Validacija metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Gavran, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:232308

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KEMIJSKI ODSJEK

MAGDALENA GAVRAN

VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE BISFENOLA A I BENZOFENONA U TERMOKROMNIM BOJAMA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

MAGDALENA GAVRAN

VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE BISFENOLA A I BENZOFENONA U TERMOKROMNIM BOJAMA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistre kemije

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za analitičku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nives Galić i neposrednim vodstvom mr. sc. Kristinke Vinković u sklopu diplomskog sveučilišnog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja magistre kemije.

ZAHVALA

Veliko hvala mentorici prof.dr.sc. Nives Galić na korisnim i stručnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada te na ukazanoj ljubaznosti i strpljenju.

Srdačno se zahvaljujem mr.sc. Kristinki Vinković na pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada, susretljivosti, trudu, ohrabrivanju, strpljenju i ustupljenim materijalima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima koji su me uz nesebičnu ljubav i neizmjerno razumijevanje podržavali tijekom cijelog studija. Veliko hvala i mojoj braći, Vedranu i Zlatku, koji su vjerovali u moj uspjeh čak i kada ja nisam.

Naposlijetku, hvala mojim prijateljima i kolegama na podršci i nezaboravnim uspomenama tijekom cijelog studija.

Magdalena Gavran

SADRŽAJ

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
BASIC DOCUMENTATION CARD

SAŽETAK v
ABSTRACT vi
1. UVOD 1
1.1. Cilj i svrha rada 1
2. LITERATURNI PREGLED 2
2.1. Kromogene boje 2
2.1.1. Termokromne boje 3
2.1.2. Termokromne boje na bazi tekućih kristala 3
2.1.3. Termokromne leuko - boje 4
2.2. Bisfenol A 6
2.2.1. Uporaba bisfenola A 7
2.2.2. Toksičnost bisfenola A 8
2.2.3. Metode određivanja bisfenola A 9
2.3. Benzofenon 11
2.3.1. Uporaba benzofenona 11
2.3.2. Toksičnost benzofenona 12
2.3.3. Metode određivanja benzofenona 13
2.4. Osnovni principi kromatografije 14
2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 15
2.4.2. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti 20
2.5. Validacija analitičkih metoda 21
2.5.1. Specifičnost i selektivnost 22
2.5.2. Linearnost 22
2.5.3. Granica detekcije i kvantifikacije 23
2.5.4. Preciznost 24
2.5.5. Točnost 25
2.5.6. Radno područje 26
2.5.7. Robustnost 26

3. EKSPERIMENTALNI DIO 27
3.1. Kemikalije 27
3.2. Pribor 27
3.3. Instrumenti 27
3.4. Programi za upravljanje instrumentima i obradu podataka 28
3.5. Uzorci 28
3.6. Kromatografski uvjeti 29
3.7. Priprema kalibracijskih otopina i uzoraka prema razvijenoj metodi 29
3.7.1. Priprema kalibracijskih otopina 29
3.7.2. Priprema uzoraka termokromnih boja 30
3.8. Validacija metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama 30
3.8.1. Linearnost 30
3.8.2. Preciznost 31
3.8.3. Točnost 31
3.8.4. Granica kvantifikacije (LOQ) 31
3.8.5. Granica detekcije (LOD) 32
4. REZULTATI I RASPRAVA 35
4.1. Odabir kromatografske tehnike i uvjeta za određivanje bisfenola A i benzofenona 35
4.2. Validacija metode 35
4.2.1. Specifičnost i selektivnost 35
4.2.2. Linearnost 36
4.2.3. Granica kvantifikacije i granica detekcije 38
4.2.4. Preciznost 39
4.2.5. Točnost 41
4.2.6. Robustnost 43
4.2.7. Stabilnost 44
4.3. Sažetak rezultata validacije 45
4.4. Analiza uzoraka termokromnih boja 46
5. ZAKLJUČAK 49
6. LITERATURNA VRELA 50
7. PRILOZI .....
7.1. Popis kratica i simbola viii
7.2. Životopis ix

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE BISFENOLA A I BENZOFENONA U TERMOKROMNIM BOJAMA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

MAGDALENA GAVRAN

Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Uporaba endokrino aktivnih tvari kao što je bisfenol A za sintezu različitih materijala predstavlja sve veći problem zbog njihova djelovanja na hormonsku ravnotežu kod ljudi i životinja. Pseudoestrogeni bisfenol A i benzofenon mogu biti sastojci termokromnih boja bitni za njihovo funkcioniranje. Bisfenol A ima ulogu razvijača boje, a benzofenon se koristi kao fotoinicijator u bojama koje se suše pomoću UV zračenja. Uporaba termokromnih boja je u porastu, a koriste se u raznim tipovima ″pametne″ ambalaže, za sigurnosni tisak, u komercijalne svrhe te za različite vrste temperaturnih indikatora. Široka uporaba predstavlja povećani rizik intoksikacije ljudi i zagađenja okoliša endokrino aktivnim tvarima koje termokromne boje sadrže. U sklopu ovog diplomskog rada validirana je metoda za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim tiskarskim bojama po parametrima koje propisuju smjernice međunarodnih organizacija. Validirani parametri su specifičnost, selektivnost, linearnost, preciznost, točnost i robustnost. Validiranom metodom određen je sadržaj bisfenola A i benzofenona u 15 uzoraka termokromnih boja različitih proizvođača, načina tiska i sušenja.

(51+IX stranica, 21 slika, 18 tablica, 35 literaturnih navoda, jezik izvornika:hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: benzofenon, bisfenol A, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, termokromne boje, validacija

Mentor: Prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Nives Galić
Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
Izv. prof. dr. sc. Željka Soldin
Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Rad prihvaćen: 07.02.2017.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma thesis

VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF BISPHENOL A AND BENZOPHENONE IN PRINTING INKS BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

MAGDALENA GAVRAN

Division of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Use of the endocrine disruptors like bisphenol A for the synthesis of different materials represents a growing problem due to their impact on the hormone balance in humans and animals. Pseudo-estrogenes bisphenol A and benzophenone may be important ingredients for the activity of thermochromic printing inks. Bisphenol A has a role of the colour developer and benzophenone is used as a photo-initiator in the UV-curing inks. Thermochromic printing inks are increasingly used in various types of "smart" packaging, security printing, for commercial purposes and different types of temperature indicators. Widespread use represents increasing fate of intoxication of humans and environmental pollution by the endocrine disruptors contained in the thermochromic printing inks. In this diploma thesis the method for determination of bisphenol A and benzophenone in thermochromic printing inks has been validated according to parameters prescribed in guidelines of the international organisations. Validated parameters were specificity, selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness. The validated method was applied for bisphenol A and benzophenone analyses in 15 samples of thermochromic printing inks of various producers, printing and drying modes.

(51+IX pages, 21 pictures, 18 tables, 35 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia.

Key words: benzophenone, bisphenol A, high pressure liquid chromatography, thermochromic printing inks, validation.

Mentor: Dr. Nives Galić, Prof.

Reviewers: Dr. Nives Galić, Prof.
Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.
Dr. Željka Soldin, Assoc. Prof.

Replacement: Dr. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 07.02.2017.

1. UVOD

1. UVOD

Termokromne boje su smjese koje grijanjem ili hlađenjem mijenjaju boju pri tzv. aktivacijskoj temperaturi. Koriste se u raznim vrstama ″pametne″ ambalaže (indikatori svježine i temperature proizvoda), za sigurnosni tisak (čekovi, ulaznice, recepti za lijekove), u komercijalne svrhe (promotivni materijali, dekorativne svrhe, dizajnerska rješenja) te za različite vrste temperaturnih indikatora. Tri glavne komponente termokromnih boja su nosač boje, razvijač i otapalo.

Bisfenol A je komercijalno najvažniji razvijač u termokromnim bojama jer se njime postižu žarke boje i promjene s velikim kontrastom. Istraživanja su pokazala da bisfenol A agonistički djeluje na receptore estrogena te je klasificiran kao endokrino aktivna tvar koja ometa hormonsku ravnotežu kod ljudi i životinja. Smatra se da ima estrogeno djelovanje i u vrlo niskim koncentracijama od 1 ng L^{-1}, a najosjetljivije skupine su fetusi, dojenčad i djeca. Rana izloženost bisfenolu A povezuje se s povećanim rizikom raka prostate i dojke.

Termokromne boje koje se suše pomoću djelovanja UV zračenja mogu sadržavati benzofenon kao fotoinicijator koji potiče nastanak polimernog filma preko otiska boje. Istraživanja na životinjama pokazala su da benzofenon ima slabu estrogenu aktivnost no u vodi pod djelovanjem UV zračenja može prijeći u 3-hidroksibenzofenon i 4-hidroksibenzofenon koji imaju znatno veću estrogenu aktivnost. Benzofenon i njegovi derivati povezuju se s povećanim rizikom od raka dojke te estrogenim djelovanjem na reproduktivni sustav, kosti i jetru.

1.1. Cilj i svrha rada

Na Zavodu za analitičku kemiju razvijena je metoda za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim tiskarskim bojama tekućinskom kromatografijom obrnutih faza s UV detekcijom u sklopu doktorske disertacije mr. sc. Kristinke Vinković.

Cilj i svrha ovog diplomskog rada je validacija razvijene metode koja uključuje ispitivanje parametara selektivnosti, specifičnosti, linearnosti, preciznosti, točnosti, granice detekcije i određivanja te robustnosti metode. Validiranom metodom odredit će se sadržaj bisfenola A i benzofenona u 15 uzoraka termokromnih boja različitih proizvođača. Prema dostupnim izvorima do sada nisu pronađeni podaci o određivanju bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama.

2. LITERATURNI PREGLED

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kromogene boje

Tinte koje mijenjaju boju pod određenim okolnostima sve se više primjenjuju u području sigurnosnog tiska, pametne ambalaže i u komercijalne svrhe. Ovakve tinte dobivaju nova područja primjene jer daju proizvodima nove specifične karakteristike. Zbog svoje kompleksnosti pametni materijali su dio interdisciplinarnog područja istraživanja. Oni daju proizvodu veću zaštitu, dekorativnost, dodatnu funkcionalnost, nove specifične karakteristike korištenja, a time i veliku dodatnu tržišnu vrijednost. Takvi materijali imaju jednu ili više karakteristika koje se lako mogu kontrolirano mijenjati vanjskim podražajima, kao što su temperatura, vlaga, pH vrijednost, električno ili magnetsko polje. Neki od najvažnijih pametnih materijala su piezoelektrični materijali, materijali s memorijom za oblik, kromogeni materijali, itd.[1]

Kromogeni materijali mijenjaju obojenje pod utjecajem nekog vanjskog podražaja. Obzirom na vrstu vanjskih podražaja na koje boje mogu reagirati, kromogene tiskarske boje dijele se na način prikazan u Tablici 1.

Tablica 1. Podjela kromogenih tiskarskih boja obzirom na vrstu vanjskih podražaja.[1]

Vrsta boje	**Faktor koji uzrokuje promjenu boje**
Termokromne	Temperatura
Fotokromne	Svjetlo
Biokromne	Biokemijske reakcije
Halokromne	pH vrijednost
Elektrokromne	Električno polje
Piezokromne	Trenje
Ionokromne	Koncentracija iona

Od navedenih kromogenih boja, najviše se istražuju i upotrebljavaju termokromne i fotokromne boje.[1]

2.1.1. Termokromne boje

Termokromne boje mijenjaju obojenje prilikom izlaganja određenim temperaturama. Obzirom na strukturu, trenutno se koriste dva tipa termokromnih boja, termokromne boje na bazi tekućih kristala i termokromne leuko - boje. Ove dvije formulacije termokromnih boja razlikuju se po mogućnostima promjene obojenja unutar vidljivog spektra, jednostavnosti pripreme i točnosti indikacije temperature.

Upotreba termokromnih materijala započela je početkom šezdesetih godina i bila je bazirana na tekućim kristalima. Sedamdesetih godina termokromni materijali na bazi tekućih kristala mogli su se pronaći u tzv. prstenu raspoloženja (engl. *mood ring*) koji je mijenjao boju ovisno o promjeni temperature tijela.[2]



Slika 1. Primjena termokromnih materijala.[3,4,5]

U početku je korištenje i zaštita tekućih kristala bila komplicirana, no kada se razvila mikroinkapsulacija, započeo je razvoj i upotreba termokromnih materijala. Ovaj razvoj potaknuo je veliki interes za termokromizam i uskoro se povećao broj molekula za koje je utvrđeno da imaju termokromna svojstva. Danas se termokromni materijali koriste u komercijalne svrhe, kao npr. promotivni materijali, dekorativni materijali te u brojnim dizajnerskim rješenjima. Termokromni materijali svoju svrhu pronašli su i u prehrambenoj industriji kao indikatori svježine i temperature proizvoda. Također, koriste se i u sigurnosnom tisku, na čekovima, ulaznicama i receptima za lijekove.[6]

2.1.2. Termokromne boje na bazi tekućih kristala

Termokromne boje na bazi tekućih kristala (engl. *Thermochromic liquid crystal ink*, TLC) posjeduju uređen raspored molekula, ali njihove molekule se mogu međusobno izvijati i kretati. Postupno povećanje temperature dovodi do narušavanja geometrije i promjene boje

kristala, tj. promjene valnih duljina reflektiranog svjetla. Hlađenjem se kristali vraćaju u svoju prvobitnu boju. Tekući kristali reflektiraju svjetlost u uskom području valnih duljina. Taj efekt je vidljiv kao tzv. *colour play* tj. prelijevanje boja od duljih valnih duljina (crvenog dijela spektra) prema kraćim valnim duljinama (plavom dijelu spektra). Refleksija vidljivog svjetla događa se sve dok se ne dosegne kritična temperatura. Iznad kritične temperature tekući kristali ponovno postaju transparentni.[7]



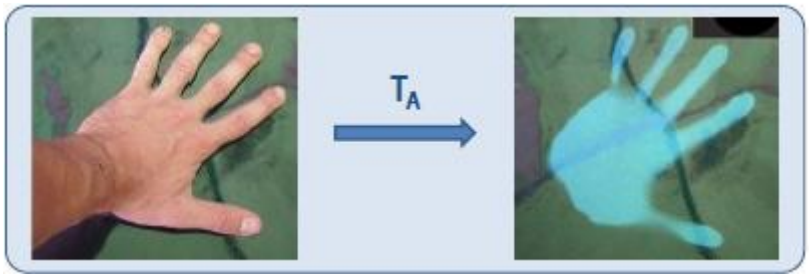
Slika 2. *Colour play* efekt.[8]

Refleksija se odvija na kiralnim centrima molekula čija raspodjela konformacija ovisi o temperaturi. Promjena boje se događa u uskom temperaturnom području. Temperatura pri kojoj se događa promjena boje naziva se temperatura aktivacije, $\boldsymbol{T_A}$. Temperatura aktivacije uzrokuje kontinuiranu promjenu obojenja duž cijelog vidljivog spektra. Obzirom na temperaturu aktivacije, termokromne boje mogu se podijeliti u hladne (T_A = 10 ºC), tjelesna temperatura (T_A = 31 ºC) i tople (T_A = 43 ºC).[2]

Obzirom na širinu pojasa, boje na bazi tekućih kristala dijele se na uskopojasne i širokopojasne. To su boje koje imaju definiran temperaturni raspon u kojem aktivno reflektiraju vidljivo svjetlo. Uskopojasni termokromni tekući kristali najčešće imaju temperaturni raspon u kojem aktivno reflektiraju vidljivo svjetlo, od 0,5 °C do 4 °C, dok širokopojasni najčešće imaju raspon širine pojasa od 5 °C do 30 °C.[9]

2.1.3. Termokromne leuko - boje

Termokromne leuko - boje mijenjaju boju iz obojenog u bezbojno ili iz jedne boje u drugu u širem temperaturnom području. Boja je rezultat apsorbiranja upadne svjetlosti kromogenih skupina. Termokromne leuko - boje su trenutno najzastupljenije u izradi termokromnih tinti. $\boldsymbol{T_A}$ uzrokuje promjene obojenja iz jedne boje u drugu ili iz obojenog u transparentno stanje.



