

## VYUŽITÍ METODY MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ PRO STANOVENÍ BISFENOLŮ VE VODÁCH

SIMONA TESAŘOVÁ<sup>a</sup>, MICHAELA CHARVÁTOVÁ<sup>a</sup> a MILADA VÁVROVÁ<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, <sup>b</sup> Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno  
simkates@seznam.cz, charvatovam@vfu.cz, vavrova@fch.vutbr.cz

Došlo 21.11.13, přepracováno 13.11.14, přijato 19.11.14.

Klíčová slova: bisfenol, mikroextrakce tuhou fází, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

### Úvod

Životní prostředí je v současnosti zatíženo různými typy kontaminantů, jejichž zdrojem jsou nové materiály i nově zaváděné technologie. Obalové materiály tvořené polymery jsou jedním z nejčastějších zdrojů reziduí vyskytujících se v životním prostředí. Předkládaná práce je zaměřena na stanovení bisfenolů, skupiny obávaných reziduí pocházejících z plastových materiálů, a to konkrétně bisfenolu A (BPA), bisfenolu A diglycidyl etheru (BADGE), bisfenolu F (BPF) a bisfenolu F diglycidyl etheru (BFDGE) ve vodách, které jsou nejvíce kontaminovanou složkou životního prostředí.

Bisfenoly z hlediska chemické struktury obsahují hydroxylovou skupinu připojenou na uhlík aromatického kruhu<sup>1</sup>. Nejvíce diskutovaným zástupcem bisfenolů je strukturně nejjednodušší bisfenol A. Do popředí zájmu se dostal díky své prokázané přítomnosti v kojeneckých lahvích. BPA se používá jako monomer při výrobě epoxidových pryskyřic a polykarbonátových plastů, z nichž jsou vyráběny již zmiňované kojenecké lahve. Také ho lze využít jako antioxidant, případně retardér hoření. Bylo zjištěno, že BPA může migrovat z lahve do mléka. Tento přestup může mít za následek ohrožení zdraví dětí s nedostatečně vyvinutou imunitou (ve věku do 3 let). U bisfenolu A a bisfenolu F byla pomocí toxikologických studií prováděných na hlodavcích prokázána karcinogenita (schopnost vyvolat proliferaci buněk), mutagenita (schopnost ovlivnit vývoj mozku, zpomalení růstu a vývoje plodu) a endokrinní aktivita, zejména estrogenní<sup>2–5</sup>. Bisfenol A byl zakázán při výrobě polykarbonátových kojeneckých lahví nejdříve v USA, později také

v Evropské unii. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA), stejně jako Agentura pro ochranu životního prostředí v USA (The United States Environmental Protection Agency, US EPA), stanovily na základě ekotoxikologických testů v roce 2006 hodnotu tolerovatelného denního příjmu BPA na 50 µg kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti/den (cit.<sup>6</sup>). I přes opakovaně prokazované negativní účinky bisfenolu A na organismy neustále roste jeho celosvětová produkce<sup>1,7</sup>.

Americká společnost pro testování a materiály (American Society for Testing and Materials, ASTM) doporučuje pro stanovení bisfenolů standardní metodu LC-MS<sup>8</sup>. V naší práci byla použita dostupnější plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, která je často používána ve studiích zabývajících se stanovením bisfenolů v různých materiálech<sup>3,11,12</sup>. Pro izolaci sledovaných analytů z matrice byla zvolena mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction, SPME). SPME je vzhledem ke své rychlosti a vysoké selektivitě často aplikovanou metodou při stanovení organických kontaminantů ve složkách životního prostředí. Principem této metody je sorpce analytu na stacionární fázi polymerního charakteru, kterou je pokryto křemenné vlákno ukryté uvnitř kovové jehly. Metoda SPME může probíhat dvěma způsoby, a to buď jako headspace probíhající v prostoru lahvičky nad vzorkem nebo jako přímé ponoření vlákna do vzorku<sup>9,10</sup>.

Cílem předložené studie bylo optimalizovat metodu přímé mikroextrakce tuhou fází (SPME) pro izolaci analytů BPA, BADGE, BPF a BFDGE ze vzorků vod pro následnou analýzu metodou GC-MS.

