

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IZBRANIH
UV FILTROV V BAZENSKIH VODAH KOPALIŠČ
NA OBMOČJU NOVE GORICE IN SLOVENSKE OBALE**

DIPLOMSKO DELO

Tjaša SIMČIČ

Mentor: prof. dr. Polonca TREBŠE

Nova Gorica, 2013

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Tjaša Simčič

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Polonci Trebše, ki me je vodila skozi raziskovalno delo in mi dala priložnost, da se preizkusim in samostojno delam v laboratoriju za raziskave Univerze v Novi Gorici. Zahvaljujem se tudi vsem mladim raziskovalcem in raziskovalkam ter asistentom in asistentkam, ki ste mi priskočili na pomoč, ko sem jo potrebovala. Hvala zaposlenim na Zavodu za zdravstveno varstvo Nova Gorica, dr. Marku Vudragu, za vse informacije s področja zdravja in pomoč pri izvajanju terenskega vzorčenja.

Zahvaljujem se prijateljicam in prijateljem, ki sem jih spoznala na fakulteti, ker me spodbujajo pri mojem delu. Hvala tudi mami Tatjani, bratu Klemnu in fantu Martinu, ker verjamete vame! Hvala tudi mojemu pokojnemu očetu Matiji.

POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo določevali prisotnost benzofenonov BP3 in BP4 ter njunih kloriranih produktov v kopalnih vodah (morje, bazeni). Omenjena benzofenona sta UV zaščitni sredstvi z imenom 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3) in 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kislina (BP4). Znana sta kot najpogosteje uporabljana UV zaščitna filtra predvsem v kozmetični industriji.

Raziskovalno delo smo pričeli z vzorčenjem kopalnih voda na višku kopalne sezone. Takrat smo pričakovali največjo gostoto kopalcev in tudi najvišjo koncentracijo iskanih spojin v kopalnih vodah. Po vzorčenju smo delo nadaljevali v laboratoriju, kjer smo vzorce ekstrahirali po postopku ekstrakcije na trdnem nosilcu, ekstrakte pa koncentrirali na rotavaporju in nato analizirali s HPLC-DAD metodo.

V šestih vzorcih kopalne vode smo ugotovili prisotnost UV filtra BP3 ter klorirana produkta 5-klorobenzofenon (5-Cl BP3) in 3,5-diklorobenzofenon (3,5-diCl BP3).

KLJUČNE BESEDE: UV filtri, benzofenon BP3, benzofenon BP4, bazenske kopalne vode, morske kopalne vode, HPLC analiza.

ABSTRACT

In the context of diploma project we were determining presence of benzophenone BP3 and BP4 and their chlorinated products in bathing waters (sea, pool). Benzophenones mentioned before are UV protective agent called 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP3) and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (BP4). They are known as the most commonly used UV protective filter especially in the cosmetics industry.

Research we started by sampling bathing water at the height of the bathing season. At that time we expected the highest density of bathers and the highest concentration of the compounds that we are looking in bathing waters. After sampling, we continued with work in the laboratory, where samples were extracted with solid phase extraction, extracts were concentrated on rotatory evaporator and then we analyzed samples by HPLC – DAD method.

In six bathing water samples we found out a presence of UV filter BP3 and chlorinated products 5-chloro benzophenone (5-Cl BP3) and 3,5-dichloro benzophenon (3,5-diCl BP3).

KEYWORDS: UV filters, benzophenone BP3, benzophenone BP4, pool bathing waters, sea bathing waters, HPLC analysis.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1. Namen in cilji naloge	2
2. TEORETIČNE OSNOVE.....	3
2.1. UV filtri	3
2.1.1. Fizikalno-kemijske lastnosti.....	3
2.2. Kozmetični in drugi potrošniški izdelki	5
2.2.1. Iz sončnih krem v človeško telo in v okolje	6
2.2.2. Vnos UV filtrov v okolje	7
2.2.3. Kemikalije v našem življenju.....	8
2.3. BP3	8
2.4. BP4	9
2.5. Kemijske analize	9
2.5.1. Metode za določanje UV filtrov.....	9
2.5.2. Koncentracije UV filtrov in protimikrobnih sredstev v vzorcih vode iz okolja 10	
2.5.3. Organski UV filtri in njihova fotorazgradnja, metaboliti in dezinfekcijski stranski produkti v vodnem okolju	11
2.6. Strupenost UV filtrov.....	12
2.7. Stabilnost UV filtrov v klorirani vodi in določanje halogeniranih stranskih produktov	14
2.8. Pomen pravilnega vzorčenja in analize	15
2.9. Vzorčenje kopalnih voda	18
2.9.1. Splošni podatki o kakovosti bazenskih kopalnih vodah	18
2.9.2. Vzorčenje morja	22
3. PRAKTIČNI (EKSPERIMENTALNI) DEL	24
3.1. Vzorčenje	24
3.2. MATERIALI IN METODE.....	28
3.2.1. Kemikalije in reagenti	28
3.2.2. Vzorčenje in priprava vzorcev	28
3.2.3. Ekstrakcija	29
3.4. Koncentriranje / Izparevanje	30
3.5. Analiza	30
3.6. Priprava raztopin	31
3.6.1. Določanje minimalnega volumna vzorca za analizo	31
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
4.1. Primerjava rezultatov meritev pri ekstrakciji različnih volumnov	34
4.2. Učinkovitost ekstrakcije	35
4.3. Umeritvene krivulje za posamezne spojine	37
4.3.1. Meja detekcije in meja kvantifikacije.....	39
4.4. Analiza vzorcev vode.....	39
5. ZAKLUČKI	46
6. VIRI	47
7. PRILOGA.....	51
7.1. Rezultati redčitev.....	51
7.2. Rezultati analiz vzorcev različnih koncentracij	53

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica 1: Učinek ekstrakcije (%) komponent iz različnih zmesi pri dveh koncentracijah (nad: 20 µg/L, pod: 2 µg/L). (Povzeto po: Cuderman in Heath, 2007)	11
Preglednica 2: Koncentracije (ng/L) UV filtra, benzofenon-3 (BP3) in protimikrobnih sredstev, najdenih v bazenih in odpadnih bolnišničnih vodah. (Povzeto po: Cuderman in Heath, 2007).....	11
Preglednica 3: Koncentracije izbranih organskih UV filtrov v okolju. (Povzeto po: Diaz-Cruz in sod., 2008)	12
Preglednica 4: Podatki o učinkovitosti analitskega postopka UV filtra BP3. (Povzeto po: Negreira in sod., 2008)	14
Preglednica 5: Razpolovni čas ($t_{1/2}$) izmerjen za BP-3 pod različnimi eksperimentalnimi pogoji. (Povzeto po: Negreira in sod., 2008)	14
Preglednica 6: Postopek priprave raztopin s $c=1$ mg/L	31
Preglednica 7: Priprava redčitev	31
Preglednica 8: Priprava vzorcev različnih koncentracij.....	32
Preglednica 9: Priprava dodatnih vzorcev BP3 in 3,5-diCl	33
Preglednica 10: Optimiziranje volumna vzorca za ekstrakcijo	34
Preglednica 11: Absorbance vzorcev morske vode v dveh paralelkah	40
Preglednica 12: Absorbance vzorcev bazenske vode v dveh paralelkah.....	41
Preglednica 13: Koncentracije iskanih spojin v vzorcih bazenske in morske kopalne vode.....	43

SEZNAM SLIK

Slika 1: BP3 (Povzeto po: Salvador in Chisvert, 2005).....	9
Slika 2: BP4 (Povzeto po: Salvador in Chisvert, 2005).....	9
Slika 3: Enoten postopek vzorčenja (Povzeto po: Bavcon, 2009).....	15
Slika 4: Deleži bazenov po vrsti bazena, Slovenija 2010 (Povzeto po: Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).....	19
Slika 5: Deleži bazenov po globini vode, Slovenija 2010 (Povzeto po: Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).....	19
Slika 6: Deleži bazenov po tipu polnilne vode, Slovenija 2010 (Povzeto po: Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).....	20
Slika 7: Vzorčna mesta (fotografija, Tjaša Simčič, 2011).....	28
Slika 8: Postopek ekstrakcije z vodno črpalko (fotografija: Tjaša Simčič, 2012)	29
Slika 9: Rotacijski vakuumski uparjevalnik (rotavapor) (fotografija: Tjaša Simčič, 2012)	30
Slika 10: Visokotlačni tekočinski kromatograf (HPLC) v laboratoriju na Univerzi v Novi Gorici (fotografija: Tjaša Simčič, 2012)	30
Slika 11: Primer detekcije signal spojine BP3 pri različnih koncentracijah	35
Slika 12: Primerjava absorbanc ekstrakcije BP3 v vodi in v acetonitrilu	36
Slika 13: Primerjava absorbanc ekstrakcije 5-Cl BP3 v vodi in v acetonitrilu	36
Slika 14: Primerjava absorbanc ekstrakcije 3,5-diCl BP3 v vodi in v acetonitrilu	37
Slika 15: Umeritvena krivulja spojine BP3 brez odstopajočih podatkov	37
Slika 16: Umeritvena krivulja spojine 3,5-diCl BP3 brez odstopajočih podatkov	38
Slika 17: Umeritvena krivulja absorbance redčin za spojino 5-Cl BP3.....	38
Slika 18: Umeritvena krivulja BP3 v slani vodi.....	38
Slika 19: Kromatogram retenzijskih časov za določitev spojin BP3, 5-Cl BP3 in 3,5-diCl BP3.....	40
Slika 20: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije BP3 v vzorcih morske kopalne vode.....	41
Slika 21: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije BP3 v vzorcu bazenske kopalne vode	42
Slika 22: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 3,5-diCl BP3 v vzorcih bazenske kopalne vode	42

1. UVOD

Ultravijolična (UV) svetloba, ki prihaja v glavnem od sonca, povzroča poškodbe na različnih bioloških kot tudi kemijskih materialih, ki so ji izpostavljeni. Predvsem gre tu za svetlobo valovnih dolžin 290–320 nm (UVB) in 320–400 nm (UVA). Fotoni UV svetlobe povzročijo trganje kovalentnih vezi in s tem inducirajo različne oksidacijske procese, ki so večinoma verižne radikalske oksidacije s kisikom. Ti procesi povzročajo staranje in preperavanje različnih konstrukcijskih materialov, premazov, plastike, gume itn. Posebno škodljivi pa so ti procesi v bioloških sistemih, kjer povzročajo poškodbe celic kože, kar ima za posledico pospešeno staranje kože in nastanek različnih obolenj, od raznih vnetnih procesov do raka (Giokas in sod., 2007).

Za zaščito pred UV svetlobo uporabljamo različne snovi, ki bodisi odbijajo bodisi absorbirajo UV svetlobo. Vedno bolj se uporabljajo tudi v sredstvih za osebno nego (npr. kreme za sončenje, mazila za ustnice, šamponi in pršila za lase), kar je posledica naraščajočega zavedanja o škodljivi izpostavljenosti soncu in posledično povečanega tveganja za obolenost za kožnim rakom (Lowe in sod., 1997).

Ker gre za dokaj široko spektralno območje, 400–290 nm (UVA in UVB), nobena spojina sama po sebi ne ustreza zaščiti v tem območju, saj so njihovi absorpcijski vrhovi precej ožji. Potrebna je kombinacija več spojin, da pokrijejo celotno območje. Po raziskavah o uporabi in učinkih starih in novih formulacij se seznam spojin, dovoljenih z zakonodajo, redno posodablja. Evropska unija (EU) trenutno dovoljuje 26 organskih snovi, nekatere druge spojine pa so dovoljene v določenih državah po svetu, na primer na Japonskem in ZDA, kjer pa jih obravnavajo kot biološke učinkovine, dosegljive brez zdravniškega recepta (Giokas in sod., 2007).

Narava in delež UV filtrne komponente v komercialnem pripravku določata zaščitni faktor (SPF), ki je pokazatelj učinkovitosti izdelka za zaščito pred soncem. Sredstva za zaščito pred soncem se vedno uporabljajo v kombinaciji, saj enoten UV filter, ki bo zagotavljal dovolj visok SPF, ne obstaja. Zaradi fotonestabilnosti in možnih sinergističnih učinkov mednarodne zdravstvene organizacije omejujejo njihovo kombiniranje (Serpone in sod., 2007).

Skupino organskih kemijskih filtrov lahko glede na spektralno območje, ki ga pokrivajo, razdelimo v dve skupini, in sicer prvo sestavljajo tako imenovani UVA filtri, v katero sodijo benzofenoni, antranilati in dibenzoilmetani, ter v skupino UVB filtrov, ki jih sestavljajo derivati 4-aminobenzojske kisline (PABA), salicilati, cinamati ter derivati kafe. Spojine, ki jih evropska skupnost uvršča med organske UV filtre kot sredstva za zaščito pred soncem, kažejo karakteristike persistentnih organskih onesnaževal (POP). Skupna značilnost vseh teh je prisotnost aromatskih spojin s stransko verigo in različno stopnjo nenasičenosti. (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009)

Seveda morajo biti UV filtri relativno stabilni, ko jih izpostavimo UV sevanju. Proizvode za zaščito pred soncem uporabljamo predvsem v posebnih pogojih, to je pri kopanju v morju, v bazenih, na snegu in v hribih, kjer potrebujemo zares temeljito zaščito. Vendar kar nekaj študij v zadnjem času kaže, da tudi te spojine razpadejo na svetlobi. Pretežno gre za dve vrsti reakcij: direktne fotolitske reakcije in kloriranje aromatskega obroča ali stranske verige, kar je posledica prisotnosti klora in kloriranega medija (na primer voda v bazenih, slana morska voda) (Diaz-Cruz in sod., 2008).

Podatkov o usodi teh spojin, ko se izperejo s kože in obleke ter preidejo v okolje, za večino kemikalij ni veliko. Prav tako ni podatkov o drugih virih kontaminacije, kot so na primer izpiranje s površine, izpostavljanje UV sevanju, poliranje avtomobilov in tekstilij. Ko pridejo omenjene kemikalije v vodno okolje, lahko tam povzročijo škodljive biološke učinke na vodne organizme, kot sta npr. strupenost in estrogenska aktivnost. Prav tako lahko škodljive učinke povzročajo tudi obdelane kemikalije ali vmesni produkti razgradnje (Diaz-Cruz in sod., 2008).

1.1. Namen in cilji naloge

Za potrditev dejanske prisotnosti omenjenih spojin v bazenskih vodah želimo v okviru diplomske naloge preveriti prisotnost izbranih UV filtrov (BP3, BP4 ter njunih kloriranih produktov) v bazenskih vodah kopališč na območju Nove Gorice ter slovenske obale.

V okviru diplomske naloge smo si zadali naslednje cilje:

- ugotoviti, katera klorirna sredstva se uporabljajo za dezinfekcijo bazenskih vod (s sladko in slano vodo) na Goriškem in na slovenski obali;
- z uporabo HPLC-DAD metode ugotoviti morebitno prisotnost BP3, BP4 ter njunih kloriranih produktov v vzorčevalni bazenski vodi na višku poletja, ko je največ kopalcev.

2. TEORETIČNE OSNOVE

2.1. UV filtri

2.1.1. Fizikalno – kemijske lastnosti

UV filtri so brez barve ali rumene spojine s skoraj ničelno absorpcijo vidnega sevanja, ampak s pomembno absorpcijo svetlobe v UVA (320-400 nm) in UVB (280-320 nm) območju. Te spojine kažejo nekaj lastnosti, ki so tipične za obstojna organska onesnaževala (POPs; persistence organic pollutants) (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009). Skupna značilnost vseh UV filtrov je prisotnost aromatskega obroča in stranske verige, ki izkazuje različne stopnje nenasičenosti. Nekateri UV filtri lahko obstajajo v različnih izomernih oblikah, vendar pa enantiomeri ne izkazujejo različnih fizikalno kemijskih lastnosti. Lahko pa se izomeri in enantiomeri razlikujejo v biološkem delovanju. Komercialni pripravki vsebujejo v glavnem geometrijske (E) izomere, čeprav nekateri UV filtri vsebujejo oboje, (E) in (Z) izomere. Zaradi njihove visoke lipofilnosti (večinoma z log Kow 4-8) in relativne stabilnosti pred razgradnjo se lahko akumulirajo v prehranjevalni verigi (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009).

UV filtri v kremah za sončenje in v kozmetičnih izdelkih varujejo kožo pred poškodbami in zaustavljajo škodljivo UV sevanje; nekateri filtri ščitijo pred UVB sevanjem pri 280-315 nm valovne dolžine, UVA pa nudijo zaščito pred valovnimi dolžinami v obsegu 315-300 nm. Ločimo dva osnovna tipa UV filtrov: organske in anorganske (Balmer in sod., 2004; Steinberg, 2000). Odboj in refleksijo dosežemo z dodajanjem anorganskih UV filtrov, to so mineralni mikrodelci (TiO_2 in ZnO), medtem ko so organski UV filtri odgovorni za absorpcijo sončnega UV sevanja (predvsem UVB sevanja) (Lowe in sod., 1997).

Organski ultravijolični (UV) filtri so torej spojine, ki jih uporabljamo za absorpcijo UV sevanja. Njihova uporaba je vedno večja, kar je rezultat osveščenosti o škodljivem učinkovanju UV sevanja in pojavnosti kožnega raka. Naraščajoča uporaba UV filtrov lahko poveča okoljsko onesnaženost in izpostavljenost preko prehranske verige. Obstaja torej skrb za okolje in skrb glede potencialnih učinkov organskih UV filtrov na različne organizme v okolju. Omenjene spojine se namreč uporablja v lepotnih kremah, sprejih za lase, šamponih in drugih izdelkih za osebno nego, nekatere dodajo plastiki in drugim materialom, da preprečijo razgradnjo polimerov in barvil (Diaz-Cruz in sod., 2008).

Leta 2000 je bilo v Evropi registriranih triindvajset UV filtrov za uporabo v sončnih kremah, vendar pa niso vsi enako komercialno pomembni (Steinberg, 2000). Večina teh snovi je prisotna v izdelkih, ki se prodajajo tudi v Sloveniji, in čeprav ni mogoče pridobiti ocen o dejanskih količinah uvoženih izdelkov za osebno nego, se je uporaba krem za zaščito pred soncem povečala in zaznati je trend v smeri uporabe izdelkov z višjim sončnim zaščitnim faktorjem (SPF > 20). Višji SPF pomeni višjo množino UV filtrov – običajno sta uporabljeni dve ali pa tudi več komponent za zaščito pred UVA in UVB sevanjem (Balmer in sod., 2004).

V evropski kozmetični direktivi je bilo leta 2007 dovoljenih 27 UV filtrov za komercialno uporabo. Od tega je 26 organskih UV filtrov in le eden je anorganski, to je titanov

dioksid. Kljub dostopnosti vseh substanc je le nekaj od njih spodbudilo raziskovalce, da so opravili okoljske in biološke študije. Študije so opravili glede na pogostost pojavljanja teh substanc v komercialnih izdelkih za zaščito pred soncem. Fizikalno-kemijske in okoljske lastnosti najbolj uporabljenih UV filtrov kažejo, da lahko različni dejavniki, procesi in mehanizmi povzročijo spremembe UV filtrov, ki se odražajo v okolju na različne načine. Poleg tega pa je po površinskem nanosu sončnih krem mogoča tudi absorpcija substanc skozi kožo ljudi. Podatki o faktorju bioakumulacije teh sestavin, ki so izračunani kot količnik koncentracije UV filtra v živih organizmih v primerjavi s tisto koncentracijo v vodi, kažejo, da izkazuje določena vrsta (kot na primer riba) močno težnjo k bioakumulaciji UV filtrov v njihovo maščobno tkivo (Giokas in sod., 2007).

Nekatere UV filtre, na primer benzofenone, se uporablja tudi za preprečevanje sprememb vonja in barve izdelkov, kot so parfumi in mila. Dodajanje teh filtrov omogoča proizvajalcem, da pakirajo izdelke v čisto, brezbarvno steklo ali plastiko. UV filtre se uporablja tudi kot dodatek plastiki in embalaži kot UV zaviralce in/ali sredstva za jačanje okusa (Cuderman in Heath, 2007).

Zaradi prisotnosti vse več kemikalij v človeškem okolju je bila sprejeta uredba Evropske unije pod imenom REACH, ki je začela veljati 1. junija leta 2007. REACH je kratica za Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals, po slovensko registriranje, vrednotenje in odobritev kemikalij. Z omenjeno uredbo si pristojni organi prizadevajo, da bi izboljšali varovanje človekovega zdravja in okolja pred tveganji, ki ga lahko predstavljajo kemikalije. Vzpodbuja pa tudi razvoj novih alternativnih metod za oceno nevarnosti snovi, s katerimi bi zmanjšali število poskusov na živalih (echa.europa.eu).

Načeloma uredba REACH velja za vse kemikalije, tako za tiste, ki jih uporabljajo v industrijskih postopkih, kot tudi za tiste kemikalije, ki jih uporabljamo v vsakdanjem življenju (čistila, barve, kozmetični izdelki, oblačila, pohištvo ...). Zato sprejeta uredba vpliva na skoraj vsa podjetja v Evropski uniji. To pa pomeni, da morajo podjetja delovati v skladu z uredbo, opredeliti in upravljati morajo s tveganji, ki so povezana s snovmi, ki jih proizvajajo ali z njimi upravljajo v območju EU. Evropski agenciji za kemikalije ECHA s sedežem v Helsinkih na Finskem morajo dokazati, da se in kako se snovi varno uporablja, uporabnike pa morajo poučiti oziroma jim posredovati ukrepe za obvladovanje tveganja, v kolikor do tega pride. Če tveganja ni mogoče obvladovati, pristojni organi omejijo ali prepovejo uporabo kemikalije in potrebno je najti alternativne, manj nevarne snovi (echa.europa.eu).

REACH uvaja jasn postopek o zbiranju in ocenjevanju informacij o lastnostih in nevarnosti snovi. Podjetja morajo snov, s katero želijo delati, registrirati in istočasno sodelovati z drugimi podjetji, ki uporabljajo to isto snov. Evropska agencija za kemikalije, največja agencija, ki ima nadzor nad vsemi kemikalijami, ki se lahko uporabljajo, prejema in ocenjuje skladnost registracij novih kemikalij. Ob vsaki novi snovi pa je potrebno, da države članice EU preučijo potencialne nevarnosti na zdravje ljudi in okolja. Oceniti pa je potrebno, ali je možno tveganje snovi obvladati, kar naredijo pristojni znanstveni organi ECHA. Dokler niso izpolnjeni vsi predpisi in pogoji, nevarna kemikalija ne sme na tržišče (echa.europa.eu).

2.2. Kozmetični in drugi potrošniški izdelki

Kozmetične izdelke za zaščito pred soncem bi lahko definirali kot »vsak kozmetični izdelek, ki vsebuje UV filtre v svoji formulaciji z namenom, da zaščiti kožo pred škodljivo UV svetlobo, da se izogne ali zmanjša škodo, ki jo lahko sevanje povzroči na zdravje ljudi« (Salvador in Chisvert, 2005).

