętości próbki

Na podstawie analizy otrzymanego wykresu można wywnioskować, że maksymalna objętość próbki wprowadzana na kolumnienkę zawierającą 30 mg sorbentu, powinna wynosić 100 ml, ponieważ dalsze zwiększanie objętości próbki prowadzi do obniżenia odzysku.

Po opracowaniu metody ekstrakcji do fazy stałej na próbkach modelowych, metodę sprawdzono w odniesieniu do próbek rzeczywistych. Jako matryca posłużyła woda pobrana z rzeki Warty. Adsorpcję prowadzono z objętości 100 ml próbki, wprowadzając ją na sorbent ABS Elut-Nexus o masie 30 mg. Zaadsorbowane związki eluowano 2 ml metanolu.

Uzyskane wyniki zamieszczono w **Tabeli 20** wraz z odzyskami otrzymanymi dla próbek modelowych.

Tab. 20. Odzysk parabenów z próbek modelowych i środowiskowych wzbogaconych na poziomie 0,0005 µg/ml

Próbka i masa sorbentu	Odzysk [%] (RSD [%])				
	MP	EP	PP	BP	BzP
Próbka modelowa 30 mg sorbentu	100,1 (2,3)	93,3 (0,5)	95,9 (1,7)	104,4 (1,0)	99,0 (2,0)
Próbka środowiskowa 30 mg sorbentu	80,4 (8,6)	95,6 (4,2)	102,8 (3,7)	56,6 (1,3)	65,2 (1,5)
Próbka środowiskowa 60 mg sorbentu	89,1 (2,2)	98,6 (4,4)	100,4 (4,8)	92,9 (9,8)	89,0 (4,4)

RSD (*relative standard deviation*) – względne odchylenie standardowe

Odzyski otrzymane dla próbek środowiskowych są niższe w porównaniu z próbkami modelowymi. Zjawisko to może być wynikiem konkurencyjnej adsorpcji zanieczyszczeń pochodzących z wody rzecznej. Użycie złoża o masie 30 mg może być niewystarczające do izolacji analitów w przypadku analizy próbek rzeczywistych. W celu poprawy odzysków masę sorbentu podwojono z 30 do 60 mg, co zapewniło wyższy poziom odzysku butyloparabenu i benzyloparabenu - **Tabela 20**. Ze względu na zwiększoną masę złoża sprawdzono również objętość eluentu potrzebną do wymycia zaadsorbowanych analitów. Wyniki otrzymane w tym eksperymencie wskazują, że do wymycia wystarcza objętość 2 ml metanolu. Precyzja opracowanej metody uzyskana przy użyciu 60 mg sorbentu była zadowalająca.

5.2.1.3. Efekt matrycy

Opracowując nową metodę, w której oznaczenia przeprowadza się z użyciem spektrometru mas należy sprawdzić efekt matrycy, czyli jak matryca wpływa na proces jonizacji związków oznaczanych. Zastosowanie źródła typu elektrosprej pozwala z jednej strony na usunięcie nadmiaru rozpuszczalnika, a z drugiej na zjonizowanie cząsteczek analizowanych. Proces jonizacji analitów nie jest doskonały w momencie, gdy próbka zawiera bogatą matrycę, która zakłóca ten proces poprzez zmniejszenie lub zwiększenie ilości wytwarzanych w źródle jonów. Nadmierny wpływ matrycy nie pozwoli poprawnie oznaczyć

analitów, dlatego podczas walidacji metody analitycznej należy sprawdzić, czy efekt ten nie przeszkadza w analizie ilościowej. Efekt matrycy określono zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Ferrera i wsp. [309], która polega na przygotowaniu serii roztworów wzorcowych w standardowo stosowanym w danej analizie rozpuszczalniku oraz w typowo przygotowanej matrycy próbki. Następnie wykreśla się dwie krzywe zależności sygnału analitycznego (powierzchni piku) od stężenia wzorca i porównuje ich nachylenia. Efekt matrycy (ME) oblicza się na podstawie ilorazu nachylenia krzywej w matrycy próbki (B) do krzywej w rozpuszczalniku wzorca (A) zgodnie z równaniami:

$$ME = B/A$$

$$ME (\%) = B/A \cdot 100$$

Wartości otrzymane we wzorze pierwszym większe niż 1 oznaczają wzmocnienie sygnału przez matrycę próbki, a wartości niższe niż 1 oznaczają obniżenie sygnału. Przyjmuje się, że dla analizy śladowej związków organicznych wartości te mogą występować w zakresie od 0,80 do 1,20, przy czym im bliższe są jedności, tym dokładniejsze otrzymuje się wyniki. Natomiast wzór drugi wyraża efekt matrycy w procentach. Otrzymane wyniki dotyczące efektu matrycy zebrano w **Tabeli 21**.

Tab. 21. Efekt matrycy

Parametry	MP	EP	PP	BP	BzP
Nachylenie krzywej kalibracyjnej dla wzorców (A)	16438138	13055236	15961669	16752713	11902910
Nachylenie krzywej kalibracyjnej dla próbek (B)	18686615	11502227	18432906	16829025	12263449
Efekt matrycy (B/A)	1,14	0,88	1,15	1,00	1,03

Jak wynika z powyższej tabeli, wszystkie otrzymane wartości stosunku nachylenia krzywych mieszczą się w zakresie 0,88 do 1,15. Zatem efekt matrycy nie miał znaczącego wpływu na wyniki uzyskiwane opracowaną metodą.

5.2.1.4. Liniowość, granica wykrywalności i oznaczalności metody

Kolejnym krokiem w opracowaniu metody po wcześniejszym ustaleniu odzysku, precyzji i efektu matrycy jest wyznaczenie granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) metody oraz sprawdzenie zakresu liniowości i współczynników korelacji w badanym zakresie stężeń. LOD (*Limit of Detection*), czyli granica wykrywalności to najmniejsza ilość substancji

możliwa do wykrycia za pomocą danej metody analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. LOQ (*Limit of Quantification*), czyli granica oznaczalności to najmniejsza ilość substancji możliwa do oznaczenia za pomocą danej metody analitycznej z odpowiednią dokładnością i precyzją. W obliczeniach LOD i LOQ zastosowano metodę pomiaru stosunku sygnału do szumu. Dla granicy wykrywalności przyjęto trzykrotną wartość tego iloczynu, a dla granicy oznaczalności dziesięciokrotną. Parametry walidacyjne metody oznaczania parabenów przedstawiono w **Tabeli 22**.

Tab. 22. Parametry walidacyjne metody oznaczania parabenów

Parametr	MP	EP	PP	BP	BzP
Zakres krzywej kalibracji [ng/l]	5-500	10-1000	5-500	1-500	1-500
Współczynnik korelacji (r^2)	0,9959	0,9998	0,9990	0,9982	0,9986
Granica wykrywalności [ng/l]	1,2	2,9	0,5	0,3	0,4
Granica oznaczalności [ng/l]	4,1	9,5	1,7	1,1	1,4
Efekt matrycy	1,14	0,88	1,15	1,00	1,03
Odzysk* [%] (RSD [%])	80,4 (8,6)	95,6 (4,2)	102,8 (3,7)	56,6 (1,3)	65,2 (1,5)
Odzysk** (RSD [%])	89,1 (2,2)	98,6 (4,4)	100,4 (4,8)	92,9 (9,8)	89,0 (4,4)

*Odzysk przy 30 mg złoża kolumny SPE. **Odzysk przy 60 mg złoża kolumny SPE.

Wysoki współczynnik wzbogacenia dla opracowanej metody (do 1000 razy) i wykorzystanie chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas zapewnia stosunkowo niskie granice wykrywalności i oznaczalności. Granice wykrywalności parabenów wyznaczono na poziomie nie wyższym niż 3 ng/l, a oznaczalności na poziomie jednego do kilku ng/l. Liniowość kształtowała się w przedziale od granicy oznaczalności do 500 ng/l dla większości parabenów (aż do 1000 ng/l dla etyloparabenu).

5.2.2. Wyniki oznaczania zawartości parabenów w wodach powierzchniowych Wielkopolski (maj - grudzień 2014)

Opracowaną metodę opartą na ekstrakcji parabenów do fazy stałej oraz ich oznaczania z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas zastosowano do analizy wód powierzchniowych. Sprawdzone obecność tych związków w trzech wybranych jeziorach w okolicy Poznania oraz w Samicy Kierskiej, w Kanale Szymanowo-Grzybno i rzece Warcie w 5 miejscach jej biegu.

W próbkach jeziornych z maja 2014 oznaczono tylko metyloparaben i propyloparaben w stężeniach odpowiednio 10-23 ng/l oraz 5-7 ng/l. Natomiast stężenia wymienionych

parabenów w lipcu były 2-5 razy wyższe. Ponadto, stwierdzono także obecność butyloparabenu i benzyloparabenu w stężeniach nieprzekraczających 9 ng/l - **Tabela 23**.

Tab. 23. Stężenia parabenów w próbkach wody jeziornej (n=3)

Jezioro	Stężenie parabenów w środowisku naturalnym [ng/l] +/- SD				
	MP	EP	PP	BP	BzP
Maj					
Tuczno	11,7±0,7	-	5,5±0,2	-	-
Białokoskie	9,9±1,0	-	4,9±0,1	-	-
Kubek	22,7±1,0	-	7,0±0,1	-	-
Lipiec					
Tuczno	48,7±2,5	-	9,9±1,2	7,0±0,3	4,1±0,6
Białokoskie	24,3±2,5	-	10,0±1,0	4,3±0,2	-
Kubek	40,5±1,0	-	10,1±1,2	8,8±0,3	3,7±0,5

W próbkach wody rzecznej pobranej w maju 2014 stężenia parabenów wynosiły od 2,4 do 466 ng/l - **Tabela 24**. Stężenie metyloparabenu i propyloparabenu oznaczono na tym samym poziomie, jak w przypadku jezior. Ponadto, butyloparaben był obecny w trzech próbkach wody rzecznej, a benzyloparaben tylko w jednej. Wszystkie badane parabeny oznaczono w próbce wody z kanału. W próbkach wody rzecznej pobranych w lipcu zaobserwowano znacznie wyższy poziom stężeń parabenów niż w maju. Metyloparaben oznaczono w zakresie stężeń od 36 do 466 ng/l, a propyloparaben od 9 do 144 ng/l. Co więcej, butyloparaben i benzyloparaben były obecne w każdej próbce. W trzech z sześciu analizowanych próbek znaleziono śladowe ilości etyloparabenu. W próbkach wody rzecznej pobranej w grudniu oznaczono niższe stężenia parabenów w porównaniu ze stanem w lipcu. Jednocześnie zauważono, że dla około połowy miejsc pobierania próbek stężenia parabenów były niższe niż w miesiącach letnich, ale jednak wyższe w porównaniu ze stanem w maju tego roku.

Zanieczyszczenie wód powierzchniowych parabenami jest ściśle antropogeniczne. Jako konserwanty, związki te nie należą do łatwo biodegradowalnych. Trafiają do środowiska bezpośrednio lub z oczyszczalni ścieków. Należy podkreślić, że zużycie produktów zawierających parabeny jest nasilone latem, co jest związane ze wzmożonym stosowaniem kosmetyków chroniących przed promieniowaniem słonecznym i antyperspirantów.

Tab. 24. Stężenia parabenów w próbkach wody rzecznej (n=3)

Rzeka	Stężenie parabenów w środowisku naturalnym [ng/l] +/- SD				
	MP	EP	PP	BP	BzP
Maj					
Samica Kierska Niemieckowo	13,7 ± 1,8	-	3,7 ± 0,2	-	-
Warta Mściszewo	15,0 ± 0,7	-	2,4 ± 0,2	17,7 ± 2,3	-
Warta Poznań	14,7 ± 0,4	-	2,8 ± 0,1	5,1 ± 0,4	-
Warta Rogusko	22,6 ± 1,5	-	23,3 ± 2,7	14,4 ± 1,0	-
Warta Radzewice	8,7 ± 0,2	-	5,0 ± 0,4	-	-
Warta Wiórek	11,9 ± 0,6	-	-	-	3,9 ± 0,2
Kanał Szymanowo-Grzybno (Baranowo)	17,0 ± 0,7	< LOQ	10,6 ± 1,0	14,0 ± 1,4	4,3 ± 0,5
Lipiec					
Samica Kierska Niemieckowo	155 ± 17	< LOQ	102 ± 3	10,0 ± 0,9	3,5 ± 0,2
Warta Mściszewo	139 ± 11	< LOQ	144 ± 9	8,8 ± 0,5	2,7 ± 0,3
Warta Poznań	211 ± 7	-	29,1 ± 1,8	7,4 ± 0,9	3,0 ± 0,1
Warta Rogusko	466 ± 10	< LOQ	86,2 ± 1,9	8,7 ± 1,2	4,3 ± 0,1
Warta Radzewice	173 ± 5	-	17,4 ± 0,9	8,4 ± 0,5	3,6 ± 0,5
Warta Wiórek	36,1 ± 4,2	-	9,4 ± 0,2	6,0 ± 0,2	8,6 ± 1,1
Kanał Szymanowo-Grzybno (Baranowo)	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano
Grudzień					
Samica Kierska Niemieckowo	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano	Nie badano
Warta Mściszewo	70,7 ± 8,3	-	46,1 ± 1,6	14,0 ± 1,2	-
Warta Poznań	16,4 ± 1,0	-	21,1 ± 3,4	-	-
Warta Rogusko	14,6 ± 1,7	-	42,6 ± 0,5	-	-
Warta Radzewice	29,3 ± 4,5	-	22,0 ± 3,3	-	-
Warta Wiórek	29,9 ± 4,4	-	12,8 ± 0,5	8,8 ± 0,4	-
Kanał Szymanowo-Grzybno (Baranowo)	58,0 ± 3,0	-	26,1 ± 0,9	19,6 ± 1,6	-

W świetle dostępnych danych literaturowych [29, 39-41, 46, 310-312] w większości przypadków stężenia parabenów w wodach rzecznych, deklarowane przez autorów badań były niższe niż wartości uzyskane dla wód Wielkopolski. Jednocześnie należy podkreślić, że większość autorów nie podała informacji na temat czasu pobierania próbek. Tak więc wyniki uzyskane w tym badaniu dla próbek pobranych w maju (**Tabela 24**) okazały się być na tym samym poziomie stężeń, odnotowanych jako najniższe w badaniach światowych (**Tabela 25**). Z kolei wyniki uzyskane dla krajowych próbek pobranych w lipcu (**Tabela 24**) są wysokie. Jednocześnie podobne wartości (szczególnie dla metyloparabenu i propyloparabenu) uzyskano dla rzek w Walii (Wielka Brytania) i dla strumieni miejskich

rejonu Tokushima i Osaka (Japonia), co przedstawiono w **Tabeli 25**. Wyższe stężenia parabenów oznaczono tylko w delcie Rzeki Perłowej (południowe Chiny).

Tab. 25. Porównanie poziomów stężenia parabenów oznaczonych w wodach rzecznych w skali globalnej

Miejsce próbkowania	Stężenie parabenów [ng/l]					Lit.
	MP	EP	PP	BP	BzP	
Wielkopolska	8,7-465,6	nw*-no**	nw-144,4	nw-19,6	nw-8,6	dane w pracy
Rejon Tokushimy i Osaki, Japonia	25-676	<1,3-64	<0,8-207	<0,6-163	<0,2-2,3	29
Południowa Walia, Wielka Brytania	<0,3-400	<0,5-15	<0,2-24	<0,3-52	-	39
Południowe Indie	nw-22,8	2,47-147	nw-57,0	no	-	41
Północnozachodnia Szwajcaria	3,1-17	<0,3-1,6	<0,5-5,8	<0,2-2,8	<0,2-4,4	40
Galia, Hiszpania	1,8-17,3	no - 3	no	no	no	46
Obszar Ria de Aveiro, Portugalia	<1,6-62	<0,3-6,7	<0,5-64	<0,2-242	<0,2-0,3	310
Delta Rzeki Perłowej, Południowe Chiny	no-1062	-	no-3142	nw	-	311
Rejon środkowego Pacyfiku, Japonia	2,1-5,4	no	4,9-25	no-12	-	312

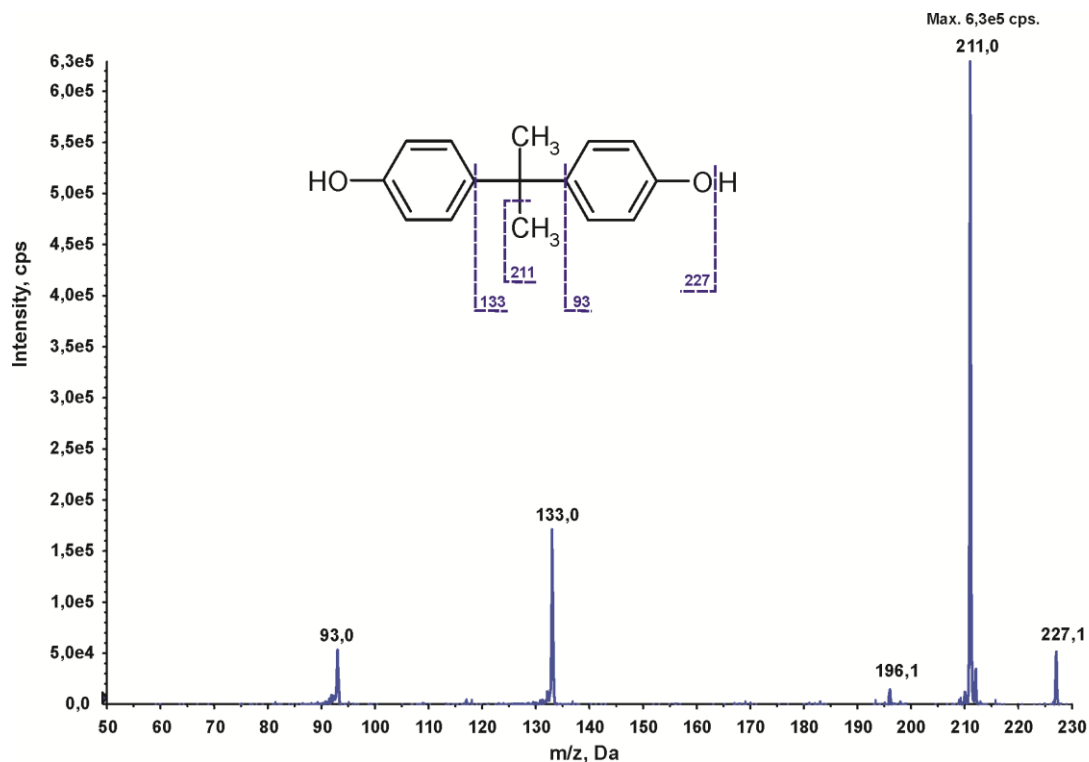
nw* - nie wykryto

no** - nie oznaczono

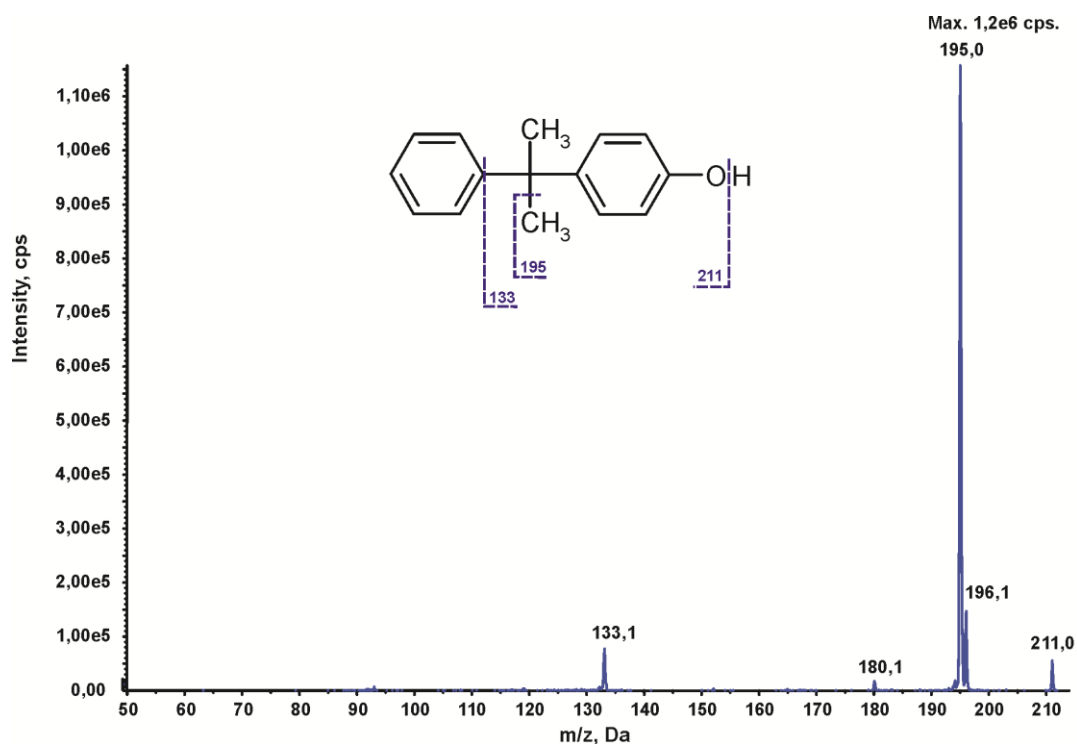
5.2.3. Oznaczanie zawartości parabenów, bisfenolu A i kumylofenolu

Z uwagi na uzyskane wyniki w czasie oznaczania parabenów, które mogłyby wskazywać na sezonowość pojawiania się tych związków w środowisku, postanowiono przedłużyć ich monitoring. Ponadto grupę oznaczanych związków rozszerzono o bisfenol A i CP, które należą do substancji o wysokiej aktywności estrogenowej. Zastosowana w tym przypadku metoda analityczna została oparta na procedurze SPE opisanej dla parabenów (paragraf 5.2.1.2.). Jednocześnie zmodyfikowanie analizy chromatograficznej LC-MS/MS umożliwiło równoczesne oznaczanie BPA i CP oraz pięciu parabenów, a ponadto przy niższych poziomach stężenia niż deklarowano poprzednio.

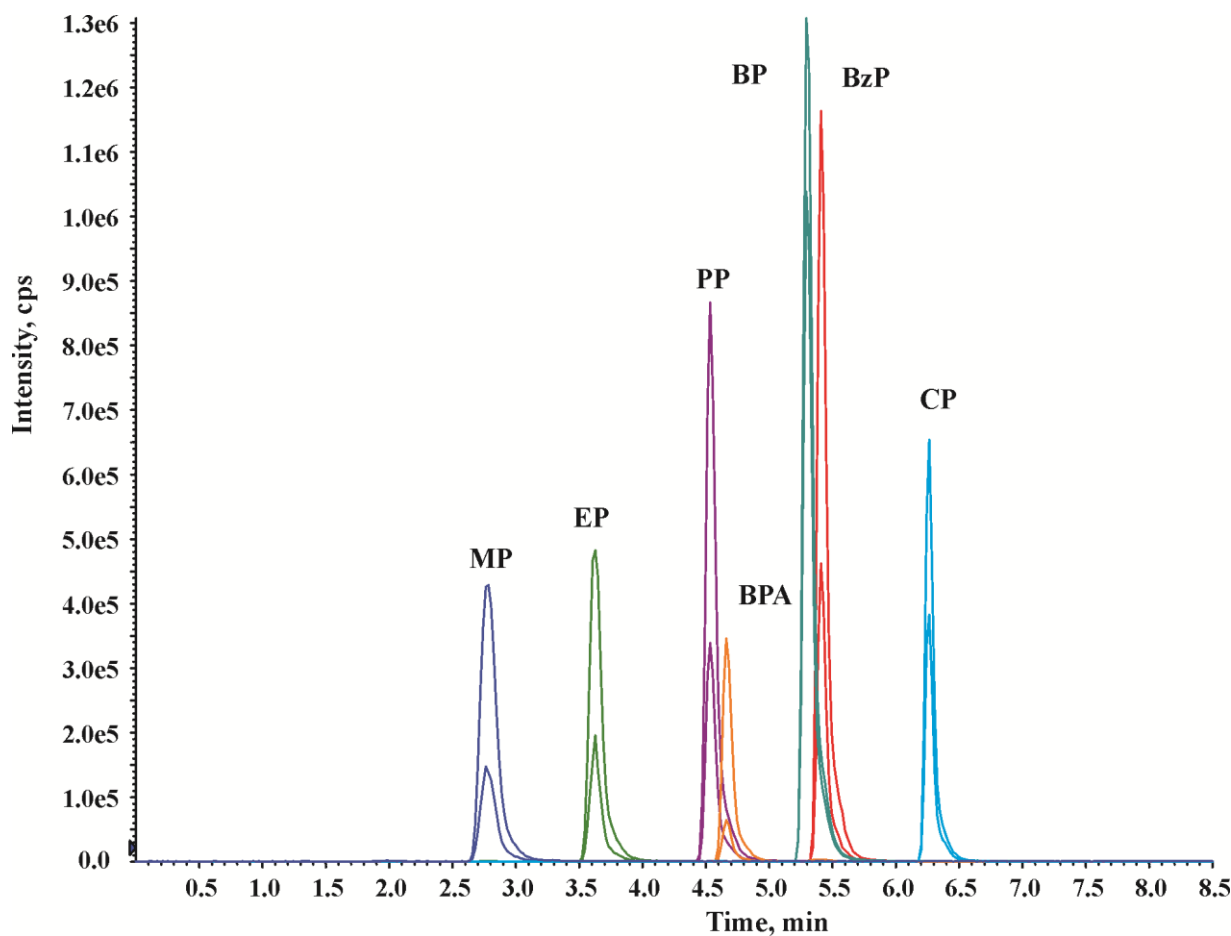
Opracowując nową metodę chromatograficzną w pierwszej kolejności dobrano warunki pracy spektrometru mas dla bisfenolu A i kumylofenolu. Ustalono pary MRM dla tych związków na podstawie widm fragmentacyjnych (**Ryciny 14 i 15**). Przykładowy chromatogram mieszaniny wszystkich oznaczanych związków przedstawiono na **Rycinie 16**.



Ryc. 14. Widmo fragmentacyjne bisfenolu A uzyskane dla energii kolizji -40 eV



Ryc. 15. Widmo fragmentacyjne kumylofenolu uzyskane dla energii kolizji -40 eV



Ryc. 16. Chromatogram oznaczanych związków: parabenów, BPA i CP

Zmodyfikowana metoda została w pełni zvalidowana, a wyniki zostały przedstawione w **Tabeli 26**. W świetle uzyskanych rezultatów można stwierdzić, że metoda została poprawnie opracowana, co wskazuje na możliwość jej wykorzystania do oznaczania parabenów, BPA i CP w wodach powierzchniowych. Granice wykrywalności (od 0,1 do 2 ng/l) i oznaczalności (od 0,4 do 5 ng/l) są niskie, liniowość ma szeroki zakres (od granicy oznaczalności do 400 ng/l dla parabenów i 4000 ng/l dla fenoli), pomimo że zaobserwowano niewielki efekt matrycy. Z tego względu użyto wzorców znakowanych izotopowo MP $^{13}\text{C}_6$ i BPA d_{16} . W tym przypadku uzyskano również odpowiedni odzysk i precyzję metody. Opracowana metoda jest stosunkowo prosta i z akceptowalnymi kosztami operacyjnymi z powodu ograniczonej liczby etapów analitycznych, zużycia małych objętości rozpuszczalników i materiałów eksploatacyjnych oraz stosunkowo krótkiego czasu analizy LC-MS/MS.

Tab. 26. Parametry walidacyjne metody oznaczania parabenów, BPA i CP

Parametr	MP	EP	PP	BP	BzP	BPA	CP
Zakres krzywej kalibracji [ng/l]	1-400	1-400	0,5-400	0,5-400	0,5-400	5-4000	5-4000
Współczynnik korelacji (r^2)	0,9995	0,9994	0,9994	0,9994	0,9996	0,9997	0,9999
Granica wykrywalności [ng/l]	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	2	2
Granica oznaczalności [ng/l]	1,1	0,7	0,4	0,5	0,5	5	5
Efekt matrycy	0,83	0,91	0,98	0,92	0,93	0,89	0,98
Odzysk [%] (RSD [%])	97,8 (2,1)	106,5 (2,1)	105,8 (1,3)	106,9 (1,3)	102,3 (3,3)	93,8 (2,00)	97,3 (2,3)

5.2.4. Wyniki oznaczania zawartości parabenów, BPA i kumylofenolu w wodach powierzchniowych Wielkopolski (w okresie od marca 2015 do września 2016)

W ramach przedłużonego monitoringu śledzono zmiany stężenia parabenów, BPA i kumylofenolu od marca 2015 do września 2016. Pobierano próbki z 15 lokalizacji (6 jezior, 8 rzek i jednego kanału) i oznaczano zawartość analitów w wodach powierzchniowych Wielkopolski. Wyniki zebrano w **Tabeli 27**.

MP oznaczono we wszystkich próbkach, w zdecydowanie wyższych stężeniach od pozostałych parabenów, na poziomie od kilkunastu ng/l do najwyższego 1600 ng/l. Pozostałe parabeny występowały na poziomach stężeń nieprzekraczających 10 ng/l, z tego BzP w najmniejszych ilościach. Należy podkreślić, że chociaż MP występował w największych ilościach spośród wszystkich parabenów, to równocześnie jest on uważany za najbezpieczniejszy z tej grupy związków [9,21,313]. Tak więc, wpływ czterech pozostałych parabenów (EP, PP, BP i BzP) na organizmy żywe może być porównywalny do oddziaływania jednego tj. MP.