### Experimentální část

#### Přístroje a pomůcky

Plynový chromatograf 6890N a hmotnostní spektrometr 5973N (Agilent Technologies, USA), elektromagnetické míchadlo RCT basic (IKA-WERKE, Staufen im Breisgau, Německo), manuální držák na vlákno SPME (Supelco, Bellefonte, PA, USA), SPME vlákna divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan 50/30 µm (DVB/CAR/PDMS), polydimethylsiloxan/divinylbenzen 65 µm (PDMS/DVB), polydimethylsiloxan 7 µm (PDMS 7), polydimethylsiloxan 100 µm (PDMS 100), polyakrylát 85 µm (PA) (vše Supelco, Bellefonte, PA, USA); z běžných laboratorních pomůcek byly dále používány magnetická míchadélka, 10ml lahvičky na vzorky s plochým okrajem, 5ml lahvičky na vzorky se šroubovacím okrajem, hliníková víčka se silikonovým septem, šroubovací víčka s PTFE/silikonovým septem, krimpovací kleště 20 mm otevírací a zavírací (vše Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika).

#### Reagencie

Acetonitril pro reziduální analýzu (J.T. Bakker, Nizozemí), kyselina chlorovodíková suprapur, koncentrovaná, chlorid sodný, aceton (vše Merck, Darmstadt, Německo),

bisfenol A (99,9%, Supelco, Bellefonte, USA), bisfenol F (98%, Supelco, Bellefonte, USA), bisfenol A diglycidyl ether (88%, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Německo), bisfenol F diglycidyl ether (98%, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Německo), *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSFTA) (99,6%, Supelco, Bellefonte, USA).

#### Pracovní postupy

##### *Příprava roztoku směsi bisfenolů*

Standardní roztok o koncentraci  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  každého analytu byl připraven smícháním jednotlivých standardních roztoků, které byly připraveny rozpuštěním příslušné navážky v acetonitrilu. Standardní roztoky těchto látek připravené v acetonitrilu měly následující koncentrace: BPA  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ , BADGE  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ , BPF  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  a BFDGE  $10 \text{ g ml}^{-1}$ .

Na obr. 1 je pro ilustraci uveden chromatogram této směsi s následujícími retenčními časy: BPA 6,35 min; BPF 6,01 min; BADGE 8,78 a 11,09 min; BFDGE 7,87 a 10,08 min. Analyty BADGE a BFDGE poskytují více píků, což odráží zastoupení jednotlivých izomerů, které jsou ve standardu přítomny.

##### *Příprava reálných vzorků*

Pro zjištění koncentrací vybraných analytů v reálných vzorcích vod byly odebrány vzorky povrchových vod z potoka ve Velkých Němčicích, z přírodního pramene v Křepicích a z řeky Svratky v Židlochovicích. Dalšími analyzovanými vzorky byly vody balené v PET lahvích o dvou různých objemech (0,5 l a 1,5 l), a to v perlivé i neperlivé variantě, zakoupené v běžné obchodní síti od různých výrobců.

Vzorky byly do doby zahájení analýzy uchovávány v chladničce a zpracovány maximálně do 24 h od odebrání (povrchové vody) a ihned po otevření vod balených. K izolaci analytů pomocí SPME byly reálné vzorky připraveny tak, že do lahvičky na vzorky s definovaným obje-

mem, s rovným dnem a plochým okrajem bylo odměřeno 7,5 ml vzorku a 100  $\mu\text{l}$  acetonitrilu.

##### *Příprava vzorků pro optimalizaci metody SPME*

Pro optimalizaci metody SPME byl vždy připraven stejný vzorek tak, že do 10 ml lahvičky bylo odměřeno 7,5 ml destilované vody, ke které se přidalo 100  $\mu\text{l}$  směsného standardu bisfenolů o koncentraci  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Do takto připraveného vzorku se vložilo magnetické míchadélko a lahvička byla uzavřena hliníkovým víčkem se septem. Uzavřená lahvička se směsí se umístila na laboratorní magnetickou míchačku a vzorek se 10 min míchal.