Vrsto in razmerje UV filtrov vsakega komercialnega pripravka določa sončni zaščitni faktor (SPF) (National Toxicology Program), ki ga uporabljamo kot indikator učinkovitosti kreme za sončenje. Sredstva za zaščito pred soncem se vedno uporabljajo v kombinaciji, ker noben posamezni UV filter, ki se uporablja na ravni, ki so trenutno dovoljene z zakonodajo, ne zagotavlja dovolj visokega zaščitnega faktorja za zaščito pred soncem (Serpone in sod., 2007).

Da bi izboljšali človekovo zdravje in okolje ter ju varovali pred tveganji, ki jih predstavljajo kemikalije, je bila sprejeta Uredba Evropske unije, REACH. Kemikalij pa je vse več, saj se v EU zelo pospešuje konkurenčnost kemijske industrije. REACH z varovanjem okolja, kar se nanaša tudi na živali, pospešuje razvoj novih metod za oceno nevarnosti snovi, da bi bilo čim manj poskusov na živalih (echa.europa.eu).

V skladu z uredbo REACH je testiranje na vretenčarjih možno le v skrajnem primeru. Tako uporablja dva načina, s katerima ohranja najnižje možno število zahtevanih testov na živalih. Prvi je souporaba podatkov, drugi pa alternativne metode in pristopi. Souporaba podatkov temelji na tem, da se podatki testov, s katerimi ugotavljajo nevarne lastnosti kemikalij, čim več souporabljajo med registriranimi zavezanci. Souporaba rezultatov testov, ki so bili opravljeni na vretenčarjih, je obvezna. Takšne študije se ne smejo ponavljati. Alternativne metode in pristopi pa so rešitve, s katerimi nadomestijo teste na vretenčarjih, če se z njimi pridobi podatke, ki zagotovijo visoko raven varovanja zdravja ljudi in okolja. Podjetja v izogib testiranju snovi na živalih lahko uporabljajo obstoječe študije o živalih, ki so bile narejene pred sprejetjem uredbe REACH (echa.europa.eu).

Agencija ECHA (European Chemicals Agency) se mora strinjati s predlogom o izvedbi študije višje stopnje. Agencija preuči vse predlagane predloge za testiranje, ali je test primeren in ali bi se tako pridobili potrebni in zanesljivi podatki. Agencija povabi k sodelovanju tretje osebe, da posredujejo znanstveno veljavne informacije in študije, ki obravnavajo snov in tako preprečuje nepotrebno testiranje na živalih. Kadar pa so testiranja na živalih nujna, je potrebno upoštevati zahteve uredbe REACH, ki uveljavlja koncept »treh R« za uporabo živali – replacement, reduction, refinement oziroma nadomestitev, zmanjšanje in izboljšanje. To so vodilna načela pri testih, ki se izvajajo na živalih in prispevajo k zmanjševanju poškodb testnih živali (echa.europa.eu).

Predpogoj za večino postopkov REACH je identifikacija snovi, ki poteka v več postopkih (echa.europa.eu):

- Registracija: Podjetja, ki na leto proizvedejo ali izvozijo vsaj eno tono snovi, morajo zbrati informacije o lastnostih snovi in njihovi uporabi. Prav tako pa morajo izdelati oceno nevarnosti in možna tveganja, ki jih snov predstavlja.
- Evalvacija: Agencija ECHA in države članice EU pregledajo in ocenijo informacije, ki jih posredujejo podjetja za registracijo snovi. Preučijo dokumentacijo in predloge podjetij o načinu testiranja ter podajo mnenje ali snov predstavlja tveganje za zdravje ljudi ali okolja.

- Avtorizacija: Pri postopku avtorizacije je pomembno, da se zagotovi povečan nadzor ob morebitnih tveganjih, ki povzročajo veliko zaskrbljenost, ter da se te snovi postopoma zamenjuje z manj nevarnimi alternativami.
- Omejitev: Pa je zadnje orodje. To je orodje, ki se uporabi, ko pride do nesprejemljivega tveganja snovi na zdravje ljudi ali okolje. Omejitev pomeni omejitev ali odpoved proizvodnje nevarne snovi ter omejitev dajanja na trg ali uporabe snovi.

2.2.1. Iz sončnih krem v človeško telo in v okolje

Prepoznavanje škodljivih učinkov ultravijoličnega (UV) sevanja na kožo je sprožilo razvoj organskih kemikalij (s skupnim imenom UV filtri), ki lahko absorbirajo UV sevanje in ublažijo negativne učinke sončne svetlobe, katerim smo izpostavljeni. Raziskave, opravljene za ugotavljanje učinkovitosti UV filtrov, ki jih nanese na površino kože, so pokazale, da se postopno zmanjšuje UV zaščitna zmogljivost, ki je ni mogoče pripisati izključno (foto)razgradnji. UV filtri se lahko sistematično absorbirajo skozi površino kože ali pa se sprostijo med kopanjem in umivanjem (Giokas in sod., 2007).

Kozmetični izdelki za zaščito pred soncem se uporabljajo že približno 75 let. Glavne sestavine UV filtrov s kemijskega stališča navadno vsebujejo enega ali več aromatskih obročev, na katere so vezani z dvojnimi vezmi in različnimi substituenti, vsebujejo pa lahko tudi različne verige. Omenjene skupine izkazujejo sposobnost zmanjševanja prenosa fotonov svetlobe, ki dosežejo površino Zemlje. Bolj natančno, UV filtri absorbirajo fotone in se nato hitro vrnejo v osnovno stanje s toplotnim oddajanjem energije skozi serijo vibracijskih prehodov (vibracijsko sproščanje). Proces se ponovi in tako je koža zaščitena pred UV sevanjem (Kimbrough, 1997). Pri tem procesu lahko pride tudi do cepitve vezi oz. razgradnje UV filtrov. Danes na trgu lahko najdemo veliko pripravkov z različnimi sestavami, ki ponujajo zaščito pred obema tipoma sončnega sevanja (UVA 320-400 nm in UVB 280-320 nm) (Giokas in sod., 2007).

Načeloma so sončne kreme zasnovane za zunanjo uporabo najbolj izpostavljenih delov telesa in s tem najbolj izpostavljenih delov kože (Akiyama in sod., 1980). Opazanja, da sončne kreme lahko povzročijo nezaželene stranske učinke na koži (kot na primer kožne alergije) (Schauder in Ippen, 1997; Schinicit in sod., 1998) in da lahko prodrejo skozi kožo, so sprožile različne toksikološke raziskave. Predhodne raziskave na poskusnih živalih kažejo, da izkazujejo nekateri organski UV filtri pomembne učinke na hormone, na primer na estrogen ter hormone ščitnice, katerih delovanje je moteno. Razlike v hormonskih ravneh pri prostovoljcih po uporabi izdelkov za zaščito pred soncem, so bile primerljive z kontrolno skupino (Tinwellin sod., 2002; Schlumpf in sod., 2001; Schmutzler in sod., 2004; Janjua in sod., 2004). Vendar pa so v drugi raziskavi Schlumpf in sodelavci (Schlumpf in sod., 2008) v 75 % vzorcev človeškega materinega mleka našli ostanke številnih UV filtrov (največ je bilo benzofenona-3 (BP3); 125 ng/g maščob), kar lahko povzroči tveganje za prenos snovi na novorojenčka.

Trije glavni regulatorni sistemi, ki nadzorujejo in spremljajo kozmetične izdelke po vsem svetu, so European Union (EU) Cosmetics Directive (Direktiva o kozmetičnih izdelkih Evropske unije), United States (US) Food and Drug Administration (Upravljanje s hrano in zdravili Združenih držav Amerike) in zakonodaja Japonske (European Commission, 1976; US Food and Drug Administration; Japanese Ministry of Health and Welfare). Tako so tudi različne komponente kozmetičnih izdelkov, na primer v Evropi (European Commission, 1976), obravnavane kot kozmetični dodatki, medtem ko so v Združenih

državah Amerike (US Food and Drug Administration, 1999) klasificirane kot zdravila. Na Japonskem (Japanese Standard for Cosmetics Ingredients, 1985) pa jih imajo za kozmetične dodatke ali zdravila.

Veliko let je bila glavna skrb v zvezi z uporabo UV filtrov njihova učinkovitost pri blažitvi negativnih učinkov izpostavljenosti sončni svetlobi in manjšanje tveganja za ljudi. Pred kratkim pa se je pojavil še en pomemben vidik. Raziskave so pokazale, da se UV filtri lahko kopičijo v vodnem okolju, preko neposrednih in posrednih virov. Tipični primeri poti prenosa UV filtrov v okolje so, da so UV filtri v proizvodnem procesu dobili tržni obseg, njihova uporaba je obširna; UV filtri so v izdelkih za osebno nego in kozmetiko, katere nanašamo na kožo, s kopanjem (v morju, jezerih, bazenih ...) pa jih vnesemo v vodno okolje (Giokas in sod., 2007).

Na drugi strani pa skrb za čisto okolje in sprostitev sestavin iz sončnih krem v vodno okolje navaja tveganje zaradi izpostavljenosti neposrednega stika teh spojin in njihovih stranskih produktov s človeškim telesom. Raziskave so pokazale, da je vnos teh substanc in spojin v bazene (neposredni viri) zelo pomemben, predvsem odvisno od uporabe in pogojev (načina) vzdrževanja bazena (Lambropoulou in sod., 2002; Giokas in sod., 2004). Sončno sevanje lahko namreč vodi do nastajanja nekaterih stranskih produktov s še bolj škodljivimi učinki, kot so izvirne sestavine (Norwegian Radiation Protection Authority, 2000; Sakkas in sod., 2003).

2.2.2. Vnos UV filtrov v okolje

Kljub temu da je okoljskih poročil o zaščitnih sredstvih in njihovih koncentracijah, ki jih najdemo v sončnih kremah, malo, še posebej če število poročil in raziskav primerjamo z raziskavami ostalih onesnažil v okolju, se njihova prisotnost v okolju omenja že v zgodnjih 80. letih 20. stoletja, vendar tedaj prisotnosti UV filtrov v okolju še niso povezali z uporabo izdelkov za osebno nego (Akiyama in sod., 1980; Ahel, 1991; Zoeteman, 1981; Ehrhardt in sod., 1982; Ehrhardt, 1987). Ne glede na to so novejšje raziskave prepoznale pomembno vlogo izdelkov za osebno nego pri akumulaciji novih vrst organskih onesnaževal v vodno okolje, še posebej v vodi, namenjeni kopanju in rekreaciji. Izmerjene koncentracije so se razlikovale glede na lokacijo vzorčenja in intenzivnosti rekreacijske aktivnosti. Najvišje koncentracije so bile izmerjene med najbolj toplimi poletnimi dnevi, še posebej v večernih urah, ko je bil vnos sončnih krem največji in kot posledica povečanega sončnega sevanja ter izpostavljenosti (Giokas in sod., 2007).

Potencialni učinki v toksikološki klasifikaciji UV filtrov so bolj raznoliki, vendar se še vedno pojavljajo polemike v zvezi z njihovim toksikološkim vplivom, še posebej na vodne organizme. Starejša poročila o toksikoloških učinkih UV absorbiranih kemikalij povečajo skrb o možnih endokrinih hormonskih motnjah nekaterih sestavin (Schlumpf in sod., 2001) v koncentracijah, ki so v okviru drugih industrijskih kemikalij in so identificirane kot okoljski kseno-estrogeni. Kot je pokazalo že veliko raziskav, se lahko UV filtri pretvarjajo v okolju, kot posledica metabolne aktivnosti ali pri naravni poti razgradnje (hidroliza, fotorazgradnja). Tako je razumljivo, da je potrebnih več različnih metod za raziskave, glede na to, da nas ne zanimajo samo osnovne sestavine in snovi, pač pa tudi njihovi stranski produkti (Giokas in sod., 2007).

Velik del UV filtrov in protimikrobnih sredstev, ki se uporablja v izdelkih za osebno nego, na koncu vstopi v vodno okolje. Znana sta dva načina vstopa v vodno okolje (Cuderman in Heath, 2007):

- neposredni vnos v površinske vode, kot rezultat rekreativnih aktivnosti, na primer izpiranje iz kože med kopanjem ali plavanjem;
- in posredni vnos v površinske vode preko odpadnih vod, veliko je odplak iz bolnišnic in čistilnih naprav.

Posredne poti lahko vključujejo tudi odstranitev ostankov sončnih krem z drgnjenjem med tuširanjem in z ledvičnim izločanjem snovi, ki preidejo skozi kožo ali po zaužitju (kot rezultat nanosa šminke za ustnice) (Balmer in sod., 2004).

2.2.3. Kemikalije v našem življenju

Ljudje ob besedi kemikalije pomislimo na nevarnosti, znake nevarnosti (kot je lobanja, prekrizane kosti), epruvice, testne bučke, dojemamo jih kot nevarne snovi. To zasledimo tudi na slikovnem svetovnem spletu. Želimo jih celo izključiti iz svojega življenja. Vendar življenje brez kemikalij dejansko ni mogoče. Saj smo iz kemikalij sestavljeni ljudje, zemlja in svet okrog nas. Celo človeku najbolj strupene snovi so naravno prisotne v okolju. To so na primer arzenik in volčja češnja (echa.europa.eu).

Velikokrat se pojavi vprašanje, ali so kemikalije varne. Odgovor na to vprašanje ni enostaven. Pravi odgovor lahko dobimo le za vsako spojino posebej. Odvisno je od kemikalije in v kolikšni meri ji je človek izpostavljen. V velikih količinah je tudi voda nevarna za človekovo zdravje, pa čeprav brez nje življenje, ne bi bilo mogoče. Medtem ko so že zelo majhne količine drugih snovi (npr. cianida) lahko usodne za zdravje. Tako govorimo o pojmu tveganja. To je odvisno od intrinzične nevarnosti kemikalije in od izpostavljenosti tej kemikaliji (količini in obdobju izpostavljenosti) (echa.europa.eu).

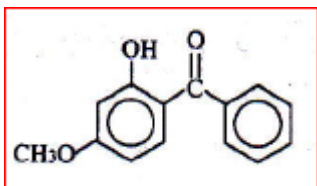
EU je vodilna v svetu na področju varnejših kemikalij. Cilji uredbe REACH in uredbe o razvrščanju, označevanju in pakiranju v Evropski uniji so (echa.europa.eu):

- zagotoviti, da podjetja, ki se ukvarjajo s kemikalijami, jih uvažajo ali proizvajajo podajo nazorna pojasnila in zagotovijo informacije o lastnostih kemikalij;
- zagotoviti, da v zgornji alineji omenjena podjetja podajo pojasnilo, kako se snov uporablja in kdo ji bo najverjetneje izpostavljen;
- nadzorovati tveganje, ki ga predstavljajo najnevarnejše kemikalije za zdravje ljudi in okolje, tako da se zmanjša količina kemikalij, ki smo jim izpostavljeni;
- zagotoviti, da so nevarne snovi razvrščene ter vključene v popis na spletnih straneh agencije ECHA in so javno dostopne ter da so izdelki, ki vsebujejo te snovi dobro označeni in pravilno pakirani, da jih uporabniki lahko varno uporabljajo;
- zagotoviti, da se uporaba najnevarnejših kemikalij sčasoma opusti.

2.3. BP3

INCI poimenovanje (Mednarodna nomenklatura za kozmetične izdelke): Benzofenon-3
 Kemijsko poimenovanje: 2-Hidroksi-4-metoksibenzofenon (*oksibenzon*)

C_{max} (%) (najvišja dovoljena koncentracija v kozmetiki (% m/m)): 10 % (Salvador in Chisvert, 2005).



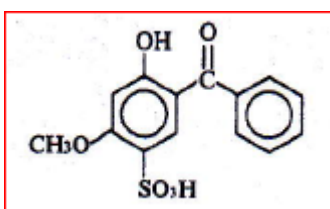
Slika 1: BP3 (povzeto po: Salvador in Chisvert, 2005)

BP3 je UV filter, ki se ga najpogosteje proučuje zaradi njegovega vpliva na presnovo (Okereke in sod., 1994; Okereke in sod., 1993). BP3 se presnavlja v prisotnosti citokroma P-450 v spojine, ki se uporabljajo, kot sredstva za zaščito pred soncem (Ingelman-Sundberg in Hagbjork, 1982). Njegove aromatske hidroksilirane metabolite so identificirali v človeškem urinu (Flex in sod., 1998), prav tako pa so proste in vezane oblike BP3 metabolitov določili v tkivih (v jetrih, vranici in srcu) in v bioloških vzorcih (kot na primer v urinu in blatu) (Okereke in sod., 1993).

2.4. BP4

INCI poimenovanje (Mednarodna nomenklatura za kozmetične izdelke): Benzofenon-4
 Kemijsko poimenovanje: 2-Hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kislina in njeno natrijeva sol (*sulisobenzon*)

C_{max} (%) (najvišja dovoljena koncentracija v kozmetiki (% m/m)): 5 % (kot kislina) (Salvador in Chisvert, 2005)



Slika 2: BP4 (povzeto po: Salvador in Chisvert, 2005)

Poleg BP3 in BP4 so najbolj pogosto uporabljeni UV filtri še 4-metil-benzildien-kafra (4MBC), 2-etil-heksil-4-trimetoksicinamat oziroma etilheksil-metoksicinamat (EHMC) in oktokrilen (OC).

2.5. Kemijske analize

2.5.1. Metode za določanje UV filtrov

Najbolj uporabljena in razširjena analitska metoda za kvantitativno določanje UV filtrov je tekočinska kromatografija (LC). Sledijo druge kromatografske tehnike, kot so na primer tankoplastna kromatografija (TLC) in plinska kromatografija (GC). Molekulska spektroskopija in elektrokemijsko določanje UV filtrov sta metodi, ki se ju uporablja zelo redko. Atomska spektroskopija, kot na primer plamenska atomska absorpcijska spektroskopija, atomska emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo in fluorescenco z rentgenskimi žarki, pa se uporabljajo predvsem za določanje anorganskih UV filtrov (Salvador in Chisvert, 2005).

2.5.2. Koncentracije UV filtrov in protimikrobnih sredstev v vzorcih vode iz okolja

Dostopni podatki o koncentracijah UV filtrov v okolju so omejeni, še posebno ni podatkov o koncentracijah omenjenih spojin v vzorcih zemlje. Podane koncentracije močno nihajo kot posledica vzorčnega mesta, velikosti zajetega sistema, ki ga zajema študija (na primer jezera, bazeni), letnega časa in ure v dnevnu (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009). V vodnem okolju najvišje izmerjene in objavljene koncentracije korelirajo s časom vzorčenja, kar pomeni, da je ujemanje največje pri vzorčenjih v večernih urah toplih poletnih dni. V naravnih vodah se najbolj pogosto zazna BP3, ki je v kremah za zaščito pred soncem, s koncentracijskimi vrednostmi v obsegu 2-125 ng/L (Giokas in sod., 2004, Giokas in sod., 2005, Lambropoulou in sod., 2002, Balmer in sod., 2005). Jezera in reke so bili po raziskavi najmanj onesnaženi, s koncentracijami UV filtrov v obsegu 19-125 ng/L (Cuderman in Heath, 2007; Jeon in sod., 2006). V bazenih pa je bila koncentracija UV filtrov višja, in sicer 330 ng/L za 4-MBC in 400 ng/L za BP3 (Cuderman in Heath, 2007). Še višje koncentracije BP3 (0,45-5,61 µg/L) so zaznali v neobdelani pitni vodi v Kaliforniji, v Združenih državah Amerike (Lorraine in Pettigrove, 2006). V surovi odpadni vodi so bile te snovi v koncentracijah v območju 0,4-5,6 µg/L (Lorraine in Pettigrove, 2006; Balmer in sod., 2005). V odpadnih vodah iz čistilnih naprav so bile izmerjene koncentracije UV filtrov v obsegu 0,001-2,7 µg/L (Balmer in sod., 2005).

Za Slovenijo so objavljeni podatki o ostankih farmacevtskih izdelkov v vodah, kjer so delno vključene tudi nekatere spojine, ki so sestavine izdelkov za osebno nego (Kosjek in sod., 2005). Za oceno količine UV filtrov in protimikrobnih sredstev v slovenskih vodah so v raziskavi vzorčili rekreativne vode (avgust 2004) in odpadne vode (januar 2005). Po končanem vzorčenju so pH vodnih vzorcev prilagodili na pH 3 z dodajanjem razredčene HCl in vzorce prefiltrirali skozi celulozne filtre (velikosti por 0,45 µm), da bi se izognili mašenju SPE (solid phase extraction) vložkov (cartridges) z drobci snovi. Zavedali so se, da lahko s filtriranjem vzorcev potencialno odstranijo tudi frakcije izdelkov za osebno nego, ki so se absorbirali na drobce snovi. Vzorci so bili do analize shranjeni v temi pri temperaturi 4 °C (Cuderman in Heath, 2007).

V nadaljevanju raziskave sta avtorici najprej določili, kolikšna je učinkovitost ekstrakcije iskanih snovi, kar je prikazano v Preglednici 1 in nato še koncentracije, ki so prisotne v okolju - rezultati so podani v Preglednici 2. Nižji odstotek ločbe iz vod v naravnem okolju je lahko rezultat izgube spojin zaradi konkurenčnih reakcij (Cuderman in Heath, 2007). Glede koncentracij pa je bilo pričakovati prisotnost UV filtrov v večini vzorcev, ker so bila vzorčna mesta na priljubljenih rekreacijskih lokacijah na višku sezone. Najbolj pogosto zaznan UV filter je bil BP3. Ne da pa se določiti najbolj pogosto uporabljenega UV filtra, ker na embalažah izdelkov ni podana količina UV filtrov in informacije glavnih slovenskih proizvajalcev niso na voljo. Sestavine UV filtrov pa niso bile zaznane v vzorcih odpadnih vod, najverjetneje zaradi vzorčenja, ki je potekalo v zimskem obdobju (leta 2005), ko se v centralni Evropi uporaba izdelkov z vsebnostjo UV zaviralcev zmanjša (Cuderman in Heath, 2007).

Preglednica 1: Učinek ekstrakcije (%) komponent iz različnih zmesi pri dveh koncentracijah (nad: 20 µg/L, pod: 2 µg/L) (povzeto po: Cuderman in Heath, 2007)

	BP3	Triklosan	Klorofen
Deionizirana voda	89	82	95
	82	82	94
Morska voda	90	89	95
	87	88	91
Bazenska voda	90	94	98
	80	87	97

Preglednica 2: Koncentracije (ng/L) UV filtra, benzofenon-3 (BP3) in protimikrobnih sredstev, najdenih v bazenih in odpadnih bolnišničnih vodah (povzeto po: Cuderman in Heath, 2007)

	Mesto vzorčenja	BP3	4MBC	OC	Klorofen	Triklosan
Bazeni	Kodeljevo	103	<LOD	15	<LOD	<LOD
	Portorož	400	330	<LOD	<LOD	<LOD
Odpadne vode iz bolnice	Bolnica 2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	122

2.5.3. Organski UV filtri in njihova fotorazgradnja, metaboliti in dezinfekcijski stranski produkti v vodnem okolju

Poleg lastnosti, da ščitijo in varujejo izpostavljeno kožo, pa tudi proizvode pred škodljivo UV svetlobo, morajo biti UV filtri stabilni, ko so izpostavljeni UV sevanju. Nekateri organski UV filtri so podvrženi razgradnji, predvsem fotolizi in lahko reagirajo tudi s klorom ali drugim klorirnim medijem (na primer morje, bazen) (Diaz-Cruz in sod., 2008).