Tab. 27. Stężenia parabenów, BPA i CP w analizowanych próbkach wód jeziornych i rzecznych (n=3)

Miejsce pobrania próbki	Czas pobrania próbki	Stężenie [ng/l]±SD						
		MP	EP	PP	BP	BzP	BPA	CP
Jeziora								
Bnińskie (L5)	03.2015	9,1±0,9	10,1±0,3	5,2±0,4	4,2±0,1	0,7±(<0,1)	12,4±1,5	nw ^a
	06.2015	nb ^b	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	08.2015	45,6±1,5	13,7±0,4	9,8±0,4	3,4±0,2	0,6±0,1	18,4±0,9	nw
	10.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	03.2016	11,0±0,1	2,2±0,2	2,8±0,2	3,7±0,4	0,9±0,1	52,1±4,6	no ^c
	06.2016	87,7±4,3	3,3±0,2	9,9±0,7	2,8±0,5	no	31,3±5,5	no
	09.2016	7,4±0,5	2,5±0,3	2,6±0,5	0,6±0,1	nw	9,3±1,3	nw
Bytyńskie (L2)	03.2015	14,0±0,4	11,2±0,6	4,7±0,6	5,1±0,7	1,1±(<0,1)	21,1±1,8	nw
	06.2015	66,4±5,1	6,9±0,6	2,7±0,4	3,5±0,4	0,8±0,1	8,8±1,3	4,5±0,5
	08.2015	17,6±1,3	7,0±0,6	2,9±0,1	2,9±0,1	2,9±0,2	no	nw
	10.2015	65,1±1,3	4,3±0,4	4,2±0,3	5,9±0,2	4,2±0,4	22,9±0,7	nw
	03.2016	8,4±0,6	2,1±0,2	4,3±0,2	1,8±0,1	no	95,0±8,6	nw
	06.2016	18,5±1,2	1,9±0,1	7,9±0,5	2,4±0,3	0,5±2,0	13,4±0,9	1,5±0,1
	09.2016	3,6±0,6	2,0±0,2	1,1±0,1	no	no	8,3±1,0	nw
Lutowskie (L4)	03.2015	13,5±1,2	10,1±0,2	5,2±0,4	4,5±0,1	0,8±0,1	6,9±0,7	nw
	06.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	08.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	10.2015	66,3±8,3	5,1±0,1	9,9±0,7	1,8±0,1	0,6±0,1	11,6±0,8	nw
	03.2016	6,7±0,5	1,4±0,1	5,1±0,4	2,0±0,2	0,4 (<0,1)	17,7±1,5	nw
	06.2016	117,0±3,3	2,9±0,1	8,3±0,5	3,6±0,1	5,7±3,2	18,1±2,0	no
	09.2016	33,1±2,1	2,5±0,4	6,6±0,2	1,0±0,1	no	23,2±2,2	nw

Śremskie (L1)	03.2015	17,4 ± 0,8	10,4 ± 0,5	6,8 ± 0,3	4,1 ± 0,3	0,7 ± 0,1	11,1 ± 1,5	nw
	06.2015	31,0 ± 5,6	6,1 ± 0,3	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	11,2 ± 1,6	nw
	08.2015	103,7 ± 7,1	6,4 ± 0,5	4,1 ± 0,4	2,9 ± 0,1	0,5 ± (< 0,1)	4,8 ± 0,5	nw
	10.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	03.2016	5,5 ± 0,4	1,8 ± 0,1	0,5 ± (< 0,1)	2,3 ± 0,2	0,5 ± (< 0,1)	29,0 ± 2,5	nw
	06.2016	35,5 ± 3,2	2,1 ± 0,3	7,4 ± 0,4	2,8 ± 0,3	0,5 ± (< 0,1)	16,5 ± 2,3	nw
	09.2016	36,2 ± 2,8	22,0 ± 1,5	4,0 ± 0,2	1,5 ± 0,1	no	13,4 ± 0,9	nw
Pamiętkowskie (L3)	03.2015	18,3 ± 0,6	12,2 ± 2,0	5,5 ± 0,7	4,6 ± 0,5	31,0 ± 0,2	4,6 ± 0,9	nw
	06.2015	68,9 ± 5,0	6,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2	2,7 ± 0,3	0,6 ± (< 0,1)	11,4 ± 0,6	5,6 ± 0,5
	08.2015	17,7 ± 1,1	7,0 ± 0,3	3,8 ± 0,3	2,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	7,6 ± 0,7	nw
	10.2015	111,6 ± 5,5	25,6 ± 2,2	14,0 ± 1,8	18,7 ± 0,8	3,9 ± 0,3	31,2 ± 4,5	nw
	03.2016	6,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	no	13,3 ± 0,9	nw
	06.2016	91,7 ± 1,1	2,5 ± 0,2	9,5 ± 0,4	2,7 ± 0,4	0,7 ± (< 0,1)	22,6 ± 3,0	no
	09.2016	8,7 ± 0,9	1,5 ± 0,1	2,8 ± 0,3	0,9 ± 0,1	no	12,6 ± 0,6	nw
Wierzbiczańskie (L6)	03.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	06.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	08.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	10.2015	21,4 ± 1,8	3,8 ± 0,2	4,4 ± 0,4	5,1 ± 0,4	4,0 ± 0,3	11,70,7	nw
	03.2016	7,5 ± 0,5	1,8 ± 0,1	5,8 ± 0,3	2,1 ± 0,2	no	15,8 ± 3,7	nw
	06.2016	36,0 ± 2,4	2,2 ± 0,2	9,5 ± 0,9	2,4 ± 0,3	no	7,5 ± 0,8	nw
	09.2016	32,4 ± 1,9	14,1 ± 0,6	4,0 ± 0,3	1,5 ± 0,2	0,5 ± (< 0,1)	14,1 ± 0,5	nw

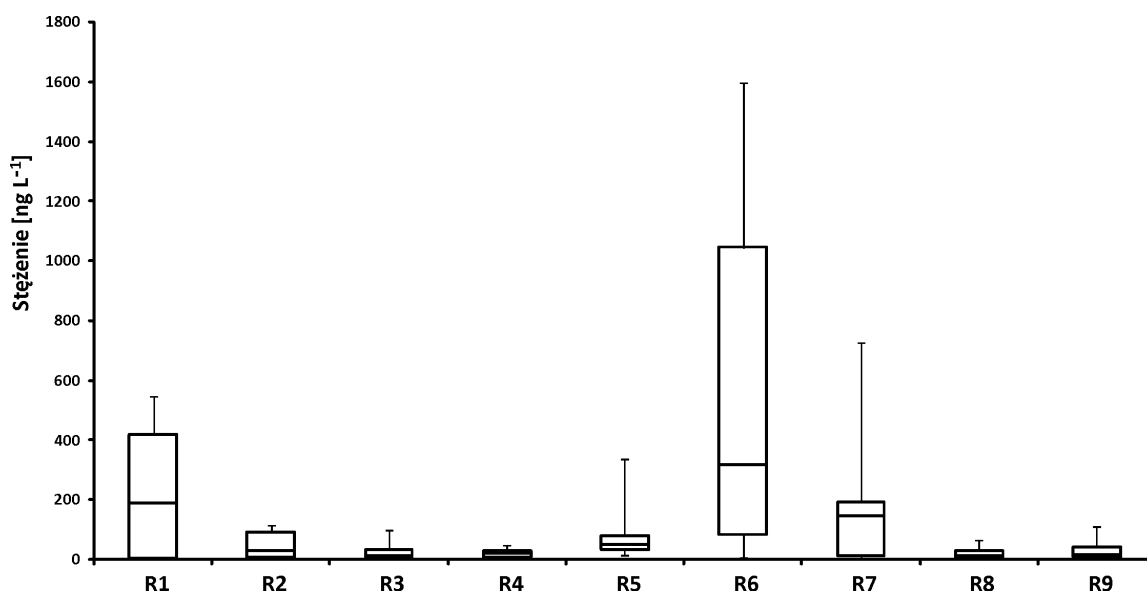
Rzeki								
Sama, Szamotuły (R2)	03.2015	11,6 ± 0,1	11,5 ± 1,2	6,8 ± 1,0	2,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1	16,7 ± 1,7	nw
	06.2015	115,8 ± 4,4	6,4 ± 0,4	2,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,5 ± (< 0,1)	10,8 ± 1,7	nw
	08.2015	99,2 ± 7,6	10,1 ± 1,0	15,0 ± 1,2	7,4 ± 0,8	0,5 ± (< 0,1)	16,6 ± 2,3	nw
	10.2015	83,0 ± 0,2	27,5 ± 0,4	24,6 ± 0,5	22,6 ± 0,4	5,4 ± 0,3	78,3 ± 3,6	nw
	03.2016	3,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,8 ± 0,2	1,3 ± 0,1	11,2 ± 1,3	24,5 ± 1,1	nw
	06.2016	27,4 ± 3,9	1,1 ± 0,1	5,0 ± 0,4	1,9 ± (< 0,1)	no	11,4 ± 0,5	nw
	09.2016	8,1 ± 0,7	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,3	0,6 ± 0,1	no	6,8 ± 1,1	nw
Samica Stęszewska, Krosinko (R3)	03.2015	13,5 ± 0,5	10,8 ± (< 0,1)	4,5 ± 0,2	3,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	7,9 ± 0,1	nw
	06.2015	9,5 ± 1,5	6,0 ± 0,2	3,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1	6,5 ± 0,9	nw
	08.2015	100,3 ± 2,7	6,9 ± 0,5	6,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	0,5 ± (< 0,1)	9,3 ± 0,6	nw
	10.2015	44,3 ± 2,3	4,5 ± 0,3	6,3 ± 0,5	1,6 ± 0,1	4,5 ± 0,3	72,2 ± 6,3	nw
	03.2016	5,9 ± 0,3	1,7 ± (< 0,1)	3,8 ± 0,3	1,6 ± 0,1	no	13,7 ± 1,3	nw
	06.2016	20,3 ± 1,9	1,5 ± 0,1	6,7 ± 0,6	2,1 ± 0,2	no	6,1 ± 0,7	nw
	09.2016	8,6 ± 0,8	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,2		no	5,4 ± 0,6	nw
Kanał Mosiński, Mosina (R4)	03.2015	24,3 ± 0,6	11,0 ± 0,8	5,0 ± 0,5	3,8 ± 0,2	2,2 ± (< 0,1)	20,8 ± 1,6	nw
	06.2015	47,3 ± 4,4	6,3 ± 0,4	4,3 ± 0,4	1,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	7,8 ± 0,7	nw
	08.2015	20,2 ± 0,5	6,8 ± 0,3	18,6 ± 0,3	3,7 ± 0,3	0,6 ± 0,1	22,4 ± 1,7	nw
	10.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	03.2016	2,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2	3,3 ± 0,3	1,5 ± 0,1	no	11,5 ± 2,2	nw
	06.2016	30,1 ± 0,2	1,5 ± 0,2	5,3 ± 0,4	2,3 ± 0,3	3,5 ± 0,4	11,9 ± 1,6	no
	09.2016	6,2 ± 0,2	1,1 ± (< 0,1)	0,9 ± (< 0,1)	0,6 ± (< 0,1)	no	5,8 ± 0,9	nw

Główna Poznań (R8)	03.2015	8,9 ± 0,2	9,4 ± 0,2	5,2 ± 0,9	3,1 ± 0,3	0,7 ± (< 0,1)	20,9 ± 1,5	nw
	06.2015	11,8 ± 1,0	4,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1	1,5 ± (<0,1)	0,5 ± 0,1	8,2 ± 0,5	nw
	08.2015	21,7 ± 1,7	4,7 ± 0,2	7,0 ± 0,4	2,8 ± 0,1	3,6 ± 0,3	27,5 ± 1,6	nw
	10.2015	40,3 ± 3,0	3,6 ± 0,1	11,1 ± 0,7	1,4 ± 0,1	1,3 ± (< 0,1)	10,6 ± 0,9	nw
	03.2016	65,3 ± 5,2	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	no	7,7 ± 0,6	nw
	06.2016	11,3 ± 2,0	1,2 ± 0,3	3,8 ± 0,1	3,6 ± 0,6	0,9 ± (< 0,1)	35,7 ± 1,1	nw
	09.2016	4,7 ± 0,6	1,6 ± (<0,1)	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,1	no	9,5 ± 0,8	no
Główna, Janikowo (R9)	03.2015	14,2 ± 1,8	10,9 ± 0,3	3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,4	0,8 ± 0,1	8,0 ± 0,2	nw
	06.2015	16,3 ± 2,5	6,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,3	0,5 ± (< 0,1)	27,7 ± 4,3	no
	08.2015	62,4 ± 2,2	7,7 ± 0,8	5,9 ± 0,5	5,4 ± 0,3	0,8 ± (< 0,1)	11,8 ± 0,9	nw
	10.2015	112,8 ± 4,4	5,4 ± 0,1	9,7 ± 0,6	2,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2	15,9 ± 0,6	nw
	03.2016	3,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	no	11,6 ± 0,4	nw
	06.2016	18,5 ± 1,0	1,5 ± 0,6	2,6 ± 0,3	2,7 ± 0,7	4,2 ± 0,4	10,3 ± 0,3	no
	09.2016	2,6 ± 0,6	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	no	nw	4,7 ± 0,3	nw
Warta, Wiórek (R5)	03.2015	20,3 ± 0,7	11,0 ± 0,1	36,1 ± 0,9	4,5 ± 0,1	0,7 ± (< 0,1)	22,7 ± 0,3	nw
	06.2015	67,3 ± 6,3	6,6 ± 0,1	3,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,5 ± (< 0,1)	14,1 ± 1,4	no
	08.2015	47,2 ± 5,5	9,8 ± 0,4	14,5 ± 0,8	3,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	39,3 ± 2,4	6,2 ± (< 0,1)
	10.2015	49,5 ± 6,6	5,6 ± 0,3	3,7 ± 0,4	2,9 ± 0,3	0,5 ± (< 0,1)	8,4 ± 0,4	nw
	03.2016	15,2 ± 1,9	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2	1,4 ± 0,1	no	6,1 ± 0,3	nw
	06.2016	88,2 ± 5,2	10,5 ± 1,0	7,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,3	33,6 ± 5,4	no
	09.2016	336,2 ± 12,7	2,5 ± 0,1	6,9 ± 0,7	0,7 ± 0,1	no	20,4 ± 1,3	nw

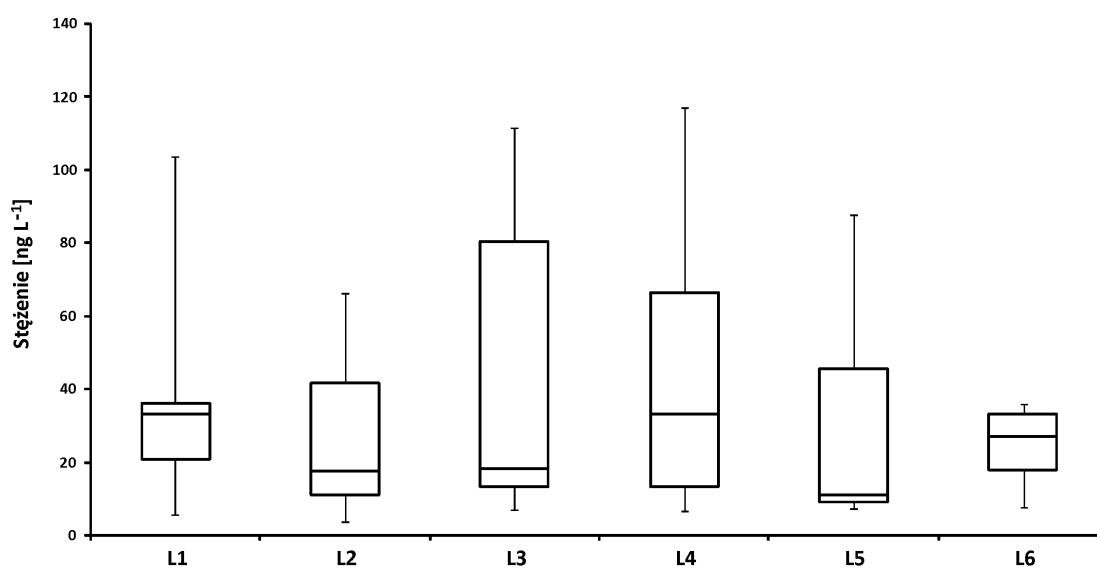
Warta, Poznań (R6)	03.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	06.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	08.2015	318,0 ± 5,3	14,2 ± 0,5	40,8 ± 0,4	4,3 ± 0,4	0,5 ± (< 0,1)	21,6 ± 0,9	5,6 ± 0,2
	10.2015	1598 ± 182	9,8 ± 0,7	62,0 ± 6,5	3,7 ± 0,2	2,8 ± 0,1	38,7 ± 2,3	nw
	03.2016	5,3 ± 0,6	0,9 ± 0,1	5,3 ± 0,5	1,1 ± 0,1	no	28,3 ± 1,7	nw
	06.2016	81,7 ± 5,4	9,6 ± 0,3	10,5 ± 1,4	4,3 ± 0,7	no	38,0 ± 0,7	no
	09.2016	1045 ± 74	6,5 ± 0,6	14,4 ± 0,3	1,7 ± (<0,1)	no	48,3 ± 4,5	nw
Warta, Mściszewo (R7)	03.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	06.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	08.2015	190,6 ± 9,6	8,8 ± 0,4	51,4 ± 3,0	4,3 ± 0,2	0,5 ± (< 0,1)	42,3 ± 2,0	nw
	10.2015	726,8 ± 21,2	6,5 ± 0,4	26,2 ± 3,2	2,7 ± 0,4	0,7 ± 0,1	54,0 ± 4,9	nw
	03.2016	3,5 ± 0,4	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,5 ± (< 0,1)	19,0 ± 1,2	nw
	06.2016	145,9 ± 13,8	2,3 ± 1,4	2,7 ± 0,2	8,3 ± 1,2	1,7 ± 0,2	25,5 ± 2,3	no
	09.2016	12,8 ± 0,3	2,0 ± 0,1	2,9 ± 0,3	1,1 ± (<0,1)	no	10,5 ± 0,8	nw
Kamionka, Bielsko (R1)	03.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	06.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	08.2015	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
	10.2015	375,6 ± 52,1	7,3 ± 0,5	93,9 ± 11,6	8,3 ± 0,7	nw	12,9 ± 0,9	nw
	03.2016	2,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,1 ± (<0,1)	no	9,5 ± 0,7	nw
	06.2016	546,8 ± 36,2	1,7 ± 0,3	5,0 ± 0,6	1,9 ± 0,2	no	6,6 ± 0,9	no
	09.2016	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,1	2,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	nw	9,4 ± 1,3	nw

nw - nie wykryto, no - nie oznaczono, nb - nie badano

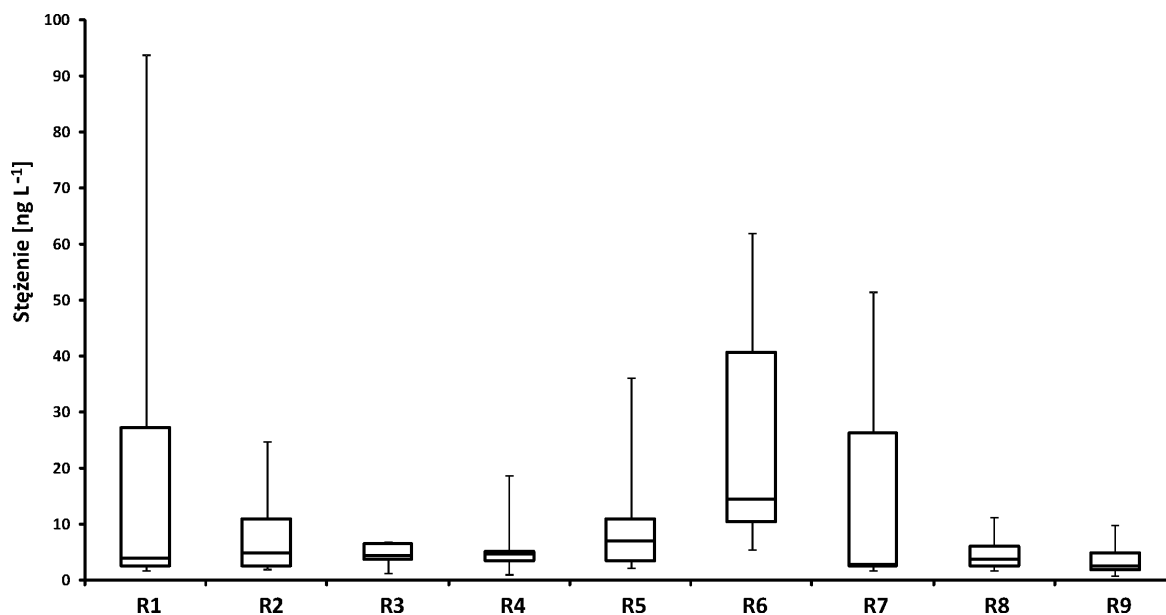
Zaobserwowano pewne różnice stężenia parabenów w zależności od miejsca próbkowania, głównie w przypadku MP i PP wód rzecznych - **Ryciny 17-20** (na rycinach pudełko wskazuje dwudziesty piąty i siedemdziesiąty piąty percentyl oraz wartość mediany - wąsy wskazują wartości minimalne i maksymalne). Dwa wymienione związki występowały w najniższych stężeniach w punktach pobrania R3, R4, R8 i R9, a na nieco wyższych poziomach w punktach R2 i R5. Wszystkie te punkty pobrania próbek z rzek były zlokalizowane przy małych rzekach z wyjątkiem lokalizacji R5 przy dużej rzece, jaką jest Warta (punkt próbkowania znajduje się przed jej wpłynięciem do Poznania). Znacznie wyższe stężenia MP i PP wystąpiły w lokalizacjach pobrań R1, R6 i R7.



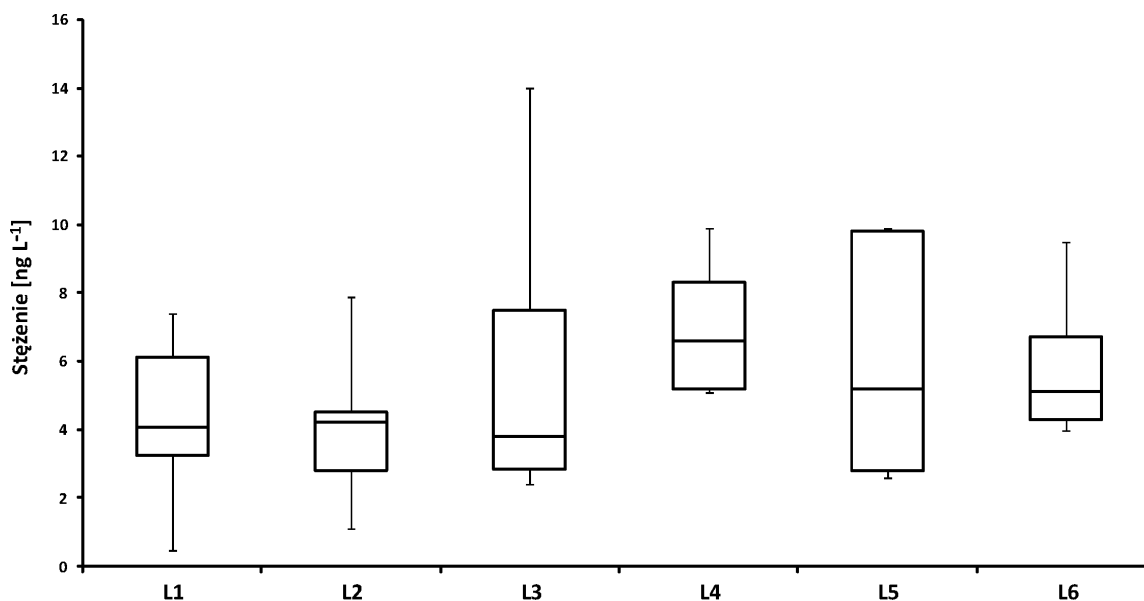
Ryc. 17. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości metyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej



Ryc. 18. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości metyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej



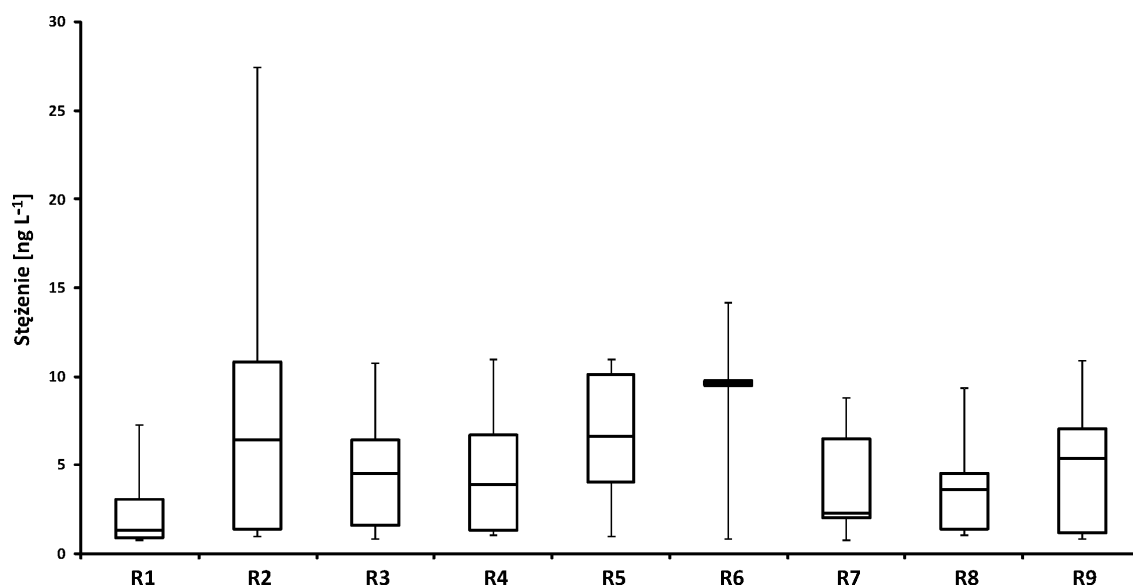
Ryc. 19. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości propyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej



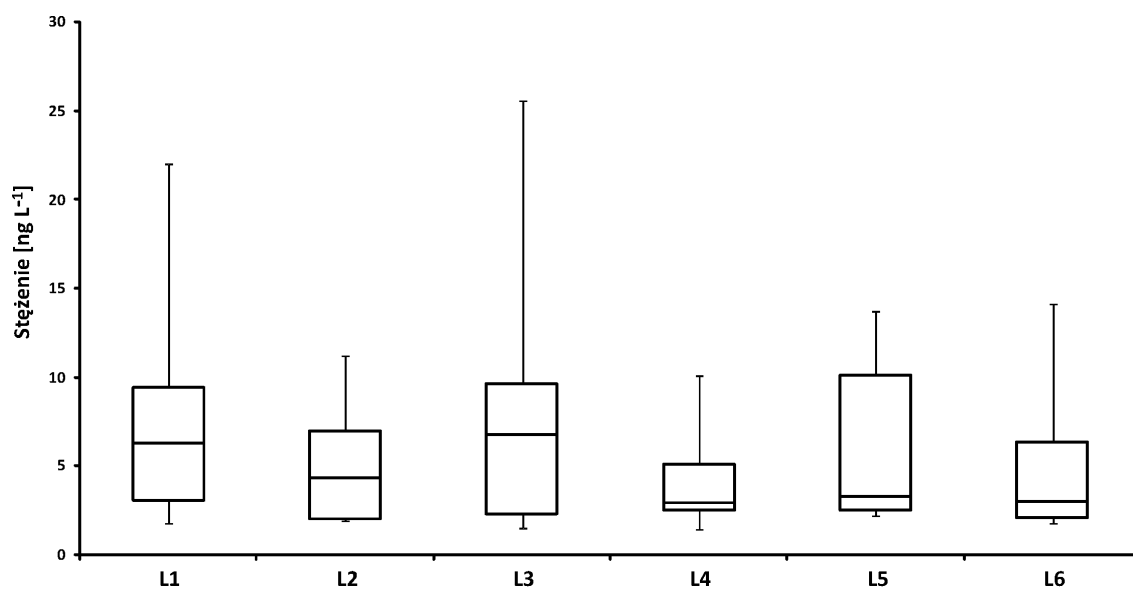
Ryc. 20. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości propyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej

Miejsce pobierania próbki oznaczone jako R6 leży na terenie Poznania (miasta o populacji 550 000), a R7 jest na odcinku Warty około 10 km za Poznaniem. Wysokie poziomy MP i PP w próbkach z tych lokalizacji mogą być związane z wpływem zanieczyszczeń pochodzących z aglomeracji miejskiej. Jednocześnie zaskakująca jest większa

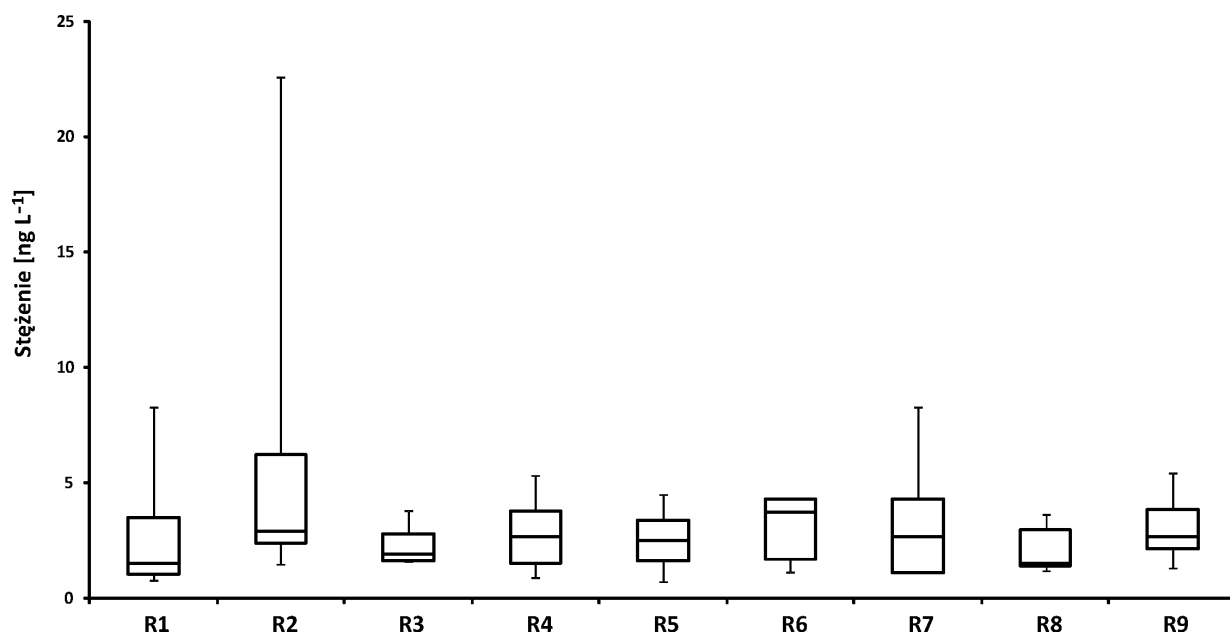
ilość tych związków w próbce z punktu R1, który uznawany jest za najczystszy obszar z wszystkich testowanych miejsc z uwagi na brak osiedli miejskich i zakładów przemysłowych w otoczeniu. Jednakże trzeba wziąć pod uwagę, że najwyższe stężenia zaobserwowano w punkcie R1 w okresie niskiego poziomu wody w tej małej rzece. Co ciekawe, podobnych różnic między punktami pobierania próbek nie można zauważyć dla EP, BP i BzP - **Ryciny 21-26** (na rycinach pudełko wskazuje dwudziesty piąty i siedemdziesiąty piąty percentyl oraz wartość mediany - wąsy wskazują wartości minimalne i maksymalne).



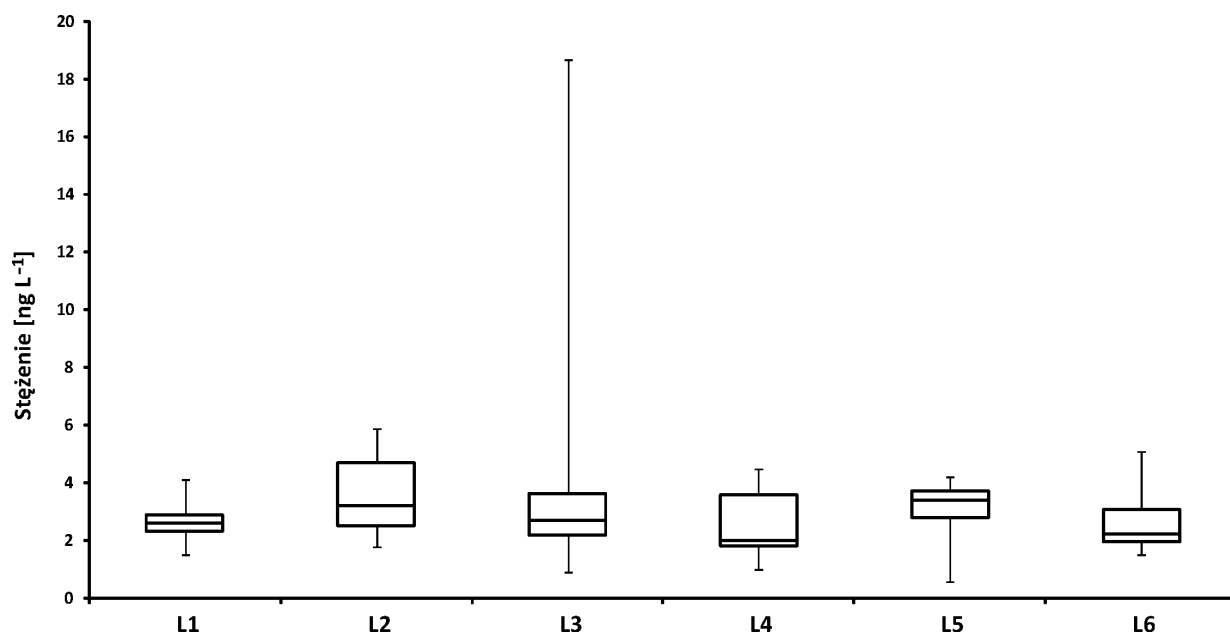
Ryc. 21. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości etyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej



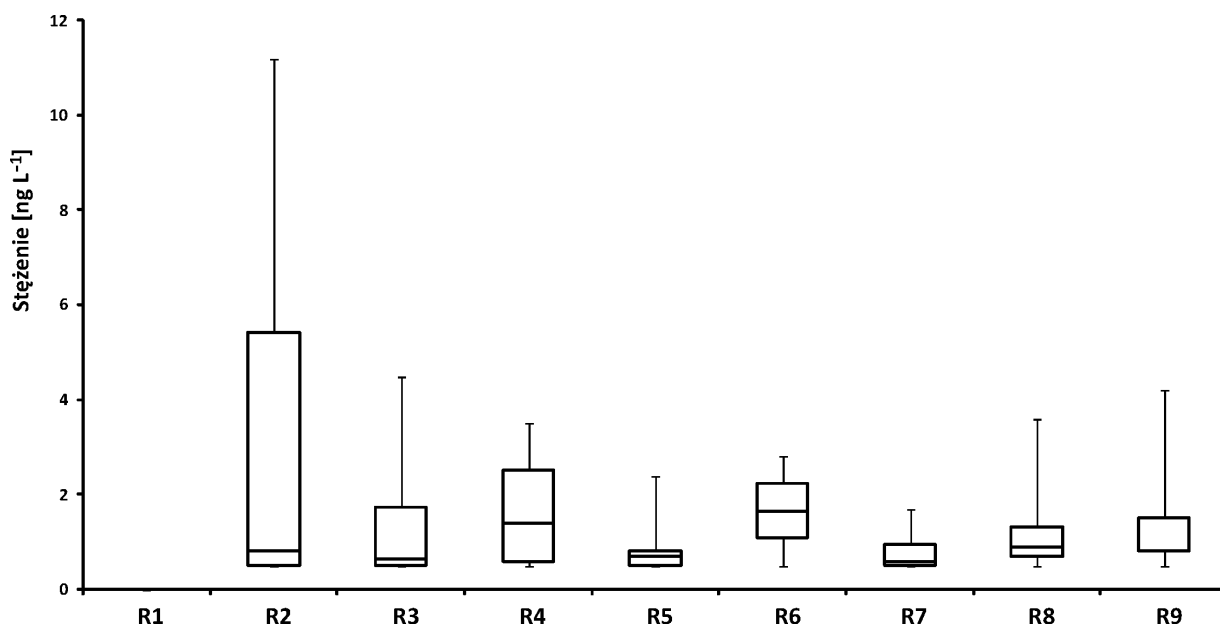
Ryc. 22. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości etyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej



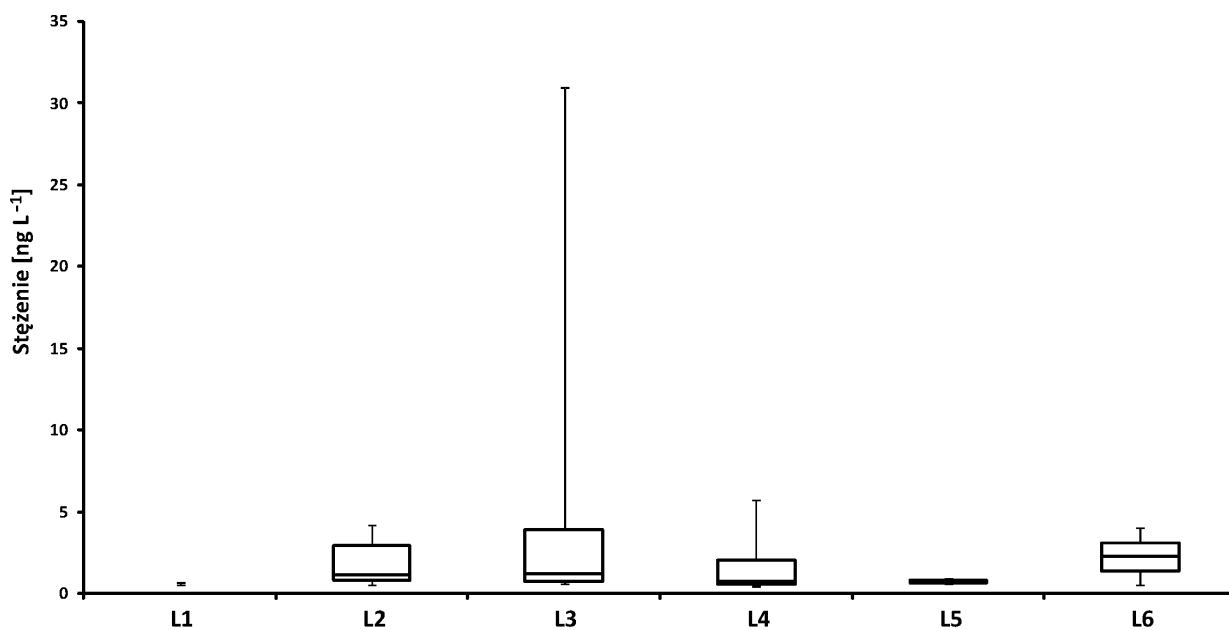
Ryc. 23. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości butyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej



Ryc. 24. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości butyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej



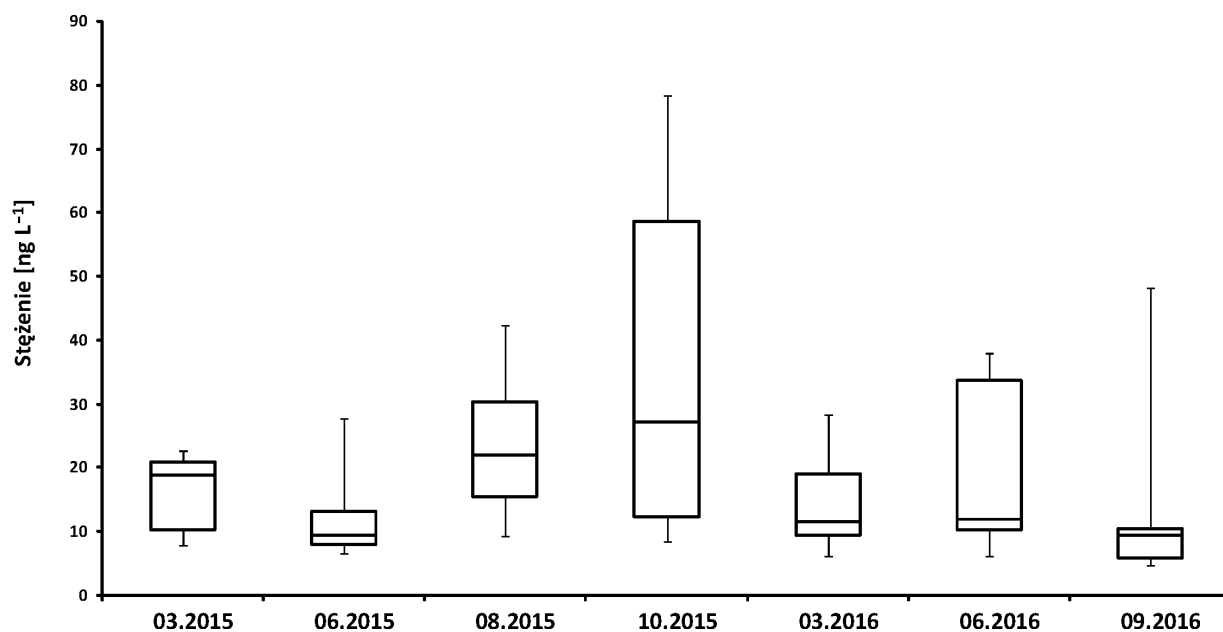
Ryc. 25. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości benzyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej



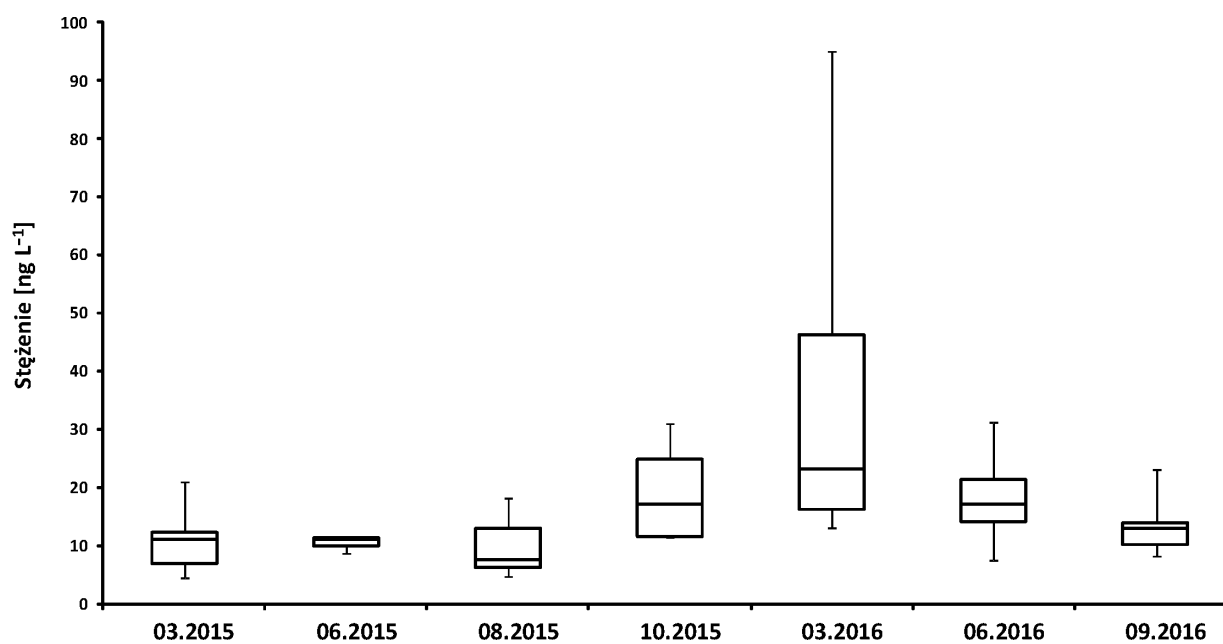
Ryc. 26. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości benzyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej

W jeziorach stężenia wszystkich parabenów mieściły się w podobnym zakresie w miejscach pobrania próbek dla każdego z 6 jezior, chociaż wystąpiły pewne różnice między parabenami - **Ryciny 17-26**. Stężenia te były na podobnym poziomie do odnotowanych dla mało zanieczyszczonych rzek, a uzasadnieniem może być otoczenie, ponieważ wszystkie jeziora znajdują się na terenach rolniczych i są otoczone jedynie polami i małymi wioskami.

BPA oznaczono na poziomach stężeń od kilku ng/l do kilkudziesięciu ng/l (**Ryciny 27 i 28, Tabela 27**), tj. między wielkością stężeń uzyskanych dla MP i innych parabenów.



Ryc. 27. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości BPA oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej



Ryc. 28. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości BPA oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej

Kumylofenol zidentyfikowano tylko w ograniczonej liczbie próbek - **Tabela 27**. Niemniej jednak należy wziąć pod uwagę, że zarówno BPA jak i CP mają znacznie wyższe

właściwości zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego niż większość parabenów [312, 313]. Zatem, nawet jeśli BPA występuje na poziomie niższym niż MP, to jego wpływ na organizmy żywe jest znacznie większy, ponieważ wykazuje on około 300 razy wyższą aktywność niż MP [313], czego nie można skompensować około 10-20 razy wyższym stężeniem MP niż BPA - **Ryciny 17, 18, 27, 28**. Ze wszystkich parabenów oznaczonych w tych badaniach tylko BP i BzP wykazują nieco wyższą aktywność zaburzającą funkcjonowanie układu hormonalnego niż BPA [315], tj. odpowiednio około 1,25 i 2,5 razy. Niemniej jednak związki te występowały przeważnie w kilkukrotnie niższych stężeniach niż BPA - **Ryciny 23-28**. Zatem ich potencjalny wpływ na środowisko jest również zdecydowanie mniejszy niż BPA.

Natomiast nie zauważono istotnej różnicy między stężeniem BPA w próbkach wody z rzek. Tylko dwie lokalizacje R6 i R7 były bardziej zanieczyszczone od pozostałych miejsc próbkowania, co zaobserwowano wcześniej przy oznaczaniu zawartości MP i PP. Główną różnicą między BPA, a dwoma parabenami było to, że w punkcie R1 oznaczono niewiele BPA, ale zaskakująco dużo parabenów. Jak wspomniano wcześniej, R1 znajduje się w obszarze praktycznie nieuprzemysłowionym, a więc niski poziom zanieczyszczenia BPA jest uzasadniony.

Wyniki badań sezonowych zmian stężeń parabenów w 2014 roku wydawały się sugerować wzrost stężenia tych związków w okresie letnim. Jednak przeprowadzone badania obejmowały niewystarczającą liczbę punktów czasowych, aby w pełni poprzeć tę obserwację. Należy podkreślić, że istnieje wiele czynników wpływających na poziom zanieczyszczeń w rzekach i jeziorach, w tym pogoda (wpływ na poziom wody i temperaturę wody), biodegradacja (odpowiedzialna za usuwanie zanieczyszczeń) i działalność człowieka (bezpośrednio wpływająca na zużycie zanieczyszczeń i ich obecność w środowisku). W tym badaniu stężenia dwóch głównych parabenów (MP i PP), jak również BPA monitorowano przez stosunkowo długi okres od marca 2015 r. do września 2016 r. Wyniki przedstawione na **Rycinach 17-20, 27, 28** wskazują, że występuje znaczna sezonowa różnica poziomów MP i PP zarówno w rzekach, jak i jeziorach, bez wyraźnego wpływu pory roku na stężenie BPA. Niższe stężenia MP oznaczono w marcu niż w kolejnych miesiącach zarówno dla rzek, jak i dla jezior, chociaż mniejsze stężenia można zaobserwować od czerwca 2016 do września 2016. Podobny trend zaobserwowano w roku 2016 dla PP zarówno w rzekach, jak i jeziorach, tj. stężenia w marcu były niższe niż w czerwcu, a następnie zauważono ich spadek we wrześniu. Jednakże najniższe stężenia oznaczono w czerwcu. Różnicy stężeń między MP a PP w okresie od marca 2015 do czerwca 2015 nie można wyjaśnić w jednoznaczny sposób,

ponieważ MP i PP są często łącznie stosowane jako konserwanty. Istnieje jednak kilka innych czynników, które powinny być brane pod uwagę. Według dostępnych danych dla rzeki Warty między dwoma najbardziej zanieczyszczonymi punktami pobierania próbek R6 i R7 - poziom wody w marcu 2015 r. wynosił około 200 cm, a w marcu 2016 około 250 cm. Natomiast od czerwca do października 2015 poziom wody był zdecydowanie na niższym poziomie i wynosił około 140 cm (120 - 160 cm), a od czerwca do września 2016 r. wynosił około 150 cm (120 - 180 cm). Obniżenie poziomu wody od marca 2015 r. do kolejnych testowanych punktów czasowych nie koreluje z niższymi stężeniami PP. Można to dodatkowo potwierdzić poziomem wody odnotowanym w roku 2016 – taki sam trend poziomu wody prowadzi do innych zmian stężeń PP. Obniżającemu się poziomowi wody w miesiącach letnich/jesiennych zarówno w 2015, jak i w 2016 roku można przypisywać ogólny trend obserwowany dla MP i PP tj. ich rosnące stężenia, ale zmiana jest oczywiście zbyt mała, aby wyjaśnić dużą różnicę między porami roku. Innym czynnikiem, który należałoby uwzględnić jest biodegradacja tych zanieczyszczeń. Można zakładać, że na szybkość procesu biodegradacji miała wpływ temperatura. Proces biodegradacji jest wolniejszy w zimie, co prowadzi do wyższego stężenia zanieczyszczeń, okres ten obejmuje także miesiąc marzec, kiedy temperatura wody jest nadal stosunkowo niska [314]. Temperatura w Poznaniu w marcu 2015 r. była znacznie niższa niż w marcu 2016 r., co wskazuje wpływ procesu biodegradacji na zawartość PP w rzece Warcie. Zaskakujące jest obniżenie poziomu stężenia MP między marcem a czerwcem 2016 r. Z przeprowadzonych w Zakładzie Chemii Ogólnej i Analitycznej Politechniki Poznańskiej niepublikowanych badań wynika, że MP wykazuje bardzo szybką biodegradację (45 godz.), a PP charakteryzuje powolna degradacja (14 dni). Stwierdzone różnice wynikają z różnej szybkości rozkładu, która dla MP była zdecydowanie większa. Biorąc to pod uwagę, różnicę między wartościami stężenia MP i PP w 2015 r. (tj. niższe stężenie PP i jednocześnie zwiększenie stężenia MP w okresie od marca do czerwca 2015 r.) można wyjaśnić większym wpływem temperatury na PP niż MP. Niemniej jednak ta mała niespójność w zachowaniu PP nie zmienia ogólnej obserwacji, że istnieje sezonowa zmiana stężenia parabenów w wodach powierzchniowych (wyższe poziomy lato/jesień), ponieważ czynnik uwalniania zanieczyszczeń jest dominujący wobec czynnika biodegradacji, jak i czynnika objętości wody. Analitycznej zależności nie można zaobserwować w przypadku BPA i CP.

Porównując wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach z wynikami opublikowanymi wcześniej przez innych naukowców można zauważyć, że uzyskane stężenia parabenów są wyższe od stężeń oznaczonych w wodach powierzchniowych wielu innych krajów europejskich. Podobne lub nawet wyższe stężenia parabenów zmierzono w niektórych

krajach azjatyckich, jak również w badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy w roku 2014 dla próbek pobieranych w kilku punktach zlokalizowanych w Wielkopolsce. Jednak, najwyższe stężenia tych związków odnotowano w Brazylii. Autorzy tych doniesień sugerowali możliwy wpływ suszy, ale brakuje szerszych badań z tego regionu, które potwierdzałyby tendencje zachodzących zmian stężenia parabenów w tym obszarze.

Uzyskane stężenia BPA w analizowanych próbkach nie są wysokie. Wielu innych autorów z całego świata przedstawia wyniki wskazujące na większe zanieczyszczenie BPA, a poziomy tego związku są rzędu setek ng/l, czyli kilka razy więcej niż uzyskano w niniejszych badaniach. Ponadto, biorąc pod uwagę stosunkowo znaczne oddziaływanie BPA na układ endokryny w porównaniu z najliczniej występującymi na świecie parabenami (np. MP, EP, BP i PP), należy założyć, że stanowi on większe zagrożenie dla środowiska niż parabeny.

W literaturze nie znaleziono wiele doniesień na temat zawartości CP w środowisku, ale dostępne informacje wskazują na małą zawartość tej substancji, co związane jest z jego mniejszą produkcją. Jednakże zdolność zaburzania gospodarki hormonalnej przez CP jest 12 razy większa niż BPA [312]. W związku z tym, należy uwzględnić, że CP nawet w kilkukrotnie niższym stężeniu niż BPA (oznaczone w niektórych próbkach pobranych z jezior L2 i L3), może wpływać na żywe organizmy w tym samym stopniu jak BPA – **Tabela 27**.

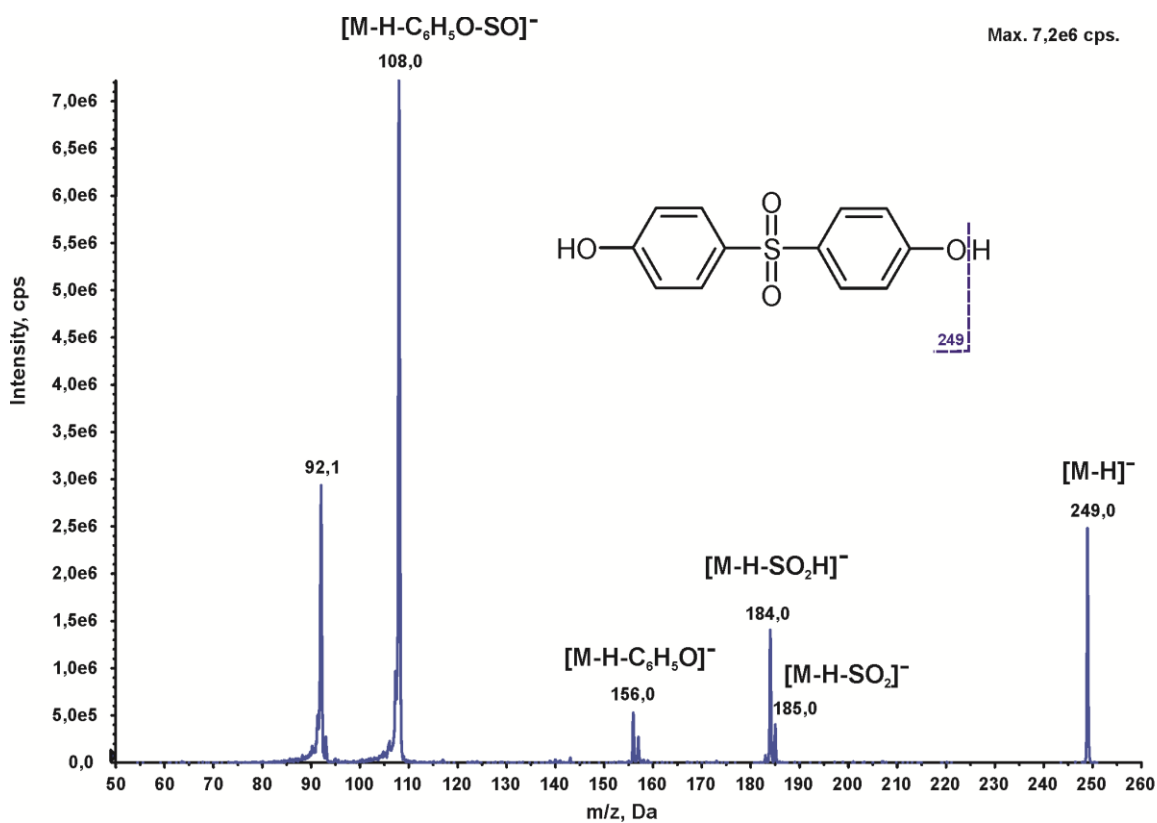
Uzyskane wyniki wykazały, że oznaczanie parabenów, BPA i CP w wodach powierzchniowych przez długi okres czasu pozwoliłoby wskazać rzeczywiste tendencje zmiany ich stężenia. Sezonowe różnice stężenia parabenów stwierdzono wykazując ich znacznie większą zawartość w okresie letnim/jesiennym niż na początku roku. Wykazano, że duża ilość wprowadzanych do środowiska parabenów nie może być zrównoważona przez inne czynniki, np. przez wyższą biodegradację w ciepłym sezonie. Tych sezonowych zmian nie zaobserwowano dla BPA i CP. BPA oznaczano na podobnym poziomie stężeń do parabenów między 5 ng/l a 95 ng/l, tj. głównie niższym od stężenia MP, ale wyższym niż stężenia innych parabenów. CP oznaczono tylko w niewielkiej ilości próbek.

Korzystną obserwacją jest fakt, że działanie BP i BzP zaburzające gospodarkę hormonalną jest dużo słabsze w porównaniu z BPA ze względu na znacznie niższe stężenia stwierdzone w środowisku.

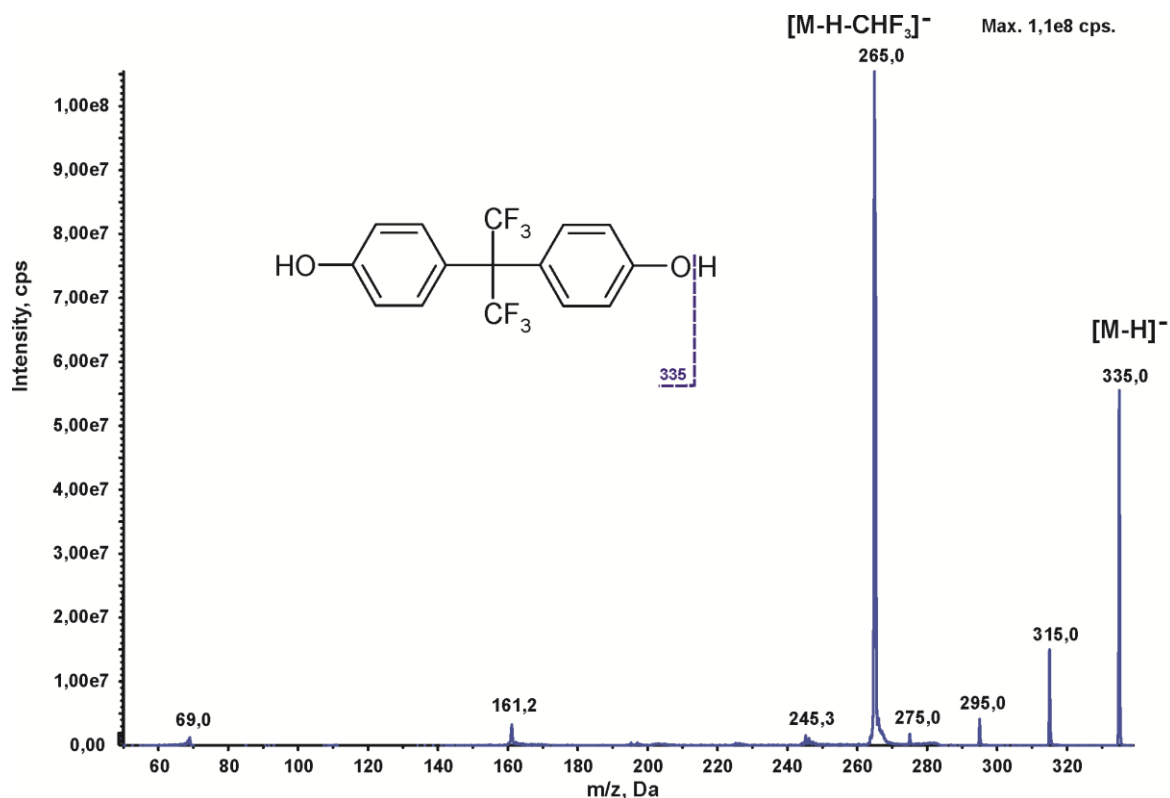
5.3. Oznaczanie parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym – zadanie III.

5.3.1. Analiza próbek techniką LC-MS/MS

Przed przystąpieniem do analizy chromatograficznej, w pierwszej kolejności ustalono warunki pracy spektrometru mas dla związków, których nie oznaczano w poprzednich zadaniach badawczych, tj.: bisfenolu S, bisfenolu AF, bisfenolu F. W tym celu przygotowano roztwory poszczególnych analitów, które wprowadzono bezpośrednio do źródła jonizacji spektrometru mas. Poniżej przedstawiono dwa widma fragmentacyjne bisfenoli S i AF (**Ryciny 29 i 30**). Ścieżka fragmentacyjna bisfenolu F jest podobna do bisfenolu A i dlatego nie została zamieszczona w pracy.

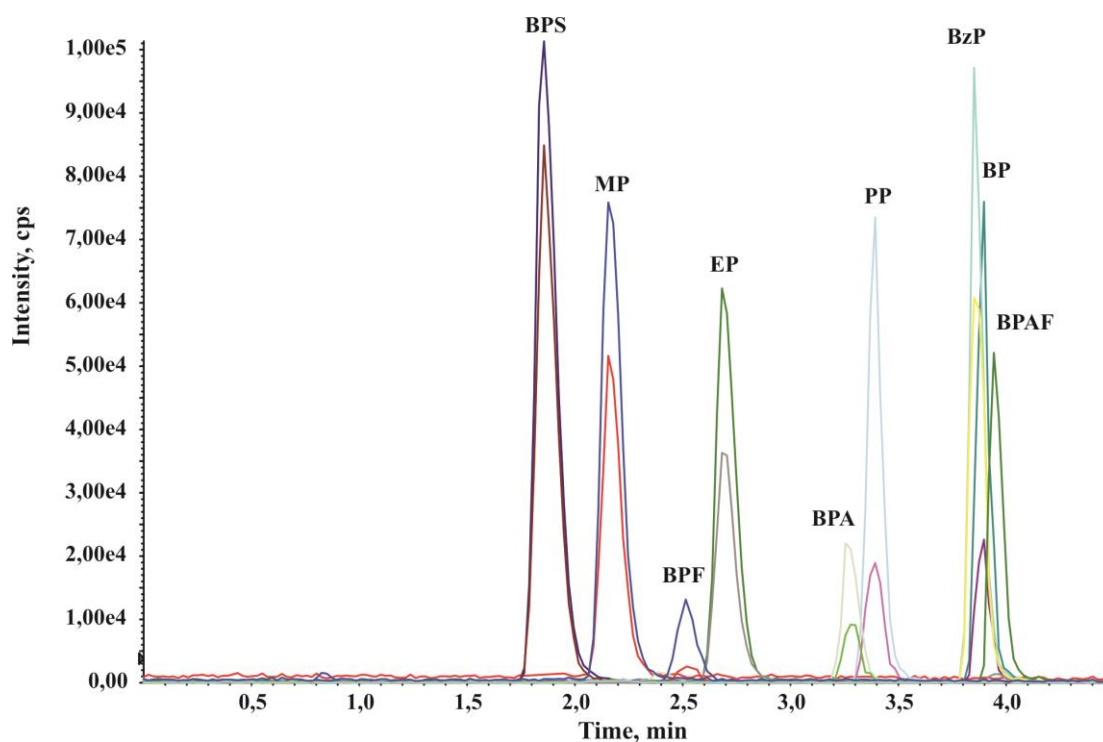


Ryc. 29. Widmo fragmentacyjne bisfenolu S uzyskane dla energii kolizji -40 eV



Ryc. 30. Widmo fragmentacyjne bisfenolu AF uzyskane dla energii kolizji -40 eV

Kolejnym etapem było ustalenie warunków pracy chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas w celu uzyskania jak najlepszego rozdzielania chromatograficznego przy jednoczesnym osiągnięciu najniższej granicy oznaczalności dla poszczególnych analitów. Przetestowano szereg kolumn chromatograficznych z różnym wypełnieniem, jak i różny skład fazy ruchomej poprawiający jonizację w źródle. Jako modyfikatory fazy ruchomej stosowano: kwas mrówkowy, kwas octowy, octan amonu, mrówczan amonu oraz amoniak. Najlepszy rozdzielanie chromatograficzne otrzymano przy zastosowaniu kolumny Hypersil Gold C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,9 μm) firmy Thermo Scientific. Przykładowy chromatogram mieszaniny wszystkich analitów przedstawiono na **Rycinie 31**. Z kolei najlepsze wyniki czułości metody otrzymano, gdy w fazie ruchomej nie zastosowano żadnych dodatków modyfikujących. W **Tabeli 28** zamieszczono porównanie wyników liniowości, granicy oznaczalności i wykrywalności analitów otrzymane dla analiz przeprowadzonych z dodatkiem octanu amonu i bez jakiegokolwiek dodatku modyfikatora fazy.



Ryc. 31. Chromatogram mieszaniny parabenów i bisfenoli

Tab. 28. Parametry walidacyjne metody LC-MS/MS

Parametry	MP	EP	PP	BP	BzP	BPA	BPF	BPS	BPAF
Dodatek do fazy CH₃COONH₄									
Zakres liniowości [μg/l]	0,5-400	0,5-400	0,5-400	0,5-400	0,5-400	5-4000	5-4000	0,5-200	0,5-200
Współczynnik korelacji (r ²)	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9990	0,9997	0,9964	0,9996
Granica wykrywalności [μg/l]	0,06	0,04	0,03	0,03	0,03	0,59	1,01	0,01	0,03
Granica oznaczalności [μg/l]	0,21	0,12	0,11	0,08	0,10	1,96	3,35	0,03	0,10
Bez dodatku CH₃COONH₄									
Zakres liniowości [μg/l]	0,5-200	0,5-200	0,5-400	0,5-400	0,5-200	5-2000	5-2000	0,5-400	0,5-400
Współczynnik korelacji (r ²)	0,9991	0,9992	0,9997	0,9992	0,9991	0,9993	1,0000	0,9993	0,9996
Granica wykrywalności [μg/l]	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,19	0,20	0,01	0,03
Granica oznaczalności [μg/l]	0,05	0,08	0,07	0,06	0,08	0,64	0,67	0,03	0,10

5.3.2. Opracowanie metody ekstrakcji parabenów i bisfenoli techniką QuEChERS

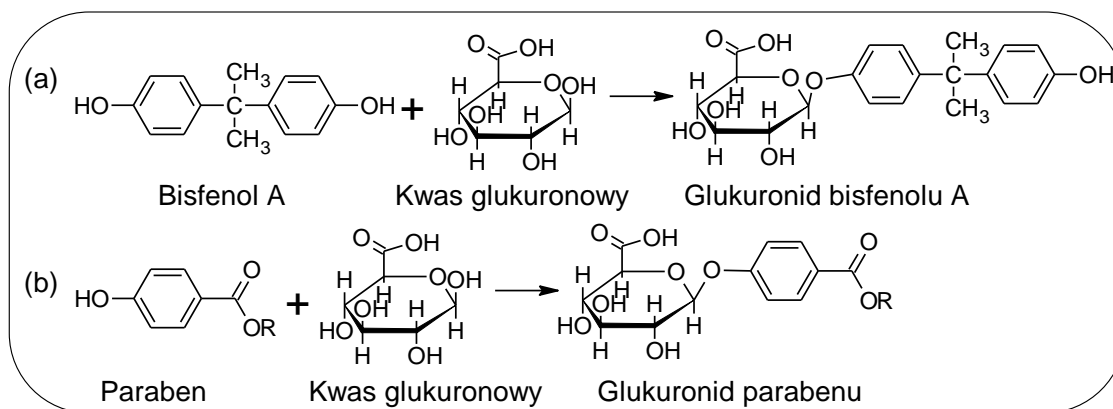
Technika QuEChERS to rodzaj ekstrakcji rozpuszczalnikiem połączonej z późniejszym etapem oczyszczania ekstraktu. Została ona opracowana przez Anastassiadesa w 2003 roku [315] i po raz pierwszy zastosowana do ekstrakcji pestycydów z żywności.

Bazując na tej technice opracowano metodę ekstrakcji parabenów i bisfenoli z mleka kobycego za pomocą acetonitrylu w obecności bezwodnego siarczanu(VI) magnezu i chlorku sodu. Z uwagi na fakt, że w skład mleka kobycego wchodzi białka, jak i tłuszcze, które mogą utrudnić analizę próbek, należało opracować metodę pozwalającą na eliminację przeszkadzających składników. W celu usunięcia białka przed procesem ekstrakcji do próbki dodawano wraz z acetonitrylem kwas octowy. Po ekstrakcji próbkę odwirowywano uzyskując trzy fazy: acetonitrylową z analitami, ścięte białko oraz pozostałość – serwatkę. Natomiast tłuszcze, które przeszły do ekstraktu usunięto na drodze dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej. Zdyspergowaną fazę stałą stanowiła mieszanina bezwodnego siarczanu(VI) magnezu z komercyjnie dostępnymi sorbentami na bazie krzemionki modyfikowanej łańcuchami oktadecylowymi C18 i pierwszo-drugorzędową aminą PSA. Ekstrakt po oczyszczeniu został odwirowany, dodatkowo przefiltrowany i poddany analizie LC-MS/MS.

5.3.3. Oznaczanie całkowitej zawartości bisfenoli i parabenów w próbkach mleka

Etap przygotowania próbki mleka kobycego obejmował również opracowanie metody pozwalającej na oznaczenie stężenia wolnych form bisfenoli i parabenów, jak i ich koniugatów z kwasem glukuronowym powstających na drodze metabolizmu tych związków w organizmie człowieka.