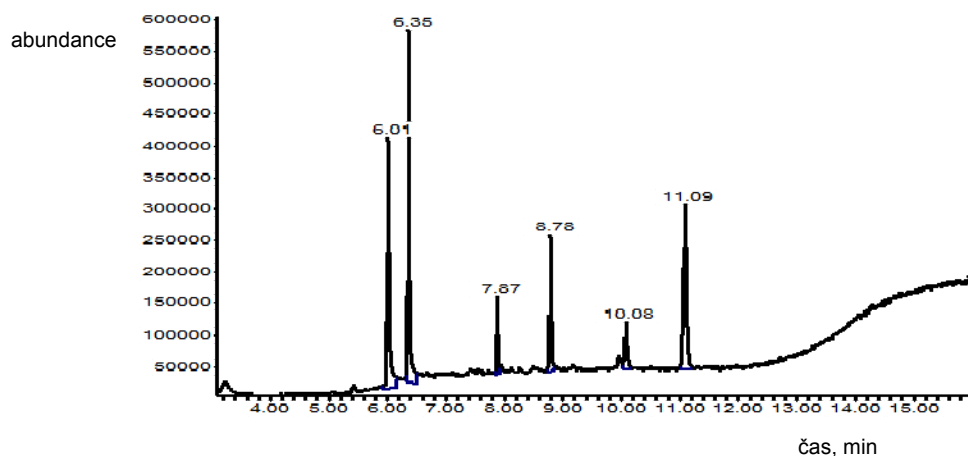
##### *Optimalizace metody přímé SPME*

Výběr stacionární fáze vlákna je nejdůležitějším krokem metody SPME, a proto bylo nejdříve porovnáváno pět různých typů vláken, aby mohlo být zvoleno jedno optimální vlákno vhodné pro izolaci analytů z matrice. Ověřovány byly tyto typy vláken:

- divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan 50/30  $\mu\text{m}$  (DVB/CAR/PDMS),
- polydimethylsiloxan/divinylbenzen 65  $\mu\text{m}$  (PDMS/DVB),
- polydimethylsiloxan 7  $\mu\text{m}$  (PDMS 7),
- polydimethylsiloxan 100  $\mu\text{m}$  (PDMS 100),
- polyakrylát 85  $\mu\text{m}$  (PA).

V rámci optimalizace SPME byly dále posuzovány následující vlivy:

- změna pH (přídavek HCl zředěné destilovanou vodou),
- přídavek 0,75 g soli (NaCl),
- teplota na 50 °C,
- předmíchání vzorku (testované doby byly 5, 10, 15 a 20 min),
- míchání (ano/ne),
- doba extrakce (5, 10, 15, 20, 30, 45 a 60 min),
- derivatizace analytu, která následovala po vlastní



Obr. 1. Chromatografický záznam standardů BPF (6,01 min), BPA (6,35 min), BFDGE (7,87 a 8,78 min) a BADGE (10,08 a 11,09 min)

sorpci přímou SPME, v head-space prostoru 5 ml lahvičky se šroubovacím okrajem o obsahu 1 ml acetonu a 50  $\mu\text{l}$  derivatizačního činidla BSFTA při zahřívání na 60 °C a době sorpce 20 minut.

#### Stanovení analytů pomocí GC-MS

Pro analyty izolované z reálných vzorků vod byla jako rozhodčí metoda použita analýza plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí za následujících chromatografických podmínek<sup>11</sup>: kapilární kolona DB-5MS (20 m  $\times$  0,180 mm  $\times$  0,18  $\mu\text{m}$ ), teplota nástřikového prostoru 260 °C, teplota iontového zdroje a transfer line 230 °C. Pro analýzu byl optimalizován následující teplotní program: 150 °C po dobu 2 min, 30 °C/min do 270 °C, zadrž 6 min, 10 °C/min do 290 °C, zadrž 2 min; celková doba analýzy byla 16 min. Jako nosný plyn bylo použito helium o průtoku 1,1 ml min<sup>-1</sup>. Použitá technika nástřiku splitless, vlákno bylo manuálně vloženo do nástřikového prostoru. Stanovení sledovaných analytů probíhalo paralelně.

## Výsledky a diskuse

### Optimalizace metody SPME

Pro izolaci vybraných analytů ze vzorků vod, tj. povrchové i balené vody, byla optimalizována metoda přímé SPME s následujícími vybranými parametry:

- vzorek: 7,5 ml destilované vody a 100  $\mu\text{l}$  směšného standardu,
- 10 minut předmíchání,
- 10 minut sorpce na vlákno DVB/CAR/PDMS, a to za stálého míchání vzorku.