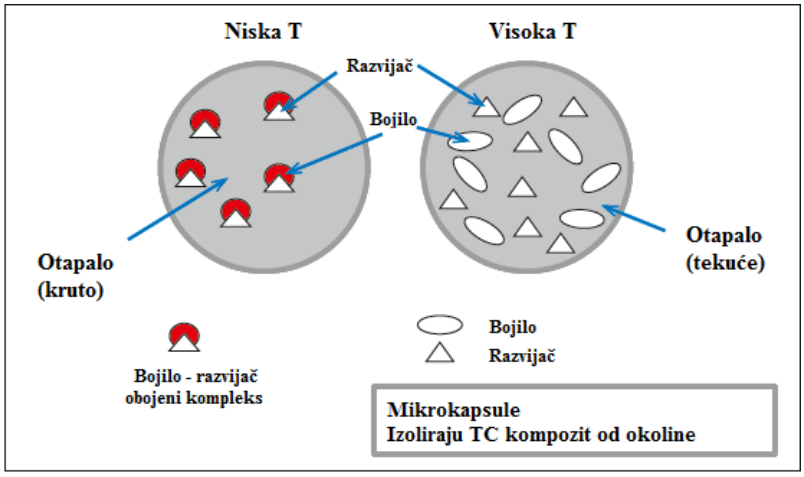
Slika 3. Promjene obojenja iz jedne boje u drugu.[8]

Obzirom na promjene, postoje reverzibilni i ireverzibilni termokromni sustavi. Kod reverzibilnih termokromnih sustava promjena boje je višekratna i povratna, dok je kod ireverzibilnih termokromnih sustava promjena boje jednokratna i trajna. Boja ireverzibilnih termokromnih sustava obično se počinje mijenjati na temperaturi od 65 ºC, a u potpunosti se promijeni na temperaturi od 90 ºC. Kada se boja jednom pojavi, ona neće nestati, promijenit će se iz jedne boje u drugu ostavljajući trajnu naznaku o promjeni temperature. Ovakvi ireverzibilni termokromni sustavi najviše se upotrebljavaju u medicinske svrhe kao indikatori pravilno steriliziranih medicinskih proizvoda.[2]

Reverzibilne termokromne boje sastoje se od bojila, razvijača i otapala. Bojila koja se najčešće koriste pripadaju grupi spirolaktona, fluorana, spiropirana, fulgida i timolftaleina. Sadrže elektrondonorske skupine i mijenjaju boju s promjenom pH vrijednosti. Promjena boje događa se kroz dvije kompetitivne reakcije: između bojila i razvijača te između otapala i razvijača. Obojenje nastaje pri nižim temperaturama kada se otapalo nalazi u krutom stanju i kada molekula razvijača preuzme elektrone radeći kompleks bojilo - razvijač. Razvijači su obično slabe kiseline, kao npr. bisfenol A, galati, fenoli, hidroksibenzoati, hidroksikumarin. Povećanjem temperature otapalo prelazi u tekući oblik i uzrokuje raspad kompleksa bojilo - razvijač. Razvijač se otapa u otapalu i obojenje nestaje. Kao otapala se koriste alkoholi i esteri, a temperatura tališta otapala određuje temperaturu na kojoj će se mijenjati boja trokomponentnog termokromnog kompozita. Prilikom ponovnog hlađenja, otapalo se skrutne, a razvijač i bojilo se vrate u prvobitno stanje. Promjena je reverzibilna više tisuća puta.[10]

Tri glavne komponente termokromnih boja daju termokromni pigment koji se miješa s vezivom i formira u mikro - kapsule kako bi boja na proizvodu bila fiksirana i stabilna. Inkapsulacija je potrebna zbog zaštite od vanjskih utjecaja. Mikrokapsule nisu inertne i netopljive kao konvencionalni pigmenti, a raspršenje svjetla je zanemarivo malo. Njihova veličina je od 3 do 5 μm, što je deset puta veće od konvencionalnih pigmentnih čestica.

Proces mikrokapsulacije daje okrugle kapsule najčešće s melaminskom ovojnicom oko termokromnog kompozitnog materijala koji sačinjava samu jezgru.[2]

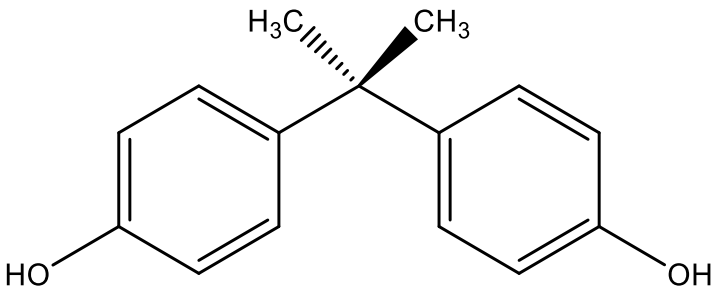


Slika 4. Shematski prikaz kompozitnog sustava bojilo - razvijač - otapalo.[2]

Zbog mikroinkapsulacije termokromne boje su osjetljive na mehanička oštećenja. UV zračenje, agresivna otapala i temperature iznad 230 ºC mogu nepovoljno utjecati na njihovu funkcionalnost. Slabo su postojane na UV zračenje i zbog toga brojni istraživači rade na povećanju njihove UV stabilnosti.[2]

2.2. Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) je organska molekula kemijske formule $C_{15}H_{16}O_2$ i molekulske mase 228,29 g mol^{-1}.[11] Prema IUPAC-ovoj nomenklaturi ime mu je 4−[2−(4−hidroksifenil)propan−2−il]fenol. U literaturi se najčešće može pronaći pod imenom 2,2−bis−(4−hidroksifenil) propan. Pri standardnim uvjetima BPA je u čvrstom stanju u obliku kristala ili pahulja i slabog je mirisa poput fenola. Prvi put je sintetiziran 1905. godine kondenzacijom fenola i acetona uz kiselinu kao katalizator.[12]



Slika 5. Struktura bisfenola A.

2.2.1. Uporaba bisfenola A

BPA je industrijska kemikalija i osnovna polazna sirovina za proizvodnju polikarbonatne plastike i epoksi smola. Od polikarbonata se izrađuju brojni artikli za skladištenje hrane, kompaktni diskovi, igračke i bočice za dječju hranu. Epoksi smole su polimeri s izvrsnim mehaničkim svojstvima te visokom temperaturom i kemijskom otpornošću. Koriste se za unutarnju oblogu limenki za hranu i piće, u zubnim plombama, aditivima u građevini itd. BPA je svoju primjenu pronašao i u proizvodnji termo - papira, polivinil - klorida, polisulfonskih smola i sl.[1]



Slika 6. Plastika i epoksi smole, materijali koji se proizvode od BPA.[11]

2.2.2. Toksičnost bisfenola A

Godinama se smatralo da BPA nema štetnih učinaka za ljudsko zdravlje. Detekcija BPA u okolišu, vodi za piće i hrani pobudila je interes brojnih istraživača i utvrđeni su negativni efekti ovoga spoja na ljudsko zdravlje. Utvrđen je problem specifične migracije bisfenola A iz materijala i predmeta u hranu i piće koji su glavni put unosa BPA u ljudskom organizmu. Najznačajniji toksični učinak BPA je pseudoestrogeno djelovanje, a u nekim istraživanjima je klasificiran i kao kancerogen i mutagen koji djeluje na centralni živčani sustav, bubrege i jetru.[13]

Europska Komisija je 1996. godine klasificirala BPA kao supstanciju vanjskog porijekla koja je štetna za ljudsko zdravlje. Potvrđeno je da bisfenol A ima estrogena svojstva i agonistički efekt prema estrogenom receptoru, tj. pojačava djelovanje estrogenog receptora. U ljudskom organizmu BPA ima djelovanje slično hormonu estradiolu. Endokrina aktivnost uočena je čak i pri koncentraciji nižoj od 1 ng L^{-1}. Zbog kompleksnosti hormonalnog sustava, mehanizam djelovanja ksenobiotika koji dovode do ometanja endokrinog sustava još nije u potpunosti objašnjen. Efekti izlaganja bisfenolu A imaju veći utjecaj na fetuse, dojenčad i mlađu djecu te mogu dovesti do ireverzibilnih oštećenja koja se pojavljuju i nakon nekog vremena.[13]

Zbog potencijalne opasnosti za ljudsko zdravlje, Europska Unija, SAD i Kanada donijele su zakonsku regulativu kojom je definiran i ograničen dnevni unos bisfenola A iz ambalaže u hranu te zabrana uporabe materijala koji sadrže BPA za izradu predmeta koji koriste mala djeca. Kanada je 2009. godine među prvima zabranila uporabu polikarbonatnih bočica za dječju hranu. SAD, odnosno Američka agencija za zaštitu okoliša (*US Environmental Protection Agency*, EPA) je također zabranila uporabu materijala koji sadrže BPA za proizvodnju bočica za dječju hranu te odredila maksimalnu prihvatljivu, odnosno referentnu dozu (RfD) bisfenola A koja iznosi 50 μg po kilogramu tjelesne mase dnevno. U Europi je za regulativu zadužena Europska agencija za sigurnost hrane (*European Food Safety Agency*, EFSA) prema čijim je novim smjernicama iz siječnja 2015. dopušteni dnevni unos BPA u organizam čovjeka 4 μg po kilogramu tjelesne mase.[13,14]

2.2.3. Metode određivanja bisfenola A

Najčešće tehnike koje se koriste za određivanje bisfenola A u hrani i biološkim uzorcima su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), te vezani sustavi tekućinska kromatografija–spektrometrija masa (LC-MS) i plinska kromatografija–spektrometrom masa (GC-MS). Osim spektrometrije masa, kao detekcijske tehnike upotrebljavaju se UV detekcija, elektrokemijska detekcija te fluorescencijska detekcija. Posljednja se najviše koristi zbog toga što su fluorescencijski detektori osjetljiviji u odnosu na UV detektore, a zahtijevaju jednostavniju aparaturu u odnosu na spektrometre masa.

U Tablici 2 navedene su tehnike i granice određivanja bisfenola A u uzorcima hrane i biološkim uzorcima. U literaturi nisu pronađeni podaci o određivanju bisfenola A u termokromnim bojama.

Tablica 2. Glavni parametri metoda za određivanje bisfenola A u hrani i biološkim uzorcima.[15]

Uzorak	Priprema	Separacija i detekcija	LOD	Reproducibilnost i točnost
Voda	SPME	HPLC − fluorescencija (275/305nm)	1,1 ng L^{-1}	RSD = 22 % (n=4)
Dječja hrana	SPE: C_{18} Kloroform: voda	HPLC-fluorescencija 235/317 nm	0,9 ppb	RSD = (2–27) % (n= 3) Točnost = (86–104) %
Kava	SPE: C_{18} Acetonitril - voda 40:60	HPLC-fluorescencija (275/300nm)	–	RSD = (1,9−6,7)% (n = 3) Točnost = (85,3−96,2) %
Mlijeko	LLE: acetonitril / heksan Acetonitril – *n* - heptan 20:80	HPLC – fluorescencija 275/300 nm	(1–3) ng mL^{-1}	RSD = (3,4−24,6) % (n = 5) Točnost = (76,9–101,8) %

Vino	pH = 7 Imunoafinitetna kolona Acetonitril - voda 40:60	HPLC-fluorescencija 275/305 nm	0,1 ng L^{-1}	RSD = (10–15) % (n = 3) Točnost = (74–81) %
Urin	LLE: dietil eter	HPLC – ECD	0,2 ng mL^{-1}	RSD = (3–12) % (n=4) Točnost = 103 %
Krvna plazma	LLE: voda SPE: C_{18} Acetonitril - voda 40:60	HPLC-ECD	0,2 ng mL^{-1}	RSD =2,9 % (n=5) Točnost = 93 %
Riba	LLE: acetonitril Aceton - heksan 30:70	Fluorescencija 235/300 nm	1 ng g^{-1}	RSD = (1,8–4,8)% (n=5) Točnost = (70,7–72,9) %
Voće, povrće	LLE: acetonitril SPE:C_{18} Aceton–heptan	UV 228 nm	(5–10) ng mL^{-1}	RSD = (3,4–4,2) % (n=3) Točnost = (84,5–90,1) %

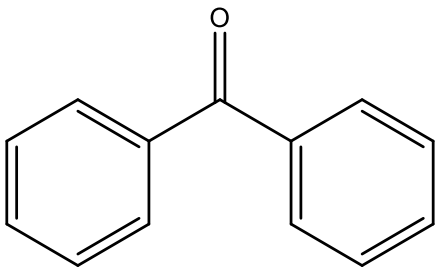
ECD = elektrokemijska detekcija
LLE = ekstrakcija tekuće/tekuće
SPE = ekstakcija na čvrstoj fazi
SPME = mikroekstrakcija na čvrstoj fazi
RSD = relativno standardno odstupanje