Fotokemične reakcije, ki jih povzroči sončna svetloba, so verjetno glavni abiotski procesi, ki potekajo in vplivajo na usodo organskih kemikalij v površinskih vodah. Fotoliza povzroči absorbiranje svetlobe in cepitev molekule na reaktivne dele oziroma fragmente (prosti radikali) ali reaktivne intermediate (vmesne produkte). Na površinskem sloju vodnega sistema potekata dva procesa: neposredna fotoliza in posredna fotoliza. Organski UV filtri vsebujejo kromoforne skupine, ki so sposobne absorpcije svetlobe valovne dolžine, ki jo predstavlja sončna svetloba. Raztopljene organske snovi, ki so navzoče v površinskih vodah, so znane po tem, da lahko preoblikujejo druge spojine, ki vstopijo v vodno okolje, s produkcijo reaktivnih fotooksidantov, ki obsegajo tudi reaktivne kisikove vrste (kot na primer hidroksilni radikali (OH*)) (Blough in Zeep, 1995). OH* radikali so zelo reaktivna vrsta delcev, ki napade veliko različnih molekul, reakcija pa vodi do njihove razgradnje (Knowland in sod., 1993).

V sistemih za obdelavo pitne vode pogosto za dezinfekcijo vode uporabljajo klor, klorov dioksid in ozon, medtem ko za dezinfekcijo odpadnih voda uporabljajo predvsem klor. V Evropi postaja postopek ozonacije vedno pogosteje uporabljen, ker je to alternativni postopek kloriranja. Klor poleg vonja lahko povzroča tudi tvorbo problematičnih stranskih produktov, t. i. trihalometanov. Kljub temu pa je na primer v Združenih

državah Amerike še vedno bolj priljubljen klorirni način dezinfekcije pitne vode (Diaz-Cruz in sod., 2008).

V Preglednici 3 je izbor nekaj dostopnih podatkov o koncentraciji BP3 v kopalnih vodah po svetu.

Preglednica 3: Koncentracije izbranih organskih UV filtrov v okolju (povzeto po: Diaz-Cruz in sod., 2008)

Mesto vzorčenja	BP3
Bazen (Lambropoulou in sod., 2002)	2,4–3,3 g/L
Morje (Giokas in sod., 2004)	1,4–2,2 g/L
Bazen (Giokas in sod., 2004)	3,3–5,1 ng/L
Jezero Hüttnersee v Švici (Poiger in sod., 2004)	5–125 ng/L

2.6. Strupenost UV filtrov

Po nanosu sredstev za zaščito pred soncem (sončnih krem) na kožo lahko spojine preidejo skozi kožo in se porazdelijo po telesu. Sredstva se nato izločijo kot spojine, ki so vstopile v telo, ali pa se pred izločanjem presnovijo. Kot posledica obeh, nanosa sončnih krem in metaboliziranja, lahko vstopijo v vodno okolje. Do sedaj je bilo nekaj metabolitov UV filtrov že tema raziskav v zvezi z njihovo potencialno motnjo hormonske aktivnosti (Diaz-Cruz in sod., 2008).

Raziskav, ki bi vključevale monitoring in raziskave toksičnosti izdelkov za osebno nego, je bilo relativno malo, čeravno najdemo omenjene spojine bolj pogosto v okolju v višjih koncentracijah kot farmacevtske izdelke. Izdelki za osebno nego neprestano prehajajo v vodno okolje in so biološko aktivni in obstojni (Brausch in Rand, 2011). V nasprotju s farmacevtskimi izdelki, ki so namenjeni notranji uporabi (jih zaužijemo), so izdelki za osebno nego namenjeni zunanji uporabi, na telesu ljudi in tako niso predmet presnovnih sprememb. Zato velike količine izdelkov za osebno nego vstopijo v okolje nespremenjene (Ternes in sod., 2004). Veliko teh spojin se uporablja v velikih količinah in raziskave navajajo, da jih je veliko prisotnih tudi v okolju, da so bioaktivne in imajo možnost, da se bioakumulirajo (Peck, 2006; Mackay in Barnthouse, 2010).

Izdelki za osebno nego so med najbolj pogosto zaznanimi spojinami v površinskih vodah po celem svetu (Peck, 2006); v primerjavi s farmacevtskimi izdelki je malo znanega o njihovi strupenosti za druge organizme (Daughton in Ternes, 1999). Številna mnenja in ocene so bile objavljene o ugotavljanju toksičnosti in pojavnosti farmacevtskih izdelkov (Halling-Sorensen in sod., 1998; Crane in sod., 2006; Fent in sod., 2006), ni pa podatkov o študiji, ki bi obravnavala potencialno tveganje za uporabo izdelkov za osebno nego za vodno okolje.

Zavedanje o škodljivosti ultravijoličnega (UV) sevanja na ljudi je sprožilo povečano uporabo zaščitnih krem z UV filtri. Običajno najdemo tri do osem različnih UV filtrov v sončnih kremah in kozmetiki. Ti lahko predstavljajo več kot 10 % mase izdelka (Schreurs in sod., 2002). Raziskava iz Švice ocenjuje, da vnos štirih najbolj pogosto uporabljenih UV filtrov v čistilni napravi doseže naslednje vrednosti: 118 g 2-etil-heksil-4-trimetoksicinamat (EHMC), 49 g 4-metil-benzildien-kafre (4MBC), 69 g benzofenona-3 (BP3) in 28 g oktokrilena (OC) na 10.000 ljudi na dan v času visoke uporabe (Balmer in sod., 2004). Poleg tega pa Poiger in sod. (2004) ocenjujejo, da se uporablja do

1.263 mg UV filtrov na osebo na dan, kar predstavlja do 966 kg sproščenih UV filtrov neposredno v majhno jezero v Švici na leto. Do podobnih rezultatov so prišli tudi v raziskavi, kjer so v švicarskih jezerih določili BP3 pri najvišjih koncentracijah (5-125 ng/L).

Večina dodatnih podatkov, ki obstajajo o koncentraciji v okolju, se nanaša na bioakumulacijo UV filtrov v vodnih organizmih. UV filtri so znani, da se bioakumulirajo v ribah na ravni, podobni polikloriranih bifenilov (PCB) in dikloro-difenil-trikloroetana (DDT) (Daughton in Ternes, 1999) glede na njihovo lipofilnost ($\log K_{ow} = 3-7$) in stabilnost v okolju (Balmer in sod., 2004; Poiger in sod., 2004). UV filtre so našli v maščobnem tkivu pri ribah v koncentracijah do 2 ppm (2mg/kg ribe) (Nagtegaal in sod., 1997). Samo ena študija navaja, da nekateri UV filtri niso akutno toksični za vodne organizme (Fent in sod., 2009). Pri vodni bolhi vrste *Daphnia magna* so opazili, da je zelo občutljiva na kratkotrajno izpostavljenost (48 ur) za EHMC, medtem ko je bila manj občutljiva za benzofenon-4 (BP4) (Fent in sod., 2009). Večina raziskav, ki se nanašajo na UV filtre, je fokusiranih na dolgotrajno izpostavljenost.

Ocena nevarnosti:

Zaradi nezadostne količine dolgotrajnih *in vivo* podatkov za UV filtre še ni mogoče predvideti tveganja. Tudi ocena tveganja še ni določena oziroma izračunana za potencialne endokrine učinke zaradi pomanjkanja *in vivo* raziskav na vodnih organizmih; vendar študije na sesalcih kažejo, da UV filtri najverjetneje povzročajo endokrine učinke (Brausch in Rand, 2011). Na bazi podatkov, ki so bili objavljeni v aprilu 2010, dokončna ocena tveganja ne more biti izvedena za določitev potencialnih učinkov izdelkov za osebno nego v vodnem okolju. Številne predhodne ocene tveganja so bile izvedene, dokončne presoje pa še ni bilo narejene zaradi nepopolne zbirke podatkov. Nepopolni podatki glede na pomembnost vključujejo (Brausch in Rand, 2011):

- koncentracije snovi v okolju;
- kronične podatke za sredstva za odganjanje mrčesa in sredstva za zaščito;
- endokrine učinke dišav;
- bioakumulacije in biomagnifikacije UV filtrov;
- akutne podatke za metil triklosane in UV filtre.

Veliko število ultravijoličnih (UV) absorpcijskih snovi je ponavadi prisotnih v proizvodih za osebno nego, v tekstilih, ki so izpostavljeni UV sevanju in v plastičnih materialih, kar pa izzove hormonsko aktivnost v človeškem telesu in zunaj njega. Indukcija vitelogenina, spremembe v spolnih žlezah, zmanjšana plodnost in reprodukcija, feminizacija in spremenjene spolne karakteristike rib so lastnosti, ki so bile povezane s pogosto uporabo UV filtrov, vključno z benzofenoni in kafri podobnimi snovmi (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009). Čeprav so sedanji toksikološki podatki o UV filtrih razpršeni in omejeni, kažejo, da potencialno tveganje teh obširno uporabljenih spojin potrebuje nadaljnje raziskave. Estrogenska učinkovitost večine UV filtrov, ki se jih običajno uporablja, vključno s 4-metil-benzil-dien kafro (4-MBC), BP3 in oktil metoksicinatom (OMC), je v obsegu tudi drugih značilnih estrogenih kemikalij (Kuiper in sod., 1998). Ugotovitve kažejo, da številni UV filtri spreminjajo hormonske (endokrine) in/ali reprodukcijske končne točke pri nekaterih vrstah (na primer pri podganah, ribah in žabah), vendar pri koncentracijah, višjih, kot so tiste, ki so bile izmerjene v naravnem okolju (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009).

2.7. Stabilnost UV filtrov v klorirani vodi in določanje halogeniranih stranskih produktov

Z zavedanjem o škodljivih učinkih sončnega sevanja na človeka je narasla proizvodnja in uporaba UV filtrov. Te spojine so klasificirane, kot organske ali anorganske vrste spojin (Salvador in Chisvert, 2005; Richardson, 2007; Giokas in sod., 2005).

Za ugotavljanje in določanje stabilnosti UV filtrov pod dezinfekcijskimi pogoji je potrebno vedeti, ali spojine reagirajo v klorirani vodi in določiti morebitne halogenirane produkte. Zato je bila uvodoma ocenjena stabilnost UV filtra BP3 (ter drugih UV filtrov) v prisotnosti naraščajoče koncentracije klora (vse do 3 µg/mL). Eksperimenti so bili izvedeni z ultra čisto vodo pri treh različnih pH vrednostih (6.2, 7.2, 8.2), ki so zajeli območje pričakovanih meritev v različnih vzorcih vode z dodatkom 50 ng/mL samo ene iskane spojine. Po določenem času (2–30 min) so odstranili presežek klora, vzorce so nato skoncentrirali in določili količino prvotnega klora. Za BP3 so ugotovili, da stabilnost (pKa 7,6) pri dveh obravnavanih reakcijskih časih, 10 in 2 min, pada z naraščanjem pH vodnih vzorcev (Negreira in sod., 2008).

V nadaljevanju preglednica 4 povzema najbolj ustrezne podatke, ki se nanašajo na uspešnost analitskega postopka. Podaja podatke o zadrževalnem (retenzijskem) času, linearnosti in meje določljivosti (Negreira in sod., 2008). Razpolovni časi, merjeni za BP3 pod različnimi eksperimentalnimi pogoji, so podani v Preglednici 5. Z upoštevanjem ugotovitev o stabilnosti BP3 pri različnih pH vrednostih ugotovimo, da je BP3 manj stabilen pri pH 8,2 kot pri pH 7,2. Prav tako je zanimivo, da je razpolovni čas BP3 v klorirani vodi iz pipe podoben tistemu, ki je bil izmerjen v ultra čisti vodi, če govorimo o isti količini prostega klora (Negreira in sod., 2008).

Preglednica 4: Podatki o učinkovitosti analitskega postopka UV filtra BP3 (povzeto po: Negreira in sod., 2008)

Analit	Retenzijski čas (min)	Linearnost R ² (ng/mL)	Meja občutljivosti (ng/L)
BP3	17,34	0,999 (v območju 2-2000)	8

Preglednica 5: Razpolovni čas (t_{1/2}) izmerjen za BP-3 pod različnimi eksperimentalnimi pogoji (povzeto po: Negreira in sod., 2008)

Analit	Vzorec	pH	Prosti klor (µg/mL)	Bromid (ng/mL)	t _{1/2} (min)
BP-3	Ultra čista voda	7,2	0,30 ^a	0	2,7
		7,2	0,60 ^a	0	1,2
		8,2	0,30 ^a	0	1,8
		8,2	0,60 ^a	0	0,8
		7,2	0,30 ^a	1	2,8
		7,2	0,30 ^a	10	0,8
	Voda iz pipe	7,2	0,76 ^b	Ni določen	1,0

^a Dodana koncentracija

^b Izmerjena koncentracija

2.8. Pomen pravilnega vzorčenja in analize

Pravilno vzorčenje je v analizi kemiji zelo pomemben del analize. Vzorec, ki ga analiziramo v laboratoriju, predstavlja le delček mnogo večjega celotnega vzorca, o katerem želimo pridobiti določene podatke. Zato je potrebno vzeti vzorec reprezentativno, da je čim bolj skladen s celotnim vzorčevalnim sistemom. Tu je glavni vir napak, ki lahko vplivajo na točnost analize (Bavcon, 2009). Način vzorčenja je za vsako vzorčevalno skupino specifičen. Vendar pa velja za vse enoten potek vzorčenja, prikazan v spodnji shemi (Slika 3).



Slika 3: Enoten postopek vzorčenja (povzeto po: Bavcon, 2009)

I. Priprava vzorcev

Vzorci, ki jih pripravimo za kromatografsko separacijo, izpostavimo verižni obdelavi, tako, da so na koncu skladni z analizo, detekcijo in separacijo ter vsebujejo selektivno skoncentriran analit. Izogniti se moramo kontaminaciji in paziti, da je vzorec reprezentativen. Čiščenju namenimo največ pozornosti in časa saj lahko le tako ohranimo brezhibnost instrumentov, dobimo kvalitetnejšo separacijo in boljšo občutljivost detektorja (Bavcon, 2009).

II. Ekstrakcija

Ekstrakcijo uporabljamo za izolacijo iskanih spojin iz raztopin ali trdnih zmesi. Ločimo ekstrakcijo tekoče – tekoče, ki temelji na razliki topnosti sestavin v zmesi v dveh topilih in ekstrakcijo trdno – tekoče, ki pa temelji na razliki topnosti v danem topilu. (Bavcon, 2009)

V diplomskem delu smo se osredotočili na ekstrakcijo tekoče – tekoče, zato bom v nadaljevanju podrobneje predstavila ekstrakcijo iz raztopin ter novejša metode izolacije spojin iz vzorcev, ker se z eno izmed novejših metod srečamo pri praktičnem delu priprave in obdelave vzorcev v laboratoriju.

Ekstrakcija iz raztopin

Če raztopini dodamo topilo (spojina, ki jo želimo ekstrahirati mora biti v tem topilu zelo topna), ki se s prvimi ne meša, dobimo dvofazni sistem. Ko takšno zmes dobro stresamo, se spojina, ki jo želimo ekstrahirati porazdeli med obe fazi. Nato plasti ločimo in na novo dobljeno raztopino uparimo. Dobimo ekstrahirano spojino. Eno topilo, ki ga uporabimo v večini ekstrahiranj iz raztopin, je voda, drugo topilo pa je organsko, ki se z vodo ne meša. Za boljšo učinkovitost postopek ekstrakcije večkrat ponovimo (Bavcon, 2009).

Novejša metode izolacije spojin iz vzorcev

Te metode se uporabljajo predvsem zaradi manjše porabe organskih topil in s tem manjšega vpliva in izpusta v okolje ter krajšega časa priprave vzorcev. Tako je ena izmed novejših metod izolacije spojin iz vzorcev ekstrakcija na trdni fazi (Solid Phase Extraction SPE), pri kateri se uporablja mini ekstrakcijske kolone, diske ali vlakna.

Temelji na porazdelitvi, adsorpciji, afiniteti ali ionski izmenjavi analita na polnilu. Kolona je v obliki brizge, le da ima na dnu polnilo, na katerem so vezane selektivne funkcionalne skupine, na katere se veže analit. Z ustreznim topilom nato še speremo analit iz kolone in ga skoncentriramo v topilu (Bavcon, 2009).

III. Koncentriranje

Uparevanje: Reakcije izvajamo v topilu, ki ga je potrebno na koncu odstraniti iz zmesi z uparevanjem. Za uparevanje se največ uporablja rotacijski vakuumski uparjevalnik (rotavapor), ki nudi hitro in učinkovito uparevanje. Prednost rotavaporja je, da se zaradi vrtenja buče poveča površina, s katere odpareva topilo, s tem pa tudi hitrost uparevanja (Svete, 1999).

Rotacijski vakuumski uparjevalnik ali rotavapor je naprava, ki se uporablja za učinkovito in nežno odstranjevanje topil iz vzorcev z izhlapevanjem. Glavni deli rotavaporja so:

- motorna enota, ki vrtil izparilno bučko v kateri je vzorec;
- zračna cev, ki je os za vrtenje vzorca, je vakuumsko tesna cev, po kateri se odvajajo pare iz vzorca, ki ga hočemo osušiti;
- vakuumski sistem, ki bistveno zmanjša pritisk v sistemu uparjalnika;
- ogrevana kopel (običajno je to voda) za ogrevanje vzorca;
- kondenzator z eno hladilno tuljavo ali »hladilna past«, v katerem je mešanica hladilnih tekočin, kot sta suhi led in aceton;
- kondenzata – zbirni bučki na dnu hladilnika, ki ujmeta destilate topila, potem ko ponovno kondenzira;
- mehanski ali motoriziran mehanizem za hitri dvig izparilne bučke iz ogrevane kopeli.

Uporaba vakuumskega sistema z rotacijskim izparilnikom je lahko tako enostavna, kot vodni sesalec s pastjo, ki ga potopimo v hladno kopel (za nestrupena topila) ali pa je tako zapleten kot mehanska vakuumška črpalka s hladilno pastjo. Stekljeni izdelki, ki se uporabljajo v parnem toku in kondenzatorju, so lahko preprosti ali pa kompleksni, odvisno od ciljev, ki jih hočemo doseči z izhlapevanjem ter od lastnosti, ki jih dajo raztopljene spojine mešanici (Rotary evaporator).

IV. Analiza

Tekočinska kromatografija za mobilno fazo uporablja tekočino (ali organska topila ali vodo ali pufrne raztopine). Pri kolonski kromatografiji je stacionarna faza (ki ne sme biti topna v mobilni fazi) v trdni ali gelski obliki ali pa v obliki tankega, kemično oziroma fizikalno vezanega filma na inetrnem trdnem nosilcu. Pri planarni kromatografiji je stacionarna faza nanešena na podlago – ravno ploščo (steklo, Al – pločevina) v obliki filma (tankoplastna kromatografija) ali pa je stacionarna faza kar podloga – papir (papirna kromatografija) (Bavcon, 2009).

Različne vrste tekočinske kolonske kromatografije ločujemo glede na ključni mehanizem ločbe. Tako poznamo ločbo na osnovi porazdelitve analita med mobilno in stacionarno fazo, adsorpcije/desorpcije analita s trdne mobilne faze, ionske izmenjave, izključitve na podlagi molske mase, specifične afinitete med analitom in kolono. Pri vseh tipih kolonskih kromatografij lahko uporabljamo različne tlake (Bavcon, 2009). V nadaljevanju se bom omejila na visokotlačno tekočinsko kromatografijo (High Pressure Liquid Chromatography, High Performance Liquid Chromatography – HPLC), ki se

pretežno uporablja v analitske namene in sem jo uporabljala tudi sama za analizo vzorcev.

Največkrat uporabljena stacionarna faza je silikagel – SiO_2 , ki je polaren in zato je potrebna uporaba nepolarne mobilne faze. Kot polarno stacionarno fazo lahko uporabimo tudi aluminijev oksid (Al_2O_3 , rahlo alkalen). V primeru, da analiziramo nepolarne analite, uporabimo nepolarno mobilno fazo. Običajno za to uporabimo silikagel, ki ima na površini manj polarne substituentne, ki so kemično modificirani. Ločba pri HPLC temelji na razliki v porazdelitvi komponent analita med stacionarno in mobilno fazo, ki sta si po polarnosti različni. Tako molekule, ki so po polarnosti bolj podobne mobilni fazi, hitreje zapustijo kolono, tiste, ki so po polarnosti bolj podobne stacionarni fazi, pa se na koloni zadržujejo dlje (Bavcon, 2009).

Pri odvzemu vzorca bazenske kopalne vode moramo biti zelo dosledni in natančni, zato je potrebno ob vsakem odvzemu izpolniti tudi Terenski list za odzem vzorca kopalne vode. Vsak vzorec je potrebno oštevilčiti, napisati mesto vzorčenja, odzemno mesto, kdo je upravljalca bazena, datum in čas dozema. Odzemno mesto je točno določeno s koordinatami in šifro in je običajno tam, kjer je dnevna gostota kopalcev največja. Odzemno mesto se nahaja tam, kjer je voda globoka najmanj 1 m, vzorec pa se odvzame na približno 30 cm pod gladino. V bazenih je odzemno mesto 30 cm odstranjeno od sredine daljše stranice bazena. Odzemna mesta vzorcev so fiksna. Pred terenskimi meritvami in pred odvzemom vzorca za kemijske analize je potrebno odvzeti vzorec za mikrobiološke analize. Embalaža mora biti sterilna (ustrezna oznaka), predhodno ohlajena, imeti mora širok vrat in je lahko iz stekla ali plastične mase, za enkratno ali večkratno uporabo, le da ne stimulira ali zavira rasti mikroorganizmov v odvzetem vzorcu. Dodan mora biti tudi tiosulfat, če se vzorči klorirano vodo v bazenih. Ročno zajemalo ali podaljšek, s katerim si pomagamo zajeti vodo, mora biti sterilen, prav tako je pomembno paziti, da ne pride do kontaminacije vzorčevalne posode, zato je potrebno dosledno slediti pravilom, ki zadevajo sterilno delo. Minimalna količina odvzetega vzorca je 500 mL. Vzorčevalne embalaže se ne napolni do vrha (od 2 cm pod vrhom), da se lahko vzorec pred nadaljnimi analizami v laboratoriju lahko premeša. Po odvzemu se morajo vzorci hraniti na hlajenem mestu pri temperaturi $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$. Čas od vzorčenja do sprejema vzorca v laboratorij je maksimalno 8 ur. Nato sledijo terenske meritve: temperatura vode, prosti klor, vezani klor, klorov dioksid, pH, redoks potencial. Napisati je potrebno, kdo je vzorec odzvel in kdo mu je prisostvoval. Odvzete vzorce se zajame v pripravljene embalaže, ki so odvisno od iskanih parametrov plastične ali steklene. Vzorec vode, v katerem se meri trihalometane, se odvzame v posebej za to narejene steklene vijale, ki imajo zamašek in tesnilo ali v tako imenovano »Winkler-jevo« steklenico s steklenim zamaškom. Tu vodo napolnimo do vrha, da v vzorcu ni zraka. Potrebno pa je tudi preverjati hladilno komoro med transportom, in sicer temperaturo pred prvim vzorčenjem in pred oddajo vzorca (IZV, Priporočila, navodila, mnenja za kopalne vode).