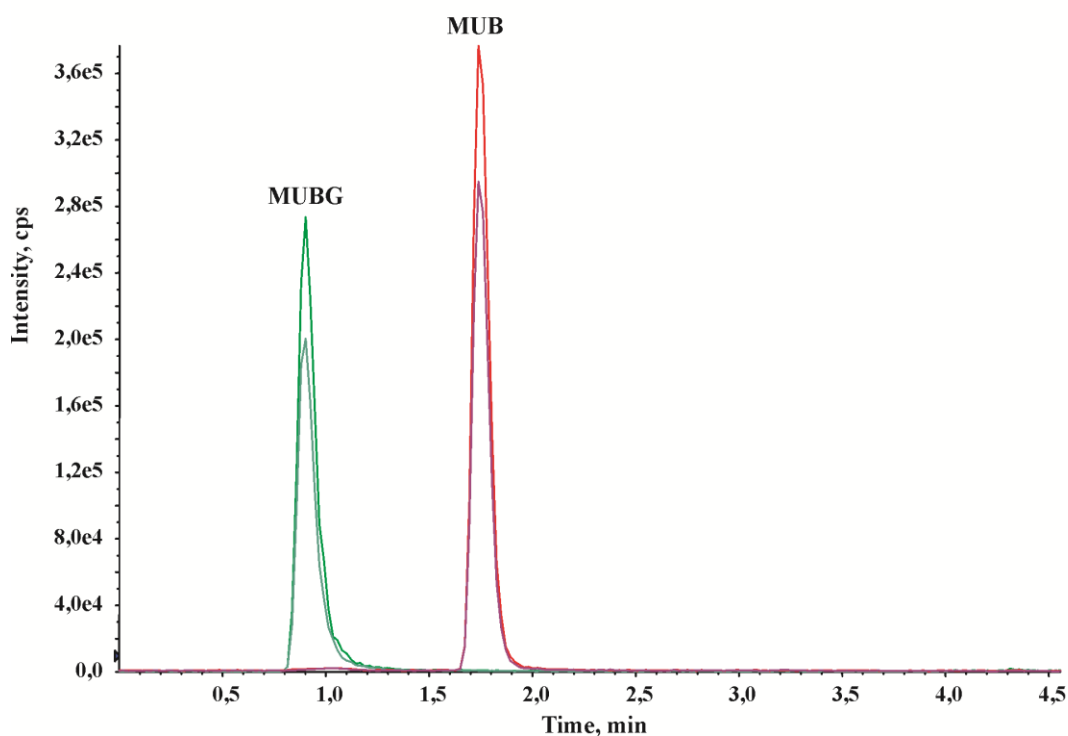
Sprężenie związków z kwasem glukuronowym, czyli reakcja glukuronidacji z udziałem enzymu glukuronylotransferazy, stanowi podstawowy mechanizm detoksykacji i eliminacji związków lipofilowych z organizmu na drodze degradacji i metabolizowania substancji obcych takich jak bisfenole i parabeny [106, 316, 14]. W organizmie człowieka bisfenole i parabeny są metabolizowane w wątrobie od kilku do kilkudziesięciu godzin. Na **Rycinie 32** przedstawiono reakcje przemiany bisfenolu A i modelowego parabenu pod wpływem działania glukuronylotransferazy. Glukuronidy powstają w wyniku utworzenia wiązania glikozydowego pomiędzy cząsteczką kwasu glukuronowego a analitem.



Ryc. 32. Biotransformacja bisfenolu A (a) i parabenu (b) w organizmie człowieka w obecności glukuronylotransferazy [317]

Z uwagi na występowanie w mleku kobiecym dwóch form bisfenoli i parabenów, w celu oznaczenia całkowitej ilości tych związków niezbędne było opracowanie warunków przeprowadzenia hydrolizy glukuronidu za pomocą enzymu β -glukuronidazy. Reakcja była prowadzona w cieplarni w temperaturze 37°C. Z uwagi na wysoki koszt substancji wzorcowych glukuronidów oznaczanych związków, optymalizację czasu przebiegu hydrolizy wykonano z użyciem β -D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu.

W pierwszej kolejności opracowano warunki pracy spektrometru mas dla dwóch związków tj. β -D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu i 4-metyloumbeliferonu. Na podstawie otrzymanych widm fragmentacyjnych wybrano po dwie pary MRM dla każdego przypadku, a następnie sprawdzono rozdział chromatograficzny z zastosowaniem tej samej kolumny i warunków pracy chromatografu, jakie zostały ustalone do oznaczania bisfenoli i parabenów. Przykładowy chromatogram mieszaniny β -D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu (MUBG) i 4-metyloumbeliferonu (MUB) zamieszczono na **Rycinie 33**.



Ryc. 33. Chromatogram mieszaniny β -D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu (MUBG) i 4-metyloumbeliferonu (MUB)

Spektrometr mas pracował w trybie MRM z jonizacją poprzez elektrorozpylanie z tworzeniem jonów naładowanych ujemnie. Optymalne warunki pracy tandemowego spektrometru mas zostały przedstawione w **Tabeli 29**.

Tab. 29. Warunki pracy źródła ESI przy oznaczaniu β -D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu i 4-metyloumbeliferonu

Związek	DP* [V]	MRM 1 [m/z]	CE** [eV]	CXP*** [V]	MRM 2 [m/z]	CE** [eV]	CXP*** [V]
MUBG	-53	351 → 175	-40	-2	351 → 113	-20	-5
MUB	-30	175 → 133	-31	-6	175 → 119	-38	-5

* - DP (*declustering potential*) – potencjał rozbicia klastrów;

** - CE (*collision energy*) – energia kolizji;

*** - CXP (*collision cell exit potential*) – potencjał wyjścia z komory zderzeń;

MRM - tryb monitorowania wybranych reakcji fragmentacji.

W celu sprawdzenia czasu konwersji glukuronidów oznaczanych związków do ich wolnej formy w próbkach mleka kobiecego, przeprowadzono kontrolowane reakcje hydrolizy wiązania glikozydowego β -D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu do 4-metyloumbeliferonu. Wzorując się na wyznaczonym eksperymentalnie czasie potrzebnym do przeprowadzenia tej

reakcji ustalono tym samym czas reakcji hydrolizy glukuronidu oznaczanych związków. Eksperyment polegał na przygotowaniu 7 próbek po 1 ml mleka kobiecego o stężeniu 0,4 µg/ml β-D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu, do których dodano po 100 µl roztworu enzymu β-glukuronidazy o aktywności 400 U w buforze octanowym o pH=5. Każda z próbek była inkubowana w temperaturze 37°C w różnym czasie, tj. odpowiednio 0, 15 i 30 min oraz 1; 1,5; 2 i 3 godz. Po przeprowadzeniu reakcji próbki poddano procesowi ekstrakcji metodą QuEChERS, a następnie analizowano z wykorzystaniem opracowanej metody LC-MS/MS. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że reakcja hydrolizy przebiega całkowicie w ciągu 15 minut. Z uwagi na obecność różnych składników w mleku ustalono, że 1 godzina będzie wystarczająca do przeprowadzenia całkowitej konwersji glukuronidu oznaczanych związków do ich wolnych form.

Tab. 30. Odzysk i precyzja dla oznaczanych związków*

Parametr	Glukoronidaza	MP	EP	PP	BP	BzP	BPA	BPF	BPS	BPAF
odzysk [%]	bez dodatku	100,5	89,5	90,8	90,3	87,5	98,0	96,2	76,0	91,8
precyzja [%]	bez dodatku	2,3	4,2	4,5	1,0	1,9	7,5	5,4	2,8	1,7
odzysk [%]	z dodatkiem	92,0	80,1	81,6	80,8	84,1	84,1	77,4	82,1	79,8
precyzja [%]	z dodatkiem	5,6	4,5	3,9	4,9	3,9	7,9	2,5	6,1	3,7

*Stężenie parabenów, BPS i BPAF 5 µg/l, stężenie BPA i BPF 50 µg/l. Procedura bez dodatku glukuronidazy odpowiada metodzie oznaczania wolnych analitów. Procedura z dodatkiem glukuronidazy odpowiada metodzie oznaczania całkowitej zawartości analitów (wolnych i sprzężonych).

Kolejnym krokiem w opracowaniu metody przygotowania próbek było sprawdzenie odzysków i precyzji. Otrzymane wyniki zamieszczono w **Tabeli 30**. Oznaczanie parabenów i bisfenoli w próbkach mleka kobiecego wykonano z zastosowaniem metody dodatku wzorca.

5.3.4 Wyniki oznaczania zawartości parabenów i bisfenoli w próbkach mleka kobiecego

Badaniami objęto próbki mleka od 21 kobiet z regionu Wielkopolski, zebrane w latach 2016-2017, od każdej z dawczyń w dwóch punktach czasowych. Proces pozyskiwania próbek zgodny ze schematem amerykańskich naukowców Hines i wsp. [297] - między 2 a 7 tygodniem i między 3 a 4 miesiącem po porodzie został wcześniej zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Zebranie próbek zostało poprzedzone rozmowami dotyczącymi charakteru i znaczenia badań z potencjalnymi dawczyniami, które urodziły pierwsze dziecko w Klinice Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego. W odpowiednim czasie dawczyniom dostarczano pojemniki na pokarm dla niemowląt z tworzywa niezawierającego BPA do miejsca zamieszkania wolontariuszek. Każda z dawczyń zgodziła się podpisać Formularz Świadomej Zgody Ochotnika, zastosować się do instrukcji i wypełnić ankietę. Instrukcję pobierania pokarmu dla wolontariuszek oraz kwestionariusz zamieszczono w aneksie. Po zebraniu próbek mleka w trydniowym cyklu, przechowywano je w zamrażarce w temp. -20°C . Dane dotyczące zebranych próbek zamieszczono w **Tabeli 31**.

Próbki mleka poddano analizie na zawartość parabenów i bisfenoli zgodnie z wcześniej opracowaną metodą QuEChERS-LC-MS/MS. Z uwagi na obecność oznaczanych związków w matrycach biologicznych w formie wolnej i w postaci związanej z glukuronidem przeprowadzono dla każdej próbki dwie odrębne ekstrakcje różniące się wstępną procedurą przygotowania. W celu oznaczenia wolnej formy związków w mleku, próbki poddano bezpośredniej ekstrakcji metodą QuEChERS, natomiast oznaczanie całkowitej zawartości analitów w mleku polegało na przeprowadzeniu wstępnej reakcji hydrolizy enzymatycznej. W reakcji pod wpływem enzymu β -glukuronidazy, anality występujące w postaci związanej jako glukuronidy zostały uwolnione i dopiero w dalszym etapie próbkę poddano ekstrakcji metodą QuEChERS. Po ekstrakcji wszystkie próbki poddano analizie z wykorzystaniem metody LC-MS/MS. W **Tabelach 32–35** zamieszczono wyniki uzyskane dla wolnych analitów w dwóch punktach czasowych. Z kolei w **Tabelach 36–39** zebrano wyniki otrzymane dla całkowitej zawartości analitów w próbkach mleka.

Tab. 31. Zestawienie próbek mleka z uwzględnieniem dawczyń

Nr próbki	Okres zbierania próbek	Miejsce zamieszkania dawczyń	Wiek dawczyni
1.1 1.2	20 - 22.09.2016 16 - 18.12.2016	Poznań, Stare Miasto	32
2.1 2.2	24 - 26.09.2016 12 - 14.12.2016	Poznań, Wilda	31
3.1 3.2	22 - 24.09.2016 17 - 19.12.2016	Poznań, Wilda	30
4.1 4.2	29.09 - 1.10.2016 14 - 16.12.2016	Poznań, Strzeszyn	34
5.1 5.2	10 - 12.10.2016 29 - 31.01.2017	Poznań, Grunwald	37
6.1 6.2	14 - 16.10.2016 6 - 8.01.2017	Poznań, Wilda	40
7.1 7.2	20 - 22.10.2016 14 - 16.01.2017	Poznań, Rataje	29
8.1 8.2	23 - 25.10.2016 11 - 13.01.2017	Poznań, Stare Miasto	24
9.1 9.2	06 - 08.11.2016 18 - 20.01.2016	Poznań, Junikowo	32
10.1 10.2	17 - 19.06.2016 9 - 11.09.2016	Bogucin	26
11.1 11.2	20 - 22.06.2016 9 - 11.09.2016	Poznań, Sołacz	30
12.1 12.2	18 - 20.06.2016 06 - 08.09.2016	Lusówko	26
13.1 13.2	24 - 26.06.2016 10 - 12.09.2016	Poznań, Grunwald	35
14.1 14.2	25 - 27.06.2016 24 - 26.09.2016	Poznań, Rataje	36
15.1 15.2	3 - 5.07.2016 4 - 6.10.2016	Murowana Goślina	26
16.1 16.2	9 - 11.07.2016 12 - 14.09.2016	Murowana Goślina	36
17.1 17.2	13 - 15.07.2016 26 - 28.09.2016	Bogucin	30
18.1 18.2	12 - 14.07.2016 15 - 17.10.2016	Poznań, Nowe Miasto	31
19.1 19.2	13 - 15.07.2016 17 - 19.10.2016	Poznań, Jeżyce	31
20.1 20.2	11 - 13.07.2016 1 - 3.10.2016	Dąbrówka	24
21.1 21.2	15 - 17.09.2016 3 - 5.12.2016	Poznań, Piątkowo	31

Tab. 32. Wyniki zawartości parabenów w formie wolnej w próbkach mleka kobiecego pobranego między 2 a 4 tygodniem po porodzie (n=3)

Próbka	Stężenie [ng/ml]				
	MP	EP	PP	BP	BzP
1.1	0,76±0,12	0,11±0,01	0,25±0,06	<LOQ	<LOD
2.1	0,56±0,02	0,31±0,03	0,09±0,04	0,08±0,02	<LOD
3.1	0,27±0,03	0,04±0,01	0,12±0,03	<LOQ	<LOD
4.1	0,49±0,09	0,12±0,03	0,23±0,07	<LOQ	<LOQ
5.1	1,37±0,04	0,17±0,03	0,22±0,02	<LOQ	<LOD
6.1	0,28±0,08	<LOQ	0,13±0,07	<LOQ	<LOQ
7.1	0,55±0,06	<LOQ	0,26±0,01	<LOQ	<LOQ
8.1	0,45±0,15	<LOQ	0,26±0,02	<LOQ	<LOQ
9.1	0,28±0,03	<LOQ	0,08±0,01	<LOD	<LOQ
10.1	0,40±0,04	0,10±0,02	0,14±0,01	<LOQ	<LOD
11.1	0,45±0,03	0,16±0,04	0,14±0,03	<LOQ	<LOD
12.1	0,30±0,004	0,13±0,01	0,10±0,04	<LOQ	<LOD
13.1	4,83±0,28	0,11±0,02	0,28±0,03	<LOQ	<LOD
14.1	0,24±0,04	0,11±0,03	0,23±0,01	<LOQ	<LOD
15.1	0,34±0,01	0,19±0,02	0,18±0,01	<LOQ	<LOD
16.1	0,47±0,06	0,15±0,02	0,48±0,04	<LOQ	<LOQ
17.1	0,33±0,04	0,08±0,04	0,38±0,01	<LOQ	<LOD
18.1	1,17±0,05	0,11±0,02	0,43±0,01	0,07±0,02	<LOD
19.1	0,34±0,02	0,19±0,08	0,16±0,04	<LOQ	<LOD
20.1	0,35±0,02	<LOQ	0,12±0,02	<LOQ	<LOD
21.1	0,31±0,02	0,25±0,03	0,13±0,03	0,06±0,02	<LOD
Wartość min	0,24	<LOQ	0,08	<LOD	<LOD
Wartość max	4,83	0,31	0,48	0,08	<LOQ
Średnia	0,69	0,15	0,21	0,07	-

Tab. 33. Wyniki zawartości bisfenoli w formie wolnej w próbkach mleka kobiecego pobranego między 2 a 4 tygodniem po porodzie (n=3)

Próbka	Stężenie [ng/ml]			
	BPA	BPS	BPF	BPAF
1.1	4,85±0,89	<LOQ	<LOD	<LOQ
2.1	0,80±0,36	0,06±0,02	<LOD	<LOQ
3.1	<LOQ	0,03±0,01	<LOD	<LOQ
4.1	1,48±0,12	0,04±0,03	<LOD	0,12±0,04
5.1	<LOD	0,07±0,02	<LOD	<LOQ
6.1	<LOD	0,05±0,02	<LOD	<LOQ
7.1	<LOD	0,05±0,001	<LOD	<LOQ
8.1	<LOD	0,11±0,05	<LOD	0,10±0,06
9.1	<LOD	0,04±0,02	<LOD	<LOQ
10.1	3,05±0,01	0,40±0,07	<LOD	0,10±0,01
11.1	0,9±0,17	0,12±0,01	<LOD	0,10±0,02
12.1	2,82±0,06	0,03±0,01	<LOD	<LOQ
13.1	1,25±0,07	0,04±0,02	<LOD	<LOQ
14.1	1,63±0,04	0,04±0,02	<LOD	<LOQ
15.1	1,54±0,13	0,04±0,02	<LOD	<LOQ
16.1	1,62±0,03	0,04±0,01	<LOD	0,11±0,02
17.1	1,28±0,08	0,03±0,01	<LOD	0,11±0
18.1	3,15±0,37	0,05±0,01	<LOD	0,1±0,01
19.1	3,61±0,50	0,11±0,02	<LOD	<LOQ
20.1	3,02±0,09	0,12±0,01	<LOD	<LOQ
21.1	2,66±0,71	0,12±0,01	<LOD	<LOQ
Wartość min	<LOD	0,03	<LOD	<LOQ
Wartość max	4,85	0,4	<LOD	0,12
Średnia	2,24	0,08	-	0,11

Tab. 34. Wyniki zawartości parabenów w formie wolnej w próbkach mleka kobiecego pobranego między 3 a 4 miesiącem po porodzie (n=3)

Próbka	Stężenie [ng/ml]				
	MP	EP	PP	BP	BzP
1.2	0,48±0,04	0,16±0,03	0,22±0,07	0,07±0,04	<LOD
2.2	0,26±0,02	0,09±0,01	0,10±0,02	<LOQ	<LOD
3.2	0,27±0,02	<LOQ	0,11±0,03	<LOQ	<LOD
4.2	0,22±0,05	<LOQ	0,10±0,05	<LOQ	<LOQ
5.2	3,95±0,08	0,11±0,04	2,96±0,17	<LOQ	<LOQ
6.2	0,23±0,04	<LOQ	0,15±0,07	<LOD	<LOD
7.2	13,21±0,1	0,75±0,03	4,46±0,42	<LOQ	<LOQ
8.2	0,80±0,07	<LOQ	0,27±0,03	<LOD	<LOD
9.2	0,23±0,02	<LOQ	0,10±0,03	<LOQ	<LOQ
10.2	2,77±0,08	1,47±0,01	0,30±0,05	0,07±0,01	<LOD
11.2	2,34±0,15	0,21±0,08	1,35±0,04	<LOQ	<LOD
12.2	0,46±0,01	0,16±0,05	0,19±0,04	<LOQ	<LOD
13.2	0,33±0,01	<LOQ	0,21±0,06	<LOQ	<LOD
14.2	0,32±0,03	0,11±0,01	0,20±0,02	<LOQ	<LOD
15.2	0,54±0,14	<LOQ	0,19±0,05	<LOQ	<LOD
16.2	0,42±0,01	0,20±0,02	0,40±0,03	<LOQ	<LOD
17.2	0,26±0,03	0,10±0,03	0,40±0,02	<LOQ	<LOD
18.2	0,71±0,06	0,08±0,01	0,37±0,03	<LOQ	<LOQ
19.2	0,31±0,05	0,13±0,01	0,11±0,01	<LOQ	<LOD
20.2	0,37±0,08	<LOQ	0,10±0,04	<LOQ	<LOD
21.2	0,32±0,01	0,13±0,02	0,12±0	<LOQ	<LOD
Wartość min	0,22	<LOQ	0,10	<LOD	<LOD
Wartość max	13,21	1,47	4,46	0,07	<LOQ
Średnia	1,37	0,28	0,59	0,07	-

Tab. 35. Wyniki zawartości bisfenoli w formie wolnej w próbkach mleka kobiecego pobranego między 3 a 4 miesiącem po porodzie (n=3)

Próbka	Stężenie [ng/ml]			
	BPA	BPS	BPF	BPAF
1.2	2,38±0,06	<LOQ	<LOD	<LOQ
2.2	<LOQ	0,03±0,02	<LOD	<LOQ
3.2	<LOD	0,05±0,03	<LOD	<LOQ
4.2	<LOQ	0,05±0,01	<LOD	<LOQ
5.2	<LOD	0,06±0,04	<LOD	<LOQ
6.2	<LOD	0,05±0,03	<LOD	<LOQ
7.2	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ
8.2	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ
9.2	<LOD	0,04±0,02	<LOD	<LOQ
10.2	1,22±0,1	0,15±0,08	<LOD	0,13±0,01
11.2	1,95±0,35	0,09±0,02	<LOD	0,11±0,03
12.2	1,01±0,35	0,04±0,01	<LOD	<LOQ
13.2	1,69±0,21	0,05±0,01	<LOD	<LOQ
14.2	<LOQ	0,05±0,02	<LOD	<LOQ
15.2	<LOD	0,04±0,01	<LOD	<LOQ
16.2	1,71±0,49	0,03±0,02	<LOD	<LOQ
17.2	<LOD	0,07±0,01	<LOD	0,10±0,01
18.2	1,76±0,02	0,06±0,02	<LOD	<LOQ
19.2	2,64±0,49	0,11±0,01	<LOD	<LOQ
20.2	2,78±0,25	0,10±0,01	<LOD	<LOQ
21.2	2,72±0,02	0,11±0,02	<LOD	<LOQ
Wartość min	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ
Wartość max	2,78	0,15	<LOD	0,13
Średnia	1,99	0,07	-	0,11

Tab. 36. Wyniki całkowitej zawartości parabenów w próbkach mleka kobiecego pobranego między 2 a 4 tygodniem po porodzie (n=3)

Próbka	Stężenie [ng/ml]				
	MP	EP	PP	BP	BzP
1.1	1,08±0,19	0,87±0,02	0,21±0,05	<LOQ	<LOD
2.1	1,97±0,06	1,68±0,32	0,11±0,02	<LOQ	<LOD
3.1	0,69±0,10	0,11±0,03	0,24±0,08	<LOQ	<LOD
4.1	0,50±0,03	0,13±0,01	0,28±0,04	<LOQ	<LOQ
5.1	1,47±0,29	0,18±0,02	0,35±0,03	<LOQ	<LOQ
6.1	0,20±0,01	<LOQ	0,13±0,02	<LOQ	<LOQ
7.1	1,81±0,26	0,17±0,05	0,43±0,07	<LOQ	<LOQ
8.1	1,00±0,26	0,10±0,03	0,25±0,08	<LOQ	<LOQ
9.1	0,47±0,08	0,41±0,003	0,09±0,03	<LOQ	<LOQ
10.1	0,57±0,05	0,11±0,01	0,22±0,04	<LOQ	<LOD
11.1	0,66±0,03	0,14±0,05	0,16±0,02	<LOQ	<LOD
12.1	1,37±0,16	1,07±0,09	0,24±0,02	<LOQ	<LOD
13.1	5,70±1,06	0,24±0,05	0,43±0,04	<LOQ	<LOD
14.1	0,39±0,04	0,12±0,01	0,24±0,04	0,06±0	<LOD
15.1	0,44±0,03	0,19±0,01	0,21±0,05	<LOQ	<LOD
16.1	0,48±0,10	0,22±0,02	0,36±0,03	<LOQ	<LOQ
17.1	0,35±0,05	0,08±0,03	0,35±0,03	<LOQ	<LOQ
18.1	1,17±0,14	0,14±0,01	0,43±0,02	0,09±0,02	<LOQ
19.1	0,34±0,05	0,18±0,04	0,16±0,05	<LOQ	<LOD
20.1	0,35±0,06	0,08±0,01	0,13±0,03	<LOQ	<LOD
21.1	0,39±0,09	0,38±0,03	0,15±0,05	0,06±0,01	<LOD
Wartość min	0,2	<LOQ	0,09	<LOQ	<LOD
Wartość max	5,7	1,68	0,43	0,09	<LOQ
Średnia	1,02	0,33	0,25	0,07	-

Tab. 37. Wyniki całkowitej zawartości bisfenoli w próbkach mleka kobiecego pobranego między 2 a 4 tygodniem po porodzie (n=3)

Próbka	Stężenie [ng/ml]			
	BPA	BPS	BPF	BPAF
1.1	4,86±0,66	0,07±0,02	<LOD	<LOQ
2.1	<LOD	0,05±0,03	<LOD	0,12±0,02
3.1	<LOQ	0,09±0,04	<LOD	<LOQ
4.1	2,37±0,03	0,06±0,05	<LOD	0,12±0,02
5.1	<LOQ	0,10±0,04	<LOD	<LOQ
6.1	<LOD	0,07±0,02	<LOD	<LOQ
7.1	<LOD	0,05±0,03	<LOD	<LOQ
8.1	<LOD	0,12±0,04	<LOD	0,10±0,03
9.1	<LOD	0,10±0,03	<LOD	<LOQ
10.1	3,07±0,22	0,84±0,08	<LOD	0,10±0,01
11.1	3,57±0,45	0,55±0,09	<LOD	0,14±0,04
12.1	3,38±0,03	0,54±0,11	<LOD	<LOQ
13.1	1,41±0,02	0,06±0,02	<LOD	<LOQ
14.1	1,69±0,04	0,07±0,04	<LOD	<LOQ
15.1	1,62±0,08	0,06±0,04	<LOD	<LOQ
16.1	2,10±0,13	0,04±0,01	<LOD	0,10±0,01
17.1	1,85±0,16	0,03±0,01	<LOD	<LOQ
18.1	3,86±0,38	0,07±0,03	<LOD	0,11±0,02
19.1	3,57±0,67	0,13±0,01	<LOD	<LOQ
20.1	3,29±0,19	0,12±0,01	<LOD	<LOQ
21.1	2,76±0,28	0,12±0,01	<LOD	<LOQ
Wartość min	1,41	0,04	<LOD	<LOQ
Wartość max	4,86	0,84	<LOD	0,14
Średnia	2,82	0,16	-	0,11

Tab. 38. Wyniki całkowitej zawartości parabenów w próbkach mleka kobiecego pobranego między 3 a 4 miesiącem po porodzie (n=3)

Próbka	Stężenie [ng/ml]				
	MP	EP	PP	BP	BzP
1.2	0,6±0,04	0,54±0,05	0,29±0,03	0,09±0,05	<LOQ
2.2	0,41±0,08	0,14±0,05	0,19±0,02	<LOQ	<LOD
3.2	0,31±0,03	0,09±0,01	0,16±0,01	<LOQ	<LOD
4.2	0,28±0,09	0,09±0,02	0,10±0,04	<LOQ	<LOQ
5.2	4,86±0,02	0,13±0,04	3,65±0,14	<LOQ	<LOQ
6.2	0,21±0,03	<LOQ	0,14±0,01	<LOQ	<LOQ
7.2	13,98±1,31	0,70±0,06	4,25±0,26	<LOQ	<LOD
8.2	1,05±0,05	<LOQ	0,32±0,05	0,06±0,05	<LOQ
9.2	0,44±0,06	0,41±0,02	0,15±0,06	<LOQ	<LOQ
10.2	2,84±0,14	1,53±0,08	0,28±0,06	0,08±0	<LOD
11.2	2,21±0,17	0,25±0,05	1,39±0,03	0,07±0,01	<LOD
12.2	0,48±0,02	0,35±0,03	0,19±0,01	<LOQ	<LOD
13.2	0,52±0,04	0,14±0,03	0,22±0,02	<LOQ	<LOD
14.2	0,42±0,01	0,20±0,03	0,25±0,02	<LOQ	<LOD
15.2	0,55±0,11	<LOQ	0,21±0,03	<LOQ	<LOD
16.2	0,57±0,03	0,29±0,03	0,38±0,04	<LOQ	<LOD
17.2	0,26±0,03	0,10±0,02	0,36±0,01	0,07±0,03	<LOQ
18.2	0,74±0,02	0,09±0,03	0,37±0,05	<LOQ	<LOQ
19.2	0,32±0,05	0,14±0,02	0,11±0,03	<LOQ	<LOQ
20.2	0,52±0,15	0,09±0,03	0,17±0,02	<LOQ	<LOD
21.2	0,38±0,01	0,17±0,01	0,18±0,03	<LOQ	<LOD
Wartość min	0,21	<LOQ	0,10	<LOQ	<LOD
Wartość max	13,98	1,53	4,25	0,09	<LOQ
Średnia	1,52	0,30	0,64	0,07	-

Tab. 39. Wyniki całkowitej zawartości bisfenoli w próbkach mleka kobiecego pobranego między 3 a 4 miesiącem po porodzie (n=3)

Próbka	Stężenie [ng/ml]			
	BPA	BPS	BPF	BPAF
1.2	2,52±0,67	0,05±0,03	<LOD	<LOQ
2.2	<LOQ	0,09±0,02	<LOD	0,11±0,02
3.2	<LOQ	0,05±0,02	<LOD	<LOQ
4.2	<LOQ	0,08±0,02	<LOD	<LOQ
5.2	<LOD	0,06±0,01	<LOD	<LOQ
6.2	<LOD	0,05±0,04	<LOD	<LOQ
7.2	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ
8.2	<LOD	0,05±0,04	<LOD	0,10±0,04
9.2	<LOD	0,13±0,05	<LOD	<LOQ
10.2	3,34±0,01	1,27±0,02	<LOD	0,15±0,08
11.2	2,20±0,06	0,39±0,09	<LOD	0,11±0,07
12.2	3,06±0,70	1,20±0,17	<LOD	<LOQ
13.2	1,82±0,07	0,05±0,004	<LOD	<LOQ
14.2	<LOQ	0,09±0,01	<LOD	<LOQ
15.2	0,80±0,10	0,07±0,04	<LOD	0,12±0,05
16.2	2,64±0,29	0,13±0,01	<LOD	<LOQ
17.2	1,90±0,12	0,06±0,02	<LOD	0,11±0,02
18.2	1,96±0,05	0,05±0,01	<LOD	<LOQ
19.2	2,64±0,29	0,13±0,01	<LOD	<LOQ
20.2	3,11±0,04	0,12±0,05	<LOD	<LOQ
21.2	3,20±0,45	0,12±0,03	<LOD	<LOQ
Wartość min	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ
Wartość max	3,34	1,27	<LOD	0,15
Średnia	2,35	0,21	-	0,12

Zawartość formy związanej obliczono jako różnicę zawartości całkowitej i substancji wolnej. Uzyskane wyniki przedstawiono w **Tabelach 40-43**. W większości przypadków zawartość obu form była na podobnym poziomie, lecz w niewielkiej liczbie próbek zawartość formy związanej była kilkukrotnie wyższa od zawartości formy wolnej. Ponadto różnica między zawartością obu tych form nie była w żaden sposób skorelowana z grupą związków (parabenów czy bisfenoli) czy też z czasem pobrania próbki (między 2-7 tygodniem lub między 3-4 miesiącem).

Tab. 40. Całkowita zawartość MP, EP i PP oraz ich zawartości w postaci wolnej i związanej w próbkach mleka pobranych w pierwszym punkcie czasowym

Próbka	Stężenie [ng/ml]								
	MP (c)*	MP (w)**	MP (z)***	EP (c)*	EP (w)**	EP (z)***	PP (c)*	PP (w)**	PP (z)***
1.1	1,08	0,76	0,32	0,87	0,11	0,76	0,21	0,25	-
2.1	1,97	0,56	1,41	1,68	0,31	1,37	0,11	0,09	0,02
3.1	0,69	0,27	0,42	0,11	0,04	0,07	0,24	0,12	0,12
4.1	0,50	0,49	0,01	0,13	0,12	0,01	0,28	0,23	0,05
5.1	1,47	1,37	0,10	0,18	0,17	0,01	0,35	0,22	0,13
6.1	0,20	0,28	-	<LOQ	<LOQ	-	0,13	0,13	0
7.1	1,81	0,55	1,26	0,17	<LOQ	0,17	0,43	0,26	0,17
8.1	1,00	0,45	0,55	0,10	<LOQ	0,10	0,25	0,26	-
9.1	0,47	0,28	0,19	0,41	<LOQ	0,41	0,09	0,08	0,01
10.1	0,57	0,40	0,17	0,11	0,10	0,01	0,22	0,14	0,08
11.1	0,66	0,45	0,21	0,14	0,16	-	0,16	0,14	0,02
12.1	1,37	0,30	1,07	1,07	0,13	0,94	0,24	0,1	0,14
13.1	5,70	4,83	0,87	0,24	0,11	0,13	0,43	0,28	0,15
14.1	0,39	0,24	0,15	0,12	0,11	0,01	0,24	0,23	0,01
15.1	0,44	0,34	0,10	0,19	0,19	0	0,21	0,18	0,03
16.1	0,48	0,47	0,01	0,22	0,15	0,07	0,36	0,48	-
17.1	0,35	0,33	0,02	0,08	0,08	0	0,35	0,38	-
18.1	1,17	1,17	0	0,14	0,11	0,03	0,43	0,43	0
19.1	0,34	0,34	0	0,18	0,19	-	0,16	0,16	0
20.1	0,35	0,35	0	0,08	<LOQ	0,08	0,13	0,12	0,01
21.1	0,39	0,31	0,08	0,38	0,25	0,13	0,15	0,13	0,02

(c)* całkowita zawartość parabenów;

(w)** zawartość parabenów w postaci wolnej;

(z)*** zawartość parabenów w postaci związanej.

Tab. 41. Całkowita zawartość BPA i BPS oraz ich zawartości w postaci wolnej i związanej w próbkach mleka pobranych w pierwszym punkcie czasowym

Próbka	Stężenie [ng/ml]					
	BPA (c)*	BPA (w)**	BPA (z)***	BPS (c)*	BPS (w)**	BPS (z)***
1.1	4,86	4,85	0,01	0,07	<LOQ	0,07
2.1	<LOD	0,80	-	0,05	0,06	-
3.1	<LOQ	<LOQ	-	0,09	0,03	0,06
4.1	2,37	1,48	0,89	0,06	0,04	0,02
5.1	<LOQ	<LOD	-	0,10	0,07	0,03
6.1	<LOD	<LOD	-	0,07	0,05	0,02
7.1	<LOD	<LOD	-	0,05	0,05	0
8.1	<LOD	<LOD	-	0,12	0,11	0,01
9.1	<LOD	<LOD	-	0,1	0,04	0,06
10.1	3,07	3,05	0,02	0,84	0,40	0,44
11.1	3,57	0,90	2,67	0,55	0,12	0,43
12.1	3,38	2,82	0,56	0,54	0,03	0,51
13.1	1,41	1,25	0,16	0,06	0,04	0,02
14.1	1,69	1,63	0,06	0,07	0,04	0,03
15.1	1,62	1,54	0,08	0,06	0,04	0,02
16.1	2,10	1,62	0,48	0,04	0,04	0
17.1	1,90	1,28	0,62	0,06	0,03	0,03
18.1	3,86	3,15	0,71	0,07	0,05	0,02
19.1	3,57	3,61	-	0,13	0,11	0,02
20.1	3,29	3,02	0,27	0,12	0,12	0
21.1	2,76	2,66	0,10	0,12	0,12	0

(c)* całkowita zawartość bisfenoli;

(w)** zawartość bisfenoli w postaci wolnej;

(z)*** zawartość bisfenoli w postaci związanej.

