



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Utvikling av analysemetode for bisfenolmetabolitter i urin fra arbeidsmiljø ved bruk av UHPLC- MS/MS

Samra Chaudhry

Sivilingeniør i kjemi og bioteknologi (master)

Utvikling av analysemetode for bisfenolmetabolitter i urin fra arbeidsmiljø ved bruk av UHPLC-MS/MS

Samra Chaudhry

© Samra Chaudhry

2020

Utvikling av analysemetode for bisfenolmetabolitter i urin fra arbeidsmiljø ved bruk av
UHPLC-MS/MS

Samra Chaudhry

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Sammendrag

Bisfenoler brukes til å produsere plast av polykarbonat verden over og produkter som for eksempel gjennomsiktige flasker, hermetikkbokser og kvitteringspapir. Eksponering av bisfenol kan føre til uheldige helseeffekter, og derfor er det interessant å etablere en analysemetode av disse i urin.

I denne oppgaven ble det utviklet en UHPLC-MS/MS metode til å måle metabolitter av syv bisfenoler i urin med tanke på at metoden skal brukes til å måle bisfenoleksponering i arbeidsmiljø sammenheng. Disse syv bisfenoler er: Bisfenol A (BPA), Bisfenol B (BPB), Bisfenol F (BPF), Bisfenol S (BPS), Bisfenol Z (BPZ), Bisfenol AP (BPAP) og Bisfenol AF (BPAF). Det ble etablert en enkel prøveopparbeidelse etter fortykning før analyse (dilute-and-shoot-prinsippet) der urinen ble fortyknet etter enzymatisk hydrolyse av de glukurinerte metabolittene. Bisfenolene ble separert på en Waters Acquity BEH C18 kolonne med omvendt-fase-kromatografi med en løsning av 15 mM Ammoniumacetat (A) og Acetonitril (B) som mobilfase. Det ble benyttet isokratisk eluering (MobilfaseA: MobilfaseB (60:40 v/v)) og analysetid var totalt seks minutter. Bisfenolene ble ionisert med elektrospay ionisering og MS/MS ble benyttet for deteksjon av analyttene.

MS-betingelser ble optimalisert med hensyn til best mulig sensitivitet av bisfenolene. Forskjellige injeksjonsvolum og klippetider av urin ble testet for å få høyest mulig signalintensitet av de ulike bisfenolene og til slutt ble det utført en forenklet validering av metoden. Kvantifiseringsgrense ble funnet å være 0,5 ng/mL for BPA, 2 ng/mL for BPB, 5 ng/mL for BPF, 2 ng/mL for BPS, 5 ng/mL for BPZ, 1 ng/mL for BPAP og 0,5 ng/mL for BPAF. Nøyaktighet ble testet ved 1 ng/mL - 20 ng/mL, og reelle prøver fra brannmenn (som hadde røykdykket) samt interlaboratorieprøver (fra et eksternt laboratorium) ble testet med den endelige metoden. Konklusjonen er at metoden trenger videre optimalisering da nøyaktigheten til de laveste konsentrasjonene hadde avvik på over 20 %.

Abstract

Bisphenols are used to produce plastic of polycarbonate plastic and for example products such as transparent bottles, canned food and receipt paper. Bisphenol exposure can lead to adverse health effects, and therefore interesting to establish a method of analyses of these in urine.

In this master thesis, a UHPLC-MS / MS method was developed for measuring metabolites to seven bisphenols in urine in occupational environment. These seven bisphenols are: Bisphenol A (BPA), Bisphenol B (BPB), Bisphenol F (BPF), Bisphenol S (BPS), Bisphenol Z (BPZ), Bisphenol AP (BPAP) and Bisphenol AF (BPAF). A simple sample preparation was established following the dilute-and-shoot principle where the urine was diluted following enzymatic hydrolysis of the glucuroniated metabolites. The bisphenols were separated on a Waters Acquity BEH C18 reverse phase chromatography column with a solution of 15 mM Ammonium Acetate (A) and Acetonitrile (B) as the mobile phase. Isocratic elution was used (Mobile phase A: Mobile phase B (60: 40 v/v)) and the analyses took six minutes. The bisphenols were ionized by electrospray ionization and MS / MS was used for detection and quantification of the analytes.

MS conditions were optimized to obtain best sensitivity of the bisphenols. Various injection volumes of urine were tested and optimization of the enzymatic hydrolysis of urine were performed to obtain the highest signal intensity of the various bisphenols and, finally, a simplified validation of the method was performed. Quantification limit for BPA was 0,5 ng/mL, for BPB was 2 ng/mL, for BPF was 5 ng/mL, for BPS was 2 ng/ml, for BPZ was 5 ng/mL, for BPAP was 1 ng/mL and for BPAF was 0.5 ng/mL. Accuracy was tested at 1 ng/mL - 20 ng / mL, and real samples from firefighters (who had been fire extinguishing during a fire drill) and interlaboratory samples (from an external laboratory) were tested with the final method. It is concluded that the method still needs some further optimization as the accuracy of the lowest concentrations had deviations of more than 20%.

Forord

Masteroppgaven er utført ved Statens arbeidsmiljøinstitutt (STAMI), avdeling for kjemi og biologisk arbeidsmiljø (KBA) i samarbeid med Norges miljø og biovitenskap universitet (NMBU) ved fakultetet for Kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Oppgaven utgjør 30 stp av 300 stp i studieprogrammet sivilingeniør i kjemi og bioteknologi og arbeidet fant sted fra september 2019 til mai 2020. Fagområdet i oppgaven er analytisk kjemi.

Hovedveileder har vært **Dag Ekeberg** ved NMBU og eksternveileder har vært **Cecilie Rosting** ved STAMI. Med dette vil jeg gjerne rette en stor takk til begge to for en god veiledning, gode ideer og tålmodighet under utførelse av oppgaven.

Takk til min bror, **Usman M. Chaudhry**, som inspirerte meg til å ta opp studiet og for gode innspill til masteroppgaven.

Takk til min svigerinne, **Roha Niaz**, som skrev bacheloroppgaven samme semester som jeg skrev masteroppgave. Takk for diskusjon og samtaler rundt progresjon under utførelse av masteroppgaven.

Samtidig vil jeg rette en stor takk til sjefen min ved Rikshospitalet, **Erik Ringerike**, for at han ga meg permisjon fra jobben, slik at jeg kunne fullføre mastergraden min.

Til slutt vil jeg gjerne si takk til alle mine kollegaer og venner som ville gjerne at jeg tok opp studiet mitt og som har motivert meg gjennom den siste delen av studiet, spesielt **Matin Abdolghafari** og **Laila El Hamouti**.

Forkortelser

µg	mikrogram
µL	mikroliter
µm	mikrometer
ACN	acetonitril
APCI	atmosfæretrykk ionisering
BP	bisfenol/bisfenoler
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPAP	bisfenol AP
BPB	bisfenol B
BPF	bisfenol F
BPS	bisfenol S
BPZ	bisfenol Z
C8	octyl
C18	octadecyl
CN	cyanopropyl
DS	<i>dilute and shoot</i> / fortytning før analyse
EMA	european medicines agency
ESI	elektrosprayionisering
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IS	intern standard
LC	<i>liquid Chromatography</i> (væskekromatografi)
LC-MS/MS	væskekromatografi koblet med tandem massespektrometri
LLE	væske-væske-ekstraksjon
LOD	deteksjonsgrense
LOQ	kvantifikasjonsgrense
m	masse
MeOH	metanol
MFA	mobilfase A
MFB	mobilfase B
Min	minutt / minutter

mL	milliliter
mm	millimeter
mM	millimolar
MS	massespektrometri
m/z	forholdet mellom masse og ladning
N₂	nitrogen
ng	nanogram
NH₄OH	ammoniumhydroksid
pH	<i>potenita hydrogenii</i> (styrke hydrogen)
RSD%	Relativ standardavvik / Presisjon
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (fastfase-ekstraksjon)
t	time / timer
UGT	uridin 5'-difosfoglukuronyltransferase
UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
V	volt
z	ladning

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Generelt om bisfenol	1
1.2	LC-MS-analyser av bisfenoler i urin	2
1.3	Mål for oppgaven	2
2	Teori	4
2.1	Generelt om bisfenol	4
2.1.1	Bisfenol A	4
2.1.2	Helseeffekter.....	5
2.1.3	Arbeidsmiljø.....	5
2.2	Prøveopparbeidelse	6
2.2.1	Fast-fase-ekstraksjon (SPE)	6
2.2.2	Online-SPE	6
2.2.3	Fortynning før analyse («dilute and shoot»)	7
2.3	Kromatografi.....	8
2.3.1	Omvendtphase kromatografi	8
2.3.2	Ultra High Performance Liquid Chromatography – UHPLC.....	9
2.4	Massespektrometri.....	10
2.4.1	Elektrosprayionisering (ESI).....	10
2.4.2	Atmosfæretrykk ionisering (APCI)	11
2.4.3	Trippelkvadrupol.....	12
3	Eksperimentelt	13
3.1	Materialer og kjemikalier.....	13
3.2	Metode.....	15
3.2.1	Bisfenoler – kjemiske egenskaper og struktur	15
3.2.2	Tillaging av stamløsninger.....	17
3.2.3	Tillaging av mobilfaser	17
3.2.4	Prøveopparbeidelse.....	17
3.2.5	Urinprøve fra brannmenn og interlaboratorieprøver	18
3.2.6	Testing av masseoverganger, kollisjonsenergi og kollisjonstrykk.....	18
3.3	Den endelige analysemetoden	18
3.3.1	UHPLC-betingelser	18
3.3.2	MS-betingelser	19
3.4	Validering av metoden.....	19
4	Resultater og diskusjon	20
4.1	Tuning av MS-betingelser	20
4.1.1	Bestemmelse av endelig kollisjonsenergi	20
4.2	Optimalisering av HPLC-metode	21
4.3	Prøveopparbeidelse	22
4.3.1	Testing av online SPE-metode	22
4.3.2	Eliminering av bakgrunn.....	22
4.3.3	Optimalisering av injeksjonsvolum og fortynningsmetode	25
4.3.4	Optimalisering av hydrolysetid/prøveopparbeidelse.....	27
4.4	Validering av metoden.....	28
4.5	Analyse av brannmannprøver og interlaboratorieprøver	30

5	Konklusjon	32
6	Videre arbeid.....	33
	Referanser	34
	APPENDIX.....	38

1 Introduksjon

1.1 Generelt om bisfenol

Bisfenol A (BPA) eller 4,4'-dihydroksy-2,2-difenyylpropan er en organisk forbindelse. Dette kjemikalie er brukt til å produsere polykarbonat og epoksyharpikser i et høyt volum verden over. Polykarbonat brukes til å fremstille gjennomsiktige plastprodukter som har høy stivhet, slagsikkerhet og gode elektriske egenskaper. Slike produkter omfatter for eksempel elektronikk, drikkeflasker og CD-plater [1]. BPA ble oppfunnet av den russiske kjemikeren Aleksander Dianin i 1891. Selv om polykarbonater ble produsert på laboratoriet i slutten av 1800-tallet, ble industrielt bruk av polykarbonat ekspandert i 1960. I senere år ble det oppdaget at BPA var skadelig for mennesker. Den første rapporten kom i 1993 der de fant ut at BPA ble vasket ut ved høye temperaturer fra polykarbonat og var et tegn på BPA-eksponering. BPA hadde en negativ hormonforstyrrende effekt [2]. De siste årene har det vært flere studier relatert til negative helseeffekter hos menn, kvinner og barn. BPA-eksponering har ikke bare negativ hormonforstyrrende effekt, men det kan føre til flere ulike sykdommer som diabetes, overvekt og kreft. Eksempler for andre negative effekter mennesker er utsatt for er nedsatt fruktbarhet, lavere sædkvalitet, tidligere fødsler og endring i leverfunksjon [3]. Det finnes statlige reguleringer ved bruk av BPA og på grunn av disse reguleringer blir BPA erstattet med andre lignende forbindelser. Totalt 16 bisfenol analoger er dokumentert for industrielt bruk, BPF (4,4'-methylenediphenol), BPS (4-hydroxyphenyl sulfone) og BPAF (4,4'-hexafluoroisopropylidene diphenol) er blant de hoved erstatningene for BPA i produksjon av polykarbonat plast og epoksyharpikser [4]. Forhøyede konsentrasjonsverdier av BPF, BPS og BPAF er rapportert i det biotiske miljøet og urin fra mennesker. Videre har laboratorieundersøkelser vist at mange bisfenolanaloger forårsaker hormonforstyrrende effekter, genotoksisitet og nevrotoksisitet [5, 6].

Mange yrkesgrupper kan være utsatt for høy eksponering av BPA og disse yrkesgruppene er mer utsatt enn vanlige individer. Gjennom årene har flere land blant annet Kina, USA, Malaysia, Finland, Brasil og Italia gjennomført flere studier for å måle BPA-nivå i urin og serum i arbeidsmiljø sammenheng [7]. Disse har tatt utgangspunkt i eksponering i plastikk- og epoksyharpiksfabriker eller eksponering fra termisk papir (kvitteringer). Det økende bruk av

BPA i polykarbonat plast og eksponering gjennom mat og luft, gjør det interessant å måle bisfenoler og metabolitter av bisfenol i urin. Analyser av BPA nivåer i urin kan bli stadig viktigere for å vurdere BPA-risiko i mennesker.

1.2 LC-MS-analyser av bisfenoler i urin

Analyse av forskjellige bisfenoler i urin ved bruk av væskrokromatografi koblet til massespektrometri har blitt utviklet i flere studier. Felles for alle metodene er at urinprøven behandles med enzym før analyse for å få hydrolysert bisphenol-gluconidase til fritt bisfenol. Hovedsakelig er trippelkvadrupol med elektropray brukt som ioniseringsteknikk i disse metodene, men det er også enkelte publiserte metoder der atmosfæretrykk ionisering (APCI) har blitt brukt i stedet for ESI som ioniseringsteknikk [8]. En av de publiserte metodene benytter online fastfase ekstraksjon (online SPE) for å rense opp prøvene før analyse [9]. Andre har benyttet væske-væske-ekstraksjon (LLE) som prøveopparbeidelse [10-13]. I en av de publiserte artiklene er det utviklet en metode for å måle ni bisfenoler i urin [4]. Deteksjonsgrense (LOD) i denne metoden ble fra 0,03 til 0,26 ng/mL for alle bisfenoler og kvantifiseringsgrense (LOQ) ble fra 0,12 til 0,81 ng/mL for alle bisfenoler. En annen publisert metode beskriver analyse av tre bisfenoler [8]. I denne metoden ble LOD satt til 0,06 ng/mL for alle bisfenoler og LOQ ble satt til 0,2 ng/mL for alle bisfenoler.