2.9. Vzorčenje kopalnih voda

2.9.1. Splošni podatki o kakovosti bazenskih kopalnih vodah

Pravilnik o minimalnih higienskih in drugih zahtevah za kopalne vode določa higienske zahteve, ki jih mora kopališče izpolnjevati. Upravljalec mora skrbeti, da je kopališče urejeno, ustrezno opremljeno, da se izvaja pravilna priprava bazenske kopalne vode, da se izvajajo dnevne meritve kopalne vode ter da je zagotovljeno jemanje vzorcev za laboratorijske analize. Pravilnik in zahteve veljajo za vsak bazen. Kopalne vode oziroma vzorec pa je skladen, če vrednosti posameznih izmerjenih parametrov ustrezajo vrednostim, ki so določene v pravilniku. Če se pri analizi pojavijo neskladnosti, mora upravljalec ravnati po navodilih Inštituta za varovanje zdravja. V kolikor se to zgodi, je potrebno takoj odvzeti še en vzorec, in če rezultati še vedno niso skladni, mora upravljalec najti vzroke, ki povzročajo nepravilnosti (Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).

Bazenska voda se lahko onesnažuje na več načinov. Najpogosteje s strani kopalcev, ko se spirajo nečistoče iz površine kože in telesnih votlin. Nečistoče pridejo v kopalne vode ob nepredvidljivih dogodkih, kot sta iztrebljanje ali bruhanje v kopalno bazensko vodo. To so možne poti prenosa raznih mikroorganizmov, ki so vedno prisotni pri ljudeh, pa tudi patogenih mikroorganizmov, ki jih v kopalne vode vnesejo bolni kopalci. Prenos mikroorganizmov poteka, ko se nehote zaužije vodo z vdihovanjem ali preko kože. Zaradi nečistoč in mikroorganizmov je potrebna uporaba dezinfekcijskih sredstev. Kjer je bazenska kopalna voda v zaprtem sistemu, je treba zagotavljati dotok sveže pripravljene vode in dezinfekcijskih sredstev, v večini primerov klora (Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).

Kriteriji za ocenjevanje primernosti bazenske kopalne vode za kopanje na podlagi laboratorijskih preskusov vzorcev kopalne vode so (IVZ, Kriteriji za ocenjevanje):

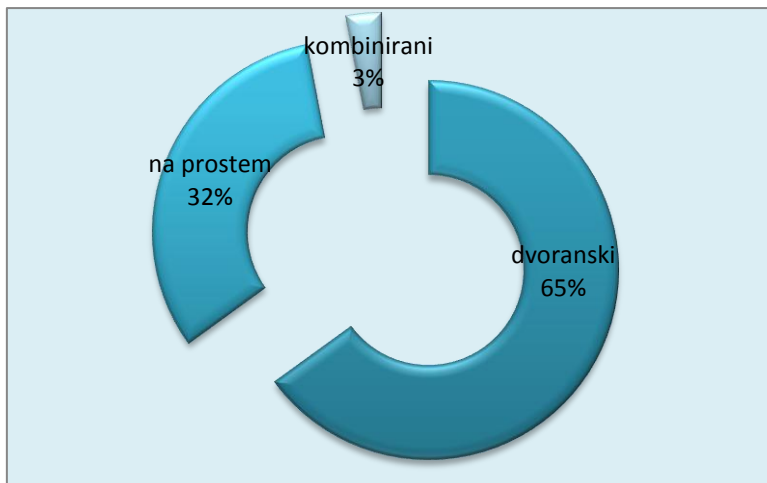
- Mikrobiološki parametri: Tu se oceni ali je bila priprava in dezinfekcija vode uspešna in ali kopalna voda in kopališče izpolnjuje higienske predpise. Neprimerna voda za kopanje je kadar so posamezni mikrobiološki parametri kopalne vode v bazenu sledeči: *Escherihia coli* – vrednost > 10/100mL, *Pseudomonas aeruginosa* – vrednost > 10/100mL, *Legionella pneumophila* – vrednost > 100CFU/100mL, *Staphylococcus aureus* – vrednost 1/1mL, ali skupno število mikroorganizmov (36 ± 2) °C – vrednost > 200/1mL.
- Fizikalni in kemijski parametri: Te vrednosti so pokazatelj kakovosti kopališča in kopalne vode ter uspešnosti njihovega upravljanja. Na podlagi teh podatkov se oceni možnost mikrobiološkega onesnaženja. Meri se koncentracijo trihalometanov (THM), ki nastanejo kot stranski produkt dezinfekcije kopalne vode. Koncentracija THM je odvisna od vrste in koncentracije organske snovi, temperature in vrednosti pH v vodi. Voda je neprimerna za kopanje, ko je koncentracija THM > 500µg/L.
- Ocena primernosti: Oceno se podaja na podlagi mikrobioloških ter fizikalnih in kemijskih parametrov in temelji na podlagi dveh zaporednih preskusov. Če rezultati prvega preskusa kažejo neprimernost, je potrebno takoj po opravljeni analizi ponovno odvzeti vzorec in meritve ponoviti. Upravljalec pa mora ugotoviti vzroke in jih takoj odpraviti. Če je tudi drugi vzorec neprimeren, četudi v samo enem parametru, se oceni da je voda neprimerna in se ne sme uporabljati kot kopalna voda.

Vrste bazenskih kopališč

Glede na vrsto bazena, globino vode in tip polnilne vode razlikujemo 3 vrste bazenskih kopališč (Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).

Bazenska kopališča glede na vrsto bazena (Slika 4)

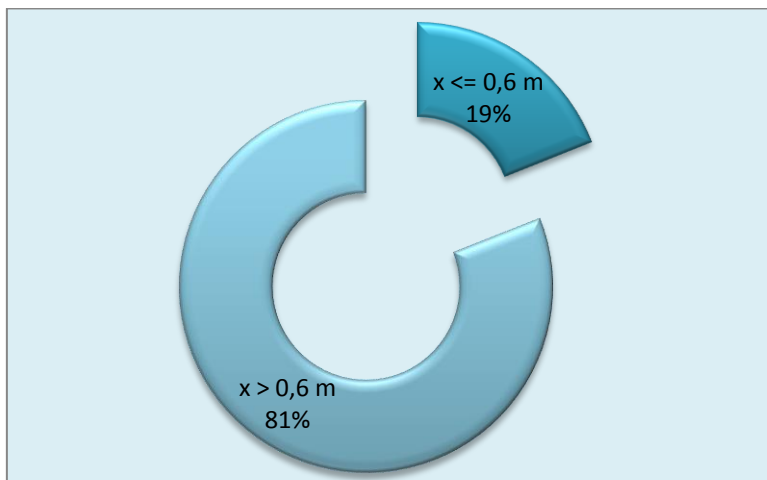
Bazenska kopališča glede na vrsto bazena razvrščamo na kopališča na prostem, dvoranska kopališča ter kombinirana kopališča. V Sloveniji smo imeli v letu 2010 65 % (oziroma 382) dvoranskih bazenov, 32 % (186) bazenov na prostem in 3 % (18) kombiniranih bazenov (Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).



Slika 4: Deleži bazenov po vrsti bazena, Slovenija 2010 (povzeto po: Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).

Bazenska kopališča glede na globino vode (Slika 5)

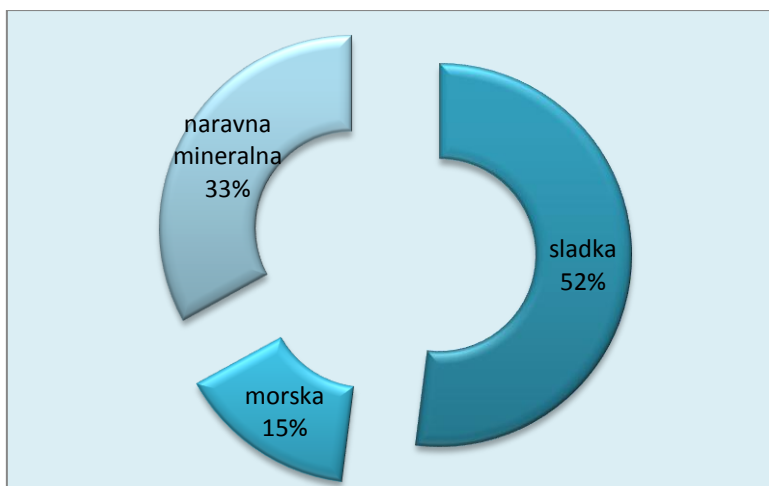
Pravilnik o tehničnih ukrepih in zahtevah za varno obratovanje kopališč in za varstvo pred utopitvami določa, da kopalna voda otroškega kopališča ne sme presegati globine 0,60 m. Tako se bazenska kopališča glede na globino vode deli na tiste z globino kopalne vode nižjo ali enako 0,6 metra (teh je 19 % oziroma 112 bazenov) in na tiste z globino višjo od 0,6 metra (teh je 81 % oziroma 474 bazenov) (Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).



Slika 5: Deleži bazenov po globini vode, Slovenija 2010 (povzeto po: Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).

Bazenska kopališča glede na tip polnilne vode (Slika 6)

Pojem polnilna voda pomeni, da je to voda, ki se uporablja za prvo polnjenje bazenov in za dopolnjevanje med njegovim obratovanjem. Tip polnilne vode je lahko sladka voda, s katero je bilo napolnjenih 52 % (305) bazenov, morska voda, katero je imelo 15 % (88) bazenov ali pa je polnilna voda naravna mineralna voda, katero so uporabljali v 33 % (193) bazenih (Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011).



Slika 6: Deleži bazenov po tipu polnilne vode, Slovenija 2010 (povzeto po Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, 2011)

Priprava in dezinfekcija kopalne vode

V bazenskih kopališčih mora neprestano potekati priprava polnilne vode ter dezinfekcija kopalne vode z rezidualnim učinkom in korekcijo pH vrednosti zaradi možnega stalnega onesnaževanja z mikroorganizmi, ki so lahko nevarni za zdravje kopalcev. Voda zato v zaprtem sistemu neprestano kroži in se nadomešča njena izgubljena količina, to je najmanj 30 litrov na uporabnika. Dezinfekcijska sredstva, ki se najpogosteje uporabljajo, so klorovi preparati, kot so plinasti klor, natrijev hipoklorit, kloroizocianurati, kalcijev hipoklorit in klorov dioksid. Njihove dovoljene koncentracije so določene glede na vezani klor, do 0,3 mg/L in na prosti klor od 0,3 do 0,6 mg/L. V takih koncentracijah dezinfekcijska sredstva ne predstavljajo neposredne nevarnosti za zdravje. Prosti klor ali tudi tako imenovani dobri klor uničuje mikroorganizme v vodi in se veže na organske nečistoče v vodi, ki jih vnesemo kopalci. Posledica je močan vonj po kloru. Torej vonj po kloru ni pokazatelj prevelike količine oziroma koncentracije klora v vodi, temveč je pokazatelj, da je v vodi prisotna visoka koncentracija kloroaminov, ki nastanejo ko prosti klor reagira z organskimi nečistočami in bi ga bilo potrebno še dodati. Kjer pride do tega, je očitno, da se voda ne pripravlja pravilno. Druga vrsta pa je vezani ali slabi klor, ki pa je precej manj učinkovit (IZV, Pogosta vprašanja o kopalni vodi, 2011).

Na javnih kopališčih, tako v plavalnih bazenih kot tudi masažnih bazenih, je najpomembnejši del vzdrževanja skrb za čisto in neoporečno vodo. Te zahteve se izpolnjujejo z namestitvijo filtrnega sistema (peščeni filtri) in avtomatskim dezinfekcijskim sistemom, ki je nujno potreben za zagotavljanje čistosti vode. Avtomatske naprave so potrebne, ker s preprostimi metodami in ročnim merjenjem parametrov ni mogoče dosegati standardov bazenske kopalne vode. Avtomatizacija meritev in dezinfekcijska sredstva ter primeren filtracijski sistem zagotavljajo neoporečno vodo v vsakem trenutku. Parametri, ki se neprestano spremljajo; so količina prostega klora, redoks signal, pH vrednost in temperatura. Na podlagi teh

parametrov se v bazensko kopalno vodo sprošča točno določena količina dezinfekcijskega sredstva in sredstva za uravnavanje pH vrednosti. Poleg dezinfekcijske centrale je priporočeno, da imajo bazeni tudi sistem za kosmičenje vode (flokulacija), ki iz vode odstranjuje tudi mikroskopsko majhne delce. (Titro, dezinfekcija vode)

Avtomatske centrale se poslužujejo več tehnik merjenja parametrov in doziranja potrebnih količin tekočega klora in pH regulatorja v bazen. Ena izmed je merilno – regulacijska tehnika, ki ima avtomatsko centralo z avtomatskim merjenjem parametrov prostega klora v vodi, redoks signala in pH vrednosti vode in avtomatskim krmiljenjem doziranja sredstev za čiščenje vode, z dvema dozirnima črpalkama in rezervoarji za shranjevanje kemikalij. Priporočljivo je, da so sredstva za čiščenje in dezinfekcijo kopalne vode hranjena v ta namen zgrajenih skladiščih ali zidnih omarah. (Titro, dezinfekcija vode)

Higiena bazenske vode se vzdržuje z različnimi tehnologijami (SoTom, Tehnologije za čiščenje kopalne bazenske vode):

- *Dezinfekcija:* Odstranjevanje ali uničevanje patogenih organizmov. Učinkovito dezinfekcijsko sredstvo mora v koncentraciji, ki ne povzroča neprijetnosti in zdravstvenih težav kopalcev, v 30 sekundah uničiti 99,99% bakterije *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Filtracija:* S tem postopkom se iz tekočine odstrani delce. Mikron je mera za stopnjo filtracije (1mikron je 0,001mm). Vrste filtracije so: predfiltracija, večslojna, peščena filtracija, membranska filtracija, reverzna osmoza.
- *Kosmičenje:* S to metodo se odstrani raztopljene organske substance, ki se ne odstranijo s filtriranjem. S pomočjo koagulantov se raztopljene snovi izkosmičijo, se pretvorijo v obliko, ki se lahko odstrani s filtriranjem. Tako se odstrani tudi fosfate, ki so prišli v bazensko kopalno vodo s polnilno vodo, ali pa s kozmetiko kopalcev in odmrle mikroorganizme. Koagulanti so snovi izdelane na bazi aluminija ali železa. Imajo močan pozitivni elekto naboj, ki privlači vse negativno nabite delce.
- *Membranska filtracija:* Bolj učinkovito, kot ostale tehnologije odstranjujejo vsa onesnaževala, so bolj zanesljive in okolju bolj prijazna tehnologija, saj je uporaba kemijskih sredstev pri tej metodi najnižja. Voda se razdeli na čisto vodo – permeat in močno koncentrirano onesnaženo vodo – retentat, ki je običajno odpadna voda. Separacija delcev temelji na: razliki med velikostjo delcev in velikostjo por membrane, razliki v topnosti in difuzije membrane in raztopine, razliki naboja delcev.
- *Ozonacija:* Ozon je najmočnejši oksidant, takoj za hidroksilnim ionom in razpad v vodni raztopini sproža nastanek le teh. Tako se oksidira mnogo organskih in anorganskih snovi v vodi, zato spada med biocidno sredstvo. Ker ima zelo malo stranskih produktov je dobro dezinfekcijsko sredstvo, čeprav je oksidant.
- *Uravnavanje pH vrednosti:* Primeren pH je zelo pomemben za pripravo kopalne vode, zato ga je potrebno redno nadzorovati. Od njega je tudi odvisno delovanje postopka kosmičenja in dezinfekcije. Optimalna pH vrednost v bazenih je med 7.0 in 7.4.
- *UV dezinfekcija:* Ta metoda deluje s fotoni na dedni material celice brez dodajanja drugih čistilnih in dezinfekcijskih sredstev v vodo. Tako se onemogoči razmnoževanje mikroorganizmov.

2.9.2. Vzorčenje morja

Meteorološke in hidrološke značilnosti vzorčnih mest

Meteorološke značilnosti: Na območju slovenske obale se meteorološki podatki in količina padavin na treh lokacijah beležijo klasično (ročno merjenje in beleženje), na treh lokacijah pa samodejno (digitalno merjenje z avtomatskim ali polavtomatskim prenosom podatkov v bazo podatkov ARSO). Meteorološka postaja Portorož – letališče je najprimernejša za opis podnebnih razmer slovenske obale, ker se tam meteorološke značilnosti merijo največ let. Največ padavin pade od avgusta naprej; letna povprečna vrednost za obdobje med leti 2001 in 2010 je 974,1 mm. Največ padavin je septembra, julija pa jih je v povprečju najmanj. V istem obdobju je bila najvišja povprečna temperatura zraka 23,6 °C, poletni meseci (junij, julij in avgust) imajo v povprečju dnevno temperaturo zraka nad 20 °C. Vetrovna roža pa nakazuje, da je prevladujoča smer vetra JV, pogosta pa je tudi burja. Povprečna hitrost vetra je v poletnem času okoli 2–4 m/s, doseže tudi 20 m/s, v zimskem času celo več kot 40 m/s (Kopalne vode, 2009).

Hidrološke značilnosti: Na mareografski postaji Koper se beležijo višina in temperatura morja ter druge meteorološke meritve, ki veljajo za celotno območje slovenskega morja. Prenos podatkov v bazo podatkov ARSO je avtomatski. Ti podatki pa služijo za opozorila, kot na primer o prihajajočih poplavih, za mesečna in letna poročila ter za pripravljanje prognoze plimovanja morja. Te prognoze se izdelajo za leto vnaprej na ARSO in so tudi objavljene. Plimovanje morja je mešanega tipa, dnevno sta dve plimi in dve oseki. Srednja višina morja za obdobje med leti 1960 in 2010 znaša 217 cm. Najvišja višina morja je bila izmerjena 392 cm, najnižja pa 102 cm. Povprečna razlika med plimo in oseko je 66 cm. Poplave morja so posledica nadpovprečno visokih plim, ki jih povzročita zlasti padanje zračnega pritiska in močni južni vetrovi. Do poplav največkrat prihaja v jesensko-zimskem času. V obdobju med leti 2001 in 2010 je bila na mareografski postaji Koper srednja temperatura morja 17 °C, najvišja srednja dnevna temperatura vode na globini 1 m je bila 31,1 °C, najnižja srednja dnevna temperatura pa je bila 4,5 °C. Morski tok v smeri severozahoda poteka s hitrostjo 1,5 km/h (Kopalne vode, 2009).

Splošni podatki o kakovosti naravnih kopalnih voda - morje

Leta 2006 je Slovenija segala v sam vrh držav Evropske unije po kakovosti kopalnih voda na morju. Vse kopalne vode so izpolnjevale predpisane zahteve kopalne direktive. Priporočene zahteve je izpolnjevalo 84,2 % (16 od 19) kopalnih voda. Tudi leta 2008 je bila kakovost kopalnih voda zelo dobra. 18 od 19 (94,7 %) morskih kopalnih voda je ustrezalo strožjim, priporočenim zahtevam. V neskladni kopalni vodi je bila pred kopalno sezono določena povišana vrednost koliformnih bakterij fekalnega izvora (Kopalne vode, 2009).

Monitoring kakovosti kopalnih voda

Monitoring kakovosti kopalnih voda v letu 2010 je izvajala Agencija Republike Slovenije za okolje na 21 kopalnih vodah na morju, celinskih in morskih vodah. Vzorčenje je potekalo vsakih 14 dni, od 1. junija do 15. septembra (čas kopalne sezone), en vzorec kopalne vode pa je bil odvzet tudi tik pred začetkom kopalne sezone. Na kopalnih vodah se je v skladu izvajalo vzorčenje kopalnih voda ter organoleptični pregled kopalne vode z namenom ugotavljanja morebitnega razraščanja cianobakterij ali makro

alg oziroma morskega fitoplanktona ter morebitne prisotnosti drugih vrst onesnaženja, kot so plavajoči odpadki, steklo, plastika in podobno. Pri odvzetih vzorcih kopalne vode so opravljali analize prisotnosti intestinalnih enterokokov in *Escherichie coli*. Za zagotovitev kakovosti laboratorijskih analiz so izvajalci posameznih delov monitoringa kopalnih voda sodelovali v mednarodni medlaboratorijski primerjalni shemi. Tako podani rezultati monitoringa v letu 2010 izkazujejo, da vse kopalne vode na morju dosegajo predpisane zahteve glede kakovosti kopalne vode, kar predstavlja 100-odstotno skladnost. Tudi 100 odstotkov kopalnih voda na morju ustreza priporočenim zahtevam glede kakovosti kopalne vode (Kakovost kopalnih voda v kopalni sezoni 2010).

3. PRAKTIČNI (EKSPERIMENTALNI) DEL

3.1. Vzorčenje

V sklopu diplomskega dela smo izbrali vzorce morske vode in bazenske kopalne vode. Vzorce morske vode smo odvzeli na slovenski obali. Od Kopra do Portoroža smo vzorčili morsko vodo na sedmih krajih, kjer je gostota kopalcev največja. Vodo smo vzorčili na urejenih javnih kopališčih, vedno meter do dva od obale, ker se je tam zadrževalo največ kopalcev. Terensko vzorčenje smo opravljali na višku kopalne sezone v sredini avgusta, in sicer v nedeljo 14. in 21. avgusta 2011 popoldan, ko je bilo na kopališčih prisotnih največ kopalcev.

Vzorčenje bazenske vode pa je potekalo na Primorskem, Goriškem, Dolenjskem in Štajerskem. Skupno je bilo odvzetih šest vzorcev bazenskih vod. Z vzorčenjem bazenske vode smo zajeli skoraj vse tipe bazenskih kopalnih voda. Neposredne vzorce smo zajeli približno na sredini bazenov. Vsi bazeni, ki se uporabljajo za športne, rekreativne ali terapevtske namene, morajo imeti v času obratovanja zagotovljeno kontinuirano razkuževanje z rezidualnim učinkom. V tanamen uporabljajo klorove preparate, v zadnjem času pa je vse bolj razširjena elektroliza. Kopališča in kopalna voda v bazenih je strogo nadzorovana in mora izpolnjevati zahteve, ki so navedene v pravilniku o minimalnih higienskih zahtevah (Ur. list RS, 39/11). Ker je vzorčenje potekalo skorajda po vsej Sloveniji, smo vzorce zbirali od 27. julija do 24. septembra 2011.