Analiza hrane i bioloških uzoraka koji sadrže bisfenol A uključuje pripremu uzorka, ekstrakciju, separaciju i detekciju. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) i ekstrakcija tekuće - tekuće (engl. *Liquid - Liquid Extraction*, LLE) su najučinkovitije i najčešće korištene metode ekstrakcije BPA u hrani i biološkim uzorcima. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) je primjer ekstrakcije koja je učinkovita za analizu hlapljivih spojeva, dok je za srednje hlapljive i nehlapljive spojeve manje učinkovita, posebno ako se radi o složenoj matrici, kao što su hrana i biološki uzorci. Najznačajnija primjena SPME za ekstrakciju BPA odnosi se na jednostavne matrice kao što je voda. Prije ekstrakcije uzorci se mogu cijepiti obilježenim izotopima BPA te je moguće

provesti korekcije rezultata ukoliko dođe do gubitka analita ili varijacija u volumenu ekstrakta što povećava točnost i preciznost metode.[15,16]

2.3. Benzofenon

Benzofenon je organska molekula kemijske formule $C_{13}H_{10}O$ i molekulske mase 182,22 g mol^{-1}. Bijela je kristalna tvar karakterističnog mirisa. Slabo je topljiv u vodi, ali je topljiv u organskim otapalima kao što su alkohol, eter, octena kiselina, kloroform i benzen. Na Slici 7 prikazana je strukturna formula benzofenona koji se dobiva Friedel - Craftsovom acilacijom benzoil klorida sa suviškom benzena u prisutnosti bezvodnog aluminijevog klorida.[17]



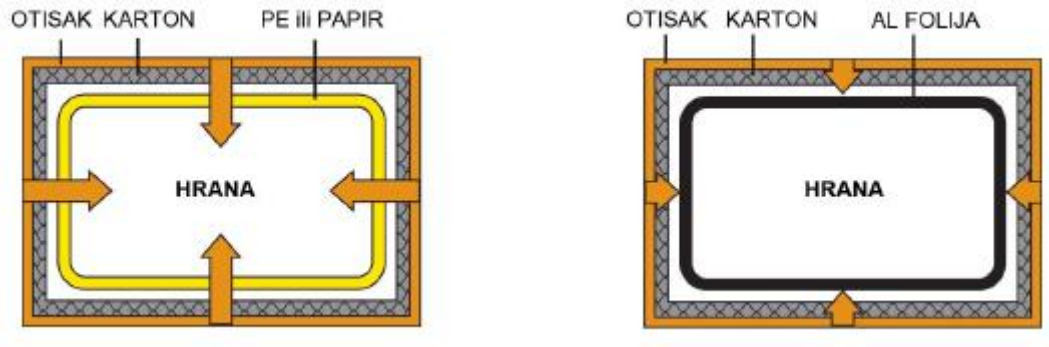
Slika 7. Strukturna formula benzofenona.

2.3.1. Uporaba benzofenona

Benzofenon ima vrlo široku uporabu. Koristi se kao sastojak umjetnih aroma, pojačivač mirisa, dodatak u proizvodnji plastike, premaza i ljepila. Također se koristi u proizvodnji insekticida, poljoprivrednih kemikalija, antihistaminika i drugih lijekova. Može se dodavati plastičnoj ambalaži radi zaštite proizvoda od UV zračenja što omogućuje proizvođačima pakiranje proizvoda u prozirnu staklenu i plastičnu ambalažu. Benzofenon se često koristi kao fotoinicijator u tintama i lakovima. Osim kao sredstvo za sušenje, benzofenon se može koristiti i kao sredstvo za vlaženje pigmenata te u tisku u svrhu poboljšanja reoloških svojstava povećavanja protoka tinte gdje ima ulogu reaktivnog otapala.[17]

Glavni izvor izloženosti benzofenonu iz ambalaže za pakiranje hrane odnosi se na njegovu široku upotrebu kao fotoinicijatora u UV tintama koje se nanose na vanjsku stranu

kartonske ambalaže. Fotoinicijatori su ključni za proces sušenja, odnosno očvršćivanja UV boja. Različite vrste fotoinicijatora reagiraju na različite valne duljine ultraljubičastog zračenja. Zbog toga se u formuliranju boja koriste različite vrste fotoinicijatora kako bi se osiguralo efikasno očvršćivanje boje. Benzofenon lako migrira u hranu iz ovakve ambalaže, ponekad čak i ako je dodatno zaštićena plastičnom vrećicom koja se koristi kao barijera od vlage. Poznato je da benzofenon lako migrira kroz polipropilenski film, dok aluminij i višeslojni materijali učinkovito inhibiraju njegovu migraciju.[18]



Slika 8. Shematski prikaz migracije benzofenona u hranu.[18]

2.3.2. Toksičnost benzofenona

Benzofenon se može unijeti u organizam udisanjem, preko kože i gutanjem. Djelatnosti povezane s izloženošću benzofenonu su slikarstvo, industrija plastičnih kompozita i industrija ljepila i lakova. Niske koncentracije benzofenona pronađene su u vinovoj lozi u koncentraciji od 0,08 ppm do 0,13 ppm.[17]

Europski odbor za prehrambeni lanac i zdravlje životinja (*EU Standing Committee for the Food Chain and Animal Health*) istraživao je utjecaj benzofenona i njegovog derivata 4-metilbenzofenona na miševe i uspostavio je granicu dnevnog unosa benzofenona i njegovog derivata na 0,6 mg kg^{-1}. Obzirom da oba spoja mogu biti sastojci tiskarskih boja ne preporuča se koristiti ih na ambalaži prehrambenih proizvoda, osim u slučaju prisutnosti funkcionalne barijere koja blokira njihov prijenos u hranu.[20] Nisu dostupni podaci o toksičnosti benzofenona u ljudi no poznato je da može utjecati na endokrini sustav kroz razne učinke na receptore hormona.[17]

Na temelju negativnih *in vivo* i *in vitro* rezultata ispitivanja, zaključeno je da benzofenon nema genotoksični potencijal. Jetra i bubrezi identificirani su kao primarni ciljni organi toksičnosti benzofenona kod miševa i štakora. Utvrđeno je i da benzofenon uzrokuje hipertrofiju jetre kod štakora.[17,20]

U Sloveniji je zabilježena koncentracija benzofenona i njegovog derivata 4-metilbenzofenona iznad dozvoljene vrijednosti u hrani u kontaktu s ambalažom, a koja može uzrokovati oštećenje jetre i bubrega ako se unosi u organizam hranom kroz dulje vrijeme.[18] U Hrvatskoj je zabilježen slučaj migracije benzofenona iz kartonske kutije kao vanjske ambalaže na polipropilensku foliju koja predstavlja primarnu (direktnu) ambalažu, tj. u neposrednom je kontaktu s hranom. Polipropilenska folija je učinkovita barijera i gotovo je nepropusna, no dugim stajanjem postoji mogućnost migracije benzofenona u hranu. Zbog toga su primijenjene mjere predostrožnosti i proizvod je povučen s tržišta.[18]

Metabolit benzofenona koji nastaje u vodenom okruženju uz djelovanje UV zračenja, 4-metilhidroksibenzofenon ima jaču estrogenu aktivnost i anti - androgenu aktivnost *in vivo* i *in vitro*. Brojni mono-, di-, tri-, tetra- hidroksilirani benzofenoni posjeduju estrogenu aktivnost i povećavaju rizik od raka dojke kod ljudi. Najveća aktivnost opažena je kod 2,4,4'-trihidroksibenzofenona.[19]

2.3.3. Metode određivanja benzofenona

Broj radova koji opisuju određivanje benzofenona znatno je manji u usporedbi s određivanjem bisfenola A. Derivati benzofenona određivani su u ljudskom urinu ekstrakcijom tekuće − tekuće, a potom tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemnom spektrometrijom masa (LC−MS/MS). Za ekstrakciju je korištena mikroekstrakcija na krutoj fazi. Za ekstrakciju benzofenona iz vodenih otopina i ljudskog urina mogu se koristiti i druge metode ekstrakcije, kao što su mikroekstrakcija u tekućoj fazi (engl. *Liquid Phase Microextraction,* LPME), mikroekstrakcija na kapi (engl. *Single Drop Microextraction,* SDME) i dr.[21]

Hidroksilirani derivati benzofenona analizirani su u vodi i ribi tekućinskom kromatografijom s UV detekcijom te vezanim sustavima GC-MS i LC-MS.

U Tablici 3 prikazana je usporedba glavnih karakteristika analitičkih metoda korištenih za određivanje benzofenona u biološkim uzorcima.

Tablica 3. Analitičke tehnike i granice kvantifikacije benzofenona u biološkim uzorcima.[22]

Uzorak	Analitička tehnika	Granica detekcije
Urin	SPE-LC-MS / MS	0,3 ng L^{-1}
	LC-UV	1,3 ng L^{-1}
	GC-MS	(0,05−10) ng L^{-1}
	LC-MS/MS	(0,28–0,9) ng L^{-1}
Mlijeko	SPE-LC-MS/MS	0,4 ng L^{-1}
Serum	SPE-LC-MS/MS	0,5 ng L^{-1}
Krv	LC-UV	3,9 ng L^{-1}

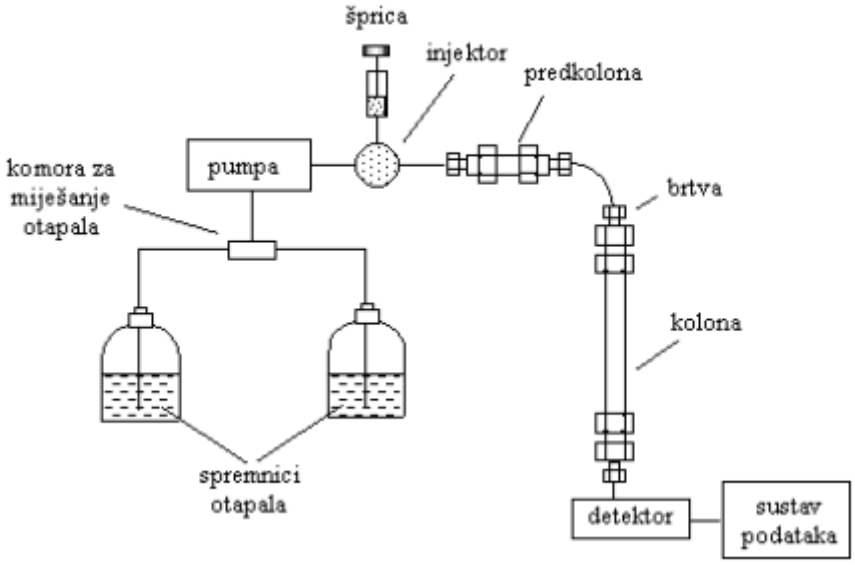
2.4. Osnovni principi kromatografije

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga se kreće u određenom smjeru (pokretna ili mobilna faza). Kromatografske metode dijele se prema različitim kriterijima. Prema fizičkom stanju pokretne faze poznajemo tekućinsku kromatografiju (engl. *Liquid Chromatography*, LC), plinsku kromatografiju (engl. *Gas Chromatography*, GC) te fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC). Prema mehanizmu odjeljivanja dijele se na: adsorpcijsku kromatografiju (engl. *Adsorption Chromatograpy*), razdjelnu kromatografiju (engl. *Partition Chromatography*), kromatografiju isključenjem (engl. *Exclusion Chromatography*), afinitetnu kromatografiju (engl. *Affinity Chromatography*) i ionsko − izmjenjivačku kromatografiju (engl. *Ion − Exchange Chromatography*).[23]

2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) razvijena je kasnih 1960 − ih i 1970 − ih godina. Danas je široko prihvaćena separacijska tehnika za analizu i pročišćavanje uzoraka u raznim područjima, uključujući farmaceutsku, prehrambenu te industriju polimera kao i ekologiju i biotehnologiju.[24]

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti sastoji se od komore za miješanje otapala, pumpe i otplinjača (degazera), sustava za unošenje uzorka, kolone, detektora te sustava za obradu podataka. Na Slici 9 shematski je prikazan HPLC sustav.



Slika 9. Shematski prikaz HPLC sustava.[25]

2.4.1.1. Spremnik pokretne faze

Vrsta i sastav pokretne faze utječu na odvajanje komponenata. Prije upotrebe važno je degazirati otapalo jer se mali mjehurići plina prisutni u pokretnoj fazi mogu skupljati u drugim dijelovima uređaja, osobito u pumpama, koloni i detektoru i uništiti analizu. U pripremi pokretne faze važno je koristiti visoko pročišćene puferske soli i reagense, po mogućnosti HPLC − čistoće. Bilo kakve nečistoće prisutne u reagensu mogu dovesti do kromatografskih pogrešaka. Sitne čestice mogu se nakupiti u kapilari ili u koloni i izazvati

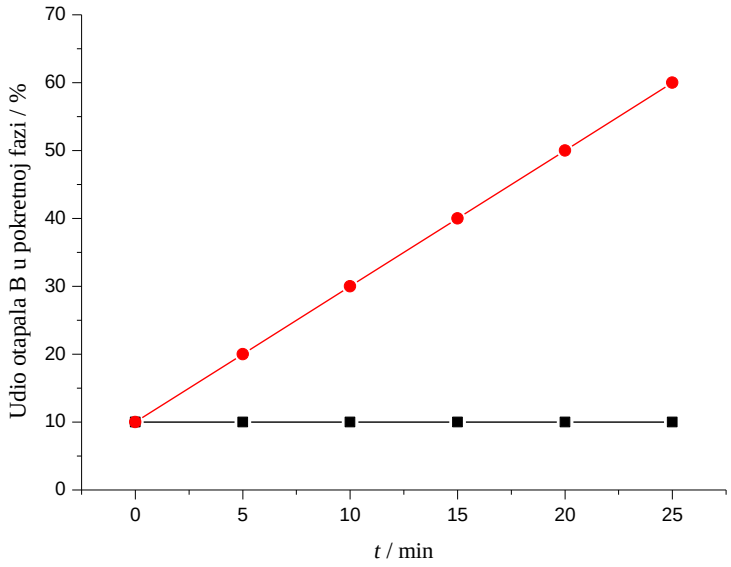
začepljenje (ometati protok pokretne faze) i porast tlaka. Pokretnu fazu potrebno je filtrirati prije upotrebe kako bi se uklonile sitne čestice.[24]

2.4.1.2. Pumpe

Pumpa u tekućinskom kromatografu omogućava potiskivanje pokretne faze u kromatografsku kolonu uz kontrolirani protok u rasponu od 0,1 do 10 mL min^{-1}. Zahtjevi kojima moraju udovoljavati pumpe u tekućinskom kromatografu vrlo su strogi: otpornost na tlak do 400 atm, nisko pulsiranje, precizan i točan protok pokretne faze, otpornost na koroziju izazvanu različitim otapalima, reproducibilnost i kontrolu protoka uz relativnu pogrešku manju od 0,5 %. Za primjenu u tekućinskoj kromatografiji prikladne su dvije vrste pumpi, ubrizgavajuća pumpa s klipom koja kod kontrolirane brzine unutar glatkog cilindra potiskuje pokretnu fazu i naizmjenična pumpa s jednim ili više prostora iz kojih se pokretna faza potiskuje pomoću naizmjeničnih klipova ili dijafragmi.[26]