1.3 Mål for oppgaven

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en enkel og rask LC-MS/MS metode til å kvantifisere bisfenolanaloger i urin i arbeidsmiljø sammenheng. Målet er at metoden skal kunne benyttes til å måle bisfenoler i urin som er samlet inn fra brannmenn etter brannslukningsarbeid. Det er viktig å kartlegge konsentrasjoner av bisfenoler i urin fordi høy eksponering av bisfenoler reflekteres i forhøyde konsentrasjonsverdier av bisfenolmetabolitter i urin. Høye konsentrasjonsverdier i urin kan assosieres med mulige uheldige helseeffekter.

Det ble satt følgende delmål for å utvikle metode:

1. Optimalisere MS-betingelser for å oppnå høy signalintensitet fra de ulike bisfenolene
2. Utvikle en UHPLC-metode for alle syv bisfenoler
3. Optimalisere prøveopparbeidelse av bisfenoler fra urin ved
 - a) Undersøke om online SPE eller en fortynning («dilute and shoot») kan benyttes til prøveopparbeidelse av urin før analyse
 - b) Optimalisere betingelser for enzymatisk hydrolyse av bisfenolanalogene i urin
4. Validere metoden og teste metoden på urinprøver donert fra brannmenn etter røykdykking

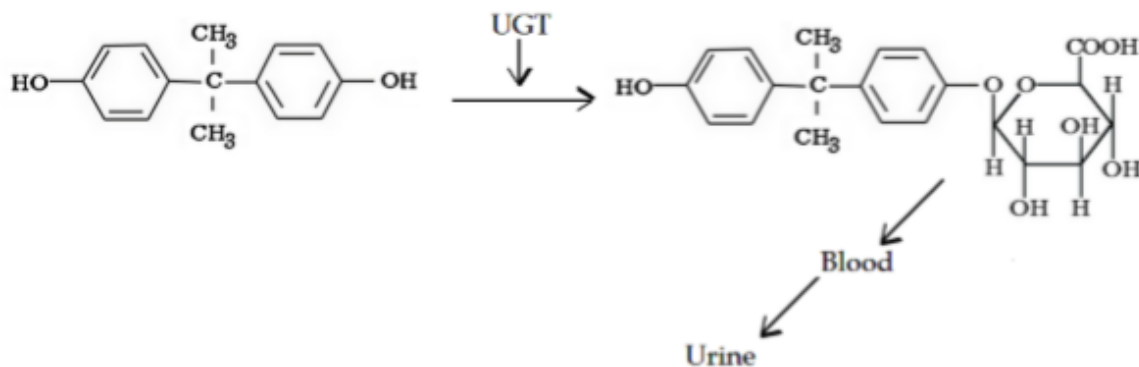
2 Teori

2.1 Generelt om bisfenol

2.1.1 Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) er et hormonforstyrrende kjemikalie som kan ha skadelige effekter i organismer [14]. Det er store anvendelser av BPA i miljøet, og matvarer er hovedkilden til eksponering [15]. Eksponering fra matvarer kan forekomme fra hermetiske bokser, der innsiden av boksene har et belegg for å forhindre direkte kontakt mellom metallboksens vegger og næringsmiddelet [16]. Andre kilder til eksponering av BPA kan skje gjennom støv, termisk papir og medisinsk utstyr [15]. Støv blir sett på som et større problem hos barn enn voksne, hvor barn blir eksponert for dette med hyppigere kontakt til munn [17]. Produkter som forurenses innendørs støv er: epoksybaserte gulvbelegg, lim, maling, elektronisk utstyr og trykte kretskort [18]. Eksponering gjennom termisk papir har også vært diskutert de siste årene. I disse termiske papirene kan BPA tas opp i kroppen gjennom huden ved kontakt med papiret [19].

BPA metaboliseres i leveren av uridin 5'-difosfoglukuronyltransferase (UGT), som katalyserer glukuronideringen av BPA (Figur 1) [20]. BPA kan også bli metabolisert til andre forbindelser som BPA-sulfat og bisfenol-3,4-kinon [21]. Absorpsjon av BPA i kroppen kan finne sted ved oralt opptak, gjennom luftveier og ved hudkontakt med termisk papir. Effektiv absorpsjon av BPA skjer i fordøyelseskanalen og den skilles ut i urin når glukuronidmetabolitt har blitt dannet [22]. Den biologiske halveringstiden for BPA er mindre enn 6 timer [23], og dermed er analyse av urin egnet for å vurdere nylig eksponering av BPA.



Figur 1: Glukuronidering av BPA i mennesker [24]

2.1.2 Helseeffekter

Bisfenol A er mye brukt i produksjon av vanlige forbrukerprodukter som matbeholdere, papir, vannrør, leker, personlige pleieprodukter og medisinske produkter [25]. Mange forskere har dokumentert effekter av BPA som hormonforstyrrende og har koblet BPA til skadelige helseeffekter som diabetes, overvekt eller kreft [26]. Det brukes alternative stoffer for å erstatte BPA som et resultat av offentlig bekymring og statlige forskrifter om BPA. Totalt 16 bisfenolanaloger har blitt dokumentert for industrielt bruk, der bisfenol F (BPF), bisfenol S (BPS) og bisfenol AF (BPAF) er alternativ erstatning for å fremstille polykarbonat plast [4]. Forhøyede konsentrasjoner av BPF, BPS og BPAF er rapportert i det biotiske miljøet og i urin fra mennesker fra enkelte regioner [5, 6]. Videre har laboratorieundersøkelser sett at mange bisfenolanaloger har hormonforstyrrende effekter, cytotoxiskitet, genotoksisitet, reproduksjonstoksisitet, dioksinlignende effekter og nevrotoksisitet [5]. Imidlertid er populasjonsepidemiologiske studier på assosiasjonene mellom eksponering av bisfenolanaloger og negativ helse fortsatt begrenset [4].

2.1.3 Arbeidsmiljø

I I-land vil miljøeksponering hovedsakelig skje gjennom oralt inntak, mens yrkesmessig eksponering av BPA skjer hovedsakelig gjennom luft og hudkontakt, og kan derfor potensielt gi enda høyere eksponering enn miljøeksponering [7]. Plastindustri, papirindustri [7], malingfabrikker, traktorfabrikker [27], kasserer [28] og brannmenn er noen eksempler på industri og yrkesgrupper der eksponering av BPA kan forekomme. Yrkesutsatte grupper har generelt sett høyere påvist verdier av BPA i serum enn miljøeksponerte individer [7]. Det

norske arbeidstilsynet har satt en grenseverdi på 2 mg/m^3 (høyeste tillatte gjennomsnittsnivå igjennom et åttetimers skift) for BPA (i luft) i arbeidsmiljøsammenheng [29], men det finnes ingen biologisk grenseverdi fastsatt for BPA i urin i Norge. Det tyske forskningsinstituttet (Deutsche Forschungsgemeinschaft) har satt en veiledende referanseverdi i urin på 80 mg fritt BPA/L urin som da tilsvarer øvre nivåer av BPA som man kan forvente å finne i urin hos den generelle befolkning [30]. Det er for øvrig ikke satt noen øvre grenseverdi for andre bisfenoler i verken luft eller urin.

2.2 Prøveopparbeidelse

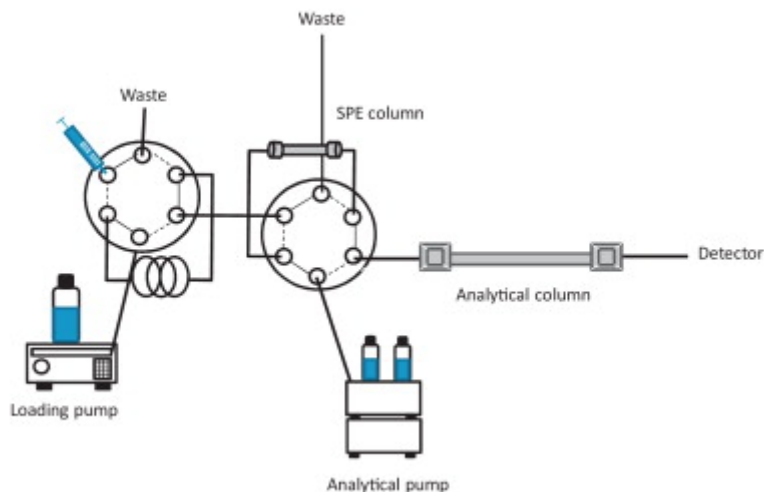
2.2.1 Fast-fase-ekstraksjon (SPE)

Fast-fase ekstraksjon (Solid-Phase Extraction SPE) benyttes til å isolere, rense og oppkonsentrere analytter fra væsker [31]. Ekstraksjonen har fire hoved trinn: 1) kondisjonering 2) påsetting av prøve, 3) vask og 4) eluering. Prinsippet for denne ekstraksjonen er at analyttens evne til å fordele seg mellom overflaten av et fast stoff (sorbent) og en væske. Det faste stoffet har funksjonelle grupper på overflaten som gjør at analytten binder seg til den. Hvis interaksjonen mellom analytten og overflaten er større enn analytten og væske, vil stoffet isoleres på overflaten. Slike faste stoffer kalles sorbenter og velges ut ifra interaksjoner med analytten. Hvis det er vandige prøveløsninger velges sorbenter for omvendt-fase-ekstraksjon eller ionebytterekstraksjon. Hvis prøven er løst i organiske løsemidler velges sorbenter for normalfase ekstraksjon. De fleste sorbenter er basert på silika, men det finnes også polymere sorbenter.

2.2.2 Online-SPE

Online-SPE blir direkte koblet til væskerkromatografi. Dette tar bort manuelle prøveopparbeidelsestrinn og gir dermed raskere analyser [32]. SPE ser ut som en liten kolonne som er montert på før selve analysekolonnen i HPLC-systemet. Prøven blir først injisert til SPE-kolonne før den senere blir separert på en analytisk kolonne [33]. SPE-kolonne og analytisk kolonne er koblet sammen ved hjelp av en 10-ports-ventil, der de forskjellige posisjonene til ventilen er koblet til SPE, analytisk kolonne, pumpe, prøvetaker og avfall [34]. Figur 2 viser en skisse av et system som består av to pumper, hvor loading-

pumpe overfører injiserte prøven til SPE-kolonnen. Uønskede forbindelser overføres til avfall, mens analyttene blir igjen på kolonnen [33]. Analytten eluerer av SPE-kolonnen ved at 10-ports-ventilen skifter posisjon slik at mobilfase med økende prosent organisk mobilfase kan eluere analytten av SPE-kolonnen, ofte ved såkalt «back-flushing» der analytten elueres av motsatt vei av det den ble satt på kolonna. Deretter elueres analytten direkte over til selve analysekolonna.



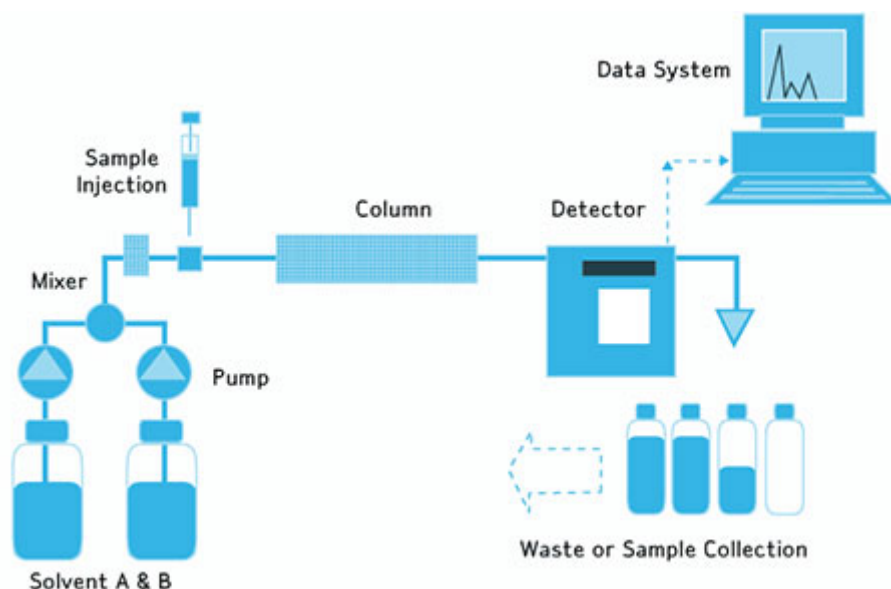
Figur 2: To-pumpe system [33]

2.2.3 Fortynning før analyse («dilute and shoot»)

Fortynning før analyse («dilute and shoot» - DS) har de siste årene blitt benyttet med LC-MS, der prøven blir fortynnet med intern standard og direkte injisert inn i LC-MS-instrumentet. Prøve-fortynning har fordelene med å være enkel, kostnadseffektiv prøveopparbeidelse i forhold til gamle prøveopparbeidelsesteknikker, og teknikker er kompatible med omvendt-fase-kromatografi [35]. DS benyttes ofte på stoffer som har egenskap til å ionisere seg og stoffer som har høye deteksjonsnivåer. Med gradvis økning av instrumentfølsomhet de siste årene, kan DS etter hvert brukes på stoffer med lavere deteksjonsnivå. Matrikseffekter kan være et problem med DS da prøvene ikke er rensert opp på forhand. Det som er fordelaktig med DS er at prøven går gjennom få prøveopparbeidelsestrinn, og derfor er tidsbesparende og kan hindre tap av prøve [36].