Při optimalizaci metody byl brán zřetel zejména na komplexní stanovení všech vybraných analytů v jednom kroku. Při hodnocení typu pokrytí vlákna bylo prokázáno, že každý analyt vykazuje odlišné odezvy pro různá zkoušená vlákna. Na základě posouzení odezvy bylo ze tří nejlepších vláken vybráno vlákno DVB/CAR/PDMS, které bylo vhodné pro stanovení všech analytů současně. Výsledky dokumentující výběr optimálního vlákna jsou prezentovány na obr. 2.

Opakovatelnost optimalizované metody byla testována pomocí pěti paralelních analýz směšného vzorku o koncentraci 0,13  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a její vyhodnocení bylo provedeno porovnáním pěti GC-MS chromatogramů a následným výpočtem směrodatné odchylky. Hodnoty meze detekce (LOD), meze stanovitelnosti (LOQ), relativní směrodatné odchylky (RSD) a směrnice kalibrační závislosti ( $r^2$ ) jsou uvedeny v tab. I. Hodnoty LOD a LOQ byly pro jednotlivé analyty vypočteny z kalibračních křivek za použití vzorců:

$$\text{LOD} = 3 \cdot Hs/a$$

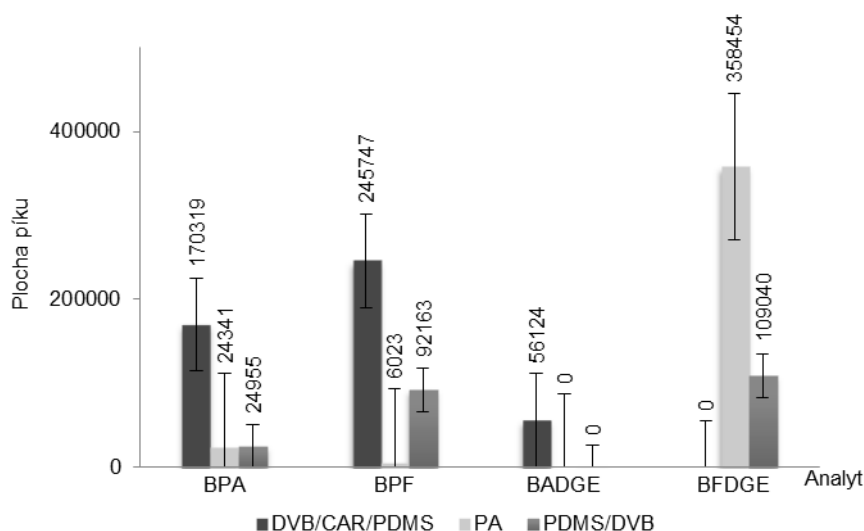
$$\text{LOQ} = 10 \cdot Hs/a$$

kde  $Hs$  je velikost šumu na základní linii chromatogramu a  $a$  je hodnota směrnice kalibrační přímky.

Tabulka I

Základní metrologické parametry metody SPME-GC-MS

Analyt	RSD [%]	LOD [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	$r^2$
BPA	15,030	1,36	4,53	0,9902
BPF	10,493	3,39	11,31	0,9805
BADGE	15,733	0,03	0,10	0,9530
BFDGE	10,404	0,76	2,54	0,9777



Obr. 2. Výběr SPME vlákna; porovnání odezvy jednotlivých analytů při použití tří typů SPME vláken

Tabulka II

Zjištěné koncentrace analytů v reálných vzorcích vod uvedené v  $\mu\text{g l}^{-1}$

Vzorek	BPA	BPF	BADGE	BFDGE
Pramen	<LOQ	14,74	18,78	15,62
Svratka	<LOD	14,63	18,79	15,23
Potok	<LOD	15,03	18,83	15,70
BVMP <sup>a</sup>	7,58	22,78	19,07	20,39
BVMN <sup>b</sup>	<LOQ	16,17	18,85	16,36
BVVP <sup>c</sup>	<LOQ	18,97	18,88	17,40
BVVN <sup>d</sup>	<LOD	14,34	18,83	14,85

<sup>a</sup> Balená voda malá perlivá, <sup>b</sup> balená voda malá neperlivá, <sup>c</sup> balená voda velká perlivá, <sup>d</sup> balená voda velká neperlivá

#### Analýza reálných vzorků

Optimalizovaná metoda SPME s metodou GC-MS byla použita pro stanovení koncentrace sledovaných analytů v reálných vzorcích vod. Sledované analyty byly zjišťovány v povrchových vodách vodních toků na jižní Moravě (řeka Svratka, potok tvořící přítok řeky Svratky) a z přírodního pramene. Kromě toho byly pro analýzu zakoupeny rovněž různé typy balených vod (perlivé i neperlivé) o různých objemech (0,5 a 1,5 l), pocházejících od různých výrobců. Na základě získaných výsledků lze říci, že koncentrace nejobávanějšího zástupce měřených analytů, tj. bisfenolu A, je v reálných vzorcích vod zanedbatelná. Ve většině případů byla koncentrace BPA pod mezí detekce, případně pod mezí stanovitelnosti. Výsledky naopak prokázaly, že všechny vzorky obsahovaly vyšší koncentrace ostatních analytů. Jak je však uvedeno v tab. II, tyto zjištěné koncentrace posuzovaných analytů byly i v těchto případech velmi nízké, řádově v  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Nami zjištěné hodnoty v povrchových vodách (viz tab. II) byly velmi podobné výsledkům publikovaným ve španělské studii z roku 2001 (cit. <sup>12</sup>), ve které byly sledovány koncentrace stejných analytů v odpadních vodách: BPA 0,02–0,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ , BPF 0,06–2,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ , BADGE 0,45–50,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  a BFDGE 0,30–50,0  $\mu\text{g l}^{-1}$ . I z těchto výsledků lze říci, že vodní složka životního prostředí je více kontaminována příbuznými bisfenoly jako BADGE a BFDGE, což jsou produkty rozkladu BPA a BPF, než obávaným bisfenolem A.

#### Závěr

V předložené studii jsou uvedeny výsledky získané při optimalizaci metody přímé SPME ve spojení s GC-MS pro stanovení BPA, BPF, BADGE a BFDGE v reálných vzorcích vod. Vypracovaná metoda je vhodná pro rychlá stanovení výše uvedených analytů ve vodách, protože neobsahuje derivatizaci jako krok často aplikovaný při stanovení pomocí metody LC-MS.

*Tato práce vznikla za finanční podpory VZ MŠMT ČR č. MSM 6215712402.*

#### LITERATURA

1. Ballesteros-Gomez A., Rubio S., Perez-Bendito D.: *J. Chromatogr. A* 1216, 449 (2009).
2. Fernandez M. F., Arrebola J. P., Taoufik J., Navalon A., Ballesteros O., Pulgar R., Vilchez J. L., Olea N.: *Reprod. Toxicol.* 24, 259 (2007).
3. Zafra A., del Olmo M., Suarez B., Hontoria E., Navalon A., Vilchez J. L.: *Water Res.* 37, 735 (2003).
4. Xiangli L., Li L., Shichun Z., Chongyu L., Tiangang L.: *Chin. J. Anal. Chem.* 34, 325 (2006).
5. Pleskacova H.: *Diplomová práce*. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno 2008.
6. LAMBDA LIFE a.s.: *SPME.pdf*, 2010. <http://www.lambda.sk/pdf/metodiky/SPME.pdf>, staženo 17. října 2010.
7. Jordakova I., Dobias J., Voldrich M., Poustka J.: *Czech J. Food Sci.* 21, 85 (2003).
8. Vilchez J. L., Zafra A., Gonzalez-Casado A., Hontoria E., del Olmo M.: *Anal. Chim. Acta* 431, 31 (2001).

**S. Tesařová<sup>a</sup>, M. Charvátová<sup>a</sup>, and M. Vávrová<sup>b</sup>**  
<sup>a</sup> Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, <sup>b</sup> Department of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno): **The Use of Solid Phase Microextraction for Determination of Bisphenols in Waters**

A new method for determination of bisphenol A, bis-phenol F and their diglycidyl ethers in water was developed. The analytes were isolated from the matrix by direct solid phase microextraction (SPME) for subsequent analysis by GC-MS. The optimized method of SPME and GC-MS was applied to the analysis of real samples including surface water and bottled water.