Tab. 42. Całkowita zawartość MP, EP i PP oraz ich zawartości w postaci wolnej i związanej w próbkach mleka pobranych w drugim punkcie czasowym

Próbka	Stężenie [ng/ml]								
	MP (c)*	MP (w)**	MP (z)***	EP (c)*	EP (w)**	EP (z)***	PP (c)*	PP (w)**	PP (z)***
1.2	0,6	0,48	0,12	0,54	0,16	0,38	0,29	0,22	0,07
2.2	0,41	0,26	0,15	0,14	0,09	0,05	0,19	0,10	0,09
3.2	0,31	0,27	0,04	0,09	<LOQ	0,09	0,16	0,11	0,05
4.2	0,28	0,22	0,06	0,09	<LOQ	0,09	0,10	0,10	0
5.2	4,86	3,95	0,91	0,13	0,11	0,02	3,65	2,96	0,69
6.2	0,21	0,23	-	<LOQ	<LOQ	-	0,14	0,15	-
7.2	13,98	13,21	0,77	0,70	0,75	-	4,25	4,46	-
8.2	1,05	0,80	0,25	<LOQ	<LOQ	-	0,32	0,27	0,05
9.2	0,44	0,23	0,21	0,41	<LOQ	0,41	0,15	0,1	0,05
10.2	2,84	2,77	0,07	1,53	1,47	0,06	0,28	0,3	-
11.2	2,21	2,34	-	0,25	0,21	0,04	1,39	1,35	0,04
12.2	0,48	0,46	0,02	0,35	0,16	0,19	0,19	0,19	0
13.2	0,52	0,33	0,19	0,14	<LOQ	0,14	0,22	0,21	0,01
14.2	0,42	0,32	0,10	0,2	0,11	0,09	0,25	0,20	0,05
15.2	0,55	0,54	0,01	<LOQ	<LOQ	-	0,21	0,19	0,02
16.2	0,57	0,42	0,15	0,29	0,2	0,09	0,38	0,40	-
17.2	0,26	0,26	0	0,10	0,10	0	0,36	0,40	-
18.2	0,74	0,71	0,03	0,09	0,08	0,01	0,37	0,37	0
19.2	0,32	0,31	0,01	0,14	0,13	0,01	0,11	0,11	0
20.2	0,52	0,37	0,15	0,09	<LOQ	0,09	0,17	0,10	0,07
21.2	0,38	0,32	0,06	0,17	0,13	0,04	0,18	0,12	0,06

(c)* całkowita zawartość parabenów;

(w)** zawartość parabenów w postaci wolnej;

(z)*** zawartość parabenów w postaci związanej.

Tab. 43. Całkowita zawartość BPA i BPS oraz ich zawartości w postaci wolnej i związanej w próbkach mleka pobranych w drugim punkcie czasowym

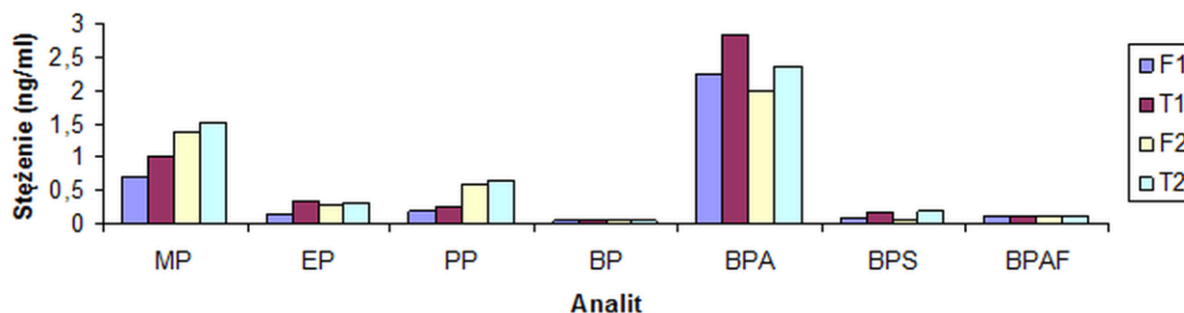
Próbka	Stężenie [ng/ml]					
	BPA (c)*	BPA (w)**	BPA (z)***	BPS (c)*	BPS (w)**	BPS (z)***
1.2	2,52	2,38	0,14	0,05	<LOQ	0,05
2.2	<LOQ	<LOQ	-	0,09	0,03	0,06
3.2	<LOQ	<LOD	-	0,05	0,05	0
4.2	<LOQ	<LOQ	-	0,08	0,05	0,03
5.2	<LOD	<LOD	-	0,06	0,06	0
6.2	<LOD	<LOD	-	0,05	0,05	0
7.2	<LOD	<LOD	-	<LOQ	<LOQ	-
8.2	<LOD	<LOD	-	0,05	<LOQ	0,05
9.2	<LOD	<LOD	-	0,13	0,04	0,09
10.2	3,34	1,22	2,12	1,27	0,15	1,12
11.2	2,20	1,95	0,25	0,39	0,09	0,30
12.2	3,06	1,01	2,05	1,20	0,04	1,16
13.2	1,82	1,69	0,13	0,05	0,05	0
14.2	<LOQ	<LOQ	-	0,09	0,05	0,04
15.2	0,80	<LOD	0,80	0,07	0,04	0,03
16.2	1,85	1,71	0,14	0,03	0,03	0
17.2	1,73	<LOD	1,73	0,08	0,07	0,01
18.2	1,96	1,76	0,20	0,05	0,06	-
19.2	2,64	2,64	0	0,13	0,11	0,02
20.2	3,11	2,78	0,33	0,12	0,10	0,02
21.2	3,20	2,72	0,48	0,12	0,11	0,01

(c)* całkowita zawartość bisfenoli;

(w)** zawartość bisfenoli w postaci wolnej;

(z)*** zawartość bisfenoli w postaci związanej.

Wykres średnich zawartości poszczególnych analitów oznaczonych w postaci wolnej i całkowitej w próbkach z pierwszego i drugiego etapu pobierania (odpowiednio między 2-7 tygodniem i między 3-4 miesiącem) przedstawiono na **Rycinie 34**. Na wykresie nie przedstawiono zawartości BzP i BPF z uwagi na fakt, że związków tych nie oznaczono w żadnej z próbek (nie wykryto lub wykryto poniżej granicy oznaczalności).



Ryc. 34. Wykres średnich stężeń analitów w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 (między 2-7 tygodniem) i 2 (między 3-4 miesiącem)

Spośród pozostałych czterech parabenów najwyższą średnią zawartość odnotowano dla MP, a znacznie niższe wartości uzyskano dla pozostałych 3 parabenów. Dwa spośród parabenów (MP i PP) oznaczone zostały we wszystkich próbkach, EP w większości próbek, a BP w mniej niż połowie - **Ryciny 35-38**.

Średnie stężenie całkowite MP wynosiło 1,02 ng/ml w pierwszym punkcie czasowym i 1,52 ng/ml w drugim punkcie czasowym. Z kolei w postaci wolnej uzyskano odpowiednio niższe wartości średnie MP wynoszące odpowiednio 0,69 ng/ml i 1,37 ng/ml. Najwyższą wartość całkowitą MP oznaczono w próbce 7.2, która wynosiła 13,98 ng/ml, a drugie co do wielkości całkowite stężenie MP uzyskano dla próbki 5.2. Jak wynikało z analizy przeprowadzonych ankiet dawczyni tych próbek deklarowały codzienne stosowanie balsamów do ciała – obie stosowały jeden produkt tej samej firmy. Analogiczne zależności uzyskano dla stężenia propyloparabenu. Podobnie w przypadku próbki 7.2 oznaczono najwyższe stężenie PP (dla jego postaci wolnej 4,46 ng/ml), a kolejne co do wielkości całkowite stężenie tego związku 3,65 ng/ml, zmierzono dla próbki 5.2. Co ciekawe, jedynie dawczyni mleka oznaczonego numerem 6 deklarowała unikanie stosowania kosmetyków, co odzwierciedliło się w uzyskanych wynikach będących zawsze poniżej wartości średniej.

W przypadku oznaczeń PP, dla próbek z pierwszego punktu czasowego uzyskano całkowite średnie stężenie analitu równe 0,25 ng/ml, a w drugim punkcie czasowym 0,64 ng/ml. Natomiast w postaci wolnej zmierzono odpowiednio niższe wartości średnie PP, tj. 0,21 ng/ml i 0,59 ng/ml. Uzyskane stężenia są kilkakrotnie niższe od tych odnotowanych dla MP.

W większości próbek oznaczono również EP, przy czym w pierwszym punkcie czasowym średnie całkowite stężenie analitu wynosiło 0,33 ng/ml, a tylko dla jednej próbki oznaczono całkowite stężenie analitu poniżej LOQ (<0,08 ng/ml). W drugim punkcie

czasowym średnie całkowite stężenie analitu było na podobnym poziomie, ale już dla trzech próbek znajdowało się poniżej LOQ. Odpowiednio niższe stężenia zmierzono dla EP w postaci wolnej. W pierwszym punkcie czasowym uzyskano średnią zawartość EP w postaci wolnej równą 0,15 ng/ml i pięć wyników poniżej granicy oznaczalności. W drugim punkcie czasowym uzyskano średnią zawartość EP w postaci wolnej równą 0,28 ng/ml i aż osiem wyników poniżej granicy oznaczalności. Średnie stężenie EP było niższe niż PP.

BP w większości próbek znajdował się na poziomie poniżej LOQ (<0,06 ng/ml), a w trzech przypadkach nie został wykryty (<0,02 ng/ml). Oznaczone zawartości BP mieszczą się w granicach od 0,06 do 0,09 ng/ml. Średnio oznaczono BP w próbkach mleka w ilości 0,07 ng/ml, co nieznacznie tylko przekracza wartość granicy oznaczalności.

Oznaczone ilości parabenów i proporcje pomiędzy zawartością poszczególnych związków z tej grupy odpowiadają ich rozpowszechnieniu zarówno w kosmetykach, jak i w środowisku. MP jest najczęściej stosowanym parabenem w kosmetykach i występuje zazwyczaj w kilkukrotnie większych ilościach niż EP i PP, a pozostałe parabeny praktycznie w kosmetykach nie występują [6, 307, 318]. Analogiczne zróżnicowane występowanie różnych parabenów odnotowano również w środowisku [319, 320], lecz w tym przypadku przewaga MP nad innymi parabenami nie zawsze była znacząca, a BP stanowi istotny składnik tej grupy zanieczyszczeń, co niewątpliwie związane było ze znacznie lepszą biodegradacją parabenów o krótszych, niż o dłuższych łańcuchach alkilowych [321].

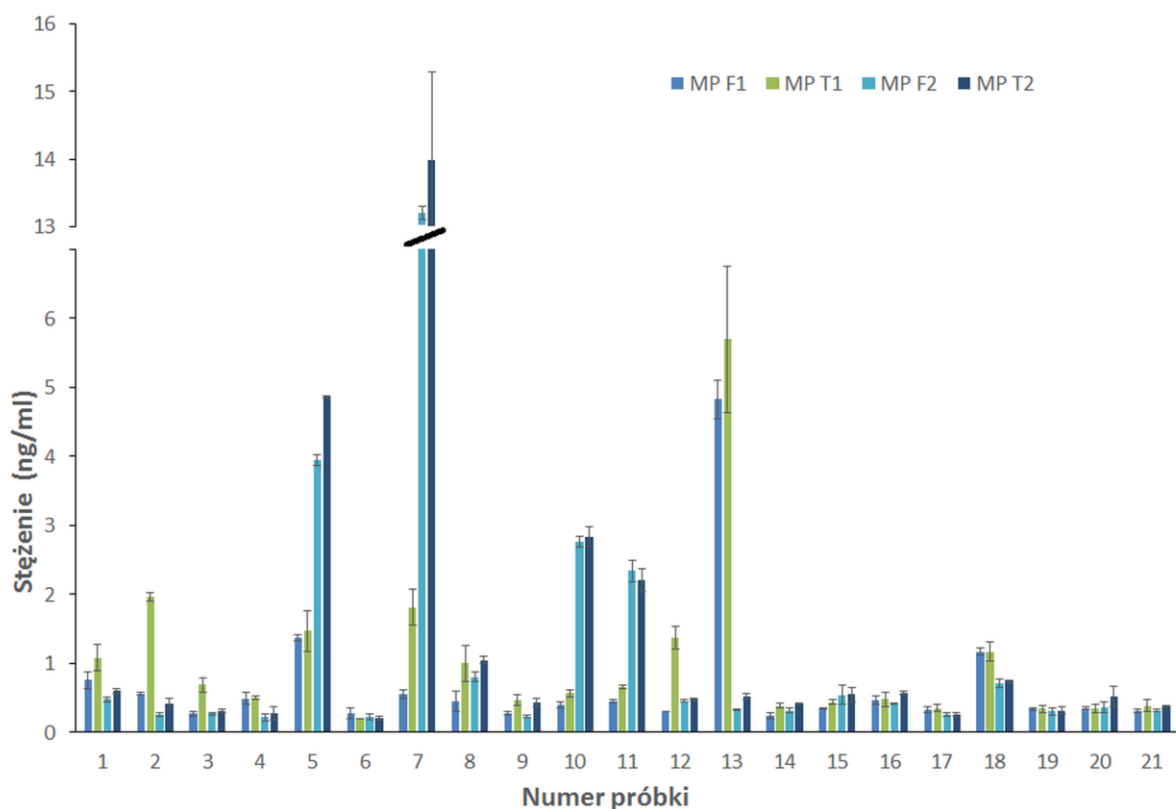
Z grupy bisfenoli najczęściej stosowanym związkiem jest BPA. Jednakże tego związku nie oznaczono we wszystkich próbkach (**Rycina 39**) z uwagi na jego niską odpowiedź w warunkach prowadzonej analizy i co za tym idzie, z wysokimi wartościami stężeń dla wyznaczonych granicy oznaczalności i granicy wykrywalności, odpowiednio 0,67 ng/ml i 0,19 ng/ml (**Tabela 28**). Średnie całkowite stężenie BPA wyniosło 2,82 ng/ml w próbkach mleka z pierwszego punktu czasowego, a 2,35 ng/ml z drugiego punktu czasowego. Natomiast średnie stężenia BPA w wolnej postaci wyniosły odpowiednio mniej – 2,24 ng/ml i 1,99 ng/ml. BPA jest związkiem o najwyższym średnim stężeniu spośród obu grup analitów - parabenów i bisfenoli, oznaczanych w trakcie prowadzonych badań - **Rycina 34**. W przypadku próbki numer 1, dla pomiarów w pierwszym punkcie czasowym uzyskano najwyższy poziom BPA tj. około 5 ng/ml, zarówno w przypadku formy wolnej jak i całkowitej. Dawczyni tej próbki mleka deklarowała się jako była palaczka. Z kolei w drugim punkcie czasowym najwyższe stężenie całkowite oznaczono w próbce 10 (3,34 ng/ml), a najwyższe stężenie w postaci wolnej tego związku w próbce 20 (2,78 ng/ml), której dawczyni także paliła w przeszłości papierosy - **Rycina 39**. Jedynie dwie wolontariuszki

przyznały się do nałogu tytoniowego (zarzuconego) i w obu przypadkach stężenie BPA oznaczone w próbkach mleka należało do najwyższych.

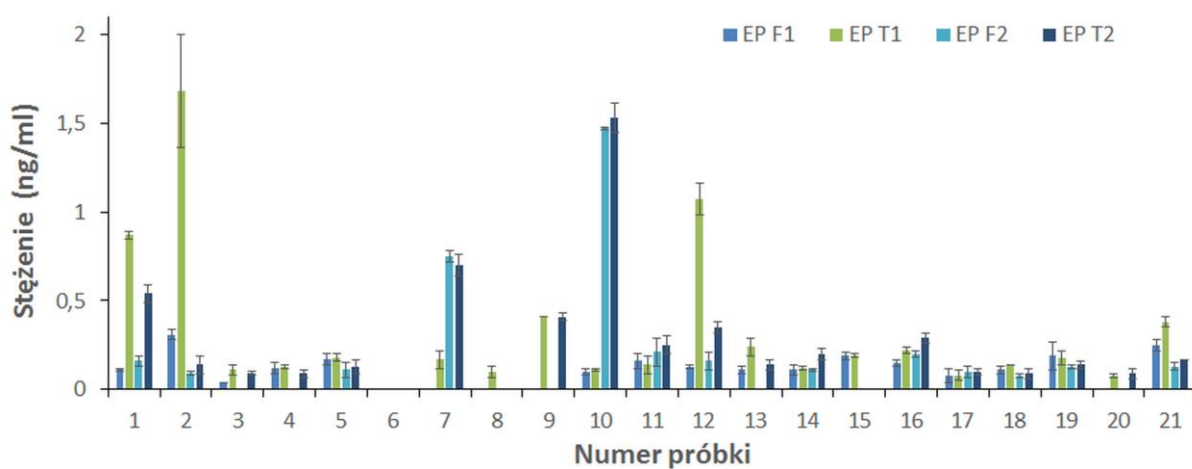
Z grupy bisfenoli najczęściej oznaczanym związkiem był BPS. Nie jest to związek tak rozpowszechniony, jak BPA [322, 323], a w warunkach prowadzonej analizy uzyskano dla niego znacząco niższe wartości granicy oznaczalności i wykrywalności (odpowiednio 0,03 ng/ml i 0,01 ng/ml) - **Tabela 28**. Średnie całkowite stężenie BPS wynosiło dla próbek z pierwszego punktu czasowego 0,16 ng/ml i dla próbek z drugiego punktu czasowego 0,21 ng/ml. Natomiast w przypadku pomiaru stężenia wolnego BPS odnotowano, że związku w tej formie było około połowę mniej, stwierdzono średnio 0,08 ng/ml w pierwszym punkcie czasowym, a w drugim 0,07 ng/ml - **Rycina 34**. Wśród analizowanych próbek, w większości przypadków BPS oznaczono na poziomie około 0,1 ng/ml, a tylko w 3 próbkach na poziomie znacznie wyższym, lecz nieprzekraczającym 1,3 ng/ml - **Rycina 40**. Niestety nie znaleziono korelacji pomiędzy wyższym stężeniem BPS, a informacjami zebranymi z ankiet dawczyń mleka.

BPF ze względu na wysoką granicę oznaczalności metody i jednocześnie stosunkowo małe zastosowanie nie został wykryty w żadnej z próbek. Natomiast BPAF oznaczono w około jednej trzeciej próbek, zaś w pozostałych próbkach wykryto poniżej granicy oznaczalności (<0,10 ng/ml). W przypadku oznaczania całkowitego stężenia BPAF otrzymano średnią wartość 0,11 ng/ml i 0,12 ng/ml dla dwóch punktów czasowych, a dla pomiarów stężeń postaci wolnej tego związku, uzyskano identyczne wartości średnie równe 0,11 ng/ml, co nieznacznie tylko przekracza wartość granicy oznaczalności.

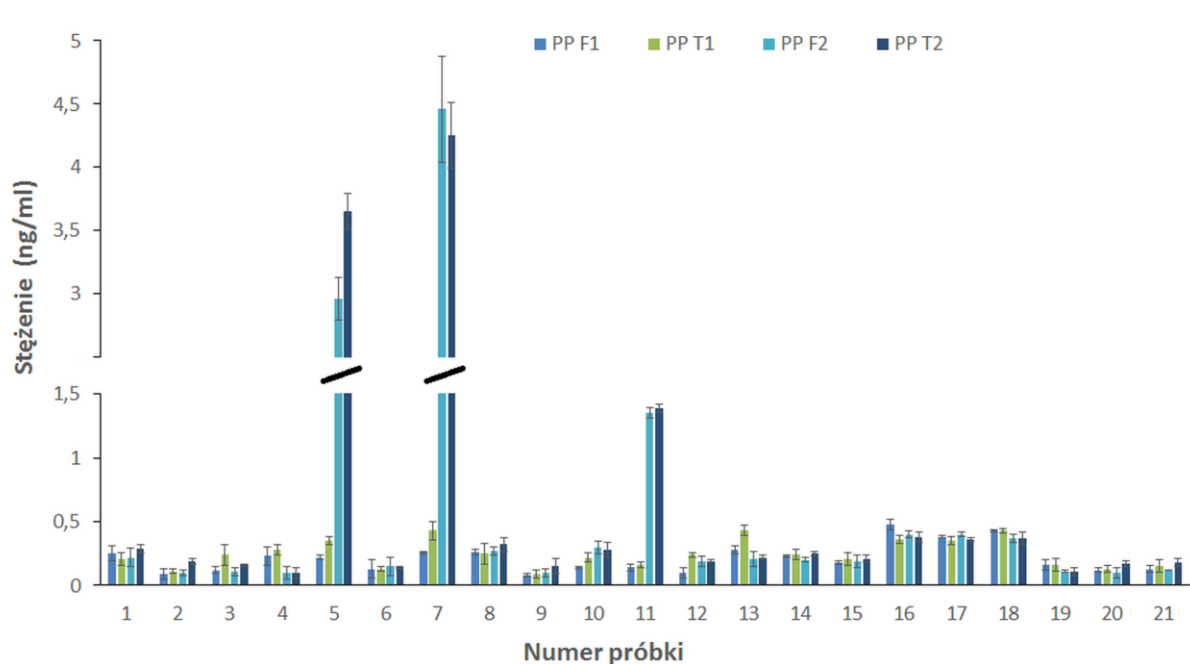
Stężenia bisfenoli nie korelowały ze stężeniami parabenów, których obecność uzasadniano głównie stosowaniem kosmetyków. Z kolei występowanie bisfenoli można kojarzyć z czynnikami środowiskowymi, np. nałogiem palenia papierosów. Średnie stężenie najczęściej występującego MP kształtowało się na poziomie około 1 ng/ml, a z kolei średnie stężenie BPA, choć obecnego na poziomie mierzalnym tylko w niektórych próbkach, było rzędu kilku ng/ml. Ponieważ aktywność estrogenna BPA jest 1 tys. - 10 tys. razy niższa niż estradiolu [324], a MP 2,5 mln. - 3 mln. niższa [313, 21], to właśnie BPA może mieć najbardziej istotny wpływ na karmione dzieci, a nie MP, który stosowany jest w znacznej ilości kosmetyków. Aktywność pozostałych dwóch parabenów występujących w większości próbek mleka kobiecego, tj. EP i PP, w porównaniu do estrogenu jest odpowiednio 150 tys. - 200 tys. (EP) i 30 tys. razy (PP) niższa [313, 21]. Jest ona wyższa niż aktywność MP, lecz przy niskim stężeniu EP i PP w próbkach mleka, wpływ tych związków nie ma praktycznie znaczenia w porównaniu z wpływem BPA.



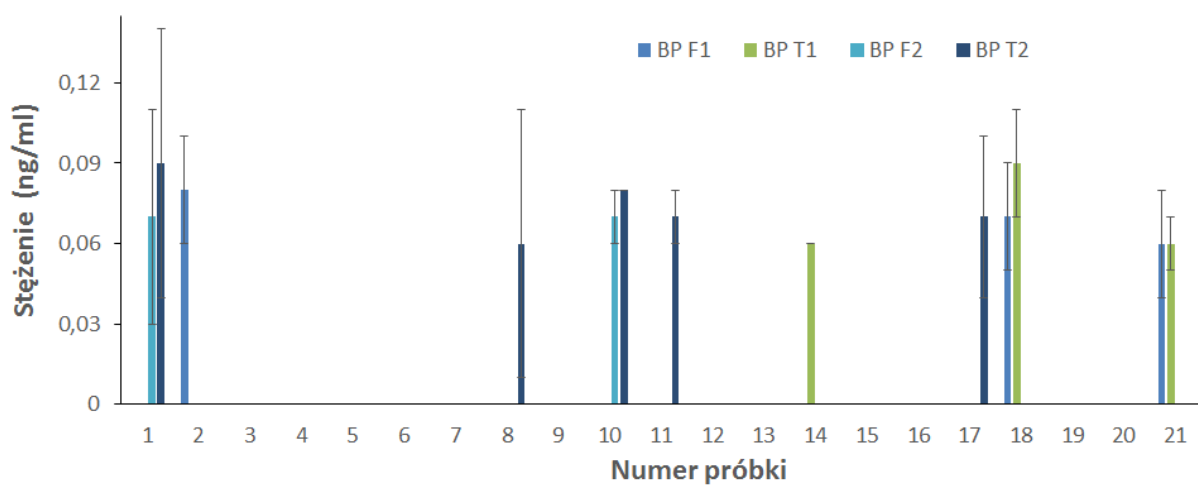
Ryc. 35. Wykres średnich stężeń MP w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2



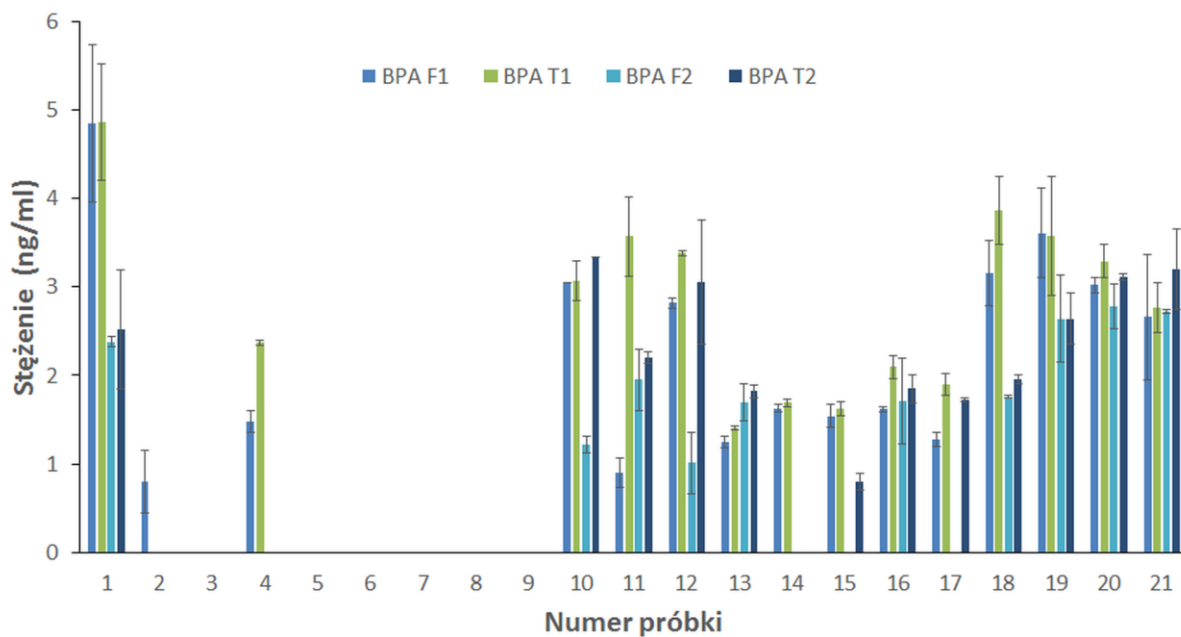
Ryc. 36. Wykres średnich stężeń EP w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2



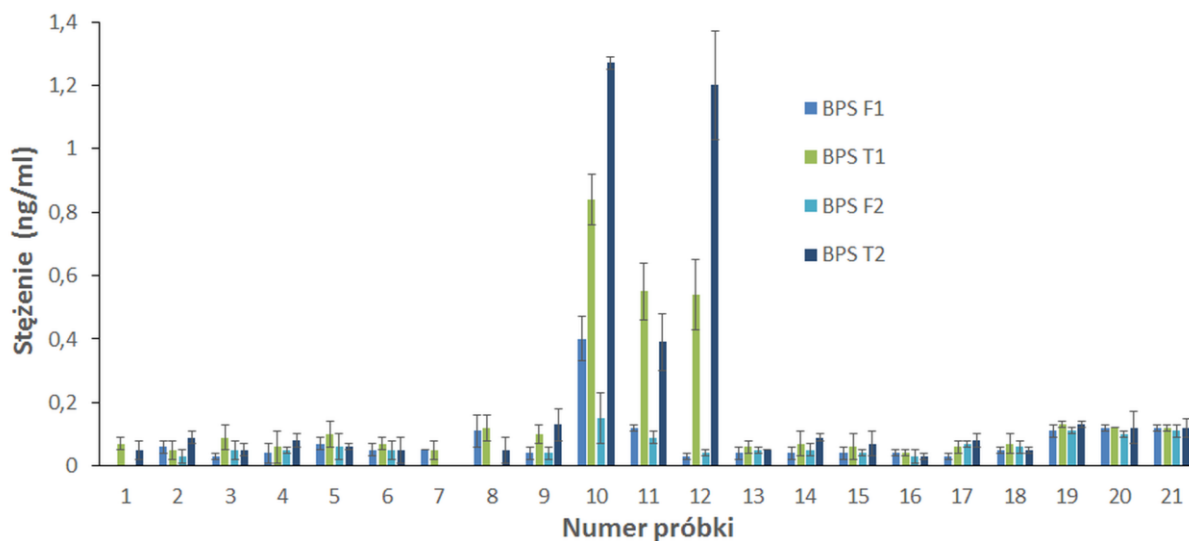
Ryc. 37. Wykres średnich stężeń PP w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2



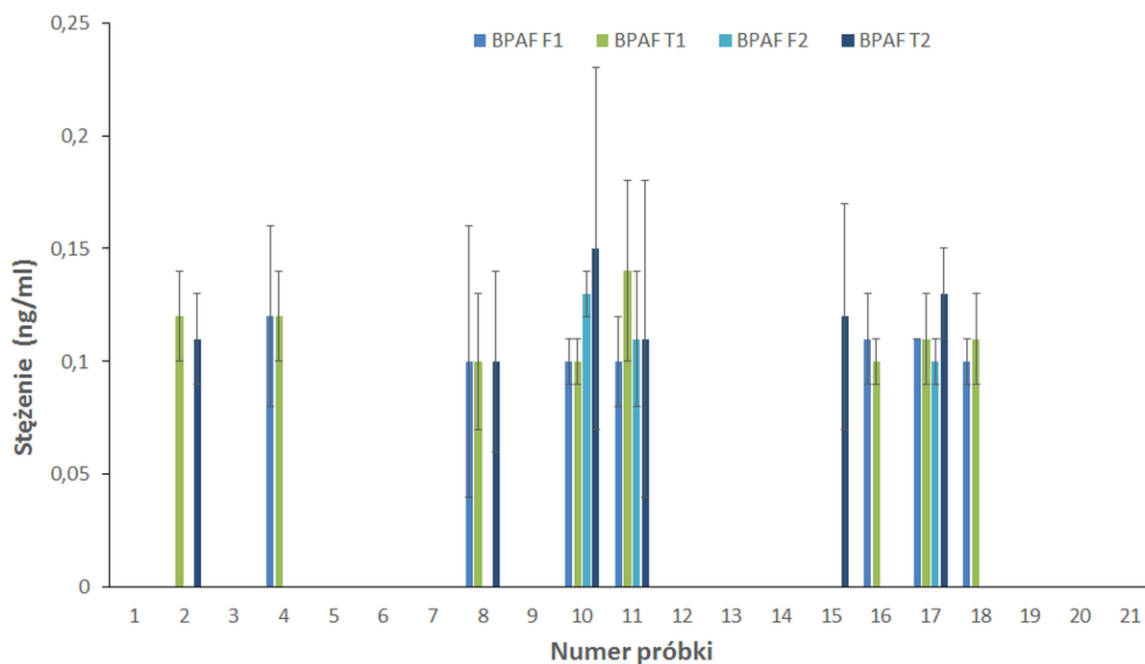
Ryc. 38. Wykres średnich stężeń BP w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2



Ryc. 39. Wykres średnich stężeń BPA w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2



Ryc. 40. Wykres średnich stężeń BPS w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2



Ryc. 41. Wykres średnich stężeń BPAF w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2

Przegląd dotychczas opublikowanych prac na temat oznaczania parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym wykazał, że stężenia raportowane przez innych autorów są podobnego rzędu, do oznaczonych w niniejszej pracy. Rodríguez-Gómez i współpracownicy oznaczali parabeny i BPA w próbkach mleka od kobiet z Hiszpanii. Spośród 10 próbek tylko w dwóch nie wykryli żadnych zanieczyszczeń lub wykryli śladowe ilości oznaczanych związków. W jednej z próbek oznaczyli bardzo wysokie stężenia analitów (MP 16,3 ng/ml, EP 18,1 ng/ml, PP 12,6 ng/ml i BP 12,1 ng/ml), a w pozostałych potwierdzili obecność wszystkich lub większości. W przeważającej ilości próbek (poza 3 wcześniej wskazanymi) występowały MP (7 próbek, w zakresie 1,26 ng/ml - 4,65 ng/ml) i PP (6 próbek, w zakresie 1,02 ng/ml - 4,0 ng/ml). W mniejszej ilości próbek oznaczono pozostałe związki: EP (5 próbek, w zakresie 0,97 ng/ml - 2,00 ng/ml), BP (4 próbki, w zakresie 1,06 ng/ml - 5,4 ng/ml) oraz BPA (4 próbki, w zakresie 0,60 ng/ml - 2,10 ng/ml) [325].