Tijekom kromatografske analize pumpe mogu potiskivati različite sastave pokretne faze pa razlikujemo izokratne i gradijentne pumpe. Izokratne pumpe osiguravaju protok pokretne faze konstantnog sastava. Gradijentne pumpe osiguravaju protok pokretne faze promjenjivog sastava (upotreba dvije do četiri različite otopine). Razlikujemo dva tipa gradijentnih pumpi, binarne gradijentne pumpe, koje osiguravaju protok dvaju otapala i kvartarne gradijentne pumpe, koje osiguravaju protok četiri otapala.[27]

Najjednostavniji način odjeljivanja tekućinskom kromatografijom je izokratno eluiranje koje se često koristi u kontroli kvalitete. Međutim, često se bolji kromatogram dobije gradijentnim eluiranjem uz upotrebu dvije do četiri različite otopine čije se polarnosti, ionske jakosti i pH vrijednosti međusobno znatno razlikuju. Sastav pokretne faze mijenja se na unaprijed utvrđen način i to ponekad konstantno, a ponekad u nizu koraka. Gradijentno eluiranje često se koristi za analizu kompleksnih matrica i za razvoj metoda za analizu nepoznatih smjesa.[27]



Slika 10. Usporedba izokratnog eluiranja (■) i eluiranja linearnim gradijentom (●).[27]

2.4.1.3. Sustav za unošenje uzorka

Prvi i najjednostavniji način unošenja uzoraka bio je direktno ubrizgavanje injekcijskom špricom preko septuma. Međutim, takav način unošenja nije reproducibilan pa se najčešće koristi premosni injektor s petljom. Petlje se mogu mijenjati i različitog su volumena, od 5 µL do 500 µL. Uzorak se u petlju unosi injekcijskom špricom kroz šesterokanalni ventil. Za vrijeme punjenja petlje uzorkom, pokretna faza ne prolazi kroz petlju već se uvodi direktno u kromatografsku kolonu. Usmjeravanjem eluensa kroz napunjenu petlju uzorak se injektira u kolonu. Na taj način se uzorak unosi u kolonu pri visokom tlaku i bez prekida protoka pokretne faze.[18]

Uzorak se može u tekućinski kromatograf uvesti automatskim sustavom za injektiranje. Koristi se kada je potrebno analizirati veći broj uzoraka ili kada ručno injektiranje nije praktično. Viali se napune otopinom uzorka i stave u automatski injektor (uređaj za automatsko ubrizgavanje). Automatski injektor izmjeri određeni volumen uzorka i injektira ga.[24,27]

2.4.1.4. Kolona

Kolona je najvažniji dio tekućinskog kromatografa jer upravo ovdje dolazi do razdvajanja komponenti uzorka. Nepokretna faza, kojom je kolona punjena, razdvaja komponente uzorka koristeći razne fizikalne i kemijske interakcije. Sitne čestice unutar kolone uzrokuju visoki protutlak pri normalnim protocima stoga pumpa mora jako potiskivati pokretnu fazu kroz kolonu i ovaj otpor uzrokuje visoki tlak unutar kromatografa.

Za uspješnu analizu tekućinskim kromatografom ključan je odabir odgovarajuće kolone. Postoji nekoliko vrsta kolona za tekućinsku kromatografiju: analitička (unutarnjeg promjera (u.p.) 1,0 − 4,6 mm, duljine 15 − 250 mm), preparativna (u.p. > 4,6 mm, različitih duljina), kapilarna (u.p. 0,1 − 1 mm, različitih duljina) i nano (u.p. < 0,1 mm). Za izradu kućišta kolone koriste se različiti materijali, a najčešći su nehrđajući čelik, staklo (najčešće se koristi za biomolekule) i PEEK polimer koji je biokompatibilan i kemijski inertan prema većini otapala.[27]

Kolone su punjene poroznim česticama malog promjera. Materijali kojima se puni kolona najčešće su izrađeni od silikagela, aluminija i ionsko − izmjenjivačke smole. Najčešće veličine su 5 μm, 3,5 μm i 1,8 μm. Kolone se pune koristeći visoki tlak kako bi se osigurala njihova stabilnost tijekom upotrebe. Porozne čestice u koloni obično na svojoj površini imaju kemijski vezanu fazu koja je u interakciji s komponentama uzorka kako bi ih međusobno razdvojila.[27]

Ispred glavne kolone postavljaju se kratke predkolone kako bi se zaštitila glavna kolona i postiglo bolje razdvajanje sastojaka. Čestice nepokretne faze u tim kolonama su veličine 10 − 30 μm kako bi se izbjegao veći pad tlaka u sustavu kolona.[27]

2.4.1.5. Detektori

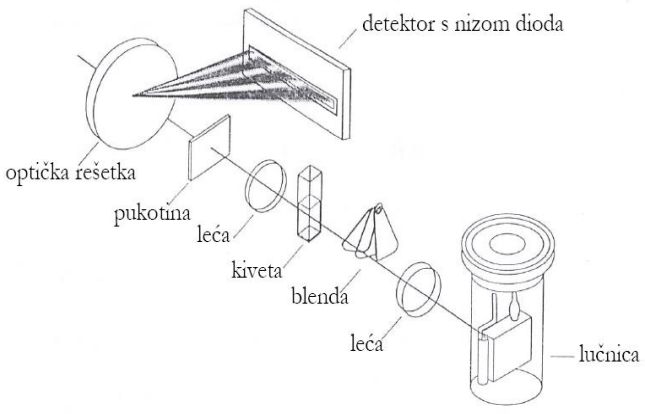
Odziv detektora u tekućinskoj kromatografiji proporcionalan je koncentraciji analita. Neke karakteristike dobrog detektora tekućinskog kromatografa su osjetljivost, linearnost, pouzdanost i jednostavnost korištenja. U tekućinskoj kromatografiji moguća je indirektna detekcija sastojaka bilježenjem promjena određenog svojstva pokretne faze (vodljivosti, indeksa loma, raspršenja svjetla) i detekcija sastojaka na temelju njihovih svojstava (apsorpcija UV zračenja, fluorescencija, elektrokemijske reakcije).[26]

Najzastupljeniji detektori u tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza su apsorpcijski, fluorimetrijski detektori i spektrometri masa.

Apsorpcijski detektori

Detekcija sastojaka apsorpcijskim detektorima temelji se na mjerenju apsorpcije UV i vidljivog svjetla u eluensu koji se po izlasku s kolone uvodi u protočnu kvarcnu ćeliju. Tipovi UV detektora su fotometar sa živinom lampom kao izvorom svjetlosti i filtrom koji propušta svjetlost određene valne duljine, fotometar s ugrađenom optičkom rešetkom ili prizmom što omogućava detekciju sastojaka pri različitim valnim duljinama i detektor s nizom fotodioda (engl. (*Photo)Diode array detector*, DAD*)* koji omogućava snimanje cijelog UV spektra analiziranog sastojka.[26]

Od fotometrijskih detektora posebno su dobri oni s nizom dioda. Uzorak se osvjetljava polikromatskim svjetlom D_2 – lučnice, a potom slijedi disperzija optičkom rešetkom na snopove 2 nm koji istodobno padaju na niz od otprilike 316 dioda. Naime, HPLC – DAD sustavi omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV–Vis području: apsorbancija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini.



Slika 11. Detektor s nizom fotodioda.

Fluorimetrijski detektori

Fluorimetrijski detektori prikladni su za detekciju sastojaka koji fluoresciraju pri čemu su oko 1000 puta osjetljiviji od UV–detektora. Kao izvori zračenja koriste se živina lampa ili ksenonov luk. Valne duljine pobude i emisije biraju se pomoću monokromatora ili se kao detektor upotrebljava spektrofluorimetar. Fluorimetrijskim detektorima mogu se detektirati i sastojci koji ne fluoresciraju ako se prethodno prevedu u fluorescirajuće derivate, primjerice s dansil kloridom ili 4-metilen-7-metoksikumarinom. Za derivatizaciju se najčešće koristi dansil klorid koji reagira s primarnim i sekundarnim aminima, aminokiselinama i fenolima praveći fluorescentne produkte.[26]

Spektrometar masa

Osnovni problem u povezivanju tekućinskog kromatografa sa spektrometrom masa je kako pri uvođenju tekuće pokretne faze protoka i do 1 mL min^{-1} održati potrebni vakuum u spektrometru masa. Stoga su razvijeni različiti međuspojevi koji omogućuju djelomično uvođenje tekuće faze u spektrometar masa i djelotvorno uklanjanje suviška otapala prije uvođenja analita u vakumirani sustav. Spektrometar masa detektira spoj koji se eluira s HPLC kolone, ionizira ga i mjeri masu ili fragmentira spoj u male dijelove (fragmente) koji su karakteristični za određeni spoj.[26]

2.4.2. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti upotrebljava se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu komponenti u uzorku. Kvalitativnom analizom identificiraju se pojedine komponente u uzorku. Najčešći parametar za identifikaciju spoja je retencijsko vrijeme (vrijeme potrebno uzorku da se eluira s kolone nakon injektiranja). Identifikacija spoja bazirana je na kemijskoj strukturi, molekulskoj masi ili nekim drugim molekularnim parametrima, a potvrđuje se standardom. Kvantitativnom analizom se mjeri količina komponente u uzorku (koncentracija). Postoje dva glavna načina interpretacije kromatograma, kvantifikacija pomoću visine kromatografskog pika mjerena od bazne linije, odnosno kvantifikacija pomoću površine pika. Da bi se kvantitativno procijenio spoj, uzorak s

poznatom količinom spoja koji nas zanima injektira se i mjeri se njegova visina ili površina pika. U mnogim slučajevima, postoji linearni odnos između visine ili površine pika i količine uzorka.

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti moguće je odrediti spojeve u tragovima čija je koncentracija jako niska (u mg L^{-1} ili niža). Analiza spojeva u tragovima je vrlo bitna za farmaceutska, biološka, toksikološka i ekološka ispitivanja osobito ako supstance u tragovima mogu biti štetne ili otrovne. U kromatogramu je vrlo teško razdvojiti ili detektirati spojeve u tragovima pa je potrebna vrlo visoka rezolucija separacije i vrlo osjetljivi detektori.[27]

Tekućinska kromatografija može se koristiti i za izolaciju određenih spojeva iz uzorka. Skupljanjem kromatografskih pikova na samom izlazu iz detektora i koncentrirajući spoj (analit) tako da se uklanja / ispari otapalo, čista supstanca može biti pripremljena za kasniju upotrebu, npr. organsku sintezu, klinička ispitivanja, toksikološka ispitivanja itd. Ova metodologija naziva se preparativna kromatografija.

2.5. Validacija analitičkih metoda

Validacija analitičkih metoda je postupak kojim se osiguravaju točni, precizni i reproducibilni rezultati tijekom dugoročnog korištenja metode. Također, validacijom se mogu utvrditi uzroci mogućih problema tijekom izvođenja metode čime se postiže veliki stupanj pouzdanosti i primjenjivosti metode. Osnovni parametri koji se ispituju tijekom validacije analitičke metode su selektivnost, specifičnost, linearnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, preciznost, točnost, radno područje i robusnost. Preciznost se može određivati na četiri razine kao preciznost mjerenja, preciznost pripreme (ponovljivost), međupreciznost i međulaboratorijska ponovljivost. Obzirom na namjenu metode validiraju se određeni parametri kao što je prikazano u Tablici 4.[28]

Tablica 4. Parametri validacije analitičkih metoda obzirom na namjenu. [28]

	Identifikacijski testovi	Analiza tragova		Sadržaj
		Kvantitativna	Limit test	
Specifičnost	Da	Da	Da	Da
Selektivnost	Da	Da	Da	Da
Linearnost	Ne	Da	Ne	Da
Granica detekcije	Ne	Ne	Da	Ne
Granica kvantifikacije	Ne	Da	Ne	Ne
Preciznost	Ne	Da	Ne	Da
Ponovljivost	Ne	Da	Ne	Da
Međupreciznost	Ne	Da	Ne	Da
Točnost	Ne	Da	Ne	Da
Radno područje	Ne	Da	Ne	Da

2.5.1. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost i selektivnost su svojstva metode da se specifično i selektivno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. U praksi se dokazuju usporedbom odziva metode na referentni materijal i analit u uzorku.[29]

Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit. Metoda kojom se može određivati više komponenata istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom. Selektivnost je nezaobilazan parametar za validaciju većine metoda. Kod kromatografskih metoda, osim usporedbe kromatograma referentnog materijala i uzorka, potrebno je dokumentirati i parametre koji određuju razdvojenost i simetriju pikova, a kod određenih metoda i prikupiti dokaze o čistoći pikova.[29]

2.5.2. Linearnost

Linearnost metode se određuje kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. U praksi se linearnost

određuje mjerenjem odziva detektora za poznate koncentracije referentnog materijala. Procjenjuje se matematički i grafički.

Matematički se preko linearne regresije izrazi jednadžba pravca ($y = ax+b$) i izračuna se koeficijent korelacije r. Nagib pravca (a) je parametar koji izravno ukazuje na osjetljivost metode. Odsječak pravca (b) može ukazivati na sustavnu pogrešku. Za koeficijent korelacije uobičajeno se postavlja kriterij $r \geq 0{,}99$.