2.3 Kromatografi

Kromatografi er en fellesbetegnelse på teknikker som skiller analyttene fra hverandre. Dette gjøres ved at en blanding av analytter transporteres ved hjelp av en mobilfase gjennom en stasjonærfase. Analyttene blir separert på grunn av stasjonærfasen som bremses opp analyttene forskjellig. Når analyttene blir retardert ulik, kommer de ut på forskjellig tidspunkt, slik at de blir separert. I de teknikkene der mobilfase er en væske (mobilfasen kan også være en gass), kalles det væskerkromatografi (HPLC: High Performance Liquid Chromatography). HPLC består av følgende enheter: reservoar med mobilfase, pumpe, injektor, kolonne, detektor og PC [31]. Figur 3 viser bilde av de forskjellige komponentene til HPLC.



Figur 3: Skisse av de viktigste delene i en HPLC [37]

2.3.1 Omvendtfase kromatografi

I omvendt fase er stasjonærfasen upolar og mobilfasen er polar. Stasjonærfasen kan bestå av forskjellige alkankjeder: octadecyl (C18), octyl (C8), feynlpropyl (fenyl) og cyanopropyl (CN) som er bundet til silanolgrupper. Disse typene kalles silikabaserte. De forskjellige alkangruppene avgjør stasjonærfasens upolarhet og C18 er den mest vanlige. Stoffer retarderes på omvendt-fase-materialer ved hydrofob interaksjon, og retensjonen avtar etter som de hydrofobe gruppene på stasjonærfasen minker. Kraftene som virker er van der Waals-

krefter, og øker med molekylstørrelse på analytten. Interaksjonen oppstår mellom den hydrofobe delen på stasjonærfasen (alkankjede) og de hydrofobe delene på analytten. I en sammensatt prøve av analytter vil det mest hydrofile stoffet få kortest retensjonstid. Mobilfasen består av blandinger av vann og et organisk løsemiddel, som for eksempel MeOH og ACN. Innholdet av organisk løsemiddel avgjør styrken og retensjonen. Jo mer innhold av det organiske løsemiddelet, jo mindre retensjon får man. Valg av organisk løsemiddel kan også påvirke separasjonens selektivitet [31].

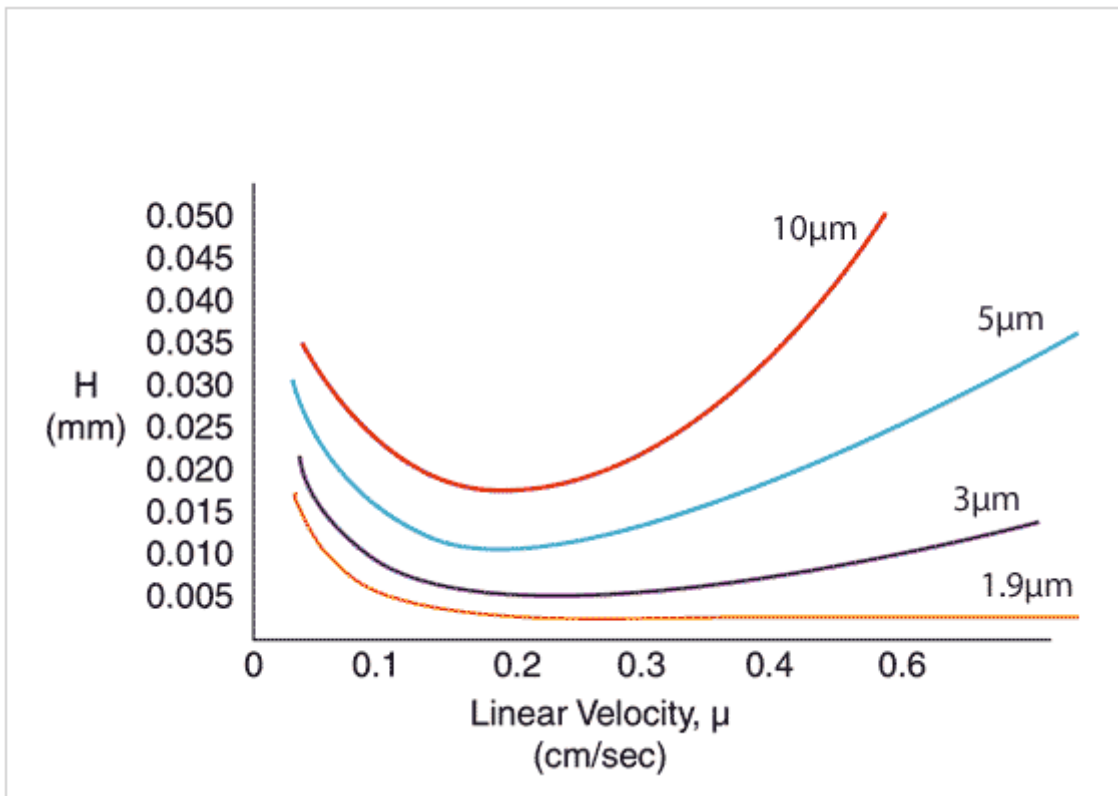
2.3.2 Ultra High Performance Liquid Chromatography – UHPLC

Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) er en retning innen væskrokromatografi og følger samme prinsipp som high performance liquid chromatography (HPLC), men den gir høyere hastighet på analysen, bedre oppløsning og følsomhet. Kolonnen inneholder da stasjonærfase med partikler mindre enn 2 µm, mens konvensjonell HPLC kolonner er fylt med partikler mellom 3-5 µm [38]. Under utviklingen av UHPLC står van deemters ligning sentralt. Det er en empirisk formel (Figur 4) som beskriver forholdet mellom lineær hastighet (flow rate) og platehøyde (HETP eller kolonneeffektivitet). Van Deemter-kurve (figur 5) viser at ved lave partikkelstørrelser kan man kjøre høy flow uten å miste kolonneeffektiviteten. Dette gir igjen mulighet til å få raskere analyser [38].

$$H = A + B/v + C/v [38]$$

- H:** høydeekivalenten til teoretisk plate
- A:** Eddydiffusjon
- B:** Diffusjon i mobilfase
- C:** Massetransport mellom stasjonær- og mobilfase
- V:** Strømningshastighet

Figur 4: Van Deemters ligning



Figur 5: Van deemter- kurve som viser at mindre partikkelstørrelser gir høyere total toppeffektivitet og et mye større utvalg av anvendbare strømningshastigheter. [39]

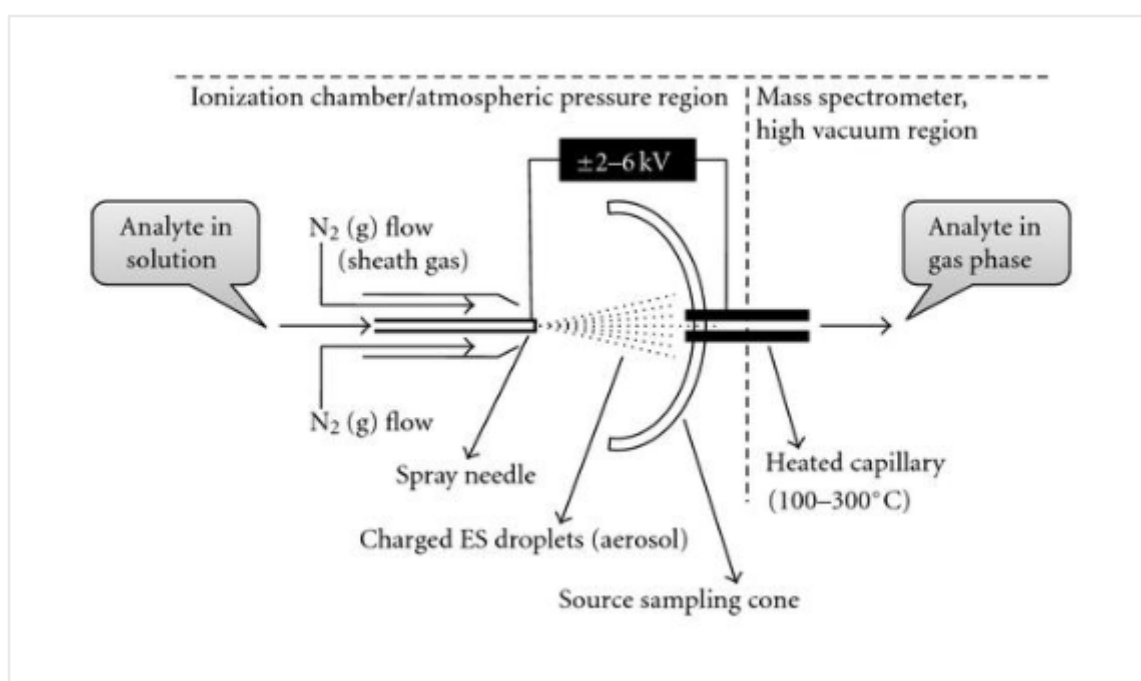
2.4 Massespektrometri

Massespektrometri er en analyseteknikk som benyttes til å identifisere og kvantifisere kjemiske forbindelser. Ioniseringen foregår i en ionekilde. Det benyttes ulike type ionekilder, og dette avhenger hvilke forbindelser man ønsker å analysere. I masseanalysatoren bestemmes massen til ionet, ofte kalt molekylionet. Ved hjelp av enten et magnetisk felt eller elektrostatisk felt separeres ionene etter forholdet (m/z) mellom masse (m) over ladning (z). I detektor registreres mengden av ionene som dannes, og hvilke masser ionene har. Resultatet fra en slik analyse registreres i et massespektrum, hvor intensiteten (mengden) av ioner plottes som funksjon av m/z [31].

2.4.1 Elektrosprayionisering (ESI)

ESI betegnes som en myk ioniseringsteknikk, der ioniseringen foregår under atmosfæretrykk. Denne ioniseringsteknikken benyttes som regel med HPLC koblet til MS som detektor. ESI

benyttes på enten sure eller basiske forbindelser, og stoffene er ionisert før de føres inn i MS. Prøven føres inn i MS med en væskestrøm (mobilfasen fra HPLC) hvor væsken bør være av flyktig karakter. Væskestrømmen passerer gjennom et trangt kapillærrør [31]. Utenfor kapillærrøret føres det en høy spenning (2-6 kV) til væskestrømmen som danner en aerosol [40]. Aerosol består av meget små dråper. Den høye spenningen gjør at de små dråpene i aerosol får elektrisk ladning. Gass-strøm, tørkegass (N₂), fordamper løsemiddelet som gjør at dråpene blir mindre. Tilslutt dyttes analyttmolekylene med ladning inn i masseanalysator ved hjelp av elektrisk spenning [31]. En typisk oppbygning av ESI-kilden og hovedprinsippene for ESI er vist i Figur 6.



Figur 6: En illustrasjon av ESI [40]

2.4.2 Atmosfæretrykk ionisering (APCI)

APCI er også en myk ioniseringsteknikk og benyttes med HPLC koblet til MS som detektor. I motsetning til ESI passerer væskestrømmen gjennom et varmt kapillærrør. Utenfor kapillæret vil væsken fordampe og transporteres bort av tørkegass. En nål med høyt elektrisk potensial (flere hundre kV) ioniserer molekylioner ved hjelp av kjemiske reaksjoner. Disse reaksjonene kan enten danne positive eller negative ioner av molekyler til analyttene. APCI benyttes som et alternativ for ESI og er mest egnet for analytter som ikke inneholder ioniserbare grupper [31].

2.4.3 Trippelkvadrupol

MS/MS (trippelkvadrupol) er en svært spesifikk og sensitiv teknikk. Analytter kan måles i komplekse blandinger i henhold til deres evne til å danne kationer (positiv ion-modus) og/eller anioner (negativ ion-modus), deres m/z -forhold og deres spesifikke fragmentering. Forbindelser analyseres i forhold til deres overgang mellom utgangsjon og produksjon par, og dette gjør at MS kan gi selektive bestemmelse av analytter. Trippelkvadrupol eller tandem massespektrometri består av tre kvadrupoler (Q1, q2 og Q3) etter hverandre. Disse kvadrupolene består av fire sylindriske metallstenger. Ved hjelp av multiple reaction monitoring (MRM) modus velges utgangsjonet i Q1, ioner fragmenteres i q2 og produksjoner velges i Q3 [41].

3 Eksperimentelt

3.1 Materialer og kjemikalier

Tabell 3.1, tabell 3.2, tabell 3.3 og tabell 3.4 presenterer kjemikalier, bisfenolstandarder, forbruksmateriell og utstyr, og instrumenter benyttet i denne oppgaven.