Z kolei Azzouz i współpracownicy oznaczali w próbkach mleka kobiecego szereg związków, w tym parabeny i BPA [262]. Spośród analizowanych 6 próbek w jednej nie wykryli żadnego zanieczyszczenia. W pozostałych natomiast występowały głównie MP (1,2 ng/ml - 8,1 ng/ml) i EP (1,3 ng/ml - 5,1 ng/ml). PP, BP i BzP nie wykryto, a BPA oznaczono tylko w 2 próbkach (w stężeniach odpowiednio 1,4 ng/ml i 2,9 ng/ml) [262]. Chociaż w wymienionych powyżej 2 publikacjach [325, 262] odnotowano podobny zakres stężenia parabenów, to jednak można zauważyć, że nie obserwowano tak dużej dominacji MP nad EP i PP, jak w próbkach mleka analizowanych w niniejszej pracy.

Natomiast Dualde i współpracownicy oznaczali w próbkach mleka kobiet cztery parabeny (MP, EP, PP i BP) oraz trzy bisfenole (BPA, BPF i BPS) [326]. Autorzy tej publikacji w większości z 10 próbek oznaczyli MP w wyższym stężeniu (8 próbek, stężenia 0,11 ng/ml – 7,00 ng/ml) niż EP, PP i BP (odpowiednio 4 próbki, stężenia 0,49 ng/ml – 4,05 ng/ml, 6 próbek, stężenia 0,13 ng/ml – 0,76 ng/ml, 2 próbki, stężenia 0,17 ng/ml i 0,34 ng/ml). Tylko w jednej próbce oznaczono więcej EP niż MP. Przedstawione proporcje stężeń są zgodne z uzyskanymi w niniejszej pracy. BPA oznaczony został przez Dualde i współpracowników aż w 8 próbkach, a pozostałe bisfenole w jednej do czterech, w zależności od rodzaju związku [326]. Analogiczne zależności stwierdzono w niniejszej pracy, gdzie dominującym pod względem wysokości stężenia bisfenolem również jest BPA.

Z kolei szwajcarscy naukowcy oznaczali parabeny w postaci wolnej w odtłuszczonym mleku kobiecym. Częstość wykrywania i zawartość w odtłuszczonym ludzkim mleku była najwyższa w przypadku najbardziej hydrofilowego MP (średnio 2,18 ng/ml) i malała ze wzrostem lipofilności (EP średnio 1,26 ng/ml, PP średnio 1,42 ng/ml, BP – nie wykryto). Brak wykrycia bardziej lipofilowego BP wg autorów wskazywał raczej na jego niski potencjał do pojawienia się w odtłuszczonej matrycy niż na jego brak w mleku. Autorzy zauważyli również wzrost poziomu EP z wiekiem matki [327].

W badaniach prowadzonych przez Hines i współpracowników oznaczano całkowitą zawartość parabenów i BPA w mleku kobiet z Północnej Karoliny w USA. W 7 z 9 próbek mleka oznaczono MP w zakresie od 0,5 ng/ml do 2,3 ng/ml. PP wykryto w 8 próbkach, lecz w znacznie niższym zakresie stężeń (0,1 ng/ml - 0,4 ng/ml), tj. podobnie, jak w niniejszej pracy na poziomie kilka razy niższym niż MP. Natomiast BPA oznaczono w 7 z 9 próbek na poziomie od 0,3 ng/ml do 1,1 ng/ml [297].

Ye i współpracownicy oznaczali wolne i całkowite stężenia MP, PP i BPA w próbkach mleka pobranych od czterech kobiet karmiących dzieci, nienarażonych zawodowo na te związki [52]. Uzyskane przez autorów stężenia całkowite były najczęściej równe stężeniu form wolnych, a w niektórych przypadkach dwukrotnie wyższe – analogicznie do wyników badań opisanych w niniejszej pracy. Całkowity MP występował w zakresie od 0,53 ng/ml do 3,00 ng/ml. Z kolei PP oznaczono tylko w jednej próbce w stężeniu 0,33 ng/ml [52].

W badaniach mleka kobiecego w Brazylii metyloparabenu nie wykryto tylko w jednej na 16 próbek, a w pozostałych stężenia MP były w granicach od 10,8 ng/ml do 39,8 ng/ml, przy czym w połowie próbek powyżej 20 ng/ml. EP oznaczono w 8 próbkach w zakresie stężeń od 11,5 ng/ml do 29,6 ng/ml, PP nie oznaczono w żadnej (LOQ 10 ng/ml), a BP oznaczono tylko w 3 próbkach w zakresie od 3,0 ng/ml do 8,1 ng/ml (LOQ 3 ng/ml). Raportowane przez

Souza i współpracowników stężenia są wielokrotnie wyższe od oznaczonych w niniejszej pracy. Ponadto oznaczony profil parabenów jest inny – występują głównie MP i EP, a nie stwierdzono obecności PP, co wskazuje na wyraźną specyfikę rynku brazylijskiego pod względem powszechności stosowania kosmetyków i zawartych w nich parabenów [328]. Teza taka jest uzasadniona, ponieważ na podstawie badań przedstawionych w niniejszej pracy można zaobserwować zbieżność profilu parabenów w mleku z tymi uzyskanymi dla próbek środowiskowych i kosmetyków.

Yi i współpracownicy porównywali możliwości oznaczania BPA z użyciem HPLC z detekcją fluorescencyjną i z użyciem spektrometru mas. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu detektora fluorescencyjnego mieściły się w zakresie od braku wykrycia aż do 87,7 ng/ml całkowitego (wolnego i związanego) BPA, natomiast w systemie LC-MS/MS całkowity BPA oznaczono w zakresie od 0,65 ng/ml do 42,6 ng/ml. Wyniki te są znacznie wyższe od przedstawionych w niniejszej pracy – wartość mediany dla 100 próbek to 10,4 ng/ml – jest ona dwukrotnie wyższa od najwyższej otrzymanej w niniejszej pracy, co może świadczyć o znacznym zanieczyszczeniu koreańskiego środowiska przez BPA [249].

Powyższe porównanie wskazuje, że uzyskane wyniki wpisują się w światowe trendy, a równocześnie stężenia parabenów i bisfenoli są niższe niż w przypadku próbek pochodzących z wybranych krajów o znacznym poziomie zanieczyszczenia mleka (Brazylia – parabeny, Korea – BPA). Wyniki badań wskazują, że najczęściej oznaczanym parabenem jest MP występujący w próbkach mleka na poziomie od dziesiątych części do kilku ng/ml. Drugim co do częstości występowania parabenem jest PP, którego zawartość również koreluje z oznaczanymi w innych krajach poziomami stężeń, średnio w zakresie od 0,2 ng/ml do 0,6 ng/ml, tj. mniej niż w przypadku MP. Oznaczone ilości EP były przeważnie minimalnie niższe od stężeń PP, najniższe stężenia uzyskano dla BP, a BzP nie oznaczono w żadnej badanej próbce. Spośród bisfenoli najwyższe stężenia odnotowano dla BPA, występującego w ilości kilku ng/ml w dużej ilości próbek, analogicznie jak w innych miejscach świata. Wartość maksymalna, prawie 5 ng/ml, przekroczyła wartość stężeń opisywanych w niektórych publikacjach, lecz jest ona jednocześnie znacząco niższa niż w większości próbek z Korei. Pozostałe bisfenole występują w znacznie mniejszych ilościach, z czego BPS oznaczono w większości próbek na poziomie setnych części ng/ml, BPAF oznaczono w kilku próbkach w stężeniu około 0,1 ng/ml, a BPF nie oznaczono w żadnej próbce. Uzyskane wyniki wskazują, że obecne zanieczyszczenie środowiska tymi zamiennikami BPA w Polsce nie ma jeszcze znaczącego negatywnego wpływu na organizm człowieka.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

- W badaniach próbek produktów kosmetycznych takich jak toniki, płyny micelarne i wody toaletowe oznaczono zawartości parabenów i porównano z limitami zawartymi w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady. Wszystkie testowane próbki kosmetyków zawierały parabeny na poziomach zgodnych z obowiązującymi przepisami, nawet jeśli niektóre zawierały związki, których nie zadeklarowano na etykietach. Dominującym parabenem występującym w próbkach był MP, zarówno ze względu na stężenie, jak i ilość próbek, w których został stwierdzony. Oznaczenia przeprowadzono opracowaną metodą HPLC-FD, a wyniki potwierdzono metodą LC-MS/MS.
- Po raz pierwszy do oznaczania parabenów w produktach kosmetycznych zastosowano technikę HPLC-FD, wykorzystującą detektor fluorescencyjny o znacznie większej selektywności i czułości niż powszechnie stosowany detektor UV. Pozwoliło to opracować metodę z krótką procedurą przygotowania próbki, polegającą wyłącznie na jej rozcieńczeniu. Nie dodawano rozpuszczalnika, nie wzbogacano i oczyszczano próbek przy pomocy żmudnych technik ekstrakcyjnych. Dzięki prostocie opracowanej metody zmniejszono możliwość generowania błędów. Ponadto stwierdzono, że wprowadzenie na kolumnę chromatograficzną bardzo rozcieńczonych próbek wydłuża czas jej eksploatacji. Proponowana procedura może być stosowana w wielu laboratoriach ze względu na prostotę i brak konieczności posiadania drogiego sprzętu, takiego jak LC-MS/MS.
- Przeprowadzono monitoring stężenia parabenów, BPA i kumylofenolu w wodach powierzchniowych Wielkopolski (jeziora, rzeki i kanał) od marca 2015 do września 2016. We wszystkich próbkach oznaczono MP, w zdecydowanie wyższych stężeniach od pozostałych parabenów (maksymalnie nawet 1600 ng/l). Pozostałe parabeny występowały na poziomach stężeń nieprzekraczających 10 ng/l, w tym BzP w najmniejszych ilościach. W jeziorach stężenia wszystkich parabenów były podobne do odnotowanych wcześniej w mało zanieczyszczonych rzekach i mieściły się w tym samym zakresie, chociaż wystąpiły pewne różnice między różnymi parabenami. BPA oznaczono na poziomach stężeń od kilku ng/l do kilkudziesięciu ng/l, tj. między wartościami stężeń uzyskanymi dla MP i innych parabenów. Z kolei kumylofenol zidentyfikowano tylko w ograniczonej liczbie próbek. Stwierdzono sezonowe zmiany stężenia parabenów, wykazując znacznie większe pojawianie się w okresie letnim/jesiennym niż na początku roku. Wykazano, że duże wprowadzanie parabenów do środowiska nie może być zrównoważone przez inne czynniki, np. przez wyższą biodegradację w ciepłym sezonie. Sezonowych zmian nie zaobserwowano w przypadku BPA i CP.

- Przebadano 21 próbek mleka kobiecego stanowiącego nieinwazyjną matrycę do analizy zanieczyszczenia środowiska. Spośród parabenów największe ilości stwierdzono w przypadku MP, analogicznie do wcześniej wykonanych analiz zarówno w kosmetykach, jak i wodach powierzchniowych. W próbce mleka dawczyni, która deklarowała unikanie stosowania kosmetyków, wszystkie analizy były poniżej wartości średniej. Najczęściej stosowany w kosmetykach MP oznaczono w próbkach mleka na poziomie 1 ng/ml. Kilkukrotnie mniej oznaczono EP i PP. Maksymalne stężenie MP, blisko 14 ng/ml, uzyskano u dawczyni deklarującej codzienne stosowanie balsamu do ciała. Z grupy bisfenoli najczęściej wykrywanym związkiem okazał się BPS, jednakże najwyższe średnie stężenie w tej grupie związków uzyskano dla BPA (2 ng/ml), a dwa maksymalne stężenia (ok. 3 ng/ml) stwierdzono w mleku od wolontariuszek, które przyznały się do zarzucenia nałogu tytoniowego. Biorąc pod uwagę większą aktywność endokrynną BPA niż parabenów i jego wyższe średnie stężenia w mleku należy podkreślić, że stanowi on większe zagrożenie dla karmionych piersią dzieci niż parabeny.

7. STRESZCZENIE

W ramach prowadzonych badań opracowano nowe procedury analityczne umożliwiające oznaczanie parabenów w kosmetykach oraz parabenów, bisfenolu A i kumylofenolu w próbkach wód powierzchniowych, a także parabenów i bisfenoli w matrycy biologicznej - mleku kobiecym.

Opracowano metodę oznaczania parabenów w produktach kosmetycznych opartą na technice HPLC-FD, której skuteczność potwierdzono techniką LC-MS/MS. Zaproponowana metodyka oznaczania stanowi nowatorskie rozwiązanie, konkurencyjne w stosunku do innych znanych metod, gdyż przygotowanie próbki jest proste i szybkie, a bardzo czuły i selektywny detektor fluorescencyjny umożliwia oznaczanie niskich zawartości analitów. Przebadano próbki produktów kosmetycznych, takich jak toniki, płyny micelarne i wody toaletowe pod kątem zgodności zawartości parabenów z normami zawartymi w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady. Wszystkie ilości konserwantów okazały się zgodne z wymaganiami. Dominującym związkiem okazał się metyloparaben, zarówno ze względu na stężenie, jak i ilość próbek zawierających MP.

Opracowano procedurę wydzielenia parabenów, kumylofenolu i bisfenolu A techniką ekstrakcji do fazy stałej z próbek środowiskowych (wody powierzchniowe) oraz opracowano i zwalidowano metodę do jednoczesnego oznaczania analitów techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Przeprowadzono ocenę zmiany stężenia analitów w próbkach z jezior, rzek i kanałów Wielkopolski od marca 2015 do września 2016. We wszystkich próbkach oznaczono metyloparaben w stężeniu aż do 1600 ng/l – zdecydowanie wyższym od pozostałych parabenów, które występowały na poziomach stężeń nieprzekraczających 10 ng/l, w tym benzyloparaben w najmniejszych ilościach. Bisfenol A oznaczono na poziomach stężeń od kilku ng/l do kilkudziesięciu ng/l, a kumylofenol zidentyfikowano tylko w nielicznych próbkach. Stwierdzono sezonowość zmiany stężenia parabenów, stwierdzając wyższe poziomy w okresie letnio-jesiennym niż na początku roku. Dla bisfenolu A i kumylofenolu powyższej tendencji nie odnotowano.

Ze względu na powszechność stosowania parabenów i bisfenoli oraz istniejące doniesienia literaturowe na temat obecności ich pozostałości w organizmie ludzkim, podjęto próbę oceny zawartości tych związków w mleku kobiecym. Po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu zebrano 21 próbek mleka od dobrowolnych dawczyń karmiących pierwsze dziecko w dwóch punktach czasowych tj. pomiędzy 2 a 7 tygodniem po porodzie oraz pomiędzy 3 a 4

miesiącem po porodzie. Opracowano i zwalidowano procedurę wydzielenia analitów i metodę jednoczesnego oznaczania parabenów i bisfenoli techniką LC-MS/MS. Do wydzielenia badanych substancji wykorzystano technikę QuEChERS. Po wyekstrahowaniu analitów za pomocą acetonitrylu w obecności bezwodnego $MgSO_4$ i $NaCl$ z fazy wodnej do fazy organicznej i oczyszczeniu z użyciem odpowiednich sorbentów, oznaczano poziomy badanych substancji z zastosowaniem metody LC-MS/MS. Oznaczono ilości parabenów w proporcjach odpowiadających ich rozpowszechnieniu zarówno w kosmetykach, jak i w środowisku, tj. z dominującą pozycją metyloparabenu. Najczęściej stosowany w kosmetykach metyloparaben oznaczono w próbkach mleka na poziomie 1 ng/ml. Kilkukrotnie niższe stężenia odnotowano dla etyloparabenu i propyloparabenu. W próbce mleka dawczyni, która deklarowała unikanie stosowania kosmetyków, wszystkie anality oznaczono poniżej wartości średniej. Maksymalne stężenie metyloparabenu, blisko 14 ng/ml, stwierdzono u dawczyni deklarującej codzienne stosowanie balsamu do ciała. Z grupy bisfenoli najwyższe średnie stężenie uzyskano dla bisfenolu A (2 ng/ml), a dwa najwyższe odnotowane stężenia (ok. 3 ng/ml) uzyskano w mleku wolontariuszek, które przyznały się do zarzucenia nałogu tytoniowego.

8. SUMMARY

Within the conducted research, new analytical procedures were developed to determine parabens in cosmetics and parabens, bisphenol A and cumylphenol in surface water samples, as well as parabens and bisphenols in the biological matrix - human milk.

A method for the determination of parabens in cosmetic products based on HPLC-FD technique was developed. Its effectiveness was confirmed by the LC-MS/MS technique. The proposed methodology of determination can be considered as an innovative solution, competitive to other known methods, as the sample preparation is fast and straightforward. Moreover, a very sensitive and selective fluorescence detection method makes it possible to determine low concentrations of analytes.

Samples of cosmetic products such as tonics, micellar waters, and toilet waters were tested for compliance of parabens with the limits set in the Regulation of the European Parliament and the Council. All amounts of preservatives turned out to meet the legal requirements. The dominant paraben present in the samples was methylparaben, both due to the concentration and the number of samples containing it.

A procedure for extracting parabens, cumylphenol and bisphenol A with solid phase extraction from environmental samples (surface waters) was developed, and a method for simultaneous determination of analytes with liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was developed and validated. Monitoring of changes in analyte concentrations in samples from lakes, rivers, and canals of Greater Poland Voivodeship from March 2015 to September 2016 was carried out. Methylparaben was determined in all samples at concentrations reaching 1600 ng/l - higher than other parabens that occurred at concentration levels not exceeding 10 ng/l, of which benzylparaben was detected in the smallest amounts. Bisphenol A was determined at concentration levels from a few ng/l to several tens of ng/l, and cumylphenol was identified only in a few samples. Seasonality of changes in paraben concentration was observed, higher levels in summer/autumn than at the beginning of the year. For bisphenol A and cumylphenol such a trend was not observed.

Due to the widespread use of parabens and bisphenols as well as existing reports on their residues in the human body, an attempt was made to assess their content in human milk. After the permission of the Bioethical Commission at the Poznan University of Medical Sciences had been obtained, 21 milk samples were collected from volunteers feeding the first child at two-time points, i.e. between 2 and 7 weeks after delivery and between 3 and 4 months after delivery. An analytical separation procedure and a method for the

simultaneous determination of parabens and bisphenols using the LC-MS/MS technique were developed and validated. QuEChERS technique was applied for extraction of the tested substances. After extraction of the analytes with acetonitrile in the presence of anhydrous MgSO_4 and NaCl from the aqueous phase to the organic phase and purification using the appropriate sorbents, the levels of the tested substances were determined using the LC-MS/MS method. The determined amounts of parabens corresponded to their prevalence both in cosmetics and in the environment, i.e. methylparaben held the dominant position.

Methylparaben the most commonly used in cosmetics, was determined in milk samples at the level of 1 ng/ml. Several times lower concentrations were recorded for ethylparaben and propylparaben. In the milk sample of the volunteer who declared avoiding the use of cosmetics, all analytes were below the average value. The maximum concentration of methylparaben, close to 14 ng/ml, was obtained for the volunteer who declared the daily use of the body balm. Within bisphenols, the highest mean concentrations were obtained for bisphenol A (2 ng/ml), and the two highest concentrations recorded (about 3 ng/ml) were obtained for milk samples of volunteers, who admitted to the abandoned tobacco addiction.

9. LITERATURA

- [1] Noszczyńska M., Piotrowska-Seget Z. *Bisphenols: Application, occurrence, safety, and biodegradation mediated by bacterial communities in wastewater treatment plants and rivers. Review.* Chemosphere, 201 (2018) 214-223.
- [2] Ocaña-González J.A., Villar-Navarro M., Ramos-Payán M., Fernández-Torres R., Bello-López M.A. *New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review.* Anal Chim Acta, 858 (2015) 1-15.
- [3] Raza N., Kim K.-H., Abdullah M., Raza W., Brown R. J.C. *Recent developments in analytical quantitation approaches for parabens in human-associated samples.* Trends Anal Chem, 98 (2018) 161-173.
- [4] Borreman M., Goeyens L., Roos P., Van Loco J. *Validation of HPLC Analysis of 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl and Benzyl 4-Hydroxybenzoate (Parabens) in Cosmetic Products, with Emphasis on Decision Limit and Detection Capability.* Chromatographia, 59 (2004) 47–53.
- [5] Nowak K., Ratajczak-Wrona W., Górska M., Jabłońska E. *Parabens and their effects on the endocrine system.* Mol Cell Endocrinol, 474 (2018) 238-251.
- [6] Zgoła-Grześkowiak A., Werner J., Jeszka-Skowron M., Czarczyńska-Goślińska B. *Determination of parabens in cosmetic products using high performance liquid chromatography with fluorescence detection.* Anal Methods, 8 (2016) 3903-3909.
- [7] Goyal S., Amar S. K., Kushwaha H. N., Singh J., Srivastav A. K., Dubey D., Chopra D., Ray R.S. *Toxicological Potential of parabens - a widely used preservative.* Glob J Multidiscip Stud, 4 (2014) 77-86.
- [8] Peck A.M. *Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices.* Anal Bioanal Chem, 386 (2006) 907-939.
- [9] Soni M.G., Taylor S.L., Greenberg N.A., Burdock G.A. *Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature.* Food Chem Toxicol, 40 (2002) 1335-1373.
- [10] Haman C., Dauchy X., Rosin Ch., Munoz J.-F. *Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review.* Water Res, 68 (2015) 1-11.
- [11] Soni M.G., Carabin I.G., Burdock G.A. *Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens),* Food Chem Toxicol. 43 (2005) 985-1015.
- [12] Błędzka D., Gromadzińska J., Wąsowicz W. *Parabens. From environmental studies to human health.* Environ Int, 67 (2014) 27-42.
- [13] <https://www.toxnet.nlm.nih.gov>; data wejścia 20/04/2019
- [14] Abbas S., Greige-Gerges H., Karam N., Piet M.H., Netter P. Magdalou J. *Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-glucuronosyltransferases in man.* Drug Metab Pharmacokinet, 25 (2010) 568-77.
- [15] Aubert N., Ameller T., Legrand J.-J. *Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration.* Food Chem Toxicol, 50 (2012) 445-454.
- [16] Janjua N.R., Mortensen G.K., Andersson A.-M., Kongshoj B., Skakkebak N.E., Wulf H.Ch., *Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben Following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans.* Environ Sci Technol, 41 (2007) 5564-5570.
- [17] https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf; data wejścia 20/04/2019

- [18] Prusakiewicz J.J., Harville H.M., Zhang Y., Ackermann Ch., Voorman R.L. *Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: Possible link to paraben estrogenic effects*. *Toxicology*, 232 (2007) 248-256.
- [19] Boberg J., Taxvig C., Christiansen S., Hass U. *Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites*. *Reproductive Toxicol*, 30 (2010) 301–312.
- [20] Okubo T., Yokoyama Y., Kano K., Kano I. *ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR*. *Food Chem Toxicol*, 39 (2001) 1225-32.
- [21] Routledge E.J., Parker J., Odum J., Ashby J., Sumpter J.P. *Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 153 (1998) 12-9.
- [22] Darbre P.D., Byford J.R., Shaw L.E., Horton R.A., Pope G. S., Sauer M.J. *Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo*. *J Appl Toxicol*, 22 (2002) 219-26.
- [23] Hossaini A., Larsen J.-J., Larsen J.C. *Lack of Oestrogenic Effects of Food Preservatives (Parabens) in Uterotrophic assays*. *Food Chem Toxicol*, 38 (2000) 319-323.
- [24] Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J., Pope G.S. *Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours*. *J Appl Toxicol*, 24 (2004) 5–13.
- [25] Pugazhendhi D., Sadler A.J., Darbre P.D. *Comparison of the global gene expression profiles produced by methylparaben, n-butylparaben and 17 β -oestradiol in MCF7 human breast cancer cells*. *J Appl Toxicol*, 27 (2007) 67–77.
- [26] Golden R., Gandy J., Vollmer G. *A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health*. *Crit Rev Toxicol*, 35 (2005) 435-58.
- [27] Kirchhof M., de Gannes G.C. *The health controversies of parabens*. *Skin Therapy Lett*, 18 (2013) 5-7.
- [28] Xue J., Kannan K. *Accumulation profiles of parabens and their metabolites in fish, black bear, and birds, including bald eagles and albatrosses*. *Environ Int*, 94 (2016) 546–553.
- [29] Yamamoto H., Tamura I., Hirata Y., Kato J., Kagota K., Katsuki S., Yamamoto A., Kagami Y., Tatarazako N. *Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach*. *Sci Total Environ*, 410-411 (2011) 102–111.
- [30] Albero B., Pérez R.A., Sánchez-Brunete C., Tadeo J.L. *Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain)*. *J Hazard Mater*, 15 239-240 (2012) 48-55.
- [31] *Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in Cosmetic Products*. *Int J Toxicol*, 27 (2008) 1–82.
- [32] <https://www.fda.gov/Cosmetics/ProductsIngredients/Ingredients/ucm128042.htm>, data wejścia 20/04/2019
- [33] <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/a22d3948-4545-11e4-a0cb-01aa75ed71a1/language-en>; data wejścia 20/04/2019
- [34] https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_069.pdf; data wejścia 20/04/2019; data wejścia 20/04/2019
- [35] Brausch J.M., Rand G.M. *A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity*. *Chemosphere*, 82 (2011) 1518–1532.
- [36] Liao Ch., Liu F., Kannan K. *Occurrence of and Dietary Exposure to Parabens in Foodstuffs from the United States*. *Environ Sci Technol*, 47 (2013) 3918–3925.
- [37] Gasperi J., Geara D., Lorgeoux C., Bressy A., Zedek S., Rocher V., El Samrani A., Chebbo G., Moilleron R. *First assessment of triclosan, triclocarban and paraben mass loads at a very large regional scale: Case of Paris conurbation (France)*. *Sci Total Environ*, 493 (2014) 854–861.

- [38] Emnet P., Gaw S., Northcott G., Storey B., Graham L. *Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base*. Environ Res, 136 (2015) 331–342.
- [39] Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R. M., Guwy A.J. *The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales UK*. Water Res, 42 (2008) 3498–3518.
- [40] Jonkers N., Kohler H.P.E., Dammshäuser A., Giger W. *Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions*. Environ Pollut, 157 (2009) 714–723.
- [41] Ramaswamy B.R., Shanmugam G., Velu G., Rengarajan B., Larsson D.G. *GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers*. J Hazard Mater, 186 (2011) 1586-93.
- [42] Peng X., Ou W., Wang C., Wang Z., Huang Q., Jin J., Tan J. *Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China*. Sci Total Environ, 490 (2014) 889-98.
- [43] Blanco E., Casais Mdel C., Mejuto Mdel C., Cela R. *Combination of off-line solid phase extraction and on-column sample stacking for sensitivedetermination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillaryelectrophoresis*. Anal Chim Acta. 647 (2009) 104-11.
- [44] Bratkowska D., Marcé R.M., Cormack P.A., Borrull F., Fontanals N. *Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples*. Anal Chim Acta, 706 (2011)135-42.
- [45] Canosa P., Rodríguez I., Rubí E., Bollaín M.H., Cela R. *Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level*. J Chromatogr A, 1124 (2006) 3-10.
- [46] Gonzalez-Marino I., Quintana J.B., Rodriguez I., Cela R. *Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 23 (2009) 1756–1766.
- [47] Lee H.B., Peart T.E., Svoboda M.L. *Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1094 (2005) 122-9.
- [48] Pedrouzo M., Borrull F., Marcé R.M., Pocurull E. *Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining the presence of eleven personal care products in surface and wastewaters*. J Chromatogr A, 1216 (2009) 6994-7000.
- [49] Villaverde-de-Sáa E., González-Mariño I., Quintana J.B., Rodil R., Rodríguez I., Cela R. *In-sample acetylation-non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction for the determination of parabens and triclosan in water samples*. Anal Bioanal Chem, 397 (2010) 2559-68.
- [50] Yu K., Li B., Hang T. *Direct rapid analysis of multiple PPCPs in municipal wastewater using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry without SPE pre-concentration*. Anal Chim Acta,738 (2012) 59-68.
- [51] Carmona E., Andreu V., Picó Y. *Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water*. Sci Total Environ, 484 (2014) 53–63.
- [52] Ye X., Bishop A.M., Needham L.L., Calafat A.M. *Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk*. Anal Chim Acta, 622 (2008) 150-6.
- [53] Barr L., Metaxas G., Harbach C.A., Savoy L.A., Darbre P.D. *Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum*. J Appl Toxicol, 32(2012) 219-32.

- [54] Genuis S.J., Birkholz D., Curtis L., Sandau C. *Paraben Levels in an Urban Community of Western Canada*. Hindawi Publishing Corporation ISRN Toxicol, (2013) 1-8
- [55] Honda M., Robinson M., Kannan K. *Parabens in human urine from several Asian countries, Greece, and the United States*. Chemosphere, 201 (2018) 13-19.
- [56] Usman A., Ahmad M. *From BPA to its analogues: Is it a safe journey?* Chemosphere, 158 (2016) 131-42.
- [57] Vogel S.A. *The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety"*. Am J Public Health, 99 (2009) 559-566.
- [58] Chen F., Ying G.-G., Kong L.-X., Wang L., Zhao J.-L., Zhou L.-J., Zhang L.-J. *Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei*. Environ Pollut China, 159 (2011) 1490-1498.
- [59] Staples Ch. A., Dom P. B., Klecka G. M., O'Blook S. T., Harris L. R. *A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A*. Chemosphere, 36 (1998) 2149-2173.
- [60] https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/bisphenolaf_093008_508.pdf; data wejścia 20/04/2019
- [61] <http://www.bisphenol-a.org/>; data wejścia 20/04/2019
- [62] Konieczna A., Rutkowska A., Rachoń D. *Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA)*. Rocz Panstw Zakl Hig, 66 (2015) 5-11.
- [63] Chen D., Kannan K., Tan H., Zheng Z., Feng Y., Wu Y., Widelka M. *Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity - a review*. Environ Sci Technol, 50 (2016) 5438-5453.
- [64] Regueiro J., Wenzl T. *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.
- [65] Pivnenko K., Pedersen G.A., Eriksson E., Astrup T.F. *Bisphenol a and its structural analogues in household waste paper*. Waste Manage, 44 (2015) 39–47.
- [66] Völkel W., Colnot T., Csanady G.A., Filser J.G., Dekant W. *Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration*. Chem Res Toxicol, 15 (2002) 1281-1287.
- [67] Völkel W., Kiranoglu M., Fromme H. *Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment*. Toxicol Lett, 179 (2008) 155-162.
- [68] Ye X., Kuklennyik Z., Needham L.L., Calafat A.M. *Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 383 (2005) 638-644.
- [69] Ye X., Kuklennyik Z., Needham L.L., Calafat A.M. *Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 831 (2006) 110-115.
- [70] Snyder R.W., Maness S.C., Gaido K.W., Welsch F., Sumner S.C., Fennell T.R. *Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 168 (2000) 225-234.
- [71] Shimizu M., Ohta K., Matsumoto Y., Fukuoka M., Ohno Y., Ozawa S. *Sulphation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells*. Toxicol In Vitro, 16 (2002) 549-556.
- [72] Willhite C.C., Ball G.L., McLellan C.J. *Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration*. J Toxicol Environ Health, B Crit Rev, 11 (2008) 69-146.

- [73] Pottenger L.H., Domoradzki J.Y., Markham D.A., Hansen S.C., Cagen S.Z., Waechter J.M. Jr. *The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration.* Toxicol Sci, 54 (2000) 3-18.
- [74] http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/428.pdf; data wejścia 20/04/2019
- [75] Hiron P.C., Millburn P., Smith R.L. *Bile and urine as complementary pathways for the excretion of foreign organic compounds.* Xenobiotica, 6 (1976) 55-64.
- [76] Walton K., Dorne J.L., Renwick A.G. *Uncertainty factors for chemical risk assessment: interspecies differences in glucuronidation.* Food Chem Toxicol., 39 (2001) 1175-1190.
- [77] Ghibellini G., Leslie E.M., Brouwer K.L. *Methods to evaluate biliary excretion of drugs in humans: an updated review.* Mol Pharm, 3 (2006) 198-211.
- [78] Renwick A.G., Dorne J.L., Walton K. *An analysis of the need for an additional uncertainty factor for infants and children.* Regul Toxicol Pharmacol, 31 (2000) 286-296.
- [79] Dorne J.L., Walton K., Renwick A.G. *Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment: a review.* Food Chem Toxicol, 43 (2005) 203-216.
- [80] Benedetti M.S., Whomsley R., Canning M. *Drug metabolism in the paediatric population and in the elderly.* Drug Discov Today, 12 (2007) 599-610.
- [81] Dorne J.L. *Human variability in hepatic and renal elimination: implications for risk assessment.* J Appl Toxicol, 27 (2007) 411-420.
- [82] Matsumoto J., Yokota H., Yuasa A. *Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy.* Environ Health Perspect, 110 (2002) 193-196.
- [83] Heaton G.D., Renwick A.G. *The effects of high dietary concentrations of saccharin on in vitro metabolism of xenobiotics in rats.* Food Chem Toxicol, 29 (1991) 297-303.
- [84] Richard K., Hume R., Kaptein E., Stanley E.L., Visser T.J., Coughtrie M.W. *Sulphation of thyroid hormone and dopamine during human development: ontogeny of phenol sulphotransferases and arylsulphatase in liver, lung, and brain.* J Clin Endocrinol Metab, 86 (2001) 2734-2742.
- [85] Strolin B.M., Whomsley R., Baltes E. *Involvement of enzymes other than CYPs in the oxidative metabolism of xenobiotics.* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2 (2006) 895-921.
- [86] Duanmu Z., Weckle A., Koukouritaki S.B., Hines R.N., Falany J.L., Falany C.N., Kocarek T.A., Runge-Morris M. *Developmental expression of aryl, estrogen, and hydroxysteroid sulphotransferases in pre-and postnatal human liver.* J.Pharmacol. Exp Ther, 316 (2006) 1310-1317.
- [87] Pacifici G.M. *Sulphation of drugs and hormones in mid-gestation human fetus.* Early Hum Dev, 81 (2005) 573-581
- [88] Blake M.J., Castro L., Leeder J.S., Kearns G.L. *Ontogeny of drug metabolizing enzymes in the neonate.* Semin Fetal Neonatal Med, 10 (2005) 123-138.
- [89] Nishiyama T., Ogura K., Nakano H., Kaku T., Takahashi E., Ohkubo Y., Sekine K., Hiratsuka A., Kadota S., Watabe T. *Sulphation of environmental estrogens by cytosolic human fsulphotransferases.* Drug Metab Pharmacokinet, 17 (2002) 221-228.
- [90] Yang M., Kim S.Y., Lee S.M., Chang S.S., Kawamoto T., Jang J.Y., Ahn Y.O. *Biological monitoring of bisphenol a in a Korean population.* Arch Environ Contam Toxicol, 44 (2003) 546-51.
- [91] Domoradzki J.Y., Pottenger L.H., Thornton C.M., Hansen S.C., Card T.L., Markham D.A., Dryzga M.D., Shiotsuka R.N., Waechter J.M.Jr. *Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-monoglucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages.* Toxicol Sci, 76 (2003) 21-34.