Za vrlo niske koncentracije prihvaća se i kriterij $r \geq 0{,}98$. Najčešće se upotrebljavaju dva načina grafičkog prikaza. Grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije (za linearna područja odstupanja jednoliko raspoređena između pozitivnih i negativnih vrijednosti).[29]

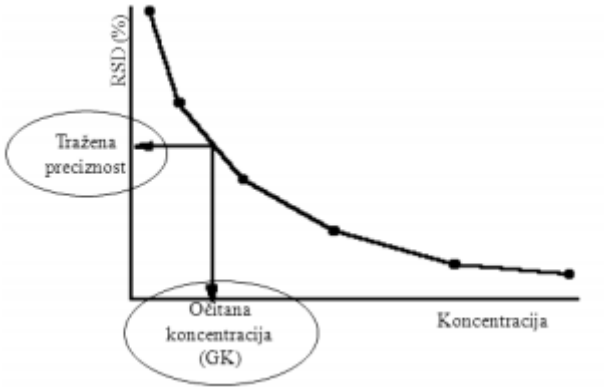
Grafički prikaz signala na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x logaritamske skale. Dobivena linija treba biti vodoravna u cijelome linearnom području, a područje linearnosti prestaje pri koncentracijama gdje linija relativnog odziva siječe paralelne linije koje odgovaraju 95 % ili 105 % koncentraciji.[29]

2.5.3. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije (LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati uz odgovarajuću točnost i preciznost. Procjena može biti vizualna, s pomoću omjera signal / šum ili statistička. Vizualno se određuje razrjeđivanjem otopine uzorka ili cijepljenjem otopine uzorka odgovarajućom količinom analita. Vizualna se procjena može primijeniti i kod neistrumentnih i instrumentnih metoda, a procjenjuje se najmanji signal koji se nedvojbeno može prepoznati. Omjer signal / šum može se primjeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom, a prihvatljiv je omjer 3:1. Statistički se granice detekcije (kao i kvantifikacije) mogu odrediti na bazi standardne devijacije signala i nagiba prema jednadžbi: $GD = 3{,}3\ \sigma / a$ pri čemu je a nagib, a σ standardna devijacija regresijskog pravca.[29,30]

Granica kvantifikacije (LOQ) je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Određuje se razrjeđivanjem otopine uzorka, ili cijepljenjem uzorka s odgovarajućom koncentracijom analita. Granica detekcije procjenjuje se pomoću omjera signal / šum, a prihvatljiv omjer je 10:1. Ako se zahtijeva da metoda ima zadanu preciznost na granici kvantifikacije, pripremi se više uzoraka poznate koncentracije u području oko moguće granice kvantifikacije. Svaki uzorak se izmjeri pet do šest puta i izračunaju se relativne standardne devijacije za svaku koncentraciju. Zatim se

grafički prikaže odnos relativne standardne devijacije prema koncentraciji i iz grafa odredi koncentracija na granici kvantifikacije s točno određenom preciznošću. U praksi se obično pripremi uzorak tako određene koncentracije i potvrdi preciznost višekratnim mjerenjem. Parametar granice kvantifikacije iznimno je važan kod metoda kojima se određuju analiti u tragovima koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i okoliš.[29,30]



Slika 12. Određivanje granice kvantifikacije sa zadanom preciznošću.[29]

2.5.4. Preciznost

Preciznost (engl. *precision*) pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Obično se provodi 5 − 6 mjerenja na 1 − 3 različite koncentracije. Izražava se kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Može biti iskazana kao ponovljivost, reproducibilnost i međupreciznost.[30]

a) Preciznost mjerenja je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument i laboratorij) u kratkom vremenskom periodu. Određuje se iz šest uzastopnih mjerenja koncentracije analita uz referentne standardne otopine. Odabere se koncentracija koja otprilike odgovara sredini radnog raspona i izračuna se relativno standardno odstupanje.[31]

b) Preciznost priprave (engl. *reproducibility*) je parametar koji nam opisuje preciznost dobivenu u istom laboratoriju pod propisanim, unaprijed određenim uvjetima (npr. metoda, uzorak koji se ispituje, analitičari, okoliš). Određuje se pripremom i analizom šest otopina istog uzorka i izračuna se relativno standardno odstupanje.[31]

c) Međupreciznost (engl. *intermediate precission, inter – day*) je odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka istom metodom pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti analitičar, instrument, kolona) kroz duže vremensko razdoblje. Pripremi se šest otopina istog uzorka na definirani način i otopine uzorka analizira drugi analitičar, na drugome uređaju, drugi dan. Ovim parametrom se ispituje hoće li metoda nakon razvoja davati iste rezultate tijekom uporabe uz promjene navedenih uvjeta.[31]

2.5.5. Točnost

Točnost pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. U tu svrhu napravi se analiza uzoraka poznate koncentracije i usporede se izmjerene i stvarne vrijednosti. Eksperimenti se provode nakon određivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti, najmanje tri puta za najmanje tri koncentracijske razine raspoređene unutar radnog područja metode.[29]

Točnost je mjera pouzdanosti analitičke metode. Može se ispitati na nekoliko načina. Jedan od njih je usporedba rezultata metode sa rezultatima druge metode koja je potvrđena kao točna. Točnost analitičke metode može se ispitati i analizom uzorka poznate koncentracije i usporedbom dobivene mjerene vrijednosti sa pravom, već poznatom vrijednosti. Ukoliko referentni materijali nisu dostupni, uzorak se može cijepiti sa poznatom koncentracijom analita.[31]

Nakon ekstrakcije analita iz matrice uzorka i injektiranja u analitički instrument, može se odrediti analitički povrat (engl. *recovery*) usporedbom odgovora analiziranog uzorka sa odgovorom standardnog referentnog materijala otopljenog u čistom otapalu. Ukoliko je validacija zadovoljavajuća, analitički povrat određen za različite koncentracije može se iskoristiti za korekciju konačnih rezultata. Odabrane koncentracije trebaju pokriti širok raspon koncentracija i trebaju se uzeti u obzir i one koncentracije blizu granice kvantifikacije kao i one na samom vrhu kalibracijske krivulje.[31]

Točnost se određuje analizom najmanje devet otopina uzorka na tri koncentracijske razine koje pokrivaju određeni raspon koncentracija. Izražava se kao postotak analitičkog povrata ili kao razlika između srednje i prihvaćene prave vrijednosti zajedno s intervalima pouzdanosti.[31]

2.5.6. Radno područje

Radno područje je raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, točnost i linearnost. Za određivanje tog parametra nije potrebno provoditi zasebne eksperimente, nego se zaključci izvode iz eksperimenata linearnosti, točnosti, preciznosti, granice detekcije i granice kvantifikacije.[29]

2.5.7. Robustnost

Robustnost se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. Ispitivanje robustnosti provodi se kako bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe metode utječu na rezultat analize. Najčešće se ispituju utjecaji promjene sastava i vrijednosti pH pokretne faze, temperature kolone i protoka pokretne faze.[29]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Za pripremu otopina korištene su sljedeće kemikalije:

Bisfenol A (≥ 99%, SigmaAldrich Co., St. Louis, USA), benzofenon (99 %, GC, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), acetonitril (AvantorPerformance Materials B.V., Deventer, The Netherlands), aceton (AvantorPerformance Materials, Gliwice, Poland), ultračista voda, metanol (AvantorPerformance Materials, B.V., Deventer, The Netherlands), pH standardi pH = 7,00 ± 0,02 i pH = 4,01 ± 0,02, Mettler – Toledo, Greifensee, Švicarska).

3.2. Pribor

PTFE filteri veličine pora 0,25 µl (Macherey − Nagel, Düren, Njemačka), PVC šprice (1 mL, HenkeSassWolf, Tuttlingen, Njemačka), automatski pipetori Pipet – Lite XLS, Rainin (Rainin, Švicarska), analitička kolona (Zorbax Eclipse XDB C18, 150 × 4,6 mm, 5µm I.D.) s predkolonom (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD).

3.3. Instrumenti

Tekućinski kromatograf HP 1100 sastavljen od gradijentne pumpe, automatskog injektora, termostatiranog prostora za kolonu i detektora s nizom fotodioda (Agilent Tehnologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD), tekućinski kromatograf HP1220 Infinity sastavljen od gradijentne pumpe, automatskog injektora, termostatiranog prostora za kolonu i detektora apsorpcije UV zračenja (Agilent Tehnologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD), ultrazvučna kupelj (Sonis4 Iskra, Pio d.o.o., Šentjernej, Slovenija), analitička vaga (Mettler Toledo d.o.o., Zagreb, Hrvatska), digitalni pH − metar MP220 (Mettler, Švicarska), centrifuga IO − 72 (Železniki, Slovenija).

3.4. Programi za upravljanje instrumentima i obradu podataka

ChemStation for LC, 3D Systems B.03.02-SR2 (Agilent Technologies, SAD), OpenLab CDS c.01.05 [35] (Agilent Technologies, SAD), Microsoft Office Excel 2007 (12.0.4518.1014) MSO (12.0.4518.1014) (Microsoft, SAD).

3.5. Uzorci

Za određivanje bisfenola A i benzofenona koristilo se petnaest uzoraka termokromnih boja različitih proizvođača te različitih načina sušenja. Svi uzorci korištenih termokromnih boja imaju oblik gušće ili rjeđe paste. U Tablici 5 navedena su imena uzoraka te njihovi proizvođači i načini sušenja.

Tablica 5. Uzorci termokromnih boja u kojima su određivani bisfenol A i benzofenon.

Uzorak	Proizvođač	Sušenje
Offset blue 1130 – 27 − 01	TMC[1]	Na zraku
Offset burgundy to blue CP6	CTI[2]	
Offset green to yellow CP45C		
Wet offset blue 45 °C		
Wet ofset magenta 31°C		
Sheetfed offset 1130 − 15 − 03 − 1		
Screen UV magenta 31 °C		UV
Screen UV blue 31 °C		
UV purple to pink CP31C		
Flexo UV aqua 15 °C green		
Flexo UV magenta 15 °C		
Screen UV red 31 °C		
UV orange to yellow FC12C		
Screen UV black 15 °C		
Sun chemical magenta room voda − UV	Sun Chemical	
Sun chemical blue (cold)		

[1]TMC = *Thermochromic Measurements Inc.,*
[2]CTI = *Chromatic Technologies Inc.*

3.6. Kromatografski uvjeti

Pokretna faza sastojala se od smjese ultračiste vode i acetonitrila. Koristilo se gradijentno eluiranje kao što je prikazano u Tablici 6. Brzina protoka pokretne faze bila je 1,0 mL min^{-1}, volumen injektiranja 5 μL, a temperatura kolone 30 °C. Analiti su detektirani pomoću DAD detektora odnosno UV detektora pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije od 226 nm za bisfenol A, odnosno 254 nm za benzofenon. Vrijeme analize bilo je 28 minuta.

Tablica 6. Uvjeti gradijentnog eluiranja pri analizi bisfenola A i benzofenona na koloni Zorbax Eclipse XDB.

***t* / min**	***φ*(A) / %**	***φ*(B) / %**
0	53	47
3	53	47
11	25	75
20	25	75
20,5	53	47
26	53	47

3.7. Priprema kalibracijskih otopina i uzoraka prema razvijenoj metodi

3.7.1. Priprema kalibracijskih otopina

U odmjernu tikvicu od 25 mL odvagano je oko 10 mg BPA i 10 mg BFN, dodano 15 mL metanola i stavljeno u ultrazvučnu kupelj 15 minuta. Nakon hlađenja odmjerna tikvica je nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Nazivna masena koncentracija radne otopine bisfenola A, odnosno benzofenona bila je 400 mg L^{-1}.

S1: 0,25 mL pripremljene otopine prebačeno je u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopunjeno otapalom (metanol/voda 1/1) do oznake. Nazivna koncentracija standardne otopine 1 iznosila je 4 mg L^{-1}.

S2: 0,5 mL izvorne otopine prebačeno je u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunjeno otapalom do oznake. Nazivna koncentracija standardne otopine 2 iznosila je 20 mg L^{-1}.

S3: 1,5 mL izvorne otopine prebačeno se u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunjeno otapalom do oznake. Nazivna koncentracija standardne otopine 3 iznosila je 60 mg L^{-1}.

3.7.2. Priprema uzoraka termokromnih boja

Oko 100 mg uzorka odvagano je u odmjernu tikvicu od 50 mL, dodano 30 mL metanola i stavljeno u ultrazvučnu kupelj na 120 minuta. Nakon hlađenja odmjerna tikvica se nadopunila vodom do oznake. Nakon stabilizacije taloga dobivene otopine uzoraka profiltrirane se u viale kroz PTFE filter veličine pora 0,22 μm.

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

3.8.1. Linearnost

Linearnost metode određena je pomoću tri radna standarda bisfenola A i benzofenona pripremljenih na sljedeći način: u odmjernu tikvicu od 50 mL odvagano je 20 mg bisfenola A i benzofenona. Tikvice su dopunjene do pola volumena metanolom i stavljene 10 minuta u ultrazvučnu kupelj. Kad su se otopine ohladile, tikvice su nadopunjene do oznake metanolom. Iz svakog radnog standarda napravljena su razrjeđenja kao što je prikazano u Tablici 7.

Tablica 7. Priprava otopina za validaciju linearnosti metode.

Oznaka	Nazivna koncentracija / mg L^{-1}	Priprema	
		V_{RS} / mL	V_{UK} / mL
S1	0,5	0,25*	1
S2	1	0,5*	1
S3	2	0,125	25
S4	4	0,25	25
S5	10	0,25	10
S6	20	0,5	10
S7	40	1,0	10
S8	60	1,5	10
S9	100	2,5	10

*Otopine S1 i S2 priređene su iz otopine S3.

Svaka od ovih otopina je analizirana i određena je površina ispod kromatografske krivulje. Nacrtan je baždarni dijagram iz kojeg je određen nagib pravca, odsječak i koeficijent regresije.

3.8.2. Preciznost

Preciznost priprave određena je mjerenjem šest zasebno pripremljenih otopina uzorka *Sun chemical blue cold*.

Međupreciznost je određena mjerenjem šest zasebno pripremljenih otopina uzorka *Sun chemical blue cold* koje je pripremio drugi analitičar i analizirao na drugome instrumentu, drugi dan i na drugoj koloni prema propisanoj analitičkoj metodi.

3.8.3.Točnost

Točnost metode ispitana je na tri koncentracijska nivoa. Točnost na visokoj i srednjoj koncentraciji ispitana je cijepljenjem uzorka *Sun chemical blue cold* koji već sadrži bisfenol A i benzofenon. Napravljeno je šest odvaga uzorka. Tri pripreme uzorka cijepljene su s 1,5 mL otopine bisfenola A koncentracije 400 mg L^{-1} i 4 mL otopine benzofenona koncentracije 400 mg L^{-1}, a tri s 5 mL otopine bisfenola A i 10 mL otopine benzofenona.

Točnost na niskoj koncentraciji ispitana je na tri zasebno pripremljene otopine uzorka *Wet offset blue 45 °C* koji ne sadrži bisfenol A i benzofenon. Uzorak je pripremljen prema propisanoj analitičkoj metodi i cijepljen s 2 mL kalibracijske otopine benzofenona koncentracije 100 mg L^{-1} i bisfenola A koncentracije 100 mg L^{-1}.

3.8.4. Granica kvantifikacije (LOQ)

Pripremljen je uzorak *Wet offset blue 45 °C* prema navedenoj analitičkoj metodi te je u vialu pomiješano 100 µL kalibracijske otopine benzofenona i bisfenola A, koncentracije 10 mg L^{-1} i 900 µL otopine uzorka *Wet offset blue 45 °C*. Konačna koncentracija analita u otopini bila je 1 mg L^{-1}. Uzorak je injektiran šest puta.