Tabell 3.1 Kjemikalier benyttet i oppgaven

Kjemikalier	Produsent	Renhet	CAS-nr
Metanol	Rathburn	Gradient Grade	67-56-1
Acetonitril	Rathburn	HPLC Grade S	75-05-8
Acetonitril	Fluka	LC-MS Grade	75-05-9
Eddiksyre	Merck	100 %	64-19-7
Metansyre	Sigma-Aldrich	≥ 98 %	64-18-6
Ammoniumacetat	Fluka	≥ 99 %	631-61-8
Ammoniumhydroksid	Merck	25 %	1336-21-6
β-glucuronidase/Arylsulfatase	Sigma-Aldrich	-	-

Tabell 3.2 Bisfenolstandarder benyttet i oppgaven

Navn	Produsent	Renhet	CAS-nr.
Bisfenol A	Sigma-Aldrich	≥ 99%	80-50-7
Bisfenol B	Sigma-Aldrich	≥ 98%	77-40-7
Bisfenol F	Sigma-Aldrich	≥ 98%	620-92-8
Bisfenol S	Sigma-Aldrich	≥ 98%	80-90-1
Bisfenol Z	Sigma-Aldrich	≥ 99%	843-55-0
Bisfenol AP	Sigma-Aldrich	≥ 99%	1571-75-1
Bisfenol AF	Sigma-Aldrich	≥ 99%	1478-61-1
Bisfenol A-d16	Sigma-Aldrich	98 %	96210-87-6
Bisfenol F-d10	Toronto Research Chemicals	98 %	1794786-93-8

Tabell 3.3 Forbruksmateriell og utstyr benyttet i oppgaven

Navn	Produsent	Spesifikasjoner/Modell
Flaske	VWR International	1 L, 500 mL, 25 mL
Målekolbe	VWR International	500 mL, 250 mL, 10 mL
Veieskip	VWR International	-
Spatel	VWR International	-
Automatpipette	Sartorius	1000 µL
Automatpipette	Thermo Scientific	Finnpipette F2: 1-10 µL, 10-100 µL
Pipettespiss	Sarstedt	Tip Stackpack
Pipettespiss	Thermo Scientific	Finntip Flex 10
Pipettespiss	Sartorius	Optifit tips 1000 µL
Pasteurpipette	VWR International	-
Analysevekt	Mettler Toledo	XPR 205
PH-meter	Thermo Scientific	Orionstar A211
Vial	Thermo Scientific	-
Vialkork	VWR International	-
Ultralydbad	Bandelin	Sonorex RK510H
Eppendorfrør	Eppendorf	-
Stativ	HP	-
Vannbad	GFL	-
Thermomikser	Eppendorf	Thermomixer Comfort
Sentrifuge	Thermo Scientific	MicroCL 21 centrifuge

Tabell 3.4 Instrumenter med tilbehør benyttet i oppgaven

Produkt	Produsent	Spesifikasjoner/Modell
HPLC	Thermo Scientific	Dionex Ultimate 3000 RS
HPLC-Kolonne	Waters	Acquity UPLC BEH C18, (2.1 x 100) mm, 1.7 µm
MS	Thermo Scientific	TSQ Vantage
Programvare	Thermo Scientific	Chromeleon Xpress
Programvare	Thermo Scientific	TSQ Tune Master
Programvare	Thermo Scientific	XcaliburTM 2.2
Online SPE-kolonne	Waters	Xbridge C8, (3.0 x 30) mm, 3.5 µm

3.2 Metode

3.2.1 Bisfenoler – kjemiske egenskaper og struktur

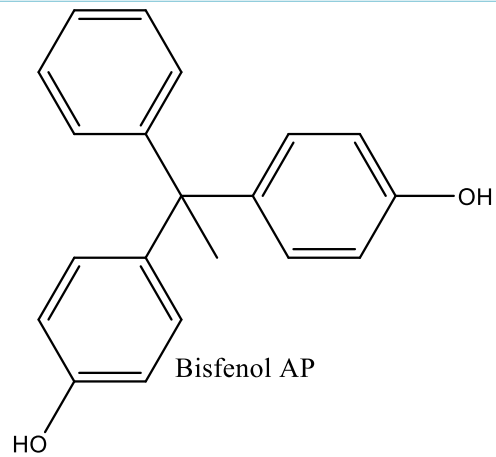
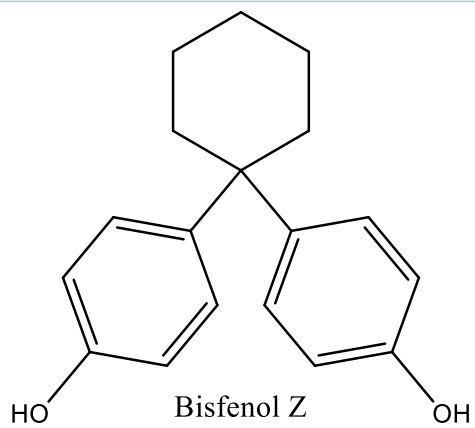
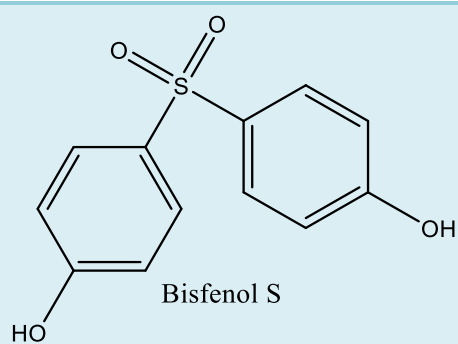
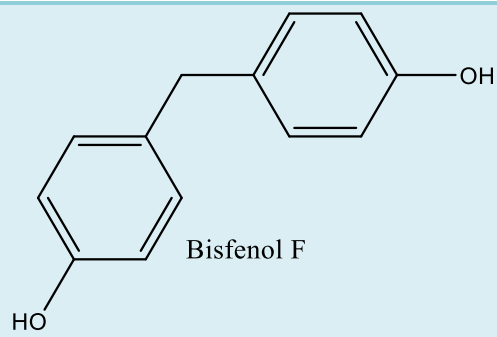
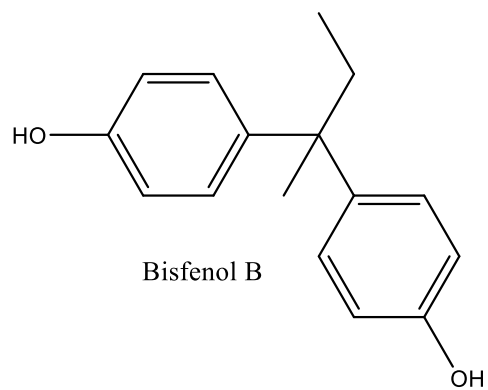
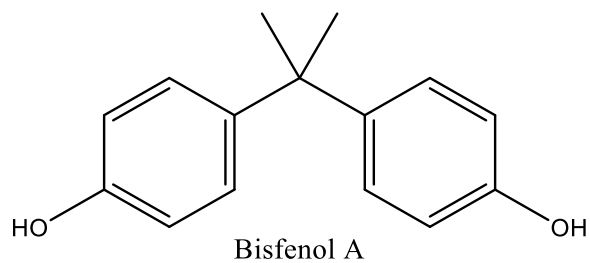
Tabell 3.5 presenterer fysikalsk kjemiske egenskaper ved BPA og metabolittene.

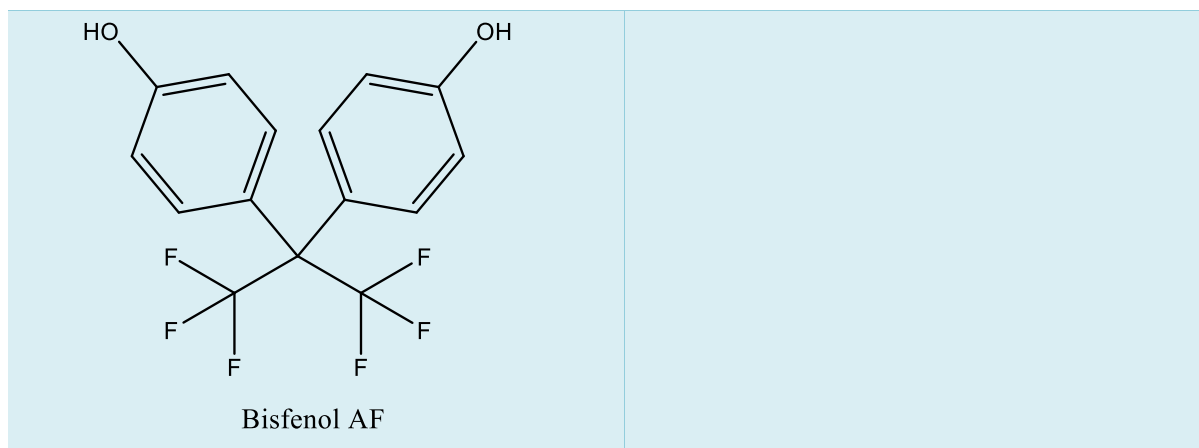
Tabell 3.6 presenterer kjemiske strukturer av alle analyttene

TABELL 3.5: Fysikalskkjemiske egenskaper til alle bisfenolene brukt i oppgaven [42]

Forbindelse	Monoisotopisk masse (g/mol)	Molekylvekt (g/mol)	Kjemisk formel	pka	xlogP
BPA	228.11	228.29	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	9,6	3,3
BPB	242.13	242.31	C ₁₆ H ₁₈ O ₂	10,1	3,9
BPF	200.08	200.23	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	7,55	2,9
BPS	250.02	250.27	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S	8,2 ved 25 °C	1,9
BPZ	268.14	268.3	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	9.76-10.37	5,4
BPAP	290.13	290.4	C ₂₀ H ₁₈ O ₃	9.66-10.27	4,4
BPAF	336.05	336.23	C ₁₅ H ₁₀ F ₆ O ₂	9.2 ved 25 °C	4,5

Tabell 3.6: Kjemiske strukturer av analyttene [43] [4]





3.2.2 Tillaging av stamløsninger

Stamløsninger av alle bisfenolene ble laget ved å veie inn ca. 1 mg av hver forbindelse på analysevekt, overført til 25 mL målekolbe og løst i LC kvalitet acetonitril (ACN). Alle løsningene ble oppbevart i fryser ved $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lavere konsentrasjoner av løsningene ble laget ved å pipettere ut ønsket volum og fortynnet med vann eller ACN. Stamløsninger av internstandard (IS) var laget før start av oppgaven og hadde konsentrasjon $0,382\text{ mg/mL}$ for bisfenol A-d16 og 1 mg/mL for bisfenol F-d10.

3.2.3 Tillaging av mobilfaser

Det ble testet ut fire forskjellige mobilfaser (mobilfase A): $0,1\%$ (v/v) eddiksyre, $0,1\%$ (v/v) metansyre, $0,1\%$ (v/v) NH_4OH og 15 mM ammoniumacetat. De tre førstnevnte ble laget ved å pipettere ut ønsket volum og fortynnet med MilliQ-vann. Den sistnevnte ble laget ved å veie ut ønsket mengde på analyse vekt og fortynnet med MilliQ-vann. Mobilfase B var MS kvalitet ACN.

3.2.4 Prøveopparbeidelse

Først ble urin spiket med alle forbindelsene utenom IS. Et volum på $500\text{ }\mu\text{L}$ spiket urin ble overført til 2 mL eppendorfrør. Deretter ble det tilsatt $50\text{ }\mu\text{L}$ IS (BPA-d16 og BPF-d10) med konsentrasjon $1\text{ }\mu\text{g/mL}$, $200\text{ }\mu\text{L}$ 1 M ammoniumacetat og $10\text{ }\mu\text{L}$ ufortynnet enzym (β -glucuronidase/arylsulfatase). Prøvene ble satt i vannbad over natt (ca. 16 timer) ved 37 grader og risting. Tilslutt ble det tilsatt $250\text{ }\mu\text{L}$ $0,5\%$ metansyre slik at fortynningen ble 1:1

urin:metansyre. Dette ble sentrifugert i 10 minutter på 11000 rpm for å få bunnfall av enzymet, eventuelle andre proteiner og partikler i urinen. Supernatanten ble overført til vial og ble analysert. (Kalibreringskurver fulgte samme prosedyre for prøveopparbeidelse.)

3.2.5 Urinprøve fra brannmenn og interlaboratorieprøver

Urinprøver fra to brannmenn samlet inn i et pågående prosjekt på STAMI: (Kreftrisiko blant brannmenn ble analysert). Prøvene ble samlet inn under en øvelsesbrann i bil. Urinprøver ble avgitt i mørke uringlass (Sarstedt, Tyskland) rett før øvelsesbrannen, rett etter brannen og seks timer etter brannen. Prøvene ble oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prøvene ble tint før analyse og behandlet slik som beskrevet i 3.2.4. Disse brannmannprøver er omtalt som B1 (brannmannprøve 1) og B2 (brannmannprøve 2) i kapittel 4.5. Prøve 1 er prøve tatt rett før brann, prøve 2 er tatt rett etter brann og prøve 3 er tatt seks timer etter brann.

Interlaboratoriekontrollprøver med bisfenol A ble kjøpt fra et tysk analysefirma (The German External Quality Assessment Scheme, G-equa, 64.runde), og ble oppbevart kjølig (8 grader) før prøveopparbeidelse som beskrevet i 3.2.4 Prøveopparbeidelse og videre analyse.

3.2.6 Testing av masseoverganger, kollisjonsenergi og kollisjonstrykk

Det ble injisert løsninger av alle bisfenolene og IS ($1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ i metanol) direkte på massespektrometer (MS) for å bestemme masseoverganger, kollisjonsenergi og kollisjonstrykk.

3.3 Den endelige analysemetoden

3.3.1 UHPLC-betingelser

Som mobilfase A ble 60 % 15 mM Ammoniumacetat benyttet, mens mobilfase B bestod av 40 % ACN. Mobilfasehastighet på $0,3\text{ mL/min}$ ble benyttet under analysen og et Injeksjonsvolum på $50\text{ }\mu\text{l}$ ble injisert inn i LC-MS-instrumentet. Total analysetid var 6 minutter. Det ble benyttet kolonne fra Waters Acquity UPLC BEH C18 med diameter $2,1$

mm og lengde 100 mm og partikkelstørrelse på 1,7 µm. Kolonnetemperaturen ble satt til 60 grader.

3.3.2 MS-betingelser

Under MS-betingelser ble det valgt ESI som ioniseringsteknikk og analyttene ble analysert i negativ mode. Tabell 3.7 viser hvilken masseovergang og kollisjonsenergi som ble benyttet på hver enkel forbindelse (IS er også inkludert). (BPA-d16 og BPF-d10 er de deutererte forbindelsene av BPA og BPF).

Tabell 3.7: Masseoverganger og kollisjonsenergi for alle BP benyttet under MS-betingelser

Analytt	Overgang	Kollisjonsenergi (V)
BPA	226,9 -> 212,0	23
BPA-d16	240,7 -> 223,2	23
BPB	240,9 -> 212,0	22
BPF	198,9 -> 105,2	24
BPF-d10	209,0 -> 97,2	29
BPS	248,9 -> 108,1	32
BPZ	266,9 -> 223,1	37
BPAP	288,9 -> 274,0	25
BPAF	334,9 -> 265,0	26

3.4 Validering av metoden

Den endelige metoden ble validert for å vise hvor godt den er egnet for kvantitative målinger. Denne valideringen var ikke fullstendig, men det ble utført en forenklet validering for å teste potensiale for å bruke metoden i kvantitative analyser. Det ble tatt utgangspunkt i det europeiske legemiddelbyrå (European Medicines Agency, EMA) krav til bionalytiske metoder [44], men kun følgende parameterne ble evaluert: deteksjonsgrense (LOD), kvantifikasjonsgrense (LOQ), lineært område, metodepresisjon og nøyaktighet.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Tuning av MS-betingelser

Innledningsvis ble M-H, produktion, kollisjonsenergi og kollisjonstrykk for de ulike bisfenolene bestemt ved direkte infusjon av analyttene i MSen. Tabell 4.1 viser M-H, produktion, kollisjonsenergi og kollisjonstrykk funnet ved tuning av analyttene.