Vzorce vode volumna en liter smo zajeli s čisto steklenico, v kateri smo jih hranili do dela v laboratoriju.

Vzorci bazenske vode, ki so bili namenjeni analizi v laboratoriju, so bili vzeti v skoraj vseh vrstah bazenskih kopališč. Tako smo imeli vzorce vode iz:

- dvoranskega bazena s sladko vodo in globino $x > 0,60$ m;
- bazen na prostem s sladko vodo in globino $x \leq 0,60$ m;
- bazen na prostem s sladko polnilno vodo in globino $x > 0,60$ m;
- bazen na prostem z naravno mineralno vodo – termalno in globino $\leq 0,60$ m;
- bazen na prostem z naravno mineralno vodo – termalno in globino $> 0,60$ m;
- kombinirani bazen z naravno mineralno vodo – termalno in globino $> 0,60$ m.

Bazen 1

Bazen 1 se nahaja v spa centru. Uvrstimo ga kot dvoranski bazen s sladko vodo in globino $> 0,60$ m. Globina vode v bazenu je 135 cm in ima ogrevano polnilno vodo. Bazen lahko naenkrat sprejme do 34 oseb.

V času vzorčenja, to je bilo 27. 7. 2011 ob 10.15, sta bila prisotna le dva kopalca.

Bazen 2

Bazen 2 je na kopališču, ki obsega zunanji olimpijski bazen, dva manjša zunanja otroška bazena in manjši notranji zimski bazen in ga uporablja letno okrog 28.000–30.000 obiskovalcev. Odprt je v poletnem času v povprečju približno 90 do 100 kopalnih dni s povprečjem približno 200 do 250 obiskovalcev dnevno. Vodo smo

vzorčili v otroškem bazenu, ki ga uvrstimo v skupino bazen na prostem s sladko polnilno vodo in globino > 0,60 m.

Vzorčenje vode je potekalo v četrtek, 18. 8. 2011, približno ob 14. uri, ko je bilo zelo veliko kopalcev.

Bazen 3

Bazen 3 je v hotelskem kompleksu, ki obsega 1.200 m² pokritih in zunanjih bazenskih površin. To je bazen na prostem s sladko polnilno vodo in globino > 0,60 m.

Vzorec bazenske vode smo vzeli v petek, 26. 8. 2011, približno ob 16. uri. V bazenu je bilo takrat veliko ljudi, saj se je ravno zaključila vodna odbojka. Tudi na splošno je bilo tisti dan veliko kopalcev, saj je bila temperatura zraka 35 °C.

Bazen 4, bazen 5

Kopališče, kjer najdemo bazen 4 in bazen 5, ima 10.000 m² termalnih vodnih površin, kjer je kopanje mogoče od sredine aprila do začetka oktobra. Tu najdemo veliko različnih vrst in oblik bazenov z različnimi vodnimi aktivnostmi. Bazen 4 je bazen na prostem s sladko vodo in globino ≤ 0,60 m, bazen 5 pa je bazen na prostem s sladko vodo in globino > 0,60 m.

Vzorca vode smo vzeli 22. 9. 2011, in sicer enega iz otroškega bazena bazen 4 in drugega iz večjega kopalnega bazena, ki smo ga poimenovali bazen 5. Kljub že končanim poletnim počitnicam je bilo še vedno veliko kopalcev.

Bazen 6

Kompleks, kjer najdemo bazen 6, uvrščamo med kopališča, aktivna celo leto. Tip bazena, kjer smo vzeli vzorec vode, je kombinirani bazen z naravno mineralno vodo – termalno in globino > 0,60 m.

Iz kombiniranega bazena smo vzeli vzorec vode v soboto, 24. 9. 2011.

Kopališče 1

Plaža se razprostira na približno 4.500 m² in je lepo urejena. Kopališče je delno pokrito s prodom in z veliko naravne sence. Na kopališču je dobro poskrbljeno za invalide in je tudi primerno za otroke. V času visoke sezone in v najboljših vremenskih razmerah je število kopalcev 1.500–2.000. Izdana je vodna pravica za neposredno rabo vode za dejavnost kopališča (naravno kopališče).

Podrobnejši podatki o značilnostih kopalne vode:

Največja širina plaže je 50 metrov.

Največja globina kopalne vode je 5,5 metra.

Morsko vodo smo vzorčili v nedeljo, 14. 8. 2011, ob 15.30. V času vzorčenja je bilo zelo veliko kopalcev.

Kopališče 2

Kopališče 2 obsega 15.000 kvadratnih metrov travnato–betonske površine z urejenimi dostopi v morje. Na kopališču med obratovanjem za kopalce skrbijo reševalci iz vode, ponoči pa je prisotna varnostna služba. V času visoke sezone in v najboljših vremenskih razmerah je prisotnih lahko tudi do 500 kopalcev. Izdana je vodna pravica za neposredno rabo vode za dejavnost kopališča (naravno kopališče).

Podrobnejši podatki o značilnostih kopalne vode:

Največja širina plaže je 70 metrov.

Največja globina kopalne vode je 5 metrov.

Vzorčenje morske vode je potekalo v nedeljo, 14. 8. 2011, približno ob 16.45, ko je bilo prisotnih zelo veliko kopalcev.

Kopališče 3

Tja pridemo lahko samo peš, saj do njega vodi sprehajalna pot. Za varnost kopalcev ni poskrbljeno – kopamo se na lastno odgovornost. Kakovost vode se spremlja na sredini območja. Podatek o številu kopalcev v času visoke sezone in najboljših vremenskih razmerah je 300. Status kopalne vode je kopalno območje.

Podrobnejši podatki o značilnostih kopalne vode:

Največja širina plaže je 10 metrov.

Največja globina kopalne vode je 5 metrov.

Vzorec morske vode smo vzeli na zelo toplem in sončnem danu, ko je bilo prisotnih veliko kopalcev, v nedeljo, 14. 8. 2011, ob 17.45.

Kopališče 4

Razteza se od naravnega kopališča do avtokampa in je dolga 3.160 metrov. Kopanje je omogočeno na celotnem območju. Tu se tudi redno pregleduje kakovost vode. Območje je lahko dostopno. Kopališče 4 je kombinirano kopališče. Večji del kopališča ima betonsko površino in nekaj trave. Število kopalcev v času visoke sezone in v najboljših vremenskih razmerah se giblje okoli 500. Status kopalne vode: izdana vodna pravica za neposredno rabo vode za dejavnost kopališča (naravno kopališče).

Podrobnejši podatki o značilnostih kopalne vode:

Največja širina plaže je 50 metrov.

Največja globina kopalne vode je 7 metrov.

Vzorec vode smo vzeli v nedeljo, 21. 8. 2011, približno ob 17. uri.

Kopališče 5

Kopališče 5 se razprostira v dolžini 1.400 metrov in ima tudi lepo urejeno sprehajalno pot. Kakovost vode se spremlja na sredini območja. Število kopalcev v času visoke sezone in v najboljših vremenskih razmerah je 500. Status kopalne vode: kopalno območje.

Podrobnejši podatki o značilnostih kopalne vode:

Največja širina plaže je 10 metrov.

Največja globina kopalne vode je 9 metrov.

21. 8. 2011 smo ob 17.30 vzeli vzorec morske vode na kopališču 5.

Kopališče 6

Je kopalno območje, primerno za invalide. Na kopališču je veliko sence in igral, zato je kopališče primerno za družine z mlajšimi otroci. V času visoke sezone in v najboljših vremenskih razmerah je na kopališču 1.000 kopalcev. Status kopalne vode: kopalno območje.

Podrobnejši podatki o značilnostih kopalne vode:

Največja širina plaže je 100 metrov.

Največja globina kopalne vode je 8 metrov.

Na kopališču 6 smo v nedeljo, 21. 8. 2011, ob 19.30 vzorčili morsko vodo. Kljub relativno pozni uri je bilo prisotnih še veliko kopalcev.

Kopališče 7

Plaža je primerno urejena tudi za invalidne obiskovalce. Za varnost kopalcev skrbijo reševalci iz vode, za red pa redar. Redno se spremlja kakovost vode na sredini kopališča. Senca in travnate površine kopališča so primerne za otroke, živali pa je tja prepovedano voditi. Število kopalcev v času visoke sezone in v najboljših vremenskih razmerah je 600. Status kopalne vode: izdana vodna pravica za neposredno rabo vode za dejavnost kopališča (naravno kopališče).

Podrobnejši podatki o značilnostih kopalne vode:

Največja širina plaže je 50 metrov.

Največja globina kopalne vode je 6,5 metrov.

Vzorec vode smo vzeli v sredo, 24. 8. 2011, ob 13.30 na zelo obiskanem kopališču 7.

Na Sliki 7 so prikazana nekatera vzorčna mesta, in sicer trije primeri morskih kopališč in eno bazensko kopališče.



Slika 7: Vzorčna mesta (fotografija, Tjaša Simčič, 2011)

3.2. MATERIALI IN METODE

3.2.1. Kemikalije in reagenti

- Deionizirana voda; prevodnost < 18 M Ω cm
- Metanol, za HPLC p.a., 99,8% čistost, Sigma - Aldrich
- Diklorometan p.a., 99,8% čistost, Merck
- Aceton a.r., 99,5+% čistost, Sigma - Aldrich
- BP3 (2-hidroksi-4-metoksibenzofenon), 98%, Sigma - Aldrich
- BP4 (2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kislina)
- 3-Cl BP3, (3-kloro-2-hidroksi-4-metoksifenil) fenilmetanon, sintetiziran predhodno, kot je opisano v diplomskem delu Dobravc, 2010
- 5-Cl BP3, (5-kloro-2-hidroksi-4-metoksifenil) fenilmetanon, sintetiziran predhodno, kot je opisano v diplomskem delu Dobravc, 2010
- 3,5-diCl BP3, (3,5-dikloro-2-hidroksi-4-metoksifenil) fenilmetanon, sintetiziran predhodno, kot je opisano v diplomskem delu Dobravc, 2010

3.2.2. Vzorčenje in priprava vzorcev

Vzorčenje bazenske kopalne in morske vode smo izvedli vedno v popoldanskih urah v najtoplejših mesecih leta. Vzorce vode sem zajela v označeno steklenico volumna en

liter približno 0,5 m do 1 m od obale, jih močno zaprla in jih med transportom hranila v hladilni skrinji.

Vzorci v steklenici sem do nadaljnjega analiziranja v laboratoriju, ki se je pričelo 27. 9. 2011, hranila v temnem prostoru, v hladilniku pri temperaturi 4°C. Vzorcev nismo začeli takoj analizirati, ker so iskane snovi, BP3, BP4, 3,5-diCl BP3 in 5-Cl BP3, zelo obstojne. Drugih parametrov pri tem vzorčenju nismo merili, pomembno je bilo le, da smo vzorčili v času, ko je na kopališčih prisotnih največ kopalcev in s tem največji vnos iskanih spojin v kopalne vode.

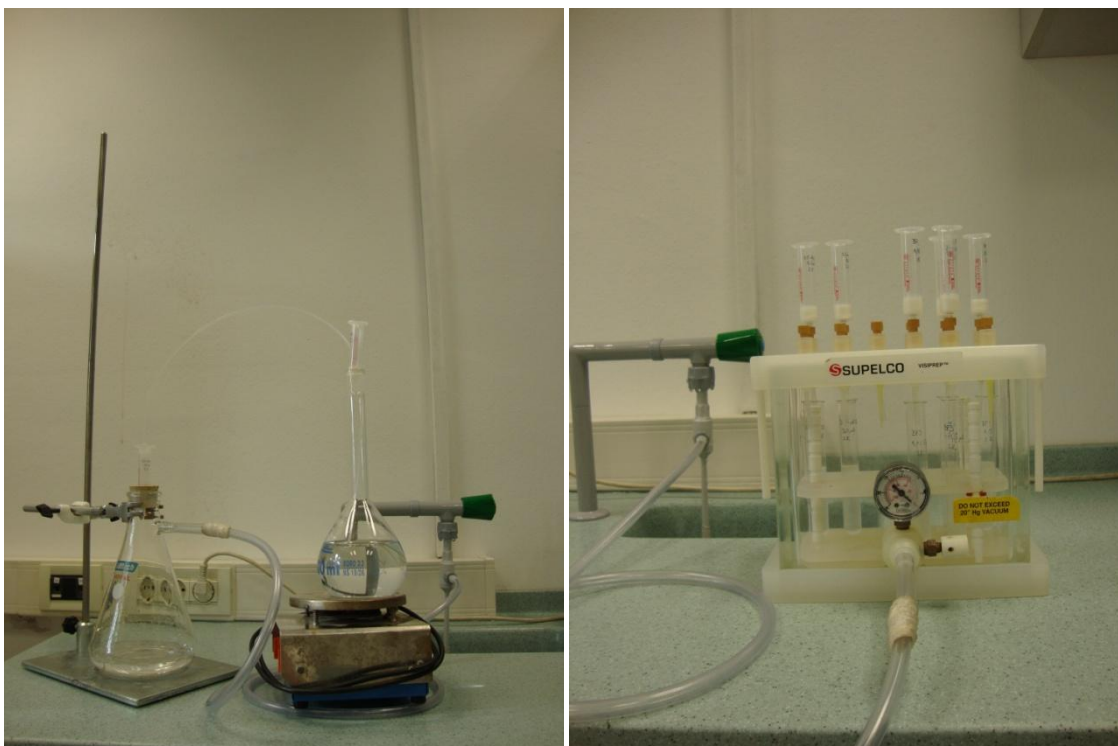
V vzorcih vode ni bilo vidnih plavajočih delcev in kasneje usedlin, zato posebna predpriprava vode za analizo ni bila potrebna. Vzorce sem za analizo razdelila na dva dela, tako da sem imela dve paralelki vzorcev volumna 500 mL.

3.2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcijska metoda je temeljila na navodilih proizvajalca SPE kolon. Tako smo uporabljali kolone strata-X 500 mg/6 mL za ekstrakcijo na trdni fazi, ki je potekala v treh fazah:

- prva faza: kondicioniranje naredimo z 5 mL metanola, kateremu sledi še 5 mL deionizirane vode;
- druga faza: 500 mL vzorca vode spustimo skozi kolono;
- tretja faza: izpiranje. Brizgo strata-X speremo najprej s 5 mL acetona in nato še s 5 mL diklorometana (elucija).

Za izvedbo prvih dveh faz ekstrakcije smo naredili vodno črpalko (Slika 8 levo), pri tretji fazi pa smo uporabili vodno črpalko, ki je namenjena prav delu z brizgalkami (Slika 8 desno). V tretji fazi smo končni ekstrakt ulovili v epruvetke. Za HPLC analizo pa smo morali vzorce še skoncentrirati na manjši volumen ter jih nato raztopiti v točno določenem volumnu topila oziroma mobilne faze (Countryman in sod., 2002).



Slika 8: Postopek ekstrakcije z vodno črpalko (fotografija: Tjaša Simčič, 2012)

3.4. Koncentriranje / Izparevanje

Raztopino iz epruvetk smo prelili v ustrezne bučke za uparevanje na rotavaporju (Slika 9). Z uporabo rotavaporja smo odparili vso tekočino. Preostanek smo nato raztopili točno v 1 oz. 0,5 mL acetonitrila, raztopino prenesli v 1000 μ L vialo in jo nepredušno zaprli. Vzorec je bil tako pripravljen na analizo s HPLC.



Slika 9: Rotacijski vakuumski uparjevalnik (rotavapor) (fotografija: Tjaša Simčič, 2012)

3.5. Analiza

Analizo UV filtrov in njihovih kloriranih produktov na visokotlačni tekočinski kromatografiji (HPLC) smo izvajali na Agilent 110 o instrumentu (Slika 10):

Kolona: Zorbax C8 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)

Metoda: BP3 – ROMINA1

Mobilna faza: CH₃CN / dH₂O (CH₃COOH)

Acetonitril/deionizirana voda (etanojska oziroma očetna kislina)



Slika 10: Visokotlačni tekočinski kromatograf (HPLC) v laboratoriju na Univerzi v Novi Gorici (fotografija: Tjaša Simčič, 2012)

3.6. Priprava raztopin

3.6.1. Določanje minimalnega volumna vzorca za analizo

Na osnovi literaturnih podatkov (Cuderman in sod., 2006) smo se odločili, da najprej preverimo standardne raztopine BP3, BP4, 5-Cl BP3 in 3,5-diCl BP3 s koncentracijo 1 mg/L in nižje, pri čemer smo za pripravo raztopin s koncentracijo 1 mg/L najprej zatehtali določeno količino suhe snovi (BP3, BP4, 5-Cl BP3 in 3,5-diCl BP3), ki smo jo raztopili v acetonitrilu v 10 mL bučki. Dobljeno raztopino smo nato redčili z deionizirano vodo, da smo dobili končno raztopino s koncentracijo 1 mg/L v 1000 mL bučki.

V Preglednici 6 so v prvem stolpcu spojine, na katere se nanaša vrstica, v drugem stolpcu je napisana zatehta osnovne spojine, ki smo jo raztopili v 10 mL acetonitrila. V naslednjem stolpcu je podana dobljena koncentracija in v zadnjem stolpcu preglednice je podan volumen pripravljene raztopine, ki smo ga odmerili in razredčili z deionizirano vodo v 1000 mL bučki, da smo dobili končno koncentracijo raztopine 1 mg/L.

Preglednica 6: Postopek priprave raztopin s $c=1$ mg/L

Raztopina	Zatehta [mg]	Koncentracija [g/L]	V_1 za 1 mg/L [mL]
BP3	4,8	0,48	2,08
BP4	4,9	0,49	2,04
3,5-diCl BP3	5,0	0,50	2,00
5-Cl BP3	2,8	0,56	1,79

3.6.1.1. Priprava redčitev do volumna 100 mL

Raztopine BP3, BP4, 3,5-diCl BP3 in 5-Cl BP3 s koncentracijami 1 mg/L, ki smo jih pripravili, kot je prikazano v Preglednici 6, smo nadalje redčili z deionizirano vodo v različnih razmerjih do končnega volumna 100 mL. Postopek redčitve je podan v Preglednici 7.

c_1 je koncentracija raztopine, ki smo jo redčili.

V_1 je volumen redčitvene raztopine.

V_2 je volumen deionizirane vode, ki smo ga dolili do oznake, oziroma $V_2 = 100 - V_1$.

c_2 je bila novo dobljena koncentracija raztopine.

Oznake A, B, C, D so predstavljale vrstni red redčitev. A je bila raztopina s koncentracijo 1 mg/L, ki smo jo dobili po opravljenem postopku, prikazanem v Preglednici 6. B je nato 10-kratna redčitev, C 100-kratna in D 1000-kratna redčitev.

Preglednica 7: Priprava redčitev

Oznaka	c_1 (mg/L)	V_1 (mL)	V_2 (mL)	c_2 (mg/L)
A	1	100	0	1
B	1	10	90	0,1
C	1	1	99	0,01
D	1	0,1	99,9	0,001

Sledila je ekstrakcija in nato izparevanje pripravljenih raztopin po postopku, kot je bil opisan v podpoglavju 3.2.3. Ekstrakcija.

Posušene vzorce smo raztopili v 1 mL acetonitrila. Raztopino pa smo nato prenesli v vialo ($V = 1 \text{ mL}$).

Sledila je še analiza na HPLC.

Pri zadnji, tisočkratni redčitvi raztopine s koncentracijo 1 mg/L (koncentracije 1 $\mu\text{g/L}$) na HPLC nismo zasledili signala, ki bi ustrezal raztopinam BP3, BP4, 3,5-diCl BP3 in 5-Cl BP3, zato smo nadalje te vzorce z najnižjo koncentracijo 1 $\mu\text{g/L}$ koncentrirali, in sicer tako, da smo namesto 100 mL koncentrirali 500 mL vzorca.

Pri tem volumnu, 500 mL, smo dobili odziv na HPLC-DAD instrumentu, zato smo v nadaljevanju pripravljali 500 mL vzorce.

Analiziranje vzorca BP4 opustimo, ker ne moremo določiti signala, saj je retenzijski čas spojine BP4 pri času približno 4 minute. V tem času imamo tudi druge moteče signale, ki so prisotni v ozadju in zato signala BP4 ni mogoče določiti.

3.6.1.2. Priprava 500 mL vzorcev za pripravo umeritvene krivulje

Iz raztopin s koncentracijo 1 mg/L (pripravljenih po postopku, opisanem v Preglednici 6) smo pripravili redčitve v dveh paralelkah po postopku, opisanem v Preglednici 8.

Preglednica 8: Priprava vzorcev različnih koncentracij

Oznaka	V [mL] raztopine $c=1 \text{ mg/L}$	V [mL] bučke	c [$\mu\text{g/L}$]
V1/1	0,75	500	1,5
V1/2	0,75	500	1,5
V2/1	0,5	500	1
V2/2	0,5	500	1
V3/1	0,25	500	0,5
V3/2	0,25	500	0,5
V4/1	0,125	500	0,25
V4/2	0,125	500	0,25

Legenda k Preglednici 8: črka V je simbol za vzorec, 1/1 in 1/2 pa je oznaka, da je to bil prvi vzorec prve oziroma druge paralelke.

V 500 mL bučko smo odpipetirali volumen raztopine, ki je podan v drugem stolpcu Preglednice 8, nato pa še do oznake 500 mL dopolnili z deionizirano vodo.

Vzorce smo ekstrahirali in jih nato koncentrirali oziroma izsušili do suhega z rotavaporjem. Posušene vzorce smo raztopili v 0,5 mL acetonitrila, jih prenesli v vialo in naredili HPLC analizo.

Postopek je enak za vse tri (BP3, 3,5-diCl BP3 in 5-Cl BP3) iskane spojine.

V nadaljnjem eksperimentalnem delu smo naredili še štiri redčitve v dveh paralelkah, in sicer z višjo koncentracijo, kot je prikazano v Preglednici 9.

Preglednica 9: Priprava dodatnih vzorcev BP3 in 3,5-diCl

Spojina	V [mL] raztopine c=1 mg/L	V [mL] bučke	c [µg/L]
1/1 BP3	1,125	500	2,25
1/2 BP3	1,125	500	2,25
2/1 BP3	1,500	500	3,00
2/2 BP3	1,500	500	3,00
3/1 3,5-diCl	1,500	500	3,00
3/2 3,5-diCl	1,500	500	3,00
4/1 3,5-diCl	3,000	500	6,00
4/2 3,5-diCl	3,000	500	6,00

Legenda k Preglednici 9: 1/1 in 1/2 oznaki nakazujeta, kateri vzorec po vrsti smo analizirali (prva številka) in katera paralelka je bila (druga številka) ter kateri spojini je pripadal vzorec.