3.8.5. Granica detekcije (LOD)

Pripremljen je uzorak *Wet offset blue 45 °C* prema navedenoj analitičkoj metodi te je u vialu pomiješano 50 µL kalibracijske otopine benozofenona i bisfenola A, koncentracije 10 mg L^{-1} i 950 µL otopine uzorka *Wet offset blue 45 °C*. Konačna koncentracija analita u otopini je 0,5 mg L^{-1}. Uzorak je injektiran tri puta.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Odabir kromatografske tehnike i uvjeta za određivanje bisfenola A i benzofenona

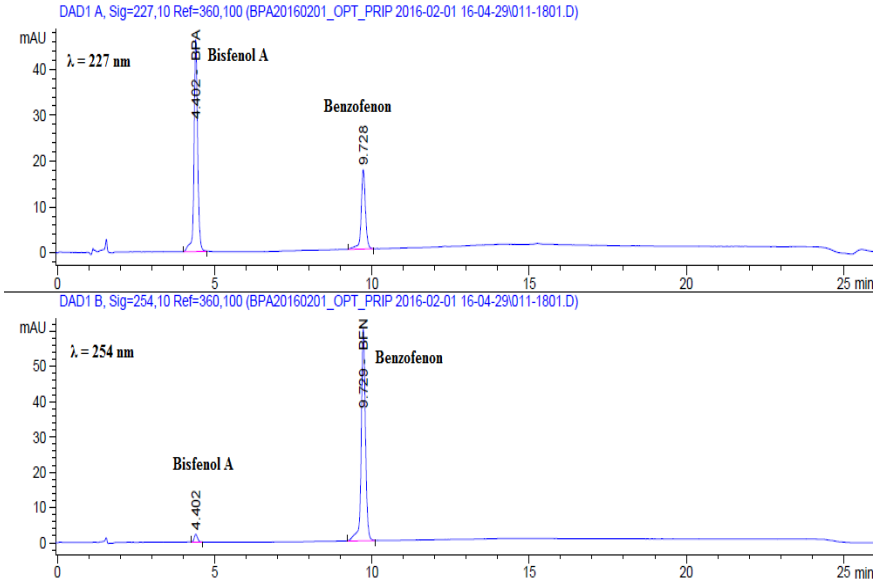
Obzirom na strukturu analita i podatke objavljene u brojnim radovima[15,32-34] analiti su određivani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti obrnutih faza u kojoj je pokretna faza polarnija od nepokretne faze. Kao pokretna faza koristila se smjesa vode i acetonitrila. Smjesa voda–acetonitril je odgovarajuća pokretna faza jer je p*K*a vrijednost bisfenola A visoka (pK_a = 9,6) pa su oba analita u nenabijenom obliku pri pH vrijednosti pokretne faze koja je nešto niža od 7. Odabrani protok pokretne faze od 1,0 mL min^{-1} je standardan za dane dimenzije kolone. Gradijentnim eluiranjem omogućena je dobra selektivnost u optimalnom vremenu. Valne duljine detekcije analita bisfenola A (λ = 226 nm) i benzofenona (λ = 254 nm) odabrane su obzirom na UV apsorpcijske maksimume. Temperatura kolone je malo iznad sobne temperature kako bi se mogla održati konstantnom tijekom analiza.

4.2. Validacija metode

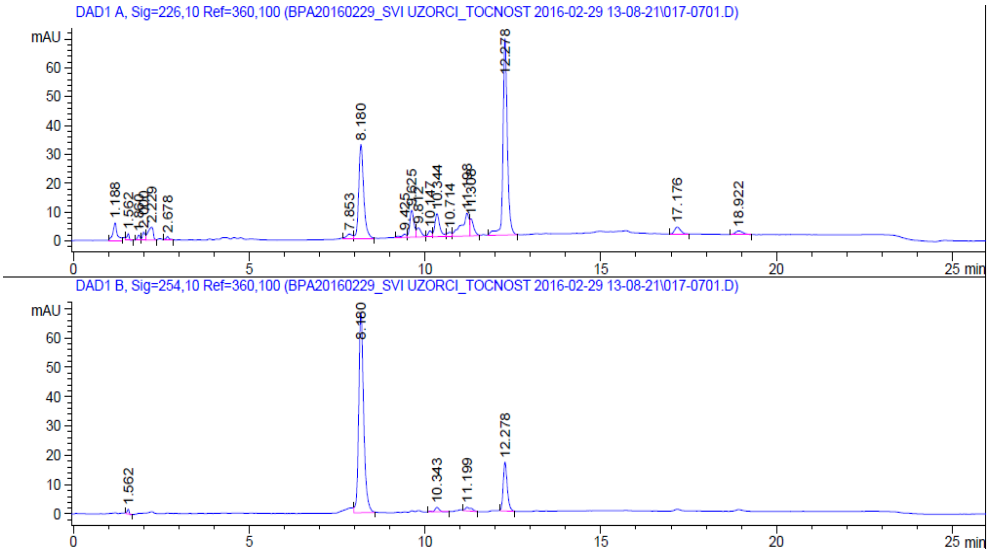
4.2.1. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost metode potvrđena je snimanjem apsorpcijskih UV spektara analita u otopini standarda i otopinama uzoraka. Potvrđeno je da se radi o spojevima s istim UV spektrima. Ovime je određen i apsorpcijski maksimum pri kojemu su analiti detektirani.

Selektivnost metode utvrđena je snimanjem kromatograma otopina uzoraka. Na mjestu eluiranja bisfenola A (t_R = 4,4 min) i benzofenona (t_R = 9,7 min) nisu uočeni pikovi koji bi ometali određivanje analita (Slike 13 i 14).



Slika 13. Kromatogrami standardne otopine bisfenola A i benzofenona (γ = 20 mg L^{-1}) snimljeni DAD detektorom pri 226 nm i 254 nm.

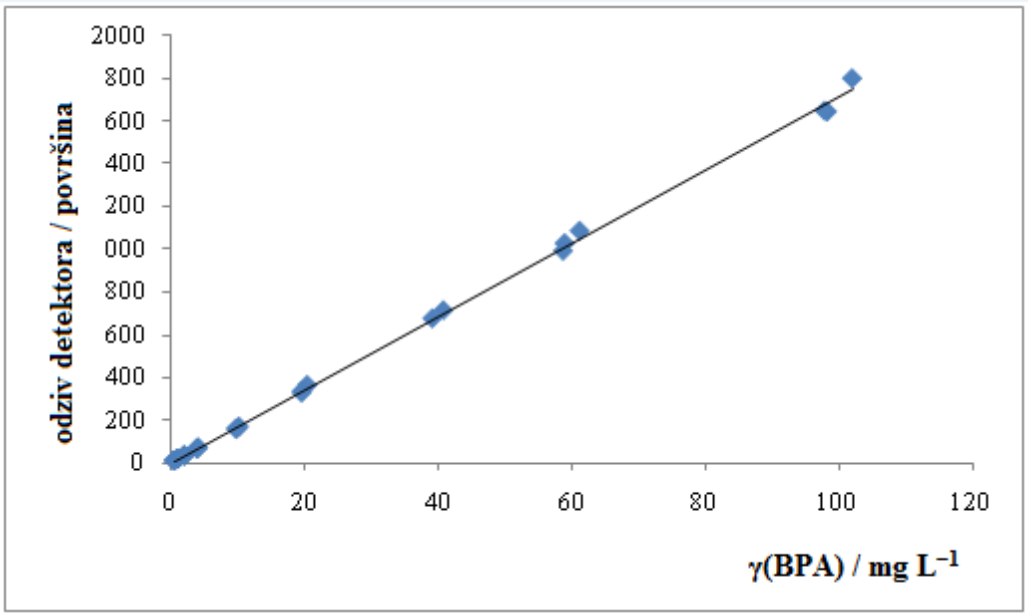


Slika 14. Kromatogrami uzorka termokromne boje *Screen UV blue 31* °C snimljeni DAD detektorom pri 226 nm i 254 nm.

4.2.2. Linearnost

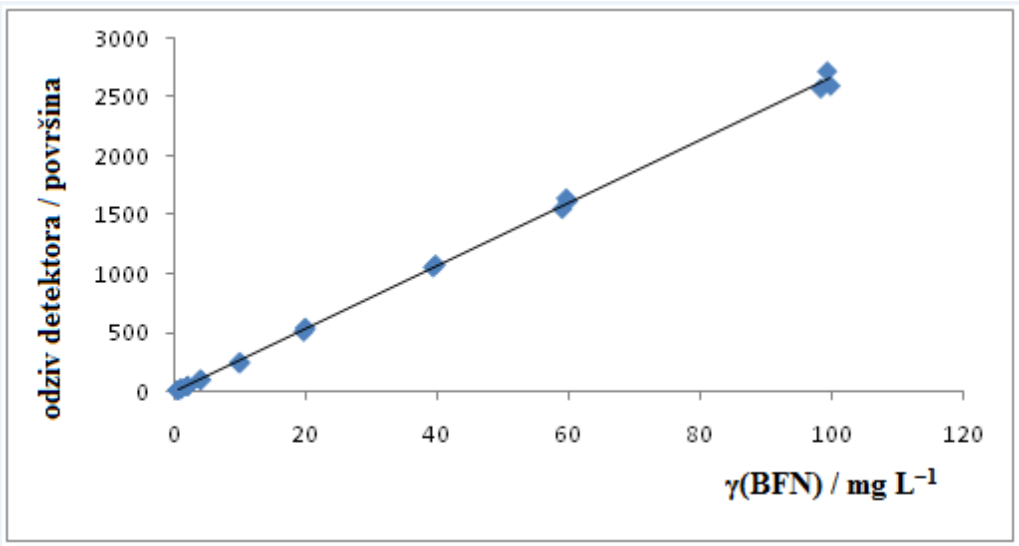
Linearnost metode određena je pomoću tri radna standarda bisfenola A i benzofenona iz kojih su napravljena razrjeđenja kao što je opisano pod 3.8.1. Svaka standardna otopina je

analizirana i određene su površine ispod kromatografske krivulje. Iz dobivenih površina nacrtan je baždarni dijagram iz kojeg je određen nagib pravca, odsječak i koeficijent regresije.



Slika 15. Linearnost odziva detektora za određivanje bisfenola A pri 226 nm.

Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca $y = 17{,}15\ x - 1{,}814$ iz koje je određen nagib pravca, $a = 17{,}15$ i odsječak $b = -1{,}814$. Metoda je linearna u zadanom području koncentracija od 0,5 do 100 mg L^{-1} uz koeficijent regresije od 0,999.



Slika 16. Linearnost odziva detektora za određivanje benzofenona pri 254 nm.

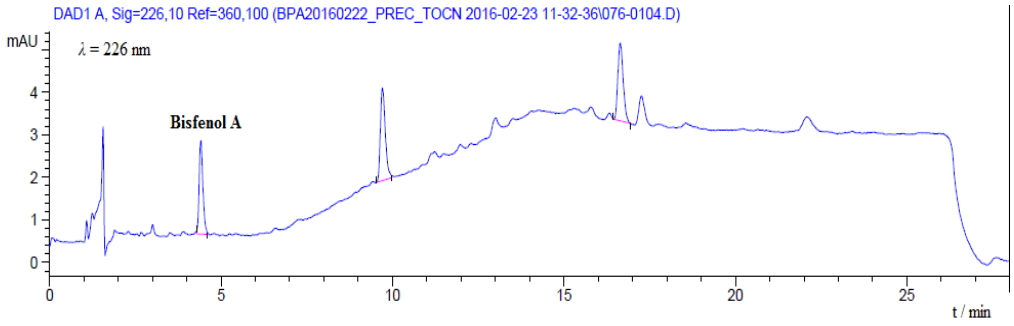
Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca $y = 26{,}73\ x - 4{,}117$ iz koje je određen nagib pravca, a = 26,73 i odsječak b = −4,117. Metoda je linearna u zadanom području koncentracija od 0,5 mg L^{-1} do 100 mg L^{-1} uz koeficijent regresije od 0,999. Može se zaključiti da je linearnost metode zadovoljavajuća u validiranom području.

4.2.3. Granica kvantifikacije i granica detekcije

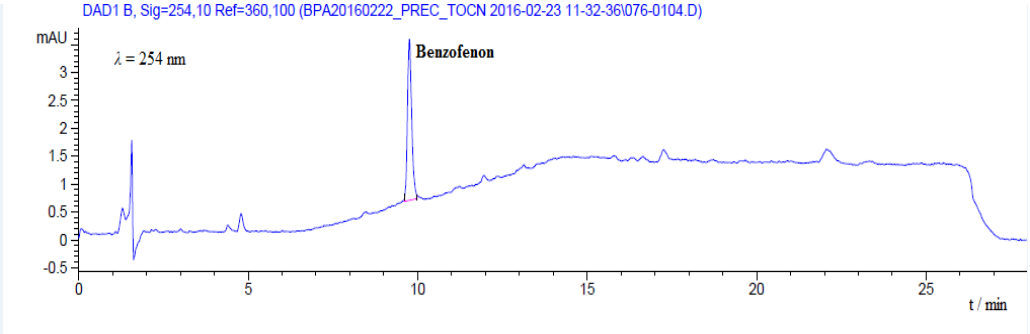
Granice kvantifikacije određena je na uzorku termokromne boje *Wet offset blue 45 °C* kako je opisano pod 3.8.4. Uzorak je injektiran šest puta, a LOQ je određen s pomoću omjera signal/šum. Prihvatljivi omjer *S/N* za granicu kvantifikacije je 10:1. U Tablici 8 prikazane su vrijednosti omjera *S/N* bisfenola A i benzofenona u određivanom uzorku.

Tablica 8. Vrijednosti omjera signala prema šumu bisfenola A i benzofenona u uzorku *Wet offset blue 45 °C* kojemu je dodano 1 mg L^{-1} bisfenola A i benzofenona.

Broj injektiranja	**Omjer signal/šum**	
	BPA	**BFN**
1	20	38
2	16	39
3	16	30
4	15	23
5	17	22
6	15	25
Srednja vrijednost	**17**	**30**
RSD / %	**1,9**	**7,5**



Slika 17. Kromatogram uzorka termokromne boje kojem je dodan bisfenol A u masenom udjelu jednakom granici određivanja pri 226 nm, γ(BPA) = 1 mg L^{-1}



Slika 18. Kromatogram uzorka termokromne boje kojem je dodan benzofenon u masenom udjelu jednakom granici određivanja pri 254 nm, γ(BFN) = 1 mg L^{-1}.