Tabell 4.1: Oversikt over [M-H]⁻, produktion, kollisjonsenergi og kollisjonstrykk for alle BP.

Analytt	[M-H] ⁻ og produktion	Kollisjonsenergi (V)	Kollisjonstrykk (mtorr)
BPA	226,9 ---> 212,0	20	2,4
BPB	240,9 ---> 212,0	20	1,7
BPF	198,9 ---> 93,0	23	1,6
BPS	248,9 ---> 108,1	29	2,2
BPZ	266,9 ---> 223,1	34	2,0
BPAP	288,9 ---> 274,0	23	1,6
BPAF	334,9 ---> 265,0	24	2,2

4.1.1 Bestemmelse av endelig kollisjonsenergi

For å få bedre signalintensitet og sensitivitet av metoden ble MS-betingelser optimalisert videre med å teste forskjellig kollisjonsenergi rundt kollisjonsenergi bestemt under tuning. Det ble tatt utgangspunkt i kollisjonsenergi i tabell 4.1 og +/- 3 volt ble testet. Det ble også testet ut 3 forskjellige declustering spenninger da dette kan øke sensitivitet hvis analyttene danner addukter med for eksempel spormengder av salter i mobilfasen. Signalintensiteten økte med økt spenning for samtlige bisfenoler. Signalintensiteten for BPA økte med 11% i forhold den initielle signalintensiteten og dette var å se for de andre bisfenolene også der signalintensiteten økte fra 10-30 %. Dette ble gjort ved å injisere rene løsninger med alle bisfenoler (BP) fra prøvetaker og via analysekolonnen før MS-deteksjon. Tabell 4.2 viser de initielle og endelige kollisjonsenergi for alle BP.

Tabell 4.2: Initiell og endelig kollisjonsenergi for alle BP

Analytt	Initiell kollisjonsenergi [V]	Endelig Kollisjonsenergi [V]
BPA	20	23
BPB	20	22
BPF	23	24
BPS	29	32
BPZ	34	37
BPAP	23	25
BPAF	24	26

4.2 Optimalisering av HPLC-metode

Det ble screenet fire forskjellige mobilfase A for å se hvordan mobilfasen påvirket signalintensitet, retensjonstider og separasjon av analyttene. Vi ønsket å teste forskjellige mobilfaser med forskjellige pH og testet 0,1 % maursyre, 0,1 % eddiksyre, 0,1 % ammoniumhydroksid og 15 mM ammoniumacetat. Dette ble undersøkt for å se om separasjon var mulig, og hvilken av de ulike mobilfasene som ville gi best signalintensitet. Tabell 4.3 viser de fire forskjellige mobilfasene og deres pH mål.

Tabell 4.3: Ulike mobilfase testet og deres pH mål ved gitt konsentrasjon

Mobilfase :	Sammensetning	pH
A		
1	0,1 % Maursyre	2,75
2	0,1 % Eddiksyre	3,36
3	0,1 % Ammoniumhydroksid	11,08
4	15 mM Ammoniumacetat	6,68

Høyst signal ble funnet ved basiske betingelser (0,1 % ammoniumhydroksid) for alle bisfenolene unntatt (BPS som ikke ga noe signal ved denne mobilfasen). Sure betingelser

(mobilfase 1 og 2) ga lave signalintensiteter for alle bisfenolene. Dette kan mest sannsynlig skyldes at ioniseringen i ESI undertrykkes ved disse betingelsene da bisfenolene har pKa-verdier i området 1,9 – 5,4. I denne oppgaven endte det opp med 15 mM ammoniumacetat som mobilfase A. Dette er et kompromiss mellom lavt pH som gir tilstrekkelig retensjon og separasjon (men noe dårlig signalintensitet for samtlige av bisfenolene) og høy pH som ga tilstrekkelig signalintensitet for alle analyttene samt tilstrekkelig retensjon utenom BPS.

4.3 Prøveopparbeidelse

4.3.1 Testing av online SPE-metode

Ulike injeksjonsvolum (25 μ L-250 μ L), ulike loadetider (0-5 minutter) og ulik prosent start på mobilfase B (10-40 %) ble testet for å optimalisere signalintensitet og toppfasong. 15mM ammoniumacetat:ACN (90:10, v/v) ble valgt som loadingbuffer. (Kombinasjon av de forskjellige betingelsene er vist i tabell 1 i appendix.)

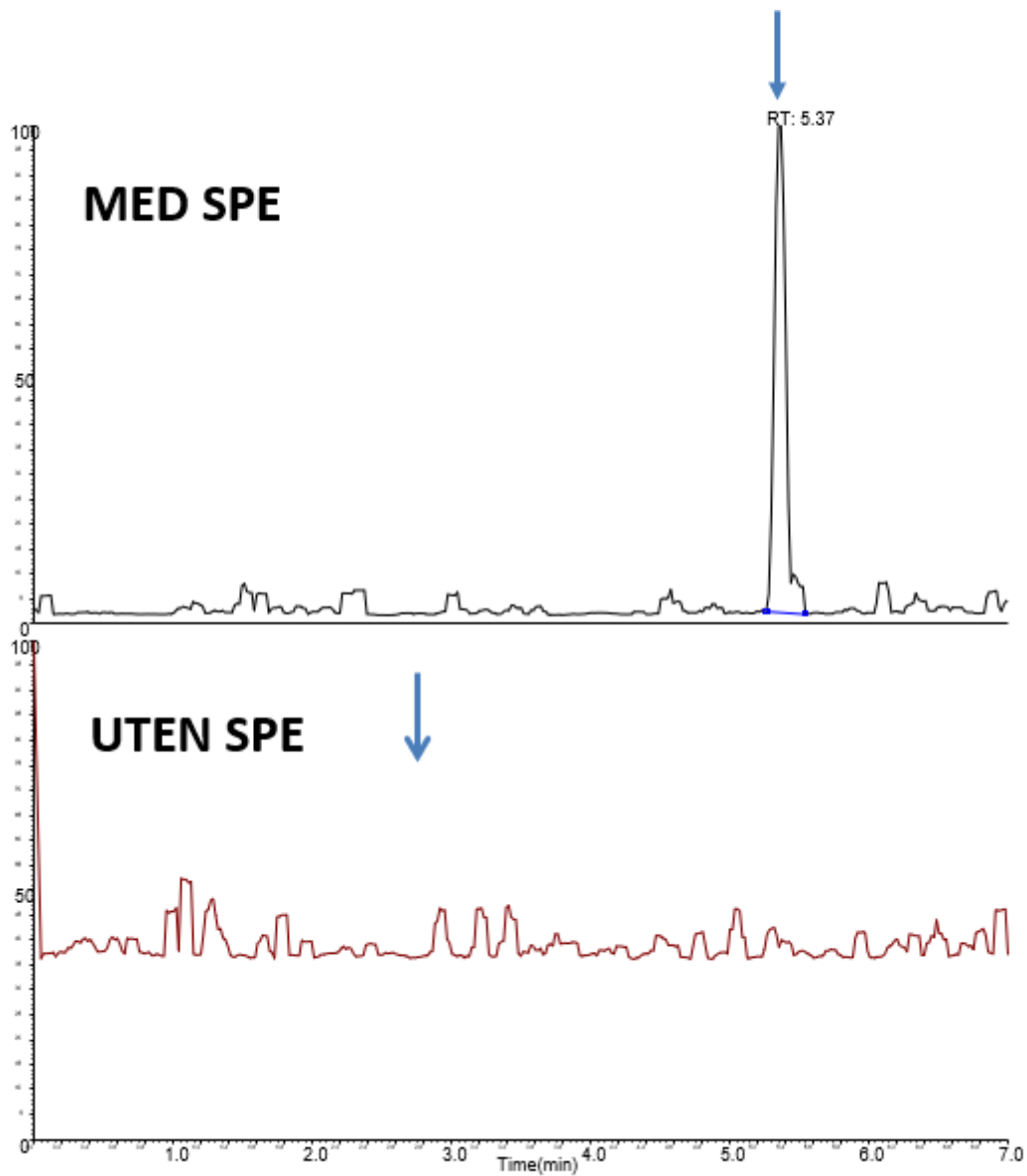
Hvordan betingelsene påvirker signalintensitet og topphøyde varierte fra analytt til analytt, sannsynligvis på grunn av forskjeller i analyttenes kjemiske egenskaper. Generelt gir økt injeksjonsvolum høyere signalintensitet, mens økt loadetid fører til tap av analytt. Gradient som starter med høy prosent mobilfase B ser ut til å gi bedre signalintensitet for BPAP og BPAF. På tross av at høyt injeksjonsvolum gir høyt signal for alle bisfenolene, gir den dessverre også veldig brede topper. De optimale betingelsene for online-SPE viste seg å være når det ble benyttet et injeksjonsvolum på 50 μ L, loadetid på 3 min og prosent start mobilfase B 40 %.

4.3.2 Eliminering av bakgrunn

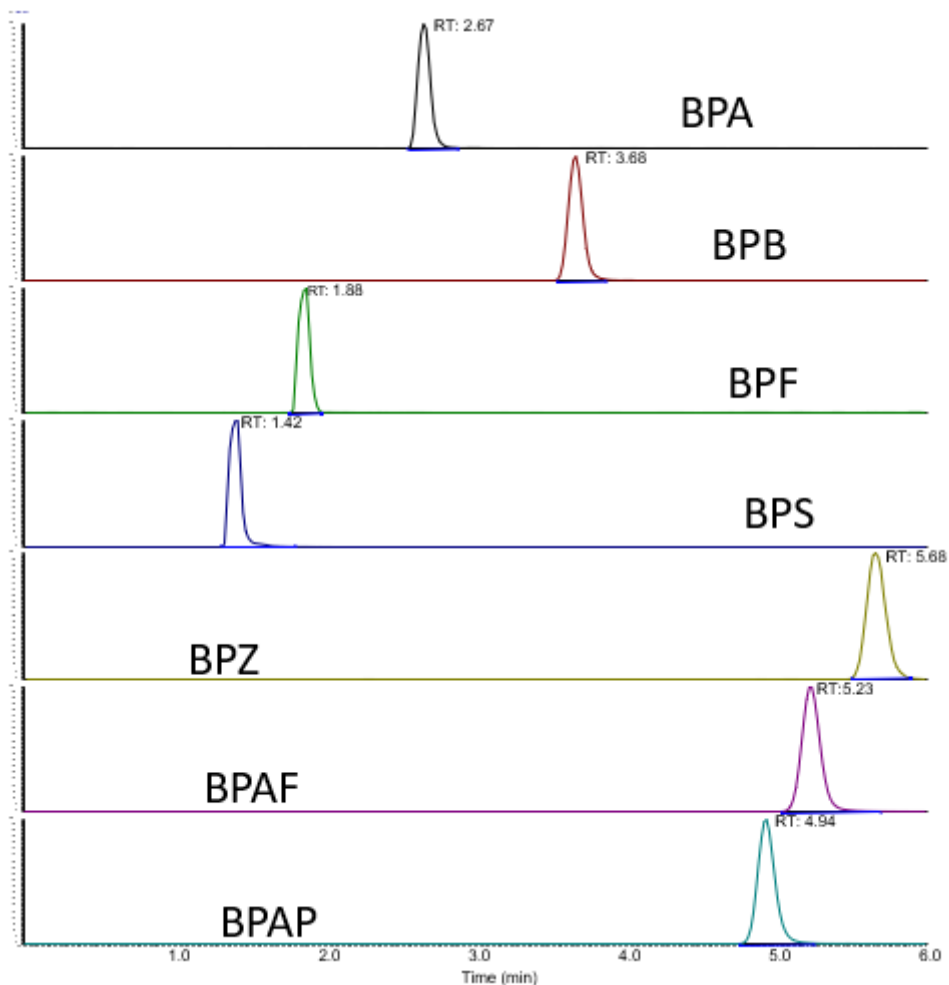
Det ble oppdaget spormengder av BPA i blanke prøver (mobilfase A) som kan komme fra løsningsmidler, laboratoriestyr og plastutstyr som brukes til prøveopparbeidelse [45]. For å eliminere bakgrunn av spormengder av BPA i blanke prøver, ble følgende testet: MilliQ-vann ble byttet ut med LC-MS kvalitet vann og ACN ble byttet fra LC kvalitet til LC-MS kvalitet. Utstyr som brukes til å lage mobilfase ble også bakt i ovnen i 400 °C i 4 timer for å fjerne eventuelle rester av BPA i glassutstyret [8]. En publisert studie har beskrevet at BPA kan

akkumuleres på SPE-kolonne under kondisjonering der høyt nivå av mobilfase A benyttes, sannsynligvis spormengder av BPA fra vannet, løsemiddelet og annet utstyr. Det ble benyttet 90 % ammoniumacetat (mobilfase A) på SPE kolonne i online-SPE-metoden optimalisert i avsnitt 4.3.1. Da SPE ble tatt ut av metoden forsvant også bakgrunnen av BPA. Dette er vist i figur 7 hvor resultatet fra analysen med SPE og uten SPE vises med en start gradient på 40 % B. BPA akkumuleres sannsynligvis på SPE-kolonne når (høy prosent mobilfase A benyttes) og elueres deretter ut da det ble byttet til organisk mobilfase (mobilfase B) over SPE-kolonnen. Det ble derfor konkludert med at SPE-kolonner ikke skal benyttes ved videre analyser.