Postopek priprave vzorca pred analizo:

V 500 mL bučkah smo naredili razredčitve, kot je opisano v Preglednici 9. Nato je sledila ekstrakcija. Takrat smo pri eluciji sprali brizgo z 5 mL acetona in 2 x po 5 mL diklorometana. Izparevanje smo naredili na novi napravi v laboratoriju, z novim koncentradorjem.

Na posnetih kromatogramih nismo zasledili signalov, ki bi ustrezali spojinam, preiskovanim v naši raziskavi. Vzrok za to bi lahko bila previsoka temperatura, ki smo jo nastavili na novem koncentradorju. Pri starem rotavaporju izparevanje poteka pri temperaturi okrog 30 °C, medtem ko je bila na novem koncentradorju bistveno višja in je zato možno, da so izparele tudi naše spojine. Možni vzrok bi lahko bile tudi plastične posodice, v katere smo dali vzorec, ki smo ga koncentrirali. Med postopkom priprave vzorca smo pred uporabo novega koncentradorja vedno uporabljali vse pripomočke iz stekla, razen kapalk in nastavkov na avtomatskih pipetah.

Ponovno smo pripravili vzorce 3,5-diCl BP3, tokrat v dveh paralelkah. Ekstrahirali smo po navodilih – pri eluciji smo sprali brizgo z 5 mL acetona in 5 mL diklorometana. Vzorce smo odparili, in sicer prvo paralelko z rotavaporjem, drugo pa ponovno z novim koncentradorjem. Tokrat nismo uporabili plastičnih posodic, ampak steklene epruvice. Rezultate smo nato po HPLC analizi med seboj primerjali.

3,5-diCl BP3

c = 0,00300 mg/L (rotavapor); t = 21,104; A = 224,8

c = 0,00300 mg/L (koncentrador); t = 21,065; A = 79

c = 0,00600 mg/L (rotavapor); t = 20,953; A = 560,1

c = 0,00600 mg/L (koncentrador); t = 20,923; A = 327,1

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Primerjava rezultatov meritev pri ekstrakciji različnih volumnov

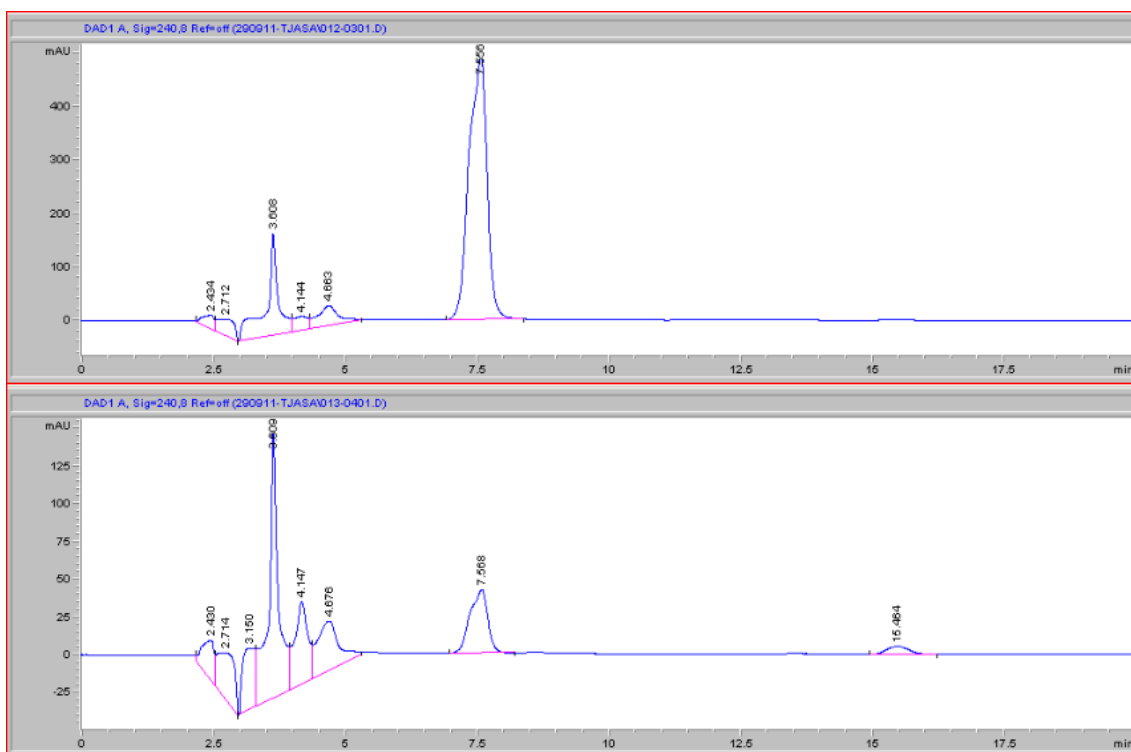
Optimiziranje volumna vzorca za ekstrakcijo: Primerjava absorbance raztopine s koncentracijo 1 µg/L, pri čemer drugi stolpec Preglednice 10 predstavlja absorbanco pri ekstrahiranju 100 mL vzorca, tretji stolpec pa absorbanco vzorca po ekstrakciji 500 mL vzorca.

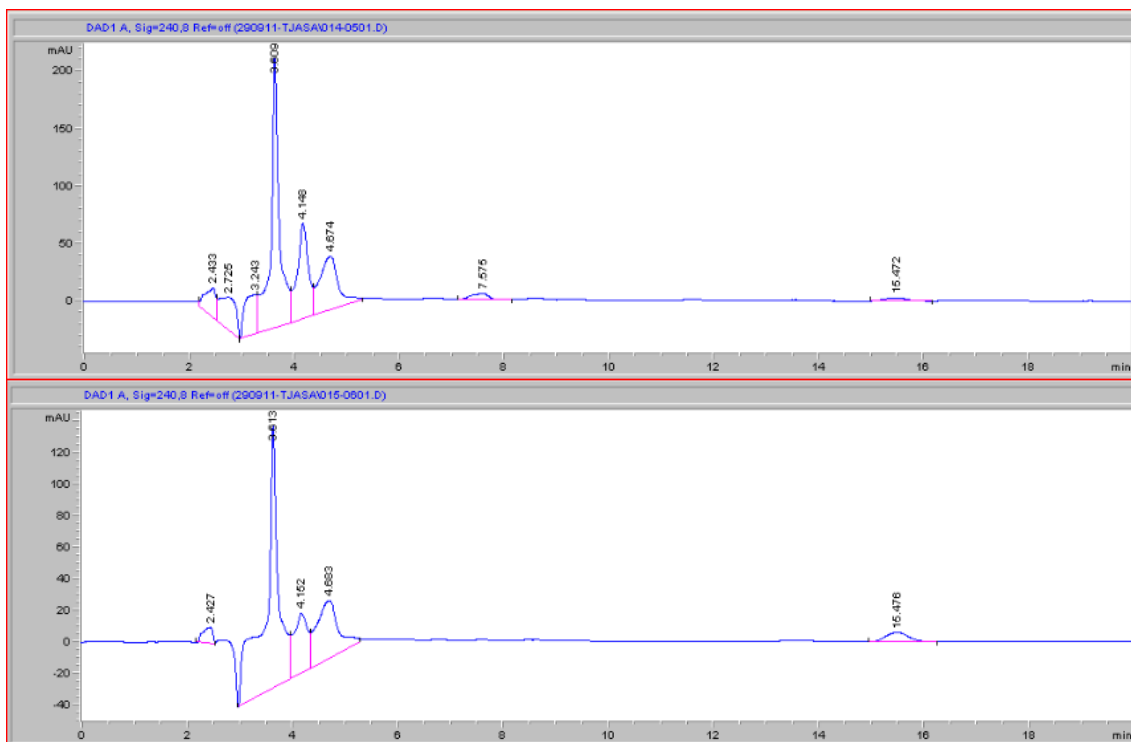
Preglednica 10: Optimiziranje volumna vzorca za ekstrakcijo

Spojina	Absorbanca pri V=100 mL	Absorbanca pri V=500 mL
BP3	p.m.d.	155,7
3,5-diCl BP3	p.m.d.	228,25
5-Cl BP3	p.m.d.	101,35

p.m.d. – pod mejo detekcije

Ker smo detektirali signale vseh treh spojin le pri volumnu ekstrahiranega vzorca 500 mL, smo nadaljevali z analiziranjem vseh nadaljnjih vzorcev pri volumnu 500 mL. Primeri detekcije signala spojine BP3 pri različnih koncentracijah so prikazani na Sliki 11. Koncentracija pada, zato se niža tudi signal, ki ga detektiramo pri času 7,5 min.





Slika 11: Primer detekcije signal spojine BP3 pri različnih koncentracijah

Težave pri ekstrakciji

Ustreznejše rezultate smo dobili po odparevanju topila z rotavaporjem. Z uporabo koncentratorja smo dobili nižje vrednosti absorbance. Po predvidevanjih je prišlo do tega, ker smo imeli na koncentratorju temperaturo nastavljeno na 60 °C, medtem ko je delovna temperatura pri rotavaporju 35 °C. Pri tako visoki temperaturi, 60 °C, je mogoče, da je istočasno s topilom delno odpareval tudi naš vzorec, saj so se na pokrovu koncentratorja pojavile bele lise.

V naslednjem postopku priprave različnih koncentracij raztopin smo ponovno pripravili vzorce standardov po postopku iz Preglednice 9 in jih analizirali.

Pripraviti pa smo morali tudi umetno onesnaženo morsko vodo in ustrezne umeritvene krivulje, saj smo analizirali tudi vzorce morske vode.

Glede analize realnih vzorcev morskih in bazenskih kopalnih vod smo se odločili, da bomo izvedli ekstrakcijo v dveh paralelkah z volumnom vode 500 mL, jih koncentrirali na trdnih nosilcih, topilo, s katerim smo preiskovane spojine sprali z nosilcev, pa uparili na rotavaporju.

4.2. Učinkovitost ekstrakcije

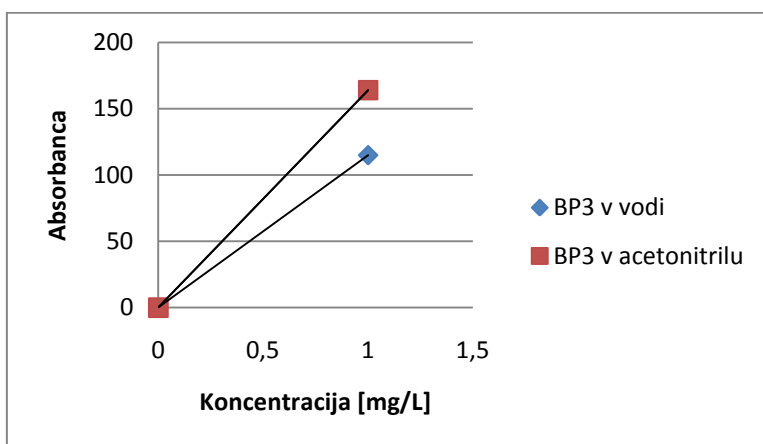
Izkoristek ekstrakcije za spojine BP3, 5-Cl BP3 in 3,5-diCl BP3 smo izračunali tako, da smo primerjali absorbanco (A_0) raztopin iskanih spojin s koncentracijo 1 mg/L volumna 10 mL v acetonitilu ter absorbanco (A) raztopin s koncentracijo 1 µg/L v vodi. Uporabili smo raztopino s koncentracijo 1 µg/L volumna 0,5 L in dobili 0,5 µg iskane spojine,

katero smo raztopili v 0,5 mL acetonitrila. Tako smo dobili koncentracijo iskanih spojin (BP3, 5-Cl BP3 in 3,5-diCl BP3) 1 mg/L. Absorbance smo med seboj primerjali in na koncu izračunali izkoristek po formuli A / A_0 .

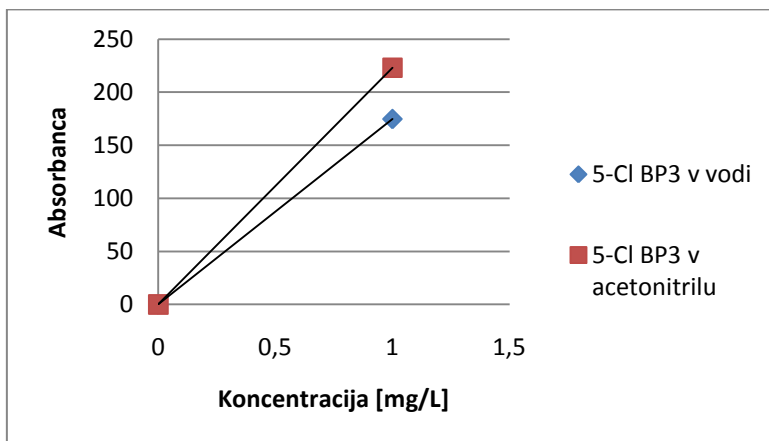
Izkoristek ekstrakcije:

- BP3: $A = 115$ $A_0 = 164$ Izkoristek ekstrakcije = 70,12 %
- 5-Cl BP3: $A = 174,7$ $A_0 = 223$ Izkoristek ekstrakcije = 78,34 %
- 3,5-diCl BP3: $A = 101,35$ $A_0 = 146,8$ Izkoristek ekstrakcije = 69,04 %

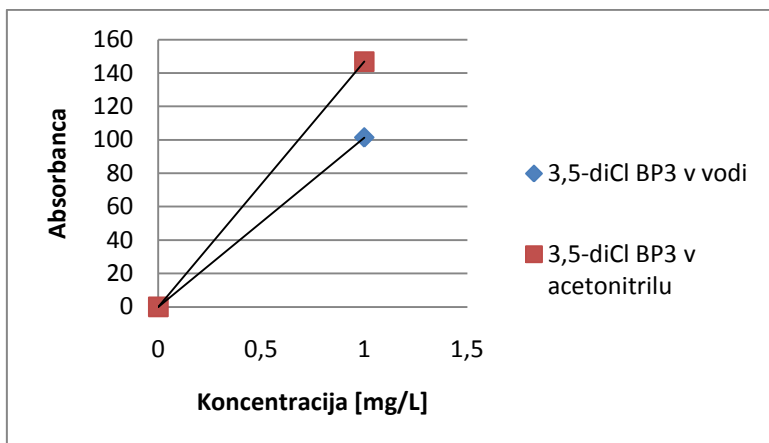
Primerjava absorbanc ekstrakcij spojin BP3, 5-Cl BP3 ter 3,5-diCl BP3 v vodi in v acetonitrilu so prikazane na Slikah 12, 13 in 14.



Slika 12: Primerjava absorbanc ekstrakcije BP3 v vodi in v acetonitrilu



Slika 13: Primerjava absorbanc ekstrakcije 5-Cl BP3 v vodi in v acetonitrilu

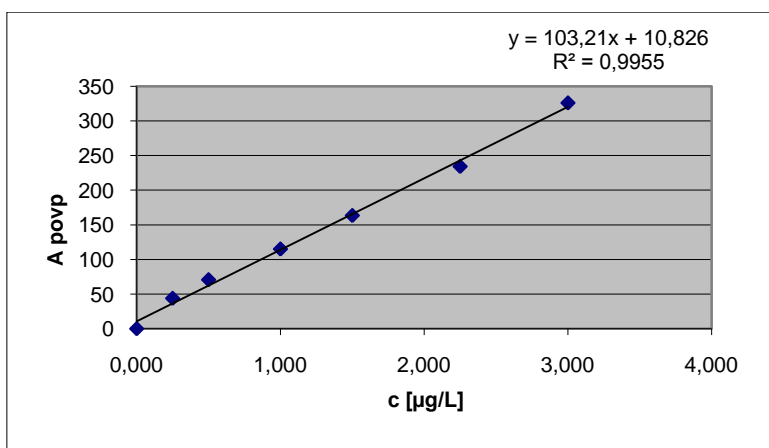


Slika 14: Primerjava absorbanc ekstrakcije 3,5-diCl BP3 v vodi in v acetonitrilu

4.3. Umeritvene krivulje za posamezne spojine

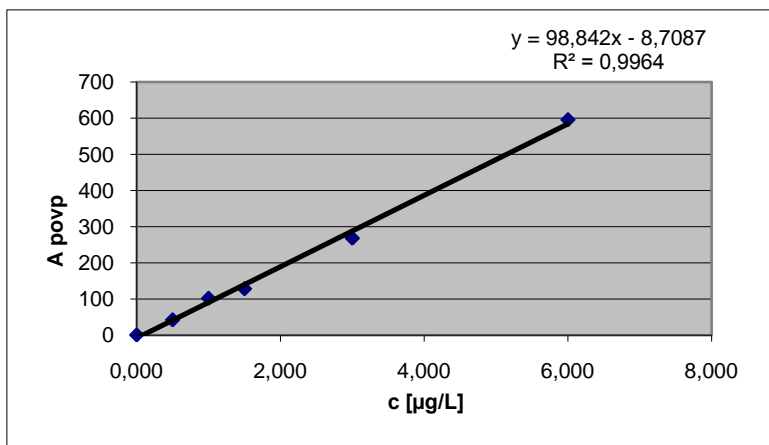
V nadaljevanju so prikazane umeritvene krivulje za vsako spojino posebej; v območju 0–3 µg/L za BP3 in 0–6 µg/L za 3,5-diCl BP3 ter 5-Cl BP3 v območju 0–1,5 µg/L. Vsaka točka predstavlja povprečno vrednost dveh meritev vzorca.

Na Sliki 15 smo v grafu prikazali umeritveno krivuljo za spojino BP3.



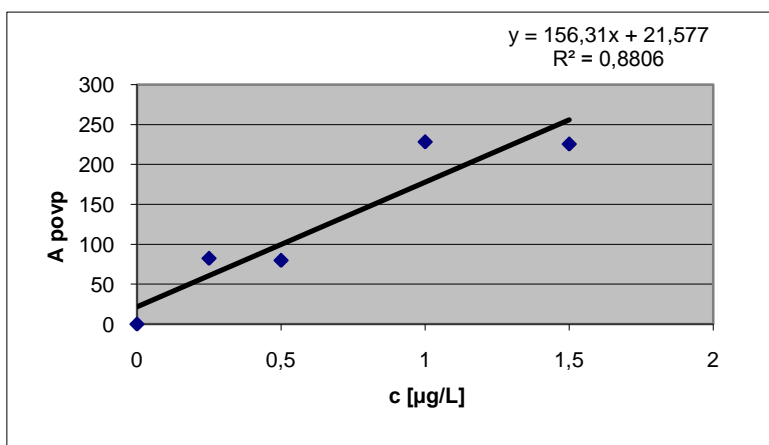
Slika 15: Umeritvena krivulja spojine BP3 brez odstopajočih podatkov

Prav tako kot smo naredili umeritveno krivuljo za spojino BP3, smo naredili tudi umeritveno krivuljo za spojino 3,5-diCl BP3 (Slika 16).



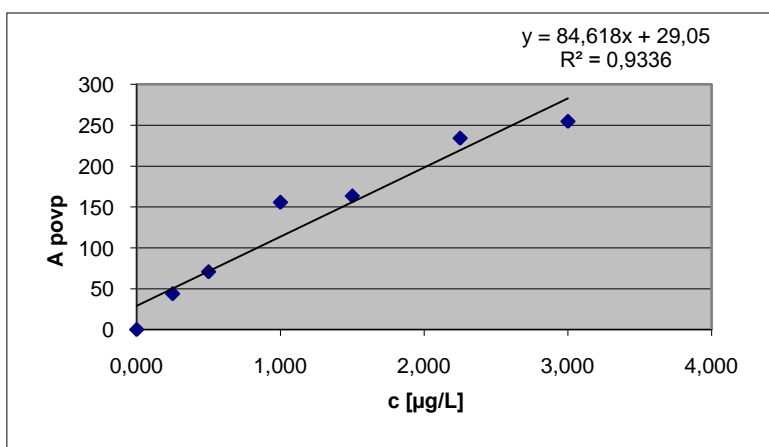
Slika 16: Umeritvena krivulja spojine 3,5-diCl BP3 brez odstopajočih podatkov

Na Sliki 17 je prikazana še umeritvena krivulja spojine 5-Cl BP3.



Slika 17: Umeritvena krivulja absorbance redčin za spojino 5-Cl BP3

Slika 18 pa predstavlja umeritveno krivuljo umetno onesnažene morske vode, kjer določamo BP3, saj to spojino določimo v realnih vzorcih morske vode.



Slika 18: Umeritvena krivulja BP3 v slani vodi

4.3.1. Meja detekcije in meja kvantifikacije

Mejo detekcije oziroma »limit of detection« (LOD) definiramo kot najmanjši signal analita, ki ga še lahko ločimo od šumov ozadja. Izračunamo ga po spodnji enačbi, kjer je standardni odklon ozadja s_D in k naklon premice.

$$\text{LOD} = (3 \times s_D) / k$$

Meja kvantifikacije oziroma »limit of quantification« (LOQ) pa pove, katera je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko določimo z ustrezno natančnostjo in točnostjo. Mejo kvantifikacije izračunamo podobno kot mejo detekcije, le da količnik standardnega odklona in naklona premice pomnožimo s faktorjem 10.

$$\text{LOQ} = (10 \times s_D) / k$$

Tako smo določili mejo detekcije in mejo kvantifikacije za iskane spojine.

BP3

$$s_D = 60,55$$

$$k = 103,21 \quad \text{LOD} = 1,76 \quad \text{LOQ} = 5,87$$

5-Cl BP3

$$s_D = 90,83$$

$$k = 156,31 \quad \text{LOD} = 1,74 \quad \text{LOQ} = 5,81$$

3,5-diCl BP3

$$s_D = 21,33$$

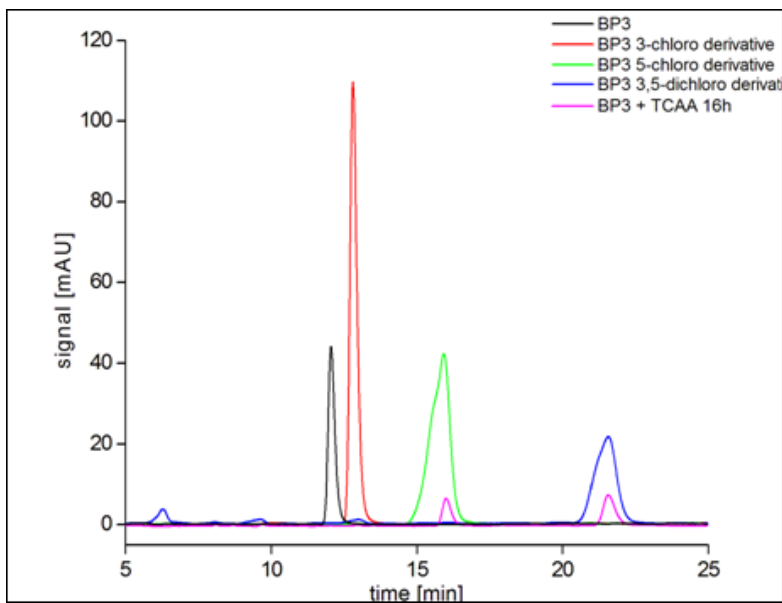
$$k = 98,842 \quad \text{LOD} = 0,65 \quad \text{LOQ} = 2,16$$

4.4. Analiza vzorcev vode

Vzorci vode obsegajo bazenske kopalne vode in morsko vodo iz slovenskih kopališč. Vzorce vode smo zajeli v dveh paralelkah zaradi bolj točnega končnega rezultata ter medsebojne primerjave in kontrole dela. Prvo paralelko smo označili s črko A, drugo pa s črko B.

V Preglednicah 11 in 12 so podani rezultati analiz vod iz bazenov in morja. V nekaterih od njih smo določili prisotnost spojin BP3, 3,5-diCl BP3 in 5-Cl BP3.

Da pa smo lahko iz izmerjenih rezultatov določili, za katero spojino gre, smo imeli že predhodno določene retenzijske čase za metodo, s katero smo delali. Ti časi so prikazani v kromatogramu na Sliki 19.



Slika 19: Kromatogram retenzijskih časov za določitev spojin BP3, 5-Cl BP3 in 3,5-diCl BP3

Preglednica 11: Absorbance vzorcev morske vode v dveh paralelkah

Vzorec	Absorbanca			Absorbanca Povpr.
	BP3	3,5-diCl BP3	5-Cl BP3	
Morje1 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje1 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje2 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje2 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje3 A	190,8	p.m.d.	p.m.d.	184,4 ± 6,5
Morje3 B	177,9	p.m.d.	p.m.d.	
Morje4 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje4 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje5 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje5 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje6 A	p.m.d.	p.m.d.	88,8	88,8
Morje6 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje7 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje7 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	

p.m.d. – pod mejo detekcije

Preglednica 12: Absorbance vzorcev bazenske vode v dveh paralelkah

Vzorec	Absorbanca			Absorbanca Povpr.
	BP3	3,5-diCl	5-Cl	
Bazen1 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen1 B	39,2	p.m.d.	p.m.d.	39,2
Bazen2 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen2 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen3 A	p.m.d.	563	p.m.d.	638,2 ± 75,2
Bazen3 B	p.m.d.	713,4	p.m.d.	
Bazen4 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen4 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen5 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen5 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen6 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen6 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	

p.m.d. – pod mejo detekcije

Iz zgornjih tabel (Preglednica 11, 12) je razvidno, da smo v šestih vzorcih vode z analizo HPLC in predhodno pripravo vode z ekstrakcijo in koncentriranjem določili prisotnost UV filtrov ali njihovih kloriranih produktov.

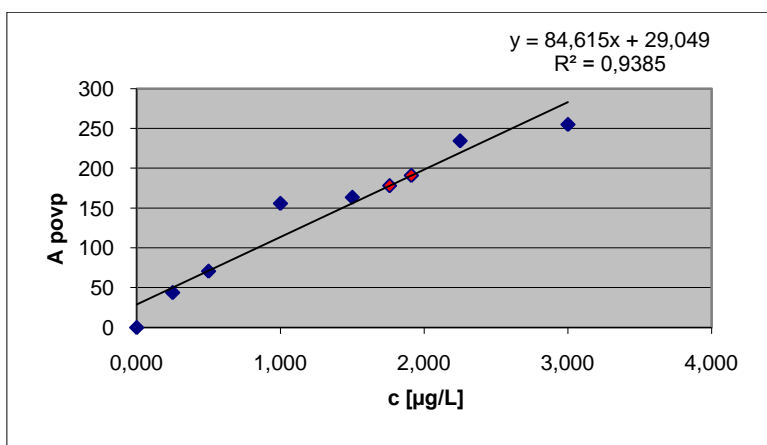
Pri bazenskih vodah smo v enem vzorcu bazenske vode z analizo določili UV kloriran produkt 3,5-diCl BP3, v drugem vzorcu pa smo dobili rezultat, da je prisoten UV filter BP3.

Vzorci morske vode pa podajo rezultat o prisotnosti UV filtra BP3 in kloriranega produkta 5-Cl BP3.

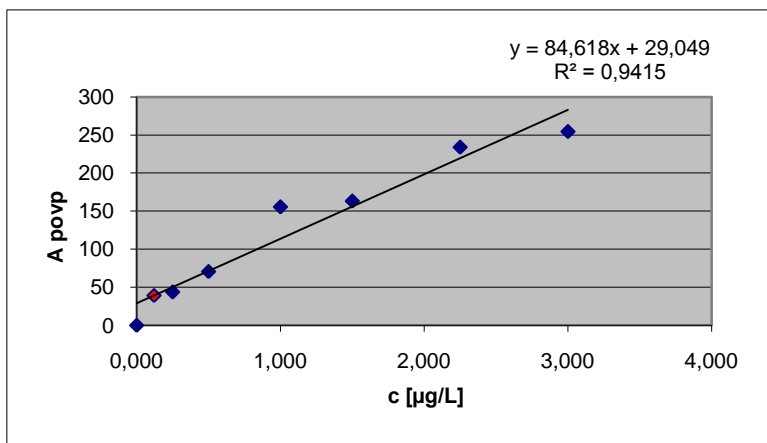
Da lahko določimo še koncentracije UV filtrov in kloriranih produktov, ki smo jih izmerili v bazenski in morski vodi, si pomagamo z umeritvenimi krivuljami, ki smo jih naredili iz standardnih raztopin in redčitev.

BP3

V umeritveno krivuljo, ki je na Sliki 15, dodamo izmerjene absorbance spojine BP3, ki smo jih določili v bazenu in morju. Rezultata sta prikazana na Sliki 20 in Sliki 21.



Slika 20: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije BP3 v vzorcih morske kopalne vode



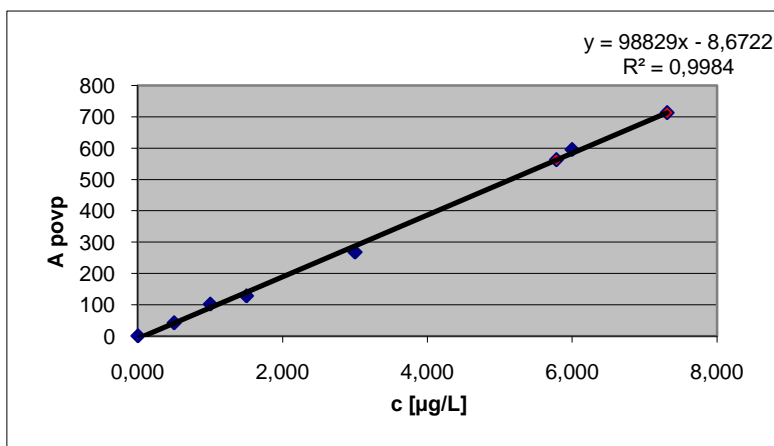
Slika 21: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije BP3 v vzorcu bazenske kopalne vode

Tako lahko določimo koncentracijo spojine, ki se je nahajala v morju oziroma v bazenu v času vzorčenja po izračunu:

$$c = (A - 10,826) / 103208$$

3,5-diCl BP3

Prav tako kot za BP3 naredimo za spojino 3,5-diCl BP3, da v umeritveno krivuljo, ki je na Sliki 16 dodamo izmerjene absorbance spojine 3,5-diCl BP3, ki smo jih določili v bazenu 3. Rezultat je prikazan na Sliki 22.



Slika 22: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 3,5-diCl BP3 v vzorcih bazenske kopalne vode

Tako lahko po enačbi določimo koncentracijo spojine, ki se je nahajala v bazenu 3 v času vzorčenja:

$$c = (A + 8,7087) / 98842$$

5-Cl BP3

Spojine 5-Cl BP3 ne določamo, ker je bila izmerjena absorbanca prenizka za določanje koncentracije. Pripravili smo eno serijo standardov z različnimi koncentracijami, vendar umeritvena krivulja ni reprezentativna, ker rezultati istih koncentracij v paralelkah močno odstopajo. To je tudi lepo razvidno iz umeritvene krivulje 5-Cl BP3 na Sliki 17.

Preračunane koncentracije preiskovanih spojin v morski in bazenski vodi so podane v Preglednici 13.

Preglednica 13: Koncentracije iskanih spojin v vzorcih bazenske in morske kopalne vode

Vzorec	Koncentracija [$\mu\text{g/L}$]			Koncentracija Povpr.
	BP3	3,5-diCl BP3	5-Cl BP3	
Bazen1 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen1 B	0,3	p.m.d.	p.m.d.	0,3
Bazen2 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen2 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen3 A	p.m.d.	5,8	p.m.d.	6,6 \pm 0,8
Bazen3 B	p.m.d.	7,3	p.m.d.	
Bazen4 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen4 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen5 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen5 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen6 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Bazen6 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje1 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje1 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje2 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje2 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje3 A	1,7	p.m.d.	p.m.d.	1,7 \pm 0,1
Morje3 B	1,6	p.m.d.	p.m.d.	
Morje4 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje4 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje5 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje5 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje6 A	p.m.d.	p.m.d.	/	/
Morje6 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje7 A	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	
Morje7 B	p.m.d.	p.m.d.	p.m.d.	

p.m.d. – pod mejo detekcije

V diplomskem delu smo določevali prisotnost UV filtrov in njihovih kloriranih produktov v bazenskih vodah kopališč na območju Nove Gorice in slovenske obale ter drugih slovenskih kopališčih ter v morski vodi na območju slovenskega primorja. Tako smo imeli od skupno trinajst vzorcev šest vzorcev bazenskih vod in sedem vzorcev morske vode.

Za določevanje UV filtra BP3 smo uporabili literaturni vir (Cuderman in Heath, 2007), medtem ko za določanje kloriranih produktov 5-Cl BP3 in 3,5-diCl BP3 še ni literarnih podatkov in je to zaenkrat prva študija.

V študiji Cuderman in Heath (2007), ki je po opisu poteka raziskave in analize določanja UV filtra BP3 podobna našemu postopku, so benzofenon-3 določili v koncentracijah 11-400 ng/L. Díaz-Cruz in Barceló (2009) sta pri določanju UV filtrov najpogosteje zaznala BP3 v naravnih vodah s koncentracijskimi vrednostmi med 2-125 ng/L ter BP3 v bazenih s koncentracijo 400 ng/L. Brausch in Rand (2011) pa sta v raziskavi prisotnosti BP3 v švicarskih jezerih prišla do rezultatov, da je prisotnost BP3 v jezerih v koncentracijah od 5 do 125 ng/L.

V naši raziskavi smo v treh vzorcih od skupno 26 vzorcev vode (vsak vzorec smo naredili v dveh paralelkah) zaznali prisotnost UV filtra BP3, in sicer v enem vzorcu bazenske vode s koncentracijo 0,3 µg/L in v enem vzorcu morske vode; v prvi paralelki s koncentracijo 1,7 µg/L in v drugi paralelki s koncentracijo 1,6 µg/L oziroma skupno ($1,7 \pm 0,1$) µg/L. Določili smo tudi UV kloriran produkt 3,5-diCl BP3, in sicer v enem bazenu v obeh paralelkah s koncentracijo 3,5-diCl BP3 5,8 µg/L in 7,3 µg/L oziroma ($6,6 \pm 0,8$) µg/L. Pri določanju absorbanca UV filtrov in njihovih kloriranih produktov v vzorcih vode smo v enem vzorcu morske vode določili tudi kloriran produkt 5-Cl BP3, vendar ga zaradi nizke absorbanca in posledično nizke koncentracije nismo določili, ker nismo imeli dovolj natančne metode za določitev umeritvene krivulje 5-Cl BP3.

Glede na to, da je bazen, kjer smo določili UV filter benzofenon-3, notranji bazen in da je bil v času vzorčenja skoraj prazen, saj se v poletnem času kopalci raje zadržujejo na zunanjih bazenskih kopališčih, lahko sklepamo, da polnilne vode ne menjujejo dovolj pogosto oziroma da so v zaprtih bazenih UV filtri bolj obstojni in ne razpadejo hitro. Ker to ni bazen na prostem, se tukaj ne uporablja sončnih krem. V kopalno vodo preidejo UV filtri, ki se jih uporablja v kozmetičnih izdelkih za nego obraza in las. Določena koncentracija je tudi približno 6-krat nižja kot tista, ki smo jo določili v morski vodi, je pa primerljiva s koncentracijami, ki so podane v literaturi.

Koncentracija BP-3 v morski vodi je bila ($1,7 \pm 0,1$) µg/L. V času vzorčenja, v popoldanskih urah v sredini avgusta, je bilo na urejenem kopališču zelo veliko kopalcev. Kopališče se nahaja v nekoliko zaprtem območju, manjšem zalivu, kjer ne prihaja do tako izrazitega mešanja vode. Na celotnem območju zaliva je mogoče kopanje. Poleg tega urejenega kopališča je še eno, prav tako zelo obiskano urejeno kopališče. Vzorec vode smo zajeli približno meter od obale. V tem obdobju vzorčenja vode so bila vsa kopališča zelo obiskana, vendar sklepamo, da v drugih območjih nismo določili UV filtrov in kloriranih produktov zaradi večjega pretoka in mešanja morske vode. Kloriranih produktov pa nismo določili, ker je naravna koncentracija kloridnih ionov v morski vodi prenizka, da bi jih lahko določili.

Kloriran produkt 3,5-diCl BP3 pa smo določili v odprtem bazenu na območju slovenskega primorja, kjer je bilo veliko kopalcev v popoldanskih urah v začetku vikenda, konec vročega avgusta.

Pri celotnem pregledu rezultatov, kjer smo določili signal iskanih spojin, lahko rečemo, da je glede na signal, ki je štirikrat višji od tistega, ki smo ga dobili v bazenski vodi, spojina BP3 bolj obstojna v morski vodi. Klorirani produkt 3,5-diCl BP3 smo določili le v

bazenski vodi, kloriran produkt 5-Cl BP3 pa smo določili v morski vodi, vendar je pod mejo detekcije. Iz tega lahko sklepamo, da UV filter BP3 hitreje razpada v bazenski vodi, kjer se veže s klorirnimi sredstvi in nastane klorirani produkt 3,5-diCl BP3. V morski vodi pa je manjša koncentracija kloridnih ionov in so UV filtri bolj obstojni in jih tako lahko določimo v višjih koncentracijah.

Vsako leto, predno nastopi poletni čas in s tem večja izpostavljenosti kože ljudi sončnim žarkom, poslušamo v medijih, kako zelo pomembna je zaščita kože v tem času. Promovirajo razne izdelke za zaščito pred tako poimenovanimi škodljivimi sončnimi žarki z vedno višjim zaščitnim faktorjem. Ob tem pa nihče ne pomisli, kako zelo nevarno je lahko to. Kot smo ugotovili, je na tem področju narejenih zelo malo raziskav, vemo pa, da lahko povzročajo hormonske motnje in se kopičijo v materinem mleku ter se tako prenašajo na dojenčke, kjer je ta vpliv UV zaščitnih sredstev lahko izrazitejši, imajo vpliv na morske organizme, možne so tudi mnoge druge posledice, ki nam še niso znane. Zato bi bilo potrebno podrobno proučiti škodljive vplive UV filtrov in tudi njihovih kloriranih produktov na zdravje ljudi in okolja. Te snovi so v okolju prisotne že v tolikšnih količinah, da se jih zazna že z uporabo enostavnejših metod določanja, kot smo dokazali v tem diplomskem delu. Strokovnjaki morajo podati oceno tveganja, ki bi podala oceno potencialnih negativnih učinkov UV filtrov in njihovih kloriranih produktov na izpostavljene organizme, okolje in zdravje ljudi. Tako bi v bodoče lahko obvladovali in potencialno zmanjšali tveganja, katerim smo nevede izpostavljeni.

Aktivno pa bi se v ta raziskovanja morala vključiti tudi svetovna zdravstvena organizacija (WHO) z oceno vplivov obravnavanih snovi na zdravje. Na spletni strani WHO (World health organization) najdemo rubriko o kopalnih vodah, vendar nič kaj veliko o potencialnih nevarnih učinkih sončnih krem, s katerimi uporabniki vnašamo velike količine UV filtrov v vodno okolje. V dveh zvezkih ocen vplivov na zdravje v rekreacijskih in kopalnih vodah navajajo, da so losjoni (kreme za sončenje, kozmetika, ostanki mila ...) kemikalije, ki jih v kopalno vodo prinese kopalec. Obstaja zavedanje o tej vrsti onesnaževala, vendar kaj več na tem področju še ni narejenega, niti s strani WHO (WHO, HIA).

5. ZAKLUČKI

Velike količine porabe UV filtrov, njihove kritične fizikalno-kemijske lastnosti (na primer obstojnost in visoka lipofilnost - lastnost spojin, da se zlahka raztapljajo v oljih ali maščobah) in lastnosti, da so kemijski motilci hormonskega ravnotežja, večina najbolj uporabljenih UV filtrov povzročajo okoljsko zaskrbljenost. UV filtri trenutno predstavljajo nov razred kemijskih hormonskih motilcev (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009).

Nekaj raziskav je pokazalo, da biološke aktivnosti ni najbolje napovedati zgolj iz kemijskih podatkov. Kemijske analize so potrebne v vsaki opredelitvi strupenosti glede na to, da je to sredstvo za ugotavljanje koncentracije vsakega posameznega onesnaževala v mešanici. To je kritično, ker je lahko citotoksičnost in/ali genotoksičnost kemikalij prikrita v ekstraktu zapletene mešanice onesnaževal. Poleg tega se frakcioniranje šteje za najbolj uporabljeno metodo izolacije več toksičnih komponent iz več komponentne mešanice. Kljub tem potrebam dosegljivih integriranih pristopov za karakterizacijo toksikoloških zmesi, ki vsebujejo UV filtre, še vedno ni (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009).

Kot UV absorpcijska sredstva pa se ponavadi uporablja večkomponentne zmesi, kar je kritično za ocenjevanje in razumevanje njihove aktivnosti v kombinaciji zmesi. Še več, za ustrezno oceno tveganja za okolje teh pomembnih komponent izdelkov za osebno nego se zdi nujno, da se preuči ne le zmesi prvotnih sestavin, temveč tudi razpadne produkte (metabolite, produktov po fotorazgradnji, klorirane stranske produkte), ki so hkrati prisotni v različnih okoljskih prostorih. Pri vsaki oceni tveganja je potrebno upoštevati, da se te spojine, ko enkrat vstopijo v okolje, pridružijo mešanici drugih ksenoestrogenov in tako lahko povečajo njihovo toksičnost (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009).

Glede na to, da je lahko istočasno prisotnih tisoče organskih in anorganskih onesnaževal, vprašanje testiranja zmesi ni lahka naloga. Sedanji postopki ocene tveganja za okolje so omejeni na njihovo zmožnost ovrednotenja učinkov kombiniranih ksenoestrogenov. Najbolj uporaben pristop je napovedati vpliv kombinacije dodatkov na podlagi razmerja med odmerkom in odzivom posameznih komponent zmesi (Diaz-Cruz in Barcelo, 2009).

6. VIRI

- Ahel (1991); Ahel M., Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47 (1991) 586.
- Akiyama in sod. (1980); Akiyama H.G.T., Koga M., Shinohora R., Kido A., Etoh S., J. UOEH. 2 (1980) 285.
- Balmer in sod. (2005); Balmer M., Buser H.R., Müller M.D., Poiger T., Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 953.
- Balmer in sod. (2004); Balmer M.E., Buser H.-R., Müller M.D., Poiger T., 2004. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface water, and in fish from Swiss lakes. Environ. Sci. Technol. 39, 953-962.
- Bavcon (2009); Instrumentalne metode v okolju: navodila za laboratorijske vaje, Mojca Bavcon Kralj
- Blough in Zeep (1995); Blough N.V., Zeep R.G., Active Oxygen: Reactive Oxygen Species, in: C. Foote, J. Valentine, A. Greenberg, J.F. Liebman (Editors), Chemistry, Chapman and Hill, New York, USA, 1995.
- Brausch in Rand (2011); Brausch John M., Rand Gary M., Chemosphere 82 (2011) 1518-1532
- Countryman in sod. (2002); Countryman S., Shock D. in Teuscher J.: High Recoveries of Phenols from Water with the New Polymeric SPE Sorbent – strata™ X; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA, 2002.
- Crane in sod. (2006); Crane M., Watts C., Boucard T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceutical. Sci. Total Environ. 367, 23-41.
- Cuderman in Heath (2007); Cuderman Petra, Heath Ester, Anal Bioanal Chem (2007) 387: 1343-1350
- Daughton in Ternes (1999); Daughton C.G., Ternes T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? Environ. Health Perspect 107, 907-937.
- Diaz-Cruz in Barcelo (2009); Diaz-Cruz M. Silvia, Barcelo Damia, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 6, 2009
- Diaz-Cruz in sod. (2008); Diaz-Cruz M. Silvia, Llorca Marta, Barcelo Damia: Trends in Analytical Chemistry, Vol. 27, No. 10, 2008
- Dobravc (2010); Reakcije UV filtrov z oksidanti prisotnimi v naravnih vodah. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana
- Echa.europa.eu; European chemicals agency, uredba REACH. Dostopno 28.12.2012, na URL: <http://echa.europa.eu>
- Ehrhardt (1987); Ehrhardt M., Mar. Chem. 22 (1987) 85.
- Ehrhardt in sod. (1982); Ehrhardt M., Bouchertall F., Hopf H.P., Mar. Chem. 11 (1982) 449.
- European Commission (1976); European Commission, Council Directive 76/768/CEE of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, and its successive amendments and adaptations
- Fent in sod. (2006); Fent K., Weston A.A., Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat. Toxicol. 76, 122-159.
- Fent in sod. (2009); Fent K., Kunz P.Y., Zenker A., Rapp M., 2009. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4, and 3-benzylidene camphor. Mar. Environ. Res. doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.010

- Flex in sod. (1998); Flex T., Hall B.J., Brodbelt J.S., Anal. Chem. Acta 371 (1998) 195.
- Giokas in sod. (2004); Giokas D.L., Sakkas V.A., Albanis T.A., J. Chromatogr., A 1026 (2004) 289.
- Giokas in sod. (2005); Giokas D.L., Sakkas V.A., Albanis T.A., Lambropoulou D.A., J. Chromatogr., A 1077 (2005) 19.
- Giokas in sod. (2007); Giokas Dimosthenis L., Salvador Amparo, Chisvert Alberto, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 5, 2007
- Halling-Sorensen in sod. (1998); Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerster F., Luthhoff H.C.H., Jorgensen S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. Chemosphere 36, 357-393.
- Ingelman-Sundberg in Hagbjork (1982); Ingelman-Sundberg M., Hagbjork A.L., Xenobiotica 12 (1982) 673.
- IVZ, Kriteriji za ocenjevanje primernosti bazenske kopalne vode za kopanje na podlagi laboratorijskih preskusov vzorcev kopalne vode. Dostopno 20.7.2011, na URL: <http://www.ivz.si>
- IVZ, Pogosta vprašanja o kopalni vodi (2011); Inštitut za varovanje zdravja (IVZ), Pogosta vprašanja o kopalni vodi, dostopno 10.11.2011 na URL: <http://www.ivz.si>.
- IVZ, Priporočila, navodila, mnenja za kopalne vode; Navodila IVZ za odvzem vzorca bazenske kopalne vode. Dostopno 20.7.2011, na URL: <http://www.ivz.si>
- Janjua in sod. (2004); Janjua N.R., Mogensen B., Andersson A.M., Petersen J.H., Henriksen M., Skakkebaek N.E., Wulf H.C., J. Invest. Dermatol. 123 (2004) 57.
- Japanese Ministry of Health and Welfare; Japanese Ministry of Health and Welfare, 2000, Notification No. 331/2000, Standards for Cosmetics <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/cosmetics/index.html>.
- Japanese Standard for Cosmetics Ingredients (1985); Japanese Standard for Cosmetics Ingredients, Yakuji Nippo Ltd., Tokyo, Japan, 1985.
- Jeon in sod. (2006); Jeon H.K., Cheng Y., Ryu C., J. Chromatogr., A 113 (2006) 192.
- Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010 (2011); Kakovost bazenskih kopalnih voda v Sloveniji v letu 2010, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Ljubljana, maj 2011
- Kakovost kopalnih voda v kopalni sezoni 2010; Poročilo Evropski komisiji o izvajanju direktive 76/160/EGS in direktive 2006/7/ES v letu 2010, Kakovost kopalnih voda v kopalni sezoni 2010, Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje in prostor, december 2010. Dostopno 9.11.2011 na URL: http://cdr.eionet.europa.eu/si/eu/nbwd/envtqnjqa/SI_BW_report_2010.pdf
- Kimbrough (1997); Kimbrough D.R., J. Chem. Educ. 74 (1997) 51.
- Knowland in sod. (1993); Knowland J., McKenzie E.A., McHugh P.J., Cridland N.A., FEBS Lett. 324 (1993) 309.
- Kopalne vode (2009); Kopalne vode: zdravo in varno kopanje, Mateja Poje et al., Ljubljana: MOP – Agencija RS za okolje, 2009. Dostopno 8.11.2011 na URL: <http://www.arso.gov.si/vode/kopalne%20vode/kopalne%20vode09web.pdf>
- Kosjek in sod. (2005); Kosjek T., Heath E., Krbavčič A. (2005) Environ Int 31(5):679-685
- Kuiper in sod. (1998); Kuiper G.G.J.M., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B., Gustafson A., Endocrinology 139 4252.