- [92] Domoradzki J.Y., Thornton C.M., Pottenger L.H., Hansen S.C., Card T.L., Markham D.A., Dryzga M.D., Shiotsuka, R.N., Waechter, J.M.Jr. *Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal sprague-dawley rats following oral administration.* Toxicol Sci, 77 (2004) 230-242.
- [93] Arana A., Morton N.S., Hansen T.G. *Treatment with paracetamol in infants.* Acta Anaesthesiol Scand, 45 (2001) 20-29.
- [94] van der Marel C.D., Anderson B.J., van Lingen R.A., Holford N.H., Plum M.A., Jansman F.G., van den Anker J.N., Tibboel D. *Paracetamol and metabolite pharmacokinetics in infants.* Eur J Clin Pharmacol, 59 (2003) 243-251.
- [95] Levy G., Khanna N. N., Soda D.M., Tsuzuki O., Stern L. *Pharmacokinetics of acetaminophen in the human neonate: formation of acetaminophen glucuronide and sulphate in relation to plasma bilirubin concentration and D-glucaric acid excretion.* Pediatrics, 55 (1975) 818-825.
- [96] Miller R.P., Roberts R.J., Fischer L.J. *Acetaminophen elimination kinetics in neonates, children, and adults.* Clin Pharmacol Ther, 19 (1976) 284-294.
- [97] Notarianni L.J., Oldham H.G., Bennett P.N. *Passage of paracetamol into breast milk and its subsequent metabolism by the neonate.* Br J Clin Pharmacol, 24 (1987) 63-67.
- [98] Pritchett J.J., Kuester R.K., Sipes I.G. *Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans.* Drug Metab Dispos, 30 (2002) 1180-1185.
- [99] Li M., Yang Y., Yang Y., Yin J., Zhang J., Feng Y., Shao B. *Biotransformation of bisphenol AF to its major glucuronide metabolite reduces estrogenic activity.* PLoS One, 8 (2013) e83170.
- [100] Waidyanatha S., Mathews J.M., Patel P.R., Black S.R., Snyder R.W., Fennell T.R. *Disposition of bisphenol AF, a bisphenol A analogue, in hepatocytes in vitro and in male and female Harlan Sprague-Dawley rats and B6C3F1/N mice following oral and intravenous administration.* Xenobiotica, 45 (2015) 811-819.
- [101] Yang Y., Yin J., Yang Y., Zhou N., Zhang J., Shao B., Wu Y. *Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.* J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 901 (2012) 93-97.
- [102] Cabaton N., Chagnon M.-C., Lhuguenot J.-C., Cravedi J.-P., Zalko D. *Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and nonpregnant rats.* J Agric Food Chem, 54 (2006) 10307-10314.
- [103] Cabaton N., Zalko D., Rathahao E., Canlet C., Delous G., Chagnon M.-C., Cravedi J.-P., Perdu E. *Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions.* Toxicol In Vitro, 22 (2008) 1697-1704.
- [104] Skledar D.G., Schmidt J., Fic A., Klopčič I., Trontelj J., Dolenc M.S., Finel M., Mašič L.P. *Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S.* Chemosphere, 157 (2016) 152-9.
- [105] Song Y., Xie P., Cai Z. *Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration.* Rapid Commun Mass Spectrom, 32 (2018) 495-502.
- [106] Kang J.-H., Katayama Y., Kondo F. *Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals.* Toxicology, 217 (2006) 81-90.
- [107] Sasaki M., Maki J., Oshiman K., Matsumura Y., Tsuchido T. *Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from Sphingomonas sp. strain AO1.* Biodegradation, 16 (2005) 449-59.
- [108] Lobos J.H., Leib T.K., Su T.M. *Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium.* Appl Environ Microbiol, 58 (1992) 1823-31.

- [109] Spivack J., Leib T.K., Lobos J.H. *Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. Rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism.* J Biol Chem, 269 (1994) 7323-9.
- [110] Fürhacker M. *Bisphenol A emission factors from industrial sources and elimination rates in a sewage treatment plant.* Water Sci Technol, 47 (2003) 117-22.
- [111] Kang J.H., Ri N., Kondo F. *Streptomyces sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability.* Lett Appl Microbiol 39 (2004) 178-80.
- [112] Voordeckers J.W., Fennell D.E., Jones K., Häggblom M.M. *Anaerobic biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and bisphenol A in estuarine sediments.* Environ Sci Technol, 36 (2002) 696-701.
- [113] Kang J.H., Kondo F. *Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water.* Chemosphere, 60 (2005) 1288-92.
- [114] Hirano T., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. *Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, Pleurotus ostreatus.* Biosci Biotechnol Biochem, 64 (2000) 1958-62.
- [115] Reis A.R., Tabei K., Sakakibara Y. *Oxidation mechanism and overall removal rates of endocrine disrupting chemicals by aquatic plants.* J Hazard Mater, 265 (2014) 79-88.
- [116] Choi Y.J., Lee L.S. *Aerobic Soil Biodegradation of Bisphenol (BPA) Alternatives Bisphenol S and Bisphenol AF Compared to BPA.* Environ Sci Technol, 51 (2017) 13698-13704.
- [117] Danzl E., Sei K., Soda, S., Ike M., Fujita M. *Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater.* Int J Environ Res Public Health, 6 (2009)1472-1484.
- [118] Ike M., Chen M.Y., Danzl E., Sei K., Fujita M. *Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions.* Water Sci Technol, 53 (2006) 153-159.
- [119] Ogata Y., Goda S., Toyama T., Sei K., Ike M. *The 4-tert-Butylphenol-Utilizing bacterium Sphingobium fuliginis OMI can degrade bisphenols via phenolic ring hydroxylation and meta-cleavage pathway.* Environ Sci Technol, 47 (2013) 1017-1023.
- [120] Inoue D., Hara S., Kashihara M., Murai Y., Danzl E., Sei K., Tsunoi S., Fujita M., Ike M. *Degradation of Bis(4-Hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) by Sphingobium yanoikuyae strain FM-2 isolated from river water.* Appl Environ Microbiol, 74 (2008) 352-8.
- [121] Toyama T., Sato Y., Inoue D., Sei K., Chang Y.C., Kikuchi S., Ike M. *Biodegradation of bisphenol A and bisphenol F in the rhizosphere sediment of Phragmites Australis.* J Biosci Bioeng, 108 (2009) 147-150.
- [122] Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B., Gustafsson J.A. *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta.* Endocrinology, 139 (1998) 4252-4263.
- [123] Wetherill Y.B., Akingbemi B.T., Kanno J., McLachlan J.A., Nadal A., Sonnenschein C., Watson C.S., Zoeller R.T., Belcher S.M. *In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action.* Reprod Toxicol, 24 (2007) 178-198.
- [124] Watson Ch. S., Bulayeva N. N., Wozniak A. L., Rebecca A. A. *Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses.* Steroids, 72 (2007) 124-134.
- [125] Alonso-Magdalena P., Laribi O., Ropero A. B., Fuentes E., Ripoll C., Soria B., Nadal A. *Low Doses of Bisphenol A and Diethylstilbestrol Impair Ca²⁺ Signals in Pancreatic α -Cells through a Nonclassical Membrane Estrogen Receptor within Intact Islets of Langerhans.* Environ Health Perspect, 113 (2005) 969–977.
- [126] Chevalier N., Bouskine A., Fenichel P. *Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30.* Int J Cancer, 130 (2012) 241-242.
- [127] Takeda Y., Liu X., Sumiyoshi M., Matsushima A., Shimohigashi M., Shimohigashi Y. *Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR{gamma} among the*

- human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERRgamma isoform.* J Biochem, 146 (2009) 113-122.
- [128] Nakamura S., Tezuka Y., Ushiyama A., Kawashima C., Kitagawara Y., Takahashi K., Ohta S., Mashino T. *Ipsa substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochrome P450 and enhancement of estrogenic activity.* Toxicol Lett, 203 (2011) 92-95.
- [129] Markey C.M., Wadia P.R., Rubin B.S., Sonnenschein C., Soto A.M. *Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract.* Biol Reprod, 72 (2005) 1344-1351.
- [130] Patisaul H.B., Fortino A.E., Polston E.K. *Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV.* Neurotoxicol Teratol, 28 (2006) 111-118.
- [131] Timms B.G., Howdeshell K.L., Barton L., Bradley S., Richter C.A., vom Saal F.S. *Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra.* Proc Natl Acad Sci USA, 102 (2005) 7014-7019.
- [132] Meeker J.D., Calafat A.M., Hauser R. *Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic.* Environ Sci Technol, 44 (2010) 1458-1463.
- [133] Lassen T.H., Frederiksen H., Jensen T.K., Petersen J.H., Joensen U.N., Main K.M., Skakkebaek N.E., Juul A., Jørgensen N., Andersson A.-M. *Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality.* Environ Health Perspect, 122 (2014) 478-484.
- [134] Freitas J., Cano P., Craig-Veit C., Goodson M.L., Furlow J.D., Murk A.J. *Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay.* Toxicol In Vitro, 25 (2011) 257-266.
- [135] Moriyama K., Tagami T., Akamizu T., Usui T., Saijo M., Kanamoto N., Hataya Y., Shimatsu A., Kuzuya H., Nakao K. *Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist.* J Clin Endocrinol Metab, 87 (2002) 5185-5190.
- [136] Gentilcore D., Porreca I., Rizzo F., Ganbaatar E., Carchia E., Mallardo M., De Felice M., Ambrosino C. *Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression.* Toxicology, 304 (2013) 21-31.
- [137] Zoeller R.T., Bansal R., Parris C. *Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain.* Endocrinology, 146 (2005) 607-12.
- [138] Wang T., Lu J., Xu M., Xu Y., Li M., Liu Y., Tian X., Chen Y., Dai M., Wang W., Lai S., Bi Y., Ning G. *Urinary bisphenol a concentration and thyroid function in Chinese adults.* Epidemiology, 24 (2013) 295-302.
- [139] Romano M.E., Webster G.M., Vuong A.M., Zoeller T. R., Chen, A., Hoofnagle A.N., Calafat A.M., Karagas M.R., Yolton K., Lanphear B.P., Braun J.M. *Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: the HOME Study.* Environ Res, 138 (2015) 453-460.
- [140] Teng C., Goodwin B., Shockley K., Xia M., Huang R., Norris J., Merrick B.A., Jetten A.M., Austin C.P., Tice R.R. *Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms.* Chem Biol Interact, 203 (2013) 556-564.
- [141] Jalal N., Surendranath A.R., Pathak J.L., Yu S., Chung C.Y. *Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic.* Toxicol Rep, 5 (2017) 76-84.
- [142] Prasanth G.K., Divya L.M., Sadasivan C. *Bisphenol A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study.* J Appl Toxicol, 30 (2010) 769-774.
- [143] Sargis R.M., Johnson D.N., Choudhury R.A., Brady M.J. *Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation.* Obesity, 18 (2009) 1283-1288.

- [144] Tao J., Sun L.X.J., Le X.C. *Study of the effects of bisphenol A using human fetal lung fibroblasts*. J Environ Sci (China), 48 (2016) 6-10.
- [145] Tišler T., Krel A., Gerželj U., Erjavec B., Dolenc M.S., Pintar A. *Hazard identification and risk characterization of bisphenols A, F and AF to aquatic organisms*. Environ Pollut, 212 (2016) 472-479.
- [146] Yang Y., Yin J., Yang Y., Zhou N., Zhang J., Shao B., Wu Y. *Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 901 (2012) 93-97.
- [147] Ruan T., Liang D., Song S., Song M., Wang H., Jiang G. *Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China*. Chemosphere, 124 (2015) 150-155.
- [148] Feng Y., Yin J., Jiao Z., Shi J., Li M., Shao B. *Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats*. Toxicol Lett, 211 (2012) 201-209.
- [149] Maćczak A., Cyrkler M., Bukowska B., Michałowicz J. *Eryptosis-inducing activity of bisphenol A and its analogs in human red blood cells (in vitro study)*. J Hazard Mater, 307 (2016) 328-335.
- [150] Zhou X., Kramer J.P., Calafat A.M., Ye X. *Automated on-line column switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine*. J Chromatogr. B Anal Technol Biomed Life Sci, 944 (2014) 152-156.
- [151] Audebert M., Dolo L., Perdu E., Cravedi J.P., Zalko D. *Use of the gh2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines*. Arch Toxicol, 85 (2011) 1463-1473.
- [152] Molina-Molina J.M., Amaya E., Grimaldi M., Sáenz J.M., Real M., Fernández M.F., Balaguer P., Olea N. *In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors*. Toxicol Appl Pharmacol, 272 (2013) 127-136.
- [153] Nakagawa, Y., Tayama, S. *Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes*. Arch. Toxicol, 74 (2000) 99-105.
- [154] Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., Chagnon, M.C. *Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line*. Toxicology, 255 (2009) 15-24.
- [155] Pisapia L., Del Pozzo G., Barba P., Caputo L., Mita L., Viggiano E., Russo G.L., Nicolucci C., Rossi S., Bencivenga U., Mita D.G., Diano N. *Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation*. Gen. Comp. Endocrinol, 178 (2012) 54-63.
- [156] Lee S., Kim Y.K., Shin T.Y., Kim S.H. *Neurotoxic effects of bisphenol AF on calcium-induced ROS and MAPKs*. Neurotox. Res, 23 (2013) 249-259.
- [157] Eladak S., Grisin T., Moison D., Guerquin M.J., N'Tumba-Byn T., Pozzi-Gaudin S., Benachi A., Livera G., Rouiller-Fabre V., Habert R. *A new chapter in the bisphenol a story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound*. Fertil Steril, 103 (2015) 11-21.
- [158] Higashihara N., Shiraishi K., Miyata K., Oshima Y., Minobe Y., Yamasaki K. *Subacute oral toxicity study of bisphenol F based on the draft protocol for the "enhanced OECD test guideline no. 407"*. Arch Toxicol, 81 (2007) 825-832.
- [159] Castro B., Sanchez P., Torres J.M., Ortega E. *Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S affect differently 5 α -reductase expression and dopamine-serotonin systems in the prefrontal cortex of juvenile female rats*. Environ Res, 142 (2015) 281-287.

- [160] Qiu W., Zhao Y., Yang M., Farajzadeh M., Pan C., Wayne N.L. *Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish*. *Endocrinology*, 157 (2016) 636-647.
- [161] Naderi M., Wong M.Y.L., Gholami F. *Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults*. *Aquat Toxicol*, 148 (2014) 195-203.
- [162] Chen Y., Shu L., Qiu Z., Lee D.Y., Settle S.J., Que Hee S., Telesca D., Yang X., Allard P. *Exposure to the BPA-substitute bisphenol S causes unique alterations of germline function*. *PLoS Genet*, 12 (2016) 1-22.
- [163] Boucher J.G., Ahmed, S., Atlas, E. *Bisphenol S induces adipogenesis in primary human preadipocytes from female donors*. *Endocrinology*, 157 (2016) 1397-1407.
- [164] Ho S.M., Rao R., To S., Schoch E., Tarapore P. *Bisphenol A and its analogues disrupt centrosome cycle and microtubule dynamics in prostate cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 24 (2017) 83-96.
- [165] Chouhan S., Yadav S. K., Prakash J., Swati, Singh S. P. *Effect of Bisphenol A on human health and its degradation by microorganisms: a review*. *Ann Microbiol*, 64 (2014) 13-21.
- [166] Geens T., Aerts D., Berthot C., Bourguignon J.P., Goeyens L., Lecomte P., Maghuin-Rogister G., Pironnet A.M., Pussemier L., Scippo M.L., Van Loco J., Covaci A. *A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol A*. *Food Chem Toxicol*, 50 (2012) 3725-40.
- [167] Van Landuyt K.L., Nawrot T., Gebelen B., De Munck J., Snauwaert J., Yoshihara K., Scheers H., Godderis L., Hoet P., Van Meerbeek B. *How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach*. *Dent Mater*, 27 (2011) 723-747.
- [168] Oldring P.K., Castle L., O'Mahony C., Dixon J. *Estimates of dietary exposure to bisphenol A (BPA) from light metal packaging using food consumption and packaging usage data: a refined deterministic approach and a fully probabilistic (FACET) approach*. *Food Addit Contam A*, 31 (2014) 466-489.
- [169] https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/texte_41_2014_identification_of_relevant_emission_pathways_of_bisphenol_a_0.pdf; data wejścia 20/04/2019
- [170] Cao X.L., Corriveau J., Popovic S. *Bisphenol a in canned food products from canadian markets*. *J Food Protect*, 73 (2010) 1085-1089.
- [171] Cooper J.E., Kendig E.L., Belcher S.M. *Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles*. *Chemosphere*, 85 (2011) 943-947.
- [172] Kang J.H., Kondo F. *Determination of bisphenol A in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. *J Food Protect*, 66 (2003) 1439-1443.
- [173] Goodson A., Robin H., Summerfield W., Cooper I. *Migration of bisphenol A from can coatings-effects of damage, storage conditions and heating*. *Food Addit Contam*, 21 (2004) 1015-1026.
- [174] Munguia-Lopez E.M., Peralta E., Gonzalez-Leon A., Vargas-Requena C., Soto-Valdez H. *Migration of bisphenol A (BPA) from epoxy can coatings to jalapeno peppers and an acid food stimulant*. *J Agric Food Chem*, 50 (2002) 7299-7302.
- [175] Vinas P., Campillo N., Martínez-Castillo N., Hernández-Córdoba M. *Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans*. *Anal Bioanal Chem*, 39 (2010) 115-125.
- [176] Hanaoka T., Kawamura N., Hara K., Tsugane S. *Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents*. *Occup Environ Med*, 59 (2002) 625-628.

- [177] Loganathan S.N., Kannan K. *Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures*. Arch Environ Con Tox, 61 (2011) 68-73.
- [178] Geens T., Roosens L., Neels H., Covaci A. *Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium*. Chemosphere, 76 (2010) 755-760.
- [179] Drozd K., Wysokinski D., Krupa R., Woźniak K. *Bisphenol A-glycidyl methacrylate induces a broad spectrum of DNA damage in human lymphocytes*. Arch Toxicol, 85 (2011) 1453-1461.
- [180] Fleisch A.F., Sheffield P.E., Chinn C., Edelstein B.L., Landrigan P.J. *Bisphenol A and related compounds in dental materials*. Pediatrics, 126 (2010) 760-768.
- [181] Haishima Y., Hayashi Y., Yagami T., Nakamura A. *Elution of bisphenol A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins*. J Biomed Mater Res, 58 (2001) 209-215.
- [182] Calafat A.M., Weuve J., Ye X., Jia L.T., Hu H., Ringer S., Huttner K., Hauser R. *Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants*. Environ Health Perspect, 117 (2009) 639-644.
- [183] Ndaw S., Remy A., Jargot D., Robert A. *Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper: urinary biomonitoring study*. Int Arch Occup Environ Health. 89 (2016) 935-46.
- [184] Biedermann S., Tschudin P., Grob K. *Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin*. Anal Bioanal Chem, 398 (2010) 571-576.
- [185] Hormann A.M., Vom Saal F.S., Nagel S.C., Stahlhut R.W., Moyer C.L., Ellersieck M.R., Welshons W.V., Toutain P.L. Taylor J.A. *Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA)*. PLoS One, 9 (2014) e110509
- [186] Corrales J., Kristofco L. A., Baylor Steele W., Yates B. S., Breed Ch. S., Spencer Williams E., Brooks B. W. *Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation*. Dose Response, 2015 (13) 1-29 .
- [187] Fu P., Kawamura K. *Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere*. Environ Pollut, 158 (2010) 3138-3143
- [188] Carwile J.L., Ye X., Zhou X., Calafat A.M., Michels K.B. *Canned soup consumption and urinary bisphenol A: a randomized crossover trial*. JAMA, 306 (2011) 2218-2220.
- [189] Rudel R.A., Gray J.M., Engel C.L., Rawsthorne T.W., Dodson R..E, Ackerman J.M., Rizzo J., Nudelman J.L., Brody J.G. *Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention*. Environ Health Perspect, 119 (2011) 914-920.
- [190] Hoekstra E.J., Simoneau C. *Release of bisphenol A from polycarbonate: a review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 53 (2013) 386-402.
- [191] www.bisphenol-a-europe.org/wp-content/uploads/2017/04/How-much-BPA-does-a-typical-person-take-in-through-a-normal-diet.pdf; data wejścia 20/04/2019
- [192] Liao C., Kannan K. *A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States*. Arch Environ Contam Toxicol, 67 (2014) 50-59.
- [193] Liao C., Kannan K. *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.
- [194] Liao C., Liu F., Guo Y., Moon H.-B., Nakata H., Wu Q., Kannan K. *Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure*, Environ Sci Technol, 46 (2012) 9138-9145.

- [195] Liao C., Liu F., Moon H.-B., Yamashita N., Yun S., Kannan K. *Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: spatial and temporal distributions*, Environ Sci Technol, 46 (2012) 11558-11565.
- [196] Song S., Song M., Zeng L., Wang T., Liu R., Ruan T., Jiang G. *Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China*, Environ Pollut, 186 (2014) 14-19.
- [197] Yang Y., Lu L., Zhang J., Yang Y., Wu Y., Shao B. *Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A, 1328 (2014) 26-34.
- [198] Liao C., Liu F., Kannan K. *Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues*. Environ Sci Technol, 46 (2012) 6515-6522.
- [199] Crathorne B., Palmer, C.P., Stanley J.A. *High-performance liquid chromatographic determination of bisphenol A diglycidyl ether and bisphenol F diglycidyl ether in water*. J Chromatogr, 260 (1986) 266-270.
- [200] Grob K., Spinner C., Brunner M., Etter R. *The migration from the internal coatings of food cans; summary of the findings and call for more effective regulation of polymers in contact with foods: a review*. Food Addit Contam, 16 (1999) 579-590.
- [201] Gallart-Ayala H., Moyano E., Galceran M.T. *Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 683 (2011) 227-233.
- [202] Liao C., Kannan K. *A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China*, Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 31 (2014) 319-329.
- [203] Yang Y., Guan J., Yin J., Shao B., Li H. *Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China*. Chemosphere, 112 (2014) 481-486.
- [204] Chu C.-Y., Ponten A., Sun C.-C., Jee S.-H. *Concomitant contact allergy to the resins, reactive diluents and hardener of a bisphenol A/F-based epoxy resin in subway construction workers*. Contact Dermat, 54 (2006) 131-139.
- [205] Sakata S., Cahill J., Barton D., Nixon R. *Occupational allergic contact dermatitis to bisphenol F epoxy resin*. Australas J Dermatol, 46 (2005) 90-92.
- [206] Fromme H., Kuchler T., Otto T., Pilz K., Müller J., Wenzel A. *Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment*. Water Res, 36 (2002) 1429-1438.
- [207] Jiao Y., Ding L., Fu S., Zhu S., Li H., Wang L. *Determination of bisphenol A, bisphenol F and their diglycidyl ethers in environmental water by solid phase extraction using magnetic multiwalled carbon nanotubes followed by GC-MS/MS*. Anal Methods, 4 (2012) 291-298.
- [208] Oman C., Hynning P.A. *Identification of organic compounds in municipal landfill leachates*. Environ Pollut, 80 (1993) 265-271.
- [209] Ruan T., Liang D., Song S., Song M., Wang H., Jiang G. *Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China*. Chemosphere, 124 (2015) 150-155.
- [210] Stachel B., Ehrhorn U., Heemken O.P., Lepom P., Reincke H., Sawal G., Theobald N. *Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries*. Environ Pollut, 124 (2003) 497-507.
- [211] Lee S., Liao C., Song G.-J., Ra K., Kannan K., Moon H.-B. *Emission of bisphenol analogues including bisphenol A and bisphenol F from wastewater treatment plants in Korea*. Chemosphere, 119 (2015) 1000-1006.
- [212] Song S., Ruan T., Wang T., Liu R., Jiang G. *Distribution and preliminary exposure assessment of bisphenol AF (BPAF) in various environmental matrices around a manufacturing plant in China*, Environ Sci Technol, 46 (2012) 13136-13143.
- [213] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R0321>; data wejścia 20/04/2019

- [214] <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3978>; data wejścia 20/04/2019
- [215] <https://ntp.niehs.nih.gov/results/areas/bpa/index.html>; data wejścia 20/04/2019
- [216] Staniszevska M., Falkowska L., Grabowski P., Kwaśniak J., Mudrak-Cegiołka S., Reindl A. R., Sokołowski A., Szumiło E. Zgrundo A. *Bisphenol A, 4-tert-Octylphenol, and 4-Nonylphenol in The Gulf of Gdańsk (Southern Baltic)*. Arch Environ Contam Toxicol, 67 (2014) 335–347.
- [217] Colin A., Bach C., Rosin Ch. Munoz J.-F. Dauchy X. *Is Drinking Water a Major Route of Human Exposure to Alkylphenol and Bisphenol Contaminants in France?* Arch Environ Contam Toxicol, 66 (2014) 86–99.
- [218] Meesters R.J. W., Schröder H. F. *Simultaneous Determination of 4-Nonylphenol and Bisphenol A in Sewage Sludge*. Anal Chem, 74 (2002) 3566-3574.
- [219] Kinney Ch., Furlong E.T., Kolpin D. W., Burkhardt M. R., Zaugg S. D., Werner S.L., Bossio J. P., Benotti M.J. *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.
- [220] Langdon K.A., Warne M.St.J., Smernik R.J., Shareef A., Kookana R.S. *Field dissipation of 4-nonylphenol, 4-t-octylphenol, triclosan and bisphenol A following land application of biosolids*. Chemosphere, 86 (2012) 1050–1058.
- [221] Fent G., Hein W. J., Moendel M. J., Kubiak R. *Fate of 14C-bisphenol A in soils*, Chemosphere 51 (2003) 735–746.
- [222] Huang D.-Y., Zhao H.-Q., Liu Ch.-P., Sun C.-X. *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) 5818–5826.
- [223] Sun K., Jin J., Gao B., Zhang Z., Wang Z., Pan Z., Xu D., Zhao Y. *Sorption of 17 α -ethinyl estradiol, bisphenol A and phenanthrene to different size fractions of soil and sediment*. Chemosphere, 88 (2012) 577-583.
- [224] Zeng G., Zhang C., Huang G., Yu J., Wang Q., Li J., Xi B., Liu H. *Adsorption behavior of bisphenol A on sediments in Xiangjiang River, Central-south China*. Chemosphere, 65 (2006) 1490-1499.
- [225] Yang F.X., Xu Y., Pfister G., Henkelmann B., Schramm K.W. *Nonylphenol, bisphenol-A and DDTs in Lake Donghu, China*. Fresen Environ Bull, 14 (2005) 173-180.
- [226] Gong J., Ran Y., Chen D.Y., Yang Y. *Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in riverine sediments from the Pearl River Delta, China*. Mar Pollut Bull, 63 (2011) 556-563.
- [227] Tian C., Wang J.-Tao, Song X.-L. *Sediment-water interactions of bisphenol A under simulated marine conditions*. Water Air Soil Pollut, 199 (2009) 301-310.
- [228] Xu X., Wang Y., Li X. *Sorption behavior of bisphenol A on marine sediments*. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 43 (2008) 239-46.
- [229] Wang Q., Chen M., Shan G., Chen P., Cui S., Yi S., Zhu L. *Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China*. Sci Total Environ, 598 (2017) 814-820.
- [230] Yamazaki E., Yamashita N., Taniyasu S., Lam J., Lam P. K.S., Moon H.-B., Jeong Y., Kannan P., Achyuthan H., Munuswamy N., Kannan K. *Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India*. Ecotox Environ Safe, 122 (2015) 565–572.
- [231] Völkel W. *Lesson of 15-year exposure to Bisphenol A: a critical discussion of biomonitoring studies*. Arch Toxicol, 91 (2017) 3693–3696.
- [232] Welshons W.V., Nagel S.C., vom Saal F.S. *Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure*. Endocrinology, 147 (2006) 56-69.

- [233] Vandenberg L.N., Chahoud I., Heindel J.J., Padmanabhan V., Paumgartten F.J., Schoenfelder G. *Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A*. Environ Health Perspect, 118 (2010) 1055–1070.
- [234] Koch H.M., Calafat A.M. *Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture*. Philos Trans R Soc B Biol Sci, 364 (2009) 2063–2078.
- [235] Bushnik T., Haines D., Levallois P., Levesque J. *Lead and bisphenol A concentrations in the Canadian populations*. Stat Can Health Rep, 21 (2010) 7–18.
- [236] Calafat A.M., Ye X., Wong L.Y., Reidy J.A., Needham L.L. *Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004*. Environ Health Perspect, 116 (2008) 39-44.
- [237] Zhang Z., Alomirah H., Cho H.S., Li Y.F., Liao C., Minh T.B., Mohd M.A., Nakata H., Ren N., Kannan K. *Urinary bisphenol A concentrations and their implications for human exposure in several Asian countries*. Environ Sci Technol, 45 (2011) 7044–7050.
- [238] Becker K., Göen T., Seiwert M., Conrad A., Pick-Fub H., Müller J., Wittassek M., Schulz C., Kolossa-Gehring M. *GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children*, Int J Hyg Environ Health, 212 (2009) 685–692.
- [239] Cantonwine D., Meeker J.D., Hu H., Sánchez B.N., Lamadrid-Figueroa H., Mercado-García A., Fortenberry G.Z., Calafat A.M., Téllez-Rojo M.M. *Bisphenol A exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study*. Environ Health, 9 (2010) 62
- [240] Teeguarden J.G., Twaddle N.C., Churchwell M.I., Doerge D.R. *Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens I: Bisphenol A in pregnant women*. Food Chem Toxicol, 92 (2016) 129-42.
- [241] Schönfelder G., Wittfoht W., Hopp H., Talsness C.E., Paul M., Chahoud I. *Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit*. Environ. Health Perspect, 110 (2002) 703–707.
- [242] Aris A. *Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada*. Reproductive Toxicol, 45 (2014) 8–13.
- [243] Lee J., Choi K., Park J., Moon H.-B., Choi G., Lee J. J., Suh E., Kim H.-J., Eun S.-H., G.-H. Kim, Cho G. J., Kim S. K., Kim S., Kim S. Y., Kim S., Eom S., Choi S., Kim Y. D., Kim S. *Bisphenol A distribution in serum, urine, placenta, breast milk, and umbilical cord serum in a birth panel of mother–neonate pairs*. Sci Total Environ, 626 (2018) 1494–1501.
- [244] Mendonca, K., Hauser, R., Calafat, A.M., Arbuckle, T.E., Duty, S.M. *Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine*. Int Arch Occ Env Hea, 87 (2014) 13–20.
- [245] Liao C., Liu F., Alomirah H., Loi V.D., Mohd M.A., Moon H.B., Nakata H., Kannan K. *Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures*. Environ Sci Technol, 46 (2012) 6860-6.
- [246] Andra S.S., Charisiadis P., Arora M., van Vliet-Ostaptchouk J.V., Makris K.C. *Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A*. Environ Int, 85 (2015) 352-79.
- [247] Sun Y., Irie M., Kishikawa N., Wada M., Kuroda N., Nakashima K. *Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection*. Biomed Chromatogr, 18 (2004) 501-7.
- [248] Kuruto-Niwa R., Tateoka Y., Usuki Y., Nozawa R. *Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum*. Chemosphere, 66 (2007) 1160-4.
- [249] Yi B., Kim C., Yang M. *Biological monitoring of bisphenol A with HLPC/FLD and LC/MS/MS assays*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 878 (2010) 2606-10.

- [250] Zimmers S.M., Browne E.P., O'Keefe P.W., Anderton D.L., Kramer L., Reckhow D.A., Arcaro K.F. *Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of US women using a sensitive LC/MS/MS method*. Chemosphere, 104 (2014) 237–243.
- [251] Kocjan R. *Chemia analityczna Analiza instrumentalna*, PZWL, Warszawa, 2002.
- [252] Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. *Techniki separacyjne*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, 2010
- [253] https://chem.pg.edu.pl/documents/175289/4236734/3Materialy_szkoleniowe_ABC_tech_nik_i_SPE.pdf, data wejścia 20/04/2019
- [254] Rawa-Adkonis M., Wolska L., Namieśnik J. *Analytical Procedures for PAH and PCB Determination in Water Samples—Error Sources*. Critic Rev Anal Chem, 36 (2006) 63-72.
- [255] Trenholm R.A., Vanderford B.J., Holady J. C., Rexing D. J., Snyder S. A. *Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceutical using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spektrometry*. Chemosphere, 65 (2006) 1990–1998.
- [256] http://cdn.intechopen.com/pdfs/20992/InTechModern_extraction_techniques_for_pesticide_residues_determination_in_plant_and_soil_samples.pdf; data wejścia 20/04/2019
- [257] Queiroz F.B., Silva J.C., Aquino S.F., Coutrim M.X., Afonso R. J. C. F., *Determination of endocrine disruptors and pharmaceuticals in sewage samples by tandem solid phase clean up/extraction and high performance liquid chromatography-negative and positive electrospray high-resolution mass spectrometry*. J Braz Chem Soc, 25 (2014) 298-312.
- [258] Henriques M., Cardoso V.V., Rodrigues A.M., Ferreira E., Benoliel M.J., Almeida C.M.M. *Simultaneous determination of ten endocrine hormone disruptors in water using SPE/LC-(ESI)MS-MS*. J Water Resour Prot, 2 (2010) 818-829.
- [259] Gosetti F., Bolfi B., Robotti E., Manfredi M., Binotti M., Ferrero F., Bona G., Marengo E. *Study of endocrine disrupting compound release from different medical devices through an on-line SPE UHPLC-MS/MS method*. Anal Chim Acta, 1042 (2018) 141-154.
- [260] Azzouz A., Ballesteros E. *Trace analysis of endocrine disrupting compounds in environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection*. J Chromatogr A, 1360 (2014) 248-57.
- [261] Larsson K., Ljung Björklund K., Palm B., Wennberg M., Kaj L., Lindh C.H., Jönsson B.A., Berglund M. *Exposure determinants of phthalates, parabens, bisphenol A and triclosan in Swedish mothers and their children*. Environ Int, 73 (2014) 323-33.
- [262] Azzouz A., Rascón A.J., Ballesteros E. *Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, 119 (2016) 16-26.
- [263] Hanqi Z., Hongmin W., Jinjuan Y., Yuhua S. *Dispersive Liquid-liquid Microextraction for simultaneous determination of six parabens in aqueous cosmetics*. Chem Res Chinese U, 30 (2014) 368-373
- [264] Kocúrová L., Balogh I. S., Šandrejová J., Andruch V. *Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review*, Microchem J, 102 (2012) 11–17.
- [265] Kujawski M., Namieśnik J. *Technika dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz*. Analityka 1 (2013) 15-20.
- [266] de Oliveira M.L., Rocha B.A., Souza V.C.O., Barbosa F. Jr. *Determination of 17 potential endocrine-disrupting chemicals in human saliva by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Talanta, 196 (2019) 271-276.
- [267] Wang X., Qi W., Zhao X., Lü T., Wang X., Zheng L., Yan Y., You J. *Determination of four phenolic endocrine disruptors in environmental water samples by high performance liquid chromatography-fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization*. Se Pu, 32 (2014) 623-628.

- [268] Yuan K., Kang H., Yue Z., Yang L., Lin L., Wang X., Luan T. *Determination of 13 endocrine disrupting chemicals in sediments by gas chromatography–mass spectrometry using subcritical water extraction coupled with dispersed liquid–liquid microextraction and derivatization*. *Anal Chim Acta*, 866 (2015) 41–47.
- [269] Shahvar A., Soltani R., Saraji M., Dinari M., Alijani S. *Covalent triazine-based framework for micro solid-phase extraction of parabens*. *J Chromatogr A*, 1565 (2018) 48–56.
- [270] laborant.pl/index.php/mikroekstrakcja-do-fazy-stacjonarnej-technika-analizy-lotnych-zwiazkow-organicznych; data wejścia 20/04/2019
- [271] Munaretto J.S., Ferronato G., Ribeiro L.C., Martins M.L., Adaiame M.B., Zanella R. *Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disruptors in fish fillet using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry*, *Talanta*, 116 (2013) 827–834.
- [272] Vakondios N., Mazioti, A.A., Koukouraki E.E., Diamadopoulou E. *An analytical method for measuring specific endocrine disruptors in activated sludge (biosolids) using solid phase microextraction-gas chromatography*. *J Environ Chem Eng*, 4 (2016) 1910–1917.
- [273] Llop A., Borrull F., Pocurull E. *Pressurized hot water extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of N-nitrosamines in sewage sludge*. *Talanta*, 88 (2012) 284–289.
- [274] Vallecillos L., Pocurull E., Borrull F. *A simple and automated method to determine macrocyclic musk fragrances in sewage sludge samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 1314 (2013) 38–43.
- [275] Martín-Pozo L., de Alarcón-Gómez B., Rodríguez-Gómez R., García-Córcoles M.T., Çipa M., Zafra-Gómez A. *Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review*. *Talanta*, 192 (2019) 508–533.
- [276] Lehotay S.J. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach for Determining Pesticide Residues*. *Methods in Biotechnology*, Vol. 19, Pesticide Protocols Edited by: J. L. Martínez Vidal and A. Garrido Frenich, Humana Press Inc., Totowa, NJ
- [277] Jakimska A., Huerta B., Bargańska Ž., Kot-Wasik A., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D. *Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers*. *J Chromatogr A*, 1306 (2013) 44–58.
- [278] Xiong L., Yan P., Chu M., Gao Y.Q., Li W.H., Yang X.L. *A rapid and simple HPLC-FLD screening method with QuEChERS as the sample treatment for the simultaneous monitoring of nine bisphenols in milk*. *Food Chem*, 244 (2018) 371–377.
- [279] Tuzimski T., Pieniążek D., Buszewicz G., Teresiński G. *QuEChERS-Based Extraction Procedures for the Analysis of Bisphenols S and A in Breast Milk Samples by LC-QqQ-MS*. *J AOAC Int*, 102 (2019) 23–32.
- [280] Rodríguez-Gómez R., Jiménez-Díaz I., Zafra-Gómez A., Ballesteros O., Navalón A., *A multiresidue method for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk based on a simple extraction procedure*. *Talanta*, 130 (2014) 561–570.
- [281] Vela-Soria F., Iribarne-Durán L.M., Mustieles V., Jiménez-Díaz I., Fernández M.F., Olea N. *QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of parabens and ultraviolet filters in human milk samples*. *J Chromatogr A*, 1546 (2018) 1–9.
- [282] Cheng Y., Nie X.M., Wu H.Q., Hong Y.H., Yang B.C., Liu T., Zhao D., Wang J.F., Yao G.H., Zhang F. *A high-throughput screening method of bisphenols, bisphenols diglycidyl ethers and their derivatives in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Anal Chim Acta*, 950 (2017) 98–107.

- [283] AlOthman Z.A., Dawod M., Kim J., Chung D.S. *Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review*. Anal Chim Acta, 739 (2012) 14-24.
- [284] Pakade Y.B.; Tewary D.K. *Development and applications of single-drop microextraction for pesticide residue analysis: A review*. J Sep Sci, 33 (2010) 3683-91.
- [285] Saraji M., Mirmahdieh S. *Single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and GC-MS detection for the determination of parabens in water and cosmetic products*. J Sep Sci, 32 (2009) 988-95.
- [286] Prieto A., Basauri O., Rodil R., Usobiaga A., Fernández L.A., Etxebarria N., Zuloaga O. *Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions*. J Chromatogr A, 1217 (2010) 2642–2666.
- [287] Bicchi C., Liberto E., Cordero C., Sgorbini B., Rubiolo P. *Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Headspace Sorptive Extraction (HSSE): An Overview*. LCGC North America, 27 (2009) 376–390 (dostęp online www.chromatographyonline.com)
- [288] Melo L. P., Queiroz M. E. C. *Simultaneous analysis of parabens in cosmetic products by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography*. J Sep Sci, 33 (2010) 1849-1855.
- [289] Casas-Ferreira M., Moeder M., Fernández-Laespada M. *Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge with in situ derivatization and determination by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1218 (2011) 3837-3844.
- [290] Ramirez N., Marce R. M., Borrull F. *Determination of parabens in house dust by pressurized hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 6226-6231.
- [291] Ramirez N., Borrull F., Marce R. M. *Simultaneous determination of parabens and synthetic musks in water by stir-bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry*. J Sep Sci, 35 (2012) 580-588.
- [292] Cacho J.I., Campillo N., Viñas P., Hernández-Córdoba M. *Stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of bisphenols in canned beverages and filling liquids of canned vegetables*. J Chromatogr A, 1247 (2012) 146-53.
- [293] Sun F., Kang L., Xiang X., Li H., Luo X., Luo R., Lu C., Peng X. *Recent advances and progress in the detection of bisphenol A*. Anal Bioanal Chem, 408 (2016) 6913-27.
- [294] Kołodziejczyk K. *Cechy użytkowe i kryteria doboru detektorów wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC stosowanych do badań składników żywności*, Żywność 3 (2000) 5-13.
- [295] Piao Ch., Chen L., Wang Y. *A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens*. J Chromatogr B, 969 (2014) 139-148.
- [296] Zhou Q., Gao Y., Xie G. *Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector*. Talanta, 85 (2011) 1598-602.
- [297] Hines E.P., Mendola P., von Ehrenstein O.S., Ye X., Calafat A.M., Fenton S.E. *Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women*. Reprod Toxicol, 54 (2015) 120-8.
- [298] Rodríguez-Gómez R., Roldán-Pijuán M., Lucena R., Cárdenas S., Zafra-Gómez A., Ballesteros O., Navalón A., Valcárcel M. *Stir-membrane solid-liquid-liquid microextraction for the determination of parabens in human breast milk samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1354 (2014) 26-33.

- [299] Ros O., Vallejo A., Blanco-Zubiaguirre L., Olivares M., Delgado A., Etxebarria N., Prieto A. *Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-A, alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis*. *Talanta*, 134 (2015) 247-255.
- [300] Rodríguez-Gómez R., Zafra-Gómez A., Camino-Sánchez F.J., Ballesteros O., Navalón A., *Gas chromatography and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk after stir-bar sorptive extraction*. *J. Chromatogr. A*, 1349 (2014) 69-79.
- [301] Shihabi Z.K. *Clinical applications of capillary electrophoresis*. *Ann Clin Lab Sci*, 22 (1992) 398-405.
- [302] Mei S., Wu D., Jiang M., Lu B., Lim J.M., Zhou Y.K., Lee Y.I. *Determination of trace bisphenol A in complex samples using selective molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis*. *Microchem J*, 98 (2011) 150-5.
- [303] Zhang X., Zhu D., Huang Ch., Sun Y., Lee Y.-I. *Sensitive detection of bisphenol A in complex samples by in-column molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis*. *Microchem J*, 121 (2015) 1-5.
- [304] Zeng J., Kuang H., Hu C., Shi X., Yan M., Xu L., Wang L., Xu C., Xu G. *Effect of bisphenol A on rat metabolic profiling studied by using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry*. *Environ Sci Technol*, 47 (2013) 7457-65.
- [305] Alshana U., Ertaş N., Göğür N.G. *Determination of parabens in human milk and other food samples by capillary electrophoresis after dispersive liquid-liquid microextraction with back-extraction*. *Food Chem*, 181 (2015) 1-8.
- [306] Uysal U. D., Guray T. *Determination of parabens in pharmaceutical and cosmetic products by capillary electrophoresis*. *J Anal Chem*, 63 (2008) 982-986.
- [307] Fei T., Li H., Ding M., Ito M., Lin J. M. *Determination of parabens in cosmetic products by solid-phase microextraction of poly(ethyleneglycol) diacrylate thin film on fibers and ultra high-speed liquid chromatography with diode array detector*. *J. Sep. Sci*, 34 (2011) 1599-1606.
- [308] Tsai T. F., Lee M. R. *Determination of antioxidants and preservatives in cosmetics by SPME combined with GC-MS*. *Chromatographia*, 67 (2008) 425-431.
- [309] Ferrer C., Lozano A., Aguera A., Giron J., Fernandez-Alba A. R. *Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables*. *J Chromatogr A*, 1218 (2011) 7634-39.
- [310] Jonkers N., Sousa A., Galante-Oliveira S., Barroso C. M., Kohler H. P. E., Giger W. *Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 17 (2010) 834-43.
- [311] Peng X., Yu Y., Tang C., Tan J., Huang Q., Wang Z. *Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China*. *Sci Total Environ*, 397 (2008) 158-66.
- [312] Terasaki M., Takemura Y., Makino M. *Parabenchlorinated derivatives in river waters*. *Environ Chem Lett*, 10 (2012) 401-406.
- [313] Miller D., Wheals B.B., Beresford N., Sumpter J.P. *Estrogenic activity of phenolic additives determined by an in vitro yeast bioassay*. *Environ. Health Persp* 109 (2001) 133-138.
- [314] Szymański A., Wyrwas B., Jesiołowska A., Kazmierczak S., Przybysz T., Grodecka J., Łukaszewski Z. *Surfactants in the river Warta: 1990-2000*. *Pol J Environ Stud*, 10 (2001) 371-377.
- [315] Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. *J AOAC Int*, 86 (2003) 412-431.

- [316] Ritter J. K. *Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions*, Chem Biol Interact, 129 (2000) 171–193.
- [317] Völkel W., Bittner N., Dekant W. *Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Drug Metab Dispos, 33 (2005) 1748–1757
- [318] Ara K.M., Pandidan S., Aliakbari A., Raofie F., Amini M.M. *Porous-membrane-protected polyaniline-coated SBA-15 nanocomposite micro-solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of parabens in cosmetic products and wastewater*. J. Sep. Sci., 38 (2015) 1213-1224.
- [319] Zgoła-Grześkowiak A., Jeszka-Skowron M., Czarczyńska-Goślińska B., Grześkowiak T., *Determination of parabens in Polish river and lake water as a function of season*. Anal Lett, 49 (2016) 1734-1747.
- [320] Zgoła-Grześkowiak A., Jeszka-Skowron M., Frankowski R., Grześkowiak T. *Detection of bisphenol A, cumylphenol and parabens in surface waters of Greater Poland Voivodeship*. J Environ Manage, 204 (2017) 50-60.
- [321] Czarczyńska-Goślińska B., Zgoła-Grześkowiak A., Kaczorek E., *Biodegradacja metyloparabenu i propyloparabenu w warunkach aerobowych*. 59 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Poznań 2016, streszczenie w książce zjazdowej.
- [322] ECHA, 2018. *Market Survey: Use of bisphenol A and its alternatives in thermal paper in the EU from 2014 to 2017*, 1-13.
- [323] Rochester J. R., Bolden A. L., *Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes*. Environ Health Perspect 123 (2015) 643-650.
- [324] Kim S.M., Jung E.M., An B.S., Hwang I., Vo T.T., Kim S.R., Lee S.M., Choi K.C., Jeung E.B. *Additional effects of bisphenol A and paraben on the induction of calbindin-D9k and progesterone receptor via an estrogen receptor pathway in rat pituitary GH3 cells*. Journal Physiol Pharmacol, 63 (2012) 445-455.
- [325] Rodríguez-Gómez R., Dorival-García N., Zafra-Gómez A., Camino-Sánchez F.J., Ballesteros O., Navalón A. *New method for the determination of parabens and bisphenol A in human milk samples using ultrasound-assisted extraction and clean-up with dispersive sorbents prior to UHPLC-MS/MS analysis*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 992 (2015) 47-55.
- [326] Dualde P., Pardo O., Corpas-Burgos F., Kuligowski J., Gormaz M., Vento M., Pastor A., Yusà V. *Biomonitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants*. Sci Total Environ, 668 (2019) 797-805.
- [327] Schlumpf M., Kypke K., Wittassek M., Angerer J., Mascher H., Mascher D., Vökt C., Birchler M., Lichtensteiger W. *Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics*. Chemosphere, 81 (2010) 1171-1183.
- [328] Souza I.D., Melo L.P., Jardim I.C., Monteiro J.C., Nakano A.M., Queiroz M.E. *Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples*. Anal Chim Acta, 932 (2016) 49-59.

10. WYKAZ TABEL

- Tab. 1.** Nazwy i wzory strukturalne parabenów
- Tab. 2.** Właściwości fizykochemiczne parabenów
- Tab. 3.** Przegląd zawartości parabenów w różnych próbkach wody
- Tab. 4.** Wybrane bisfenole – wzory strukturalne i nazewnictwo
- Tab. 5.** Właściwości fizykochemiczne bisfenoli
- Tab. 6.** Przegląd zawartości BPA w mleku kobiecym
- Tab. 7.** Próbki rzeczywiste – produkty kosmetyczne
- Tab. 8.** Warunki analizy HPLC- FD
- Tab. 9.** Warunki analizy chromatograficznej LC-MS/MS
- Tab. 10.** Warunki oznaczania parabenów techniką LC-MS/MS
- Tab. 11.** Lokalizacja miejsc pobierania próbek środowiskowych
- Tab. 12.** Warunki analizy chromatograficznej LC-MS/MS
- Tab. 13.** Warunki analizy chromatograficznej LC-MS/MS
- Tab. 14.** Warunki oznaczania parabenów, BPA i kumylofenolu metodą LC-MS/MS
- Tab. 15.** Warunki analizy chromatograficznej LC-MS/MS
- Tab. 16.** Warunki oznaczania poszczególnych parabenów i bisfenoli w mleku kobiecym metodą LC-MS/MS
- Tab. 17.** Parametry walidacyjne opracowanej metody HPLC-FD
- Tab. 18.** Zawartość parabenów w próbkach rzeczywistych (n=3)
- Tab. 19.** Sumaryczna zawartość parabenów w próbkach kosmetyków oznaczona metodą HPLC-FD
- Tab. 20.** Odzysk parabenów z próbek modelowych i środowiskowych wzbogaconych na poziomie 0,0005 µg/ml
- Tab. 21.** Efekt matrycy
- Tab. 22.** Parametry walidacyjne metody oznaczania parabenów
- Tab. 23.** Stężenia parabenów w próbkach wody jeziornej (n=3)
- Tab. 24.** Stężenia parabenów w próbkach wody rzecznej (n=3)
- Tab. 25.** Porównanie poziomów stężenia parabenów oznaczonych w wodach rzecznych w skali globalnej
- Tab. 26.** Parametry walidacyjne metody oznaczania parabenów, BPA i CP
- Tab. 27.** Stężenia parabenów, BPA i CP w analizowanych próbkach wód jeziornych i rzecznych
- Tab. 28.** Parametry walidacyjne metody LC-MS/MS

- Tab. 29.** Warunki pracy źródła ESI przy oznaczaniu β -D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu i 4-metyloumbeliferonu
- Tab. 30.** Odzysk i precyzja w badaniach oznaczanych związków
- Tab. 31.** Zestawienie próbek mleka z uwzględnieniem dawczyń
- Tab. 32.** Wyniki zawartości parabenów w formie wolnej w próbkach mleka kobiecego pobranego między 2 a 4 tygodniem po porodzie (n=3)
- Tab. 33.** Wyniki zawartości bisfenoli w formie wolnej w próbkach mleka kobiecego pobranego między 2 a 4 tygodniem po porodzie (n=3)
- Tab. 34.** Wyniki zawartości parabenów w formie wolnej w próbkach mleka kobiecego pobranego między 3 a 4 miesiącem po porodzie (n=3)
- Tab. 35.** Wyniki zawartości bisfenoli w formie wolnej w próbkach mleka kobiecego pobranego między 3 a 4 miesiącem po porodzie (n=3)
- Tab. 36.** Wyniki całkowitej zawartości parabenów w próbkach mleka kobiecego pobranego między 2 a 4 tygodniem po porodzie (n=3)
- Tab. 37.** Wyniki całkowitej zawartości bisfenoli w próbkach mleka kobiecego pobranego między 2 a 4 tygodniem po porodzie (n=3)
- Tab. 38.** Wyniki całkowitej zawartości parabenów w próbkach mleka kobiecego pobranego między 3 a 4 miesiącem po porodzie (n=3)
- Tab. 39.** Wyniki całkowitej zawartości bisfenoli w próbkach mleka kobiecego pobranego między 3 a 4 miesiącem po porodzie (n=3)
- Tab. 40.** Całkowita zawartość MP, EP i PP oraz ich zawartości w postaci wolnej i związanej w próbkach mleka pobranych w pierwszym punkcie czasowym
- Tab. 41.** Całkowita zawartość BPA i BPS oraz ich zawartości w postaci wolnej i związanej w próbkach mleka pobranych w pierwszym punkcie czasowym
- Tab. 42.** Całkowita zawartość MP, EP i PP oraz ich zawartości w postaci wolnej i związanej w próbkach mleka pobranych w drugim punkcie czasowym
- Tab. 43.** Całkowita zawartość BPA i BPS oraz ich zawartości w postaci wolnej i związanej w próbkach mleka pobranych w drugim punkcie czasowym

11. WYKAZ RYCIN

Ryc. 1. Ogólny wzór strukturalny parabenów

Ryc. 2. Chromatograf cieczowy z detektorem fluorescencyjnym

Ryc. 3. Chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas

Ryc. 4. Schemat procedury wydzielania analitów techniką ekstrakcji do fazy stałej

Ryc. 5. Schemat procedury wydzielania analitów techniką ekstrakcji do fazy stałej

Ryc. 6. Chromatogram HPLC-FD uzyskany dla roztworu wzorcowego mieszaniny parabenów

Ryc. 7. Chromatogram HPLC-FD uzyskany dla próbki toniku

Ryc. 8. Chromatogram HPLC-FD uzyskany dla próbki wody micelarnej

Ryc. 9. Chromatogram HPLC-FD uzyskany dla ślepej próby

Ryc. 10. Widmo rozpadu benzyloparabenu przy energii kolizji -20 eV

Ryc. 11. Chromatogram mieszaniny parabenów

Ryc. 12. Odzyski parabenów uzyskane z użyciem różnych sorbentów. Objętość próbki 10 ml, elucja 2 ml metanolu

Ryc. 13. Odzyski parabenów uzyskane z użyciem złoża ABS Elut-Nexus dla różnych objętości próbki

Ryc. 14. Widmo fragmentacyjne bisfenolu A uzyskane dla energii kolizji -40 eV

Ryc. 15. Widmo fragmentacyjne kumylofenolu uzyskane dla energii kolizji -40 eV

Ryc. 16. Chromatogram oznaczanych związków: parabenów, BPA i CP

Ryc. 17. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości metyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej

Ryc. 18. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości metyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej

Ryc. 19. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości propyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej

Ryc. 20. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości propyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej

Ryc. 21. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości etyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej

Ryc. 22. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości etyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej

Ryc. 23. Wykres pudełkowy przedstawiający ilości butyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej

- Ryc. 24.** Wykres pudełkowy przedstawiający ilości butyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej
- Ryc. 25.** Wykres pudełkowy przedstawiający ilości benzyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej
- Ryc. 26.** Wykres pudełkowy przedstawiający ilości benzyloparabenu oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej
- Ryc. 27.** Wykres pudełkowy przedstawiający ilości BPA oznaczonego w różnych próbkach wody rzecznej
- Ryc. 28.** Wykres pudełkowy przedstawiający ilości BPA oznaczonego w różnych próbkach wody jeziornej
- Ryc. 29.** Widmo fragmentacyjne bisfenolu S uzyskane dla energii kolizji -40 eV
- Ryc. 30.** Widmo fragmentacyjne bisfenolu AF uzyskane dla energii kolizji -40 eV
- Ryc. 31.** Chromatogram mieszaniny parabenów i bisfenoli
- Ryc. 32.** Biotransformacja bisfenolu A (a) i parabenu (b) w organizmie człowieka w obecności glukuronylotransferazy
- Ryc. 33.** Chromatogram mieszaniny β -D-glukuronidu 4-metyloumbeliferylu (MUBG) i 4-metyloumbeliferonu (MUB)
- Ryc. 34.** Wykres średnich stężeń analitów w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 (między 2-7 tygodniem) i 2 (między 3-4 miesiącem)
- Ryc. 35.** Wykres średnich stężeń MP w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2
- Ryc. 36.** Wykres średnich stężeń EP w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2
- Ryc. 37.** Wykres średnich stężeń PP w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2
- Ryc. 38.** Wykres średnich stężeń BP w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2
- Ryc. 39.** Wykres średnich stężeń BPA w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2
- Ryc. 40.** Wykres średnich stężeń BPS w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2
- Ryc. 41.** Wykres średnich stężeń BPAF w postaci wolnej (F) i całkowitej (T) w dwóch punktach czasowych 1 i 2

Supplement

Załącznik 1

INSTRUKCJA POBIERANIA POKARMU

W okresie zbierania próbek mleka i w dniach poprzedzających nie powinno się stosować w rejonie piersi kosmetyków zawierających parabeny.

ZALECENIA DOTYCZĄCE ZBIERANIA I PRZECHOWYWANIA PRÓBEK MLEKA

1. Próbkę mleka powinny być zbierane przez matkę w okresie między 2 a 7 tygodniem po porodzie, a następnie między 3-4 miesiącem karmienia.
2. Próbkę mleka należy pobierać w ciągu dnia między 6 rano a 18 wieczorem do czystych butelek dostarczonych przez Wykonawcę badań. Butelki do których zbierany będzie pokarm zostaną dostarczone w stanie czystym i nie będą wymagać dodatkowego mycia przed pobraniem próbek mleka.
3. Próbkę mleka powinny być pobierane ręcznie lub za pomocą laktatora. Zbiornik laktatora powinien być czysty, wypłukany kilkakrotnie wodą przegotowaną i wysuszony na powietrzu. **W żadnym wypadku nie powinien zawierać pozostałości mydła lub innych detergentów.** Nie należy używać żadnego innego naczynia do zbierania mleka. np. kubków lub innych butelek, które mogą być w domu. Jeśli pokarm będzie pobierany ręcznie, mleko powinno być odciągane bezpośrednio do przeznaczonej do tego butelki lub zbiornika laktatora.
4. **Przed przystąpieniem do pobierania próbek mleka piersi i ręce matki powinny być starannie umyte i czyste, ale należy unikać używania mydła. Jeśli użycie mydła jest konieczne, powinno być ono dokładnie spłukane.**
5. Schemat pobierania próbek mleka

Nr próbki	Okres pobrania po porodzie	Dzień pobrania	Pobranie	Pobrana objętość mleka [ml]	Całkowita objętość mleka w próbce [ml]
I	2 – 7 tydzień	1	pierwsze	Łącznie nie mniej 20 ml	Nie mniej niż 50 ml
			drugie		
		2	pierwsze	Łącznie nie mniej 20 ml	
drugie					
3	pierwsze	Łącznie nie mniej 10 ml			
II	3-4 miesiąc	1	pierwsze	Łącznie nie mniej 20 ml	Nie mniej niż 50 ml
			drugie		
		2	pierwsze	Łącznie nie mniej 20 ml	
			drugie		
3	pierwsze	Łącznie nie mniej 10 ml			
UWAGA W przypadku odciągnięcia mniej niż 5 ml pokarmu z każdej z piersi należy zwiększyć liczbę pobrań w ciągu dnia tak, aby w kolejnych dniach uzyskać łącznie podaną wyżej ilość pokarmu					

6. Procedura pobierania próbek mleka

a. Po przystawieniu dziecka do piersi należy odczekać do przyptywu mleka (uczucie rozpierania w piersi z jednoczesnym aktywnym ssaniem i częstym polykaniem przez dziecko). Następnie karmić dziecko przez 2 do 5 min. z każdej piersi. Po tym czasie odstawić dziecko od piersi i pobrać z każdej piersi przynajmniej po 5 ml pokarmu – łącznie nie mniej niż 10 ml mleka (odciągnąć ręcznie lub z pomocą laktatora). Następnie ponownie przystawić dziecko do piersi i karmić aż się nasyci.

b. Jak przedstawiono na schemacie (pobierania próbek mleka (pkt. 5 - tabela)

Wykonać dwa pobrania pierwszego dnia – łącznie nie mniej niż 20 ml pokarmu.

Wykonać dwa pobrania drugiego dnia – łącznie nie mniej niż 20 ml pokarmu.

Wykonać jedno pobranie trzeciego dnia – łącznie nie mniej niż 10 ml pokarmu.

Łączna objętość próbki mleka zebranej w ciągu 3 dni do jednej butelki powinna wynosić co najmniej 50 ml pokarmu

c. Porcje mleka zbierane podczas kolejnych karmień powinny być dolewane do tej samej butelki. Butelka ze zbieranym przez kolejne dni mlekiem powinna być przechowywana w domowej lodówce do czasu zebrania od matki całkowitej ilości pokarmu. Całkowita ilość zebranego mleka powinna być przechowywana w zamrażalniku do czasu odebrania przez Wykonawcę badań. Raz zamrożonego mleka nie powinno się rozmrażać.

Po uzyskaniu przez Wykonawcę badań informacji o zakończeniu pobierania próbek butelka zawierająca pokarm powinna być odebrana najpóźniej w ciągu 3 dni przez Wykonawcę badania.

Załącznik 2**Ankieta do wypełnienia przez uczestniczkę badań – dawczynię próbek
w obecności Wykonawcy badań**

Bardzo dziękujemy za szczere i rzetelne odpowiedzi.

Kod próbki I	
Okres pobierania próbki I (daty od do)	
Kod próbki II	
Okres pobierania próbki II (daty od do)	
Data odbioru próbek przez wykonawcę	
Wiek dziecka w tygodniach w momencie rozpoczęcia zbierania próbek:	
Płeć dziecka:	
Masa urodzeniowa dziecka [g]	
Masa dziecka podczas zbierania próbek [g]	
Wiek matki	
Masa [kg] przed ciążą	
Masa [kg] po porodzie	
Wzrost [cm]	
Obszar zamieszkania w ciągu ostatnich 5 lat:	miejski podmiejski wiejski
Miejscowość	
Rodzaj wykonywanej pracy	
Czas aktywności zawodowej [lata]	
Dieta: Jaką dietę Pani stosuje? Wegetariańską z dodatkiem mleka i jaj Ścisłe wegetariańską Inną – jaką?	
Czy zmieniła Pani rodzaj diety wraz z zajściem w ciążę? Jeśli tak, to w jaki sposób?	
Jaka jest Pani częstotliwość spożycia ryb i innej żywności pochodzenia morskiego: - nigdy - raz na tydzień - częściej niż raz na tydzień	
Jak często Pani spożywa - przeciery warzywne	
- marynaty	
- galaretki	
- dżemy, konfitury	
- konserwy rybne i mięsne	
- majonezy, ketchupy	

Produkty spożywcze jakich producentów spożywa Pani najczęściej?	
Jakie typy kosmetyków Pani stosuje?	
- balsamy do ciała	
- dezodoranty	
- toniki	
- preparaty do demakijażu	
- kremy	
- perfumy/wody toaletowe	
- inne	
Jakie są miejsca ich stosowania?	
- twarz	
- okolice szyi	
- okolice klatki piersiowej	
- okolice pach	
- ręce	
- inne	
Czy zwraca Pani uwagę na skład kosmetyków, w tym na obecność w nich parabenów?	
Jak często stosuje Pani kosmetyki?	
Jakie kosmetyki stosuje Pani w okresie laktacji?	
Jak często stosuje Pani kosmetyki w okresie laktacji?	
Kosmetyki jakich firm Pani stosuje najczęściej?	
Nawyki palenia Czy jest Pani niepaląca? Czy jest Pani była palaczką? Czy jest Pani aktualnie paląca? Co Pani pali (e-papierosy, papierosy)? Jak dużo Pani pali na dzień?	
Czy choruje/chorowała Pani a) na raka piersi b) choroby tarczycy - niedoczynność - nadczynność c) choroby ginekologiczne	
Czy przyjmuje Pani jakieś leki w sposób ciągły ?	
Jeśli tak, to proszę podać nazwę preparatu/preparatów.	
Jeśli tak, to od jak dawna?	
Jeśli tak, to proszę zaznaczyć jaką postać leku: - tabletki - kapsułka miękka - kapsułka twarda - aerozol - syrop	

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że jestem autorem rozprawy doktorskiej pt.:

„**Oznaczanie w wybranych matrycach związków z grup parabenów i bisfenoli**”.

Informuję, że udzielam/~~nie udzielam~~¹ nieodpłatnie Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu (UMP) licencji niewyłącznej do korzystania z ww. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji²

- przechowywanie i archiwizowanie pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania, udostępniania i obrotu w formie elektronicznej
- udostępnienie pracy w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej UMP

Jednocześnie informuję, że³

- wyrażam zgodę na nieodpłatne opublikowanie całości manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (WBC)
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej, ponieważ zobowiązuję się
 - w terminie nie dłuższym niż 6 miesięcy od daty podpisania niniejszego oświadczenia do przygotowania publikacji opartej na wynikach pracy doktorskiej i wysłania do wydawnictwa,
 - opublikowania ww. wyników w okresie kolejnych 18 miesięcy,
 - afiliowania ww. pracy na rzecz Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej z uwagi na zawarty w niej niejawnny charakter informacji

Przyjęłam do wiadomości fakt obowiązku niezwłocznego poinformowania Dziekanatu Wydziału **Farmaceutycznego** UMP o wysłaniu manuskryptu do wydawnictwa oraz przyjęciu publikacji do druku⁴. W przypadku niepoinformowania Dziekanatu w terminie o ww. faktach zezwalam Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu na opublikowanie całości mojej pracy doktorskiej w WBC⁵.

Data i podpis 29/04/2019

¹ niepotrzebne skreślić

² właściwe pola zaznaczyć

³ należy wybrać jedną z trzech podanych niżej możliwości

⁴ dotyczy wyłącznie sytuacji, w której autor rozprawy doktorskiej prosi o odroczenie publikacji manuskryptu w WBC z uwagi na zamiar opublikowania zawartych w niej wyników w czasopiśmie/czasopismach naukowych

⁵ Art. 14, ust. 1, Ustawa o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dz.U. 1994 Nr 24 poz. 83)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej pt.: „**Oznaczanie w wybranych matrycach związków z grup parabenów i bisfenoli**”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych.

Beata Maria Czarczyńska-Goślińska