Senere ble det også testet å bruke en gradient over den analytiske kolonnen (uten bruk av SPE) som startet på 0 % mobilfase B. Dette resulterte i at bakgrunn av BPA kom tilbake. Forskjellige nivå av mobilfase B (10 %, 20 % og 30 %) ble også testet med gradient eluering over den analytiske kolonnen (uten SPE). Lav prosent mobilfase A i starten av gradienten førte sannsynligvis til det samme problemet for analysekolonnen som observert for online SPE-kolonnen. Bakgrunn ble ikke observert ved analyser som startet på 20 % og 30 % B, men resultatet ble da veldig bred topp for BPS og veldig lang retensjonstid for de andre bisfenolene. Konklusjonen ble at bruk av høy % mobilfase B (40 %) eliminerte bakgrunn av BPA samtidig som retensjonstid og separasjon for de andre bisfenolene ble akseptabel. Isokratisk eluering (40 % mobilfase B) ble benyttet fordi retensjonstiden til bisfenolene var uendret sammenlignet med gradienteluering som startet fra 40 % til 95 % mobilfase B. Bisfenolene med lengst retensjonstid (bisfenol Z, AP og AF) fikk noe bredere toppbredde med isokratisk eluering, og dette ble løst ved å øke kolonnetemperaturen fra 40 grader til 60 grader. Isokratisk eluering gav en rask analysemetode siden regenerering av kolonna ikke var nødvendig. Den totale analysetiden for bisfenolene ble på 6 min, og et kromatogram for alle bisfenolene ved bruk av disse betingelsene er vist i figur 8.



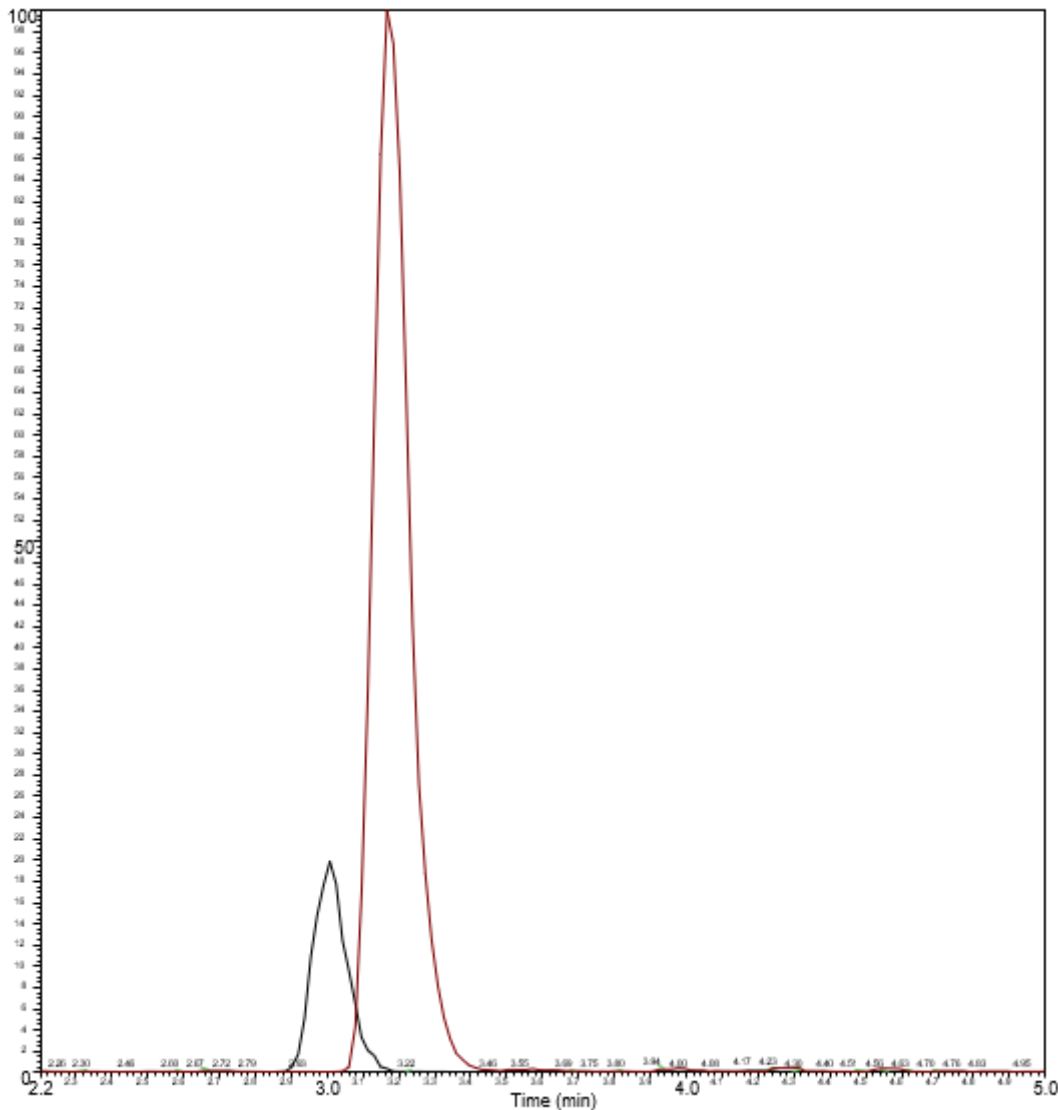
Figur 7: LC-MS/MS kromatogram fra analyse av blanke prøver gjort med SPE (øverst) og uten SPE (start gradient 40% B) (nederst). De blå pilene indikerer forventet retensjonstid for bisfenol A. Bakgrunn av BPA ble eliminert ved å ta bort SPE og kjøre 40 % mobilfase B.



Figur 8: LC-MS/MS kromatogram for BPA, BPB, BPF, BPS, BPZ, BPAF og BPAP. (Konsentrasjon er 50 ng/mL og injeksjonsvolum 50 μ L)

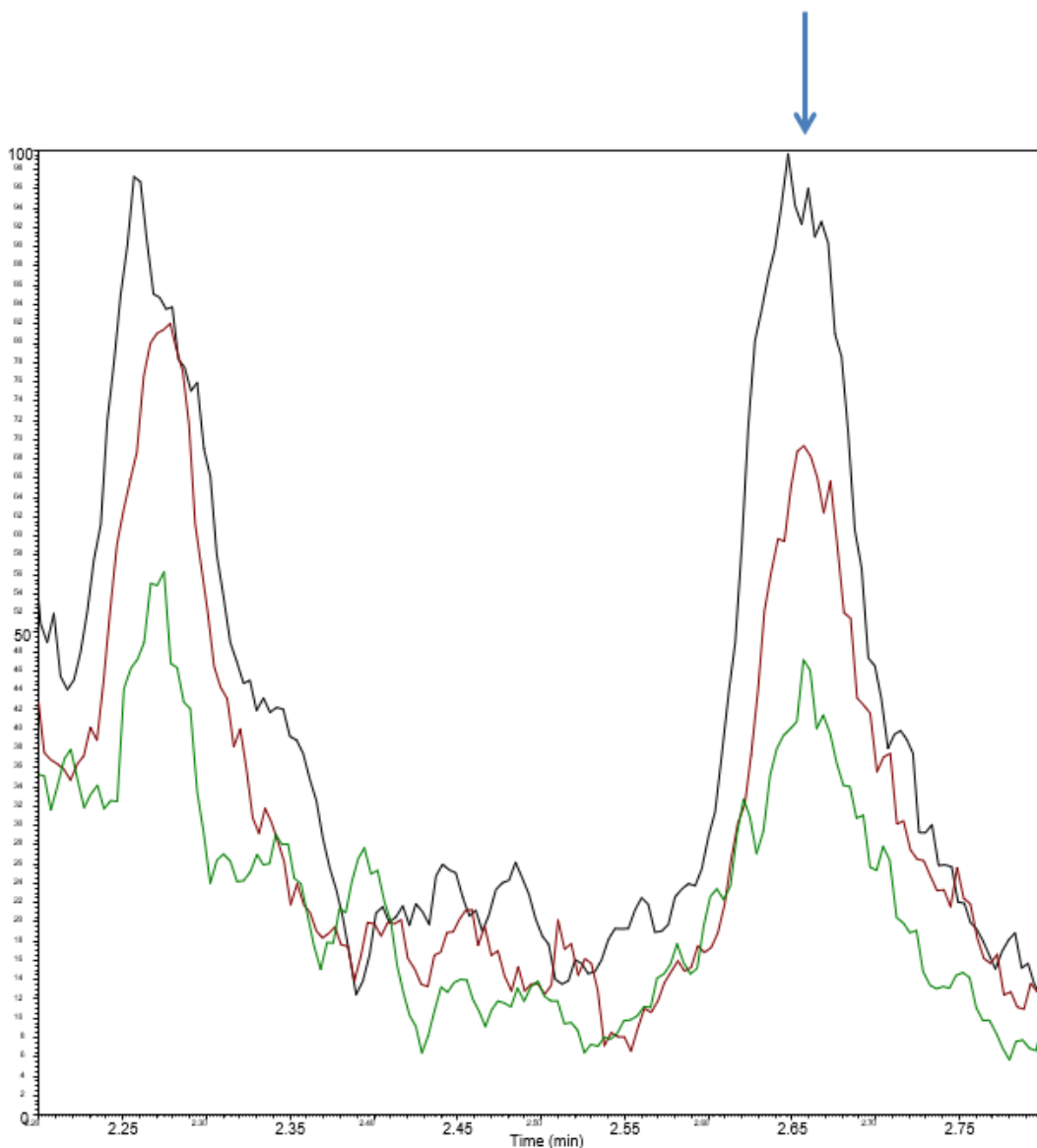
4.3.3 Optimalisering av injeksjonsvolum og fortynningsmetode

Da online-SPE ble fjernet som prøveopparbeidelsestrinn ble det testet om en enkel fortynning av prøven før analyse kunne benyttes (Såkalte «Dilute and Shoot»). Det ble igjen testet ulike injeksjonsvolum med bruk av isokratisk eluering og uten SPE. Volum på 10 μ L og 50 μ L ble testet. Figur 9 viser signalintensitet mellom 10 μ L og 50 μ L. Volum på 50 μ L ga som forventet 5 ganger høyere signalintensitet enn 10 μ L, men litt bredere topper. Signalintensiteten øker med økt volum fordi mer mengde av analyttene blir injisert. Det ble valgt 50 μ L injeksjonsvolum da dette ga best signalintensitet. Injeksjonsvolum større enn 50 μ L resulterte i brede topper og derfor ble 50 μ L valgt som endelig injeksjonsvolum.



Figur 9: Kromatogram av BPA med injeksjonsvolum 10 μL (sort topp) og på 50 μL (rød topp)

I tillegg ble ulike fortynningsforhold mellom urin og mobilfase testet: 250 μL , 500 μL og 1000 μL , 0.5 % maursyre ble tilsatt til 250 μL urin. Det ble fokusert på å optimalisere signalintensitet for bisfenol A og optimaliseringen ble utført på en reel urinprøve. Figur 10 viser resultat fra forskjellige fortynningsvolum. Det ble valgt 250 μL som fortynningsvolum (1:1 fortynning) fordi høyst signalintensitet resulterte med 250 μL uten at injeksjons nål eller kolonne ble tett.

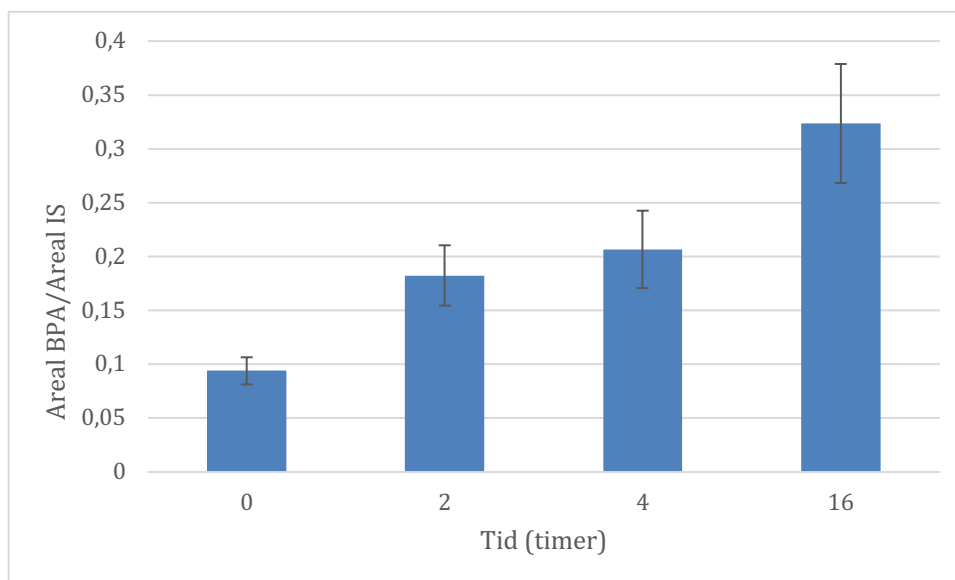


Figur 10: Kromatogram av signalintensitet av BPA for fortynningsvolum 250 µl, 500 µl og 1000 µl (Signalintensiteten øker med minkende fortynningsvolum).

4.3.4 Optimalisering av hydrolysetid/prøveoppbeidelse

Det ble testet ulike klippetider (0 timer (t), 2 t, 4 t og 16 t), der bisfenoler blir omgjort fra bisfenol-glukurinidase og bisfenol-sulfat med enzymet, β -glucuronidase/Arylsulfatase. Optimaliseringen ble utført på morgenurin donert fra en frisk frivillig og signalintensiteten til bisfenol A ble monitorert ved ulike klippetider (n=3 for hver klippetid testet). Figur 11 viser resultater fra de ulike klippetidene. Ved 0 t ble signalintensitet lavere enn etter 2-16 timers hydrolyse og fordi urin som ikke er hydrolysert finnes det lite fritt BPA. Det ble brukt

overnatt klipping (16 t) til videre i prøveopparbeidelse da denne tiden for hydrolyse ga høyest signalintensitet. 16 timers hydrolyse ga høyest signalintensiteter da dette er tilstrekkelig med tid til å frigi all BPA-metabolittene sammenliknet med kortere hydrolysetid.



Figur 11: Diagram av hydrolyse av BPA-glukuronid i 0 timer, 2 timer, 4 timer og 16 timer vs ratio av areal BPA/Areal IS, n=3.