- Lambropoulou in sod. (2002); Lambropoulou D.A., Giokas D.L., Sakkas V.A., Albanis T.A., Karayannis M.I., J. Chromatogr., A 967 (2002) 243.
- Loraine in Pettigrove (2006); Loraine G.A., Pettigrove M.E., Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 687.
- Lowe in sod. (1997); Lowe N.J., Shaath N.A., Pathak M.A., Sunscreens: Development, Evaluation, and Regulatory Aspects, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1997.
- Mackay in Barnthouse (2010); Mackay D., Barnthouse L., 2010. Integrated risk assessment of household chemicals and consumer products: assessing concern about triclosan. Integr. Environ. Assess. Manage. 6, 390-392.
- Nagtegaal in sod. (1997); Nagtegaal M., Ternes T.A., Baumann W., Nagel R., 1997. Detection of UV-sunscreen agents in water and fish of the Meerfelder Maar the Eifel, Germany. Z. fur Umweltchem. Okotox. 9, 79-86.
- National Toxicology Program; National Toxicology Program <http://ntp.niehs.nih.gov/>.
- Negreira in sod. (2008); Negreira N., Canosa P., Rodriguez I., Ramil M., Rubi E., Cela R., Jurnal of Chromatography A, 1178 (2008) 206-214
- Norwegian Radiation Protection Authority (2000); Norwegian Radiation Protection Authority (NRPA), Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters, 2000, p. 1 (ISSN 0806-895X).
- Okereke in sod. (1993); Okereke C.S., Kardy A.M., Abdel-Rahman M.S., Davis R.A., Friedman M.A., Drug Metab., Dispos. 21 (1993) 788.
- Okereke in sod. (1994); Okereke C.S., Abdel-Rahman M.S., Friednman M.A., Toxicol. Lett. 73 (1994) 113.
- Peck (2006); Peck A.M., 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. Anal. Bioanal. Chem. 386, 907-939.
- Poiger in sod. (2004); Poiger T., Buser H.-R., Balmer M.E., Bergqvist P.-A., Muller M.D., 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreen in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. Chemosphere 55, 951-963.
- Profili kopalnih voda; Ministerstvo za okolje in prostor, Delovna področja, voda, kopalne vode, seznam in profili kopalnih voda, profili kopalnih voda. Dostopno 8.11.2011 na URL: http://www.mop.gov.si/si/delovna_podrocja/voda/kopalne_vode/seznam_in_profili_kopalnih_voda/profili_kopalnih_voda/
- Richardson (2007); Richardson S.D., Anal. Chem. 79 (2007) 4295.
- Rotary evaporator; Wikipedja, Rotary evaporator
- Sakkas in sod. (2003); Sakkas V.A., Giokas D.L., Lambropoulou D.A., Albanis T.A., J. Chromatogr. A 1016 (2003) 211.
- Salvador in Chisvert (2005); Salvador A., Chisvert A., Analytica Chimica Acta 537 (2005) 1-14
- Schauder in Ippen (1997); Schauder S., Ippen H., Contact Dermatitis 37 (1997) 221.
- Schinicit in sod. (1998); Schinicit T., Ring J., Abeck D., Dermatology 196 (1998) 354.
- Schlumpf in sod. (2001); Schlumpf M., Cotton B., Conscience M., Haller V., Steinmann B., Lichtensteiger W., Environ. Health Perspect. 109 (2001) 239.
- Schlumpf in sod. (2008); Schlumpf M., Durrer E., Faass O., Ehnes C., Fuetsch M., Gaille C., Henseller M., Hoofkamp L., Maerkel K., Reolon S., Timms B., Tresguerres J.A.F., Linchtsteiger W., Int. J. Androl. 31 (2008) 144.

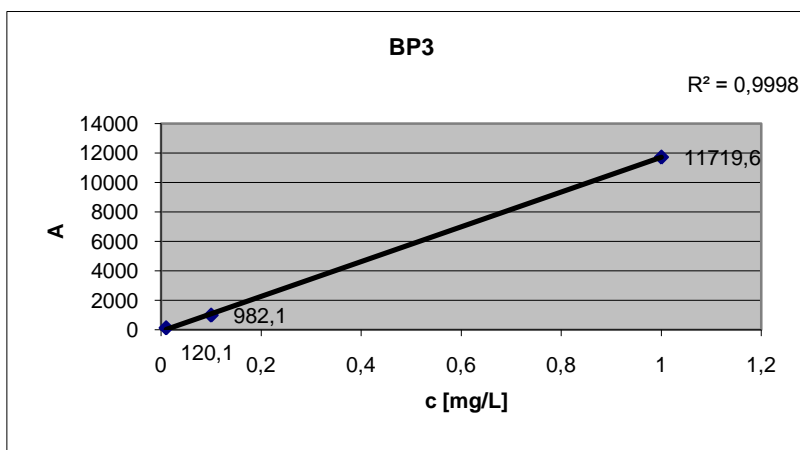
- Schmutzler in sod. (2004); Schmutzler C., Hamann I., Kovacs G., Stemmler L., Mentrup B., Schomburg L., Ambrugger P., Gruters A., Seidlova-Wuttke D., Jarry H., Wuttke W., Kohrle J., Toxicology 205 (2004) 95.
- Schreurs in sod. (2002); Schreurs R., Lanser P., Seinen W., Van der Burq B., 2002. Estrogenic activity of filters determined by an in vitro reporter gene assay and in vivo transgenic zebrafish assay. Arch. Toxicol. 76, 257-261.
- Serpone in sod. (2007); Serpone N., Dondi D., Albini A., Inorganica Chim. Acta 360 (2007) 794.
- SoTom, Tehnologije za čiščenje kopalne bazenske vode; Tehnologije za čiščenje kopalne bazenske vode. Dostopno 27.12.2012, na URL: <http://www.sotom.si>
- Steinberg (2000); Steinberg D. (2000) Encyclopedia of UV filters updated. Allured's Cosmet Zoiletries 115:28-65
- Svete (1999); Jurij Svete, 1999. Preperativna organska kemija, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani.
- Ternes in sod. (2004); Ternes T.A., Joss A., Siegrist H., 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. Environ. Sci. Technol. 38, 392A-399A.
- Tinwell in sod. (2002); Tinwell H., Lefevre P.A., Moffat G.J., Burns A., Odum J., Spurway T.D., Orphanides G., Ashby J., Environ. Health Perspect. 110 (2002) 533.
- Titro, dezinfekcija vode; Način dezinfekcije bazenske kopalne vode. Dostopno 27.12.2012, na URL: <http://www.titro.si/javni-bazeni/dezinfekcija-vode.html>
- US Food and Drug Administration (1999); US Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, 21 CFR, RIN 0910-AA01, Fed. Regist. 64 (1999) 27666.
- US Food and Drug Administration; US Food and Drug Administration, Code of Federal Regulations, Title 21, Parts 70-82 for Colorants; Parts 330-360 for OTC drugs; Parts 700-740 for cosmetics <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>.
- WHO, HIA; World health organization, Health impact assessment, Bathing waters. Dostopno 2.1.2012, na URL: <http://www.who.int/hia/en/>
- Zoeteman (1981); Zoeteman B.C., Sci. Total Environ. 21 (1981) 1.

7. PRILOGA

7.1. Rezultati redčitev

Rezultati prvih redčitev

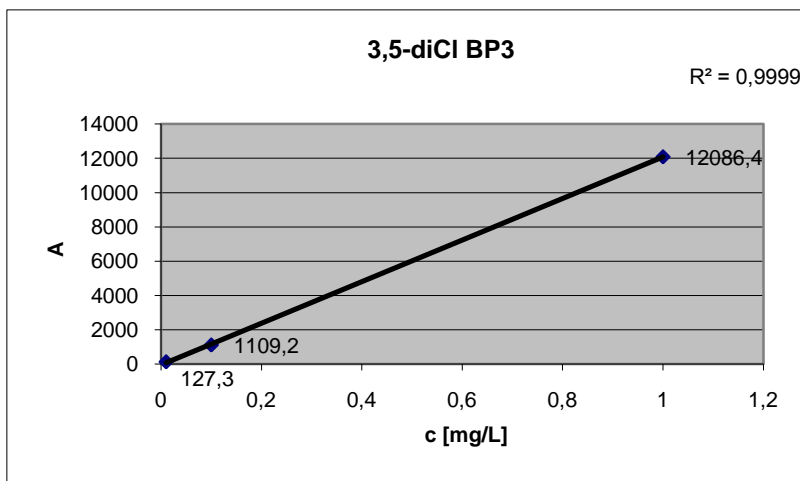
BP3		
Metoda: BP3 ROMINA		
c	t [min]	A
0,01mg/L	7,575	120,1
0,1mg/L	7,568	982,1
1mg/L	7,556	11719,6
0,001mg/L	/	/



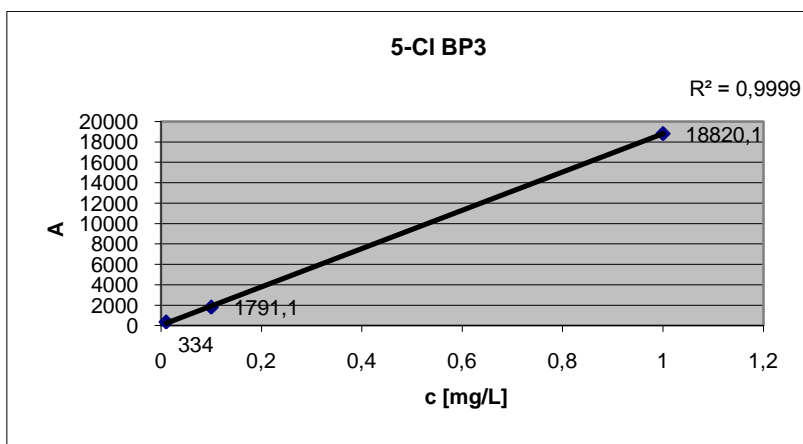
BP4		
Metoda: BP3 ROMINA		
c	t [min]	A
1mg/L	7,566	220,1
0,1mg/L	/	/
0,01mg/L	/	/
0,001mg/L	/	/

Kot je razvidno iz tabele rezultatov redčitev spojine BP4, ne moremo zaznati nizkih koncentracij s HPLC metodo, zato v nadaljnjem delu raziskav ne določam več spojine BP4, ampak se osredotočim le še na ostale 3 spojine.

3,5-diCl BP3		
Metoda: BP3 ROMINA		
c	t [min]	A
0,001mg/L	/	/
0,01mg/L	11,68	127,3
0,1mg/L	11,679	1109,2
1mg/L	11,678	12086,4



5-Cl BP3		Metoda: BP3 ROMINA 1
c	t [min]	A
0,001mg/L	/	/
0,01mg/L	15,739	334
0,1mg/L	15,754	1791,1
1mg/L	15,716	18820,1



Rezultati standardov s koncentracijo 1mg/L

Vzorec	c [mg/L]	t [min]	A
BP3	1	11,822	164
5-Cl	1	15,696	223
3,5-diCl (1)	1	/	/
3,5-diCl (2)	1	20,826	146,8

Ker s prvo meritvijo 3,5-diCl nisem dobila pravega rezultata, pripravo vzorca in meritev ponovim.

7.2. Rezultati analiz vzorcev različnih koncentracij

Rezultati vzorcev različnih koncentracij 1

Oznaka	c [mg/L]	BP3	5-Cl BP3	3,5-diCl BP3
1 SI 0,5	0,001	t=11,761; A=174,3	t=15,463; A=302,5	/
2 SII 0,5	0,001	t=11,767; A=128,7	/	/
1 SI 0,25	0,0005	/	/	/
2 SII 0,25	0,0005	/	t=15,516; A=117,9	/
1 SI 0,125	0,00025	/	/	/
2 SII 0,125	0,00025	/	/	/

Kot je razvidno iz zgornje tabele, Rezultati vzorcev različnih koncentracij 1, je s pripravljenimi vzorci nekaj narobe oziroma je nekje med pripravo prišlo do napake, zato postopek ponovim in dodam še eno redčitev.

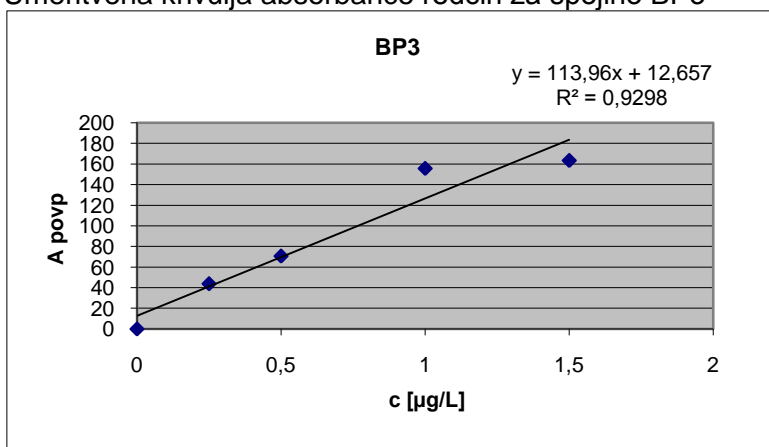
Rezultati vzorcev različnih koncentracij 2

Oznaka	c [mg/L]	BP3	5-Cl BP3	3,5-diCl BP3
1 SI 0,75	0,0015	t=11,646; A=142,9	t=15,479; A=224,9	t=20,785; A=130,7
1 SII 0,75	0,0015	t=11,675; A=183,9	t=15,454; A=226,1	t=20,813; A=124,8
1 SI 0,5	0,001	t=11,638; A=196,4	t=15,437; A=281,8	t=20,748; A=95,4
2 SII 0,5	0,001	t=11,639; A=115	t=15,478; A=174,7	t=20,773; A=107,3
1 SI 0,25	0,0005	t=11,578; A=71,8	t=15,570; A=64,3	t=20,761; A=41,7
2 SII 0,25	0,0005	t=11,647; A=69,6	t=15,591; A=95,3	/
1 SI 0,125	0,00025	t=11,607; A=48,8	t=15,374; A=113,3	/
2 SII 0,125	0,00025	t=11,517; A=38,9	t=15,461; A=51,4	/

BP3 rezultati redčitev

c [µg/L]	x1	x2	x povp
0,25	48,8	38,9	43,85
0,5	71,8	69,6	70,7
1	196,4	115	155,7
1,5	142,9	183,9	163,4
0			0

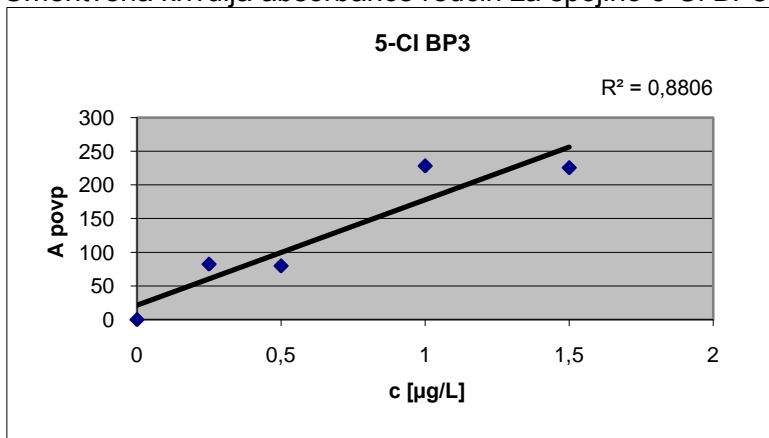
Umeritvena krivulja absorbance redčin za spojino BP3



5-CI BP3 rezultati redčitev

c [µg/L]	x1	x2	x povp
0,25	113,3	51,4	82,35
0,5	64,3	95,3	79,8
1	281,8	174,7	228,25
1,5	224,9	226,1	225,5
0			0

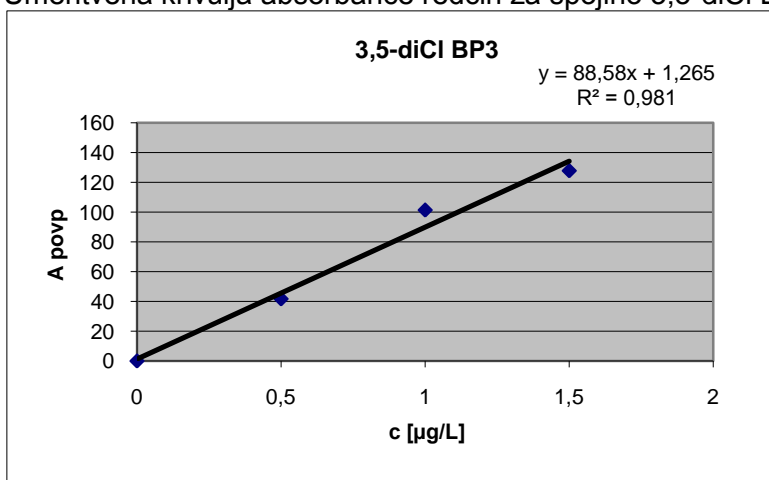
Umeritvena krivulja absorbance redčin za spojino 5-CI BP3



3,5-diCI BP3 rezultati redčitev

c [µg/L]	c [mg/L]	x1	x2	x povp
0,25	0,00025	/	/	/
0,5	0,0005	41,7	/	41,7
1	0,001	95,4	107,3	101,35
1,5	0,0015	130,7	124,8	127,75
0	0			0

Umeritvena krivulja absorbance redčin za spojino 3,5-diCl BP3



V nadaljnem eksperimentalnem delu naredim še dve redčitvi v štirih paralelkah, in sicer z višjo koncentracijo.

Rezultati vzorcev različnih koncentracij 3

c [mg/L]	BP3	3,5-diCl BP3
0,00225	t=11,935; A=227,8	/
0,00225	t=12,081; A=240,6	/
0,00300	t=12,302; A=325,9	t=21,104; A=224,8
0,00300	t=12,152; A=183,6	t=21,816; A=267,6
0,000600	/	t=20,953; A=560,1
0,000600	/	t=21,446; A=630,8

Podatki za umeritveno krivuljo BP3

c [mg/L]	A1	A2	A povp
0,00000	0	0	0
0,00025	48,8	38,9	43,85
0,00050	71,8	69,6	70,7
0,00100	196,4	115	155,7
0,00150	142,9	183,9	163,4
0,00225	227,8	240,6	234,2
0,00300	325,9	183,6	254,75

Podatki za umeritveno krivuljo **3,5-diCl BP3**

c [mg/L]	A1	A2	A povp
0,00000	0	0	0
0,00025	/	/	/
0,00050	41,7	/	41,7
0,00100	95,4	107,3	101,35
0,00150	130,7	124,8	127,75
0,00300	224,8	267,6	246,2
0,00600	560,1	630,8	595,45

Označeni so odstopajoči podatki, ki jih pri izrisu umeritvenih krivulj BP3 in 3,5-diCl BP3 ne uporabim.

Absorbance **BP3** standardov in vzorcev vode

c [mg/L]	A1	A2	A povp
0,000000	0	0	0
0,000250	48,8	38,9	43,85
0,000500	71,8	69,6	70,7
0,001000		115	115
0,001500	142,9	183,9	163,4
0,002250	227,8	240,6	234,2
0,003000	325,9		325,9
0,000275	39,2		39,2
0,001744	190,8		190,8
0,001619	177,9		177,9

Legenda k tabeli

	Vzorec vode
	Odstopajoči rezultat

Absorbance **3,5-diCl BP3** standardov in vzorcev vode

c [mg/L]	A1	A2	A povp
0,00000	0	0	0
0,00025	/	/	/
0,00050	41,7	/	41,7
0,00100	95,4	107,3	101,35
0,00150	130,7	124,8	127,75
0,00300		267,6	267,6
0,00600	560,1	630,8	595,45
0,00578	563		563
0,00731	713,4		713,4

Legenda k tabeli

	Vzorec vode
	Ni rezultata in odstopajoči rezultat

Preglednica vzorcev morske in bazenske vode v dveh paralelkah

Vzorec	t	A	Spojina
Bazen1 A			
Bazen1 B	11,155	39,2	BP3
Bazen2 A			
Bazen 2 B			
Bazen3 A	19,958	563	3,5-di-Cl
Bazen3 B	20,087	713,4	3,5-di-Cl
Bazen4 A			
Bazen4 B			
Bazen5 A			
Bazen5 B			
Bazen6 A			
Bazen6 B			
Morje1 A			
Morje1 B			
Morje2 A			
Morje2 B			
Morje3 A	11,799	190,8	BP3
Morje3 B	11,799	177,9	BP3
Morje4 A			
Morje4 B			
Morje5 A			
Morje5 B			
Morje6 A	15,07	88,8	5-Cl
Morje6 B			
Morje7 A			
Morje7 B			