Za granicu kvantifikacije određene su vrijednosti od 1 mg L^{-1}za bisfenol A i 1 mg L^{-1} za benzofenon sa vrijednostima koje su i iznad zadovoljavajućih za *S/N* omjer u odnosu na kriterije. U ovoj metodi, s obzirom na visoku koncentraciju bisfenola A i benzofenona, niže granice kvantifikacije nisu bile potrebne.

Potvrda granice detekcije određena je na uzorku termokromne boje *Wet offset blue 45°C* kako je opisano u potpoglavlju 3.8.5. Uzorak je injektiran tri puta, a LOD je određen pomoću omjera signal/šum. Prihvatljivi omjer *S/N* za granicu detekcije je 3:1. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Omjer signala i šuma pikova bisfenola A i benzofenona u uzorku termokromne boje *Wet offset blue 45 °C* na granici kvantifikacije.

	BPA	**BFN**
γ **/ mg** L^{-1}	0,1	0,1
***w* / %**	0,005	0,005
S/N	2,8	3,5

4.2.4. Preciznost

Preciznost metode za određivanje bisfenola A i benzofenona određena je na dvije razine kao preciznost pripreme uzorka (ponovljivost) i međupreciznost.

a) Preciznost pripreme određena je analizom šest zasebno pripremljenih otopina uzorka *Sun chemical blue (cold)*. Uzorci su se pripremili prema propisanoj analitičkoj metodi,

očitale su se površine ispod kromatografske krivulje, te izračunala srednja vrijednost i relativno standardno odstupanje (*RSD*).

Rezultati su izraženi kao relativna standardna odstupanja masenih udjela bisfenola A i benzofenona u uzorku *Sun chemical blue (cold)* kako je i prikazano u Tablici 10.

Tablica 10. Preciznost pripreme uzorka termokromne boje *Sun chemical blue (cold)* za bisfenol A pri 227 nm i benzofenon pri 254 nm.

Uzorak	***w*(BPA) / %**	***w*(BFN) / %**
11 – 1	1,81	0,34
11 – 2	1,79	0,34
11 – 3	1,85	0,34
11 – 4	1,82	0,34
11 – 5	1,82	0,34
11 – 6	1,83	0,34
Srednja vrijednost	**1,82**	**0,34**
RSD / %	**1,06**	**0,90**

Dobivena vrijednost relativnog standardnog odstupanja za bisfenol A iznosi 1,06 %, odnosno 0,90 % za benzofenon. Dobivene vrijednosti za preciznost pripreme ukazuju na zaključak da je predložena HPLC metoda precizna.

b) Međupreciznost je određena analizom šest zasebno pripremljenih otopina uzorka *Sun chemical blue (cold).* Uzorke je pripremio drugi analitičar i analizirao na drugome instrumentu, drugi dan i na drugoj koloni prema propisanoj analitičkoj metodi. Analizirali su se dobiveni kromatogrami, očitale površine ispod kromatografske krivulje i izračunala srednja vrijednost i relativno standardno odstupanje (*RSD*).

U Tablici 11 prikazani su maseni udjeli bisfenola A i benzofenona u uzorku *Sun chemical blue (cold)* te izračunata srednja vrijednost, relativno standardno odstupanje i međupreciznost. Međupreciznost je izražena kao razlika rezultata dobivenih u eksperimentima ponovljivosti i međupreciznosti podijeljena srednjom vrijednošću oba eksperimenta.

Tablica 11. Međupreciznost pripreme uzorka *Sun chemical blue (cold)* za bisfenol A pri 227 nm i benzofenon pri 254 nm.

Uzorak	*w*(BPA) / %	*w*(BFN) / %
11 – 1	2,00	0,38
11 – 2	1,94	0,38
11 – 3	1,91	0,38
11 – 4	1,91	0,38
11 – 5	1,93	0,38
11 – 6	1,93	0,38
Srednja vrijednost	**1,94**	**0,38**
RSD / %	**1,79**	**0,29**
Međupreciznost / %	**6,38**	**11,11**

Međupreciznost za bisfenol A je 6,38 %, a za benzofenon 11,11%. Iz Tablica 10 i 11 vidljivo je da je razlika dobivene srednje vrijednosti kod ispitivanja ponovljivosti i međupreciznosti 0,12 % za bisfenol A, odnosno 0,04 % za benzofenon. Dobivene vrijednosti za međupreciznost ukazuju na zaključak da je predložena HPLC metoda pouzdana.

4.2.5. Točnost

Točnost metode za određivanje bisfenola A i benzofenona je određena na tri koncentracijska razine unutar radnog područja metode (Tablica 12 i 13). Točnost na visokoj i srednjoj koncentraciji ispitana je cijepljenjem uzorka *Blue (cold)* analitom, a točnost na niskoj koncentraciji ispitana je na tri zasebno pripremljene otopine uzorka *Wet offset blue 45 °C* uz cijepljenje s kalibracijskom otopinom bisfenola A i benzofenona kako je opisano u potpoglavlju 3.8.3.

Uzorci su podvrgnuti HPLC analizi, očitane su površine ispod kromatografske krivulje i izračunata je točnost kao omjer izmjerenog i dodanog masenog udjela bisfenola A i benzofenona (%).

Tablica 12. Točnost određivanja bisfenola A u uzorcima termokromnih boja *Blue (cold)* i *Wet offset blue 45 °C*.

Uzorak	$w(BPA)_D$ / %	$w(BPA)_A$ / %	Točnost / %
Blue (cold)	2,61	2,56	98
	2,60	2,58	99
	2,61	2,64	101
	4,20	4,25	101
	4,15	4,32	104
	4,13	4,25	103
Wet offset blue 45 °C	0,19	0,23	120
	0,19	0,22	117
	0,19	0,23	119
Srednja vrijednost			**107**
RSD / %			**8,7**

D = koncentracija analita u uzorku nakon cijepljenja sa standardnom otopinom

A = analizirana ili izmjerena vrijednost.

Tablica 13. Točnost određivanja benzofenona u uzorcima termokromnih boja *Blue (cold)* i *Wet offset blue 45 °C*.

Uzorak	$w(BFN)_D$ / %	$w(BFN)$ / %	Točnost / %
Blue (cold)	1,96	2,16	110
	1,93	2,13	110
	1,97	2,15	109
	4,84	5,12	105
	4,73	5,09	107
	4,70	4,89	104
Wet offset blue 45 °C	0,19	0,23	117
	0,19	0,23	116
	0,19	0,24	119
Srednja vrijednost			**111**
RSD / %			**4,73**

Rezultati dobiveni na niskom koncentracijskom području su manje zadovoljavajući od rezultata dobivenih na srednjem i visokom koncentracijskom području. Točnost određivanja je u rasponu od 98 do 120 % za bisfenol A, sa srednjom vrijednošću od 107 %, odnosno od 104 do 119 % za benzofenon sa srednjom vrijednošću od 111 %. Ovi rezultati pokazuju dobru točnost metode.

4.2.6. Robustnost

Robustnost metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama ispitana je malom promjenom kritičnih parametara kao što su temperatura kolone, protok i sastav mobilne faze koji mogu utjecati na razdvajanje analita i njegovu kvantifikaciju. Definirani optimalni uvjeti metode su: temperatura kolone 30 ºC, protok 1,0 mL min^{-1} i sastav mobilne faze opisan pod 3.6. U Tablici 14 prikazana su retencijska vremena bisfenola A pri 227 nm i benzofenona pri 254 nm i utjecaj promjene navedenih parametara na robustnost metode.

Temperatura kolone i protok mobilne faze varirani su za ± 10 %. Uočene promjene prihvatljive su za povećanje temperature kolone na kojoj se odvija eluacija, dok su promjene protoka i sastava mobilne faze uzrokovale veće promjene retencijskih vremena i ukazale na kritičan parametar razvijene HPLC metode pa treba obratiti pozornost na kontrolu ovih parametara.

Tablica 14. Utjecaj promjene kritičnih parametara na retencijska vremena bisfenola A i benzofenona.

Temperatura kolone / ºC	**Protok / mL min^{-1}**	**Sastav pokretne faze / %**		t_R**(BPA)**	t_R**(BFN)**
		φ**(Ultračista voda)**	φ**(Acetonitril)**		
27	1,0	53	47	4,5	9,8
30	1,0	53	47	4,4	9,7
33	1,0	53	47	4,3	9,5
30	0,9	53	47	4,9	10,4
30	1,0	53	47	4,4	9,7
30	1,1	53	47	3,9	9,0
30	1,0	57	43	5,2	10,9
30	1,0	53	47	3,9	9,4
30	1,0	49	57	3,2	7,6

4.2.7. Stabilnost

Ispitana je stabilnost kalibracijske otopine masene koncentracije γ = 20 mg L^{-1} bisfenola A i benzofenona i stabilnost otopina uzoraka (Tablice 15 i 16). Stabilnost kalibracijske otopine i otopine uzorka praćena je 288 sati (12 dana), a uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi. Rezultati stabilnosti su izraženi kao postotak površine analita u danom vremenu u odnosu na početnu površinu. Kao kriterij stabilnosti postavljeno je odstupanje od površine pika do 5 % u odnosu na početnu vrijednost.

Tablica 15. Određivanje stabilnosti standardne otopine koncentracije 20 mg L^{-1} tijekom 288 h pri sobnoj temperaturi.

***t* / h**	***P*(BPA)**	***P*(BFN)**	***S*(BPA) / %**	***S*(BFN) / %**
0	368	562	–	–
24	372	564	101	100
48	372	564	101	100
120	372	557	101	99
144	376	560	102	99
168	363	551	98	98
288	370	548	100	97

S = stabilnost, postotak površine analita u odnosu na početnu površinu.

Tablica 16. Stabilnost uzorka termokromne boje *Sun chemical magenta room voda – UV* tijekom 288 h pri sobnoj temperaturi.

***t*/h**	***P*(BPA)**	***P*(BFN)**	***S*(BPA) / %**	***S*(BFN) / %**
0	766	518	–	–
24	762	520	99	100
48	770	523	100	100
120	764	533	99	102
144	755	533	98	102
168	747	542	97	104
288	773	557	100	107

Iz dobivenih i očitanih površina ispod kromatografske krivulje može se zaključiti da je otopina uzorka stabilne tijekom tjedan dana, a otopina standarda i dulje, minimalno 12 dana.

4.3. Sažetak rezultata validacije

Linearnost metode ispitana je u radnom području od 0,5 do 100 mg L^{-1}. Rezultati linearnosti metode su zadovoljavajući na širokom području većem od dva reda veličine uz koeficijent regresije od 0,999.

Određena je granica kvantifikacije (LOQ) 1,0 mg L^{-1} za bisfenol A i 1,0 mg L^{-1} za benzofenon, što je zadovoljavajuće obzirom na visoku koncentraciju bisfenola A i benzofenona. Zbog toga nisu bile potrebne niže granice kvantifikacije. Određena je i granica detekcije (LOD) 0,5 mg L^{-1} za bisfenol A i 0,5 mg L^{-1} za benzofenon.

Preciznost metode ispitana je na dvije razine kroz preciznost pripreme i međupreciznost. Preciznost pripreme ispitana je analizom šest zasebno pripremljenih otopina uzorka termokromne boje i izražena je relativnim standardnim odstupanjem koje iznosi 1,06% za bisfenol A i 0,90% za benzofenon što nam ukazuje na dobru preciznost metode. Međupreciznost je određena mjerenjem šest zasebno pripremljeih otopina uzorka termokromne boje i izražena je kao razlika rezultata dobivenih u eksperimentima ponovljivosti i međupreciznosti podijeljena srednjom vrijednošću oba eksperimenta i za bisfenol A iznosi 6,4 %, a za benzofenon 11,1 % što ukazuje na to da je metoda pouzdana za korištenje u drugom laboratoriju.

Točnost metode ispitana je na visokoj, srednjoj i niskoj koncentraciji i pokazala je zadovoljavajuće rezultate.

Robustnost metode ispitana je nakon male promjene kritičnih parametara. Male promjene temperature nisu imale utjecaja na analizu, dok promjene brzine protoka i sastava mobilne faze jesu. Prilikom iduće analize potrebno je obratiti pažnju na njih jer bi veća promjena ovih parametara mogla imati znatnijeg utjecaja na analizu.

Ispitana je i stabilnost otopine uzoraka tijekom 288 sati (12 dana) te je iz dobivenih rezultata vidljivo da su otopine uzorka stabilne 7 dana (168 sati).

Provedeni postupci u svrhu validacije predhodno razvijene metode za kvantitativno određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama pokazali su da je ista prihvatljiva.

U Tablici 17 prikazani su parametri i rezultati validacije metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama. Kriteriji i zahtjevi za potrebnom osjetljivošću i točnosti su u skladu s namjenom razvijene metode.[35]

Tablica 17. Sažetak parametara i rezultata validacije metode za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim bojama.

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati validacije	
		Bisfenol A	**Benzofenon**
Linearnost	$r \geq 0{,}997$	$r = 0{,}999$	$r = 0{,}999$
Preciznost	Preciznost: RSD ≤ 5 % Međupreciznost ≤ 10 %	RSD = 1,06 % MP = 6,38 %	RSD = 0,90 % MP = 11,11 %
Točnost	Analitički povrat: (80−120) %	(98−120) %	(104−119) %
Granica kvantifikacije	$S/N \geq 10$ RSD ≤ 1 %	$S/N = 17$ RSD = 1,9 %	$S/N = 30$ RSD = 7,5 %
Granica detekcije	$S/N \geq 3$	$S/N = 2{,}8$	$S/N = 3{,}5$

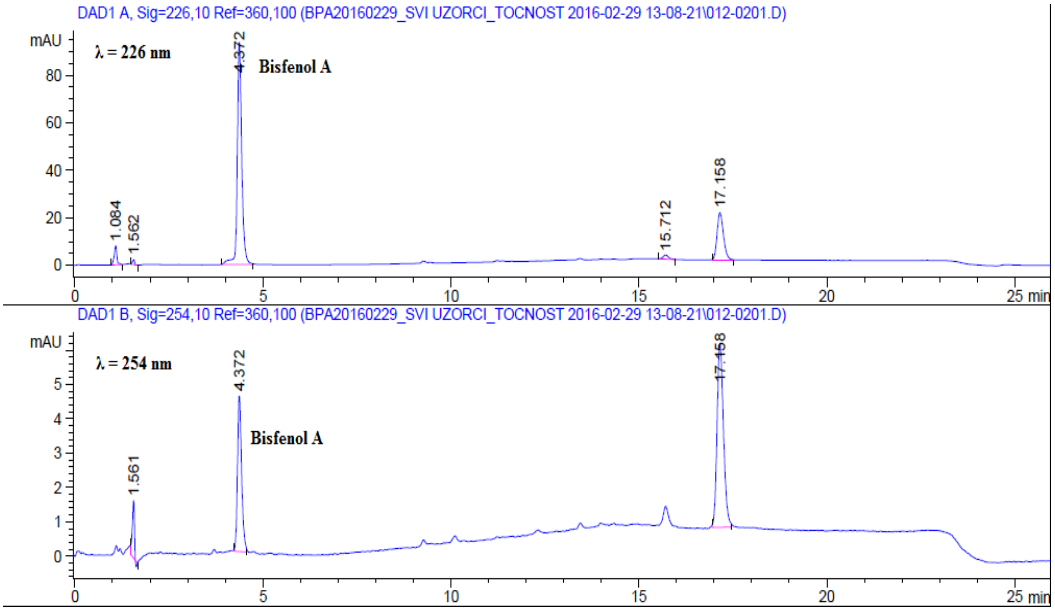
4.4. Analiza uzoraka termokromnih boja

Analizirano je 15 uzoraka termokromnih boja različitih proizvođača i različitog načina sušenja validiranom metodom za određivanje bisfenola A i benzofenona tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Nakon analize svih 15 uzoraka termokromnih boja i analize karakterističnih pikova bisfenol A je pronađen u tri, a benzofenon u dva uzorka. Rezultati su prikazani u Tablici 18.