4.4 Validering av metoden

Det ble utført en forenklet validering av metoden for å se på kvantifiseringsgrense, linearitet, presisjon og nøyaktighet. Kvantifiseringsgrense (LOQ) er den laveste konsentrasjon av analytten som er kvantifiserbart [44]. Resultater fra LOQ er vist i tabell 4.4 og resultater fra presisjon og nøyaktighet er presentert i tabell 4.5. Kvantifiseringsgrenser og linearitet ble testet i konsentrasjonsområdet 0.1-50 ng/mL for alle bisfenolene og nøyaktighet og presisjon ble testet ved 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL og 1 ng/mL (n=3 for hver konsentrasjon). Etter bestemmelse av kvantifiseringsgrensen ble det laget en kalibreringskurve fra den nederste kvantifiserbare konsentrasjon til 50 ng/mL. Kalibreringskurve for de syv bisfenolene er presentert i appendix.

Tabell 4.4: LOQ i ng/mL for alle BP

Analytt	LOQ (ng/mL)
BPA	0,5
BPB	2
BPF	5
BPS	2
BPZ	5
BPAP	1
BPAF	0,5

Nøyaktigheten av en analysemetode beskriver den målte verdien av konsentrasjonen til en prøve i forhold til den nominelle konsentrasjonen uttrykt i prosent [44]. EMA guidelines [44] beskriver at nøyaktighet må være innenfor 15 % av den nominelle konsentrasjonen (og innenfor 20 % av den nominelle konsentrasjonen ved LOQ). For de høyeste konsentrasjonene (20 ng/mL og 10 ng/mL) var avvikene under 15 %. For konsentrasjoner under 10 ng/mL var avvikene for bisfenol A og bisfenol BPAF henholdsvis -5% og 11 %, mens de resterende bisfenolene hadde avvik over 15 %.

Presisjon (RSD%) beskriver nærheten til gjentatte individuelle målinger til den nominelle verdien for hver analytt [44], og uttrykkes som variasjonskoeffisient. EMA guidelines viser til at det burde være 5 paralleller (n=5) for hver konsentrasjon og RSD % må være innenfor 15 %. RSD % var under 15 % for de fleste bisfenolene, unntaket er bisfenol A hvor RSD % var over 15 % for konsentrasjon 1 ng/mL, 10 ng/mL og 20 ng/mL. Høye RSD % for bisfenol A var uventet da denne analytten ble korrigert med internstandard. Årsaken til dette kan være matrikseffekter som ikke korrigeres av internstandard. Ved videre metodeutvikling bør matrikseffekter også undersøkes.

Tabell 4.5: Viser alle BP med konsentrasjon, nøyaktighet og presisjon (n=3)

Analytt		BPA	BPB	BPF	BPS	BPZ	BPAP	BPAF
1 ng/mL	Målt C ng/mL	1,5	-	-	-	-	3,2	2,9
	Avvik %	49,5	-	-	-	-	219	193,8
	RSD %	26,7	-	-	-	-	1,3	0,92
5 ng/mL	Målt C ng/mL	4,8	5,9	6,5	5,9	8	6,3	5,6
	Avvik %	-4,9	17,3	29,3	17,8	59,4	26,6	11,1
	RSD %	9,3	2,8	16,7	8,1	7,9	1,5	2,2
10 ng/mL	Målt C ng/mL	9	9,8	10,8	10,1	12	11	10,1
	Avvik %	9,8	-2,3	8,4	0,8	19,4	10,2	0,5
	RSD %	19,3	20,5	5	1,5	5,7	1,3	2,3
20 ng/mL	Målt C ng/mL	18,3	21,5	23,6	19,3	21,9	21,8	20,6
	Avvik %	-8,4	0,08	18	-3,4	9,5	8,9	2,8
	RSD %	21,1	2,7	10,2	1,3	3	2,5	1,7

4.5 Analyse av brannmannprøver og interlaboratorieprøver

Under validering av metoden ble reelle prøver fra to brannmenn analysert for å sjekke om metoden var tilstrekkelig sensitiv for å detektere bisfenoler i reelle urinprøver etter mulig bisfenoleksponering (brann). I tillegg ble interlaboratorieprøver (64 A og 64 B) analysert for å sjekke om konsentrasjonene funnet med den utviklede metoden i denne oppgaven samsvarte med de nominelle konsentrasjonene. Tabell 4.6 viser målte konsentrasjonsnivåer i brannmannprøvene. Det ble detektert BPA over LOQ i fire av seks brannmannprøver. Ved betydelig eksponering etter brann ville man forvente høye konsentrasjoner 6 timer etter brann (tilsvarer prøve B1-3 og B2-3) i forhold til prøve tatt rett før brann (tilsvarer prøve B1-1 og B2-1). For å kunne bestemme om konsentrasjonene av analytt i urin observert her hadde økt sammenlignet med prøve tatt før brann (B1-1 og B2-1, vil det være nødvendig å korrigere analyseresultatene med urinens keratininkonsentrasjon. Ingen andre bisfenoler ble detektert i urinprøvene fra brannmann 1 og brannmann 2.

Tabell 4.6: Målte konsentrasjonsnivåer av BPA i brannmannprøvene

Brannmannprøve	Konsentrasjon BPA ng/mL
B1-1	< LOQ
B1-2	1,2
B1-3	< LOQ
B2-1	1,5
B2-2	0,9
B2-3	2,6

Tabell 4.7 viser den målte og den nominelle konsentrasjonsverdi av interlaboratorieprøvene, 64 A og 64 B. Konsentrasjonen funnet i interlaboratorieprøvene med metoden utviklet i denne oppgaven avvirket -59,6 % for 64 A og -41,3 % for 64 B fra de nominelle konsentrasjonene. Resultater fra interlaboratorieprøver viser at analysemetoden ikke er egnet til å måle nominelle konsentrasjoner i prøvene, og at videreutvikling er nødvendig for tilstrekkelig og nøyaktig bestemmelse av bisfenoler i urin.

Tabell 4.7: Interlaboratorieprøver med nominelle, - og målt konsentrasjon av BPA i ng/mL og avvik, (n=3).

Interlaboratorieprøve	Nominelle konsentrasjon ng/mL	Målt konsentrasjon ng/mL	Avvik %
64A	0,89	0,36	-59,6
64B	22,34	13,11	-41,3

5 Konklusjon

I denne oppgaven ble det utviklet UHPLC-MS/MS metode for å måle syv bisfenol metabolitter i urin i arbeidsmiljø sammenheng. Det ble benyttet en enkel fortynningsmetode for en enkel prøveoppbehandling før analyse. LC-MS-betingelser ble optimalisert for å få unngå problemer med bakgrunn av BPA, og for sensitivitet. En forenklet validering av metoden ble utført for å sjekke egnethet til den endelige metoden. Avslutningsvis ble brannmannprøver og interlaboratorieprøver analysert for å kvantifisere BPA i reelle prøver.

Metoden viste at det var mulig å separere alle syv bisfenolene med en isokratisk eluering på en Waters Acquity UPLC BEH C18 kolonne. Under valideringen ble LOQ og R^2 ble funnet til å være henholdsvis 0,5 – 5 ng/mL og 0,972-0,999. Analyse av interlaboratorieprøver og brannmannprøver viste at metoden kan brukes til å detektere BPA i reelle prøver og i prøver tillaget av et eksternt laboratorium, men at metoden trenger videre optimalisering for å kunne måle de laveste konsentrasjonene med god nøyaktighet og presisjon.

6 Videre arbeid

Metoden utviklet i denne oppgaven er ikke ferdig med tanke på validering og må utvikles videre til å få bedre sensitivitet, nøyaktighet og presisjon slik at brannmannprøver og interlaboratorieprøver kan bli analysert.

Instrument som ble brukt under utførelse av denne oppgaven er ikke sensitiv nok til å måle bisfenol i fortynnet urin. Et alternativ vil være et instrument som kan måle lavere konsentrasjonsverdier og gi lavere deteksjonsgrenser.

Et annet alternativ for forbedret nøyaktighet og presisjon av metoden er å innføre flere prøveopparbeidelsestrinn for å få rense opp prøvene og oppkonsentrere analyttene i prøven.

Referanser

1. Helseth, L.E. *Polykarbonat. I Store Norske Leksikon*. [cited 2020.03.28]; Available from: <https://snl.no/polykarbonater>.
2. Miyagawa, S., T. Sato, and T. Iguchi, *Subchapter 101C - Bisphenol A*, in *Handbook of Hormones*, Y. Takei, H. Ando, and K. Tsutsui, Editors. 2016, Academic Press: San Diego. p. 577-578.
3. Rochester, J.R., *Bisphenol A and human health: a review of the literature*. *Reprod Toxicol*, 2013. **42**: p. 132-55.
4. Yao, Y., et al., *Rapid and sensitive determination of nine bisphenol analogues, three amphenicol antibiotics, and six phthalate metabolites in human urine samples using UHPLC-MS/MS*. *Anal Bioanal Chem*, 2018. **410**(16): p. 3871-3883.
5. Chen, D., et al., *Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review*. *Environ Sci Technol*, 2016. **50**(11): p. 5438-53.
6. Caballero-Casero, N., L. Lunar, and S. Rubio, *Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review*. *Anal Chim Acta*, 2016. **908**: p. 22-53.
7. Ribeiro, E., C. Ladeira, and S. Viegas, *Occupational Exposure to Bisphenol A (BPA): A Reality That Still Needs to Be Unveiled*. *Toxics*, 2017. **5**(3): p. 22.
8. Sanchis, Y., C. Coscolla, and V. Yusa, *Analysis of four parabens and bisphenols A, F, S in urine, using dilute and shoot and liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. *Talanta*, 2019. **202**: p. 42-50.
9. Heffernan, A.L., et al., *Rapid, automated online SPE-LC-QTRAP-MS/MS method for the simultaneous analysis of 14 phthalate metabolites and 5 bisphenol analogues in human urine*. *Talanta*, 2016. **151**: p. 224-233.
10. Jimenez-Diaz, I., et al., *Urinary levels of bisphenol A, benzophenones and parabens in Tunisian women: A pilot study*. *Sci Total Environ*, 2016. **562**: p. 81-88.
11. Rocha, B.A., A.R.M. de Oliveira, and F. Barbosa, Jr., *A fast and simple air-assisted liquid-liquid microextraction procedure for the simultaneous determination of bisphenols, parabens, benzophenones, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 2018. **183**: p. 94-101.
12. Venisse, N., et al., *Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human urine using UPLC-MS/MS method*. *Talanta*, 2014. **125**: p. 284-92.
13. Yang, Y., et al., *Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China*. *Chemosphere*, 2014. **112**: p. 481-6.

14. Rochester, J.R. and A.L. Bolden, *Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes*. Environ Health Perspect, 2015. **123**(7): p. 643-50.
15. Geens, T., et al., *A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(10): p. 3725-40.
16. Cao, X.L., et al., *Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study in Quebec City and dietary intake estimates*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2011. **28**(6): p. 791-798.
17. Calafat, A.M., et al., *Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-*tertiary*-Octylphenol: 2003–2004*. Environmental Health Perspectives, 2008. **116**(1): p. 39-44.
18. Loganathan, S.N. and K. Kannan, *Occurrence of Bisphenol A in Indoor Dust from Two Locations in the Eastern United States and Implications for Human Exposures*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2011. **61**(1): p. 68-73.
19. Ndaw, S., et al., *Occupational exposure of cashiers to bisphenol S via thermal paper*. Toxicol Lett, 2018. **298**: p. 106-111.
20. Yokota, H., et al., *Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver*. Biochem J, 1999. **340 (Pt 2)**: p. 405-9.
21. Ye, X., et al., *Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006. **831**(1-2): p. 110-5.
22. Arakawa, C., et al., *Daily urinary excretion of bisphenol A*. Environ Health Prev Med, 2004. **9**(1): p. 22-6.
23. Volkel, W., et al., *Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration*. Chem Res Toxicol, 2002. **15**(10): p. 1281-7.
24. Konieczna, A., A. Rutkowska, and D. Rachon, *Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA)*. Rocz Panstw Zakl Hig, 2015. **66**(1): p. 5-11.
25. Muhamad, M.S., et al., *A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water*. Environ Sci Pollut Res Int, 2016. **23**(12): p. 11549-67.
26. Rubin, B.S., *Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. **127**(1-2): p. 27-34.
27. Heinala, M., et al., *Assessment of Occupational Exposure to Bisphenol A in Five Different Production Companies in Finland*. Ann Work Expo Health, 2017. **61**(1): p. 44-55.

28. Ndaw, S., et al., *Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper: urinary biomonitoring study*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2016. **89**(6): p. 935-46.
29. Arbeids- og sosialdepartementet, *Forskrift om tiltaks- og grenseverdier*, A.-o. sosialdepartementet, Editor. 2011, Arbeidstilsynet: Norge.
30. Deutsche Forschungsgemeinschaft, *List of MAK and BAT values 2018*. 2018: Tyskland.
31. Pedersen-Bjergaard, S.R., Knut E., *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen, Norge: Fagbokforlaget.
32. Stoob, K., et al., *Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters*. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1097**(1): p. 138-147.
33. Rogeberg, M., et al., *On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems*. *J Pharm Biomed Anal*, 2014. **87**: p. 120-9.
34. Chiuminatto, U., et al., *Automated Online Solid Phase Extraction Ultra High Performance Liquid Chromatography Method Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Determination of Forty-Two Therapeutic Drugs and Drugs of Abuse in Human Urine*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(13): p. 5636-5645.
35. Esposito, S., et al., *Use of 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in preclinical research: application to a DMPK study of perhexiline in mouse plasma*. *J Pharm Biomed Anal*, 2016. **118**: p. 70-80.
36. Deventer, K., et al., *Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014. **55**: p. 1-13.
37. Bensakhria, A. *High Performance Liquid Chromatography*. 2017 [2020.03.03]; Available from: <https://www.analyticaltoxicology.com/en/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>.
38. Sheliya, K. and K. Shah, *ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC): A MODERN CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE*. *PHARMA SCIENCE MONITOR AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 2013. **4**: p. 78.
39. Lake, R. *How do small particle size columns increase sample throughput?* [cited 2020.03.03]; Available from: https://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016.
40. Banerjee, S. and S. Mazumdar, *Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte*. *Int J Anal Chem*, 2012. **2012**: p. 282574.
41. Piraud, M., et al., *Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders*. *J Inherit Metab Dis*, 2018. **41**(3): p. 457-477.