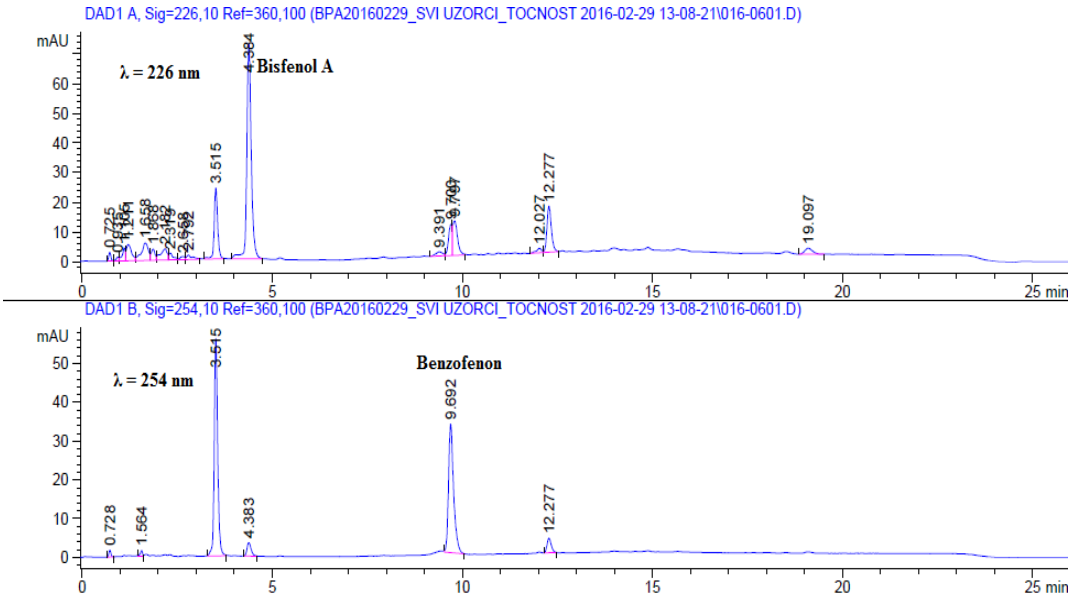
Tablica 18. Maseni udjeli bisfenola A i benzofenona pronađeni u uzorcima termokromnih boja.

Uzorak	Proizvođač	Sušenje	***w*(BPA) / %**	***w*(BFN) / %**
Offset blue 1130 – 27 − 01	TMC	Zrak	**1,88**	–
Sun chemical magenta room voda − UV	Sun Chemical	UV	**1,71**	**0,64**
Sun chemical blue (cold)	Sun Chemical	UV	**1,80**	**0,32**

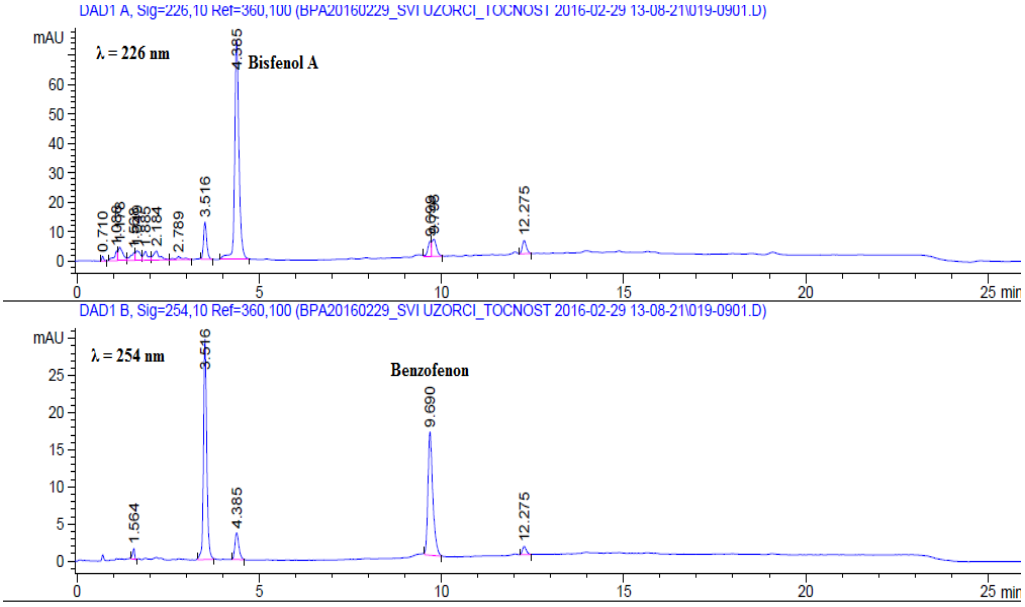
Na Slikama 19–21 prikazani su kromatogrami uzoraka termokromnih boja u kojima su detektirani bisfenol A i benzofenon.



Slika 19. Kromatogrami uzorka termokromne boje *Offset blue* snimljenih DAD detektorom pri 226 nm i 254 nm.



Slika 20. Kromatogrami uzorka termokromne boje *Sun chemical magenta room voda − UV* snimljeni DAD detektorom pri 226 nm i 254 nm.



Slika 21. Kromatogrami uzorka termokromne boje *Sun chemical blue (cold)* snimljeni DAD detektorom pri 226 nm i 254 nm.

5. ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu validirana je tekućinsko kromatografska metoda za određivanje endokrino aktivnih tvari bisfenola A i benzofenona u termokromnim tiskarskim bojama. Analiti su od ostalih sastojaka matrice odvojeni kromatografijom obrnutih faza te detektirani UV apsorpcijskom detekcijom.

Tijekom validacije metode specifičnost je potvrđena snimanjem apsorpcijskih UV spektara analita u standardima i uzorcima. Analizom kromatograma svih uzoraka, utvrđeno je i da je selektivnost metode zadovoljavajuća, tj. da nema interferirajućih pikova na vremenima zadržavanja bisfenola A i benzofenona. Ispitivanjem odziva detektora za oba analita u rasponu od 0,5 do 100 mg L^{-1} potvrđena je odgovarajuća linearnost metode. Preciznost priprave i međupreciznost ispitane su višestrukom pripravom odgovarajućih uzoraka i utvrđeno je da je preciznost priprave za bisfenol A 1,06 % te za benzofenon 0,90 %. Međupreciznost određivanja bisfenola A je 6,4 % dok je za benzofenon 11,1 %. Granice detekcije i određivanja nisu kritične za ovu metodu obzirom na koncentraciju analita, ali određene su i navedene u Tablicama 8 i 9. Točnost metode ispitana je na tri koncentracijska nivoa te je od 98 do 120 % sa srednjom vrijednošću 107 % za bisfenol A i od 104 do 119 % sa srednjom vrijednošću 111 % za benzofenon. U eksperimentu robustnosti potvrđeno je da manje promjene kromatografskih parametara kao što su temperatura kolone, sastav i protok pokretne faze ne utječu na efikasnost kromatografskog razdvajanja analita od ostalih komponenti matrice. Svi parametri validacije metode prikazani u Tablici 17 pokazali su da je metoda prikladna za određivanje bisfenola A i benzofenona u termokromnim tiskarskim bojama.

Validiranom metodom analizirano je 15 uzoraka termokromnih tiskarskih boja različitih proizvođača i načina sušenja. Bisfenol A je pronađen u tri uzorka dva proizvođača u masenoj koncentraciji blizu 2 %. Benzofenon je pronađen u dva uzorka istog proizvođača u koncentracijama od 0,64 % i 0,32 %. U skladu s teoretskim pretpostavkama, radilo se o bojama koje se suše pomoću UV zračenja.

Validacija ove metode omogućuje njenu daljnju pouzdanu primjenu za identifikaciju termokromnih boja koje sadrže endokrino aktivne tvari bisfenol A i benzofenon.

6. LITERATURNA VRELA

6. LITERATURNA VRELA

1. P. Baumfield, *Chromic Phenomena, The Technological Applications of Colour Chemistry*, The Royal Society of Chemistry Cambridge (2001), 33−36.
2. R. Kulčar, M. Klanjšeg Gunde, N. Knešaurek, *Acta Graphica* **23** (2012) 1−2, 25−36.
3. URL: http://www.bestmoodrings.com/blog/how-mood-rings-work (27.8.2016.)
4. URL: http://lumi.land/start/termo-pigment (27.8.2016.)
5. URL: http://www.trendhunter.com/trends/babys-bottle (27.8.2016.)
6. A. Seeboth, D. Lötzsch, *Thermochromic Phenomena in Polymers*, Shawbury:Smithers Rapra Technology Limited **17** (2008).
7. S. Periyasamy, G. Khanna, *Thermochromic colors in textiles*, Fibre2fashion, (2009) URL: http://www.fibre2fashion.com/industry-article/3059/thermochromic-colors-in-textiles?page=9
8. URL: http://www.fibre2fashion.com/industry-article/3059/thermochromic-colors-in-textiles?page=9 (4.8.2016.)
9. N. Abdullah, *Exp. Therm. Fluid Sci.* **34** (2010) 1089–1121
10. R. Kulčar, M. Friškovec, N. Hauptman, A. Vesel, M. Klanjšek Gunde, *Dyes Pigments* **86** (2010) 271−277.
11. URL: http://factsaboutbpa.org/benefits-applications/packaging-storage (16.8.2016.)
12. URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol_A#section=Top (16.8.2016.)
13. B. Šarkanj, D. Kipčić, D. Vasić-Rački, *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Hrvatska agencija za hranu, Osijek 2010., 181−183.
14. URL: http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160426a (18.8.2016.)
15. Xu-Liang Cao, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **35** (2012) 2795−2829.
16. S. S. Hu, Q. He, Z.F. Zhao, *Anal. Chim. Acta* **259** (1992) 305.
17. URL:https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-007.pdf (1.9.2016.)
18. URL: http://materijali.grf.unizg.hr/media/10_TB%20food%20contact.pdf (1.9.2016.)
19. T. Suzuki, S. Kitamura, R. Khota, *Toxicol. Appl. Pharm.* **203** (2005) 9−17.
20. A. Anadón, D. Bell, *The EFSA Journal* **1104** (2009) 1−30.
21. M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, *J. Chromatogr. B* **877** (2009) 298–302.
22. F. Vela-Soria, I. Jiménez-Díaz, R. Rodríguez-Gómez, *Talanta* **85** (2011) 1848–1855.

23. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999., 692−697.
24. F. A. Settle, *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, Prentice Hall PTR, Uper Saddle River, New Jersey, 1997, 147–160.
25. URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm (2.9.2016.)
26. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2006.
27. URL: http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf (15.10.2016.)
28. ICH Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Secretariat, 2006, http://www.ich.org (24.9.2016.)
29. URL: www.akreditacija.hr/agencija/casopis/11.pdf (1.9.2016)
30. G. A. Shabir, *JVT* **10** (2004) 210−218.
31. L. Huber, *Validation of Analytical Methods*, *Agilent Technologies*, Germany, (2011) 18−19.
32. J. L. Coughlin, B. Winnik, B. Buckley, *Anal. Bioanal. Chem.* **401** (2011) 995−1002.
33. I. Jimenez-Diaz, F. Artacho-Cordon, F. Vela-Soria, *Sci. Total Environ.* **562** (2016) 81−88.
34. L. Gao, J. Zu, H. Liu, *J. Sep. Sci.* **36** (2013) 1298−1303.
35. G. A. Shabir, *JVT* **10** (2004) 313−324.

7. PRILOZI

7.1. Popis kratica i simbola

ACN − acetonitril

BPA – bisfenol A

BFN – benzofenon

DAD − Detektor s nizom fotodioda (engl. *Diode Array Detector*)

EFSA − Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Agency)*

GC-MS – vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

GC − plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

HPLC − tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

u.p. – unutarnji promjer

IUPAC – (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry)*

LLE − ekstrakcija tekuće - tekuće (engl. *Liquid - Liquid Extraction*)

LC − tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography)*

LC-MS – vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometrija masa

LOD – granica detekcije

LOQ – granica kvantifikacije

MeOH − metanol

PTFE – politetrafluoretilen

RfD − referentna doza

S − standard

SPE − Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*)

SPME − Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*)

SFC − fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Chromatograph*)

TNT − trinitrotoluen

TLC − Termokromne boje na bazi tekućih kristala (engl. *Thermochromic liquid crystal ink)*

$\mathbf{T_A}$ – temperatura aktivacije

UV – ultraljubičasto (engl. *UltraViolet*)

US EPA – Američka agencija za zaštitu okoliša (engl. *US Environmental Protection Agency*)

7.2. Životopis

Rođena sam 26. listopada 1992. u Slavonskom Brodu gdje sam završila osnovnu školu i gimnaziju Matije Mesića, smjer: opći, 2011. godine. Iste godine upisala sam Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Godine 2014. upisala sam Diplomski studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta u Zagrebu, istraživački smjer; grane analitička i organska kemija.

Tijekom studija sudjelovala sam na znanstvenom skupu: ISE Satellite Student Regional Symposium on Electrochemistry, Zagreb, 2014. s prezentacijom:
M. Medvidović – Kosanović, T. Balić, M. Gavran, I. Grubeša,
Ispitivanje elektrokemijskih svojstava ((1E) – 1 – N - {[4 - (4 - {[(E) – N - (2 - aminofenil) karboksiimidoil] fenoksi}butoksi) fenil] metiliden} benzene - 1,2 - diamina uporabom cikličke i diferencijalne pulsne voltametrije.