42. National Center for Biotechnology Information. *Pubchem Database*. [cited 2019.09.17]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
43. Rocha, B.A., et al., *A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 2016. **154**: p. 511-9.
44. Committee for Medicinal Products for Human Use, *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011.
45. Wilczewska, K., J. Namiesnik, and A. Wasik, *Troubleshooting of the determination of bisphenol A at ultra-trace levels by liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. *Anal Bioanal Chem*, 2016. **408**(3): p. 1009-13.

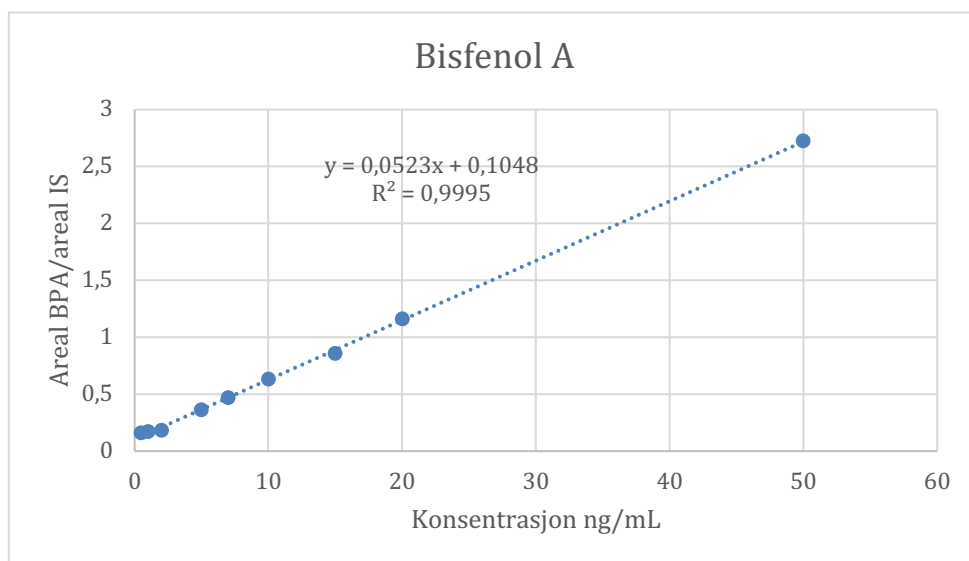
APPENDIX

Tabell fra kapittel 4.3.1 Testing av online SPE-metode. Tabellen viser ulike forsøk av forskjellig kombinasjon av injeksjonsvolum, loadetider og ulik prosent start på mobilfase B.

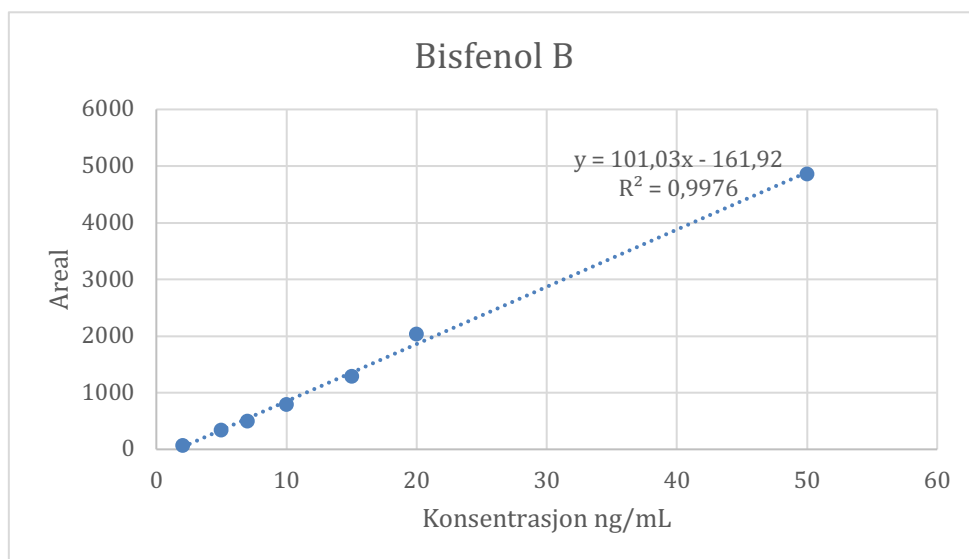
Tabell 1: Ulik injeksjonsvolum, loadetid og start mobilfase B

Forsøk nr.	Run nr.	Injvol (µL)	Loadetid (min)	Start mobilfase B (%)
7	1	50	3	40
3	2	50	4	25
12	3	100	4	40
1	4	50	2	25
13	5	100	3	25
9	6	100	2	10
14	7	100	3	25
6	8	150	3	10
8	9	150	3	40
5	10	50	3	10
2	11	150	2	25
15	12	100	3	25
11	13	100	2	40
10	14	100	4	10
4	15	150	4	25

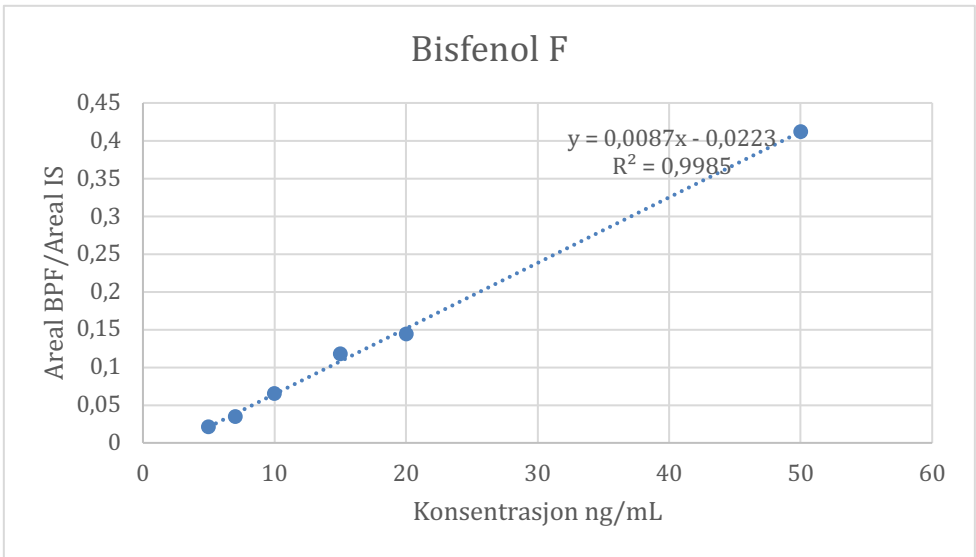
Kalibreringskurver av de syv BP fra kapittel 4.4. Figurene viser linearitet og R^2 for BPA, BPB, BPF, BPS, BPZ, BPAP og BPAF.



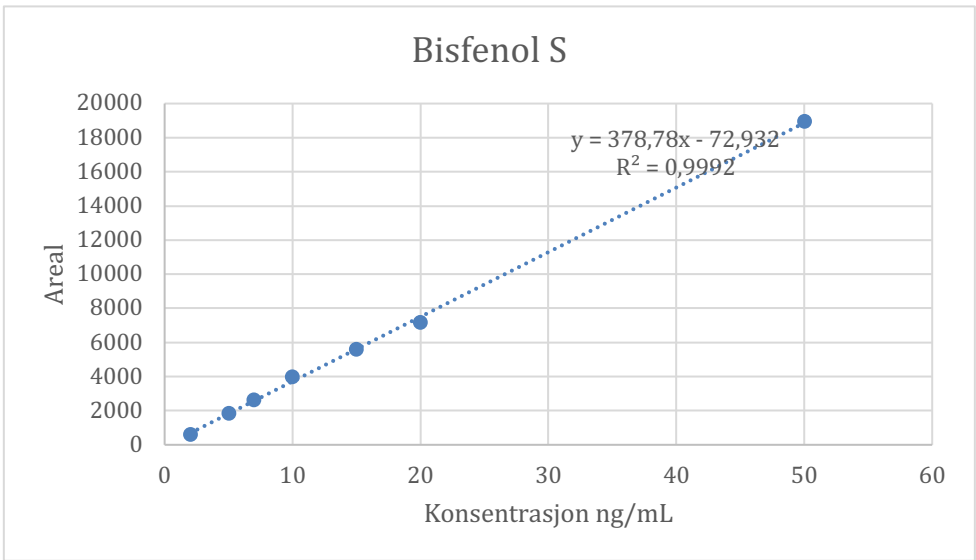
Figur 1: Kalibreringskurve av BPA fra 0,5 ng/mL til 50 ng/mL (n=3)



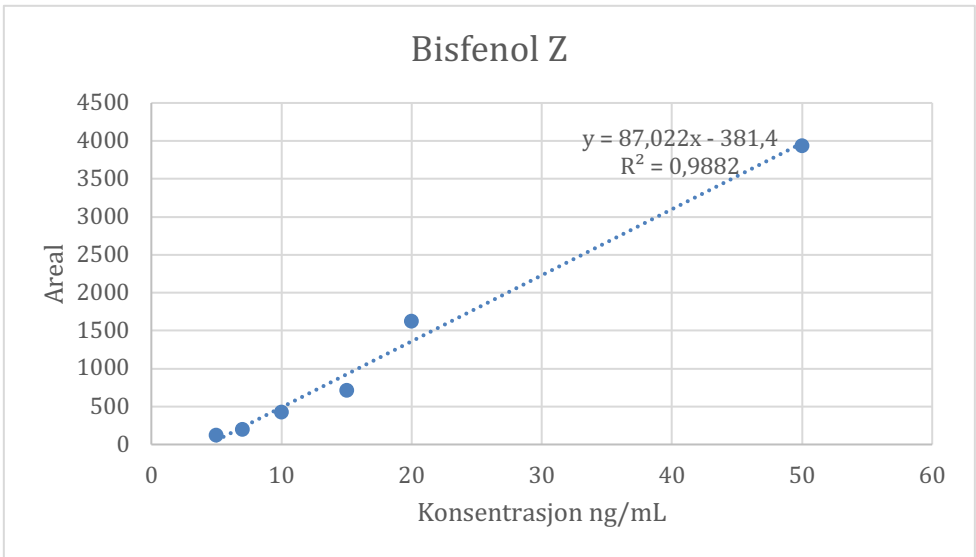
Figur 2: Kalibreringskurve av BPB fra 2 ng/mL til 50 ng/mL (n=3)



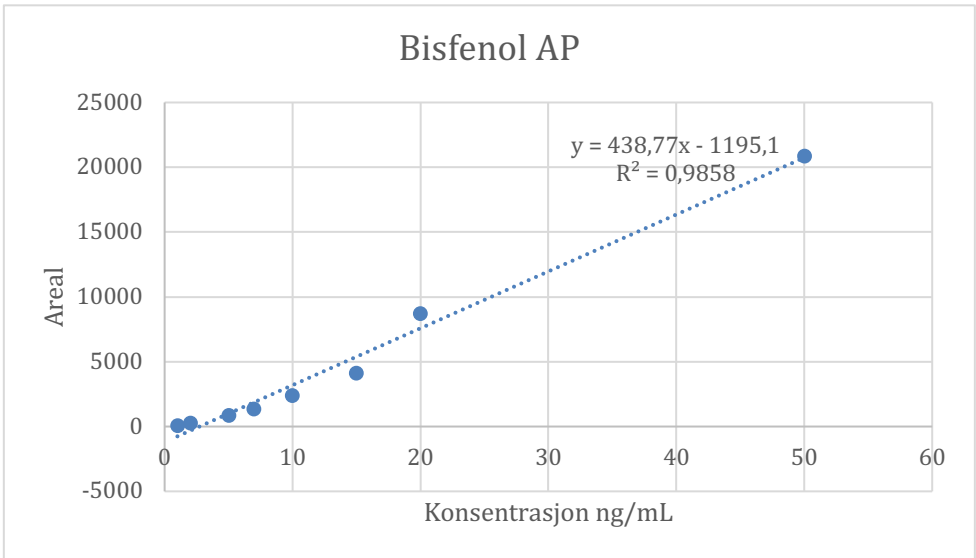
Figur 3: Kalibreringskurve av BPF fra 5 ng/mL til 50 ng/mL (n=3)



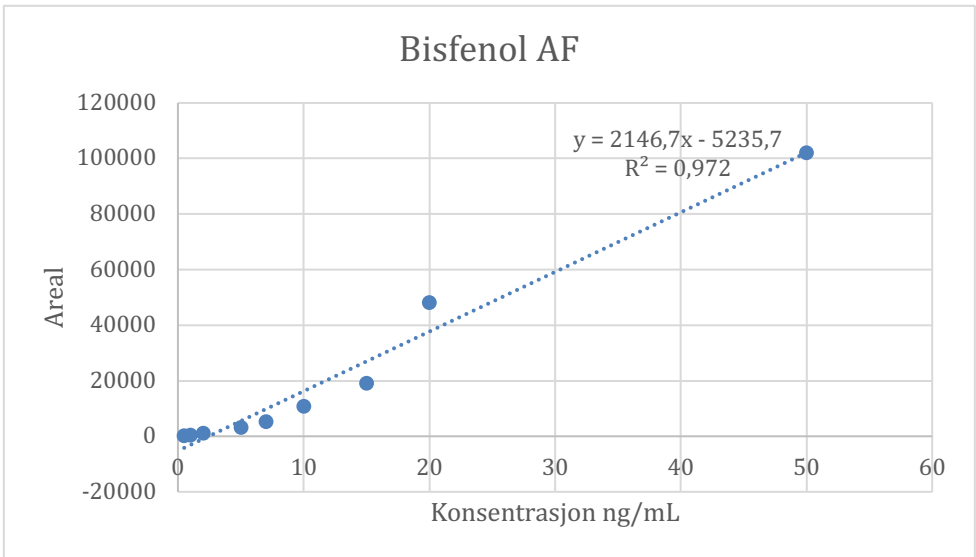
Figur 4: Kalibreringskurve av BPS fra 2 ng/mL til 50 ng/mL (n=3)



Figur 5: Kalibreringskurve av BPZ fra 5 ng/mL til 50 ng/mL (n=3)



Figur 6: Kalibreringskurve av BPAP fra 1 ng/mL til 50 ng/mL (n=3)



Figur 7: Kalibreringskurve av BPAF fra 0,5 ng/mL til 50 ng/mL (n=3)



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway