



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Danica S. Bogdanović

**KONTAMINACIJA HRANE FTALATIMA
USLED NJIHOVE MIGRACIJE IZ
PLASTIČNE AMBALAŽE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Danica S. Bogdanović

**PHTHALATES FOOD CONTAMINATION
DUE TO THEIR MIGRATION FROM
PLASTIC PACKAGING**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Danica S. Bogdanović

KONTAMINACIJA HRANE FTALATIMA USLED NJIHOVE MIGRACIJE IZ PLASTIČNE AMBALAŽE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Tekst ove doktorske disertacije stavlja se na uvid javnosti, u skladu sa članom 30., stav 8. Zakona o visokom obrazovanju („Sl. glasnik RS“, br. 76/2005, 100/2007 – autentično tumačenje, 97/2008, 44/2010, 93/2012, 89/2013 i 99/2014)

NAPOMENA O AUTORSKIM PRAVIMA:

Ovaj tekst se smatra rukopisom i samo se saopštava javnosti (član 7. Zakona o autorskim i srodnim pravima, „Sl. glasnik RS“, br. 104/2009, 99/2011 i 119/2012).

Nijedan deo ove doktorske disertacije ne sme se koristiti ni u kakve svrhe, osim za upoznavanje sa sadržajem pre odbrane disertacije.

Niš, 2021

MENTOR:

dr Tatjana Anđelković, redovni profesor

Univerzitet u Nišu

Prirodno-matematički fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Gordana Kocić, redovni profesor

Univerzitet u Nišu

Medicinski fakultet

dr Radmila Pavlović, viši naučni saradnik i docent

Univerzitet u Milanu

Departman za zdravlje, nauku o životinjama i bezbednost hrane

dr Andrija Ćirić, docent


Univerzitet u Kragujevcu

Prirodno-matematički fakultet

dr Ivana Kostić, naučni saradnik


Univerzitet u Nišu

Prirodno-matematički fakultet

	ПРИРОДНО – МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Даница С. Богдановић
Ментор, МН:	Татјана Д. Анђелковић
Наслов рада, НР:	КОНТАМИНАЦИЈА ХРАНЕ ФТАЛАТИМА УСЛЕД ЊИХОВЕ МИГРАЦИЈЕ ИЗ ПЛАСТИЧНЕ АМБАЛАЖЕ
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2021.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	9 поглавља, 190 стране, 114 цитата, 46 табела, 29 слика
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	хемија животне средине
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Фталати, контаминација, миграција, пластични артикли у контакту са храном, пластични артикли у контакту са фармацеутским производима, дечје играчке, храна, вештачка плувачка, ГЦ-МС техника, ФТИР техника
УДК	641.1 : [661.8'078.4 + 621.798.1]
Чува се, ЧУ:	библиотека

Важна напомена, ВН:	Дисертација је део истраживања у оквиру пројеката Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије ТР 31060 “Производња нових дијететских млечних производа за ризичне популације заснована на квалитативној и квантитативној анализи маркера здравственог ризика конзумирања млека“ и ИИИ 41018 „Превентивни, терапијски и етички приступ преклиничким и клиничким истраживањима гена и модулатора редокс ћелијске сигнализације у имуном, инфламаторном и пролиферативном одговору ћелије“ и у оквиру програма истраживања – број Уговора 451-03-68/2020-14/200124 и број Уговора 451-03-9/2021-14/200124. Експериментални део је урађен у Лабораторији за масену спектрометрију и Лабораторији за примењену и индустријску хемију Департмана за Хемију Природно-математичког факултета у Нишу, као и у Лабораторији за спектроскопију Технолошког факултета у Лесковцу Универзитета у Нишу.
Извод, ИЗ:	Фталати се користе као пластификатори пластичних материјала. Имајући у виду да лако мигрирају у околну средину и да представљају еколошки ризичне супстанце, важно је познавање њихове концентрације у пластичном материјалу и храни, као и услова под којима долази до миграције фталата из пластичних артикала. У том циљу испитани су следећи фталати: диметил фталат, ди-н-бутил фталат, бензилбутил фталат, ди(2-етилхексил) фталат и ди-н-октил фталат. Праћена је њихова миграција у млеко, млечне производе, алкохолна пића (ракију и синтетичко вино) и вештачку пљувачку из пластичних артикала сачињених од следећих полимера: поливинил-хлорида (ПВЦ), полиетилентерефталата, полиетилена високе густине, полиетилена ниске густине, полипропилена, полистирена и поликарбоната. Развијена је метода течно-течне екстракције за три различита типа матрикса хране – високо масну храну, ниско масну храну и безмасну храну, што је потврђено квантификацијом фталата у узорцима хране развијеном и оптимизованом методом за одређивање концентрације фталата у узорцима хране различитог степена масноће: води, алкохолним пићима, млеку коришћењем ГЦ-МС технике. Извршен је развој и оптимизација методе за одређивање концентрације фталата у узорцима ПВЦ пластичних артикала коришћењем ГЦ-МС технике и развој нове методе квантификације фталата у ПВЦ пластичним артиклима помоћу ФТИР технике. На крају, извршено је испитивање степена миграције фталата из пластичних материјала који су у контакту са храном и са фармацеутским производима и ПВЦ играчака у модел реципијент. Извршена је анализа фактора утицаја на миграцију фталата из пластичних артикала у одговарајући реципијент (н-хексан, млеко и млечни производи, вештачка пљувачка): температуре, ултразвука, процента масноће млека и млечних производа, УВ-А, УВ-Ц светлости.
Датум прихватања теме, ДП:	01.02.2019.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: Члан: Члан: Члан: Члан, ментор:

	ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
	KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Danica S. Bogdanović
Mentor, MN :	Tatjana D. Anđelković
Title, TI :	PHTHALATES FOOD CONTAMINATION DUE TO THEIR MIGRATION FROM PLASTIC PACKAGING
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2021
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	9 chapters, 190 pages, 114 ref, 46 tables, 29 pictures
Scientific field, SF :	chemistry
Scientific discipline, SD :	environmental chemistry
Subject/Key words, S/KW :	Phthalates, contamination, migration, food contact materials, pharmaceutical contact materials, children's toys, food, artificial saliva, GC-MS technique, FTIR technique
UC	641.1 : [661.8'078.4 + 621.798.1]
Holding data, HD :	library

Note, N:	This dissertation is a part of the research performed within the Grant of the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia TR 31060 "Production of new dietary dairy products for high-risk population based on qualitative and quantitative analysis of health risk markers for milk consumption" and III 41018 „Preventive, therapeutic, and ethical approach to the preclinical and clinical researches of genes and modulators of redox cell signalling in immune, inflammatory and proliferative cell response" and within the research program – Contract No. 451-03-68/2020-14/200124 and Contract No. 451-03-9/2021-14/200124. The experimental part of this thesis was done in the Laboratory for Mass Spectrometry and the Laboratory for Applied and Industrial Chemistry of the Department of Chemistry of the Faculty of Science in Nis, as well as in the Laboratory for Spectroscopy of the Faculty of Technology in Leskovac, University of Nis.
Abstract, AB:	Phthalates are used as plasticizers for plastic materials. Bearing in mind that phthalates easily migrate to the environment and represent environmental risk substances, it is important to know their concentration in plastic material and food, as well as the conditions under which phthalates migrate from plastic articles. The following phthalates were tested: dimethyl phthalate, di- <i>n</i> -butyl phthalate, benzylbutyl phthalate, di(2-ethylhexyl) phthalate and di- <i>n</i> -octyl phthalate. Their migration into milk, dairy products, alcoholic beverages (white brandy and synthetic wine) and artificial saliva from plastic articles made of the following polymers: polyvinyl chloride (PVC), polyethylene terephthalate, high density polyethylene, low density polyethylene, polypropylene, polystyrene and polycarbonate was monitored. A liquid-liquid extraction method was developed for three different types of food matrix: high fat food, low fat food and non-fat food, which was confirmed by quantification of phthalates in food samples using GC-MS technique by developed and optimized method for determining phthalate concentration in food samples of different degree of fat: water, alcoholic beverages, milk. The development and optimization of the method for determining the concentration of phthalates in samples of PVC plastic articles using the GC-MS technique and the development of a new method of quantification and relocation of phthalates in PVC plastic articles using the FTIR technique were performed. Finally, the degree of migration of phthalates from plastic materials in contact with food and pharmaceutical products and PVC toys into the recipient model was examined. The analysis of factors influencing the migration of phthalates from plastic articles to the appropriate recipient was performed (recipient model, milk and dairy products, artificial saliva): temperature, ultrasound, fat percentage of milk and dairy products, UV-A, UV-C light.
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	01.02.2019.
Defended on, DE:	
Defended Board, DB:	President:
	Member:
	Member:
	Member:
	Member,

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Др Татјана Анђелковић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет, Департман за хемију
Наслов:	Контаминација хране фталатима услед њихове миграције из пластичне амбалаже
Резиме:	<p>Фталати се користе као пластификатори пластичних материјала. Имајући у виду да лако мигрирају у околну средину и да представљају еколошки ризичне супстанце, важно је познавање њихове концентрације у пластичном материјалу и храни, као и услова под којима долази до миграције фталата из пластичних артикала. У том циљу испитани су следећи фталати: диметил фталат, ди-н-бутил фталат, бензилбутил фталат, ди(2-етилхексил) фталат и ди-н-октил фталат. Праћена је њихова миграција у млеко, млечне производе, алкохолна пића (ракију и синтетичко вино) и вештачку пљувачку из пластичних артикала сачињених од следећих полимера: поливинил-хлорида (ПВЦ), полиетилентерефталата, полиетилена високе густине, полиетилена ниске густине, полипропилена, полистирена и поликарбоната. Развијена је метода течно-течне екстракције за три различита типа матрикса хране – високо масну храну, ниско масну храну и безмасну храну, што је потврђено квантификацијом фталата у узорцима хране развијеном и оптимизованом методом за одређивање концентрације фталата у узорцима хране различитог степена масноће: води, алкохолним пићима, млеку коришћењем ГЦ-МС технике. Извршен је развој и оптимизација методе за одређивање концентрације фталата у узорцима ПВЦ пластичних артикала коришћењем ГЦ-МС технике и развој нове методе квантификације фталата у ПВЦ пластичним артиклима помоћу ФТИР технике. На крају, извршено је испитивање степена миграције фталата из пластичних материјала који су у контакту са храном и са фармацеутским производима и ПВЦ играчака у модел реципијент. Извршена је анализа фактора утицаја на миграцију фталата из пластичних артикала у одговарајући реципијент (н-хексан, млеко и млечни производи, вештачка пљувачка): температуре, ултразвука, процента масноће млека и млечних производа, УВ-А, УВ-Ц светлости.</p>
Научна област:	Хемија
Научна дисциплина:	Хемија животне средине

Кључне речи:

Фталати, контаминација, миграција, пластични артикли у контакту са храном, пластични артикли у контакту са фармацеутским производима, дечје играчке, храна, вештачка пљувачка, ГЦ-МС техника, ФТИР техника

УДК:

641.1 : [661.8'078.4 + 621.798.1]

CERIF
класификација
:

P 003 Хемија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

PhD Tatjana Andjelković, Full Professor, University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics, Department of Chemistry

Title:

Phthalates Food Contamination Due to Their migration from Plastic Packaging

Abstract:

Phthalates are used as plasticizers for plastic materials. Bearing in mind that phthalates easily migrate to the environment and represent environmental risk substances, it is important to know their concentration in plastic material and food, as well as the conditions under which phthalates migrate from plastic articles. The following phthalates were tested: dimethyl phthalate, di-*n*-butyl phthalate, benzylbutyl phthalate, di(2-ethylhexyl) phthalate and di-*n*-octyl phthalate. Their migration into milk, dairy products, alcoholic beverages (white brandy and synthetic wine) and artificial saliva from plastic articles made of the following polymers: polyvinyl chloride (PVC), polyethylene terephthalate, high density polyethylene, low density polyethylene, polypropylene, polystyrene and polycarbonate was monitored. A liquid-liquid extraction method was developed for three different types of food matrix: high fat food, low fat food and non-fat food, which was confirmed by quantification of phthalates in food samples using GC-MS technique by developed and optimized method for determining phthalate concentration in food samples of different degree of fat: water, alcoholic beverages, milk. The development and optimization of the method for determining the concentration of phthalates in samples of PVC plastic articles using the GC-MS technique and the development of a new method of quantification of phthalates in PVC plastic articles using the FTIR technique were performed. Finally, the degree of migration of phthalates from plastic materials in contact with food and pharmaceutical products and PVC toys into the recipient model was examined. The analysis of factors influencing the migration of phthalates from plastic articles to the appropriate recipient was performed (recipient model, milk and dairy products, artificial saliva): temperature, ultrasound, fat percentage of milk and dairy products, UV-A, UV-C light.

Scientific
Field:

Chemistry

Scientific
Discipline:

Environmental chemistry

Key Words:

Phthalates, contamination, migration, food contact materials, pharmaceutical contact materials, children's toys, food, artificial saliva, GC-MS technique, FTIR technique

UDC:

641.1 : [661.8'078.4 + 621.798.1]

CERIF
Classification
:

P 003 Chemistry

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u istraživačkoj laboratoriji za Masenu spektrometriju i laboratoriji Katedre za primenjenu i industrijsku hemiju, Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, i laboratoriji za spektroskopiju Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Univerziteta u Nišu.

Najveću zahvalnost dugujem mentoru, dr Tatjani Anđelković, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, na predloženoj temi doktorske disertacije i rukovođenju istom, na pomoći, stručnim savetima i nesebičnoj podršci tokom doktorskih studija i izrade ove disertacije. Zahvalna sam na ukazanom poverenju i prilici da budem deo njenog istraživačkog tima.

Veliku zahvalnost dugujem dr Gordani Kocić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu i rukovodiocu projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije "Proizvodnja novih dijetetskih mlečnih proizvoda za rizične populacije zasnovana na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi markera zdravstvenog rizika konzumiranja mleka" (evidencioni broj Projekta – TR 31060), u okviru kog su realizovani ciljevi ove doktorske disertacije. Kao članu komisije za ocenu doktorske disertacije zahvalna sam na korisnim savetima koji su doprineli kvalitetnijem oblikovanju iste.

Najsrdanije se zahvaljujem članovima komisije, dr Radmili Pavlović, višem naučnom saradniku i docentu Departmana za zdravlje, nauku o životinjama i bezbednost hrane, Univerziteta u Milanu, i dr Andriji Ćiriću, docentu Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu, koji su se rado prihvatili ocene ove doktorske disertacije. Zahvalna sam na sugestijama, savetima i smernicama koji su značajno doprineli kvalitetu disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ivani Kostić, naučnom saradniku Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, na saradnji od početka izrade doktorske disertacije, korisnim savetima, stručnoj i tehničkoj pomoći pri oblikovanju ovog rada.

Zahvaljujem se svim kolegama zaposlenim u pomenutim institucijama na predusretljivosti i razumevanju tokom izrade ove doktorske disertacije. Veliku zahvalnost dugujem dr Goranu Nikoliću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, na pruženoj pomoći oko realizacije jedne od faza eksperimentalnog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj divnoj porodici, ocu Slavoljubu, majci Dragani i sestri Smiljani, za pruženu pomoć, podršku, razumevanje, strpljenje i ljubav koju su mi pružali od početka školovanja. Od srca se zahvaljujem svom suprugu Bogdanu na bezuslovnoj podršci, strpljenju i ljubavi koju pruža meni i našoj divnoj ćerki Dreni, kojoj se zahvaljujem što postoji. Vaša ljubav i podrška mi mnogo znače.

Hvala svima koji su verovali u mene.

Lista skraćenica i akronima

Reagensi i rastvarači

- DMP – Dimetil ftalat (*engl.* Dimethyl phthalate)
DEP – Dietil ftalat (*engl.* Diethyl phthalate)
DnBP – Di-*n*-butil ftalat (*engl.* Di-*n*-butyl phthalate)
BBP – Benzilbutil ftalat (*engl.* Benzyl butyl phthalate)
DEHP – Di(2-etilheksil) ftalat (*engl.* Bis(2-ethylhexyl) phthalate)
DnOP – Di-*n*-oktil ftalat (*engl.* Di-*n*-octyl phthalate)
DINP – Diizononil ftalat (*engl.* Di-isononyl phthalate)
DIDP – Diizodecil ftalat (*engl.* Di-isodecyl phthalate)
DIBP – Diizobutil ftalat (*engl.* Diisobutyl phthalate)
BPA – bisfenol A (*engl.* Bisphenol-A)
BBz – Benzil benzoate (*engl.* Benzil benzoate)
DBA – Dibutil adipat (*engl.* Dibutyl adipate)
THF – Tetrahidrofuran (*engl.* Tetrahidrofuran)

Metaboliti

- MEHP – Mono-2-etilheksil ftalat (*engl.* Mono(2-ethylhexyl) phthalate)
MMP – Monometil ftalat (*engl.* Monomethyl phthalate)
MBP – Mono-*n*-butil ftalat (*engl.* Mono-*n*-butyl phthalate)
MBzP – Monobenzil ftalat (*engl.* Monobenzyl phthalate)
MEHP – Mono(2-etilheksil) ftalat (*engl.* Mono(2-ethylhexyl) phthalate)
MnOP – Mono-*n*-oktil ftalat (*engl.* Mono-*n*-octyl phthalate)
MCPP – Mono-(3-karboksipropil) ftalat (*engl.* Mono-(3-carboxypropyl) phthalate)
MEOHP (5oxo-MEHP) – Mono(2-etil-5-oksoheksil) ftalat (*engl.* Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate)
MCPeP – Mono-(5-karboksi-*n*-pentil) ftalat (*engl.* mono-(5-carboxy-*n*-pentyl) phthalate)
MECPP (5cx-MEPP) – Mono(2-etil-5karboksipentil) ftalat (*engl.* Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate)
MEHHP (5OH-MEHP) – Mono(2-etil-5-hidroksiheksil) ftalat (*engl.* Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate)
MCMHP (2cx-MMHP) – Mono(2-karboksimetilheksil) ftalat (*engl.* Mono 2-carboxymethylhexyl phthalate)

MCMP – Monokarboksimetil ftalat (*engl.* Mono-carboxymethyl phthalate)
MCHpP – Mono-(7-karboksi-*n*-heptil) ftalat (*engl.* Mono-(7-carboxy-*n*-heptyl) phthalate)
MHOP – Mono-7-hidroksi-*n*-oktil ftalat (*engl.* Mono-(7-hydroxy-*n*-octyl) phthalate)
MOOP – Mono-(7-okso-*n*-oktil) ftalat (*engl.* Mono-(7-oxo-*n*-octyl) phthalate)

Oznake plastike i plastičnih artikala

PVC – polivinil hlorid (*engl.* Polyvinyl chloride)
PET (PETE) – polietilentereftalat (*engl.* Polyethylene terephthalate)
HDP (HDPE) – polietilen visoke gustine (*engl.* High-density polyethylene)
LDPE – polietilen male gustine (*engl.* Low-density polyethylene)
PP – polipropilen (*engl.* Polypropylene)
PS – polistiren (*engl.* Polystyrene)
PC – polikarbonat (*engl.* Polycarbonate)
FCM – ambalažni materijal koji je u kontaktu sa hranom (*engl.* Food Contact Material)
FP – artikli koji služe za pakovanje hrane (*engl.* Food Packaging)
FHE – artikli koji služe za pripremu hrane (*engl.* Food Handling Equipment).
PCM – materijali i predmeti koji dolaze u kontakt sa farmaceutskim proizvodima (*engl.* Pharmaceutical Contact Materials)

Konstante

K_{OW} – koeficijent ravnotežne raspodele ftalata između oktanola i vode
 K_{OA} – koeficijent ravnotežne raspodele ftalata između oktanola i vazduha
 K_{AW} – koeficijent ravnotežne raspodele ftalata između vazduha i vode
 $K_{P/H}$ – koeficijent raspodele plastika/heksan

Masena spektrometrija

GC – Gasna hromatografija (*engl.* Gas Chromatography)
HPLC – Tečna hromatografija visoke performanse (*engl.* High Performance Liquid Chromatography)
LLE – Tečno-tečna ekstrakcija (*engl.* Liquid-liquid extraction)
SPE – Ekstrakcija na čvrstoj fazi (*engl.* Solid phase extraction)
SPME – Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (*engl.* Solid phase microextraction)
MAE – Ekstrakcija pomoću mikrotalasa (*engl.* Microwave assisted extraction)
DLLME – Disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija (*engl.* Dispersive liquid-liquid microextraction)

MS – Maseni spektrometar (*engl.* Mass spectrometer)
FID – plameno-jonizacioni detektor (*engl.* Flame Ionisation detection)
ECD – Detektor sa zahvatom elektrona (*engl.* Electron capture detection)
DAD – Detektor sa nizom diode (*engl.* Diode-Array Detection)
EI – Elektronska jonizacija (*engl.* Electron Impact)
PCI – Pozitivna hemijska jonizacija (*engl.* Positive chemical ionisation)
SIM – Režim praćenja jednog jona (*engl.* Single Ion Monitoring)
FS – Režim praćenja odgovarajućeg opsega masa (*engl.* Full Scan Monitoring)
 m/z – odnos mase i naelektrisanja
IS – Interni standard

Infracrvena spektroskopija

FTIR – Infracrvena spektroskopija sa *Fourier*-ovom transformacijom (*engl.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Granične vrednosti

MADL – Maksimalno dozvoljena doza (*engl.* Maximum Allowable Dose Level)
NOAEL – Nivo kod kog nije primećen neželjeni efekat (*engl.* No observed adverse effect level)
LOAEL – Najmanja količina koja izaziva neželjene efekte (*engl.* Lowest Adverse Effect Level)
TDI – Tolerantni dnevni unos (*engl.* Tolerable daily Intake)
OML – Ukupna granica migracije (*engl.* Overall Migration Limits)
SML – Specifična granica migracije (*engl.* Specific Migration Limits)
QL – Maksimalna dozvoljena količina (*engl.* Maximum Permitted Quantity)

Administracije i organizacije

NTP-CERHR – Centar za procenu rizika reprodukcije ljudi u okviru Nacionalnog toksikoliškog programa (*engl.* Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction of the National Toxicology Program)
WHO – Svetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization)
FDA – Administracija za hranu i lekove (*engl.* Food and Drug Administration)
REACH – Registracija, evaluacija, autorizacija i kontrola hemikalija (*engl.* Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)
ECHA – Evropska agencija za hemikalije (*engl.* European Chemicals Agency)

FAO – Organizacija Ujedinjenih nacija za hranu i poljoprivredu (*engl.* Food and Agriculture organization of the United Nations)

CAC – Komisija za Codex Alimentarius (*engl.* Codex Alimentarius Commission),

RAPEKS – Sistem za brzu razmenu informacija o opasnim potrošačkim proizvodima izuzimajući hranu, lekove i medicinske uređaje (*engl.* The Rapid Alert System for Non-Food Products)

APOS – Asocijacija potrošača Srbije

ISS – Institut za standardizaciju Srbije

SRM – Sertifikovani referentni materijal

EFSA – Evropska agencija za sigurnost hrane (*engl.* European Food Safety Authority)

Validacija metode

LOD – Granica detekcije (*engl.* Limit of Detection)

LOQ – Granica kvantifikacije (*engl.* Limit of Quantitation)

S/N – Odnos signal/šum (*engl.* Signal/Noise Ratio)

Sadržaj

UVOD.....	1
TEORIJSKI DEO	5
1. FTALATI	6
1.1. Opšte informacije o ftalatima.....	6
1.2. Fizičko-hemijske karakteristike ftalata	8
1.2.2. Dugodometni transport ftalata kroz životnu sredinu	10
1.2.3. Degradacija ftalata u životnoj sredini.....	11
1.2.4. Bioakumulacija i biomagnifikacija ftalata.....	12
1.3. Primena ftalata i izloženost ljudi ftalatima.....	13
1.3.1. Medicinska oprema	14
1.3.2. Ambalažni materijal za pakovanje hrane.....	16
1.3.3. Dečje igračke.....	18
1.3.4. Kozmetički preparati	19
1.4. Metabolizam ftalata	20
1.5. Uticaj ftalata na zdravlje ljudi.....	22
2. PLASTIČNI MATERIJALI – VRSTE, PRIMENA I NJIHOVA UPOTREBA	25
3. FTALATI U PLASTIČNOJ AMBALAŽI.....	28
3.1. Plastična ambalaža kao izvor ftalata	28
3.1.1. Plastična ambalaža koja je u kontaktu sa hranom	28
3.1.2. Plastična ambalaža koja se koristi u medicinskoj opremi	29
3.1.3. Plastične dečje igračke	30
3.2. Migracija ftalata.....	31
3.3. Važeća legislativa za upotrebu ftalata u proizvodima namenjenim za ljudsku upotrebu.....	33
3.3.1. Važeća legislativa u oblasti prisustva ftalata u prehrambenim proizvodima.....	34
3.3.2. Važeća legislativa u oblasti korišćenja ftalata za proizvodnju dečjih igračaka	36
3.3.3. Važeća legislativa u oblasti korišćenja ftalata za proizvodnju medicinske opreme	36
4. METODE ODREĐIVANJA FTALATA	38
4.1. GC-MS tehnika	39
4.2. FTIR tehnika.....	42
4.3. Priprema uzoraka hrane i plastičnih artikala za analizu određivanja ftalata	43
5. VALIDACIJA ANALITIČKE METODE	45
5.1. Definicija parametara koji se koriste prilikom validacije metode.....	45
5.1.1. Linearnost analitičke metode.....	45
5.1.2. Selektivnost/Specifičnost analitičke metode	46

5.1.3. Preciznost analitičke metode	46
5.1.4. Tačnost analitičke metode	48
5.1.5. Osetljivost analitičke metode	48
5.1.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije analitičke metode	48
EKSPERIMENTALNI DEO	50
6. CILJ I PROGRAM EKSPERIMENTALNOG RADA	51
6.1. Hemikalije korišćene u eksperimentalnom radu	54
6.2. Instrumentacija i parametri rada na instrumentima	54
6.3. Mere predostrožnosti i smanjenje kontaminacije uzoraka ftalata	56
6.4. Priprema standardnih rastvora korišćenih pri određivanju ftalata GC-MS tehnikom	56
6.5. Priprema standardnih rastvora korišćenih za određivanje ftalata FTIR tehnikom	57
6.6. Uzorci hrane.....	57
6.6.1. Uzorci mleka i mlečnih proizvoda za optimizaciju i validaciju tečno-tečne ekstrakcije ftalata	57
6.6.2. Uzorci alkoholnih pića za optimizaciju tečno-tečne ekstrakcije ftalate.....	58
6.6.2.1. Uzorci belih rakija	58
6.6.2.2. Uzorci sintetičkog vina	58
6.7. Uzorci plastičnih artikala u cilju određivanja sadržaja ftalata	59
6.7.1. Artikli PCM-a za optimizaciju metode određivanja ftalata FTIR tehnikom	59
6.7.2. Artikli PCM-a i plastične igračke za određivanje ftalata GC-MS tehnikom	59
6.8. Uzorci plastičnih artikala u cilju praćenja migracije ftalata	62
6.8.1. Artikli FCM-a i PCM-a u cilju praćenja migracije ftalata u model recipijent	62
6.8.2. Uzorci hrane i plastični ambalažni materijal za ispitivanje uticaja faktora na migraciju ftalata iz plastičnog materijala u hranu.....	64
6.8.3. Dečje igračke u cilju praćenja migracije ftalata u model recipijent i veštačku pljuvačku ..	64
6.8.4. Dečje igračke u cilju ispitivanja uticaja faktora na migraciju ftalata u veštačku pljuvačku	65
6.9. Određivanje ftalata u hrani.....	65
6.9.1. Razvoj i validacija metode određivanja ftalata u mlečnim proizvodima.....	65
6.9.2. Razvoj metoda određivanja ftalata u alkoholnim pićima	66
6.9.2.1. Bele rakije.....	66
6.9.2.2. Sintetičko vino	67
6.10. Određivanje ftalata u plastičnom materijalu	69
6.10.1. Razvoj metode određivanja ftalata u PCM-u FTIR tehnikom	69
6.10.2. Određivanje ftalata u PCM-u i igračkama GC-MS tehnikom	69
6.11. Određivanje ftalata u veštačkoj pljuvački	70
6.12. Praćenje migracije ftalata iz plastičnog materijala.....	70
6.12.1. Praćenje migracije ftalata iz PCM-a i FCM-a u model recipijent	70
6.12.2. Praćenje uticaja faktora na migraciju ftalata iz plastičnog artikla u mlečne proizvode.....	71
6.12.3. Praćenje migracije ftalata iz plastičnih igračaka u model recipijent i veštačku pljuvačku ..	72

6.12.4. Praćenje uticaja faktora na migraciju ftalata iz PVC igračka u model recipijent i veštačku pljuvačku	73
REZULTATI I DISKUSIJA	75
7. REZULTATI ODREĐIVANJA FTALATA U MLEČNIM PROIZVODIMA	76
7.1. Rezultati optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka hrane.....	76
7.2. Validacija metode određivanja ftalata u mlečnim proizvodima.....	79
7.2.1. Linearnost analitičke metode.....	79
7.2.2. Selektivnost/Specifičnost analitičke metode	82
7.2.3. Preciznost analitičke metode	84
7.2.4. Tačnost analitičke metode	86
7.2.5. Osetljivost analitičke metode	88
7.2.6. Granica detekcije i kvantifikacije.....	88
7.3. Efikasnost ekstrakcije ftalata iz mlečnih proizvoda validovanom metodom	89
8. REZULTATI ODREĐIVANJA FTALATA U ALKOHOLNIM PIĆIMA	90
8.1. Rezultati određivanja ftalata u belim alkoholnim pićima	90
8.1.1. Rezultati optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka belih alkoholnih pića	90
8.1.2. Efikasnost optimizovane tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka rakija	93
8.2. Rezultati određivanja ftalata u sintetičkom vinu.....	94
8.2.1. Rezultati optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka sintetičkog vina.....	94
8.2.2. Efikasnost ekstrakcije ftalata iz uzoraka sintetičkog vina	106
9. REZULTATI ODREĐIVANJA FTALATA U PCM ARTIKLIMA I PVC IGRAČKAMA	107
9.1. Rezultati određivanja ftalata u PCM artiklima FTIR tehnikom	107
9.2. Rezultati određivanja ftalata u PCM artiklima i igračkama GC-MS tehnikom	116
9.2.1. Validacioni parametri GC-MS metode određivanja ftalata u PCM artiklima i PVC igračkama	116
9.2.1.1. Linearnost analitičke metode	116
9.2.1.2. Selektivnost / Specifičnost analitičke metode.....	117
9.2.1.3. LOD / LOQ analitičke metode.....	120
9.2.2. Rezultati GC-MS analize PCM artikala	120
9.2.3. Rezultati GC-MS analize PVC igračka	121
10. REZULTATI ODREĐIVANJA MIGRACIJE FTALATA IZ FCM-A, PCM-A I IGRAČKA U RAZLIČITE MARIKSE	122
10.1. Rezultati određivanja migracije ftalata iz PCM-a i FCM-a u model recipijent	122
10.2. Rezultati određivanja uticaja faktora na migraciju ftalata iz plastičnog artikla u mlečne proizvode	126
10.3. Rezultati određivanja migracije ftalata u model recipijent i veštačku pljuvačku.....	132

10.4. Rezultati određivanja uticaja faktora na migraciju ftalata iz PVC igračka u model recipijent i veštačku pljuvačku.....	134
ZAKLJUČAK.....	137
LITERATURA.....	143
BIOGRAFIJA.....	158
BIBLIOGRAFIJA.....	161
IZJAVE AUTORA.....	166

UVOD

Ftalati, dialkil ili alkil-aril estri ftalne kiseline, najčešće se koriste kao plastifikatori, za postizanje fleksibilnosti plastičnih materijala, povećanja elastičnosti, dugotrajnosti i transparentnosti plastike. Isparljive su, providne i sirupaste tečnosti, koji se zbog svoje nepolarosti ne rastvaraju u vodi, ali se dobro rastvaraju u nepolarnoj sredini. Nisu vezani hemijskom vezom za polimer, već su samo inkorporirani u strukturu polimera, tako da pod određenim uslovima mogu da migriraju iz plastike, pri čemu dolazi do kontaminacije okolne sredine ftalatima. Pod uticajem temperature, ultrazvuka, ultravioletnog zračenja, mehaničke sile, ili u kontaktu sa nepolarnom sredinom, dolazi do migracije ftalata iz plastike. Prilikom migracije ftalata iz plastičnih artikala koji su u kontaktu sa hranom – FCM (*engl.* Food Contact Material), iz plastičnih artikala koji su u kontaktu sa medicinskim i farmaceutskim proizvodima – PCM (*engl.* Pharmaceutical Contact Materials), iz igračaka i kozmetičkih preparata, može doći do kontaminacije hrane i prehrambenih proizvoda, krvi, farmaceutskih proizvoda, ili do direktne kontaminacije ljudi ftalatima korišćenjem navedenih artikala. Procena Svetske zdravstvene organizacije je da čovek može biti kontamiran ftalatima korišćenjem sledećih plastičnih artikala namenjenim svakodnevnoj upotrebi: kuhinjske folije i druga plastična ambalaža koja se koristi u prehrambenoj industriji, medicinska oprema (setovi za dijalizu, transfuziju i infuziju sačinjeni od kesa sa rastvorima i odgovarajućih cevi), kozmetička sredstva, plastične dečje igračke, itd. S obzirom na to da ftalati mogu da čine i do 50% mase plastičnog artikla, da zbog svojih fizičko-hemijskih osobina lako migriraju iz plastičnih artikala, i da izlaganje ftalatima može da dovede do brojnih zdravstvenih poremećaja (alergijske bolesti, astma, poremećaji endokrinog sistema, oštećenje jetre i bubrega, itd.), od velikog interesa je detekcija i određivanje koncentracije ftalata u proizvodima namenjenim svakodnevnoj upotrebi i ispitivanje njihove migracije iz plastične ambalaže u konzumacione proizvode.

Za određivanje ftalata u hrani, alkoholnim pićima i drugim medijumima uglavnom se koriste analitičke tehnike tečne i gasne hromatografije sa različitim detektorima, kao što su maseni spektrometri ili ultraljubičasti (UV) (*engl.* Ultraviolet) spektrofotometri. Izbor odgovarajuće tehnike je uglavnom baziran na osnovu fizičko-hemijskih svojstava ftalata, složenosti matriksa, cene analize, vremena analize i drugih parametara.

Priprema uzorka predstavlja važan korak u analizi ftalata. Ftalati se ekstrahuju iz nemasnih tečnih uzoraka nepolarnim organskim rastvaračima i često se određuju bez dodatnog prečišćavanja, što je slučaj za vodu, bezalkoholna ili alkoholna pića. Za izdvajanje ftalata iz ovih matriksa uglavnom se primenjuje tečno-tečna ekstrakcija (LLE) (*engl.*

Liquid-liquid extraction) i ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) (*engl.* Solid phase extraction). Rastvarači koji se uglavnom upotrebljavaju su *n*-heksan, *n*-heptan, hloroform ili izooktan. U slučaju masnih uzoraka hrane primenjuju se rastvarači kao što je acetonitril za više selektivnu ekstrakciju ftalata iz hrane koja se zasniva na slaboj rastvorljivosti masti u acetonitrilu.

Glavna tehnika za određivanje ftalata je gasna hromatografija sa masenim spektrometrom kao detektorom (GC-MS) (*engl.* Gas chromatography-mass spectrometry). Za hromatografsko odvajanje analita se koriste kolone sa stacionarnom fazom niske polarnosti. Temperaturni programi se razlikuju u zavisnosti od složenosti razdvajanja. Za GC-MS se obično koristi jonizacija elektronom (*engl.* Electron Impact) i režim praćenja jednog jona. Nakon jonizacije elektronom na 70 eV, glavni fragmentni jon ftalata jeste pik m/z 149, koji potiče od protonovanog jona anhidrida ftalne kiseline i pik m/z 163 specifičan za dimetil ftalat. Ovi joni se obično koriste za kvantifikaciju ftalata u analiziranim uzorcima.

Određivanje ftalata vrši se i pomoću tehnike Infracrvene spektroskopije sa *Fourier*-ovom transformacijom (FTIR) (*engl.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Ftalati imaju specifičan *orto*-supstituisan aromatični prsten i ova *orto*-aromatična grupa pokazuje specifičnu i jaku apsorpciju na oko 743 cm^{-1} . Takođe, postoji još nekoliko specifičnih apsorpcionih traka u apsorpcionom infracrvenom spektru koje služe za kvalitativno i kvantitativno određivanje ukupne količine ftalata u nekoj ambalaži.

Sveprisutnost nekih ftalata izaziva ozbiljne probleme u određivanju njihovog sadržaja u različitim medijumima i zato je potrebno sprovesti posebne mere u cilju smanjenja nivoa ftalata u pozadini.

Savetljivost, dugotrajnost, elastičnost, providnost su osobine plastike koje su obezbeđene dodavanjem ftalata kao plastifikatora polimerima, i plastika kao takva koristi se za pravljenje FCM-a, PCM-a, plastičnih igračkaka. Imajući u vidu da pomenuti artikli sadrže ftalate štetne po zdravlje ljudi, od velike je važnosti ispitati na koji način ftalati mogu da migriraju u hranu, krv, pljuvačku, itd. Zbog fizičko-hemijskih svojstava ftalata i same plastike, usled nepravilnog skladištenja, nepravilnog korišćenja, usled dejstva određenih spoljašnjih faktora (temperatura, UV zračenje), u slučaju dugog vremena ekspozicije plastike ovim faktorima, može doći do migracije ftalata iz plastičnog artikla. Takođe, prilikom proizvodnje samih prehrambenih proizvoda može doći do kontaminacije ftalatima prilikom kontakta hrane sa delovima aparature koja sadrži plastične delove koji sadrže

ftalate. Na taj način može biti ugroženo zdravlje ljudi koji koriste proizvode kontaminirane ftalatima.

Zbog kontaminacije proizvoda ftalatima usled njihove migracije iz plastičnog materijala i navedenih potencijalnih zdravstvenih rizika prilikom korišćenja FCM-a, PCM-a i plastičnih igraćaka, cilj ove doktorske disertacije je optimizacija efikasnih, brzih i pouzdanih metoda za određivanje ftalata u različitim matriksima hrane, kao i u plastičnom materijalu i određivanje uslova pri kojima dolazi do migracije ftalata iz plastične ambalaže. Takođe, cilj ovog istraživanja je da se utvrdi koja plastika bi bila bezbedna za korišćenje i pod kojim uslovima, odnosno doprinos pojedinih faktora sredine na stepen migracije ftalata iz plastičnih artikala u hranu i pljuvačku.

U cilju realizacije postavljenih ciljeva, program rada je koncipiran tako da je vršena optimizacija i validacija metode za određivanje koncentracije ftalata u uzorcima mleka i mlečnih proizvoda, optimizacija metoda za određivanje koncentracije ftalata u alkoholnim pićima, optimizacija metode određivanja koncentracije ftalata u različitim vrstama plastične ambalaže i ispitivanje migracije ftalata iz određenog plastičnog artikla u uzorke mleka i veštačku pljuvačku pod odgovarajućim uslovima.

U ovoj studiji izvršena je analiza sadržaja ftalata i njihovog potencijala migracije iz 44 različita plastična artikla napravljenih od 7 različitih polimera plastike koji se koriste kao FCM i PCM. Uzimajući u obzir dozvoljene i zabranjene ftalate od strane Evropske agencije za sigurnost hrane – EFSA (*engl.* European Food Safety Authority) i očekivane visoke potencijalne migracije, u ovom istraživanju praćena su sledeća 3 ftalata male molekulske mase: DMP, DnBP, BBP i 2 ftalata visoke molekulske mase: DEHP i DnOP.

Metoda određivanja ftalata FTIR tehnikom je razvijena i upoređena sa GC-MS tehnikom i gravimetrijskim određivanjem ftalata. Istraživanje je pokazalo da ova brza metoda skrininga ftalata FTIR tehnikom predstavlja jednostavnu metodu koja se može koristiti kao alternativna metoda metodi određivanja ftalata korišćenjem GC-MS tehnike.

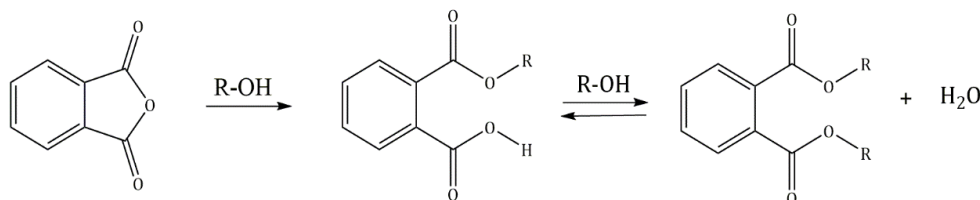
Potencijali migracije ftalata iz plastičnih artikala određeni su u kontaktnim eksperimentima po scenariju koji obezbeđuje što veći stepen migracije ftalata iz plastičnih artikala upotrebom *n*-heksana kao rastvarača recipijenta ftalata u uslovima koji obezbeđuju veći faktor mogućnosti izlaganja ljudi ftalatima, kao što su ultrazvuk, sobna temperatura, produženo vreme kontakta i mešanje.

TEORIJSKI DEO

1. FTALATI

1.1. Opšte informacije o ftalatima

Ftalati su jedinjenja koja nastaju esterifikacijom ftalnog anhidrida dugolančanim alkoholima (obično sa 7 do 10 ugljenikovih atoma) (Slika 1.). Reakcija dobijanja ftalata odvija se u dva koraka: prvi korak je dobijanje monoestra ftalne kiseline, pri čemu se reakcija odvija brzo, dok je drugi korak dobijanja diestra ftalne kiseline spor i reverzibilan proces i određuje brzinu cele reakcije. Potrebna je povišena temperatura za početak reakcije, ali je reakcija dalje egzotermna (LORZ *et al.*, 2005). U zavisnosti od alkohola koji učestvuje u procesu esterifikacije ftalati se nazivaju dialkil ili alkil-aril estri ftalne kiseline (1,2-benzendikarboksilne kiseline), gde su dve estarske grupe u *orto*- položaju. Kada su estarske grupe u *meta*- i *para*- položaju, tada se govori o izoftalatima i tereftalatima (EARLS *et al.*, 2003).



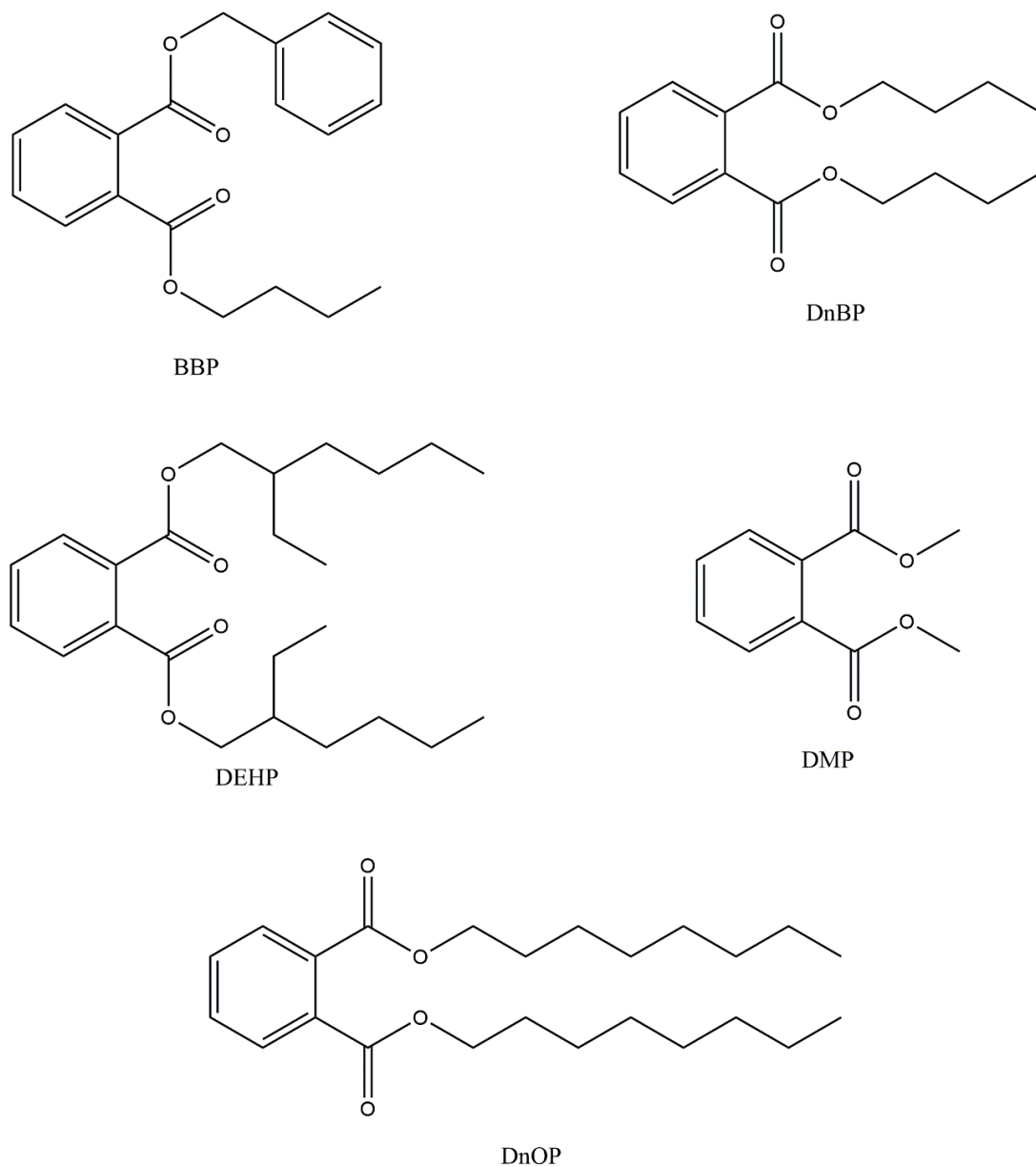
Slika 1. Hemijska reakcija dobijanja ftalata

Ftalati nalaze najširu primenu u vidu plastifikatora, koji služe za omekšavanje, povećanje savitljivosti, za produženje veka trajanja i radi stabilizacije mirisa plastičnih materijala, i kao plastifikatori mogu činiti i do 50% mase plastičnog proizvoda (EARLS *et al.*, 2003). Imajući u vidu globalnu proizvodnju plastičnih materijala, dolazi se do podatka o količini proizvodnje ftalata u iznosu od osam miliona tona u 2011. godini (NET *et al.*, 2015).

Najčešće korišćeni ftalati su:

- Dimetil ftalat (DMP) (*engl.* Dimethyl phthalate);
- Dietil ftalat (DEP) (*engl.* Diethyl phthalate);
- Di-*n*-butil ftalat (DnBP) (*engl.* Di-*n*-butyl phthalate);
- Benzilbutil ftalat (BBP) (*engl.* Benzyl butyl phthalate);
- Di(2-etilheksil) ftalat (DEHP) (*engl.* Bis(2-ethylhexyl) phthalate);
- Di-*n*-oktil ftalat (DnOP) (*engl.* Di-*n*-octyl phthalate);
- Diizononil ftalat (DINP) (*engl.* Di-isononyl phthalate);
- Diizodecil ftalat (DIDP) (*engl.* Di-isodecyl phthalate).

Na Slici 2. su prikazane strukturne formule DMP-a, DnBP-a, BBP-a, DEHP-a i DnOP-a.



Slika 2. Strukturne formule DMP-a, DnBP-a, BBP-a, DEHP-a i DnOP-a

Od nabrojanih ftalata, DEHP je zbog svoje tržišne cene najčešće upotrebljavan plastifikator, pa je po podacima iz 1987. godine globalna godišnja proizvodnja DEHP-a iznosila 1 – 4 miliona tona (WAMS *et al.*, 1987), 1997. godine je proizvodnja DEHP-a u Zapadnoj Evropi iznosila 595000 tona, dok noviji podaci govore da je proizvodnja DEHP-a opala na 221000 tona u 2004. godini u celoj Evropi (JRC, 2008). Iako se proizvodnja DEHP-a smanjuje sa vremenom, DEHP i dalje spada u „najveće“ zagađujuće supstance, jer plastika može da sadrži od 1 do 40% toksičnog DEHP-a (RUDEL *et al.*, 2008).

1.2. Fizičko-hemijske karakteristike ftalata

Ftalati predstavljaju grupu jedinjenja sa sličnom hemijskom strukturom, pri čemu svako jedinjenje odlikuju jedinstvene osobine i specifična toksičnost. Svi ftalati su bezbojne sirupaste tečnosti na sobnoj temperaturi, sa visokim vrednostima temperature ključanja od 230 do 486 °C i temperaturama topljenja od -58 do 5,5 °C. Upravo ove niske tačke topljenja i visoke tačke ključanja doprinose upotrebi ftalata u vidu plastifikatora. U Tabeli 1. su navedene osnovne fizičko-hemijske osobine za neke od češće korišćenih ftalata, njihova molarna masa i CAS broj.

Tabela 1. Fizičko-hemijske osobine ftalata (STAPLES *et al.*, 1997; COUSINS *et al.*, 2003)

	Hemijska formula	Molarna masa (g mol ⁻¹)	Temperatura ključanja (°C)	Temperatura topljenja (°C)	Gustina (g cm ⁻³)	CAS broj
DMP	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	283	5,5	1,19	131-11-3
DnBP	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,34	340	-35	1,05	84-74-2
BBP	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	312,37	370	-35	1,12	85-68-7
DEHP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,56	384	-46	0,99	117-81-7
DnOP	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,56	387	25	0,98	117-84-0

Ftalati su slabo rastvorljivi u vodi i dobro rastvorljivi u mastima. Rastvorljivost ftalata u vodi opada sa porastom molekulske mase ftalata, odnosno sa porastom dužine alkilnih lanaca u *orto*- položaju. Tako je DMP rastvorljiviji u vodi za šest redova veličine u odnosu na DEHP i DnOP, koji su praktično nerastvorljivi u vodi zbog velike molekulske mase i razgranate strukture, koje doprinose njihovoj jakoj rastvorljivosti u nepolarnoj sredini kao što su masti.

Ftalati nisu vezani hemijskom vezom za polimer, već su inkorporirani u njemu i svojom izraženom izlučljivošću lako dospevaju u životno okruženje, posebno u nepolarnu sredinu kao što je masna hrana, što ima za posledicu štetno dejstvo na zdravlje čoveka. Da bi se pojasnila raspodela ftalata u životnoj sredini, a samim tim razumeo uticaj ftalata na zdravlje čoveka, uvedene su vrednosti koeficijenata raspodele ftalata u životnoj sredini i to: koeficijent ravnotežne raspodele ftalata između oktanol i vode – K_{OW} , koeficijent ravnotežne raspodele ftalata između vazduha i vode – K_{AW} , kao i koeficijent ravnotežne raspodele ftalata između oktanol i vazduha – K_{OA} . U Tabeli 2. navedene su vrednosti rastvorljivosti ftalata u vodi, Henrijeva konstanta, pritisak pare, K_{OW} , K_{AW} i K_{OA} (COUSINS *et al.*, 2003).

Tabela 2. Rastvorljivost ftalata i koeficijenti raspodele ftalata u životnoj sredini na 25°C

Naziv ftalata	logK _{OW}	LogK _{OA}	LogK _{AW}	Rastvorljivost u vodi (mg L ⁻¹)	Henrijeva konstanta (Pa m ³ mol ⁻¹)	Pritisak pare (Pa)
DMP	1,61	7,01	-5,40	5,22 x 10 ³	9,78 x 10 ⁻³	0,26
DnBP	4,27	8,54	-4,27	9,90	0,13	4,73 x 10 ⁻³
BBP	4,70	8,78	-4,08	3,80	0,21	2,49 x 10 ⁻³
DEHP	7,60	10,53	-2,80	2,70 x 10 ⁻³	3,95	2,52 x 10 ⁻⁵
DnOP	8,10	10,53	-2,80	2,20 x 10 ⁻³	3,95	2,52 x 10 ⁻⁵

1.2.1. Raspodela ftalata u životnoj sredini

Navedene fizičko-hemijske osobine ftalata utiču na raspodelu ftalata u životnoj sredini i određuju njihovu postojanost. Rastvorljivost ftalata u vodi je jedno od važnijih svojstava koje utiče na raspodelu ftalata u životnoj sredini, biorazgradnju i potencijal bioakumulacije ftalata, samim tim utiče i na toksičnost ftalata na vodene organizme i ostale učesnike u lancu ishrane.

Ravnotežnu raspodelu supstance između vazduha i vode karakteriše koeficijent K_{AW} ili Henrijeva konstanta, koji ukazuju na tendenciju date supstance da prelazi iz vode u atmosferu. S obzirom na to da je K_{AW} direktno proporcionalan pritisku pare, a obrnuto proporcionalan rastvorljivosti date supstance u vodi, očekivalo bi se da ftalati budu okarakterisani visokim vrednostima K_{AW}, što nije slučaj za ftalate male molekulske mase. Ftalati male molekulske mase, kao što je DMP, iako imaju veliki pritisak pare, zbog velike rastvorljivosti u vodi, imaju niske vrednosti K_{AW}, što znači, da iako lako isparavaju iz čistog stanja, slabo isparavaju iz vodenih rastvora. Sa povećanjem dužine alkilnog lanca u ftalatima, rastvorljivost ftalata u vodi se smanjuje brže nego pritisak pare ftalata, pa samim tim sa povećanjem molekulske mase ftalata rastu i vrednosti K_{AW}. Takođe, povećanje vrednosti logK_{AW} sa porastom molekulske mase ftalata ne znači nužno i veće isparavanje ftalata, jer se isparljivosti ftalata umanjuje sorpcijom ftalata sa većom molekulskom masom na suspendovanim materijama u površinskim vodama, što je uslovljeno njihovom hidrofobnošću. Iz toga proističe da su koncentracije ftalata u vazduhu niske, često ispod granice detekcije, u rangu između 1 i 100 ng m⁻³ (KAVLOCK *et al.*, 2002).

Hidrofobnost ftalata je određena koeficijentom raspodele supstance između oktanolu i vode (K_{OW}), koji se koristi za određivanje očekivane raspodele supstance u životnoj

sredini između životinjskih/biljnih lipida i vode, kao i između sedimenta/organske materije tla i vode. K_{OW} za ftalate se povećava sa povećanjem molekulske mase ftalata ili sa povećanjem molarne zapremine ftalata što ukazuje na hidrofobnost ftalata, jer je $\log K_{OW}$ za većinu ftalata veći od 4,50 (jedino odstupanje pokazuje DMP čije je vrednost $\log K_{OW}$ 1,61). Istraživanja su pokazala da je rastvorljivost ftalata u oktanolu manje osetljiva na promenu u molarnoj zapremini nego rastvorljivost ftalata u vodi i vazduhu, jer se rastvorljivost ftalata u oktanolu smanjuje za jedan red veličine, dok se rastvorljivost ftalata u vodi smanjuje za šest redova veličine idući od DMP-a do DEHP-a (COUSINS *et al.*, 2003). Iz toga sledi da je razlog za povećanje K_{OW} ftalata sa porastom dužine alkilnog lanca taj što se rastvorljivost ftalata u vodi smanjuje više po jedinici zapremine nego rastvorljivost u oktanolu. Visoke vrednosti K_{OW} većine ftalata ukazuju na veliki potencijal sorpcije ftalata na sedimentu, organskoj materiji, biljnom i životinjskom svetu koji su u ravnoteži sa vodom.

Koeficijent raspodele organske supstance između oktanolu i vazduha (K_{OA}) se koristi za određivanje očekivane raspodele organske supstance između vazduha i organskih faza u zemljištu, biljkama i atmosferskim aerosolima. S obzirom na to da merenja K_{OA} vrednosti za ftalate nisu izvršena, za proračun K_{OA} vrednosti se koristi odnos K_{OW}/K_{AW} . Izračunate vrednosti za K_{OA} se kreću od 7,01 do 10,53 (idući od DMP-a do DEHP-a) što ukazuje na povećanje njihovih vrednosti sa porastom dužine alkilnog lanca ftalata, kao i veliku težnju raspodele ftalata na aerosolima, biljkama i tlu u ravnoteži sa vazduhom.

1.2.2. Dugodometni transport ftalata kroz životnu sredinu

Istraživanja pokazuju da ftalati nisu izloženi značajnom dugodometnom transportu kroz životnu sredinu, zbog toga što ftalati sa velikom molekulskom masom imaju visoke vrednosti K_{OA} , što znači da se sa ovom vrednošću povećava sklonost ftalata za sorpciju na vegetaciji i zemljištu, čime se smanjuje potencijal za dugodometni transport ftalata kroz životnu sredinu. Zbog niske isparljivosti ftalata i slabe rastvorljivosti u vodi, koncentracioni nivoi ftalata u vazduhu su niski. Sa povećanjem temperature vazduha dolazi do povećanja koncentracije ftalata u vazduhu. Ftalati će u atmosferi biti apsorbovani na aerosolnim česticama i biti uklonjeni atmosferskim padavinama iz atmosfere, što predstavlja još jedan razlog za niske koncentracione nivoe DEHP-a u vazduhu (CDC, 2009).

1.2.3. Degradacija ftalata u životnoj sredini

U aerobnim uslovima u vodenim okruženjima (voda/sediment), anaerobnim uslovima u otpadnim vodama iz postrojenja i zemljištu kontaminiranom ftalatima dolazi do biorazgradnje ftalata, pa je radi definisanja biogeohemijskog ciklusa ftalata i određivanja njihove postojanosti i transportabilnosti, važno definisati stopu degradacije ftalata. Predloženo je vreme poluraspada ftalata u različitim medijumima životne sredine na osnovu ispitivanja izvršenih nad ftalatima pod odgovarajućim uslovima.

Pod odgovarajućim uslovima, anaerobna degradacija ftalata predstavlja dominantan mehanizam eliminisanja ftalata iz otpadnih voda. Ftalati bivaju razgrađeni pod uticajem širokog spektra bakterija. Ispitivanja su pokazala da se 50% ftalata podvrgnutih razgradnji biodegradiraju u periodu od 28 dana (STAPLES *et al.*, 1997).

Poluživoti ftalata prilikom biorazgradnje u površinskim i morskim vodama mogu iznositi manje od jednog dana do dve nedelje, dok poluživot ftalata na tlu može biti manji od nedelju dana do nekoliko meseci (STAPLES *et al.*, 1997).

Poluživot ftalata se povećava sa porastom dužine alkilnog lanca kada je u pitanju biorazgradnja. Kada se govori o poluživotu ftalata usled oksidacije vazduhom, red je obrnut, sa porastom molekulske mase smanjuje se vreme poluživota (COUSINS *et al.*, 2002). Na dužinu poluživota pored aerobnih i anaerobnih uslova, utiču i drugi faktori, kao što su postojanje hranljivih materija u okruženju i temperatura. Što je područje bogatije hranljivim materijama i temperatura viša, poluživot se smanjuje. Duži poluživot se očekuje u anaerobnom, hladnom okruženju siromašnom hranljivim materijama (STAPLES *et al.*, 1997).

Pored toga što u atmosferi ftalati bivaju apsorbovani na aerosolima, a potom bivaju isprani atmosferskim padavinama, u atmosferi može doći i do razgradnje ftalata gde je dominantan put degradacije fotodegradacija napadom slobodnih radikala (indirektna fotoliza), gde je predviđen poluživot oko 1 dan za većinu ispitivanih ftalata (COUSINS *et al.*, 2002; STAPLES *et al.*, 1997).

Hidroliza ftalata pod normalnim uslovima životne sredine ne predstavlja značajan proces u sudbini ftalata, jer poluživot ftalata u slučaju hidrolize iznosi od 3 do 2000 godina, idući od DMP-a do DEHP-a (STAPLES *et al.*, 1997).

1.2.4. Bioakumulacija i biomagnifikacija ftalata

Biokoncentracioni faktor (BCF) i bioakumulacioni faktor (BAF) su vrednosti koje pokazuju tendenciju hemijske supstance da se akumulira u živim organizmima i vrednosti ovih faktora se smanjuju za organizme sa naprednijim metaboličkim sposobnostima. Razlika između procesa biokoncentracije i bioakumulacije ftalata se ogleda u tome što biokoncentracija podrazumeva procese povećanja koncentracije ftalata u vodenim organizmima sorpcijom preko kože i respiratorne površine, dok se pod procesom bioakumulacije ftalata podrazumeva povećanje nivoa koncentracije ftalata u vodenim organizmima i usled unosa hrane u organizam. Ukoliko su faktori BAF ili BCF veći od 5000 za vodene organizme, smatra se da je ta hemijska supstanca bioakumulativna, a ukoliko nedostaju podaci o vrednostima BAF i BCF, onda je granica koja određuje da li je supstanca bioakumulativna $\log K_{ow} > 5$ (GOBAS *et al.*, 2003). Uzimajući u obzir veliku hidrofobnost ftalata na osnovu visokih vrednosti $\log K_{ow}$, očekuje se visok potencijal biokoncentracije i bioakumulacije ftalata u vodenim organizmima. Bioakumulacija ftalata, počev od nižih do viših karika u lancu ishrane, je ipak ograničena zbog procesa biotransformacije ftalata koja se odvija u ekosistemu, a progresivno raste sa nivoom lanca ishrane (trofičkim nivoom). Vrednosti BCF za ftalate pokrivaju tri reda veličine (STAPLES *et al.*, 1997), npr. srednje vrednosti $\log BCF$ za DEHP iznose od 2 do 4 za bioakumulaciju u ribama i beskičmenjacima (CDC, 2009). Ove vrednosti proističu iz velike tendencije DEHP-a za sorpciju na zemljištu, sedimentu i živim organizmima.

Biomagnifikacija ftalata predstavlja povećanje koncentracije ftalata bioakumuliranih u nižim karikama lanca ishrane, proporcionalno sa nivoom lanca ishrane. Značaj biomagnifikacije ftalata se ogleda u tome da su organizmi na vrhu lanca ishrane izloženi koncentracijama ftalata koje su veće od onih na nižim nivoima lanca ishrane. Biomagnifikacijom ftalata kroz lanac ishrane može doći do prenosa ftalata sa akvatičnih na kopnene vrste prisutne u lancu ishrane, pa bi na taj način potencijalno bili ugroženi i ljudi koji jedu ribu u kojoj su bioakumulirani ftalati iz vodene sredine. Međutim, na osnovu terenskih i laboratorijskih ispitivanja ustanovljeno je da se ftalati ne biomagnifikuju u lancu ishrane u vodenim ekosistemima (GOBAS *et al.*, 2002). Navedeno istraživanje je ukazalo na nesaglasnost BAF i K_{ow} vrednosti za DMP, jer je dokazano da DMP ima veću težnju za bioakumulacijom u odnosu na to što pokazuje koeficijent K_{ow} , dok BAF vrednosti za ftalate veće molekulske mase pokazuju tendenciju smanjenja sa porastom nivoa u trofičkom sistemu. Objašnjenje ove pojave se ogleda u tome što su ftalati veće molekulske mase manje

bioraspoloživi, odnosno manja je njihova tendencija za apsorpciju preko kože vodenih organizama, već je glavni put unosa ftalata kod njih putem ishrane, pa iz tog razloga vrednosti BAF nisu u korelaciji sa vrednostima K_{OW} . Do biomagnifikacije ftalata ne dolazi najverovatnije zbog brzog metabolizma ftalata u vodenim organizmima na višem trofičkom nivou (GOBAS *et al.*, 2002).

1.3. Primena ftalata i izloženost ljudi ftalatima

Ftalati ulaze u sastav velikog broja polimernih materijala s obzirom na to da se zbog navedenih fizičko-hemijskih osobina najčešće koriste kao plastifikatori. Iz tog razloga mogu se detektovati u velikom broju polivinil hlorid proizvoda – PVC (*engl.* Polyvinyl chloride): kablovima, žicama, cevima, pločicama, tapetama, samolepljivim trakama, ambalažnom materijalu koji je u kontaktu sa medicinskim i farmaceutskim proizvodima – PCM (*engl.* Pharmaceutical Contact Material), dečjim igračkama, ambalažnom materijalu za pakovanje hrane ili koji je u kontaktu sa hranom – FCM (*engl.* Food Contact Material), itd. U ovu svrhu se najčešće koriste ftalati veće molekulska mase (DEHP, DINP, DnOP), dok se ftalati male molekulske mase (DMP, DEP, DnBP) koriste češće u proizvodima za ličnu negu, kao rastvarači i stabilizatori ovih proizvoda (HAUSER *et al.*, 2005). U Tabelama 3a. i 3b. su prikazani glavni izvori izloženosti ljudi određenim ftalatima (SAEIDNIA, 2014; IPCS, 2005; WALLACE *et al.*, 2005; IPCS, 1999; EPA, 2020; EPA, 2000; Green *et al.*, 2005).

Tabela 3a. Upotreba ftalata i izvori izloženosti ljudi najčešće korišćenim ftalatima

DEP	DnBP	BBP
- kozmetički preparati (parfemi, lakovi za kosu, lakovi za nokte, itd.)	- kozmetički preparati (lakovi za nokte, parfemi, itd.)	- igračke
- štamparske boje	- FCM	- FCM
- površinske obloge za farmaceutske proizvode	- enterijer za automobile	- industrijski rastvarači
- FCM	- nitrocelulozni lakovi, eksplozivi, čvrsta raketna goriva	- PVC podne pločice
- insekticidi	- štamparske boje i lepkovi	- podne obloge
		- boje i lepkovi
		- tkanina, tekstil i koža

Tabela 3b. Upotreba ftalata i izvori izloženosti ljudi najčešće korišćenim ftalatima

DMP	DEHP	DnOP
- čvrsta raketna goriva	- PCM	- kozmetički preparati
- lakovi i premazi	- igračke	- igračke
- insekticidi i pesticidi	- FCM	
- igračke	- kozmetički preparati	
	- podne i zidne obloge	
	- tuš zavese	
	- kišne kabanice	

Svetska zdravstvena organizacija – WHO (*engl.* World Health Organization) u svom izveštaju navodi sledeće (WHO, 1996):

- Upotrebom hrane koja predstavlja primarni izvor ftalata odrasli će biti kontaminirani sa oko 200 µg ftalata na dnevnom nivou;
- Do kontaminacije ftalatima korišćenjem pitke vode gotovo da i ne dolazi, jer su nivoi ftalata u pitkoj vodi zanemarljivi, ali ipak treba biti oprezan zbog dugoročnog korišćenja flaširane mineralne vode;
- Takođe, udisanjem vazduha koji je kontaminiran sa 50 ng m⁻³ ftalata, dnevno izlaganje će biti manje od 1 µg, tako da je i ovaj uticaj zanemarljiv;
- Međutim, korišćenjem medicinske opreme, dijalizni bolesnici, pri svakom tretmanu mogu dobiti i do 90 mg ftalata, a takođe prilikom transfuzije krvi može doći do velike kontaminacije ftalatima.

1.3.1. Medicinska oprema

S obzirom na krutost i lomljivost neplastificiranog PVC-a, kako bi se obezbedila fleksibilnost i mekoća medicinskoj opremi napravljenoj od PVC-a, često se takvoj vrsti plastike dodaju ftalati. Najčešći ftalat koji se dodaje PVC-u koji se koristi u medicinske svrhe je DEHP. Tako plastificirani PVC je pogodan za izradu širokog spektra medicinske opreme koja se koristi za lečenje hroničnih i kritično obolelih pacijenata primenom odgovarajućeg medicinskog tretmana. Medicinski tretmani pri kojima se koristi PVC oprema su: hemodijaliza, transfuzija krvi, trombocita ili plazme, vantelesna oksigenacija, kardiopulmonarni bajpas, davanje intravenskih tečnosti, enteralna i parenteralna ishrana. Takođe respiratorna terapija (veštačka ventilacija) koristi opremu napravljenu od PVC-a. Dakle, u PVC medicinsku opremu spadaju setovi za dijalizu i transfuziju sa odgovarajućim

kesama i cevima, katetri i dr. Kapsule, filmovi i drugi tipovi obloga farmaceutskih preparata takođe mogu sadržati ftalate (KAVLOCK *et al.*, 2002; FDA, 2001). S obzirom na prirodu veze između DEHP-a i PVC-a, DEHP može lako da migrira iz PVC medicinske opreme u okolnu sredinu – krv, plazmu, intravensku tečnost, pri čemu pacijent koji koristi odgovarajući medicinski tretman može biti izložen dejstvu DEHP-a. Obim izloženosti DEHP-u će zavisiti od medicinske opreme koja se koristi, vrste i dužine trajanja tretmana.

Transfuzija krvi je jedan od glavnih izvora izloženosti dece i odraslih DEHP-u, jer se DEHP izlučuje u krv iz PVC kese u kojoj je skladištena. Prema literaturnim podacima koncentracija DEHP-a u krvi iz PVC kese iznosi do 115 mg L⁻¹ DEHP-a i do 5 mg L⁻¹ mono-2-etilheksil ftalata – MEHP-a (*engl.* mono(2-ethylhexyl) phthalate) što zavisi od uslova skladištenja, tokom koga dolazi do metabolizma DEHP-a do MEHP-a (LATINI *et al.*, 2000).

Bubrežni bolesnik tokom hemodijalize je izložen DEHP-u iz PVC medicinske opreme i izmerena količina ekstrahovanog DEHP-a tokom procesa jedne hemodijalize iznosi u proseku 75,26 mg. Količina DEHP-a koju pacijent zadrži tokom jednog tretmana iznosi od 3,6 do 59,6 mg, što dovodi do podatka da godišnja izloženost takvih pacijenata DEHP-u nije zanemarljiva imajući u vidu ponovljivost postupka hemodijalize (tri puta nedeljno) i iznosi od 6,91 do 30,76 g DEHP-a, dok je prosečna vrednost 11,74 g DEHP-a (FAOUZI *et al.*, 1999).

Mehanizmi karcinogeneze i reproduktivne toksičnosti su različiti za ljude i životinje, pa se istraživanja koja su sprovedena nad životinjama ne mogu ekstrapolirati na ljude, a studije za procenu toksičnosti kod ljudi izloženih ftalatima nisu sprovedene. Ipak postoji zabrinutost za zdravlje ljudi, posebno dece i pacijenata zbog količina DEHP-a kojim su navedene grupe izložene tokom odgovarajućih medicinskih tretmana. Nivo DEHP-a koji je posledica medicinskih tretmana kod dece je isti kao nivo DEHP-a koji uzrokuje malformacije u muškom reproduktivnom sistemu kod laboratorijskih životinja (SHEA *et al.*, 2003). Iz tog razloga preporuka Centra za procenu reproduktivnih rizika kod ljudi – CERHR-a (*engl.* Center for the Evaluation of Reproductive Risks to Humans) je da se sagleda odnos rizika i koristi pri korišćenju medicinske opreme napravljene od PVC-a i njihove alternative. S obzirom na to da DEHP daje važna svojstva plastici koja se koristi u ovu svrhu, potrebno je dizajnirati alternativu koja je toksikološki sigurnija, funkcionalno efikasna i u cenovnom rangju slična kao i PVC medicinska oprema (KAVLOCK *et al.*, 2002).

1.3.2. Ambalažni materijal za pakovanje hrane

Hrana, voda i alkoholna pića kontaminirana ftalatima putem lanca ishrane, migracijom ftalata iz plastike prilikom proizvodnog procesa hrane i iz plastičnog ambalažnog materijala tokom skladištenja, predstavljaju glavni izvor izloženosti ljudi ovom kontaminantu (EC, 2002). Najveći doprinos kontaminaciji hrane i pića ftalatima pripada migraciji ftalata iz plastičnog ambalažnog materijala pri određenim uslovima (vreme, temperatura, sunčeva svetlost). Istraživanja su pokazala da sveža namirnica sadrži minimalne količine ftalata, dok prerađena, upakovana i skladištena hrana sadrže znatne količine DEHP-a.

S obzirom na to da mleko predstavlja hranu koju ljudi koriste od samog rođenja, važno je pratiti koncentracije ftalata u njemu, kao i uslove u kojima se vrši pakovanje i skladištenje mleka. Kontaminacija mleka ftalatima iz FCM-a može da potiče od plastične opreme za mužu, pumpi za izmlazavanje mleka, ambalaže u koju se mleko pakuje. Istraživanje sprovedeno od strane Casjuana i saradnika je pokazalo da je došlo do kontaminacije uzoraka kravljeg mleka prilikom korišćenja opreme za mužu izrađene od PVC materijala (CASJUANA *et al.*, 2004). Takođe, istraživanje u kome su analizirani uzorci humanog mleka je pokazalo da su nivoi monoestara ftalata viši u mleku koje je dobijeno izmlazavanjem pomoću plastičnih pumpica, u odnosu na mleko dobijeno ručnim izmlazavanjem bez korišćenja pumpica (MORTENSEN *et al.*, 2005). Analiza komercijalnog mleka pakovanog u različite vrste plastike i sa različitim načinom pripreme mleka je pokazala da se koncentracije ftalata kreću u opsegu od 0,97 do 85,3 µg ftalata po kg mleka, da su od ispitana četiri ftalata (DMP, DEP, DnBP i BBP) koncentracije DEP-a najviše i da su koncentracije ftalata u uzorcima mleka približno iste za sve vrste pakovanja, sa izuzetkom DnBP-a čije su najveće koncentracije detektovane u uzorcima sterilizovanog mleka upakovanog u HDPE ambalažu. Razlog za to je najverovatnije taj što se kod mleka upakovanog u HDPE ambalažu sterilizacija vrši u samoj boci, pri čemu temperatura koja se koristi za ovaj proces pospešuje migraciju ftalata iz plastike, dok se UHT sterilizacija mleka upakovanog u tetrapak ambalažu odvija pre flaširanja mleka (CASJUANA *et al.*, 2004).

Takođe je važno praćenje kontaminacije mineralne vode za piće flaširane u plastične boce. Analizirana je mineralna voda upakovana u boce napravljenim od polietilen tereftalata – PET (*engl.* Polyethylene terephthalate). Voda koja je stajala skladištena 5 meseci sadrži 20% više DnBP-a u odnosu na vodu čiji sastav je analiziran odmah nakon flaširanja, što ukazuje na činjenicu da tokom vremena skladištenja raste sadržaj DnBP-a zbog njegove

migracije iz plastične ambalaže (CRIADO *et al.*, 2005). Takođe, analizirana je migracija ftalata iz PET ambalaže u različite vrste bezalkoholnih pića uključujući i mineralnu vodu, sa različitim pH vrednostima, i ustanovljeno je da se migracija ftalata odvija, da je izraženija sa smanjenjem pH vrednosti, i da najveći stepen migracije pokazuje DMP, za kojim slede DnBP i DEHP. Koncentracije ftalata koje su detektovane u uzorcima ne prekoračuju maksimalnu dozvoljenu koncentraciju – MADL (*engl.* Maximum Allowable Dose Level) od $6 \mu\text{g L}^{-1}$ vode (EPA, 2009), pa samim tim i ne predstavljaju rizik za zdravlje ljudi (BOŠNIR *et al.*, 2007). Ipak, s obzirom na veliku potrošnju pića iz plastične ambalaže, briga o količini ftalata koja na taj način može dospeti do čoveka, ne sme biti zanemarena.

Interes za praćenje koncentracije ftalata u bezalkoholnim i alkoholnim pićima je takođe veliki, s obzirom na to da navedena pića mogu biti konzumirana u količini koja može biti štetna po zdravlje, ukoliko se radi o pićima koja sadrže velike doze ftalata. Alkoholna pića dele se u tri grupe – žestoka pića, pivo i vino. Alkoholna pića se mogu kontaminirati ftalatima na više načina: tokom procesa proizvodnje prilikom kontakta alkoholnog pića sa PVC materijalom u različitim fazama proizvodnje, tokom skladištenja alkoholnih pića ukoliko se za pakovanje koriste plastične boce, itd. S obzirom na već navedeno nepostojanje hemijske veze između ftalata i plastike, oni će lako migirati u alkohol koji je dobar rastvarač za ftalate, stoga plastika obogaćena ftalatima predstavlja važan izvor kontaminacije ftalatima. Istraživanje je pokazalo da su koncentracije migriranih ftalata iz plastične ambalaže u bezalkoholna pića višestruko veće (od 5 do 40 puta) u odnosu na migraciju ftalata iz iste takve ambalaže u mineralnu vodu. Razlog za to je razlika u pH vrednosti uzoraka, pH vrednosti za mineralnu vodu su veće od 5, dok su pH vrednosti bezalkoholnih pića manje od 5 (BOŠNIR *et al.*, 2007). Pravilnikom o Glavnom kodeksu za namirnice u zemljama koje su članice EU određena je maksimalno dozvoljena zbirna koncentracija za DBP i DEHP u alkoholnim pićima i iznosi $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (JURICA *et al.*, 2013). Alkoholna pića mogu biti kontaminirana ftalatima koji migriraju iz ambalaže, a mogu biti kontaminirana i tokom procesa proizvodnje alkoholnih pića. Istraživanje koje je sprovedeno radi utvrđivanja koncentracija ftalata u vinima utvrdilo je koncentracije ftalata od $2,7$ do $15 \mu\text{g L}^{-1}$, pri čemu je DnBP najzastupljeniji ftalat, za kim slede DEHP i DEP (CARRILLO *et al.*, 2008). U navedenom istraživanju kao izvor kontaminacije alkoholnih pića ftalatima se navodi tehnološki proces proizvodnje alkoholnih pića, s obzirom na to da su analizirana vina različitog geografskog porekla, da su korišćene različite vrste čepova i različite vrste ambalaže (plastična i staklena), a ipak među ovim vinima nije pronađena značajna razlika u

koncentraciji ftalata. U istraživanju sprovedenom radi detekcije i kvantifikacije DEP-a u neregistrovanim alkoholnim pićima, utvrđena je koncentracija DEP-a u dva alkoholna pića sa poreklom iz Litvanije u iznosu od 210 i 608 mg L⁻¹, pri čemu se ova visoka koncentracija ne može prepisati migraciji DEP-a iz plastične ambalaže. Ova visoka koncentracija DEP-a se objašnjava time da su ova alkoholna pića, iako su korišćena za ljudsku upotrebu, zapravo deklarirana kao parfem ili kolonjska voda radi izbegavanja oporezivanja i kao takva sadrže DEP kao sredstvo za denaturaciju (LEITZ *et al.*, 2009).

U Danskoj su radi procene rizika i izloženosti ljudi ftalatima sprovedene studije. Jedna studija je pokazala da su najveći izvori ftalata u ishrani sledeći: lisnate biljke (53%), korenasto bilje (13%), mleko (12%) i riba (10%). Procenjen je ukupan dnevni oralni unos ftalata na regionalnom nivou i iznosi 26 µg kg⁻¹ telesne mase na dan kod dece uzrasta od prve do šeste godine, 11 µg kg⁻¹ telesne mase na dan kod dece uzrasta od sedme do četrnaeste godine i 4,5 µg kg⁻¹ telesne mase na dan kod odraslih (MULLER *et al.*, 2003). Druga sprovedena studija je pokazala da je čovek prosečne telesne mase od 70 kg, dnevno izložen ftalatima u iznosu od 0,19 do 0,3 mg po danu, odnosno da je dnevni unos ftalata 2,7 – 4,3 µg kg⁻¹ telesne mase na dan kod odraslih. U studiji je na osnovu maksimalne određene koncentracije DEHP-a u hrani, izračunato da odrastao čovek od 70 kg telesne mase može da unese čak 1,1 mg DEHP-a po danu, što je ekvivalentno 15,7 µg kg⁻¹ telesne mase na dan (PETERSEN *et al.*, 2000).

Zbog svih navedenih studija, postoji preporuka da se hrana upakovana u plastični ambalažni materijal ne podgreva u mikrotalasnoj pećnici, da se plastični ambalažni materijal ne pere u mašini za sudove, da se što je više moguće koristi staklena ambalaža i da se prati sastav plastike na deklaraciji proizvoda (SAEDNIA, 2014).

1.3.3. Dečje igračke

Kao plastifikatori ftalati se dodaju i PVC-u od kog se dalje proizvode dečje igračke i proizvodi namenjeni dečjoj upotrebi – cucle, flašice za bebe, glodalice. Od ftalata se u tu svrhu najčešće koriste DEHP, BBP i DINP (SAEIDNIA, 2014). Postoji velika zabrinutost zbog korišćenja ovih proizvoda, posebno proizvoda kao što su glodalice i druge igračke koje se mogu stavljati u usta, zbog intenzivnije migracije ftalata iz plastike usled mehaničkog pritiska zubima. Zbog velike izloženosti dece ftalatima iz navedenih proizvoda i brzog metabolizma i nedovoljne fiziološke zrelosti dece, donešeni su zakoni o zabrani upotrebe određenih ftalata, kao i ograničenje upotrebe drugih ftalata.

Desetogodišnje istraživanje sprovedeno nad decom je pokazalo da je izloženost DnBP-u, BBP-u i DEHP-u smanjena od 2001. do 2010. godine, dok je izloženost DINP-u i diizobutil ftalatu (DIBP) (*engl.* Diisobutyl phthalate) povećana zato što su DINP i DIBP postali zamena za ftalate koji su u potpunosti zabranjeni. Takođe je utvrđeno da je razlika u koncentraciji metabolita DEHP-a i DIDP-a bila veća na početku istraživanja, dok se ova razlika smanjivala sa vremenom istraživanja, pri čemu su uvek koncentracije navedenih ftalata veće kod dece zbog njihove veće izloženosti ftalatima usled korišćenja dečjih igračkaka (ZOTA *et al.*, 2010). Drugo istraživanje je ipak pokazalo da ne postoji veza između detektovane koncentracije metabolita ftalata kod dece i korišćenja plastičnih igračkaka (SATHYANARAYANA *et al.*, 2008).

I pored toga što ipak ne postoje specifični podaci koji ukazuju na to da su plastične igračke značajan izvor izloženosti kod dece Američka akademija za pedijatriju (*engl.* American Academy of Pediatrics) je podržala ideju o povećanim nivoima metabolita ftalata kod dece usled žvakanja plastičnih igračkaka (SHEA *et al.*, 2003). Iz tog razloga se za proizvodnju dečjih igračkaka preporučuju polietilen i polipropilen, plastike koje ne sadrže ftalate i ne ispuštaju druge štetne materije u svoje okruženje.

1.3.4. Kozmetički preparati

Pored primene ftalata u vidu plastifikatora, ftalati se koriste i u druge svrhe, dodaju se različitim proizvodima radi stabilizacije preparata i poboljšanja mirisa. Iz tog razloga se ftalati mogu pronaći u kozmetičkim preparatima i preparatima za ličnu negu: lakovima za nokte, šamponima, lakovima i gelovima za kosu, tečnim sapunima, gelovima za tuširanje, senkama za oči, parfemima, dezodoransima za telo, sredstvima za čišćenje, deterdzentima itd. (HOULIHAN *et al.*, 2002). Najčešće korišćeni ftalati u kozmetici su DnBP koji se najčešće koristi u lakovima za nokte radi postizanja fleksibilnosti tankog sloja laka i za stabilizaciju boje (ECHA, 2010; YOUNG *et al.*, 2018) i DEP koji se koristi kao komponenta u mirisnim proizvodima za stabilizaciju mirisa, i retko je označen kao sastojak na etiketama proizvoda (CHINGIN *et al.*, 2008).

Istraživanje sprovedeno od strane tima istraživača je pokazalo da se ftalati mogu pronaći u velikom broju ispitivanih kozmetičkih preparata na čijim etiketama nije bilo označeno prisustvo ftalata. Od 72 ispitana kozmetička proizvoda, pronađeno je prisustvo bar jednog ftalata u 52 proizvoda (HOULIHAN *et al.*, 2002). Ove rezultate je potvrdilo i istraživanje sprovedeno od strane Administracije za hranu i lekove – FDA (*engl.* Food and Drug Administration) uz nekoliko izuzetaka. Cilj istraživanja od strane FDA je bio razvoj

analitičke metode za detekciju i kvantifikaciju ftalata u kozmetičkim preparatima kao i analiza određenih kozmetičkih proizvoda kako bi se odredio doprinos ftalata iz kozmetičkih preparata ukupnoj izloženosti ljudi ftalatima. 67% od 48 ispitanih proizvoda sadržalo je bar jedan od analiziranih pet ftalata (DMP, DEP, DnBP, DEHP, BBP), pri čemu je DEP detektovan u 27 od 48 proizvoda. Takođe, utvrđeno je da su najviši nivoi ftalata prisutni u lakovma za nokte, dok se na drugom mestu po sadržaju ftalata nalaze parfemi. FDA je utvrdila da ne postoji rizik po zdravlje ljudi usled korišćenja kozmetičkih preparata koji sadrže ftalate (HUBINGER *et al.*, 2006) Ipak, ono što je zabrinjavajuće su rezultati istraživanja koji pokazuju značajnu vezu između korišćenja preparata za negu dece (losiona, pudera u prahu i šampona) i koncentracije metabolita ftalata u urinu kod beba. Veza između ovih parametara je izraženija kod mlađih beba, zbog nezrelosti njihovog metabolizma, kao i zbog povećane doze po jedinici površine tela (SATHYANARAYANA *et al.*, 2008).

1.4. Metabolizam ftalata

Ftalati koji se unesu u organizam ne bivaju akumulirani u telu, već se brzo eliminišu iz tela i to putem urina, fecesa i drugih telesnih tečnosti: majčinog mleka, krvi, sline, itd. U organizmu se brzo razlažu na svoje metabolite – monoestre, koji su i odgovorni za toksični efekat ftalata. Oni se dalje mogu razgraditi i daljom oksidacijom pretvoriti u sekundarne metabolite (ANDERSON *et al.*, 2001).

Metabolizam ftalata se odvija u dve faze kao što je prikazano na Slici 3. (FREDERIKSEN *et al.*, 2007):

- Faza I je faza hidrolize diestra ftalne kiseline u monoestre ftalne kiseline. Time ftalati prelaze u svoj aktivniji oblik;
- Faza II je faza konjugacije u kojoj nastali hidrofilni konjugat glukuronida biva lako izlužen kroz urin iz organizma.

Monoestri kratko razgranatih ftalata kao što su DMP, DnBP, BBP, se odmah izlučuju iz organizma putem urina, dok monoestri ftalata sa dužim alkilnim lancima prolaze kroz dalju biotransformaciju u organizmu, uključujući oksidaciju i hidroksilaciju monoestara. Na osnovu literaturnih podataka u Tabeli 4. su navedeni metaboliti DMP-a, DnBP-a, BBP-a, DEHP-a i DnOP-a (ECHA, 2010; FREDERIKSEN *et al.*, 2007; KOCH *et al.*, 2004; KOCH *et al.*, 2006).

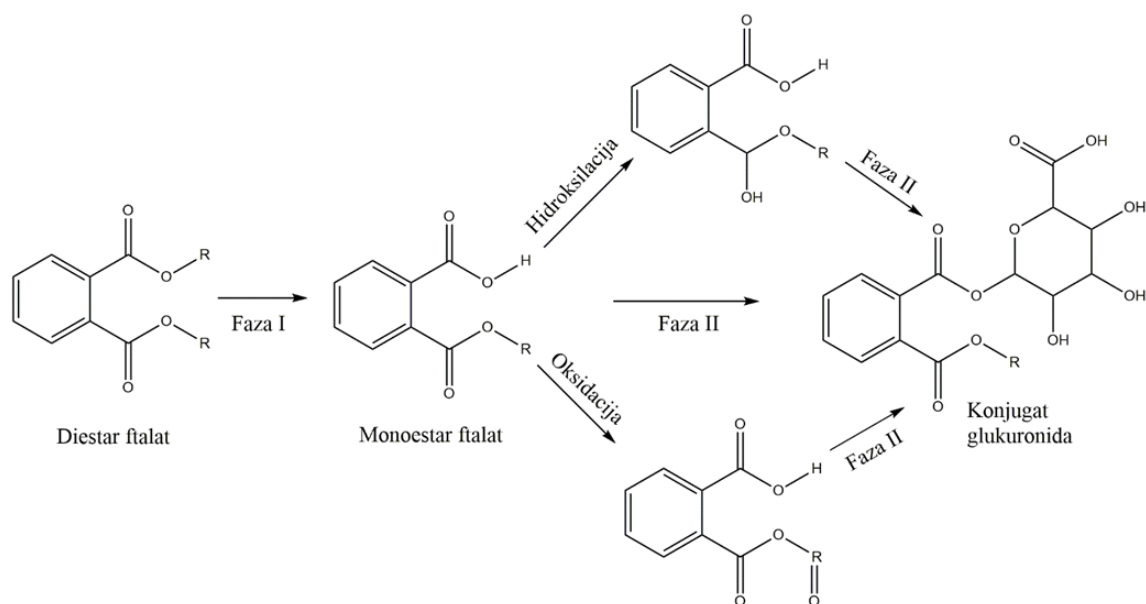
Slika 3. Metabolizam ftalata (FREDERIKSEN *et al.*, 2007)

Tabela 4. Ftalati i njihovi metaboliti

Ftalat	Metabolit	Skraćenica metabolita
DMP	Monometil ftalat	MMP
DnBP	Mono- <i>n</i> -butil ftalat	MBP
BBP	Monobenzil ftalat	MBzP
	Mono(2-etilheksil) ftalat	MEHP
	Mono(2-etil-5-hidroksiheksil) ftalat	MEHHP ili 5OH-MEHP
	Mono(2-etil-5-oksoheksil) ftalat	MEOHP ili 5oxo-MEHP
DEHP	Mono(2-etil-5-karboksipentil) ftalat	MECPP ili 5cx-MEPP
	Mono(2-karboksi-heksil) ftalat	MCMHP ili 2cx-MMHP
	Mono- <i>n</i> -oktil ftalat	MnOP
DnOP	Mono-(3-karboksipropil) ftalat	MCPP
	Monokarboksimetil ftalat	MCMP
	Mono-(5-karboksi- <i>n</i> -pentil) ftalat	MCPeP
	Mono-(7-karboksi- <i>n</i> -heptil) ftalat	MCHpP
	Mono-7-hidroksi- <i>n</i> -oktil ftalat	MHOP
	Mono-(7-okso- <i>n</i> -oktil) ftalat	MOOP

1.5. Uticaj ftalata na zdravlje ljudi

S obzirom na to da ftalata ima u gotovo svemu što nas okružuje, bitno je govoriti i o njihovom efektu na zdravlje ljudi, uzimajući u obzir da svaki ftalat odlikuje jedinstven toksikološki profil. Takođe, treba imati u vidu da su ftalati aditivni, tj. da ftalati u kombinaciji sa drugim ftalatima i drugim hemikalijama mogu da daju negativne „koktel“ posledice (WARING *et al.*, 2011). Dakle, prilikom postavljanja bezbedonosnih standarda za ftalate, potrebno je razmotriti i njihovu međusobnu interakciju i kumulativni efekat ftalata u datom proizvodu ili više proizvoda koji se koriste istovremeno, kako se ne bi potcenio realni rizik korišćenja kontaminiranih proizvoda ftalatima po zdravlje ljudi.

Kada se govori o populaciji koja je ugrožena pod uticajem ftalata, svakako u najrizičniju grupu spadaju deca i muškarci. Zbog povećane upotrebe kozmetičkih preparata od strane žena, s obzirom na činjenicu da su DEP i DnBP sveprisutni u kozmetici i proizvodima lične nege, u rizičnu populaciju od štetnog dejstva ftalata se ubraja i ženska populacija. Ipak, najosetljivija grupa su deca koja su izložena ftalatima još od intrauterinog perioda, preko postpartalnog perioda (perioda nakon porođaja) kada su ftalati prisutni u majčinom mleku, perioda detinjstva kada su deca izložena ftalatima iz različitih plastičnih igračaka do perioda puberteta kada je uticaj ftalata na hormone najveći. Takođe, treba imati u vidu i da je metabolizam dece znatno brži od metabolizma odrasle osobe.

Izlaganje ftalatima može da izazove razne endokrinološke i metaboličke poremećaje, jer ftalati negativno utiču na rad žlezda koje luče hormone. Ftalati kao takvi spadaju u endokrine disruptore i doprinose različitim ishodima kada je zdravlje čoveka u pitanju:

- 1) Studije koje su rađene na pacovima dokazuju dejstvo ftalata na promenu nivoa hormona koji dalje uzrokuju brojne malformacije reproduktivnog sistema kod muškaraca: nerazvijene ili odsutne reproduktivne organe, promene na tkivu testisa koje utiču na smanjenu proizvodnju sperme. Na taj način ftalati uzrokuju neplodnost kod muškaraca i dovode do veće feminiziranosti muškaraca. Krajnji ishod takve malformacije može da bude rak testisa (GRAY *et al.*, 2000).

Istraživanje sprovedeno na ljudima je dovelo u vezu koncentraciju ftalata u majčinim serumima iz 12 nedelje trudnoće i veličinu testisa, kvalitet sperme i reproduktivnih hormona kod 112 ispitanih adolescenata. Pokazano je da viši nivoi metabolita DEHP-a i DINP-a u prenatalnom periodu negativno utiču na reproduktivno zdravlje adolescenata (AXELSSON *et al.*, 2015).

- 2) Takođe, istraživanja ukazuju da postoji veza između izloženosti ftalatima i endokrinog poremećaja koji dovodi do pojave raka dojke (WARING *et al.*, 2011). Broj istraživanja o povezanosti dejstva ftalata i pojave raka dojke je ograničen, ali dovoljan razlog da se ftalati u potpunosti izbace iz proizvoda lične nege.
- 3) Usled izlaganja DEHP-u može doći do funkcionalnog oštećenja jetre, menja se njena morfologija, enzimska aktivnost i menja se metabolizam ugljenih hidrata i lipida (WHO, 1996).
- 4) Takođe, usled izlaganja ftalatima dolazi i do promene u funkcionisanju štitne žlezde, dolazi do smanjenja lučenja T4 hormona (HINTON *et al.*, 1986).
- 5) Bubrežni bolesnici koji su podvrgnuti hemodijalizi su znatno izloženi DEHP-u iz medicinske opreme. Izmerena doza DEHP-a u urinu ovih pacijenata je znatna i utiče na smanjenje mase bubrega, funkciju bubrega i pojavu cisti (RAWDHWWAL *et al.*, 2018).
- 6) Postoji povezanost između izlaganja ljudi ftalatima iz PVC proizvoda prisutnih u kući i pojave alergijskih bolesti i astme.
 - Japanska studija je pokazala da može doći do upale disajnih puteva i alergijskog dermatitisa kod odraslih dolazi usled konstantne izloženosti DEHP-u iz vazduha, iako je koncentracija DEHP-a u vazduhu niska. Pronađena je veza između pojave bronhijalne astme kod odraslih i izloženosti DINP-u i veza između izloženosti DMP-u i pojave alergijskog rinitisa kod dece. Studija je pokazala da su deca podložnija dobijanju određene alergijske bolesti usled dejstva DINP-a, DEHP-a, DnBP-a i BBP-a iz kućnog vazduha i prašine, u odnosu na odrasle (AIT BAMAII *et al.*, 2014).
 - Švedska studija je takođe pronašla vezu između pojave astme i izloženosti DEHP-u, i vezu između alergijskih bolesti i izloženosti BBP-u (BORNEHAG *et al.*, 2004).
 - Studija sprovedena od strane Jahreisa i saradnika je pokazala da su deca podložnija alergijskoj astmi ukoliko je majka bila izložena ftalatima tokom trudnoće i dojenja (JAHREIS *et al.*, 2017).

U izveštaju Svetske zdravstvene organizacije navedeni su rezultati ispitivanja sprovedenih na ljudima (WHO, 1996):

- Posledice doziranja dva muška dobrovoljca sa 10 g DEHP-a su blage želudačne smetnje i umerena katarza. Doza od 5 g DEHP-a nije davala nikakve efekte;
- Ispitivanjem jetre dijaliznih bolesnika je ustanovljeno da mesec dana intravenske dijalize ne dovodi do morfoloških promena na jetri, međutim nakon godinu dana hemodijalize dolazi do znatnih promena na jetri;
- Ispitivanjem industrijskih radnika koji su bili izloženi ftalatima, utvrđena je pojava polineuropatije (oštećenje perifernih živaca);
- U jednom ispitivanju od 221 radnika izloženog DEHP-u u periodu od 3 meseca do 24 godine, došlo je do smrti 8 radnika, jedan radnik oboleo je od karcionoma pankreasa a jedan od papiloma bešike. Međutim, ova studija je bila nedovoljna da pruži dokaz o povezanosti izlaganja DEHP-u i krajnjeg ishoda.

2. PLASTIČNI MATERIJALI – VRSTE, PRIMENA I NJIHOVA UPOTREBA

Plastiku kao materijal karakterišu sledeće osobine: transparentnost, bezmirisnost, nelomljivost, fleksibilnost, stabilnost, otpornost na vodu i većinu hemikalija, otpornost na visoke temperature, mala težina, dug vek trajanja, jednostavna proizvodnja uz nisku cenu proizvodnje, itd. Zbog navedenih karakteristika i zbog mogućnosti oblikovanja plastičnog materijala u najrazličitije oblike, ovaj materijal je pronašao široku primenu u najrazličitijim sferama čime je potisnuo druge prirodne materijale (drvo, kamen, kožu, papir, metal, staklo, keramiku).






















Zbog svoje široke primene, plastika je materijal koji čini glavni deo materijala i proizvoda definisanih kao Materijali i predmeti koji dolaze u kontakt sa hranom – FCM. Tako u ovu grupu spadaju: kutije za prevoz hrane, mašine za obradu hrane, materijali za pakovanje hrane, kuhinjsko posuđe i pribor. FCM je materijal koji bi trebalo da bude dovoljno inertan, odnosno da ingredijenti tog materijala ne utiču štetno na zdravlje potrošača.

Pored toga plastika kao materijal dolazi u kontakt i sa farmaceutskim proizvodima, odnosno čini značajan deo materijala i proizvoda definisanih kao Materijali i predmeti koji dolaze u kontakt sa farmaceutskim proizvodima – PCM (*engl.* Pharmaceutical Contact Materials).

Danas se velika pažnja posvećuje i proizvodima kojima su izložena deca od najranijeg života. To su proizvodi za kozmetiku i negu, proizvodi koji se koriste u ishrani poput plastičnih cucli, glodalica, plastičnog pribora za jelo, dečje igračke, i dr.

Plastiku čine polimeri (70 – 99%), makromolekuli sačinjeni od velikog broja ponovljenih jedinica, i aditivi koji obezbeđuju plastici potrebne osobine i omogućavaju joj funkcionalnost. U zavisnosti od polimera koji ulazi u sastav plastike razlikuje se sedam tipova plastične ambalaže koji su navedeni u Tabeli 5. U tabeli su pored naziva polimera od kog je sačinjena plastika navedeni i reciklabilni kodovi, koji predstavljaju brojeve koji se štampaju na plastičnoj ambalaži kako bi ukazali korisnicima od kog polimera je napravljena plastika i radi lakše klasifikacije prilikom recikliranja. Plastika se obično definiše brojevima od 1 do 7, pri čemu se odgovarajući broj pojavljuje u sredini strelica na etiketi koja se nalazi na proizvodu ili utisnuta na samom plastičnom proizvodu (ACC, 2011).

Tabela 5. Vrste plastične ambalaže, njihove skraćenice i reciklabilni kodovi

Naziv polimera	Skraćenica	Reciklabilni kod		
polietilentereftalat	PET ili PETE (<i>engl.</i> Polyethylene terephthalate)			
polietilen visoke gustine	HDP ili HDPE (<i>engl.</i> High-density polyethylene)			
polivinil hlorid	PVC (<i>engl.</i> Polyvinyl chloride)			
polietilen male gustine	LDPE (<i>engl.</i> Low-density polyethylene)			
polipropilen	PP (<i>engl.</i> Polypropylene)			
polistiren	PS (<i>engl.</i> Polystyrene)			
polikarbonat	PC (<i>engl.</i> Polycarbonate)			

PET je zbog svojih osobina jedna od najčešće korišćenih plastika: providna, jaka, otporna, predstavlja dobru barijeru za gasove i vlagu. Iako u svom nazivu nosi ime ftalata, ovaj materijal ne sadrži ftalate kao plastifikatore. Ova plastika je namenjena za jednokratnu upotrebu i najčešće se koristi za pakovanje voda, sokova, hrane. Može se lako reciklirati.

HDPE je čvrsta plastika sa velikom otpornošću na većinu rastvarača. Imajući u vidu njenu jačinu i izdržljivost koristi se za proizvodnju građevinskih materijala. Takođe, koristi se za proizvodnju ambalaže za pakovanje proizvoda sa kratkim rokom trajanja kao što su mlečni proizvodi i za pakovanje kućnih i industrijskih hemikalija, šampona, sredstava za čišćenje. Velika gustina ove plastike čini je čvršćom i tvrđom od drugih plastika slične težine, što dovodi do upotrebe HDPE plastike za proizvodnju čepova boca. Ova plastika je najsigurnija plastika, jer ne ispušta nikakve hemikalije u okolnu sredinu. Može se lako reciklirati.

PVC je krta, čvrsta, jaka plastika sa dobrom hemijskom otpornošću, poseduje stabilna fizička i električna svojstva, što ga čini dugotrajnim, i kao takav PVC se koristi u

građevinarskoj industriji, za proizvodnju vrata, prozora, cevi, itd. Ukoliko se PVC-u dodaju plastifikatori, on dobija fleksibilnost i mekoću i kao takav dobija još širu upotrebu. Kao fleksibilan se koristi u proizvodnji medicinske opreme (dijalizne kese, kese za transfuziju, cevčice, kapilare i creva koje povezuju ovu opremu), ambalaže, providnih celofana, igračkaka za decu i kućne ljubimce, kablova u elektronici. Najpoznatiji plastifikatori koji se dodaju PVC-u radi postizanja njegovih pogodnih osobina su ftalati. PVC se može reciklirati za izradu novih PVC proizvoda.

LDPE je plastični materijal koji je fleksibilan, poluprovidan, žilav, jak, koristi se za izradu jednokratnih plastičnih ambalaža za namirnice kao što su kafa, hleb, kesa za nošenje, obloga za tetrapake u koje se pakuje sok, igračkaka. Čvrsti LDPE se može reciklirati, dok je fleksibilni LDPE često kontaminiran proizvodom koji pakuje, pa ga je teže reciklirati.

PP je poluprozirni plastični materijal, često i bele boje, čvrst, lagan, ne reaguje sa većinom hemikalija, ima visoku tačku topljenja, što ga čini otpornim na topoltu. Upotreba ove plastike se bazira na proizvodnji pakovanja za prehrambene i neprehrambene proizvode, kao što su čaša za jogurt i kiselo mleko, pakovanja za margarin, posuda za dostavu hrane, plastičnog posuđa za hranu za višekratnu upotrebu, bočica za lekove, čepove za boce i zatvarače. Takođe, koristi se i za proizvodnju laboratorijske opreme. PP se može reciklirati.

PS je proziran, lagan, čvrst ili penast, lako lomljiv materijal, od koga se izrađuje stiropor, zaštitni materijal za pakovanje, ambalaža za hranu, kartoni za jaja, čašice za kafu za jednokratnu upotrebu, plastičan pribor za jelo. Međutim, ova plastika pod uticajem temperature ispušta stiren koji je kancerogen. PS se obično ne reciklira.

PC je prozirna, čvršća plastika u odnosu na druge, spada u najlošije plastike jer sadrži hemikaliju bisfenol A – BPA (*engl.* Bisphenol-A), koju i ispušta u okolnu sredinu. Ipak, PC se koristi u izradi flašica za bebe, boca koje se koriste pri rekreaciji i posuda za spremanje hrane. Reciklabilni kod 7 uključuje sve ostale vrste plastike, koje ne spadaju ni u jednu od prethodno šest navedenih vrsta plastike, što uključuje i kombinacije akrila, najlona, polikarbonata, itd.

Od nabrojanih sedam vrsta plastike, plastične mase koje ne otpuštaju hemikalije u okolnu sredinu su HDPE, LDPE i PP, dok ostale vrste plastike ispuštaju hemikalije koje su štetne po zdravlje ljudi.

3. FTALATI U PLASTIČNOJ AMBALAŽI

3.1. Plastična ambalaža kao izvor ftalata

Imajući u vidu široku primenu ftalata u skoro svim sferama života, njihovu isparljivost i mogućnost migracije iz polimera, svaki plastični materijal u kom su ftalati inkorporirani može predstavljati izvor ftalata. Ftalati u životnu sredinu mogu da dospeju na više načina: proizvodnjom i korišćenjem polimera koji sadrže ftalate, njihovim odlaganjem na industrijske i komunalne deponije, insineracijom otpada. Takođe, ljudi mogu biti izloženi ftalatima putem hrane, upotrebom dečijih igračaka kao i putem korišćenja određenog medicinskog tretmana.

Iako se ftalati kao aditivi obično dodaju PVC-u, ftalati se koriste kao deo katalizatora (Ziegler-Natta katalizator) tokom procesa polimerizacije PP-a, PE-a i PS-a (KISSIN *et al.*, 2008). Iz tog razloga su ftalati pronađeni i u materijalima koji služe za pakovanje hrane, iako nisu napravljeni od PVC-a (BACHA *et al.*, 2012).

3.1.1. Plastična ambalaža koja je u kontaktu sa hranom

Sprovedene studije pokazuju da je jedan od glavnih izvora ftalata hrana pakovana u plastični materijal, i to posebno masnija hrana poput ulja, mleka, putera, mesa, ribe i dr. (FIERENS *et al.*, 2012). Do kontaminacije hrane ftalatima dolazi usled njihove migracije pri odgovarajućim uslovima iz ambalaže u kojoj je hrana spakovana (CDC, 2009). Međutim, prehrambeni proizvodi mogu biti kontaminirani ftalatima migracijom iz polimera i tokom obrade hrane iz opreme za njenu proizvodnju, ali takođe i tokom skladištenja hrane. Tsumara i saradnici su u svom istraživanju pokazali da sveža neobrađena piletina sadrži DEHP u količini 0,08 mg kg⁻¹, dok se ova količina DEHP povećava na 13,1 mg kg⁻¹ nakon prženja piletine u teflonskom tiganju, a daljim pakovanjem piletine koncentracija DEHP raste na 16,9 mg kg⁻¹ hrane (TSUMARA *et al.*, 2001a). Plastična ambalaža, koja se koristi za pakovanje hrane, prilikom zagrevanja ili kuvanja u mikrotalasnoj pećnici takođe predstavlja izvor ftalata, a sprovedena studija je pokazala da pod uticajem visoke temperature ftalati lako migriraju iz ambalaže u masnu hranu i na taj način uzrokuju visoku ftalatnu kontaminaciju (MOREIRA *et al.*, 2014). Od najvećeg interesa je praćenje kontaminacije mleka i mlečnih proizvoda, s obzirom na to da mleko predstavlja primarni izvor hrane za decu (SORENSEN *et al.*, 2006). Istraženo je da kravlje mleko može biti kontaminirano iz opreme za mužu (CASAJUANA *et al.*, 2004), kao i humano mleko koje biva kontaminirano ftalatima takođe korišćenjem pumpi za dojenje (MORTENSEN *et al.*, 2005). Istraživanje,

sprovedeno radi detektovanja ftalata u alkoholnim pićima, dalo je podatke o zanemarljivoj migraciji ftalata iz plastične ambalaže u alkoholna pića koja su registrovana, s obzirom na to da iako je većina uzoraka u ovoj analizi bila pakovana u plastične boce, detektovane koncentracije ftalata su bile niske (LEITZ *et al.*, 2009). Takođe, istraživanje sprovedeno od strane Carrilo i saradnika govori o tome da posledica povećane koncentracije ftalata u alkoholima nije rezultat plastične ambalaže koja je u kontaktu sa alkoholnim pićima, već posledica migracije ftalata tokom tehnološkog procesa (CARRILO *et al.*, 2008). Upoređivanjem rezultata određivanja ftalata u rakiji od šljive pakovane u staklenu i plastičnu ambalažu, dobijaju se podaci koji ukazuje na to da do migracije ftalata iz plastične ambalaže u alkoholna pića ne dolazi jer ne postoji značajna razlika u koncentraciji ftalata između rakije pakovane u različitu ambalažu (JURICA *et al.*, 2016). Ipak, i pored rezultata ovih istraživanja, treba napomenuti da se radi o relativno malom broju uzoraka i da se ne može na osnovu njih doneti zaključak o kontaminaciji alkoholnih pića ftalatima usled njihove migracije iz plastične ambalaže.

3.1.2. Plastična ambalaža koja se koristi u medicinskoj opremi

Postoji znatna izloženost ljudi ftalatima iz medicinske opreme, napravljene od PVC-a, samim tim postoji i zdravstveni rizik po pacijente koji su u kontaktu sa navedenom medicinskom opremom. U medicinsku opremu napravljenu od PVC-a spadaju: kese za transfuziju, kese koje sadrže krvnu plazmu i intravenske tečnosti, kese za hemodijalizu, cevčice i creva povezane sa navedenim kesama, kese za parenteralnu ishranu, enteralne cevi za hranjenje, pupčani katetri, respiratorne maske, nazogastrične sonde, rukavice, itd. Istraživanja su pokazala povezanost između izloženosti ftalatima sa upotrebom katetera, rukavica i odgovarajućih cevi (GREEN *et al.*; 2005; TSUMARA *et al.*, 2001a; TSUMARA *et al.*, 2001b).

Centar za procenu rizika reprodukcije ljudi u okviru Nacionalnog toksikološkog programa - NTP-CERHR (USA) je procenio da je izloženost bolesne dece DEHP-u iz medicinskih uređaja tokom odgovarajućeg medicinskog tretmana od 1,8 – 3,3 mg kg⁻¹ na dan (MCKEE *et al.*, 2004). Međutim, nove procene izloženosti od strane FDA donose podatak za izloženost bolesne dece DEHP-u od 12 mg kg⁻¹ na dan putem odgovarajućih medicinskih tretmana i korišćenjem određenih medicinskih cevi (MCKEE *et al.*, 2004). Nivo DEHP kod kog nije primećen neželjeni efekat (NOAEL) (*engl.* No observed adverse effect level) po NTP-CERHR iznosi 3,7 – 14 mg kg⁻¹ na dan, dok noviji podaci daju vrednost za NOAEL od 60 mg kg⁻¹ na dan (MCKEE *et al.*, 2004). FDA je takođe odredila tolerantni

dnevni unos – TDI vrednosti (*engl.* Tolerable daily Intake) za DEHP koji dospeva do organizma na dva načina – enteralnim i parenteralnim unosom, na osnovu dostupnih podataka o toksičnosti. Vrednost TDI za parenteralni unos iznosi $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ na dan dok za enteralni unos iznosi $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ na dan (FDA, 2001). Odrasli ljudi mogu biti izloženi DEHP-u iz medicinske opreme na više načina. Putem hemodijalize izloženost DEHP iznosi $0,36 \text{ mg kg}^{-1}$ na dan, dok se DEHP putem transfuzije unese u koncentraciji od $8,5 \text{ mg kg}^{-1}$ na dan (FDA, 2001). Na osnovu ovih podataka dolazi se do činjenice da putem medicinskih tretmana, izloženost ljudi DEHP-u prelazi TDI vrednosti.

3.1.3. Plastične dečje igračke

Plastične dečje igračke koje sadrže ftalate, posebno igračke koje su dizajnirane za stavljanje u usta, predstavljaju potencijalni izvor ftalata. Zbog kontakta sa navedenim igračkama, zbog brzog metabolizma i male telesne mase deca su izložena dejstvu ftalata iz plastičnih igračaka i to u najranijoj fazi svog razvoja. U eksperimentu koji je sprovela *Greenpeace Research* laboratorija ispitana je 71 igračka iz 17 zemalja (63 igračke su napravljene od PVC-a). Najzastupljeniji detektovan ftalat u ovom istraživanju bio je DINP – od 63 igračke 40 igračaka je sadržalo DINP kao pretežni ftalat. U osam od 63 igračke DEHP je bio pretežni ftalat, dok je u preostalim bio prateći ftalat. U ovim igračkama su ftalati sačinjavali značajni deo od ukupne težine igračke (10 – 40%). Od preostalih 8 igračaka koje nisu napravljene od PVC samo jedna je sadržala ftalat u tragovima, pa se pretpostavilo da se radi o kontaminaciji uzorka iz spoljašnje sredine (STRINGER, 1997). Takođe, u jednoj studiji je 60% ispitanih igračaka i 77% ispitanih plastelina za decu sa područja Libana sadržalo određene ftalate (KORFALI *et al.*, 2013).

3.2. Migracija ftalata

Migracija je proces u kojem dolazi do prelaza određene materije iz odgovarajućeg materijala u određeni medijum i obratno. Ovaj proces je kombinacija difuzije i sorpcije. Stepenn migracije zavisi od početne koncentracije ftalata u plastici i proporcionalan je datoj koncentraciji. Na taj način, migracija je određena difuzionim koeficijentom u plastici. Ftalati se iz plastike kreću u skladu sa padom koncentracionog gradijenta, tj. difuzijom iz medijuma u kome su prisutni sa većom koncentracijom prema medijumu u kome su prisutni u nižoj koncentraciji. Sa površine materijala, bivaju desorbovani od strane odgovarajućeg medijuma. Takođe usled pada koncentracionog gradijenta, sledi difuzija u unutrašnjost medijuma. Konstantnom migracijom ftalata, plastika gubi vremenom svoja početna svojstva i postaje krta i lomljiva.

S obzirom na to da su ftalati samo pomešani sa polimerom, oni se lako oslobađaju u svoje okruženje. Tako ftalati lako migriraju pod odgovarajućim uslovima u zemljište, prašinu, atmosferu, vodu, hranu, pljuvačku, krv, itd. Bivaju adsorbovani u sedimentima i česticama aerosola i bioakumuliraju se u beskičmenjacima, ribama i biljkama. Putem lanca ishrane dolazi do zagađenja hrane i prehrambenih proizvoda, bioakumulacije u tkivima i njihovog daljeg prenosa. U vazduhu, DEHP-a ima u niskim koncentracijama, zbog njegove niske isparljivosti i slabe rastvorljivosti u vodi. Pod uticajem sunčeve svetlosti i viših temperatura vazduha, dolazi do većeg isparenja, odnosno migracije ftalata, samim tim i do povećane koncentracije ftalata u vazduhu (RUDEL *et al.*, 2008).

Za razliku od migracije ftalata iz plastike u atmosferu, migracija ftalata iz plastične ambalaže u tečne proizvode kao što je hrana sa povišenim sadržajem masti, je daleko izraženija. Migracija ftalata u hranu iz materijala koji je u kontaktu sa hranom (FCM) predstavlja veliki problem. Po direktivi Evropske unije (*Commision directive (EU) No 2002/72/EC*) dobavljači FCM moraju da pokažu da su njihovi materijali u skladu sa odgovarajućim ograničenjima (EUROPEAN UNION, 2002) definisanim kroz sledeće vrednosti:

- Ukupna granica migracije – OML (*engl. Overall Migration Limits*)
- Specifična granica migracije – SML (*engl. Specific Migration Limits*)
- Maksimalna dozvoljena količina – QM (*engl. Maximum Permitted Quantity*)

OML je najveća dozvoljena ukupna količina neisparljivih supstanci koje mogu preći iz FCM u hranu. Ova vrednost se određuje tako što se dati ambalažni materijal izlaže hemijskom simulatoru hrane određeno vreme nakon koga se ekstrahovani ostatak osuši i

odmeri. Ovom vrednošću se određuje inertnost ambalaže, izražava se u mg dm^{-2} površine dodira sa hranom, dok se za decu i odojčad izražava kao mg kg^{-1} hrane. Zakonodavstvo Evropske unije je postavilo vrednost ukupne granice migracije za plastični materijal od 10 mg dm^{-2} ili 60 mg kg^{-1} .

SML je najveća dozvoljena količina određene materije koja može preći iz FCM u hranu. To je sigurnosna granica izvedena iz toksikoloških studija. Prisustvo ovih supstanci u hrani ili simulatorima hrane se određuje pouzdanim analitičkim metodama. Izražava se u mg kg^{-1} hrane. Ukoliko za neku supstancu nije utvrđena SML vrednost, podrazumeva se ukupna granica migracije u iznosu od 60 mg kg^{-1} hrane. Za pojedine ftalate je utvrđena SML vrednost, dok je za one ftalate za koje nije utvrđena, utvrđena je SML(T) vrednost ili totalna specifična granica migracije, koja se odnosi na grupu sličnih supstanci.

QM je najveća dozvoljena količina vrste ili grupe zaostalih nakon migracije materija u FCM. Izražava se u mg kg^{-1} FCM. Kada se ova vrednost izrazi u mg dm^{-2} površine koja je u kontaktu sa hranom, QM se naziva QMA.

3.3. Važeća legislativa za upotrebu ftalata u proizvodima namenjenim za ljudsku upotrebu

U cilju zaštite ljudi osnovano je nekoliko zakonodavnih tela, kako bi se zabranila ili ograničila upotreba određenih supstanci koje imaju štetan zdravstveni uticaj:

- Zakonodavstvo Evropske Unije je jedno od najrigoroznijih zakonodavstava na svetu u oblasti korišćenja i upravljanja hemikalijama. Ovo zakonodavstvo je poznatije kao REACH (*engl.* Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals), odnosno Registracija, evaluacija, autorizacija i ograničavanje hemikalija.
- Evropska agencija za hemikalije – ECHA (*engl.* European Chemicals Agency) je oformljena od strane REACH regulative. To je telo koje nadgleda upravljanje hemikalijama na Evropskom nivou.
- Organizacija Ujedinjenih nacija za hranu i poljoprivredu - FAO (*engl.* Food and Agriculture organization of the United Nations) i Svetska zdravstvena organizacija – WHO su 1963. godine zajednički osnovale specijalizovanu međunarodnu organizaciju za hranu pod nazivom Komisija za *Codex Alimentarius* – CAC (*engl.* Codex Alimentarius Commission), čije je kraće uobičajeno ime Codex. Osnovni cilj ove komisije je donošenje standarda i srodnih dokumenata (uputstva, preporuke, pravila dobre prakse, itd.) kako bi se zaštitilo zdravlje potrošača i olakšala međunarodna trgovina hranom.
- U okviru Evropske unije osnovan je sistem RAPEKS (*engl.* The Rapid Alert System for Non-Food Products) sa ciljem brze razmene informacija o opasnim potrošačkim proizvodima izuzimajući hranu, lekove i medicinske uređaje. To je sistem koji uključuje proizvođače, trgovce, distributere, potrošače i državne organe sa ciljem sprečavanja plasmana na tržište i upotrebu proizvoda koji predstavljaju opasan rizik po zdravlje i bezbednost potrošača.

U našoj zemlji zabrinutost oko štetnih sastojaka u predmetima široke potrošnje se javila tek nedavno. Asocijacija potrošača Srbije – APOS ima cilj da se upozna sa procedurom uvoza proizvoda opšte upotrebe i merama koje nadležni državni organi preduzimaju za kontrolu zdravstvene ispravnosti istih. Republička granična sanitarna inspekcija i zdravstvene laboratorije redovno prate i ispituju robu napravljenu od PVC-a i pokušavaju da se usaglase sa evropskom regulativom. Referentna institucija u Srbiji za

Codex Alimentarius je Institut za standardizaciju Srbije – ISS, koji se bavi usaglašavanjem standarda o sigurnosti hrane i propisa o hrani koji važe u EU i Srbiji, zbog razlika u tradiciji i kulturi.

3.3.1. Važeća legislativa u oblasti prisustva ftalata u prehrambenim proizvodima

U cilju zaštite potrošača propisana su pravila od strane zakonodavnih tela koja čine tim stručnjaka, a tiču se materijala koja su u kontaktu sa prehrambenim proizvodima i koji treba da budu napravljeni tako da ne dolazi do migracije neželjenih supstanci iz datog materijala u hranu koja će biti konzumirana. Migracija neželjenih supstanci može da dovede do promena u sastavu i organoleptičkim osobinama tog konzumacionog proizvoda. Bitno je napomenuti da je svaka interakcija ambalažnog materijala i hrane specifična i zahteva posebno proučavanje.

U zakonodavstvu koje se odnosi na plastične ambalažne materijale koji dolaze u kontakt sa hranom („*food-contact*“ zakonodavstvo) ustanovljena su dva tipa migracija: specifične i opšte. Specifične migracije se odnose na migraciju supstanci koje su prisutne i u niskim koncentracijama predstavljaju opasnost za zdravlje konzumera, pa je neophodna njihova rigorozna kontrola. Globalne migracije se odnose na migraciju sastojaka koji ne predstavljaju veliki rizik za zdravlje potrošača ali su ipak nepoželjni. Evropska unija je donela okvirne smernice s ciljem da materijali i predmeti, koji dolaze u kontakt s hranom, ne bi ni po količini ni po sastavu ugrozili zdravlje potrošača ili uticali na promenu hrane odnosno na senzorska svojstva. Smernice koje obuhvataju plastične ambalažne materijale predstavljaju tzv. specifične smernice koje tretiraju problematiku pojedinog polimernog materijala. Kako je već navedeno, svaki polimerni materijal treba posmatrati kao posebnu problematiku, ali ipak je prema zakonskoj regulativi doneto da je ukupni limit migracije svih kontaminanata iz plastičnog materijala u namirnicu 60 mg kg^{-1} hrane ili 10 mg dm^{-2} površine materijala koji je u kontaktu sa hranom (CDC, 2009). Specifični limit migracije se određuje za svaki ftalat ponaosob. *Commission Regulation (EU) No 10/2011* (Dopuna regulativama *Commission Regulation (EU) No 2002/72/EC* i *No 2007/19/EC*) definiše granične vrednosti specifične migracije (SML) za pojedine ftalate, kao i graničnu vrednost za grupu ftalata (SML(T)). Tako, vrednosti SML za DnBP, DEHP i BBP su 0,3, 1,5 i 30 mg kg^{-1} hrane, redom. Dok je vrednost SML(T) za skupinu ftalata 60 mg kg^{-1} hrane (EUROPEAN UNION, 2011).

Takođe, regulativa daje i ograničenja i specifikacije za svaki ftalat ponaosob (EUROPEAN UNION, 2011):

- DnBP se koristi samo kao: (a) plastifikator u materijalima i predmetima za višekratnu upotrebu koji dolaze u dodir s nemasnom hranom; (b) agens tehničke potpore u poliolefinima u koncentracijama do 0,05% u konačnom proizvodu;
- DEHP se koristi samo kao: (a) plastifikator u materijalima i predmetima za višekratnu upotrebu koji dolaze u dodir s nemasnim hranama; (b) agens tehničke potpore u koncentracijama do 0,1% u konačnom proizvodu;
- BBP Samo za primenu kao: (a) plastifikator u materijalima i predmetima za višekratnu upotrebu; (b) plastifikator u materijalima i predmetima za jednokratnu upotrebu koji dolaze u dodir s nemasnom hranom, osim za hranu za dojenčad i malu decu u skladu s Direktivom 2006/141/EZ ili prerađenu hranu na bazi žitarica i hranu za dojenčad i malu decu u skladu s Direktivom 2006/125/EZ.

Za navedene ftalate je postavljen tolerantni dnevni unos – TDI:

- Za DnBP TDI iznosi $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ telesne težine, gde je TDI izvedena iz LOAEL vrednosti (*engl.* Lowest Adverse Effect Level) od 2 mg kg^{-1} telesne težine na dan (SILANO *et al.*, 2019). LOAEL vrednost je najmanja količina koja izaziva neželjene efekte. Takođe je navedeno da je izloženost DnBP-u iz hrane u okvirima tolerantnog dnevnog unosa;
- Za DEHP TDI iznosi $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ telesne težine, gde je TDI izvedena je iz NOAEL vrednosti od 5 mg kg^{-1} telesne težine na dan (SILANO *et al.*, 2019). NOAEL vrednost je vrednost koja ne izazviva neželjene efekte. Takođe, komisija navodi da izloženost DEHP-u putem hrane u okvirima tolerantnog dnevnog unosa;
- Za BBP TDI iznosi $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ telesne težine, gde je TDI izvedena iz NOAEL vrednosti od 50 mg kg^{-1} telesne težine na dan (SILANO *et al.*, 2019). Takođe, komisija navodi da izloženost BBP-u putem hrane može da doprinese 1% vrednosti TDI.

3.3.2. Važeća legislativa u oblasti korišćenja ftalata za proizvodnju dečjih igračkaka

Kada je reč o plastičnim dečjim igračkama, zbog osetljivosti dece na dejstvo ftalata iz igračkaka, regulativa takođe postoji. Evropska komisija (REACH) je ograničila upotrebu DEHP-a, DnBP-a i BBP-a kao plastifikatora u dečjim igračkama i proizvodima za negu dece, dok se ograničenje upotrebe DINP, DIDP i DnOP odnosi samo na igračke koje deca mogu staviti u usta. Po direktivi 1907/2006/EC ne smeju se stavljati na tržište proizvodi koji sadrže preko 0,1% DEHP-a, DnBP-a i BBP-a (pojedinačno ili zajedno) u odnosu na masu plastičnog proizvoda. Takođe, ova direktiva zabranjuje stavljanje na tržište plastične proizvode koje deca mogu staviti u usta, a sadrže DINP, DIDP i DnOP u koncentraciji iznad 0,1% mase (EUROPEAN UNION, 2006). U Sjedinjenim Američkim državama je 2008. godine usvojen zakon u kome je zabranjena proizvodnja dečjih igračkaka kod kojih je količina DEHP-a, DnBP-a ili BBP-a veća od 0,1% mase u plastičnom delu igračke, i proizvodnja igračkaka koje se mogu staviti u usta a koje sadrže DINP, DIDP i DnOP u koncentracijama većim od 0,1% (U.S. CONGRES, 2008). I pored ovih regulativa, prema podacima RAPEKS-a, u zemljama EU u prvih pet meseci 2007. godine sa tržišta su povučena 453 proizvoda koji predstavljaju određeni rizik po zdravlje potrošača, između ostalog sadrže toksične supstance tipa ftalata (POTROŠACKI REPORTER, 2007). Evropska komisija RAPEKS svake nedelje prilaže izveštaj sa upozorenjima o opasnim proizvodima koji se nalaze na tržištu (EC, <http://ec.europa.eu/rapex>).

3.3.3. Važeća legislativa u oblasti korišćenja ftalata za proizvodnju medicinske opreme

Po direktivi 2007/47/EC koja se odnosi na upotrebu medicinske opreme, medicinska oprema mora biti proizvedena na način da se minimalizuje rizik od supstanci koje se izlučuju iz iste. Posebna pažnja se posvećuje kancerogenim i mutagenim supstancama, pri čemu se odredbe odnose na razvrstavanje, pakovanje i označavanje opasnih supstanci. Ako delovi medicinske opreme namenjeni za primenu i/ili uklanjanje leka, ili medicinska oprema za prenos specifičnih tečnosti ili za uklanjanje telesnih tečnosti iz tela, kao i medicinska oprema za skladištenje takvih telesnih tečnosti i lekova, sadrže ftalate klasifikovane kao kancerogene, mutagene i supstance koje utiču na reproduktivnost, takva medicinska oprema se mora označiti kao proizvod koji sadrži ftalate. Ako se takva medicinska oprema uključuje u lečenje dece ili trudnica i dojilja, proizvođač mora dati posebno opravdanje za upotrebu

takve opreme unutar tehničke dokumentacije i unutar uputstva za upotrebu, sa informacijama o merama opreza i mogućim rizicima (EUROPEAN UNION, 2007).

4. METODE ODREĐIVANJA FTALATA

Kvalitativno i kvantitativno određivanje ftalata u različitim matriksima zahteva analitičku tehniku dovoljno selektivnu za identifikaciju ftalata u prisustvu drugih aditiva iz plastičnog materijala. Ovaj zahtev ispunjavaju analitičke tehnike tečne i gasne hromatografije kuplovane sa odgovarajućim detektorima. U zavisnosti od složenosti ispitivanog analita, vremena potrebnog za analizu, troškova analize, fizičko-hemijskih svojstava ispitivanih ftalata i drugih faktora primenjuju se različite tehnike određivanja ftalata.

Najčešće korišćene metode za kvantifikaciju ftalata su: gasna hromatografija – GC (*engl.* Gas Chromatography) (QAIN *et al.*, 2018; MILOJKOVIĆ *et al.*, 2015) i tečna hromatografija visoke performanse – HPLC (*engl.* High Performance Liquid Chromatography) (DURAL, 2020). Kao detektori koji se koriste u kombinaciji sa GC najčešće se koristi maseni spektrometar – MS (*engl.* Mass spectrometar), dok se znatno ređe koristi plameno-jonizacioni detektor – FID (*engl.* Flame Ionisation detection) (CHEN *et al.*, 2005) i detektor sa zahvatom elektrona – ECD (*engl.* Electron capture detection) (JAWOREK *et al.*, 2013). U kombinaciji sa HPLC najčešće se koriste sledeći detektori: UV-spektrofotometar (LI *et al.*, 2008; MONAKHOVA *et al.*, 2011), detektor sa nizom dioda DAD (*engl.* Diode-Array Detection) (SHEN *et al.*, 2007; ZAATER *et al.*, 2014) ili kvadrupolni maseni spektrometar - MS/MS u odabranom režimu praćenja (JEON *et al.*, 2018). Pored ovih tehnika, infracrvena spektroskopija sa *Fourier*-ovom transformacijom – FTIR (*engl.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy) je tehnika koja ima mnogo prednosti u poređenju sa tradicionalnim analitičkim metodama (ANĐELKOVIĆ *et al.*, 2021; PETERSEN *et al.*, 2010; HIGGINS, 2013; LOWRY *et al.*, 2011).

Za pripremu uzoraka najčešće korišćene tehnike su: tečno-tečna ekstrakcija – LLE (*engl.* Liquid-liquid extraction) (HADJMOHAMMADI *et al.*, 2012), ekstrakcija na čvrstoj fazi – SPE (*engl.* Solid phase extraction) (XIN GAO *et al.*, 2014), mikroekstrakcija na čvrstoj fazi – SPME (*engl.* Solid phase microextraction) (AMANZADEH *et al.*, 2016), Soksletova ekstrakcija (VISSER, 2009), ultrazvučna ekstrakcija (ZHOU *et al.*, 2012; BOGDANOVIĆ *et al.*, 2019), ekstrakcija pomoću mikrotalasa – MAE (*engl.* Microwave assisted extraction) (LIANG *et al.*, 2010) i disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija – DLLME (*engl.* Dispersive liquid-liquid microextraction) (AMIN *et al.*, 2018).

Postoje mnogobrojne studije koje su se bavile ispitivanjem ftalata u hrani, pri čemu je najčešće ispitivan ftalat i najčešće detektovan ftalat je DEHP, dok drugo i treće mesto po učestalosti ispitivanja pripadaju DnBP-u i BBP-u (WARING *et al.*, 2011).

4.1. GC-MS tehnika

Najčešće korišćena tehnika za određivanje ftalata je gasna hromatografija kuplovana sa masenim spektrometrom kao detektorom – GC-MS (*engl.* Gas chromatography-mass spectrometry) (GIMENO *et al.*, 2014). Kolone koje se koriste prilikom gasno-masenog određivanja ftalata sadrže stacionarnu fazu niske polarnosti. U zavisnosti od složenosti razdvajanja ftalata menja se i temperaturni režim. Jonizacija koja se najčešće koristi u GC-MS analizi je elektronska jonizacija – EI (*engl.* Electron Impact) (SABLAYROLLES *et al.*, 2005), dok je njena alternativa pozitivna hemijska jonizacija – PCI (*engl.* Positive chemical ionisation) (SANZO *et al.*, 2015). Primenom metana i amonijaka kao reagens gasa pri PCI stvara se maseni spektar koji sadrži pikove molekulskih jona pojedinačnih ftalata, koji omogućava bolju identifikaciju i razlikovanje ftalata. Primena PCI je naročito korisna u analizi kompleksnih smeša izomernih ftalata.

U GC-MS analizi se obično primenjuje režim praćenja jednog jona – SIM (*engl.* Single Ion Monitoring). Drugi režim monitoringa u GC-MS analizi je režim praćenja odgovarajućeg opsega masa – FS (*engl.* Full Scan Monitoring), gde opseg masa ide od m/z 50 do 350, a može biti i veći. Identifikacija i kvantifikacija ftalata zasniva se na relativnom retencionom vremenu, prisustvu glavnog fragmentnog jona (target jona) i kvalifikacionih jona, kao i njihovim relativnim intenzitetima u odnosu na intenzitet internog standarda.

Interni standard (IS) je hemijska supstanca koja je po hemijsko-fizičim osobinama veoma slična analitu koji se određuje i koja se ne očekuje u matriksu. Koristi se za poboljšanje preciznosti kvantitativne analize. Poznata koncentracija IS se dodaje standardnim rastvorima, slepim probama i uzorcima pri čemu se GC-MS analiza vrši u istim eksperimentalnim uslovima. Nakon toga se vrši izračunavanje faktora odziva za svako jedinjenje, odnosno odnos površine pika IS i površine pika analita upoređuje se sa odnosom koncentracije IS i koncentracije analita. Ovaj faktor se kasnije koristi za izračunavanje koncentracija pojedinih komponenti u nepoznatom uzorku. Kao interni standard u analizi ftalata se najčešće koriste benzil benzoat (BBz) (CARRILLO *et al.*, 2007), izotopi ftalata (KONDO *et al.*, 2010) i dibutil adipat (DBA) (GUO *et al.*, 2010).

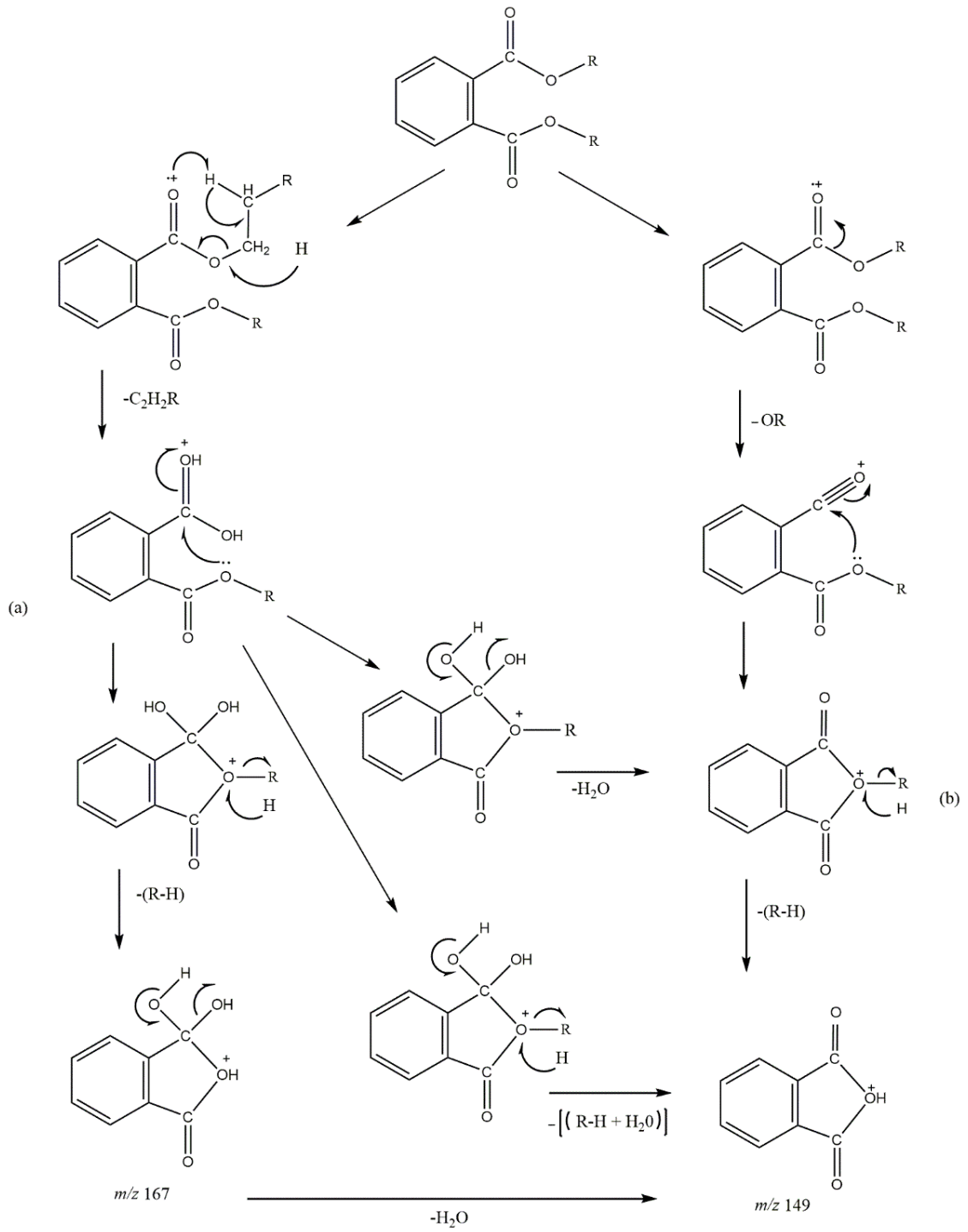
U Tabeli 6. nevedeni su glavni fragmentni joni DMP-a, DnBP-a, BBP-a, DEHP-a i DnOP-a koji se koriste prilikom kvantifikacije, kao i kvalifikacioni joni koji služe za kvalitetniju identifikaciju ftalata.

Tabela 6. Kvalifikacioni i kvantifikacioni joni ftalata

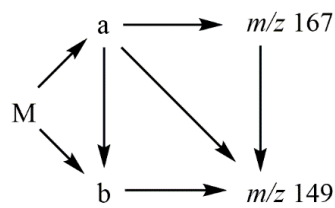
Analit	Molekulska masa (g/mol)	Joni (m/z)
DMP	194	163 [*] , 50, 77
DnBP	278	149 [*] , 167, 205, 223
BBP	312	149 [*] , 91, 206
DEHP	390	149 [*] , 167, 279
DnOP	390	149 [*] , 167, 261, 279

* Target joni, joni za kvantifikaciju

Na Slici 4a. prikazana je fragmentacija ftalata (YINON, 1988). Dva glavna fragmentna jona (*a*) i (*b*) su detektovana na masenim spektrima DnBP-a, BBP-a, DEHP-a, DnOP-a, sa izuzetkom DMP-a, kod kog se detektuje samo jon (*b*). Jon (*a*) nastaje usled *McLafferty* premeštanja i transfera vodonika, dok jon (*b*) nastaje usled gubitka alkoksi radikala. EI masene spektre svih ispitivanih ftalata, osim DMP-a, karakteriše glavni fragmentni jon m/z 149 koji je protonovani jon ftalnog anhidrida. Ovaj jon, kao što je prikazano i na Slici 4b. se formira kroz četiri alternativna puta. Glavni fragmentni jon za DMP je jon m/z 163.



Slika 4a. Fragmentacija ftalata



Slika 4b. Fragmentacija ftalata i glavni fragmentni joni ftalata

4.2. FTIR tehnika

Infracrvena spektroskopija sa *Fourier*-ovom transformacijom (FTIR) je tehnika kod koje su kompjuterski spojene dve klasične metode – interferometrija i *Fourier*-ova transformacija (matematička transformacija dobijenog interferograma direktno daje IR spektar uzorka, odnosno intenzitet propuštenog zraka od frekvencije). Prednosti FTIR spektrofotometra u odnosu na klasični spektrofotometar su: brže snimanje spektara zbog istovremenog detektovanja svih elemenata izvora, veća osetljivost (omogućen rad sa tragovima i uzorcima veoma malih dimenzija), širi spektralni opseg, mogućnost ponavljanja interferograma, veća preciznost frekvencija i velika moć razlaganja, naknadna popravka spektara, mogućnost poređenja snimljenih spektara sa spektrima iz biblioteke računara.

Svaki FTIR spektar je okarakterisan apsorpcionim maksimumom, apsorpcionim trakama, oblašću spektra nazvanom „otisak prsta molekula“. Karakterizacijom FTIR spektra, odnosno identifikacijom funkcionalnih grupa, vrši se kvalitativna i kvantitativna analiza.

FTIR metoda je našla primenu u određivanju različitih analita, zbog toga što je ovo nedestruktivna tehnika, ne zahteva posebnu pripremu uzoraka, brza je i pouzdana, i nije skupa u odnosu na druge metode, npr. GC-MS metodu. Zbog ovih karakteristika može se koristiti u kombinaciji sa drugim analitičkim tehnikama radi dobijanja dodatnih informacija o strukturi i sastavu uzorka. U većini slučajeva vreme analize je obično manje od jednog minuta, što omogućava veliku propusnost uzorka i brzu povratnu informaciju.

FTIR metoda se može koristiti i u detektovanju ftalata u različitim uzorcima plastične ambalaže, ali i pored velikih prednosti, ova metoda se za tu svrhu do sada nije koristila tako često. Analizom uzoraka PVC plastike se dobijaju FTIR spektri sa karakterističnim apsorpcionim trakama za ftalate: 743 cm^{-1} , 1579 cm^{-1} i 1599 cm^{-1} . Na osnovu intenziteta apsorpcije i površine apsorpcione trake može se izvršiti i kvantitativna analiza uzorka. Nedostatak ove analize je u tome što se na ovaj način vrši kvantifikacija svih ftalata prisutnih u uzorku, jer nije moguće izvršiti njihovu separaciju.

4.3. Priprema uzoraka hrane i plastičnih artikala za analizu određivanja ftalata

Uzorke hrane, pića, ulja ili drugi vid uzoraka je potrebno čuvati u originalnoj ambalaži na hladnom, jer bi prebacivanje uzorka u drugu ambalažu dodatno kontaminiralo uzorak. Prvi korak u analizi hrane je homogenizacija uzoraka. Uzorci pića (voda, alkohol, sokovi) su homogeni i pre ekstrakcije ne zahtevaju posebnu pripremu. Uzorci tečne hrane se pre bilo kog sledećeg koraka najpre homogenizuju mućkanjem i mešanjem, dok se čvrstim uzorcima hrane pri mešanju dodaje i destilovana voda ili polarni organski rastvarač kako bi olakšao proces homogenizacije. Sledeći korak je ekstrakcija ftalata iz uzoraka nepolarnim organskim rastvaračem. Kada su u pitanju nemasni tečni uzorci kao što je voda, alkohol, sokovi, nema potrebe za dodatnim prečišćavanjem ekstrakata. Kod ovih uzoraka se primenjuje tečno-tečna ekstrakcija za ekstrakciju ftalata iz matriksa i najčešće korišćeni organski rastvarači za tu svrhu su: *n*-heksan, *n*-heptan, cikloheksan, hloroform ili izooktan. Takođe, kod ovih uzoraka se primenjuje i ekstrakcija na čvrstoj fazi. Za ekstrakciju ftalata iz nemasne čvrste hrane koristi se acetonitril ili mešavina acetonitrila i vode. Pri analizi čvrste masne hrane najpre se vrši ekstrakcija ftalata zajedno sa mastima pomoću rastvarača kao što su dihlormetan, mešavina dihlormetana sa cikloheksanom, *n*-heksan, kao i mešavina *n*-heksana sa acetonom, ili acetonitril. Acetonitril je selektivniji rastvarač u odnosu na ostale zbog slabe rastvorljivosti masti u acetonitrilu. Kod čvrstih uzoraka se i korišćenje ultrazvučne ekstrakcije i ekstrakcija pomoću mikrotalasa pokazalo kao dobro (WENZL, 2009).

Priprema uzoraka plastičnih artikala za određivanje ftalata u njima, kao i za praćenje migracije ftalata iz plastičnih artikala u različite medijume ne zahteva posebnu pripremu.

Ono o čemu dodatno treba voditi računa je kontaminacija uzoraka pri analizi, zbog sveprisutnosti ftalata. Potrebno je sprovesti određene mere kako bi nivoi ftalata u pozadini bili niski i konstantni. Posuđe koje se koristi u analizi bi trebalo da bude isključivo stakleno, nikako plastično. S obzirom na to da čak staklo i aluminijumska folija mogu sadržati ftalate, potrebne su i dodatne mere kao što su termička obrada stakla, ispiranje stakla rastvaračima. Takođe treba voditi računa i o kontaminaciji organskih rastvarača, i ukoliko je potrebo ponovo raditi njihovu destilaciju.

Iz razloga kontaminacije uzoraka pri svakoj analizi paralelno sa ispitivanjem uzoraka treba raditi i blank uzorke (slepe probe) i prilikom obrade rezultata analize uzimati u obzir blanko koncentraciju. Blanko koncentracija je koncentracija analita koja potiče iz

reagenasa, mernog uređaja ili samog procesa određivanja i doprinosi povećanju koncentracije analita iz ispitivanog matriksa određenog odgovarajućom analitičkom tehnikom. Paralelnom analizom blanko koncentracije se drže pod kontrolom i na minimumu.

5. VALIDACIJA ANALITIČKE METODE

Validacija analitičke metode je postupak kojim se potvrđuje pouzdanost i mogućnost primene date metode za rutinske analize. Validirane metode osiguravaju pouzdanost i tačnost analitičkih podataka.

Prema kriterijumima i preporukama Evropske komisije (*European commission decision 2002/657/EC*) validacija metode određivanja GC-MS tehnikom podrazumeva definisanje njenih kvalitativnih i kvantitativnih parametara.

U kvalitativne parametre spada:

- molekularna identifikacija u odnosu na vreme zadržavanja (retenciono vreme),
- odnos jona na GC-MS hromatogramu.

U kvantitativne parametre spada:

- linearnost,
- procenat prinosa analitičkog postupka (*Recovery*),
- tačnost u smislu istinitosti i preciznosti, gde je preciznost izražena kao unutarnevna ponovljivost (repetabilnost) i intermedijarna preciznost,
- analitičke granice (granica odlučivanja ($CC\alpha$) i sposobnost detekcije ($CC\beta$)).

5.1. Definicija parametara koji se koriste prilikom validacije metode

5.1.1. Linearnost analitičke metode

Opseg linearosti je opseg kalibracione krive u okviru kojeg odziv instrumenta ostaje linearan u odnosu na koncentraciju analita. Linearnost se definiše kao mogućnost da se u datom opsegu detektuje signal koji je direktno proporcionalan koncentraciji ili količini analita. Parametri koji karakterišu linearnost su:

- Koeficijent korelacije ili regresioni koeficijent, R , koji predstavlja stepen rasturanja tačaka oko idealne prave linije i približan je jedinici za većinu analita i izražava se kao R^2 ;
- Odsečak na ordinati, y , u linearnom opsegu ne treba značajno da odstupa od nule;
- Nagib prave predstavlja osetljivost metode, tj. veći nagib pokazuje da mala promena u količini analita rezultuje velikom promenom u odgovoru sistema.

Grafički prikaz linearnosti može biti normalan-normalan, log-normalan ili log-log. U gornjim i donjim granicama ove oblasti (gornje i donje granice kvantifikacije), javlja se odstupanje od linearnosti. Linearni opseg analitičke metode jeste interval između gornjeg i donjeg nivoa koncentracije u kome se analiza može vršiti sa određenom tačnošću, preciznošću i linearnošću.

5.1.2. Selektivnost/Specifičnost analitičke metode

Selektivnost predstavlja mogućnost izdvajanja analitičkog odgovora za određenu komponentu u odnosu na druge komponente u matriksu, a specifičnost metode se odnosi na dobijanje analitičkog odgovora samo jedne ciljane komponente u prisustvu drugih komponentata u matriksu. Metoda kojom se može određivati više komponentata istovremeno, ali pod uslovom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom. Metoda je specifična ukoliko odgovor detektora potiče samo od komponente od interesa. Hromatografske tehnike se odlikuju dobrom specifičnošću zato što omogućavaju razdvajanje komponentata smeše pre njihove detekcije.

5.1.3. Preciznost analitičke metode

Preciznost analitičke metode predstavlja slaganje između vrednosti niza merenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uslovima. Velika preciznost ne garantuje i veliku tačnost. Izračunava se kao standardno odstupanje rezultata testa, gde je manja preciznost određena velikim odstupanjem i obrnuto.

Parametri preciznosti su:

- ponovljivost (repetabilnost) – preciznost određena u uslovima ponovljivosti u kraćem vremenskom intervalu (jedan dan);
- intermedijarna preciznost – preciznost određena u uslovima ponovljivosti u dužem vremenskom intervalu (npr. 15 dana);
- obnovljivost (reproduktivnost) – preciznost određena u različitim uslovima eksperimenta (drugi instrument, drugi analitičar).

Preciznost se najčešće izražava kao:

- standardna devijacija,
- varijansa ili
- relativna standardna devijacija.

Za određivanje standardne devijacije merenja, σ , ili standardnog odstupanja velikog broja merenja koristi se formula (1). Kada $n \rightarrow \infty$ onda je $\bar{x} = \mu$.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}} \quad (1)$$

Standardna devijacija ograničenog broja merenja, s , izražava se u istim jedinicama kao i merna veličina i za njeno određivanje koristi se formula (2), n predstavlja ograničen broj merenja, $n-1$ broj stepena slobode, $\bar{x} \neq \mu$.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

Varijansa ili srednje kvadratno odstupanje, s^2 , se izračunava korišćenjem formule (3):

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (3)$$

Relativna standardna devijacija, RSD , ili koeficijent varijacije, CV , se izračunava korišćenjem formule (4):

$$(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

Standardna devijacija srednje vrednosti se izračunava korišćenjem formule (5):

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

Preciznost se prema instrukcijama *European commission decision 2002/657/EC* izražava preko koeficijenta varijacije (CV). Koeficijent varijacije za ponovljenu analizu standardnog ili obogaćenog (spajkovanog) uzorka, pod uslovima ponovljivosti, ne sme prelaziti nivo izračunat pomoću *Horwitz*-ove jednačine (6). *Horwitz*-ova jednačina je empirijski postavljena i predstavlja vezu između preciznosti analitičke metode i koncentracije analita.

$$CV = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (6)$$

c – koncentracija analita izražena kao udeo mase (npr. 1 mg g^{-1} je 10^{-3}) i predstavlja bezdimenzionu veličinu.

5.1.4. Tačnost analitičke metode

Tačnost analitičke metode je stepen saglasnosti između dobijene vrednosti u analitičkom postupku i stvarne vrednosti (referentne vrednosti). Određivanje tačnosti se vrši poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim korišćenjem standardne referentne metode ili korišćenjem sertifikovanog referentnog materijala (SRM). Kada SRM nije dostupan mogu se koristiti standardni uzorci sa poznatom količinom analita. Koncentracije standardnih uzoraka treba da budu u opsegu od interesa, a najmanje jedan standardni uzorak treba da ima koncentraciju blisku granici kvantitativnog određivanja. Dobijena tačnost u velikoj meri zavisi od načina pripreme uzoraka, matriksa i koncentracije uzoraka.

5.1.5. Osetljivost analitičke metode

Osetljivost je sposobnost metode ili instrumenta da detektuju analit u tačno određenoj koncentraciji. Nagib određuje osetljivost metode. Što je nagib prave veći, to je metoda osetljivija.

5.1.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije analitičke metode

Granica detekcije

Granica detekcije – LOD (*engl.* Limit of Detection) je najmanja količina analita u uzorku koju je moguće odrediti uz razumnu statističku verovatnoću. LOD se obično određuje u oblasti gde je odnos signal/šum veći od 5. Za granicu detekcije se obično uzima vrednost koncentracija koje daju $S/N = 3$ ili $S/N = 2$. Granice detekcije matriksa, metode i analita su specifične.

LOD se može izračunati na sledeći način:

- LOD je numerički jednak trostrukoj standardnoj devijaciji srednje vrednosti slepih proba ($n > 20$) ili

$$\text{LOD} = 3,3 \times S_B/a \quad (7)$$

gde je S_B standardna devijacija odgovora, a a nagib kalibracione prave na nivoima bliskim limitu.

Standardna devijacija odgovora se može odrediti na osnovu slepe probe, standardne devijacije reziduala regresione prave ili standardne devijacije odsečka regresione prave.

Odnos signal/šum, S/N (engl. Signal/Noise Ratio)

Odnos S/N je bezdimenziona veličina koja pokazuje relativnu jačinu (snagu) analitičkog signala (S) u odnosu na prosečnu snagu šuma u pozadini (N) u određenom

uzorku i usko je povezan sa granicom detekcije. Bazirano na vrednosti odnosa signala prema šumu poredi se mereni signal koji potiče od uzorka sa poznatom niskom koncentracijom analita sa blank uzorkom (bez analita) i procenjuje se minimalna koncentracija na kojoj analit može biti pouzdano detektovan, tj. kvantifikovan.

Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije ili donja granica kvantitativnog određivanja – LOQ (*engl.* Limit of Quantitation) je nivo iznad kojeg se mogu dobiti kvantitativni rezultati sa određenim stepenom poverenja. To je najniža koncentracija analita koja se može odrediti prihvatljivom ponovljivošću i tačnošću. Određuje se analogno određivanju detekcionog limita, koristeći $S/N=10$. LOQ matriksa, metode i analita je specifičan.

LOQ se može izračunati na sledeći način:

- Ako su i tačnost i preciznost konstantne u koncentracionom rasponu oko granice detekcije, tada je granica kvantifikacije numerički jednaka šesterostrukoj ili deseterostruko standardnoj devijaciji srednje vrednosti slepih proba ($n > 20$)

$$\text{LOQ} = 10 \times S_B/a \quad (8)$$

EKSPERIMENTALNI DEO

6. CILJ I PROGRAM EKSPERIMENTALNOG RADA

Imajući u vidu raspostranjenost ftalata u okruženju, njihovu široku primenu, mogućnost izlaganja ljudi njihovom uticaju, štetnom uticaju koji imaju na ljude, kao i njihove fizičko-hemijske karakteristike, cilj istraživanja ove doktorske disertacije je razvoj metoda određivanja ftalata u hrani i plastičnim artiklima, kao i ispitivanje stepena migracije ftalata iz plastičnih artikala pod uticajem različitih faktora.

Predmet ovog naučnog istraživanja obuhvata sledeće:

- Ftalate: dimetil ftalat (DMP), di-*n*-butil ftalat (DnBP), benzil butil ftalat (BBP), di-(2-etilheksil) ftalat (DEHP) i di-*n*-oktil ftalat (DnOP);
- Hranu i piće: mleko i mlečne proizvode, alkoholna pića – bele rakije i sintetičko vino;
- Plastične artikle sačinjene od sledećih polimera: polivinil-hlorida (PVC), polietilentereftalata (PET), polietilena visoke gustine (HDPE), polietilena niske gustine (LDPE), polipropilena (PP), polistirena (PS) i polikarbonata (PC)).

U ovom radu su kao ciljane jedinjenja izabrana nabrojana pet ftalata: DMP, DnBP, BBP, DEHP i DnOP.

- Jedan od razloga za ovakav izbor jeste učestalost detekcije ovih ftalata u flaširanoj vodi, posebno u zemljama poput Srbije, Hrvatske, Češke, Tajlanda, Saudijske Arabije, Kine, Pakistana itd. (LUO *et al.*, 2018). Takođe, ispitivanja mlečnih proizvoda pokazuju isti trend detekcije navedenih ftalata (FIERENS *et al.*, 2013). S obzirom na to da su u radu analizirani plastični artikli iz domena ove primene, praćen je isti izbor ftalata koji je naveden u literaturi.
- Drugi kriterijum za odabir ovih pet ftalata je bio odabir ftalata koji mogu pokazati kako povećanje dužine funkcionalnih grupa i njihova voluminoznost utiču na potencijal migracije ftalata. Iz grupe ftalata koja je odobrena za upotrebu u plastičnom materijalu koji je u kontaktu sa hranom – DnBP, BBP, DEHP, DINP i DIDP (SILANO *et al.*, 2019), u ovom radu je fokus na tri ftalata iz ove grupe, uz dodatak dva ftalata koja su van ove grupe – DMP i DnOP. Iz opsega istraživanja su izuzeti DINP i DIDP, koji su klasifikovani kao supstance koje ne pokazuju štetan uticaj. Uprkos činjenici da postoji trend da se DEHP zameni DINP/DIDP-om u upotrebi plastifikatora u Evropskoj Uniji, DEHP i ostatak od tih 5 ciljanih ftalata i dalje se široko primenjuju, posebno u zemljama koje su navedene u radu (LUO *et al.*, 2018).

Na osnovu navedenih literaturnih podataka u poglavlju 4.1. i potreba eksperimenata, između benzil benzoata, izotopa ftalata i dibutil adipata (DBA), kao interni standard izabran je DBA. Po svojim osobinama je sličan ispitivanim ftalatima (tečnost, nerastvoran u vodi, rastvoran u nepolarnim rastvaračima, molekulske mase ($M=258,35 \text{ g mol}^{-1}$), temperature ključanja ($T_k=183^\circ\text{C}$)), ne ometa određivanje ftalata i nema ga u matriksu koji se analizira. Glavni fragmenti jon koji suži za kvantifikaciju DBA je m/z 185, dok su kvalifikacioni joni m/z 129 i 111.

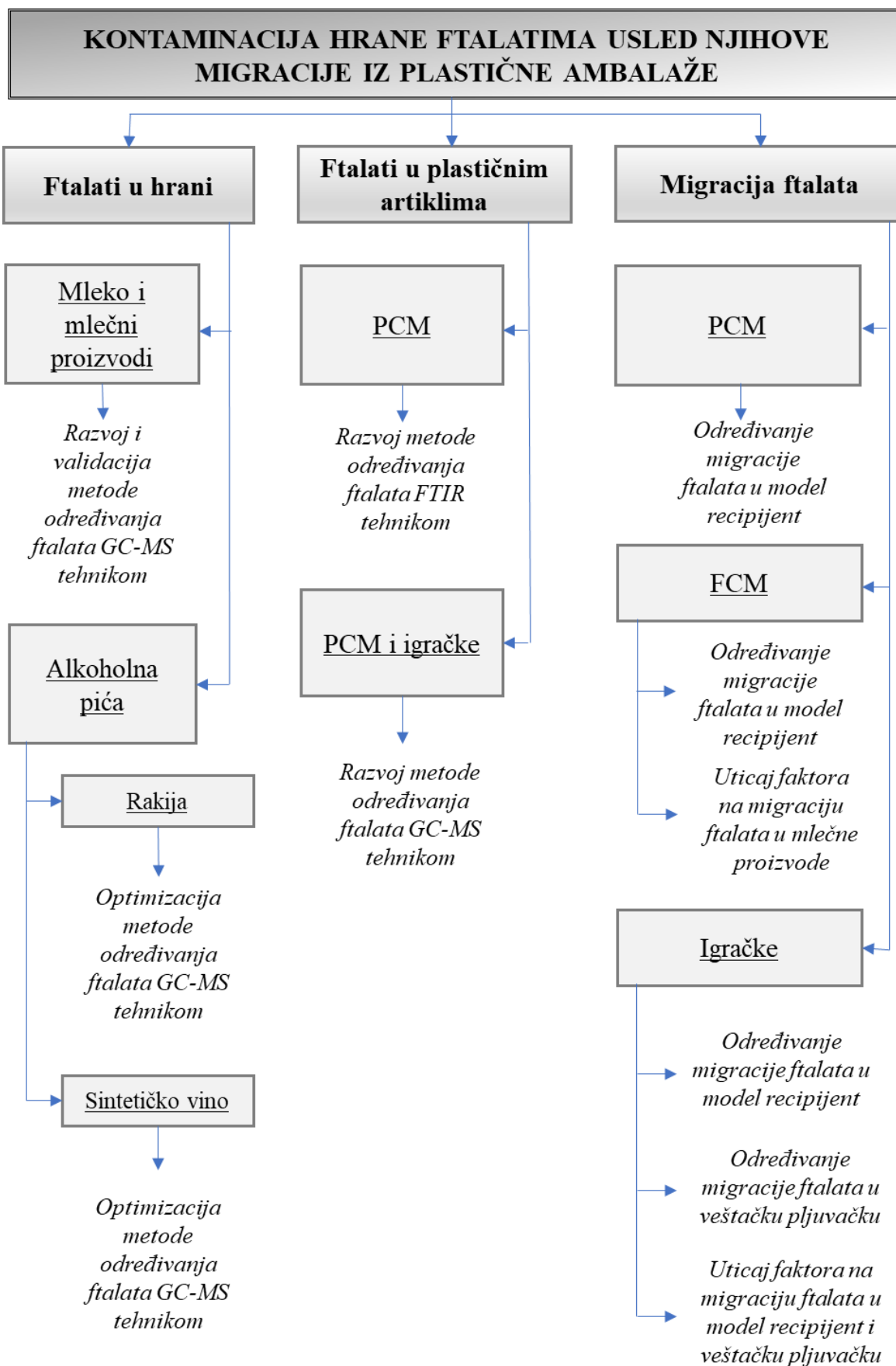
Program ove doktorske disertacije koncipiran je tako da se sastoji iz tri faze, a svaka faza je metodološki detaljnije obrađena u okviru ovog poglavlja (od 6.1. do 6.12.). Na Slici 5. je dat šematski prikaz programa eksperimentalnog rada.

Prva faza. Izvršen je razvoj i optimizacija metoda za određivanje koncentracije ftalata u uzorcima hrane različitog stepena masnoće: vodi, alkoholnim pićima, mleku. Razvijena je efikasna metoda tačno-tečne ekstrakcije za tri različita tipa matriksa hrane – visoko masnu hranu, nisko masnu hranu i bezmasnu hranu, što je potvrđeno kvantifikacijom ftalata u uzorcima hrane pomoću GC-MS tehnike.

Druga faza. Izvršen je razvoj i optimizacija metoda za određivanje koncentracije ftalata u uzorcima PVC plastičnih artikala (PCM-a i igračaka) korišćenjem GC-MS i FTIR tehnike. Razvijena je nova metoda kvantifikacije ftalata u plastičnim artiklima pomoću FTIR tehnike.

Treća faza. Izvršeno je ispitivanje stepena migracije ftalata iz FCM-a, PCM-a i PVC igračaka u različite recipijente (*n*-heksan kao model recipijent, mlečne proizvode, veštačku pljuvačku). Izvršeno je i analiziranje različitih faktora uticaja na migraciju ftalata iz plastičnih artikala, uticaj temperature, ultrazvuka, i procenta masnoće mleka i mlečnih proizvoda. Takođe, izvršena je i analiza migracije ftalata iz PVC igračaka u veštačku pljuvačku, kao i uticaj UV-A i UV-C svetlosti na promenu u strukturi PVC igračaka, nakon čega je ispitana dalja migracija ftalata iz ozračenih PVC igračaka u model recipijent i veštačku pljuvačku.

Realizacijom programa doktorske disertacije kroz navedene faze izvršena je ekstrakcija ftalata optimizovanim metodama, njihova detekcija i kvantifikacija u različitim matriksima hrane, alkoholnim pićima i plastičnim artiklima GC-MS i FTIR tehnikom i određen je stepen migracije ftalata pod odgovarajućim uslovima iz plastičnih artikala u uzorke mleka, mlečnih proizvoda i veštačku pljuvačku.



Slika 5. Šematski prikaz programa eksperimentalnog rada

6.1. Hemikalije korišćene u eksperimentalnom radu

U radu su korišćeni standardi dimetil ftalata (DMP), di-*n*-butil ftalata (DnBP), benzilbutil ftalata (BBP), di(2-etilheksil)ftalata (DEHP), di-*n*-oktil ftalata (DnOP), 99,7% čistoće, proizvođača Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dibutiladipat (DBA) proizvođača Fluka (Buchs, Switzerland) je korišćen kao interni standard.

Rastvarači HPLC čistoće korišćeni pri eksperimentalnom radu su sledeći: *n*-heksan, aceton, acetonitril, etanol, etil-acetat proizvođača Carlo Erba (France), tetrahidrofuran proizvođača Zdravlje (Srbija), metanol, izopropil alkohol proizvođača Baker (Netherlands), dihlormetan, hloroform, dihloretan, cikloheksan, trihloretan proizvođača Fisher Chemical (USA), *t*-butilmetil etar proizvođača Carl Roth (Germany). U Tabeli 7. su navedene vrednosti gustine i tačaka ključanja rastvarača korišćenih pri ekstrakciji ftalata iz odgovarajućih uzoraka.

Tabela 7. Fizičke osobine rastvarača

Tip ekstrakcionog sredstva	Gustina (g mL ⁻¹)	Tačka ključanja (°C)
<i>n</i> -Heksan	0,659	69
Dihlormetan	1,330	41
Cikloheksan	0,779	81
Etil-acetat	0,902	77
Hloroform	1,490	61
<i>t</i> -Butilmetil etar	0,740	55

Od hemikalija p.a. čistoće korišćeni su: NaCl (Zdravlje, Srbija), etanol (96 v/v%) (Reahem, Srbija), vinska kiselina (99,8%) (Sigma-aldrich, Germany), NaOH (Sineks laboratorija, Srbija), HCl (Sigma–Aldrich, USA).

6.2. Instrumentacija i parametri rada na instrumentima

Gasno hromatografska analiza uzoraka hrane (mlečnih proizvoda) i uzoraka alkoholnih pića (rakije) izvršena je na gasnom hromatografu 6890 (Hewlett–Packard, USA) povezanim sa masenim detektorom (MSD) 5973 (Hewlett–Packard, USA) i autosemplerom 7683 (Agilent, USA). Kolona korišćena za ove analize je DB-5 MS kapilarna kolona (30 m × 250 mm × 0,25 mm). Korišćena je elektronska jonizacija (voltaže 70 eV), dok je gasni hromatograf radio u *split less* modu injektiranja. Temperaturni program je bio sledeći: početna temperatura 60 °C (1 min) do 220 °C (1 min) sa brzinom rasta temperature od

20 °C min⁻¹ i nakon toga do 280 °C (4 min) sa brzinom rasta temperature od 5 °C min⁻¹. Ukupno vreme snimanja je 26 min. MSD je radio u režimu praćenja jednog jona (SIM). Identifikacija i kvantifikacija ftalata zasnivala se na relativnom retencionom vremenu, prisustvu target jona i njihovim relativnim intenzitetima. Target jon za DnBP, BBP i DEHP je m/z 149 dok je za DMP m/z 163. Target jon za DBA je m/z 185. Pomoću softvera *Agilent MSD ChemStation® D.02.00.275* je izvršeno prikupljanja i obrada podataka.

Gasno hromatografska analiza uzoraka alkoholnih pića (sintetičko vino), plastičnih artikala, kao i analiza migracije ftalata iz plastike u različite matrikse, je izvršena na gore navedenom gasnom hromatografu, s tim što je korišćena druga kolona i drugačiji temperaturni režim. Kolona korišćena u ovoj analizi je SGE 25QC2/BPX5 0,25 kapilarna nepolarna kolona (25 m × 0,22 mm × 0,25 µm). Temperaturni program je bio sledeći: početna temperatura 90 °C (0 min) do 280 °C (4 min) sa brzinom rasta temperature od 20 °C min⁻¹, uz opciju *post run* na 300 °C (2 min). Ukupno vreme snimanja je 15,5 min.

U analizi plastičnih materijala, u cilju dobijanja FTIR spektara, korišćen je infracrveni spektrofotometar sa *Fourier*-ovom transformacijom (BOMEM Hartman & Braun – Michelson MB series 100).

U analizama su korišćeni i sledeći aparati:

- Centrifuga Jouan C4I Benchtop (Termo Fisher) za odvajanje precipitata od alikvota;
- Amalgamator (Wig-L-Bug) za miksanje praha KBr i PVC precipitata dobijenih u analizi plastičnih materijala;
- Ručna hidraulična presa (Graseby Specac), u cilju dobijanja KBr tableta za snimanje na FTIR instrumentu;
- Analitička vaga Kern (CA) za merenje sa tačnošću ±0,00001 g;
- Vortex Genie (Scientific Industries, USA);
- UV fotoeraktor (Philips, Holandija);
- UV komora.

6.3. Mere predostrožnosti i smanjenje kontaminacije uzoraka ftalatima

Da bi se izbegla kontaminacija uzoraka ftalatima, najpre su svi reagensi i voda ispitani na prisustvo ftalata. Takođe, laboratorijsko posuđe korišćeno u radu je bilo isključivo stakleno, isprano vodom i deterdžentom za posuđe, potom destilovanom vodom, zatim smešom acetona i *n*-heksana, nakon čega je sušeno na 200 °C u sušnici (FANKHAUSER-NOTI *et al.*, 2007).

6.4. Priprema standardnih rastvora korišćenih pri određivanju ftalata GC-MS tehnikom

U svrhu određivanja linearnosti najpre je izvršena kalibracija GC-MS instrumenta crtanjem kalibracione prave sa najmanje pet tačaka – pet standardnih rastvora čija se koncentracija kretala u opsegu od 80 do 120% od očekivane koncentracije ftalata u uzorcima.

Početni, intermedijerni, radni i standardni rastvori ispitivanih ftalata (DMP-a, DnBP-a, BBP-a, DEHP-a, DnOP-a) su pripremljeni u *n*-heksanu. Postupak pripreme standardnih rastvora je sledeći:

- Najpre su napravljene pojedinačni početni rastvori svakog ftalata većih koncentracija, koji su razblaženi u cilju dobijanja intermedijernog rastvora u kom je koncentracija svakog ftalata ponaosob 100 µg mL⁻¹;
- Višestrukim razblaživanjem intermedijernog rastvora dobijen je radni rastvor u kom je koncentracija svakog ftalata ponaosob 1,00 µg mL⁻¹;
- Rastvori su čuvani na 4 °C. Početni rastvori su stabilni jedan mesec, radni rastvori su stabilni 10 dana;
- Standardni rastvori koncentracije 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 i 2,50 µg mL⁻¹ su dobijeni odgovarajućim razblaženjem intermedijernog rastvora i dodavanjem DBA kao internog standarda u koncentraciji od 1 µg mL⁻¹;
- Svaki standardni rastvor je korišćenjem GC-MS tehnike snimljen tri puta, kako bi se obezbedila preciznost.

6.5. Priprema standardnih rastvora korišćenih za određivanje ftalata FTIR tehnikom

U svrhu kalibracije FTIR instrumenta pripremljeni su standardni rastvori DEHP-a čija se koncentracija kreće u opsegu od 80 do 120% od očekivane koncentracije DEHP-a u plastičnim artiklima. Priprema kalibracionih standarda za FTIR analizu podrazumeva spajkovanje DEHP-om PVC-artikla iz koga su prethodnom metodom rastvaranja/precipitacije uklonjeni svi prisutni ftalati. Odmereni precipitat koji ne sadrži ftalate (0,01 g) je rastvoren u THF-u i spajkovano sa DEHP-om tako da svaki spajkovani precipitat sadrži 0 mas%, 5 mas%, 10 mas%, 20 mas%, 30 mas%, 40 mas% i 50 mas% DEHP-a. Na ovaj način pripremljeni kalibracioni rastvori u THF-u su stavljeni u evaporacione sudove, kako bi se nakon sušenja i uparavanja THF-a dobili kalibracioni standardi u vidu polimernih diskova za snimanje korišćenjem FTIR tehnike.

6.6. Uzorci hrane

6.6.1. Uzorci mleka i mlečnih proizvoda za optimizaciju i validaciju tečno-tečne ekstrakcije ftalata

U cilju optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka mlečne hrane, pripremljeni su sledeći uzorci mlečnih proizvoda: sirovo kravlje mleko, komercijalno pasterizovano kravlje mleko, surutka, humano mleko i jogurt.

- Uzorci kravljeg mleka su nabavljeni na farmi krava na jugu Srbije. Kontakt mleka sa plastičnim materijalom je izbegnut korišćenjem staklene ambalaže. Mleko je ispitivano kao sirovo, neobrađeno i nepasterizovano.
- U istoj mlekari u kojoj je nabavljeno sveže kravlje mleko, nabavljena je surutka, koja je nus-produkt u procesu proizvodnje sira.
- Uzorci humanog mleka su nabavljeni od žene starosti 35 godina, pet nedelja nakon porođaja. Ispumpavanje mleka je izvršeno ručno direktno u staklenu posudu koja je namenjena za tu svrhu, sa prethodnim ispiranjem grudi i ruku.
- Uzorci komercijalnog kravljeg mleka nabavljeni su u mlekari na tržištu Srbije i korišćeni su bez dodatne prerade. Radi se o pasterizovanom mleku flaširanom u plastičnu bocu (PET ambalaža). Mleko je korišćeno u roku trajanja (10 dana nakon pakovanja).

- Navedeno komercijalno kravlje mleko je zamrznuto u originalnom pakovanju u trajanju od 24 h, nakon čega je odmrznuto, i mleko dobijeno nakon odmrzavanja je korišćeno u daljoj analizi kao nova vrsta mleka, da bi se u cilju optimizacije ekstrakcije uzeo u obzir i efekat zamrzavanja uzoraka.
- Jogurt od kravljeg mleka pakovan u plastičnu bocu (PET ambalaža), nabavljen je u marketu na tržištu Srbije.

Uzorci sirovog mleka, surutke i humanog mleka su čuvani u staklenoj flaši, dok su uzorci jogurta i komercijalnog mleka čuvani u originalnom pakovanju, u frižideru na 4 °C.

6.6.2. Uzorci alkoholnih pića za optimizaciju tečno-tečne ekstrakcije ftalate

U ovom radu izvršena je analiza rakija, koje spadaju u grupu žestokih pića i predstavljaju destilovane napitke koji sadrže etanol u visokom procentu, i sintetičkog vina.

6.6.2.1. Uzorci belih rakija

U cilju optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka rakije korišćeni su sledeći uzorci belih rakija:

- Bela rakija od jabuke nabavljena je u domaćoj vinariji na teritoriji Srbije i korišćena je bez prethodne obrade. Ova rakija je nabavljena u staklenoj ambalaži i čuvana u originalnom pakovanju pre analiziranja. Sadržaj etanola u rakiji od jabuke iznosi 46 v/v%.
- Votka je kupljena u marketu na teritoriji Srbije. Ovo belo žestoko alkoholno piće je nabavljeno u staklenoj ambalaži i kao takvo je čuvano u originalnom pakovanju bez dodatne obrade pre analize. Sadržaj etanola u votki iznosi 40 v/v%.

6.6.2.2. Uzorci sintetičkog vina

U cilju optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka vina korišćeno je sintetičko vino pripremljeno po instrukciji navedenoj u literaturi (DUCA *et al.*, 2012). Sintetičko vino (1 L) je 15 v/v% rastvor 96 v/v% etanola i 6 g vinske kiseline (99,8%), pri čemu je pH vrednost vina podešena na 3,5 pomoću 5 mol L⁻¹ NaOH.

6.7. Uzorci plastičnih artikala u cilju određivanja sadržaja ftalata

6.7.1. Artikli PCM-a za optimizaciju metode određivanja ftalata FTIR tehnikom

U cilju određivanja ftalata u plastičnoj ambalaži FTIR tehnikom korišćeni su artikli koji se koriste u medicinske svrhe (PCM artikli). PVC PCM artikali koji su analizirani u radu, a koji se koriste prilikom procesa infuzije, peritonealne dijalize i transfuzije su:

- cevi za infuziju (*engl.* Infusion Tubing),
- dijalizna kesa (*engl.* Dialysis bag) sa odgovarajućim cevima za dijalizu (*engl.* Dialysis Tubing),
- set za transfuziju koji se sastoji od različitih kesa – kesa za prenos krvi (*engl.* Transfer bag), kvadrupolna kesa (*engl.* Quadrupole blood bag), kesa za prijem krvi (*engl.* Sag-M blood collection bag) sa odgovarajućim cevima za transfuziju (*engl.* Transfusion Tubing).

Ovi plastični artikli koji dolaze u kontakt sa farmaceutskim proizvodima i time dolaze u kontakt i sa obolelim osobama koje koriste odgovarajući tretman, su nabavljeni u Kliničkom centru Niš (Srbija).

6.7.2. Artikli PCM-a i plastične igračke za određivanje ftalata GC-MS tehnikom

U cilju određivanja ftalata u plastičnim artiklima GC-MS tehnikom korišćeni su sledeći PVC artikli: artikli koji se koriste u medicinske svrhe (PCM) (navedeni u poglavlju 6.7.1.) i PVC igračke.

Analiziranih 19 igračaka je nabavljeno u marketu u Nišu (Srbija) bez jasno naznačne deklaracije o sastavu. U pitanju su igračke namenjene najmlađoj populaciji – bebama, koje te igračke mogu stavljati u usta. Na Slikama 6a i 6b. su prikazane ispitivane igračke, numerisane od 1-19, pri čemu će se data numeracija koristiti u daljem radu.



Igračka 1.



Igračka 2.



Igračka 3.



Igračka 4.



Igračka 5.



Igračka 6.



Igračka 7.



Igračka 8.



Igračka 9.



Igračka 10.



Igračka 11.



Igračka 12.

Slika 6a. Ispitivane PVC igračke



Igračka 13.



Igračka 14.



Igračka 15.



Igračka 16.



Igračka 17.



Igračka 18.



Igračka 19.

Slika 6b. Ispitivane PVC igračke

6.8. Uzorci plastičnih artikala u cilju praćenja migracije ftalata

6.8.1. Artikli FCM-a i PCM-a u cilju praćenja migracije ftalata u model recipijent

Za ispitivanje migracije ftalata iz plastičnih materijala koji dolaze u kontakt sa hranom i farmaceutskim proizvodima korišćeno je 44 različitih plastičnih artikala. Plastični artikli koji dolaze u kontakt sa hranom (FCM) mogu se podeliti u dve grupe: artikli koji služe za pakovanje hrane – FP (*engl.* Food Packaging) i artikli koji služe za pripremu hrane – FHE (*engl.* Food Handling Equipment). FCM (35 artikala) različitih proizvođača je nabavljeno u marketima na teritoriji Srbije. PCM su nabavljeni u Kliničkom centru Niš (Srbija) (poglavlje 6.7.1.). Svih 44 artikala korišćenih u ovoj analizi, njihov broj, kao i vrsta polimera od kog su napravljeni, su navedeni u Tabeli 8.

Tabela 8. Opis 44 plastičnih artikala korišćenih u analizi migracije ftalata

Tip polimera	Namena artikla	Ime artikla	Broj analiziranih različitih komercijalnih plastičnih artikala
PVC	Peritonealna dijaliza	Kesa za dijalizu, cevi za dijalizu	2
	Transfuzija	Kesa za prenos krvi, kvadrupolna kesa, kesa za prijem krvi, cevi za transfuziju	4
	Infuzija	Cevi za infuziju	1
PET	Artikli za pakovanje hrane	Flaša za mleko, flaša za jogurt, flaša za mineralnu vodu,	15
	Artikli za pripremu hrane	Plastična kutija za hranu za jednokratnu upotrebu	
PP	Artikli za pakovanje hrane	Kesa za mleko, čaša za jogurt, čaša za kiselo mleko	12
	Artikli za pripremu hrane	Daska za sečenje hrane, kesa za zamrzivač	
PS	Artikli za pripremu hrane	Tanjir za jednokratnu upotrebu, kutija za jaja	2
PC	Artikli za pripremu hrane	Kesa za pakovanje	1
Celofan	Artikli za pripremu hrane	Folija	1
HDPE	Artikli za pripremu hrane	Kesa za odlaganje, granulat	2
LDPE	Artikli za pripremu hrane	Kesa za odlaganje sa zipom, granulat	2
	Parenteralna infuzija	Boca za rastvor za parenteralnu infuziju	2

6.8.2. Uzorci hrane i plastični ambalažni materijal za ispitivanje uticaja faktora na migraciju ftalata iz plastičnog materijala u hranu

Za analiziranje uticaja temperature, ultrazvuka i sadržaja masti u hrani na migraciju DEHP-a iz plastične ambalaže u hranu, korišćeni su sledeći mlečni proizvodi: mleko u prahu, surutka u prahu, infant formula, koji su nabavljeni u marketu na tržištu Srbije. Izabrani su uzorci mleka sa različitim sadržajem masti. Nutritivne vrednosti ovih uzoraka mleka su date u Tabeli 9. Takođe, izvršeno je i ispitivanje migracije DEHP-a u vodu, koja je uzeta kao referentni recipijent koji je polaran i bez sadržaja masti.

Tabela 9. Nutritivne vrednosti infant formule, mleka u prahu i surutke u prahu

	Masti (%)	Laktoza (%)	Proteini (%)
Infant formula	22,8	39,0	10,1
Mleko u prahu	20,0	55,0	9,0
Surutka u prahu	2,0	61,0	11,0

Kao pouzdan izvor DEHP-a je korišćena dijalizna kesa (Baxter, USA) poznatog sadržaja DEHP-a. Ispitivana kesa sadrži 35,8% DEHP u odnosu na svoju masu (KOSTIC *et al.*, 2017).

6.8.3. Dečje igračke u cilju praćenja migracije ftalata u model recipijent i veštačku pljuvačku

U cilju praćenja migracije ftalata iz plastičnih dečjih igračaka u model recipijent (*n*-heksan) i veštačku pljuvačku korišćene su dve vrste dečjih igračaka sa poznatim sadržajem DEHP-a, koji je određen GC-MS tehnikom. Za ispitivanje migracije korišćene su Igračka 8 i Igračka 12, navedene u poglavlju 6.7.2.

Veštačka pljuvačka je pripremljena po standardnoj proceduri Evropske komisije (EC, 2015). U 1 L destilovane vode rastvorene su navedene količine soli u Tabeli 10., pH vrednost je podešena na 6,8 pomoću hlorovodonične kiseline i na ovaj način pripremljena veštačka pljuvačka je čuvana u mraku.

Tabela 10. Soli korišćene u pripremi veštače pljuvačke

Jedinjenje	Molekulska formula soli	Količina soli u L rastvora (mmol)
Magnezijum-hlorid	MgCl ₂	0,82
Kalcijum-hlorid	CaCl ₂	1,00
Dikalijumhidrogen-fosfat	K ₂ HPO ₄	3,30
Kalijum-karbonat	K ₂ CO ₃	3,80
Natrijum-hlorid	NaCl	5,60
Kalijum-hlorid	KCl	10,00

6.8.4. Dečje igračke u cilju ispitivanja uticaja faktora na migraciju ftalata u veštačku pljuvačku

Radi praćenja uticaja UV-A i UV-C svetlosti na strukturu polimera od kog su napravljene dečje igračke, samim tim i na migraciju ftalata iz plastike, korišćene su takođe Igračka 8 i Igračka 12, navedene u poglavlju 6.7.2.

6.9. Određivanje ftalata u hrani

6.9.1. Razvoj i validacija metode određivanja ftalata u mlečnim proizvodima

Svi navedeni uzorci mleka i mlečnih proizvoda (poglavlje 6.6.1.) korišćeni su za razvoj optimalnog postupka tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz hrane. Ispitano je četrnaest različitih ekstrakcionih postupaka i u svakom su primenjivani različiti uslovi: vrsta ekstrakcionog sredstva, vreme ekstrakcije, način agitacije, izolovanje, odnos zapremine rasvarača prema zapremini uzorka. Parametri koji su posmatrani prilikom izbora optimalnog postupka ekstrakcije su: mogućnost odvajanja faza, vidljivost granice faza, bistrina ekstrakata, stvaranje emulzija, dostupnost reagenasa, trajanje ekstrakcije.

Rastvarači korišćeni kao ekstrakciona sredstva su: etil-acetat, *n*-heksan, cikloheksan, acetonitril, dihlometan, dihloretan i trihloretan. Zapreminski odnos ekstrakcionog sredstva prema uzorku mleka bio je 2:1, agitacija je izvršena u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 1 h i ručnim mućkanjem u trajanju od 1 h. Kao ekstrakciona sredstva korišćeni su i polarniji rastvarači u odnosu na prethodno navedenu grupu rastvarača: aceton, etanol, metanol i izopropil alkohol. Ovi rastvarači su pomešani sa uzorcima mleka u istom zapreminskom odnosu. Vrsta agitacije je mešanje u ultrazvučnoj kadi 1 h. Pored čistih

rastvarača, primenjivane su i smeše rastvarača: aceton/*n*-heksan u zapreminskom odnosu 1:1 i metanol/*n*-heksan sa zapreminskim odnosom 1:3. Efekat ispoljavanja je ispitan korišćenjem acetonitrila sa dodatkom NaCl do zasićenja. Kod ovih sistema je takođe odnos ekstrakcionog sredstva prema zapremini uzorka bio 2:1, dok je tip agitacije bio ručno mućkanje u trajanju od pola sata. Svi ekstrakcioni sistemi su ostavljeni preko noći, kako bi se razdvojili slojevi.

U cilju validacije metode kvantifikacije ftalata u uzorcima mleka, korišćeno je samo komercijalno mleko, koje je razblaženo vodom od 0 do 50 v/v%, pri čemu se na taj način uzima u obzir efekat matriksa (sadržaj masti u mleku). Da bi se utvrdila veza između sadržaja masti i efikasnosti metode ekstrakcije za svaki ftalat ponaosob, razblaženi uzorci komercijalnog mleka sa različitim nivoima razblaženja su spajkovani ftalatima koncentracije 3 i 6 $\mu\text{g L}^{-1}$.

6.9.2. Razvoj metoda određivanja ftalata u alkoholnim pićima

6.9.2.1. Bele rakije

Optimizacija metode tečno-tečne ekstrakcije (LLE) pet ftalata (DMP-a, DnBP-a, BBP-a, DEHP-a, DnOP-a) iz belih rakija (poglavlje 6.6.2.1.) izvršena je ispitivanjem različitih ekstrakcionih postupaka u kojima su se menjali sledeći uslovi: način agitacije, vreme trajanja ekstrakcije ftalata iz rakije, broj ponovljenih ekstrakcija, prisustvo etanola u uzorcima rakija. Parametri koji su praćeni prilikom izbora optimalnog postupka ekstrakcije su: odvajanje faza, vidljivost granice faza, dostupnost reagenasa.

Kao ekstrakciono sredstvo korišćen je *n*-heksan, pri čemu se uzimalo u obzir da ekstrakcija *n*-heksanom može biti manje efikasna s obzirom na dobru rastvorljivost ftalata u etanolu i delimičnu rastvorljivost *n*-heksana u etanolu. Radi ispitivanja efekta prisustva etanola na *Recovery* vrednost ekstrakcije ftalata iz rakije, izvršeno je uklanjanje etanola iz rakija uparavanjem rakije u zagrejanom vodenom kupatilu pre postupka ekstrakcije ftalata *n*-heksanom.

Uzorci belih rakija (10 mL) su spajkovani sa 25 μg svakog ispitivanog ftalata. U cilju što boljeg rastvaranja spajkovanih ftalata u rakiji, korišćena je ultrazvučna kada. Nakon rastvaranja ftalata u rakiji, analiza uzoraka rakije se odvijala u dva pravca – analiziranje rakije sa datim zapreminskim procentom etanola (10 mL) i analiziranje rakije sa uklonjenim sadržajem etanola (nakon uparavanja ostaje oko 5 mL rakije). Kao način agitacije u ekstrakcionim postupcima korišćeno je ručno mućkanje u trajanju od 5 minuta i agitacija

ultrazvučnim talasima u ultrazvučnoj kadi u trajanju od 10, 20 i 30 minuta. Na ovaj način je ispitan efekat uparavanja etanola iz uzoraka rakije, uticaj načina agitacije i uticaj vremena ekstrakcije na efikasnost ekstrakcije ftalata iz belih rakija *n*-heksanom.

Pored ispitivanja uticaja navedenih parametara, prilikom analiziranja uzoraka votke primenjen je i postupak ponovljene ekstrakcija u cilju optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka belih rakija. Nakon spajkovanja votke, dodavanja *n*-heksana i odgovarajuće agitacije, uklonjen je sloj *n*-heksana, a u uzorak votke je dodata nova količina *n*-heksana i izvršena je ponovna ekstrakcija. Ponovljanje ekstrakcije je izvršeno četiri puta. Nakon odvajanja i sakupljanja *n*-heksanskih slojeva, izvršeno je isušivanje *n*-heksanskog sloja obogaćenog ftalatima kroz filter papir sa anhidrovanim slojem natrijum-sulfata.

Kontaminacija uzoraka praćena je ispitivanjem slepih uzoraka – uzoraka rakije koji nisu spajkovani ftalatima i koji su tretirani na isti način kao i ostali uzorci.

Kvantifikacija ftalata u belim rakijama izvršena je GC-MS tehnikom. Svaka analiza je ponovljena tri puta i određivanje GC-MS tehnikom ponovljeno dva puta.

6.9.2.2. Sintetičko vino

U cilju optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina izvršeno je ispitivanje različitih ekstrakcionih postupaka. Uslovi koji su ispitivani u ekstrakcionim postupcima su sledeći: pH vrednost vina, procenat šećera u vinu, vrsta ekstrakcionog sredstva, tip agitacije.

Priprema uzorka sintetičkog vina je vršena na način opisan u poglavlju 6.6.2.2. Sintetičko vino (10 mL) spajkovano je ftalatima tako da koncentracija svih ftalata u uzorku vina bude $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ tako što je odmereno 50, 100 i 200 μL ftalata koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ispitivanje uslova ekstrakcionog postupka:

1) Tip agitacije

Ispitivana su dva tipa agitacije koja se primenjuju radi efikasnijeg postupka ekstrakcije ftalata iz vina: ručno mućkanje i ultrazvučni talasi u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 10 minuta, kao ikombinacija ručnog mućkanja i ultrazvučnih talasa u trajanju od 20 minuta, pri čemu je *n*-heksan primenjivan kao ekstrakciono sredstvo. Analiza je izvršena za tri nivoa spajka ($0,5$, $1,0$ i $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) pri pH vrednosti 3,42.

2) *pH vrednost*

Ekstrakcija ftalata iz 10 mL uzorka sintetičkog vina je vršena sa 5 mL *n*-heksana kao ekstrakcionim sredstvom, pri čemu je vršena promena pH vrednosti vina. pH vrednost vina je podešavana pomoću 5 mol L⁻¹ NaOH na sledeće vrednosti: 3,42, 4,74, 5,60. Kao tip agitacije korišćeno je ručno mućkanje i ultrazvučni talasi u ultrazvučnoj kadi, dok je vreme ekstrakcije 10 minuta.

3) *Ekstrakciono sredstvo*

U cilju optimizacije metode ekstrakcije vršen je izbor najefikasnijeg ekstrakcionog sredstva primenom različitih rastvarača u ovu svrhu: *n*-heksana, etilacetata, cikloheksana, *t*-butil-metiletra, hloroforma, dihlormetana. Nakon podešavanja pH vrednosti sintetičkog vina na 5,60 i spajkovanja, dodato je 5 mL ekstrakcionog sredstva. Na taj način ispitano je 6 različitih ekstrakcionih postupaka.

4) *Sadržaj šećera u vinu*

Ispitivan je uticaj procenta šećera u vinu na ekstrakciju ftalata iz vina, promenom sastava vina dodavanjem šećera tako da sadržaj šećera u vinu iznosi: 0, 30, 50, 100 i 150 g L⁻¹. Nakon dodavanja šećera, izvršena je ekstrakcija *n*-heksanom uz agitaciju ručnim mućkanjem i korišćenjem ultrazvučnih talasa.

5) *Procenat etanola u vinu*

Ispitivan je uticaj procenta alkohola u vinu na ekstrakciju ftalata iz vina, promenom sastava vina dodavanjem etanola tako da procentni sastav etanola u vinu iznosi 0, 6, 9, 12, 15, 18 i 21 v/v%. Kao ekstrakciono sredstvo je korišćen *n*-heksan, a analiza je izvršena za jedan nivo spajka – 0,5 µg mL⁻¹.

6) *Zapreminski odnos ekstrakcionog sredstva i uzorka*

Ispitivana su dva odnosa ekstrakcionog sredstva i uzorka – 1:2 i 1:1, tako što je spajkovano 10 mL uzorka kome je dodavavano 5 mL ekstrakcionog sredstva, i tako što je spajkovano 5 mL uzorka kome je dodavavano 5 mL ekstrakcionog sredstva.

7) *Reekstrakcija*

Uticaj reekstrakcije je ispitan tako što je ekstrakcija ftalata iz vina ponovljena tri puta sa 5 mL ekstrakcionog sredstva.

Nakon odgovarajuće pripreme uzoraka uz primenu svih navedenih uslova ekstrakcije, izvršena je analiza pripremljenih uzoraka GC-MS tehnikom. Priprema svakog uzorka ponovljena je tri puta, dok je snimanje pomoću GC-MS tehnike izvršeno dva puta.

6.10. Određivanje ftalata u plastičnom materijalu

6.10.1. Razvoj metode određivanja ftalata u PCM-u FTIR tehnikom

Navedeni PVC artikli u poglavlju 6.7.1. su izmereni (0,01 g) i rastvoreni u 4 mL THF-a. Rastvaranje plastike je ubrzano zagrevanjem uz pažnju da ne dođe do isparavanja i gubitka THF. Nakon što je plastika rastvorena u THF-u, THF rastvori plastike su stavljeni u evaporacione sudove, kako bi se nakon sušenja i isparavanja THF-a dobili odgovarajući polimerni diskovi za snimanje FTIR tehnikom. Analiza svakog artikla je obavljena tri puta.

U cilju dobijanja PVC precipitata koji ne sadrže ftalate, dodato je 10 mL *n*-heksana u THF rastvore (0,01 g plastičnog artikla rastvorenog u 4 mL THF-a). Nakon dodavanja *n*-heksana došlo je do reprecipitacije PVC artikala pri čemu su ftalati ostali rastvoreni u supernatantu iznad PVC precipitata. Pomoću centrifuge (3500 rpm) je izvršeno odvajanje slojeva, nakon čega je PVC precipitat sušen na 80°C. Osušeni PVC precipitat je pomešan sa KBr-om u amalgamatoru i pomoću hidraulične prese su dobijene tablete od polimera bez ftalata koje su dalje snimljene FTIR tehnikom. Analiza svakog artikla je obavljena tri puta.

Dodatno je izvršeno gravimetrijsko određivanje ftalata pomoću analitičke vage sa tačnošću od $\pm 0,00001$ g. Izmerena je masa PVC artikla pre rastvaranja u THF-u i masa dobijenih PVC precipitata nakon sušenja na 80°C (bez ftalata koji su ostali u supernatantu). Sadržaj ftalata je određen na osnovu razlike u masi između mase PVC artikla i mase dobijenog PVC precipitata nakon uklanjanja ftalata. Takođe je gravimetrijskom metodom određena i masa ftalata u supernatantu, tako što je osušen i uparen *n*-heksan-THF iz supernatanta, usled čega je dobijen polimerni film. Masa polimernog filma je jednaka masi ftalata u PVC artiklu.

Umesto *n*-heksana, kao sredstva za precipitaciju, korišćen je i metanol, kako bi se uporedila dva sredstva za precipitaciju plastičnog polimera.

6.10.2. Određivanje ftalata u PCM-u i igračkama GC-MS tehnikom

U cilju potvrde da se radi o PVC igračkama, 19 igračaka navedenih u poglavlju 6.7.2. rastvoreno je u THF-u. Rastvaranje igračaka je ubrzano korišćenjem ultrazvučne kade uz blago zagrevanje. Od 19 igračaka, 18 se rastvorilo u THF-u, dok je jedna igračka ostala nerastvorena, iz čega sledi da nerastvorena igračka nije napravljena od PVC-a. Preostalih 18 PVC igračaka, rastvorenih u THF-u, analizirano je na sadržaj ftalata GC-MS tehnikom.

Navedenih 7 PVC medicinskih artikala u poglavlju 6.7.1. i 18 PVC dečjih igračkaka je izmereno (0,01 g) i rastvoreno u 4 mL THF. U cilju precipitacije polimera, dodato je 10 mL *n*-heksana u THF rastvore svakog plastičnog artikla. Nakon centrifugiranja dobijenih mutnih rastvora na 3500 rpm i filtriranja supernatanta kroz 0,45 µm PTFE mikrofilter, otpipetirana je tačna zapremina *n*-heksan-THF rastvora svakog artikla (10 µl) i razlažena *n*-heksanom do 1 mL uz dodatak DBA kao internog standarda, nakon čega je izvršena analiza navedenih artikala GC-MS tehnikom.

U analizi PCM artikala precipitacija je takođe izvršena i metanolom, na isti način kao *n*-heksanom, nakon čega je izvršena kvantifikacija ftalata u metanol-THF rastvoru PCM artikala pomoću GC-MS tehnike.

6.11. Određivanje ftalata u veštačkoj pljuvački

U cilju praćenja migracije ftalata iz PVC igračkaka u veštačku pljuvačku, najpre je izvršena optimizacija metode određivanja koncentracije ftalata u veštačkoj pljuvački. Veštačka pljuvačka (5 mL) pripremljena po proceduri opisanoj u poglavlju 6.8.3. spajkovana je sa 5 analiziranih ftalata, tako da teorijska koncentracija ftalata u veštačkoj pljuvački iznosi 1, 2, 3, 4 i 6 µg mL⁻¹. Postavljeni uslovi i parametri LLE su sledeći: *n*-heksan kao ekstrakcionog sredstva i vreme ekstrakcije i način agitacije – 10 min ručno mućkanje, a potom 10 min agitacije u ultrazvučnoj kadi ultrazvučnim talasima.

Nakon primenjenog tipa agitacije i nakon bistrenja slojeva, otpipetiran je sloj *n*-heksana, i izvršeno je određivanje koncentracije ftalata pomoću GC-MS tehnike.

6.12. Praćenje migracije ftalata iz plastičnog materijala

6.12.1. Praćenje migracije ftalata iz PCM-a i FCM-a u model recipijent

Potencijal migracije ftalata je ispitivan iz 44 različitih plastičnih artikala koji su u kontaktu sa hranom ili farmaceutskim proizvodima, napravljenih od 7 različitih tipova plastike, navedenih u poglavlju 6.7.1. i 6.8.1. U cilju postizanja što većeg stepena migracije ftalata iz plastične ambalaže kao recipijent ftalata odabran je rastvarač *n*-heksan.

Svaki plastični artikal je isečen na parčiće površine oko 0,5 cm² koji su potom izmereni na analitičkoj vagi sa tačnošću ± 0.00001 g. Masa svakog parčeta plastičnog artikla navedene površine je iznosila oko 0,02 g. Svakom parčetu plastičnog artikla u staklenoj viali je dodato 5 mL *n*-heksana, u cilju izluživanja ftalata iz ovih artikala u *n*-heksan kao

recipijent pod različitim uslovima. Uslovi koji su postavljeni su sledeći: ultrazvuk na sobnoj temperaturi, produženo vreme kontakta i mućkanje u odgovarajućem vremenskom intervalu.

Migracija ftalata je praćena u različitim vremenskim periodima: 6, 15 i 30 dana. Nakon ovih vremenskih perioda, u 900 μ l *n*-heksanskog rastvora obogaćenog ftalatima dodat je DBA kao interni standard. Kvantitativno određivanje ftalata se izvršilo korišćenjem GC-MS tehnike. U cilju dobijanja pouzdanih rezultata sa određenom standardnom devijacijom, analiza svakog artikla je izvršena tri puta.

6.12.2. Praćenje uticaja faktora na migraciju ftalata iz plastičnog artikla u mlečne proizvode

Priprema uzoraka mleka je izvršena po instrukciji proizvođača: u 1 L vode je rastvoreno mleko u prahu (45 g), surutka u prahu (65 g) i infant formula (45 g). Nakon odabira pouzdanog izvora DEHP-a (poglavlje 6.8.2.), dijalizna kesha je isećena na parćice velićine oko 1 cm². Svakom uzorku dijalizne keshe površine 1 cm² dodato je 35 mL navednih uzoraka mleka. Na ovaj naćin je odnos mase plastićne ambalaže prema zapremini uzorka mleka isti kao odnos mase cele dijalizne keshe prema zapremini celokupne tećnosti sadržane u keshi.

Nakon pripreme uzoraka mleka kao recipijenata i plastićnog amabalažnog materijala kao izvora DEHP-a, postavljeni su uslovi za migracione testove. Analiziran je:

- 1) uticaj vremena izlaganja uzorka plastićnoj ambalaži na odrećenoj temperaturi izlaganjem pripremljenog uzorka sa plastićnom ambalažom temperaturi od 60°C 60 minuta, sa krajnjim ukupnim vremenom izlaganja od 60 h i
- 2) uticaj vremena izlaganja uzorka plastićnoj ambalaži pod dejstvom ultrazvuka kao dodatnog efekta već postavljenog migracionog testa na temperaturi od 60°C.

Uticaj temperature na migraciju DEHP-a je izvršen na sledeći naćin: uzorci mleka sa plastićnom ambalažom su mešani na magnetnoj mešalici i zagrevani do temperature od 60°C. Nakon 60 min zagrevanja, uzorci su hlaćeni na sobnoj temperaturi, nakon ćega su filtrirani. U filtrirane uzorke je dodavano 20 mL *n*-heksana kao pogodnog ekstrakcionog sredstva. Nakon ekstrakcije ftalata iz uzorka uz rućno mućkenje u trajanju od 15 minuta i dodatnu agitaciju u ultrazvućnoj kadi u trajanju od 30 min, ekstrakti su ostavljeni da se izbistre. *n*-Heksanski ekstrakt je koncentrovan do zapremine od 1 mL, nakon ćega je dodat interni standard DBA tako da njegova koncentracija u uzorku iznosi 1 μ g mL⁻¹. Tako pripremljen uzorak je sniman GC-MS tehnikom. Komadi plastićne ambalaže koji su bili izloćeni dejstvu temperature i uzocima mleka, su podvrgnuti ponovnim migracionim

testovima, kako bi se obezbedilo ukupno vreme izlaganja uzoraka temperaturi od 60 h. Migracija je vršena do postizanja platoa na krivoj $m = f(t)$, gde je m masa migriranog DEHP-a i t vreme izlaganja.

Uticao ultrazvuka kao dodatnog efekta temperaturi na migraciju DEHP-a iz plastične ambalaže je izvršen na prethodno naveden način, s tom razlikom da je mešanje izvršeno u ultrazvučnom kupatilu pod uticajem ultrazvuka.

Ovom analizom je izvršeno i praćenje uticaja sadržaja masti u mlečnim proizvodima na migraciju ftalata iz plastične ambalaže u navedene mlečne proizvode.

Svaki migracioni test je izvršen tri puta na istom uzorku mleka, dok je kvantifikacija svakog uzoraka pomoću GC-MS tehnike izvršena dva puta. Kako bi se u obzir uzela kontaminacija uzoraka u laboratoriji, analizirani su blanko uzorci, uzorci mleka bez komada plastike koji tretirani na isti način kao uzorci mleka sa plastičnom ambalažom.

6.12.3. Praćenje migracije ftalata iz plastičnih igračaka u model recipijent i veštačku pljuvačku

Praćenje migracije ftalata iz Igračke 8 i Igračke 12 navedenih u poglavlju 6.7.2. je izvršeno postavljanjem migracionih testova. Kao recipijent ftalata odabran je n -heksan i veštačka pljuvačka, kako bi se uporedio maksimalni stepen migracije ftalata iz plastične ambalaže u n -heksan i realni scenario migracije ftalata u veštačku pljuvačku, jer su ispitivane igračke igračke koje deca mogu stavljati u usta.

1) Migracija ftalata iz PVC igračaka u model recipijent

Odabrane PVC igračke su isečene na parčiće površine oko 0,5 cm², pri čemu je masa svakog artikla za analizu iznosila oko 0,02 g, pri čemu je merenje vršeno sa tačnošću od $\pm 0,00001$ g. Svakom isečenom i izmerenom plastičnom artiklu je dodato 5 mL n -heksana nakon čega se vršio postupak praćenja migracije ftalata iz PVC igračaka u model recipijent n -heksan u trajanju od 6, 15 i 30 dana, tako što je nakon 6 dana otpipetirana zapremina recipijenta (250 μ L) i razblažena 4 puta n -heksanom, a onda je od tog rastvora otpipetirano 10 μ L, dodato 100 μ L DBA (10 μ g mL⁻¹) i 890 mL n -heksana. Tako pripremljen rastvor je analiziran GC-MS tehnikom. Analiza je ponovljena i nakon izvršenih migracionih testova u trajanju od 15 i 30 dana. U cilju dobijanja pouzdanih rezultata sa određenom standardnom devijacijom, analiza svakog artikla je izvršena tri puta.

2) Migracija ftalata iz PVC igračaka u veštačku pljuvačku

Odabrane PVC igračke su podvrgnute sledećim migracionim testovima:

- PVC igračka, površine oko 1 cm², prelivena je veštačkom pljuvačkom (5 mL). Izvršeno je energično mućkanje korišćenjem *Vortex Genie* u trajanju od 10 minuta. Zatim je isto parče PVC igračke preliveno novom zapreminom veštačke pljuvačke (5 mL), nakon čega je ponovljeno energično mućkanje korišćenjem *Vortex Genie* u trajanju od 10 minuta. Izvršeno je skupljanje 10 mL veštačke pljuvačke, koje je dalje podvrgnuto optimizovanoj LLE ekstrakciji sa *n*-heksanom po postupku opisanom u poglavlju 6.11. Ovaj test simulira realne uslove u kojima dete 20 minuta energično žvaće PVC igračku, pri čemu dolazi do potencijalne migracije ftalata iz PVC igračke u pljuvačku deteta, čime dete može biti izloženo dejstvu ftalata;
- PVC igračka, površine 0,5 cm², prelivena je sa 5 mL veštačke pljuvačke. Migracioni test se odvijao u okviru 5, 15 i 30 dana. Nakon 5, 10, odnosno 30 dana veštačka pljuvačka koja je potencijalno kontaminirana ftalatima je dalje bila podvrgnuta optimizovanoj LLE ekstrakciji sa *n*-heksanom. Ovaj test je eksperimentalan, s obzirom na to da ne simulira realne uslove pri kojima dolazi do migracije ftalata iz PVC igračkaka u pljuvačku, i postavljen je radi poređenja rezultata dobijenih nakon migracije ftalata.

6.12.4. Praćenje uticaja faktora na migraciju ftalata iz PVC igračkaka u model recipijent i veštačku pljuvačku

Dve igračke (Igračka 8 i Igračka 12), u kojima je određen sadržaj DEHP-a u prethodnom istraživanju, navedene u poglavlju 6.7.2., ozračene su UV-A svetlošću i UV-C svetlošću određeni vremenski interval, u cilju analize uticaja UV-A i UV-C svetlosti na promenu u strukturi polimera PVC artikala, a samim tim i na migraciju ftalata iz navedenih PVC artikala. Za zračenje UV-A svetlošću talasne dužine 365 nm korišćena je UV komora. Kao izvor UV-C zračenja korišćen je UV fotoeraktor sa živinim lampama niskog pritiska, snage 28 W, sa maksimumom zračenja na 254 nm, proizvođača Philips (Holandija), pri čemu su igračke postavljene na udaljenosti od 5 cm od navedenih lampi. Ispitivanjem UV-A zračenja se donekle oponaša sunčeva svetlost, dok se ispitivanjem UV-C zračenja postavlja eksperimentalni ogled u cilju poređenja uticaja ova dva zračenja na migraciju ftalata iz PVC igračkaka.

UV-A svetlošću su zračene PVC igračke u trajanju od 1, 2, 4, 6, 12, 24 h, dok su UV-C svetlošću zračene PVC igračke u trajanju od 1 i 2 h.

Da bi se odredio procenat migracije ftalata iz ozračenih igračkaka, pre migracionih testova je izvršena je kvantifikacija ftalata, odnosno kvantifikacija DEHP-a, u ozračenim PVC igračkama na način opisan u poglavlju 6.10.2.

Nakon odgovarajućeg zračenja UV-A i UV-C svetlošću postavljeni su migracioni testovi:

- Uslovi za migraciju ftalata iz ozračenih PVC igračkaka u model recipijent (*n*-heksan) su isti kao i za migraciju ftalata iz neozračenih igračkaka (poglavlje 6.12.3.);
- Migracija ftalata iz ozračenih PVC igračkaka u veštačku pljuvačku je takođe izvedena na isti način kao i migracija ftalata iz neozračenih igračkaka u veštačku pljuvačku (poglavlje 6.12.3.).

REZULTATI I DISKUSIJA

7. REZULTATI ODREĐIVANJA FTALATA U MLEČNIM PROIZVODIMA

7.1. Rezultati optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka hrane

Optimizacija ekstrakcionog postupka je izvršena ispitivanjem sledećih operativnih parametara:

- vrsta ekstrakcionog sredstva,
- odnos zapremine ekstrakcionog sredstva prema zapremini uzorka,
- vreme ekstrakcije,
- način agitacije,
- isoljavanje i
- vrsta mleka.

Izvršena je analiza 14 ekstrakcionih postupaka za ekstrakciju ftalata iz uzoraka mleka. Optimalno ekstrakciono sredstvo potrebno je da ima:

- visoku tačku ključanja i nizak pritisak pare u cilju smanjenja rizika od isparavanja,
- nerastvorljivost rastvarača u uzorcima mleka za prevenciju gubitka rastvarača,
- adekvatan odziv pri hormatografskoj analizi i
- visok koeficijent razdvajanja analita (visoku selektivnost).

Na osnovu navedenih kriterijuma i zbog činjenice da mleko formira stabilne emulzije sa većinom rastvarača, svi ispitivani ekstrakcioni postupci su okarakterisani izgledom ekstrakta i rafinata, bistrinom ekstrakata, mogućnošću dobrog definisanja fazne granice, dobrim faznim odvajanjem, mogućnošću stvaranja emulzija. Od ispitivanih ekstrakcionih sredstava, prikazanih u Tabeli 11 a. i 11 b., *n*-heksan se pokazao kao najbolje ekstrakciono sredstvo zbog činjenice da daje homogeni i bistri ekstrakt sa jasno definisanom granicom između faza i dobrim odvajanjem faza.

U cilju povećanja efikasnosti ekstrakcije vršena je agitacija uzoraka ekstrakcionim sredstvima: ručnim mućkanjem i mešanjem u ultrazvučnoj kadi pod uticajem ultrazvuka, kako se ne bi stvarale stabilne emulzije bez vidljive granice faza i bez mogućnosti odvajanja faza.

Analizirano je vreme ekstrakcije potrebno za postizanje stabilnog stanja sistema. Vreme ekstrakcije je varirano u opsegu od 10 do 60 minuta. Kao najpovoljnije vreme ekstrakcije odabrano je 15 min.

Tabela 11 a. Ispitivani ekstrakcioni postupci za ekstrakciju ftalata iz mlečnih proizvoda

Ekstrakciono sredstvo	Izgled		Granica faza	Odvajanje faza
	ekstrakta	rafinata		
Aceton:<i>n</i>-heksan				
1000 mL razblaženog mleka je izmešano sa 10 mL acetona i 10 mL <i>n</i> -heksana. Izvršeno je ručno mućkanje od 1 h za obogaćivanje ekstrakta. Nakon stajanja preko noći, uzeta je <i>n</i> -heksan/aceton faza koja je uparavana do suva i rastvorena u <i>n</i> -heksanu.	Heterogen, kremast	Žut, neproziran	Nije definisana	-
Acetonitril:NaCl				
1000 mL razblaženog mleka je izmešano sa 20 mL acetonitrila i 20 g NaCl. Izvršeno je ručno mućkanje od 1 h za obogaćivanje ekstrakta. Nakon stajanja preko noći, uzeta je faza acetonitrila koja je uparena do suva i rastvorena u <i>n</i> -heksanu.	Homogen, jasan	Precipitat	Dobro definisana	-
Metanol:<i>n</i>-hexane				
1000 mL razblaženog mleka je izmešano sa 5 mL metanola i 15 mL <i>n</i> -heksana. Izvršeno je ručno mućkanje od 1 h za obogaćivanje ekstrakta. Nakon stajanja preko noći, uzeta je faza metanol/ <i>n</i> -heksan koja je uparena do suva i rastvorena u <i>n</i> -heksanu.	Heterogen, neproziran	Voluminoz ni precipitat	Nije definisana	-

Tabela 11 b. Ispitivani ekstrakcioni postupci za ekstrakciju ftalata iz mlečnih proizvoda

Ekstrakciono sredstvo	Izgled		Granica faza	Odvajanje faza
	ekstrakta	rafinata		
Acetonitril				
500 mL razblaženog mleka je pomešano sa 20 mL acetonitrila. Agitacija: 1 h na ultrazvučnom kupatilu i 1 h ručnog mućkanja. Ekstrakt je podvrgnut novom uzorku (500 mL) radi obogaćivanja ekstrakta, sa konačnim odnosom ekstraktanta i rastvarača 1:50. Mikstura je ostavljena preko noći, a kombinovani ekstrakt je uparen do suva i ponovo rastvoren u <i>n</i> -heksanu.	Heterogen, žut	Voluminozni precipitat	Nije definisana	-
Etilacetat Ista procedura kao kod acetonitrila	Homogen, jasan	Sjedinjen, kremast	Dobro definisana	+
Cikloheksan Ista procedura kao kod acetonitrila	Homogen, jasan	Penast precipitat	Dobro definisana	+
<i>n</i>-Heksan Ista procedura kao kod acetonitrila	Homogen, jasan	Precipitat	Dobro definisana	+
Dihlormetan Ista procedura kao kod acetonitrila	Heterogen, neproziran	Precipitat	Dobro definisana	+
Trihloretan Ista procedura kao kod acetonitrila	Heterogen, neproziran	Precipitat	Dobro definisana	+
Dihloretan Ista procedura kao kod acetonitrila	Heterogen, neproziran	Precipitat	Dobro definisana	+
Ekstrakciona sredstva rastvorena u uzorcima mleka	Izgled ekstrakta i rafinata		Interfacijalna granica	Odvajanje faza
Metanol	Heterogen, koloidni		Nije definisana	-
Etanol	rastvor, voluminozan			-
Isopropil alkohol	precipitat			-
Aceton				-

Isoljavanje mešavine mleka i organskog rastvarača koji se meša sa vodom (u ovom slučaju acetonitril) izaziva bolje odvajanje rastvarača od uzorka mleka i stvaranje dvofaznog sistema. Na ovaj način nastaje jasno definisana granica faza, ali i adhezija mlečnih kapljica na zidovima posuđa, što čini ovu metodu nepogodnom.

Literaturni podaci navode da je najbolji odnos rastvarača prema uzorku na nivou 20:1 (PÉREZ-PALACIOS *et al.*, 2012). Da bi se utvrdila optimalna količina rastvarača neophodna za efikasnu ekstrakciju, na osnovu izgleda ekstrakta, granice faza i mogućnosti odvajanja faza, korišćeni su različiti odnosi zapremine rastvarača prema zapremini uzorka. Ustanovljeno je da je zbog razblaženja mleka zadovoljavajući odnos rastvarača prema zapremini uzorka 1:50, pri čemu se ekstrakt podvrgava višestepenom dodavanju novih zapremina uzorka. Na ovaj način dolazi do veće koncentracije analita i smanjenja potrošnje rastvarača.

Analiziranje uticaja vrste mleka je pokazalo da svi uočeni efekti kod komercijalnog mleka, važe i za preostalih pet analiziranih vrsta mleka i mlečnih proizvoda – sirovo kravlje mleko, surutka, jogurt, humano mleko i odmrznuto komercijalno mleko.

Rezultati dobijeni ispitivanjem 14 različitih ekstrakcionih postupaka pokazuju da je najefikasniji sledeći ekstrakcioni postupak: *n*-heksan kao ekstrakciono sredstvo, odnos zapremine rastvarača i zapremine uzorka 2:1, pri čemu se vrši obogaćivanje ekstrakta podvrgavanjem ekstrakta novoj zapremini rastvarača, radi dobijanja konačnog odnosa zapremine rastvarača prema zapremini uzorka 1:50, i vreme ekstrakcije od 15 do 30 minuta, uz ručno mućkanje kao način agitacije.

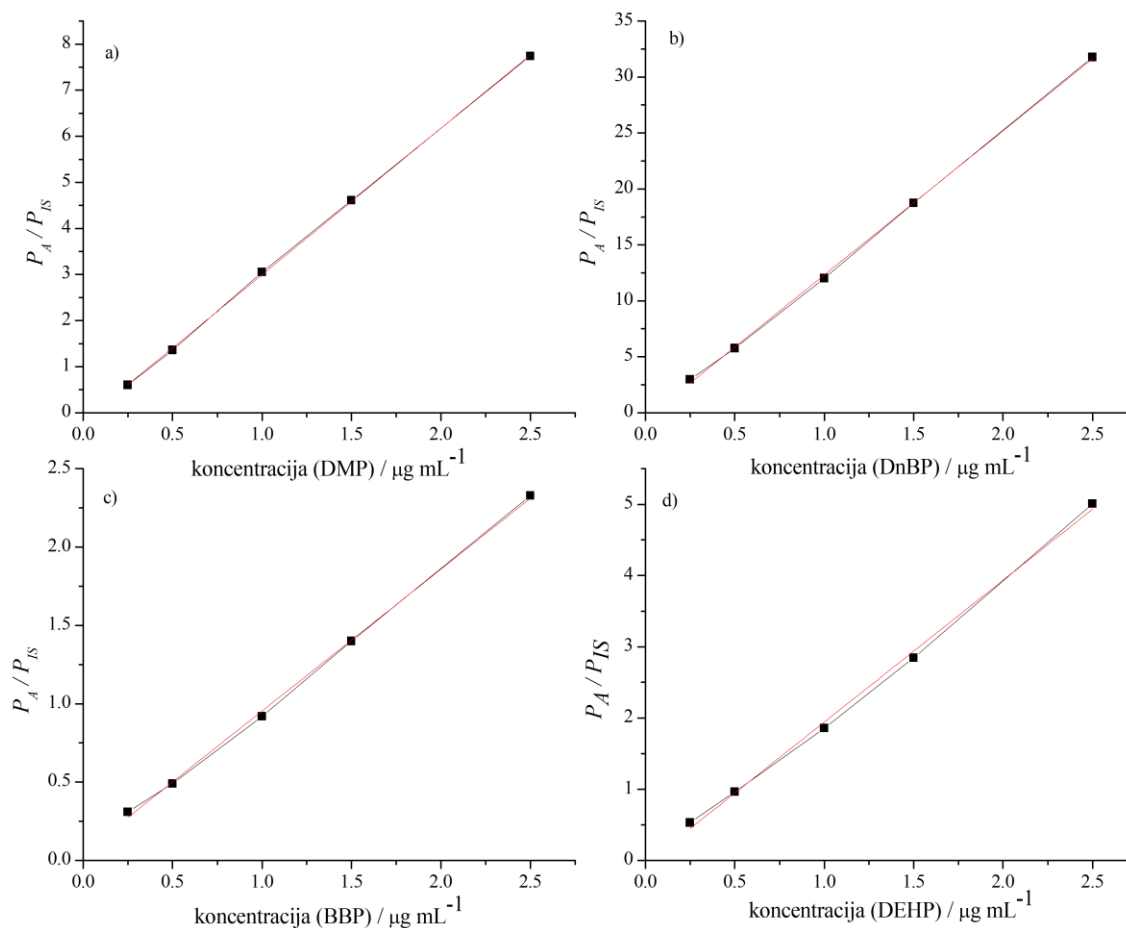
7.2. Validacija metode određivanja ftalata u mlečnim proizvodima

Nakon optimizacije tečno-tečne ekstrakcije i odabira pogodnih parametara za ekstrakciju ftalata iz uzoraka hrane (mleka i mlečnih proizvoda) izvršena je validacija metode određivanja ftalata u hrani. U svrhu validacije ove metode korišćeno je komercijalno mleko, razblaženo destilovanom vodom od 0 do 50 v/v%. Sukcesivno razblaživanje komercijalnog mleka je izvršeno zbog uticaja sadržaja masti u mleku na efikasnost ekstrakcije ftalata. Pod uticajem povišenog procenta masti u mleku može doći do smanjenja analitičke osetljivosti, preciznosti i odgovora hromatografskog sistema. Ispitani su sledeći parametri validacije: linearnost, selektivnost/specifičnost, preciznost, tačnost, osetljivost, granica detekcije i kvantifikacije.

7.2.1. Linearnost analitičke metode

Prema preporukama *European commission decision 2002/657/EC* u cilju validacije metode, ispitana je linearnost metode. Dobijene kalibracione prave instrumentalne metode su linearne u opsegu koncentracije ftalata od 0,25 do 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sa koeficijentima

korelacija većim od 0,990 za svaki ftalat i prikazane su na Slici 7. Linearni dinamički opseg je širi i obuhvata opseg koncentracije ftalata od 2,50 do 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. U Tabeli 12. se nalaze podaci vezani za kalibracione prave instrumentalne metode određivanja ftalata koji uključuju vrednosti isečka, nagiba i koeficijenta korelacije kalibracionih prava za DMP, DnBP, DEHP i BBP.

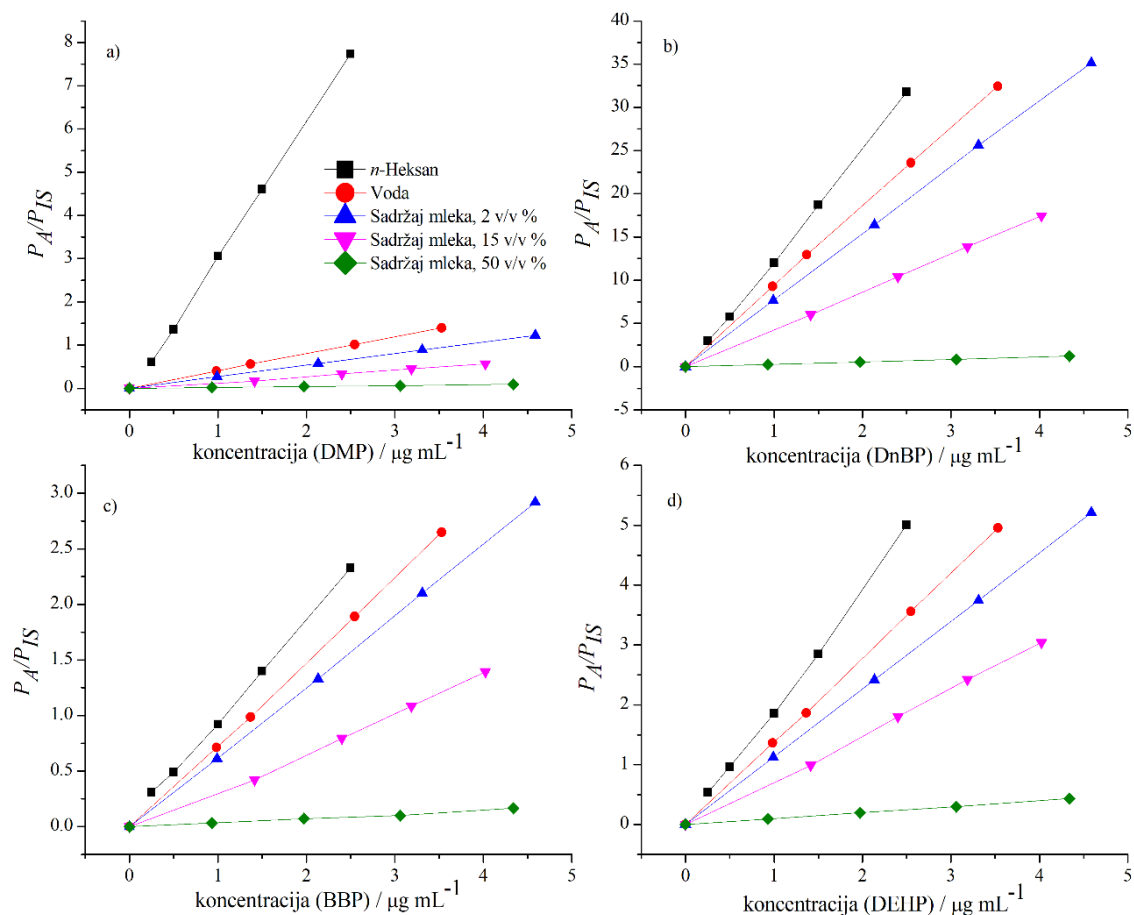


Slika 7. Kalibracione prave instrumentalne metode određivanja: a) DMP-a, b) DnBP-a, c) BBP-a, d) DEHP-a. P_A i P_{IS} predstavljaju površine hromatografskih pikova analita i internog standarda respektivno

Tabela 12. Vrednosti odsečka, nagiba i koeficijenta korelacije kalibracionih prava instrumentalnih metoda određivanja DMP-a, DnBP-a, DEHP-a i BBP-a

	Jednačina prave	Koeficijent korelacije (R^2)
DMP	$y = (3,180 \pm 0,026) x - (0,019 \pm 0,036)$	0,999
DnBP	$y = (12,883 \pm 0,152) x - (0,570 \pm 0,213)$	0,999
DEHP	$y = (1,992 \pm 0,055) x - (0,050 \pm 0,078)$	0,997
BBP	$y = (0,905 \pm 0,017)x + (0,048 \pm 0,024)$	0,999

Kalibracione prave matriksa dobijene su spajkovanjem razblaženih uzoraka mleka (0, 2, 15 i 50 v/v%) sa četiri ispitivana ftalata (DMP, DnBP, BBP, DEHP) u pet koncentracionih nivoa. Svaka serija je ponovljena šest puta. Dobijene kalibracione prave matriksa su prikazane na Slici 8. i linearne su u opsegu koncentracija ftalata od 0 do 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sa kalibracionim koeficijentima višim od 0,985 za svaki ftalat. U Tabeli 13. su navedene jednačine dobijenih prava i koeficijenti korelacije za svaki ftalat i nivo razblaženja mleka ponaosob.



Slika 8. Kalibracione prave matriksa za svaki ispitivani ftalat: a) DMP, b) DnBP, c) BBP and d) DEHP. P_A i P_{IS} predstavljaju površinu pika na hromatogramu koji potiču od analita i internog standarda

Tabela 13. Jednačine prave matriksa i koeficijenti korelacije za DMP, DnBP, DEHP i BBP

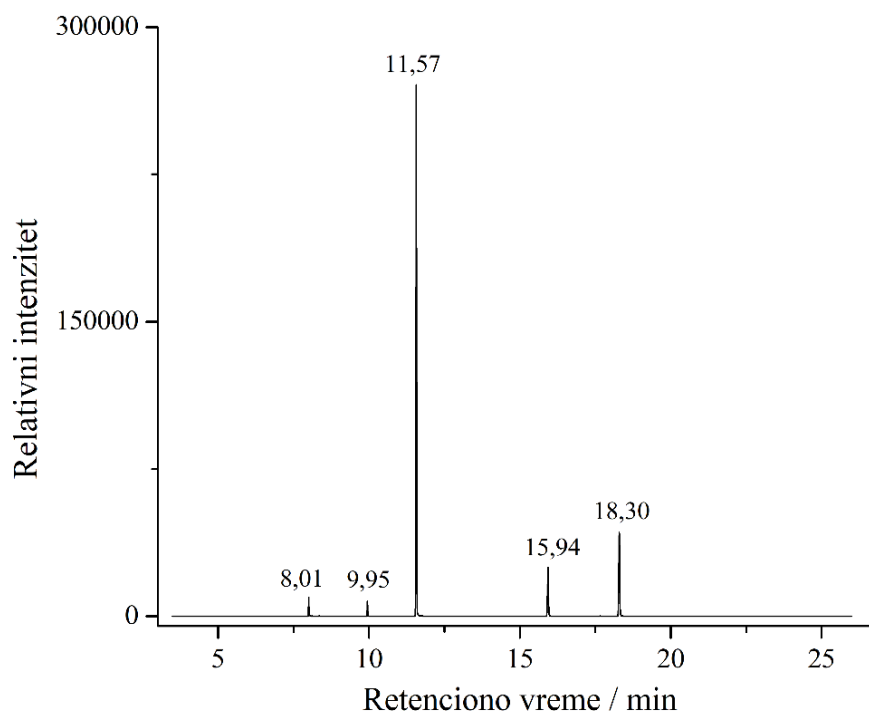
	Razblaženje mleka (v/v%)	Jednačina prave	Koeficijent korelacije (R ²)
DMP	0	$y = (0,396 \pm 0,003) x - (0,007 \pm 0,007)$	0,999
	2	$y = (0,267 \pm 0,001)x + (0,001 \pm 0,003)$	0,999
	15	$y = (0,142 \pm 0,005) x - (0,012 \pm 0,013)$	0,997
	50	$y = (0,021 \pm 0,001) x - (0,001 \pm 0,002)$	0,998
DnBP	0	$y = (9,176 \pm 0,065)x + (0,183 \pm 0,136)$	0,999
	2	$y = (7,676 \pm 0,034)x + (0,047 \pm 0,093)$	0,999
	15	$y = (4,350 \pm 0,023) x - (0,056 \pm 0,060)$	0,999
	50	$y = (0,282 \pm 0,006) x - (0,008 \pm 0,01)$	0,998
DEHP	0	$y = (1,407 \pm 0,009) x - (0,021 \pm 0,018)$	0,997
	2	$y = (1,136 \pm 0,003) x - (0,004 \pm 0,007)$	0,999
	15	$y = (0,764 \pm 0,014) x - (0,034 \pm 0,035)$	0,999
	50	$y = (0,099 \pm 0,001) x - (0,002 \pm 0,003)$	0,999
BBP	0	$y = (0,753 \pm 0,007)x - (0,021 \pm 0,016)$	0,999
	2	$y = (0,638 \pm 0,004)x - (0,015 \pm 0,011)$	0,999
	15	$y = (0,349 \pm 0,011) x - (0,031 \pm 0,028)$	0,998
	50	$y = (0,037 \pm 0,002)x - (0,003 \pm 0,006)$	0,994

7.2.2. Selektivnost/Specifičnost analitičke metode

Selektivnost metode je određena snimanjem standarda ftalata, internog standarda i uzoraka koji sadrže ftalate od interesa u režimu potpunog skeniranja (FS). Identifikacija ciljanih jedinjenja je zasnovana na prisustvu pika target i kvalifikacionih jona na određenom relativnom retencionom vremenu i njihovim intenzitetima. Selektivnost zahteva zadržavanje relativnih retencionih vremena za svaki ftalat u uzorku, za koje je u ovoj analizi utvrđeno da su u okviru odstupanja od 2,5% u poređenju sa standardima. Pored toga, praćen je i odnos intenziteta target i kvalifikacionih jona za svaki ftalat. Svi odnosi su bili u okviru preporučenih tolerancija u poređenju sa standardima kako to zahteva *European commission decision 2002/657/EC* iz čega proizilazi da je ispitivana metoda selektivna.

Specifičnost je pretežno funkcija merne tehnike, ali to varira u zavisnosti od klase jedinjenja koja se analiziraju kao i od matriksa, i predstavlja sposobnost metode da razlikuje

analit koji se određuje od ostalih supstanci prisutnih u uzorku. Specifičnost GC-MS metode je ispitivana za sve analizirane ftalate po instrukcijama *European commission decision 2002/657/EC*. Analiziran je čist rastvarač (*n*-heksan), standardni rastvor četiri ftalata u *n*-heksanu, standardni rastvor internog standarda (DBA), standardni rastvora četiri ftalata i DBA, blank uzorci i spajkovani uzorci sa ispitivanim ftalatima. Snimanje je izvršeno u dva režima rada: režim potpunog skeniranja (FS) i režim praćenja selektovanog jona (SIM). Na FS GC-MS hromatogramima nisu primećene nikakve smetnje (signali, pikovi, tragovi jona) u oblasti koji je od interesa, gde se pojavljuju ftalati i interni standard, iz čega proizilazi da je ispitivana metoda specifična. U SIM režimu rada je izvršena detekcija ftalata na osnovu vrednosti m/z i dobijen GC-MS hromatogram standardnog rastvora koji sadrži DMP, DnBP, BBP i DEHP u koncentraciji $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ i DBA u koncentraciji $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ je prikazan na Slici 9. Kao osnovni (target) pikovi ispitivanih ftalata odabrani su m/z 149 za DnBP, BBP i DEHP i m/z 163 za DMP za dalje istraživanje, dok je osnovni jon za DBA m/z 185. Pored ovih target jona karakteristični su i kvalifikacioni joni koji služe za dodatnu karakterizaciju GC-MS hromatograma. Vrednosti m/z target i kvalifikacionih jona i retenciona vremena ftalata su dati u Tabeli 14.



Slika 9. GC-MS hromatogram standardnog rastvora koji sadrži DMP, DnBP, BBP i DEHP u koncentraciji $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ i DBA u koncentraciji $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SIM režim rada)

Tabela 14. Target i kvalifikacioni joni sa retencionim vremenima za ispitivane ftalate

Ftalat	m/z^a	Retenciono vreme (min)	Početno vreme (min)
DMP	163 , 194	8,03	7,80
DnBP	149 , 150, 223, 205	11,57	11,20
BBP	149 , 91, 206, 238	16,02	15,50
DEHP	149 , 167, 279, 150	18,39	17,90
DBA	185 , 129, 111	9,95	9,70

^a Target joni su boldirani

7.2.3. Preciznost analitičke metode

Za određivanje repetabilnosti treba uraditi najmanje pet analiza. Repetabilnost je određena snimanjem spajkovanih uzoraka razblaženog mleka sa dve različite koncentracije svakog ftalata pet puta ($n=5$) u toku jednog dana u uslovima ponovljivosti.

Preciznost, izražena kao koeficijent varijacije, u uslovima ponovljivosti unutar jednog i više dana, data je u Tabeli 15 a. i 15 b. za sve ispitivane ftalate sa navedenim koncentracijama za četiri nivoa razblaženja mleka (0, 2, 15 i 50 v/v%). Izračunate vrednosti za repetabilnost se kreću od 1,54 do 4,73 za sve analizirane ftalate. Ove vrednosti su niže od predviđene vrednosti izračunate pomoću *Horwitz*-ove jednačine 4,793 za $3 \mu\text{g L}^{-1}$ i 4,320 za $6 \mu\text{g L}^{-1}$, kao što je predloženo od strane *European commission decision 2002/657/EC*, pa se smatra da je metoda prihvatljiva po pitanju preciznosti za određivanje četiri ftalata.

Tabela 15 a. Preciznost i tačnost metode određivanja ftalata u matriksima mleka

Analit	Razblaženje	Koncentracija	<i>Recovery</i> (%)	Repetabilnost (n=5)	
	mleka (v/v%)	ftalata ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
DMP	0	3	14,00	4,42	
		6	10,65	1,73	
	2	3	7,10	2,48	
		6	10,01	1,61	
	15	3	13,83	4,05	
		6	11,64	3,12	
	50	3	11,76	3,47	
		6	9,33	2,76	
	DnBP	0	3	75,00	3,28
			6	79,04	3,69
2		3	60,86	1,81	
		6	63,23	1,54	
15		3	34,04	4,73	
		6	43,87	2,29	
50		3	4,41	4,56	
		6	5,07	3,54	
BBP		0	3	125,00	3,70
			6	135,00	3,45
	2	3	92,34	1,54	
		6	84,80	1,60	
	15	3	46,81	4,34	
		6	66,19	1,79	
	50	3	8,66	4,29	
		6	9,33	3,86	

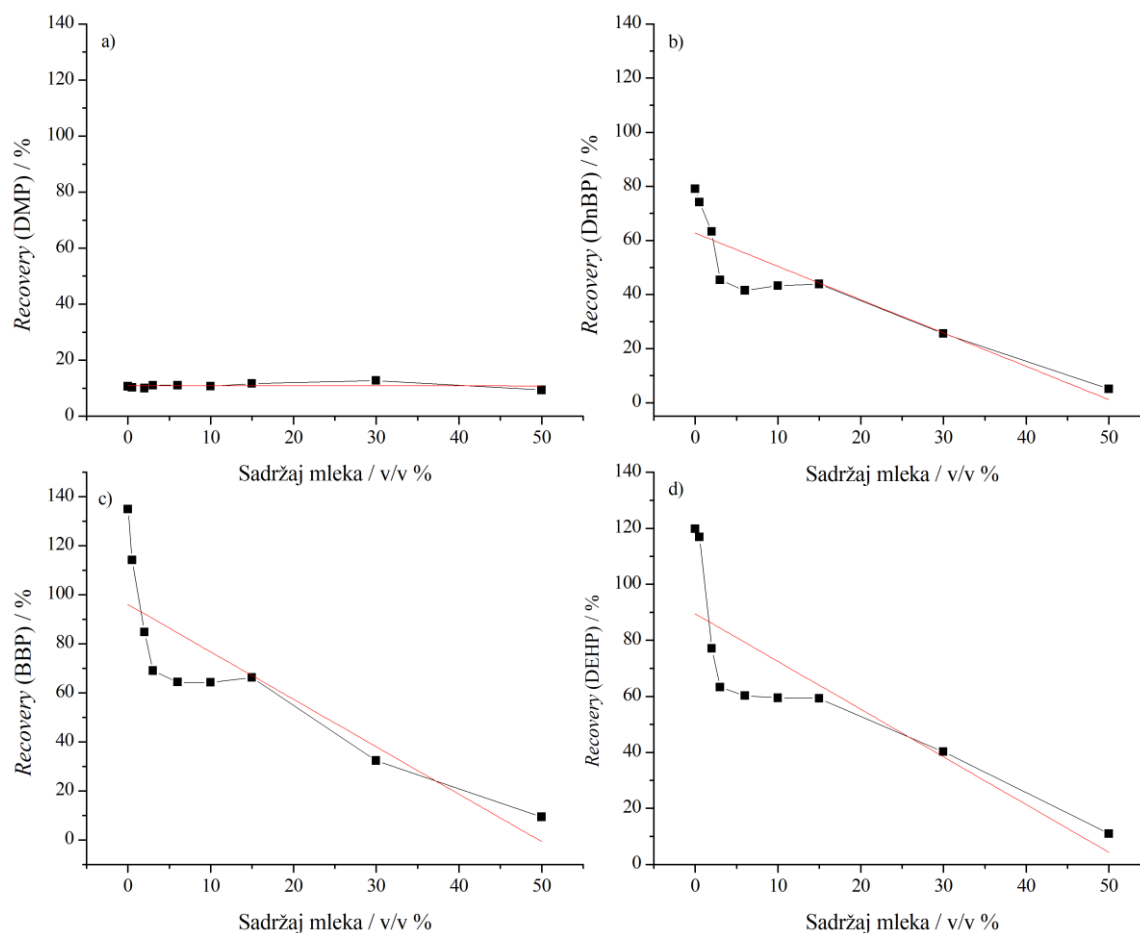
Tabela 15 b. Preciznost i tačnost metode određivanja ftalata u matriksima mleka

Analit	Razblaženje	Koncentracija	<i>Recovery</i> (%)	Repetabilnost (n=5)
	mleka (v/v%)	ftalata ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
DEHP	0	3	135,00	4,06
		6	119,84	3,78
	2	3	69,22	1,89
		6	77,11	2,01
	15	3	60,00	1,46
		6	59,28	2,28
	50	3	10,95	1,99
		6	10,94	1,58

7.2.4. Tačnost analitičke metode

Tačnost se najčešće izražava kao procenat prinosa analitičkog postupka (*Recovery*) za poznatu dodatnu količinu analita u uzorak. Za određivanje tačnosti treba koristiti najmanje tri različite koncentracije analita u uzorcima i analizu ponoviti tri puta.

Tačnost metode je ispitana spajkovanjem uzoraka razblaženog mleka (0, 0,5, 2, 3, 6, 10, 15, 30, 50 v/v%) sa tri različite koncentracije ftalata, pri čemu je svaka analiza povoljena pet puta. Dobijen je srednji prinos (iskorišćenje) ove metode izražen kao *Recovery* vrednosti. Na Slici 10. dat je grafički prikaz smanjenja *Recovery* vrednosti sa povećanjem procenta masnoće mleka za DnBP, BBP i DEHP, i konstantnost *Recovery* vrednosti za DMP, kada su uzorci razblaženog mleka spajkovani sa $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ svakog ftalata. U Tabeli 16. prikazane su *Recovery* vrednosti za metodu određivanja ftalata u razblaženim uzorcima mleka spajkovanih sa $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ svakog ftalata.



Slika 10. *Recovery* vrednosti (%) metode određivanja ftalata u razblaženim uzorcima mleka spajkovanih sa $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ svakog ftalata: a) DMP, b) DnBP, c) BBP and d) DEHP

Tabela 16. *Recovery* vrednosti metode određivanja ftalata u razblaženim uzorcima mleka spajkovanih sa $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ svakog ftalata: a) DMP, b) DnBP, c) BBP and d) DEHP

Sadržaj mleka (v/v%)	DMP	DnBP	BBP	DEHP
0	14,00	75,00	125,00	135,00
0,5	10,82	62,30	89,51	73,61
2	7,10	60,86	92,34	69,22
3	10,12	61,78	90,18	68,00
6	13,10	54,14	72,41	65,00
10	13,10	41,72	57,24	71,03
15	13,83	34,04	46,81	60,00
30	13,33	25,45	37,27	45,00
50	11,76	4,41	8,66	10,95

7.2.5. Osetljivost analitičke metode

Poređenjem vrednosti nagiba kalibracionih prava za četiri ispitivana ftalata (Slika 8., Tabela 13.) koje se odnose na standardne rastvore i različite matrikse (različiti nivoi razblaženja mleka) zaključuje se da je metoda određivanja ftalata u mlečnim proizvodima najosetljivija za DnBP, potom sledi DEHP i BBP, redom, dok je najmanje osetljiva za DMP. Vrednosti nagiba krive pokazuju da je odziv hromatografskog sistema najniži za uzorak mleka sa najvećim procentom masnoće, kao i za DMP kao ftalata koji je najrastvorljiviji u vodi. Ovo je i dovelo do razvoja strategije za eliminaciju efekta matriksa razblaživanjem uzoraka mleka, posebno kada se vrši određivanje hidrofobnijih ftalata. Na osnovu nagiba se dolazi i do podatka da će koncentracije ftalata analiziranih u uzorcima mleka biti uopšteno niže, što pokazuje negativan efekat matriksa na određivanje ftalata, čineći manje stabilan odziv hromatografskog sistema i nižu analitičku osetljivost.

7.2.6. Granica detekcije i kvantifikacije

Na osnovu navedenih formula u poglavlju 5.1.6. izračunate su vrednosti LOD i LOQ ispitivanih ftalata za datu metodu i dobijene vrednosti su date u Tabeli 17.

Tabela 17. LOD i LOQ za DMP, DnBP, BBP i DEHP

	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
DMP	0,04	0,12
DnBP	0,01	0,05
BBP	0,02	0,08
DEHP	0,04	0,12

7.3. Efikasnost ekstrakcije ftalata iz mlečnih proizvoda validovanom metodom

Nakon izbora najoptimalnijih parametara za ekstrakciju ftalata iz mlečnih proizvoda i izvršene validacije metode određivanja ftalata u mleku utvrđena je efikasnost ekstrakcije ftalata iz mleka. Svaki razblaženi uzorak komercijalnog mleka sa različitim nivoima razblaženja je spajkovan sa dve koncentracije ftalata, sa 3 i 6 $\mu\text{g L}^{-1}$, ponaosob, na osnovu čega je određivan stepen efikasnosti ekstrakcije predstavljen u vidu *Recovery* vrednosti.

Efikasnost ekstrakcije DnBP, BBP i DEHP raste sa procentom razblaženja mleka, kao što je i očekivano. Tako su dobijene *Recovery* vrednosti za veća razblaženja mleka veće za oko 60 – 80% u poređenju sa razblaženjem mleka od 50 v/v% (Slika 10., Tabela 16.). Niska *Recovery* vrednost (oko 10%) za uzorak sa 50% udela mleka je takođe očekivana, zbog hidrofobne prirode ftalata koji su rastvorljiviji u globulama mlečne masti što dalje uzrokuje manji prelaz ftalata iz mleka u nepolarni ekstrakt. *Recovery* vrednosti za ftalate u uzorcima vode (0 v/v% mleka) su očekivano najveći, kreću se u opsegu od 75 do 135%, što je u korelaciji sa prethodnim ispitivanjima komercijalnih uzoraka flaširane vode (MILOJKOVIC *et al.*, 2014; MILOJKOVIC *et al.*, 2014).

Ova metoda se pokazala kao neefikasnom za ekstrakciju DMP, što pokazuju niske *Recovery* vrednosti, koje su posledica toga što je DMP ftalat sa najmanjom molarnom masom, sa jednim ugljenikovim atomom u bočnom lancu ugljovodonika, sa najvećom rastvorljivošću u vodi od ostalih ispitivanih ftalata i sa najmanjom vrednošću koeficijenta ravnotežne raspodele ftalata između oktanela i vode (Tabela 1.). Kao takav, teži da ostane u polarnijoj sredini kao što je razblaženo mleko, u odnosu na nepolarni *n*-heksan.

Isti trend smanjenja *Recovery* vrednosti je primećen i za spajk sa nižom koncentracijom ftalata od 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 16.) i za spajk sa višom koncentracijom ftalata od 6 $\mu\text{g L}^{-1}$, kao što je prikazano na Slici 10.

8. REZULTATI ODREĐIVANJA FTALATA U ALKOHOLNIM PIĆIMA

8.1. Rezultati određivanja ftalata u belim alkoholnim pićima

8.1.1. Rezultati optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka belih alkoholnih pića

S obzirom na to da se ftalati dobro ratvaraju u *n*-heksanu, kao sredstvo za ekstrakciju ftalata iz alkoholnih pića se obično koristi upravo ovaj organski rastvarač. Iako se *n*-heksan meša sa etanolom prisutnim u rakiji, odvajanje slojeva alkohola i *n*-heksana i migracija ftalata iz rakije u *n*-heksan se izvršila usled prisustva vode u rakiji. Sa aspekta razdvajanja dva sloja (alkoholnog i *n*-heksanskog) koje se odvila jasno i vidljivo, potvrđen je dobar izbor ekstrakcionog sredstva.

Nakon odgovarajuće pripreme uzoraka belih rakija opisane u poglavlju 6.9.2.1., vršena je optimizacija različitih uslova tečno-tečne ekstrakcije (vreme ekstrakcije, način agitacije, ponovljena ekstrakcija, uklanjanje etanola iz uzoraka rakije), a zatim je izvršeno snimanje pripremljenih uzoraka GC-MS tehnikom. Na osnovu rezultata *Recovery* testova ponovljenih tri puta i datih u Tabelama 18-21., dobijeni su optimalni uslovi ekstrakcije ftalata iz belih rakija.

Efekat ponovljene ekstrakcije je ispitivan samo za uzorke votke i podaci iz Tabela 18. i 19. pokazuju da ponovljena ekstrakcija ne utiče značajno na povećanje *Recovery* vrednosti za DnBP, BBP, DEHP i DnOP i u slučaju uparene i neuparene votke. Povećanje *Recovery* vrednosti iznosi 1,58 - 6,52% nakon druge ekstrakcije, 2,60 - 11,20% nakon treće ekstrakcije, 9,87 - 21,32% nakon četvrte ekstrakcije. Ipak, kada je u pitanju DMP, *Recovery* vrednosti rastu: 3,44 - 12,64% za uparenu votku i 14,47 - 35,33% za neuparenu votku. Imajući u vidu da je povećanje *Recovery* vrednosti za četiri ispitivana ftalata malo u poređenju sa vremenom potrebnim za svaku ponovljenu ekstrakciju, kao i sa cenom analize, postupak optimizacije LLE ekstrakcije u daljoj analizi će biti sproveden bez ponavljanja ekstrakcije.

Poređenjem rezultata dobijenih ekstrakcijom ftalata iz neuparenih uzoraka rakija navedenih u Tabelama 19. i 21., uviđa se da su *Recovery* vrednosti za DMP manje u odnosu na *Recovery* vrednosti za ostale ispitivane ftalate, što je u skladu sa činjenicom da je DMP

najpolarniji ftalat od preostalih ispitivanih ftalata, i da kao takav ima najveću tendenciju rastvaranja u etanolu, a samim tim i manju tendenciju migracije u *n*-heksan. Upoređivanjem *Recovery* vrednosti za DMP za neuparene uzorke rakije od jabuke i votke, zaključuje se da su *Recovery* vrednosti za DMP manje za uzorke rakije od jabuke u odnosu na uzorke votke, što je u skladu sa procentnim sadržajem etanola u ispitivanim rakijama. Rakija od jabuke sadrži 46 v/v% etanola, dok votka sadrži 40 v/v% etanola, pa je tendencija migracije DMP veća kod votke, jer je kod nje veći procenat vode koja je odgovorna za migraciju ftalata iz rakije u *n*-heksan. *Recovery* vrednosti za ostale ispitivane ftalate su slične i veće u odnosu na *Recovery* vrednosti za DMP za neuparenu rakiju od jabuke i neuparenu votku, zbog veće tendencije migracije ovih ftalata iz uzoraka rakije u *n*-heksan kao nepolarnijem rastvaraču u odnosu na etanol.

Tabela 18. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz uparene votke

<i>Recovery</i> (%) (Srednja vrednost ± SD)					
Broj ekstrakcija	DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
1	75,53 ± 1,88	43,10 ± 1,55	52,63 ± 4,08	45,76 ± 2,17	87,02 ± 1,70
2	78,13 ± 1,02	44,20 ± 0,96	54,96 ± 1,24	48,21 ± 3,79	88,40 ± 2,56
3	82,41 ± 0,62	45,31 ± 0,64	55,96 ± 1,24	52,21 ± 3,79	89,28 ± 0,52
4	85,08 ± 0,15	52,29 ± 1,12	57,96 ± 1,24	55,21 ± 3,79	94,21 ± 0,98

Tabela 19. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz neuparene votke

<i>Recovery</i> (%) (Srednja vrednost ± SD)					
Broj ekstrakcija	DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
1	27,75 ± 2,51	54,90 ± 1,56	54,74 ± 2,98	57,33 ± 2,12	88,45 ± 0,36
2	30,85 ± 1,57	56,56 ± 0,62	58,06 ± 4,70	59,03 ± 5,66	94,22 ± 0,74
3	32,17 ± 0,31	58,61 ± 0,56	60,87 ± 6,82	60,53 ± 2,12	95,88 ± 0,42
4	35,49 ± 0,47	60,32 ± 0,63	63,14 ± 5,79	65,01 ± 2,83	98,04 ± 1,45

Kada se uporede rezultati dobijeni ekstrakcijom ftalata iz uparenih uzoraka rakije u *n*-heksan, dati u Tabelama 18. i 20., razlike između *Recovery* vrednosti su male, i one potiču od različitog tipa uzoraka rakija, odnosno od različitih konstituenata ispitivanih belih rakija.

Dalje je izvršena analiza uticaja načina agitacije, kao i vremena ekstrakcije ftalata iz uparenih i neuparenih uzoraka rakije od jabuke poređenjem *Recovery* vrednosti prikazanih u Tabelama 20. i 21.

Tabela 20. *Recovery* ekstrakcije ftalata iz uparene rakije od jabuke

Način agitacije	<i>Recovery</i> (%) (Srednja vrednost ± SD)				
	DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
10 min ultrazvuka	76,89 ± 2,01	61,05 ± 9,32	69,78 ± 0,56	47,51 ± 5,47	68,93 ± 3,57
20 min ultrazvuka	78,44 ± 2,27	49,28 ± 12,66	64,38 ± 3,29	37,67 ± 8,55	61,12 ± 6,34
30 min ultrazvuka	78,37 ± 1,08	40,77 ± 6,27	57,13 ± 8,53	35,30 ± 1,90	62,75 ± 8,41
5 min ručnog mućkanja	110,78 ± 6,16	62,53 ± 3,68	74,81 ± 2,35	66,01 ± 4,03	105,38 ± 4,18

Tabela 21. *Recovery* ekstrakcije ftalata iz neuparene rakije od jabuke

Način agitacije	<i>Recovery</i> (%) (Srednja vrednost ± SD)				
	DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
10 min ultrazvuka	21,97 ± 0,80	66,64 ± 9,47	66,23 ± 10,63	69,71 ± 7,90	104,67 ± 0,47
20 min ultrazvuka	21,39 ± 0,13	74,67 ± 3,78	61,05 ± 2,52	69,71 ± 3,24	109,96 ± 2,98
30 min ultrazvuka	21,61 ± 0,84	72,59 ± 8,96	57,72 ± 5,02	46,55 ± 6,74	67,19 ± 7,06
5 min ručnog mućkanja	27,31 ± 0,22	71,60 ± 1,90	66,38 ± 1,68	65,60 ± 5,18	90,95 ± 4,19

Najveća *Recovery* vrednost za DMP se dobija primenom sledećih uslova: ručno mućkanje u trajanju od 5 minuta i uklanjanjem etanola iz uzorka rakije u višku. Ovaj rezultat se objašnjava činjenicom da je DMP najpolarnije ftalat u poređenju sa ostalim ftalatima i najviše rastvorljiv u etanolu. U slučaju neuparenih uzoraka rakije od jabuke, DMP ostaje rastvoren u etanolu iz rakije i ne migrira u nepolarni *n*-heksan, dok kod uparenih uzoraka rakije, etanol biva uklonjen, što ubrzava migraciju DMP u *n*-heksan. S druge strane, DnOP je ftalat sa najvećom *Recovery* vrednošću, što je posledica toga da je DnOP ftalat sa

najvećom molekulskom masom, najvoluminozniji i nepolaraniji u odnosu na ostale ispitivane ftalate. Kao takav, DnOP ima najveću tendenciju migracije iz rakije u *n*-heksan. Uparavanje etanola iz rakije ne utiče na ekstarkciju DnOP iz rakije, zbog gore navedenih razloga. DnBP, BBP i DEHP imaju sličnu rastvorljivost u vodi (Tabela 2.), što je u vezi sa njihovom sličnom strukturom, veličinom i polarnošću, što uzrokuje slične *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz rakije u *n*-heksan.

Rezultati, prikazani u Tabelama 20. i 21., pokazuju da uticaj efekta vremena trajanja ekstrakcije u slučaju primene ultrazvučnih talasa u ultrazvučnoj kadi, kao načina agitacije, ne utiče na migraciju ftalata iz rakije u *n*-heksan. Takođe, ovi rezultati ukazuju na to da način agitacije utiče na ekstrakciju ftalata iz rakije, pri čemu ručno mućkanje obezbeđuje bolje uslove u odnosu na drugi tip agitacije – ultrazvučne talase, zbog toga što se tokom ultrazvučnog tretmana u ultrazvučnoj kadi stvaraju emulzije koje onemogućavaju potpuno rastvaranje ftalata u *n*-heksanu. Ovi rezultati se odnose na sve ftalate.

8.1.2. Efikasnost optimizovane tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka rakija

Gore navedeni rezultati pokazuju da je najbolji ekstrakcioni postupak za ekstrakciju ftalata iz uzoraka rakije sa *n*-heksanom kao ekstrakcionim sredstvom sledeći: ručno mućkanje kao način agitacije, vreme ekstrakcije 5 minuta bez ponavljanja ekstrakcije. Pri ovim uslovima ekstrakcije, uparavanje etanola iz uzoraka rakija utiče na povećanje efikasnosti ekstrakcije DMP-a, dok na efikasnost ekstrakcije DnBP-a, BBP-a, DEHP-a i DnOP-a uparavanje etanola nema uticaja.

8.2. Rezultati određivanja ftalata u sintetičkom vinu

8.2.1. Rezultati optimizacije tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz uzoraka sintetičkog vina

Nakon izvršenog snimanja pripremljenih uzoraka sintetičkog vina uz postavljanje odgovarajućih uslova ekstrakcionih postupaka opisanih u poglavlju 6.9.2.2., pomoću GC-MS tehnike, dobijeni su rezultati u vidu *Recovery* vrednosti koje ukazuju na efikasnost navedenih ekstrakcionih postupaka.

1) Tip agitacije

Poređenjem rezultata ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina *n*-heksanom primenom dva tipa agitacije – ručnog mućkanja i ultrazvučnih talasa i njihove kombinacije, u vidu *Recovery* vrednosti prikazanih u Tabeli 22., može se videti da ne postoji značajna razlika između vrednosti dobijenih kada su primenjeni ručno mućkanje i ultrazvučni talasi, kao i njihova kombinacija, kao tip agitacije.

Recovery vrednosti za DMP su manje od *Recovery* vrednosti za ostale ftalate kada se primenjuje *n*-heksan kao ekstrakciono sredstvo, zbog toga što je polarniji od drugih ispitivanih ftalata i kao takav ima najmanju težnju da migrira u nepolarni rastvarač kakv je *n*-heksan.

Tabela 22. *Recovery* vrednosti (%) ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina primenom različitog tipa agitacije

Tip agitacije	Koncentracija ftalata ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Recovery</i> vrednosti (%)				
		DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
Ručno mućkanje	0,5	63,24	77,56	75,28	80,25	76,50
	1,0	66,77	78,90	78,90	82,14	78,64
	2,0	62,65	81,22	78,27	84,25	77,50
Ultrazvuk	0,5	62,88	71,72	78,47	80,60	76,92
	1,0	61,86	73,14	79,06	77,14	76,74
	2,0	58,82	76,70	74,48	76,98	73,94
Ručno mućkanje i ultrazvuk	0,5	59,67	75,22	78,56	78,56	75,67
	1,0	58,28	71,63	76,89	76,54	78,61
	2,0	64,31	74,23	79,86	79,41	76,75

2) *pH* vrednost

Promenom *pH* vrednosti vina i primenom *n*-heksana kao ekstrakcionog sredstva, dobijene su *Recovery* vrednosti date u Tabelama 23. i 24. čijim poređenjem se zapaža sledeći trend:

Recovery vrednosti za DMP, BBP, DEHP, DnOP sa porastom *pH* sintetičkog vina opadaju;

Recovery vrednosti za DnBP sa porastom *pH* sintetičkog vina rastu za sva tri ispitivana nivoa spajka.

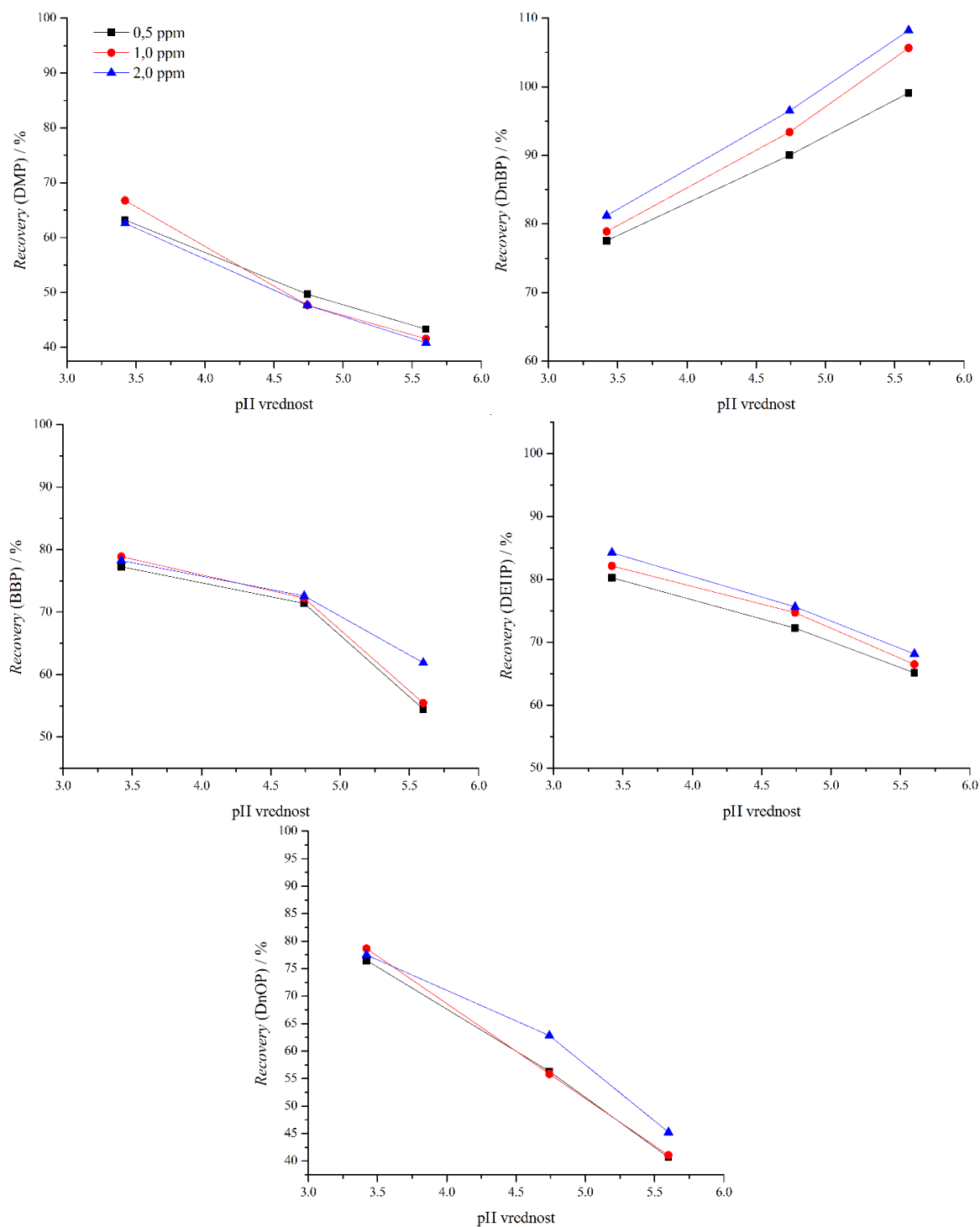
Ovaj trend se ponavlja za oba ispitivana tipa agitacije, što se može videti i na Slikama 11. i 12. iz čega se može zaključiti da je *pH* vrednost sintetičkog vina 3,42 vrednost koja odgovara najefikasnijoj ekstrakciji svih ftalata.

Tabela 23. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz vina u funkciji *pH* vrednosti vina, tip agitacije ručno mućkanje

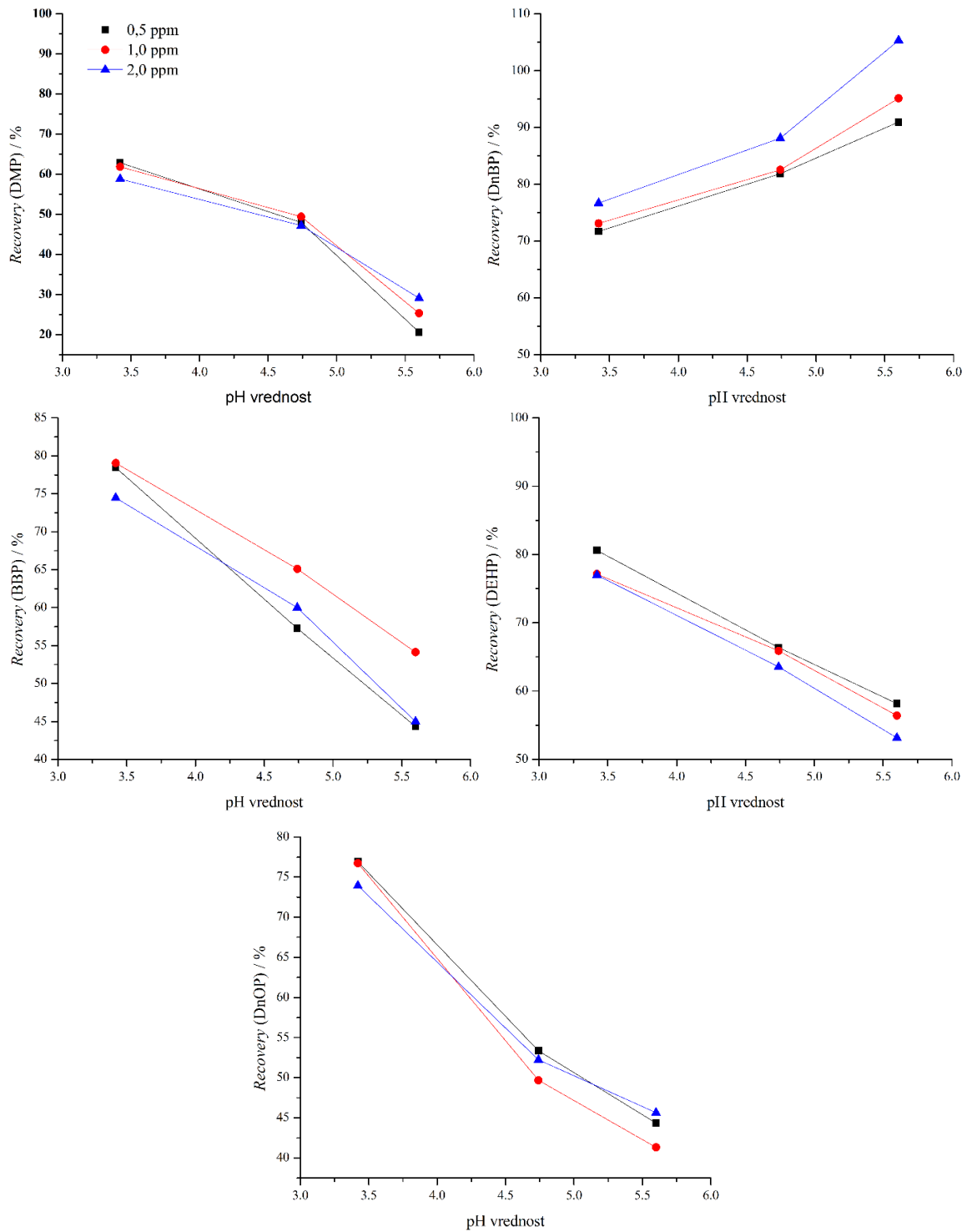
Ftalat	Koncentracija ftalata ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>pH</i>		
		3,42	4,74	5,60
<i>Recovery</i> vrednosti (%)				
DMP	0,5	63,24	49,70	43,33
	1	66,77	47,71	41,58
	2	62,65	47,71	40,83
DnBP	0,5	77,56	90,03	99,11
	1	78,90	93,40	96,51
	2	81,22	102,12	108,22
BBP	0,5	75,28	63,4	49,48
	1	78,90	72,23	55,46
	2	78,27	72,59	61,95
DEHP	0,5	80,25	72,23	65,14
	1	82,14	74,69	66,47
	2	84,25	75,63	68,14
DnOP	0,5	76,50	56,30	40,71
	1	78,64	55,85	41,07
	2	77,50	62,84	45,25

Tabela 24. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz vina u funkciji pH vrednosti vina, tip agitacije ultrazvučni talasi

Ftalat	Koncentracija ftalata ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	pH		
		3,42	4,74	5,60
		Recovery (%)		
DMP	0,5	62,88	47,96	20,65
	1	61,86	49,43	25,36
	2	58,82	47,20	29,13
DnBP	0,5	71,72	81,88	76,70
	1	73,14	82,56	88,15
	2	76,70	95,15	105,33
BBP	0,5	78,47	57,28	44,34
	1	79,06	65,11	54,13
	2	74,48	60,00	45,00
DEHP	0,5	80,60	66,37	58,15
	1	77,14	65,89	56,41
	2	76,98	63,54	53,14
DnOP	0,5	76,92	53,36	44,34
	1	76,74	49,69	41,33
	2	73,94	52,67	45,64



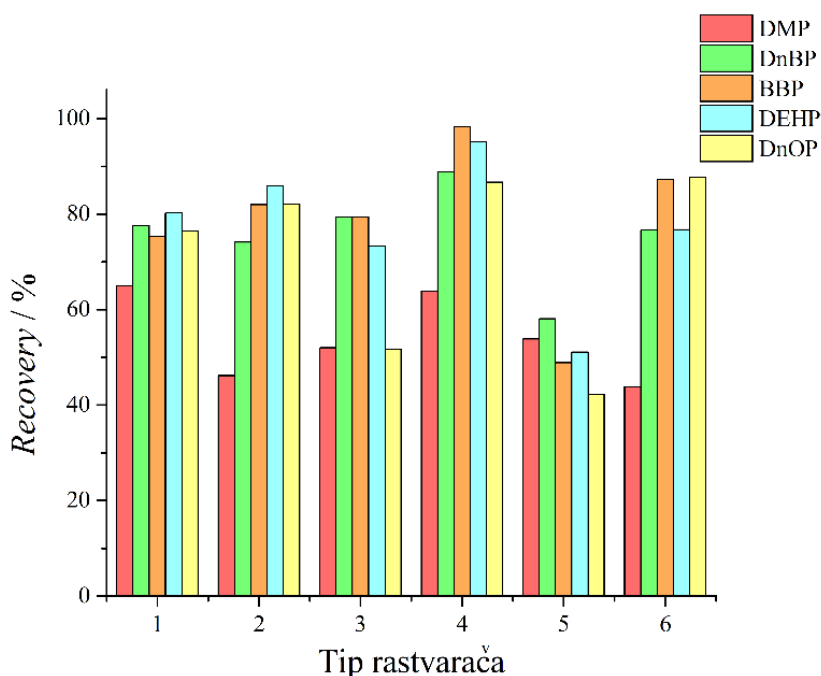
Slika 11. Zavisnost *Recovery* vrednosti (%) ekstrakcije ftalata od pH vrednosti vina, tip agitacije ručno mućkanje



Slika 12. Zavisnost *Recovery* vrednosti (%) ekstrakcije ftalata od pH vrednosti vina, tip agitacije ultrazvučni talasi

3) Tip ekstrakcionog sredstva

Na osnovu lakoće odvajanja faza, jasnoće granice faza, lakoće izvođenja ekstrakcije i dobijenih rezultata u vidu *Recovery* vrednosti, izvršen je izbor najefikasnijeg ekstrakcionog sredstva za ekstrakciju ftalata iz sintetičkog vina. Imajući u vidu vrednosti gustine svakog ispitivanog ekstrakcionog sredstva, dihlormetan i hloroform su rastvarači koji će nakon odvajanja slojeva biti u donjem sloju, dok će alkohol biti u gornjem sloju. Za ostala četiri rastvarača važi obrnut odnos. Zbog ovog odnosa, korišćenje dihlormetana i hloroforma, iziskuje dodatni korak isušivanja organskoj sloja, koji je nakon ekstrakcije obogaćen ftalatima, pomoću $MgSO_4$. Slojevi *t*-butilmetiletar-alkohol se teže odvajaju i nije jasna granica faza. Rezultati ekstrakcije ftalata različitim ekstrakcionim sredstvima u vidu *Recovery* vrednosti su prikazani u Tabeli 25. i na Slici 13.



Slika 13. Efekat različitih tipova ekstrakcionih sredstava na *Recovery* vrednosti ekstrakcije, pri čemu je 1 – heksan, 2 – dihlormetan, 3 – cikloheksan, 4 – etilacetat, 5 – hloroform i 6 – *t*-butilmetil etar

Tabela 25. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata u funkciji tipa ekstrakcionog sredstva

Tip ekstrakcionog sredstva	Spajk koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
<i>n</i> -Heksan	0,5	63,24	77,56	75,28	80,25	76,50
	1	66,77	78,90	78,90	82,14	78,64
	2	62,65	81,22	78,27	84,25	77,50
Dihlormetan	0,5	46,20	74,14	82,01	85,93	82,02
	1	45,20	74,46	81,73	82,02	80,28
	2	49,72	72,97	78,71	83,92	80,03
Cikloheksan	0,5	52,04	79,44	79,44	73,33	51,67
	1	50,75	73,33	78,61	63,89	43,33
	2	46,53	77,32	79,36	70,00	60,00
Etil-acetat	0,5	63,89	88,89	98,33	95,19	86,67
	1	59,32	80,83	89,17	96,39	96,67
	2	61,14	83,15	95,01	96,43	99,18
Hloroform	0,5	53,85	58,11	48,89	51,11	42,22
	1	48,59	57,22	50,00	40,83	32,22
	2	56,51	59,14	55,36	42,15	42,13
<i>t</i> -Butilmetil etar	0,5	43,83	76,67	87,22	76,74	87,78
	1	47,79	80,83	85,00	80,28	87,22
	2	43,75	77,16	84,56	79,96	86,14

Od svih ispitivanih rastvarača *n*-heksan, pored toga što je davao dobre *Recovery* vrednosti, predstavlja rastvarač čija se gustina najviše razlikuje od gustine vode, pri čemu daje i bolju separaciju. Etil acetat ima sličnu gustinu gustini vode, pa je i separacija lošija. Iz tog razloga je *n*-heksan uzet kao optimalno ekstrakciono sredstvo.

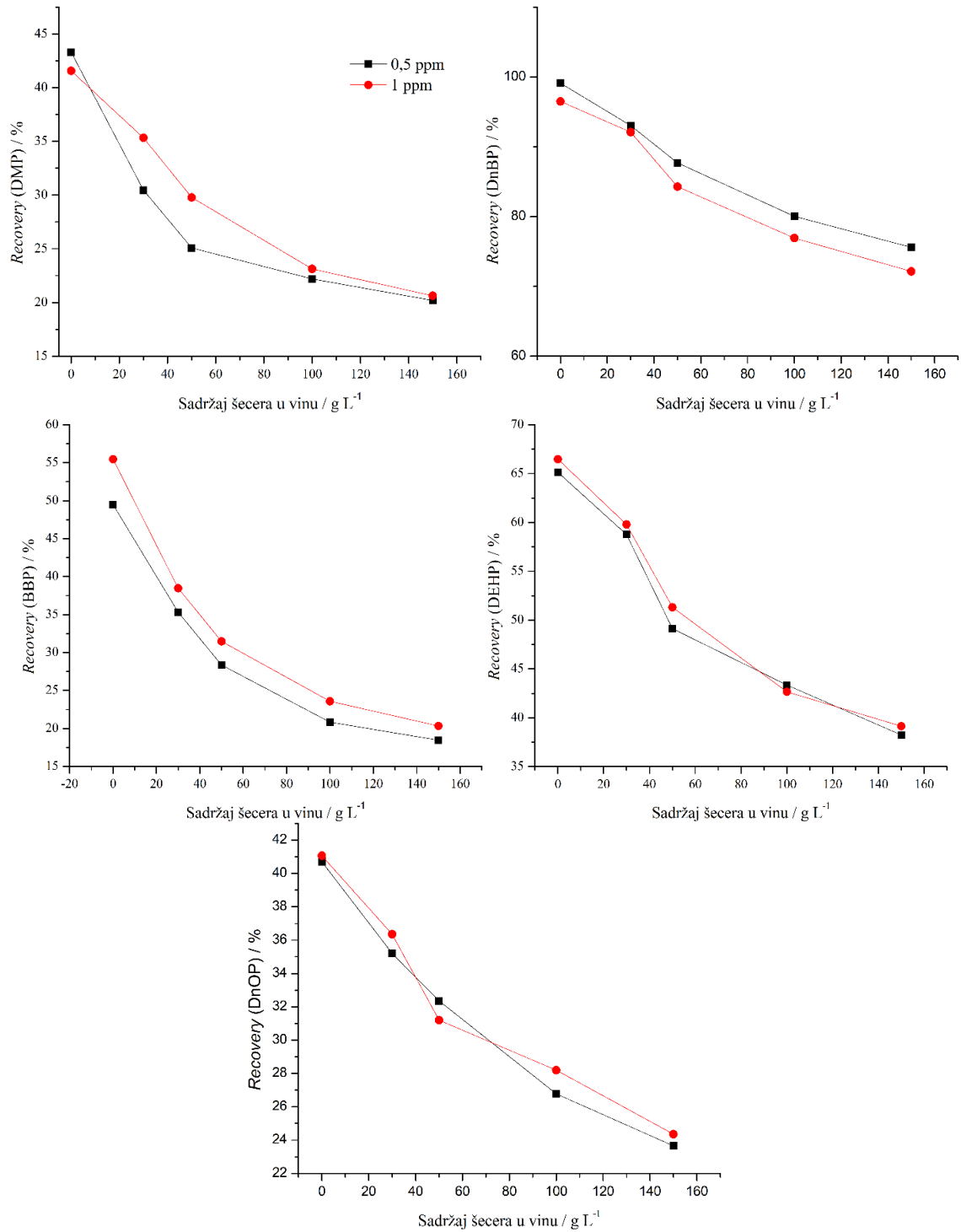
4) Sadržaj šećera u sintetičkom vinu

Promenom sadržaja šećera u vinu u intervalu od 0 do 150 g L⁻¹ dolazi i do promene *Recovery* vrednosti prilikom ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina, koje su prikazane u Tabeli 26.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 26. vidi se da sa porastom sadržaja šećera u sintetičkom vinu, *Recovery* vrednosti za sve ispitivane ftalate opadaju, što je prikazano i grafički na Slici 14. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja sprovedenim radi određivanja ftalata u šampanjcu, crvenom i belom vinu GC-MS tehnikom, koji su ukazali na uticaj faktora sadržaja šećera na određivanje ftalate u vinima (KRYLOV *et al.*, 2018). Po ovom istraživanju uticaj sadržaja šećera može da preceni ili potceni stvarnu koncentraciju ftalata u vinima za 1 do 2 reda veličine.

Tabela 26. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina u funkciji sadržaja šećera u sintetičkom vinu

Ftalat	Nivo spajka (µg mL ⁻¹)	Sadržaj šećera u vinu (g L ⁻¹)				
		0	30	50	100	150
DMP	0,5	43,33	30,47	25,08	22,20	20,20
	1,0	41,58	35,34	29,79	23,13	20,63
DnBP	0,5	99,11	93,06	87,71	80,06	75,62
	1,0	96,51	92,11	84,31	76,94	72,16
BBP	0,5	49,48	35,32	28,36	20,84	18,46
	1,0	55,46	38,48	58,77	23,58	20,33
DEHP	0,5	65,14	58,77	49,14	43,36	38,25
	1,0	66,47	59,8	51,32	42,66	39,14
DnOP	0,5	40,71	35,21	32,36	26,78	23,66
	1,0	41,07	36,36	31,20	28,20	24,36



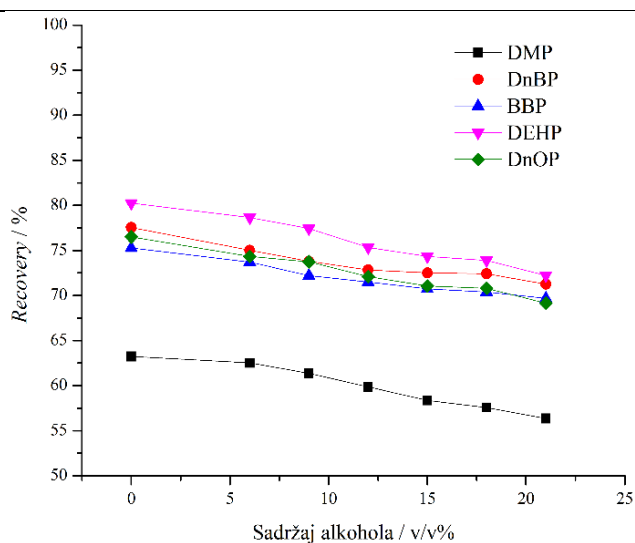
Slika 14. Recovery vrednosti ekstrakcije ftalata u funkciji sadržaja šećera u vinu

5) Procenat etanola u vinu

Promenom procentnog sastava etanola u vinu dolazi do promene *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz vina *n*-heksanom, što je prikazano u Tabeli 27. Porastom sadržaja etanola u sintetičkom vinu od 0 do 21 v/v%, *Recovery* vrednosti za ekstrakciju svih ftalata iz vina opadaju neznatno. Ovaj pad je prikaza i grafički na Slici 15. Krylov i saradnici su prilikom određivanja koncentracije ftalata u šampanjcu, crvenom i belom vinu ustanovili da pored uticaja sadržaja šećera, na tačnost određivanja koncentracije ftalata u vinu utiče i sadržaj alkohola u vinu i da izmerena koncentracija ftalata može da varira za 1 do 2 reda veličine od stvarne koncentracije (KRYLOV *et al.*, 2018). Takođe, usled mešanja *n*-heksana i etanola iz sintetičkog vina, smanjuje se zapremina dostupnog *n*-heksana za migraciju ftalata, pa se usled toga javlja efekat smanjenja migracije u vidu smanjenja *Recovery* vrednosti.

Tabela 27. *Recovery* vrednosti u funkciji sadržaja alkohola u vinu

Sadržaj etanola u alkoholu	<i>Recovery</i> vrednosti (%)				
	DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
0	63,24	77,56	75,28	80,25	76,50
6	62,52	75,02	73,71	78,67	74,34
9	61,36	73,81	72,21	77,43	73,76
12	59,87	72,85	71,5	75,34	72,09
15	58,37	72,52	70,74	74,34	71,07
18	57,57	72,42	70,40	73,90	70,80
21	56,36	71,26	69,68	72,23	69,16

Slika 15. *Recovery* u funkciji sadržaja alkohola u vinu

6) Zapreminski odnos ekstrakcionog sredstva i uzorka

U Tabeli 28. prikazane su *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata, kada je odnos zapremina ekstrakcionog sredstva i uzorka 1:2 i 1:1. Prikazanih podaci pokazuju da ne postoji razlika u efikasnosti ekstrakcije prilikom primene ova dva odnosa.

Tabela 28. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina u funkciji zapreminskog odnosa ekstrakcionog sredstva i uzorka

pH vrednost	Nivo spajka ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Zapreminski odnos ekstrakcionog sredstva i uzorka	<i>Recovery</i> vrednosti (%)				
			DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
3,5	0,5	1:2	63,24	77,56	75,28	80,25	76,50
		1:1	61,74	77,22	75,11	75,56	74,44
	1,0	1:2	66,77	78,90	78,90	82,14	78,64
		1:1	65,48	78,33	75,00	78,61	76,89
	2,0	1:2	62,65	81,22	78,27	84,25	77,50
		1:1	61,44	79,50	77,17	79,42	75,56
4,5	0,5	1:2	49,70	90,03	71,40	72,23	56,30
		1:1	48,63	88,44	67,20	71,67	55,44
	1,0	1:2	47,71	93,40	72,23	74,69	55,85
		1:1	46,99	89,22	70,17	72,28	54,00
	2,0	1:2	47,71	96,51	72,59	75,63	62,84
		1:1	46,98	90,56	70,14	76,14	57,33

7) Reekstrakcija

Poređenjem rezultata dobijenih primenom ponovljene ekstrakcije, koji su dati u Tabeli 29., primećuje se neznatni porast *Recovery* vrednosti za sve ftalate, za oba nivoa spajka. Porast za DMP se kreće u opsegu od 5,41 do 11,16%, za DnBP od 1,03 do 9,04%, za BBP od 9,53 do 12,55%, za DEHP od 7,20 do 14,09%, za DnOP od 8,64 do 14,66%.

Tabela 29. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina primenom ponovljene ekstrakcije

pH vina	Nivo spajka ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Reekstrakcija	<i>Recovery</i> vrednosti (%)				
			DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
3,42	1,0	-	61,86	73,14	79,06	77,14	76,74
		+	65,21	80,85	88,33	84,28	83,52
	2,0	-	58,82	76,7	74,48	76,98	73,94
		+	62,47	83,64	82,45	85,36	80,33
4,74	1,0	-	49,43	82,26	65,11	65,89	49,69
		+	54,91	89,22	71,32	71,22	55,46
	2,0	-	47,20	95,15	60,00	63,54	52,67
		+	52,47	99,41	65,87	70,97	57,41
5,60	1,0	-	25,36	88,15	54,13	56,41	41,33
		+	28,10	97,44	59,41	60,47	45,97
	2,0	-	29,13	105,33	45,00	53,14	45,64
		+	32,11	108,11	50,65	60,63	52,33

8.2.2. Efikasnost ekstrakcije ftalata iz uzoraka sintetičkog vina

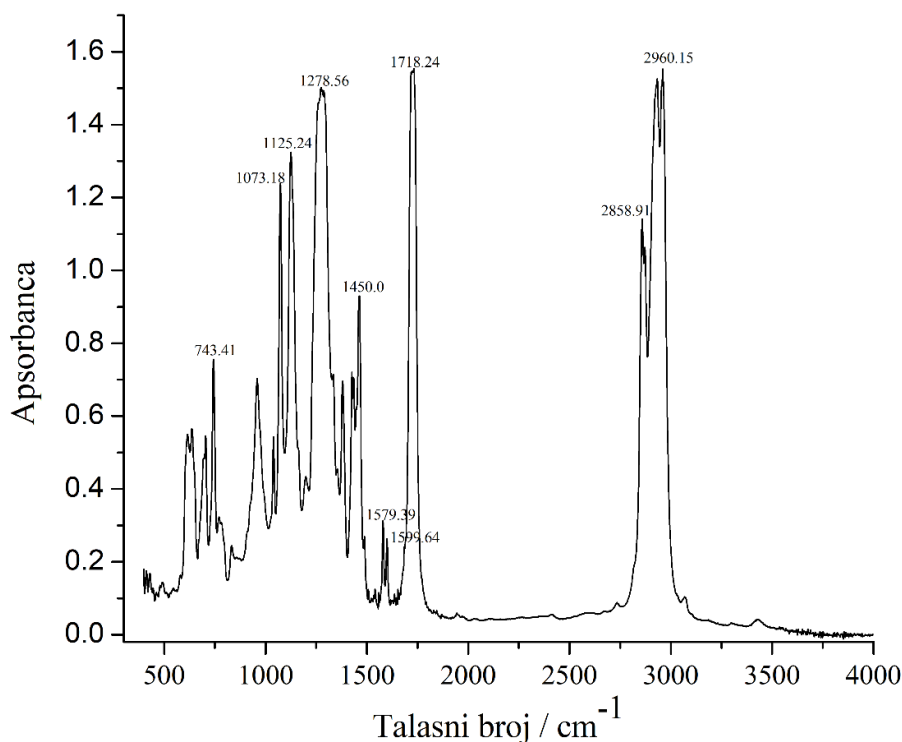
Na osnovu dobijenih rezultata određivanja ftalata u sintetičkom vinu u vidu *Recovery* vrednosti izvršen je izbor najoptimalnijih parametara za ekstrakciju ftalata iz sintetičkog vina. Uslovi (parametri) koji obezbeđuju najefikasniji ekstrakcioni postupak za ekstrakciju ftalata iz uzoraka sintetičkog vina su sledeći:

- *n*-heksan kao ekstrakciono sredstvo s obzirom na to da obezbeđuje najbolje odvajanje slojeva sintetičko vino/organski sloj uz dobijene *Recovery* vrednosti u opsegu 62,65 – 84,25%. *Recovery* vrednosti oko 62,65% se odnose na DMP, iz razloga što je DMP najpolarniji ftalat u odnosu na ostale ispitivane ftalate i kao takav pokazuje najmanju težnju da prelazi u nepolaran rastvarač, kao što je *n*-heksan;
- pH vrednost sintetičkog vina od 3,42 je izabrana kao pH vrednost pri kojoj se odvija najefikasnija ekstrakcija DMP-a, BBP-a, DEHP-a, DnOP-a iz sintetičkog vina, jer *Recovery* vrednosti ekstrakcije navedenih ftalata sa porastom pH sintetičkog vina opadaju. S obzirom na to da *Recovery* vrednosti ekstrakcije DnBP-a sa porastom pH sintetičkog vina rastu, pH vrednost od 5,60 je vrednost koja je odabrana za najefikasniju ekstrakciju DnBP-a iz sintetičkog vina. Ovaj trend se ponavlja za sva tri ispitivana nivoa spajka i za oba ispitivana tipa agitacije;
- Uticaj odnosa zapremine ekstrakcionog sredstva i uzorka je neznan, jer dobijene *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata, primenom različitog odnosa zapremina ekstrakcionog sredstva i uzorka (1:2 i 1:1) su slične;
- Takođe, primenom reekstrakcije dobija se neznan porast *Recovery* vrednosti za sve ftalate, za oba nivoa spajka, pa s obzirom na to, primena reekstrakcije može biti isključena, jer se time skraćuje vreme analize;
- Sa porastom sadržaja šećera u sintetičkom vinu, *Recovery* vrednosti za sve ispitivane ftalate opadaju. Sa porastom sadržaja etanola u sintetičkom vinu od 0 do 21 v/v% *Recovery* vrednosti za ekstrakciju svih ftalata iz vina opadaju, ali neznan;
- Poređenjem tri tipa agitacije (ručno mućkanje, ultrazvučni talasi, kao i njihova kombinacija) ustanovljeno je da tip agitacije ne utiče na povećanje ili smanjenje *Recovery* vrednosti. Dobijene vrednosti su slične za sva tri primenjena tipa agitacije, i ovaj trend je isti i pri primeni drugih uslova (parametara) ekstrakcije. Takođe, trend ostaje isti za sve ftalate, pa tako *Recovery* vrednosti za DMP ostaju najmanje, dok su *Recovery* vrednosti za ostale ftalate u opsegu od 71,63 do 84,25%.

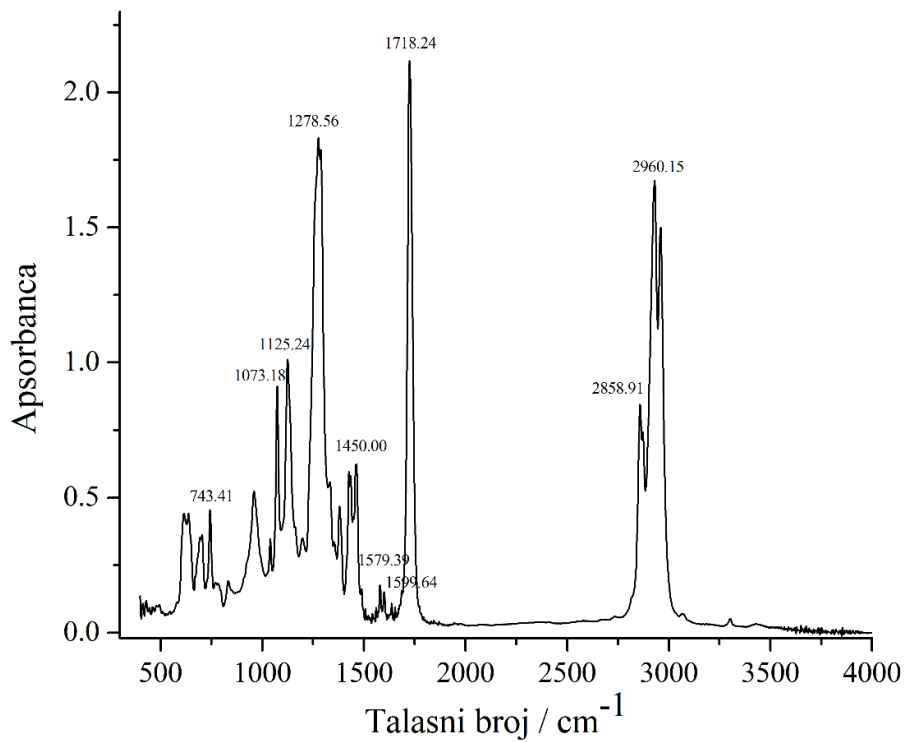
9. REZULTATI ODREĐIVANJA FTALATA U PCM ARTIKLIMA I PVC IGRAČKAMA

9.1. Rezultati određivanja ftalata u PCM artiklima FTIR tehnikom

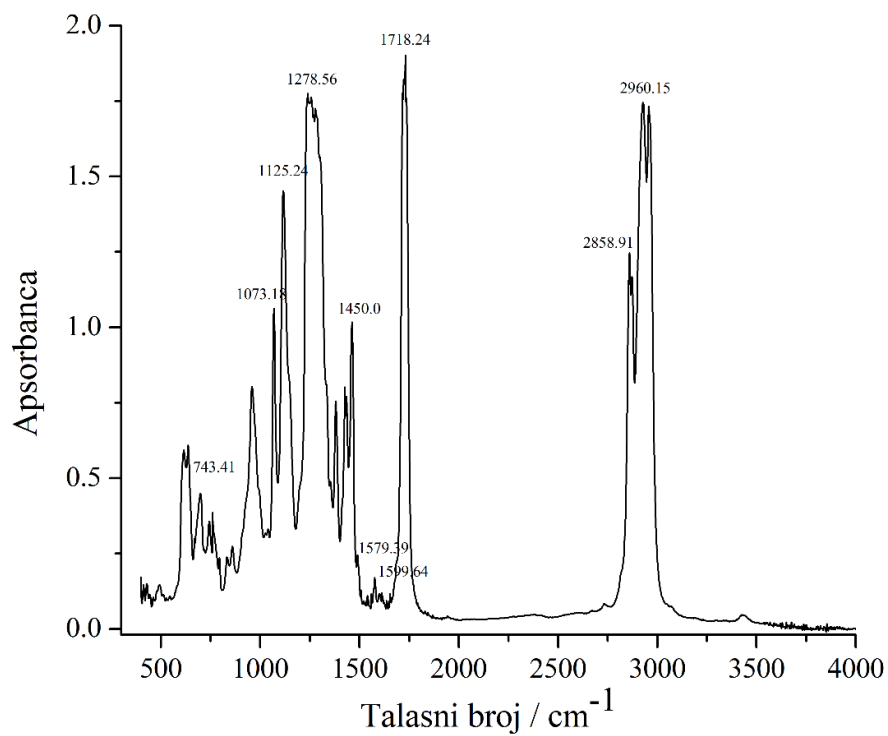
Nakon opisane pripreme uzoraka PVC plastičnih artikala koji dolaze u kontakt sa farmaceutskim proizvodima (PCM) u poglavlju 6.10.1. snimljeni su FTIR apsorpcioni spektri polimernih diskova svakog od navedenih artikala. FTIR apsorpcioni spektri polimernih diskova dobijenih nakon rastvaranja PCM-a u THF-u i isparavanja THF-a dati su na Slikama 16a.-16g. Na svakom FTIR spektru se uočavaju apsorpcione trake za identifikaciju ftalata. Korisni opseg za infracrvenu analizu ftalata je opseg apsorpcije na 743 cm^{-1} , koji potiče od *orto*- supstituisanog aromatičnog prstena ftalata. Dublet koji se pojavljuje na 1579 cm^{-1} i 1599 cm^{-1} , kao posledica vibracije istežanja aromatičnog prstena ftalata, takođe identifikuje ftalate. Frekvencija i intenzitet ovih traka u infracrvenom spektru zavise od supstitucije aromatičnog prstena ftalata. Ostale korisne apsorpcione trake na FTIR spektru plastičnih artikala koje karakterišu ftalate su: 2960 cm^{-1} (za -CH vezu), 1718 cm^{-1} (za ftalatni ester), 1450 cm^{-1} (za -CH₂- i -CH₃), 1278 cm^{-1} (za -CH₂-), 1073 cm^{-1} (za -CH₃).



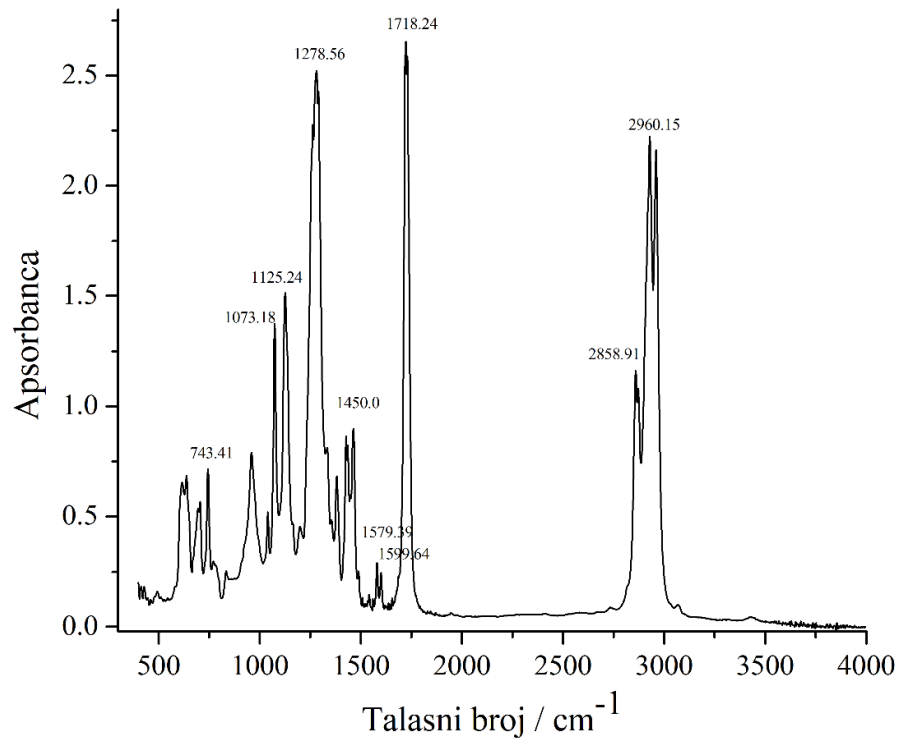
Slika 16a. FTIR spektar cevi za transfuziju sa karakterističnim apsorpcionim trakama



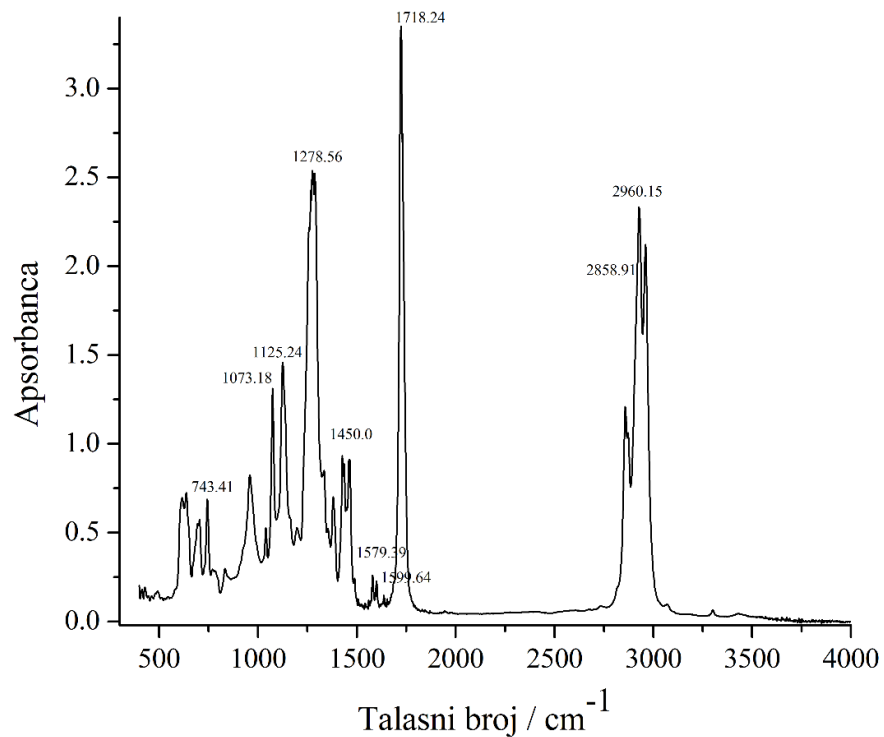
Slika 16b. FTIR spektar cevi za infuziju sa karakterističnim apsorpcionim trakama



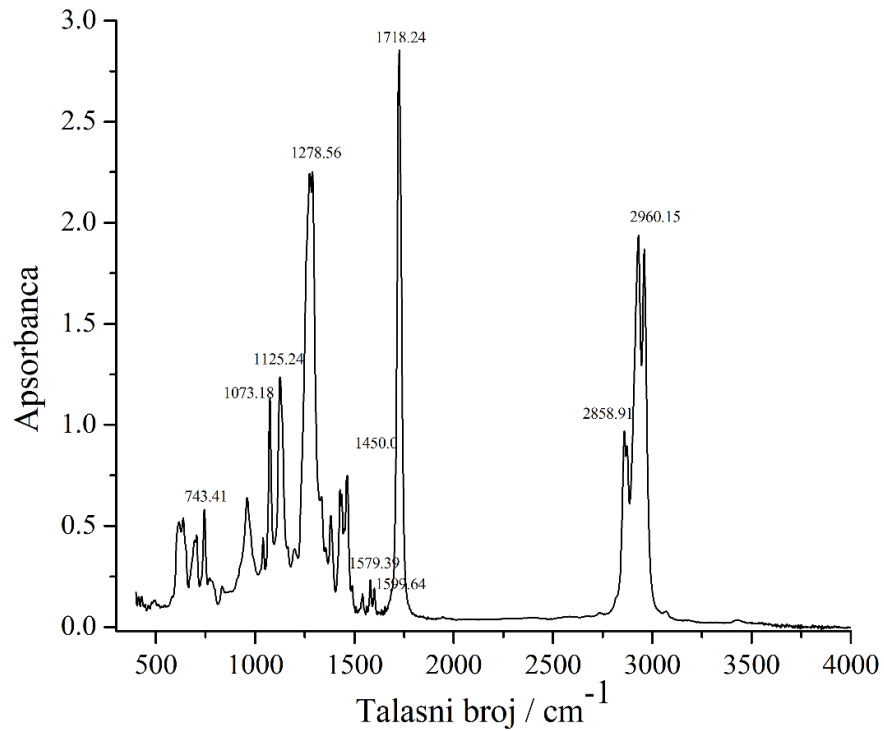
Slika 16c. FTIR spektar kvadrupolne kese za transfuziju sa karakterističnim apsorpcionim trakama



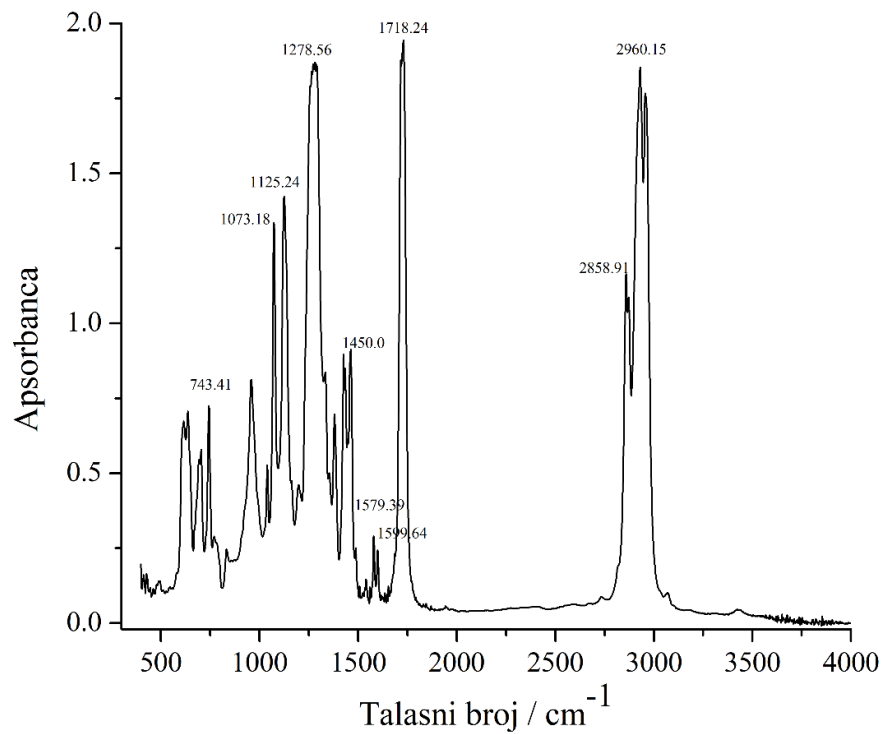
Slika 16d. FTIR spektar kese za prenos krvi sa karakterističnim apsorpcionim trakama



Slika 16e. FTIR spektar cevi za dijalizu sa karakterističnim apsorpcionim trakama

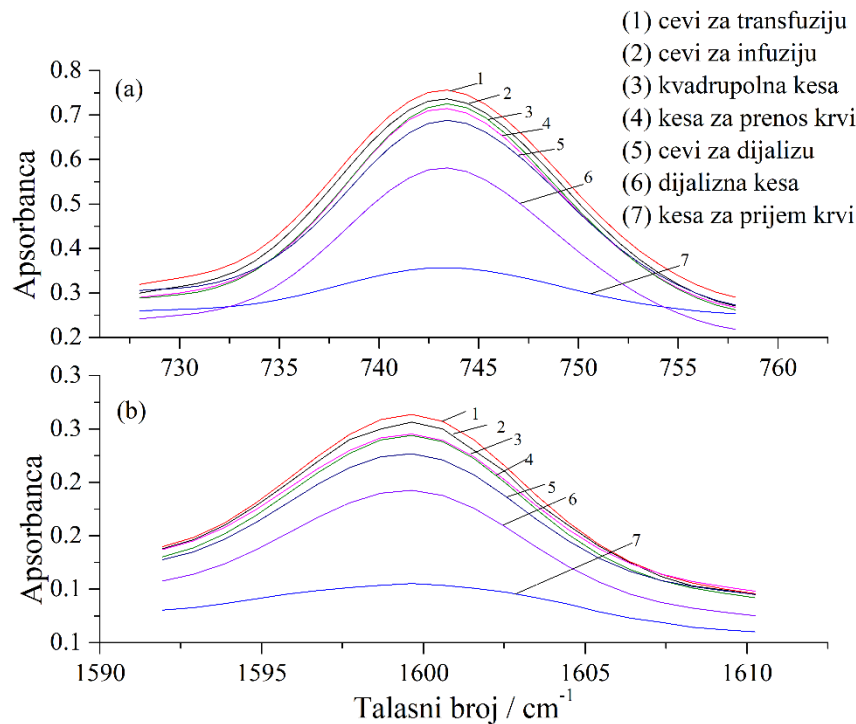


Slika 16f. FTIR spektar dijalizne kese sa karakterističnim apsorpcionim trakama



Slika 16g. FTIR spektar kese za prijem krvi sa karakterističnim apsorpcionim trakama

Na Slici 17. su date dve oblasti FTIR spektara PVC PCM artikala koje nedvosmisleno ukazuju na prisustvo ftalata u njima: $720 - 760 \text{ cm}^{-1}$ i $1560 - 1610 \text{ cm}^{-1}$. Navedene oblasti na FTIR spektrima kvalitativno pokazuju koji PVC artikli sadrže najviše ftalata. Cevi za transfuziju sadrže najveću koncentraciju ftalata, a zatim slede cevi za infuziju, kvadrupolna kesa za transfuziju, kesa za prenos krvi, cevi za dijalizu, dijalizna kesa i kesa za prijem krvi, redom.

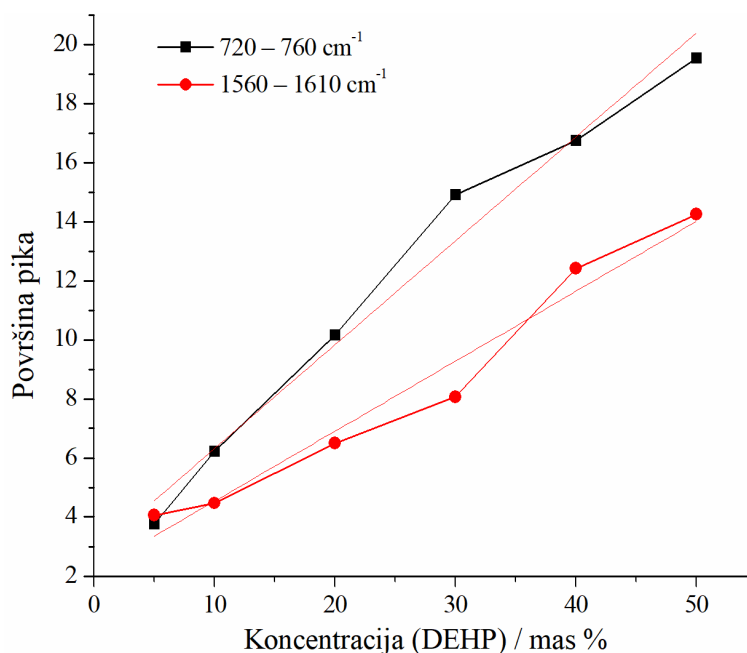


Slika 17. FTIR spektar PVC PCM artikala: a) oblast $720 - 760 \text{ cm}^{-1}$
b) oblast $1560 - 1610 \text{ cm}^{-1}$

Apsorpicione trake na FTIR spektru su posledica apsorpcije svih prisutnih ftalata na datoj talasnoj dužini, iz čega proizilazi da FTIR metoda nije specifična/selektivna metoda, jer se njom ne može odrediti svaki ftalat prisutan u PVC artiklima ponaosob, već se njom dobijaju podaci o ukupnoj količini ftalata u PVC artiklu. S obzirom na to da je GC-MS analizom utvrđeno prisustvo samo DEHP-a u ispitivanim PVC artiklima (poglavlje 9.2.2.), ukupni sadržaj ftalata određen FTIR metodom odgovara ukupnom sadržaju DEHP-a. Zato se u daljem tekstu govori o određivanju DEHP-a FTIR metodom.

U cilju kvantitativnog određivanja DEHP-a u PVC artiklima FTIR metodom, najpre su na FTIR instrumentu snimljeni kalibracioni standardi u vidu polimernih diskova, dobijenih spajkovanjem THF rastvora PVC precipitata bez sadržaja ftalata i naknadnim uparavanjem THF-a u evaporacionim sudovima. Snimanjem kalibracionih standarda čiji je

sadržaj DEHP-a u rasponu koncentracija od 0 do 50 mas% i izračunavanjem površine apsorpcionih traka u dve navedene oblasti na FTIR spektru ($720 - 760 \text{ cm}^{-1}$ i $1560 - 1610 \text{ cm}^{-1}$) dobijene su kalibracione prave predstavljene na Slici 18. Dobijene kalibracione prave koje predstavljaju funkciju površine apsorpcionih traka u odnosu na masenu koncentraciju DEHP-a u PVC artiklu su linearne u rasponu koncentracija od 0 do 50 mas% DEHP-a, sa koeficijentima određivanja i jednačinama prave navedenim u Tabeli 30.



Slika 18. Kalibracione prave za DEHP za različite oblasti na FTIR spektru: $720 - 760 \text{ cm}^{-1}$ i $1560 - 1610 \text{ cm}^{-1}$

Tabela 30. Jednačina prave i koeficijent određivanja za dve oblasti na FTIR spektru

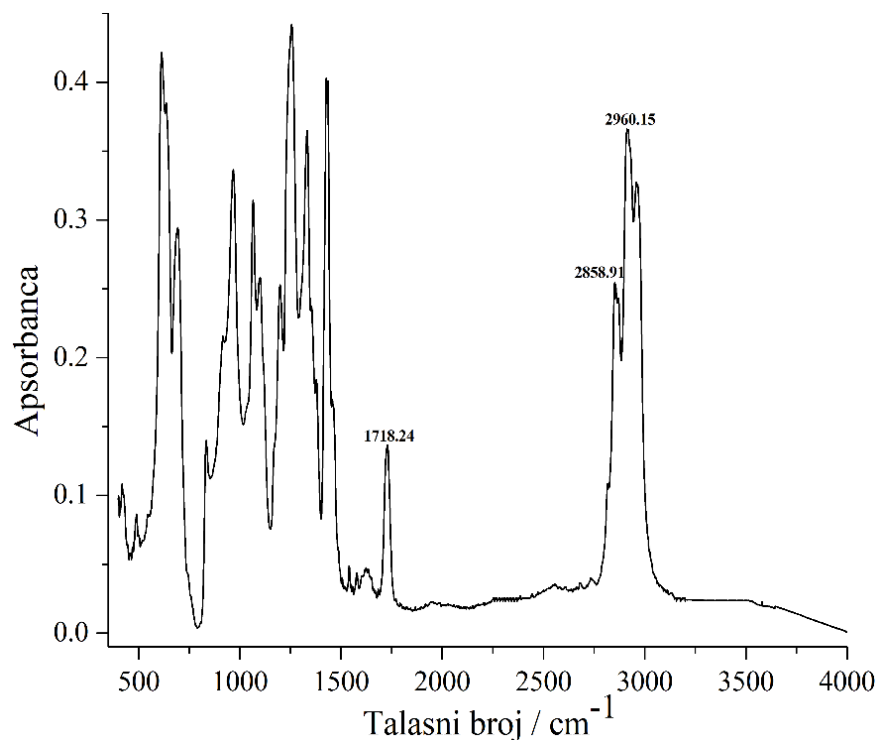
Oblast	Jednačina prave	Koeficijent određivanja, R^2
$720 - 760 \text{ cm}^{-1}$	$y = (2,80 \pm 0,77) + (0,34 \pm 0,03)x$	0,997
$1560 - 1610 \text{ cm}^{-1}$	$y = (2,17 \pm 0,65) + (0,24 \pm 0,02)x$	0,996

Nakon urađene kalibracije, na osnovu kalibracionih prava dobijenih za dve oblasti na FTIR spektru: $720 - 760 \text{ cm}^{-1}$ i $1560 - 1610 \text{ cm}^{-1}$ i na osnovu površina pikova u ovim oblastima FTIR spektara ispitivanih PVC artikala u obliku polimernog diska, izračunata je koncentracija DEHP-a izražena u masenim procentima u svakom PVC artiklu. Podaci kvantitativnog određivanja DEHP-a FTIR metodom su dati u Tabeli 31.

Tabela 31. Poređenje FTIR, GC-MS i gravimetrijskog određivanja ftalata u PVC artiklima

Plastični artikal	Određen ukupan sadržaj ftalata (mas%)					
	GC-MS tehnika			Gravimetrijsko određivanje		
	FTIR	u supernatantu nakon precipitacije <i>n</i> -heksanom	u supernatantu nakon precipitacije metanolom	30 dana migracije	Masa ftalata u supernatantu	Smanjenje mase nakon uklanjanja ftalata
Cevi za transfuziju	27,5 ± 0,6	28,8 ± 0,6	29,8 ± 0,7	28,8 ± 0,7	29,3 ± 0,3	29,0 ± 0,4
Cevi za infuziju	27,0 ± 0,3	26,1 ± 0,1	26,9 ± 0,6	26,4 ± 0,2	26,0 ± 0,5	26,1 ± 0,5
Kvadrupolna kesa	24,1 ± 0,2	25,2 ± 0,1	25,9 ± 0,0	25,7 ± 0,1	25,5 ± 0,1	25,7 ± 0,2
Kesa za prenos krvi	22,9 ± 0,2	24,8 ± 0,0	25,6 ± 0,4	25,2 ± 0,1	25,1 ± 0,1	25,2 ± 0,6
Cevi za dijalizu	21,8 ± 0,5	21,8 ± 0,4	22,4 ± 0,5	20,6 ± 1,1	21,0 ± 0,4	21,2 ± 0,4
Dijalizna kesa	17,9 ± 0,6	20,0 ± 0,6	20,6 ± 0,3	18,8 ± 1,1	19,2 ± 0,4	19,3 ± 0,4
Kesa za prijem krvi	4,98 ± 0,17	5,21 ± 0,14	5,38 ± 0,08	5,19 ± 0,01	5,50 ± 0,09	5,56 ± 0,19

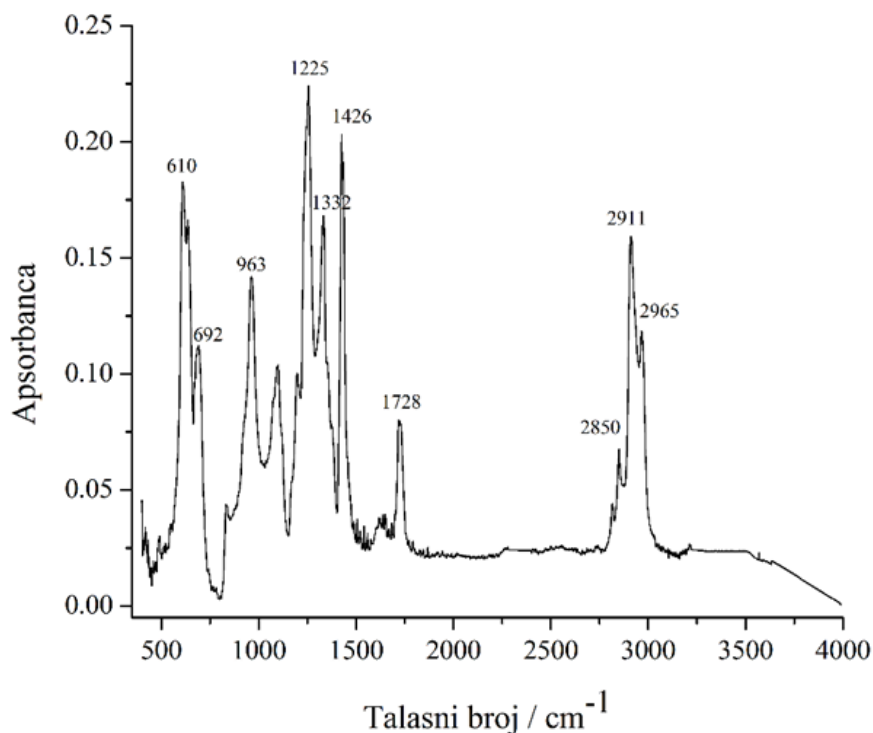
Radi dokazivanja efikasnosti metode precipitacije za potpuno uklanjanje ftalata iz PVC artikla snimljene su KBr tablete na FTIR instrumentu, sačinjene od PVC precipitata dobijenog nakon dodavanja *n*-heksana ili metanola u THF rastvor PVC artikla. Snimanjem KBr tableta FTIR tehnikom dobijeni su FTIR spektri koji pokazuju odsustvo karakterističnih apsorpcionih traka za ftalate: 743 cm^{-1} , 1579 cm^{-1} , 1599 cm^{-1} . Na Slici 19. dat je FTIR spektar kese za prenos krvi nakon precipitacije plastičnog polimera bez ftalata dobijenog gore opisanom metodom. Osim odsustva specifičnih apsorpcionih traka, FTIR spektar KBr tablete pokazuje i smanjen intenzitet apsorpcije ostalih apsorpcionih traka. Dati podaci ukazuju na efikasnost metode precipitacije *n*-heksanom, odnosno da se ovom metodom u potpunosti uklanjaju ftalati iz PVC artikala.



Slika 19. FTIR spektar KBr tablete sačinjene od kese za prenos krvi nakon uklanjanja ftalata *n*-heksanom

Identičan FTIR spektar se dobija i snimanjem polimernog diska dobijenog uparavanjem THF iz rastvora dobijenog rastvaranjem precipitata bez ftalata u THF. Kao još jedan dokaz oslobađanja ftalata iz PVC artikala jeste i nefleksibilnost i krutost polimernog diska nastalog na ovaj način.

Takođe, slični rezultati se dobijaju i kada se metanol koristi kao sredstvo za precipitaciju PVC polimera bez ftalata, što je predstavljeno Slikom 20.



Slika 20. FTIR spektar polimernog diska sačinjenog od kese za transfer krvi nakon uklanjanja ftalata metanolom

Gravimetrijskom metodom je utvrđena masa istaloženog PVC polimera nakon dodavanja *n*-heksana u THF rastvor PVC artikla. Razlika u masi između PVC artikla i dobijenog PVC polimera bez ftalata koji se nalazi u obliku precipitata, predstavlja masu ftalata koja je uklonjena iz PVC artikla.

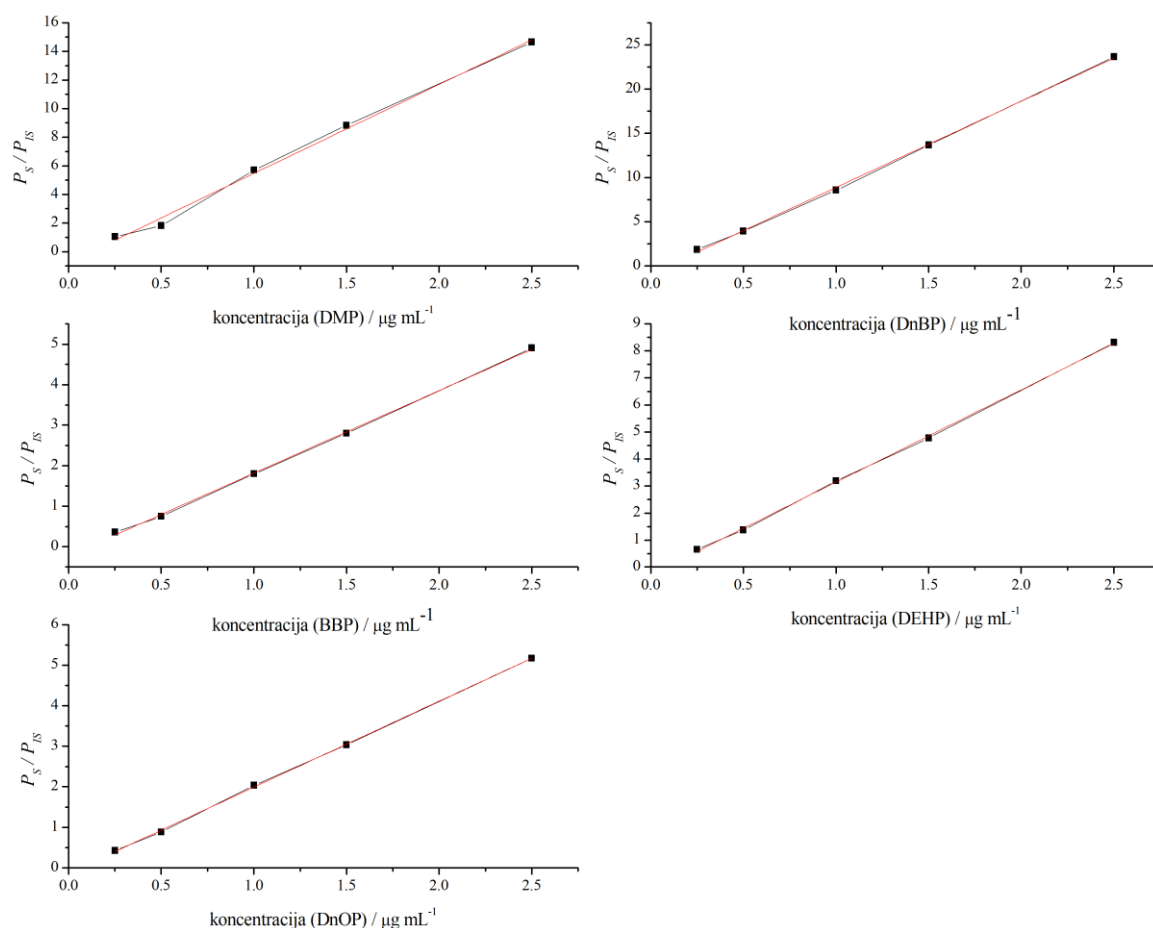
Takođe, gravimetrijskom metodom je utvrđena masa ftalata u PVC artiklima nakon uparavanja THF/*n*-heksan-a iz supernatanta u kom se nalaze rastvoreni ftalati. Nakon uparavanja ovog rastvora, dobija se polimerni film koji je jako elastičan i fleksibilan, što ukazuje na prisustvo ftalata. Podaci gravimetrijskog određivanja ftalata nalaze se u Tabeli 31.

9.2. Rezultati određivanja ftalata u PCM artiklima i igračkama GC-MS tehnikom

9.2.1. Validacioni parametri GC-MS metode određivanja ftalata u PCM artiklima i PVC igračkama

9.2.1.1. Linearnost analitičke metode

U cilju dobijanja kalibracionih prava instrumenta najpre su pomoću GC-MS tehnike snimljeni standardni rastvori analiziranih ftalata (DMP, DnBP, BBP, DEHP i DnOP) čije se koncentracije kreću u opsegu 0,25 do 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dobijene kalibracione prave instrumenata linearne su u ovom opsegu koncentracija sa kalibracionim koeficijentima višim od 0,990 za svaki ftalat i date su na Slici 21. U Tabeli 32. su date jednačine dobijenih kalibracionih prava za DMP, DnBP, BBP, DEHP i DnOP sa vrednostima koeficijenata korelacije.



Slika 21. GC-MS kalibraciona prava u opsegu koncentracija 0,25 – 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za:

a) DMP, b) DnBP, c) BBP, d) DEHP i e) DnOP

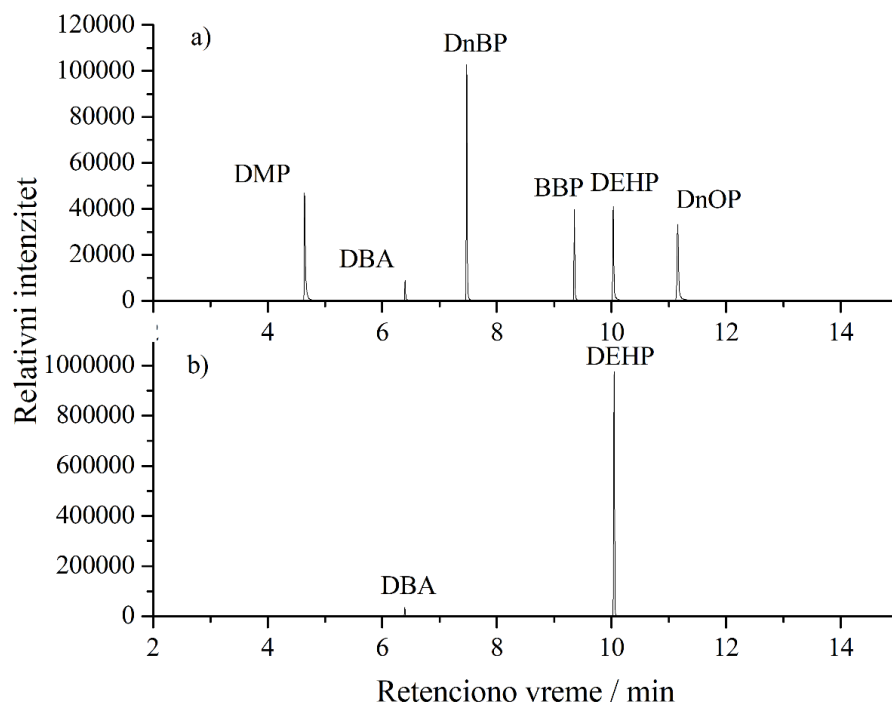
Tabela 32. Jednačine kalibracionih prava za DMP, DnBP, BBP, DEHP i DnOP sa vrednostima koeficijenata korelacije

Ime ftalata	Jednačine kalibracionih prava	R ²
DMP	$y = (6,219 \pm 0,225)x - (0,751 \pm 0,316)$	0,995
DnBP	$y = (9,753 \pm 0,149)x - (0,881 \pm 0,208)$	0,999
BBP	$y = (2,037 \pm 0,032)x - (0,222 \pm 0,044)$	0,999
DEHP	$y = (3,418 \pm 0,044)x - (0,275 \pm 0,062)$	0,999
DnOP	$y = (2,121 \pm 0,024)x - (0,129 \pm 0,034)$	0,999

9.2.1.2. Selektivnost/Specifičnost analitičke metode

Pomoću FS i SIM GC-MS hromatograma je izvršeno ispitivanje specifičnosti i selektivnosti metode. Hromatogram standardnog rastvora ispitivanih ftalata i DBA kao internog standarda, snimljen u SIM modu na GC-MS instrumentu, dat je na Slici 22 a. Ovaj hromatogram pokazuje dobro odvajanje pet ftalata i DBA u toku vremena od 13,5 min. Identifikacija DMP, DnBP, BBP, DEHP i DnOP je izvršena na osnovu prisustva pika target i kvalifikacionih jona na određenom retencionom vremenu, kao i na osnovu njihovih intenziteta. Kao target jon za sve ispitivane ftalate, osim za DMP, odabran je jon m/z 149, dok je za DMP odabran jon m/z 163. Target jon za DBA je m/z 185. Vrednosti m/z target i kvalifikacionih jona i retencionna vremena ftalata su dati u Tabeli 33.

Na Slici 22 b. dat je SIM GC-MS hromatogram PCM artikla – kese za prenos krvi prilikom transfuzije, koji na osnovu hromatograma standardnog rastvora pet ftalata predstavljenog na Slici 22 a. i na osnovu podataka datih u Tabeli 33. ukazuje na prisustvo samo jednog ftalata. Na retencionom vremenu 10,03 se u standardnom rastvoru javljao DEHP, što je potvrda da se u analiziranom uzorku PCM artikla javlja samo DEHP. GC-MS metoda je selektivna s obzirom na to da je relativno retenciono vreme zadržano za DEHP u uzorku u poređenju sa standardnim rastvorom.



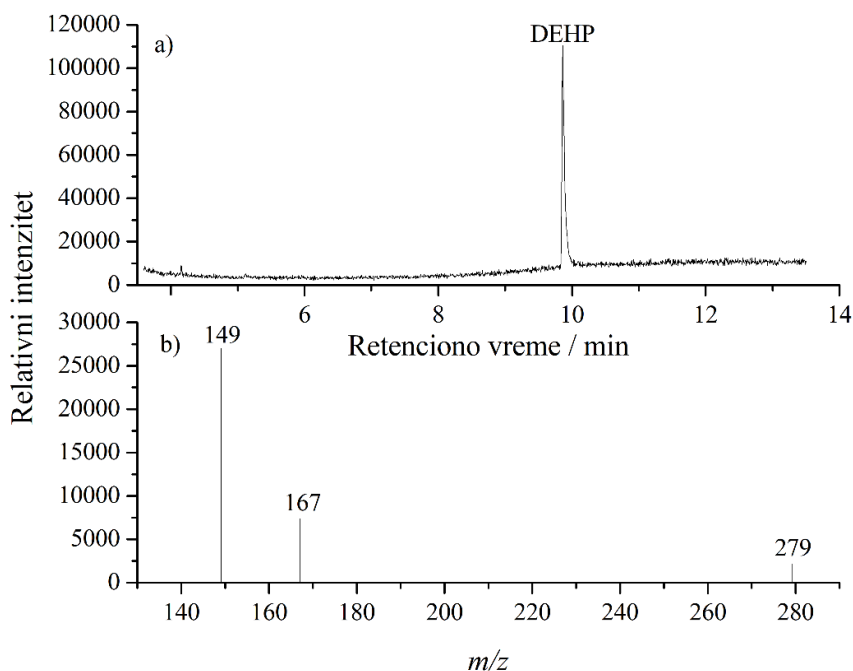
Slika 22. a) SIM GC-MS hromatogram standardnog rastvora ftalata i DBA, u koncentraciji $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; b) SIM GC-MS hromatogram PCM artikla (kese za prenos krvi)

Tabela 33. Target i kvalifikacioni joni analiziranih ftalata i retenciono vreme na GC-MS hromatogramu

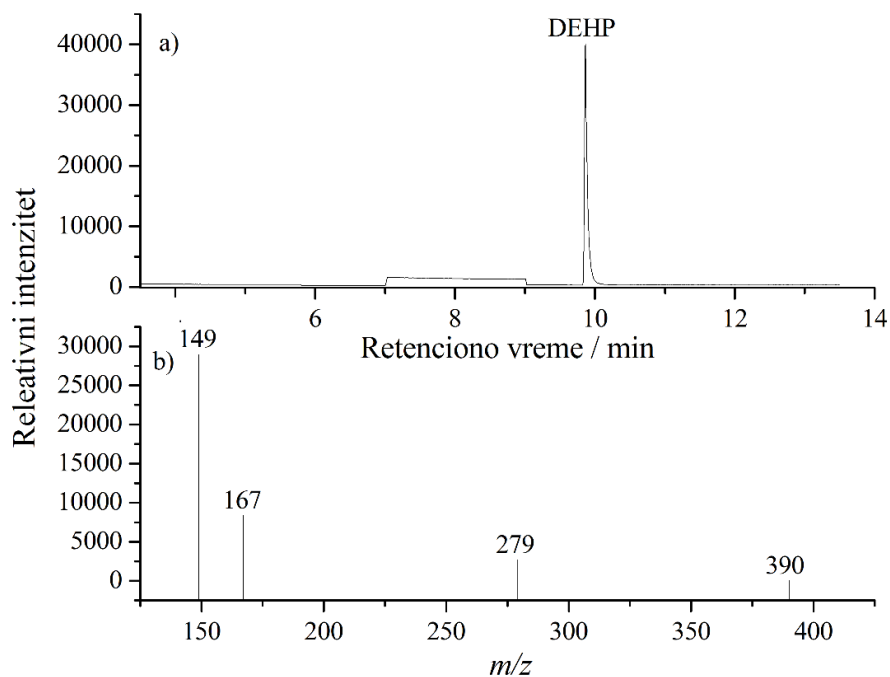
	Retenciono vreme (min)	Target jon (m/z)	Kvalifikacioni joni (m/z)
DMP	4,64	163	50, 77, 194
DnBP	7,47	149	167, 205, 223, 278
BBP	9,35	149	91, 206, 312
DEHP	10,03	149	167, 279, 390
DOP	11,16	149	167, 261, 279, 390

FS GC-MS hromatogram standardnog rastvora DEHP-a u koncentraciji od $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ je dat na Slici 23 a. i na datom hromatogramu nisu primećene nikakve smetnje (signali, pikovi, tragovi jona) u regionu gde se pojavljuje DEHP, iz čega proizilazi da je ispitivana metoda specifična. Takođe, odnos intenziteta target jona i kvalifikacionih jona za DEHP na FS GC-MS hromatogramu u standardnom rastvoru i uzorcima je u okviru preporučenog od strane *European commission decision 2002/657/EC* iz čega takođe proizilazi da je metoda selektivna, kao što je prikazano na Slikama 23 a. i 23 b. Isti trend važi i za odnos target jona

i kvalifikacionih jona za DEHP kada se koristi režim praćenja jednog jona (SIM režim), kao što je prikazano na Slikama 24 a. i 24 b.



Slika 23. a) FS GC-MS hromatogram standardnog rastvora DEHP-a u koncentraciji $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$; b) MS-FS GC-MS hromatogram standardnog rastvora DEHP-a u koncentraciji $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 24. a) SIM GC-MS hromatogram standardnog rastvora DEHP-a u koncentraciji $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$; b) MS-SIM GC-MS hromatogram standardnog rastvora DEHP-a u koncentraciji $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$

9.2.1.3. LOD / LOQ analitičke metode

Granica određivanja (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) izračunati su iz odnosa odnosa signal/šum koji su pomnoženi sa faktorima 3 i 10, respektivno (LONG *et al.*, 1983) i ove vrednosti su date u Tabeli 34.

Tabela 34. Granica određivanja i granica kvantifikacije analitičke metode

	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%) (n=3)
DMP	0,03	0,10	7,14
DnBP	0,03	0,10	10,00
BBP	0,03	0,10	6,67
DEHP	0,03	0,10	6,67
DnOP	0,06	0,20	12,50

9.2.2. Rezultati GC-MS analize PCM artikala

Nakon odgovarajuće pripreme uzoraka opisane u poglavlju 6.7.2. izvršeno je određivanje ftalata u 7 PVC PCM artikala pomoću GC-MS tehnike. Dobijeni su hromatogrami svakog analiziranog PVC PCM artikla i na Slici 22 b. je dat hromatogram jednog PCM artikla – kese za prenos krvi prilikom medicinskog tretmana transfuzije. Prikazani hromatogram ukazuje na prisustvo DEHP-a u navedenom PCM artiklu, pri čemu odsustvo pikova na retencionom vremenu 4,64, 7,47, 9,35 i 11,16 ukazuje na odsustvo ostalih ispitivanih ftalata u PCM artiklu. Ovaj trend je zapažen i kod ostalih ispitivanih PCM artikala (dijalizne kese, cevi za dijalizu, kese za prijem krvi, kvadrupolne kese, cevi za tranfuziju i cevi za infuziju). Na osnovu urađene kalibracije (poglavlje 9.2.1.1.) izvršena je kvantifikacija DEHP-a u PVC PCM artiklima. Rezultati kvantifikacije DEHP-a u PCM artiklima koji su dobijeni precipitacijom polimera *n*-heksanom i metanolom i prelaskom DEHP-a u supernatant, prikazani u masenim% DEHP-a u PCM artiklima u opadajućem nizu u Tabeli 31.

9.2.3. Rezultati GC-MS analize PVC igračkaka

Nakon odgovarajuće pripreme 18 PVC igračkaka opisane u poglavlju 6.7.2. izvršeno je određivanje koncentracije ftalata u uzorcima pomoću GC-MS tehnike. Od pet analiziranih ftalata, detektovan je samo DEHP. Na osnovu urađene kalibracije, izvršena je kvantifikacija DEHP-a i rezultati kvantifikacije DEHP-a u 18 analiziranih igračkaka prikazani su u Tabeli 35.

Tabela 35. Rezultati kvantifikacije DEHP-a u PVC igračkama GC-MS tehnikom

	DEHP (mg g ⁻¹)	DEHP (mas%)
Igračka 1	532,42 ± 27,20	53,24 ± 2,72
Igračka 2	430,01 ± 9,40	43,00 ± 0,94
Igračka 3	406,89 ± 9,19	40,69 ± 0,92
Igračka 4	402,38 ± 11,19	40,24 ± 1,12
Igračka 5	400,05 ± 19,46	40,01 ± 1,95
Igračka 6	373,55 ± 18,54	36,87 ± 1,61
Igračka 7	368,72 ± 16,07	36,87 ± 1,61
Igračka 8	368,21 ± 11,73	36,82 ± 1,17
Igračka 9	364,38 ± 6,43	36,44 ± 0,64
Igračka 10	313,42 ± 11,12	31,34 ± 1,11
Igračka 11	295,02 ± 6,31	29,50 ± 0,63
Igračka 12	270,35 ± 19,21	27,04 ± 1,92
Igračka 13	102,68 ± 3,06	10,27 ± 0,31
Igračka 14	1,34 ± 0,09	0,13 ± 0,01
Igračka 15	1,20 ± 0,20	0,12 ± 0,02
Igračka 16	0,83 ± 0,09	0,08 ± 0,01
Igračka 17	0,47 ± 0,02	0,05 ± 0,00
Igračka 18	0,45 ± 0,08	0,05 ± 0,01

10. REZULTATI ODREĐIVANJA MIGRACIJE FTALATA IZ FCM-A, PCM-A I IGRAČAKA U RAZLIČITE MATRIKSE

10.1. Rezultati određivanja migracije ftalata iz PCM-a i FCM-a u model recipijent

Nakon odgovarajuće pripreme 44 platičnih artikala opisane u poglavlju 6.12.1. i izvršene migracije ftalata iz FCM i PCM artikala u *n*-heksan kao model recipijent u različitim vremenskim intervalima (6, 15 i 30 dana) izvršeno je snimanje pripremljenih uzoraka pomoću GC-MS tehnike. Dobijeni hromatogrami model recipijenata pokazuju odsustvo DMP-a, DnBP-a, BBP-a i DnOP-a u svih 44 artikala. Hromatogramima je takođe potvrđeno prisustvo DEHP-a u 7 model recipijenata u kojima su bili uronjeni PVC artikli i odsustvo DEHP-a u presotalih 37 model recipijenata u kojima su bili uronjeni plastični artikli koji nisu PVC. Na osnovu činjenice da ni nakon 30 dana migracionog testa nije došlo do detekcije analiziranih 5 ftalata zaključuje se da 37 plastičnih artikala napravljenih od PET, LDPE, HDPE, PP, PS i PC polimera ne sadrže nijedan od ispitivanih ftalata. Rezultati analize migracije ftalata iz FCM i PCM artikala GC-MS tehnikom prikazani su u Tabeli 36.

Tabela 36. GC-MS određivanje ftalata u FCM i PCM artiklima

Redni broj	Ime uzorka	Tip polimera	Koncentracija ftalata u artiklu (mg g ⁻¹)				
			DMP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP
FCM							
1.	Flaša za mleko	PET	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2.-3.	Kesa za mleko	PP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4.-14.	Flaša za jogurt	PP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15.-21.	Čaša za jogurt	PP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22.	Čaša za kiselo mleko	PP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23.-24.	Flaša za mineralnu vodu	PP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25.	Kuhinjska folija	celofan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26	Kuhinjska daska za sečenje	HDPE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27.	Kutija za jednokratnu upotrebu	PET	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28.	Tanjir za jednokratnu upotrebu	PS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29.	Kutija za jaja	PS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	Kesa za zamrzivač	PET/PP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
31.	Kesa za jednokratnu upotrebu	HDPE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32.	Kesa sa zipom	LDPE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33.	Kesa za pakovanje proizvoda	PC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
34.	Granulat	HDPE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35.	Granulat	LDPE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PCM							
36.	Cevi za transfuziju	PVC	n.d.	n.d.	n.d.	287,58	n.d.
37	Dijalizna kesa	PVC	n.d.	n.d.	n.d.	188,14	n.d.
38	Cevi za infuziju	PVC	n.d.	n.d.	n.d.	263,60	n.d.
39.	Kesa za prenos krvi	PVC	n.d.	n.d.	n.d.	251,68	n.d.
40.	Četvorostruki sistem kesa	PVC	n.d.	n.d.	n.d.	257,21	n.d.
41.	Kesa za prijem krvi	PVC	n.d.	n.d.	n.d.	51,90	n.d.
42.	Cevi za dijalizu	PVC	n.d.	n.d.	n.d.	205,71	n.d.
43.-44.	Boca za infuziju	LDPE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*n.d. – nije detektovano

Količina migriranog DEHP-a iz PVC artikala u odnosu na period trajanja migracionog testa sa standardnom devijacijom (n=3) je data u Tabeli 37. Prikazani rezultati pokazuju da se koncentracija migriranog DEHP-a u *n*-heksan kreće od 5,19 do 28,76 mas% u odnosu na masu PVC artikla nakon 30 dana izluživanja.

Tabela 37. Koncentracija migriranog DEHP (mg g^{-1}) iz PVC artikala nakon različitog perioda migracionog testa (6, 15 i 30 dana)

PVC artikal	Koncentracija migriranog DEHP (mg g^{-1})		
	Trajanje migracionog testa (dan)		
	6	15	30
Cevi za transfuziju	$139,40 \pm 1,27^a$	$177,80 \pm 3,44^b$	$287,58 \pm 7,67^c$
Cevi za infuziju	$127,35 \pm 1,20^a$	$161,43 \pm 1,76^b$	$263,60 \pm 6,36^c$
Četvorostruki sistem kesa	$119,45 \pm 1,48^a$	$152,60 \pm 2,21^b$	$257,21 \pm 5,95^c$
Kesa za prenos krvi	$120,20 \pm 0,57^a$	$154,62 \pm 7,35^b$	$251,68 \pm 3,79^c$
Cevi za dijalizu	$101,45 \pm 1,34^a$	$109,91 \pm 4,41^a$	$205,71 \pm 7,23^b$
Dijalizna kesa	$91,50 \pm 2,97^a$	$100,33 \pm 4,98^a$	$188,14 \pm 6,87^b$
Kesa za prijem krvi	$23,60 \pm 0,71^a$	$26,37 \pm 2,16^a$	$51,90 \pm 0,14^b$

a-c vrednosti označene istim slovom u redu se statistički ne razlikuju značajno za nivo $p < 0,05$ (Tukey's HSD test)

Da bi se utvrdilo da li postoji značajna razlika između rezultata dobijenih nakon različitog perioda migracije (6, 15 i 30 dana), dobijene koncentracije DEHP date u Tabeli 37. su upoređene korišćenjem Tukey's HSD testa (*engl.* Honest significant difference). Vrednosti značajne razlike (HSD) za svaki par rezultata su izračunate pomoću programa Origin[®], za $p < 0,05$, i upoređene su sa tabličnom vrednošću 4,34 (HAMPTON *et al.*, 2006). Dobijeni rezultati pokazuju da postoji značajna razlika u migraciji DEHP-a nakon 6, 15 i 30 dana za sledeće PVC artikale: cevi za transfuziju, cevi za infuziju, kvadrupolne kese i kese za prenos krvi. Za preostala tri analizirana PVC artikla ne postoji značajna razlika u migraciji DEHP-a za period od 6 i 15 dana, dok postoji razlika u migraciji DEHP-a za period od 30 dana u odnosu na 6 i 15 dana migracije.

U cilju upoređivanja migracije ftalata iz različitih plastičnih artikala definisan je potencijal migracije ftalata za svaki proizvod, koji je predstavljen koeficijentom raspodele plastika/heksan, $K_{P/H}$. Ovim koeficijentom je predstavljen odnos mase ftalata u plastičnom materijalu (masa dobijena GC-MS analizom ftalata u supernatantu nakon taloženja polimera *n*-heksanom) i mase ftalata migrirane u recipijent nakon 6 i 15 dana. Veća vrednost $K_{P/H}$ pokazuje da ftalati teže migriraju iz plastike u recipijent. Očekuje se da potencijal izluživanja ftalata iz plastike zavisi od njihove molekulske mase, voluminoznosti, polarnosti, rastvorljivosti, hemijske veze, tačke ključanja, kao i od početne koncentracije u plastici, ali takođe zavisi i od svojstava samog plastičnog materijala. Ftalati male molekulske mase imaju visok potencijal izluživanja zbog svojih niskih tački ključanja i

malih veličina molekula, jer im je time omogućeno lakše kretanje kroz plastični materijal. Ftalati veće molekulske mase, zbog većeg broja atoma ugljenika u grupama estera, utiču na povećanje tačke ključanja ftalata, kao i na povećanje njihove voluminoznosti, pa s tim u vezi imaju veću vrednost $K_{P/H}$.

S obzirom na to da je iz analiziranih PVC artikala migrirao samo DEHP, upoređivanjem vrednosti $K_{P/H}$ za DEHP koje su date u Tabeli 38., upoređeni su plastični PVC artikli i uticaj vremena migracije. DEHP teže migrira iz cevi za dijalizu, dijalizne kese i kese za prijem krvi prilikom tretmana transfuzije, u poređenju sa ostalim PVC artiklima, iako su razlike veoma male. Sa porastom vremena trajanja migracionog testa, jačina veze između DEHP i plastike opada, pa migracija DEHP-a ide lakše, pa su zato vrednosti za $K_{P/H}$ manje nakon vremena trajanja migracionog testa od 15 dana u poređenju sa vrednostima $K_{P/H}$ za 6 dana.

Tabela 38. Koeficijenti raspodele plastika/heksan, $K_{P/H}$, za različito vreme trajanja migracionog testa

PVC artikal	$K_{P/H}$		
	Period migracionog testa (dani)		
	6	15	30
Cevi za transfuziju	2,07	1,62	1,00
Cevi za infuziju	2,05	1,62	0,99
Kvadrupolna kesa	2,11	1,65	0,98
Kesa za prenos krvi	2,06	1,61	0,99
Cevi za dijalizu	2,15	1,98	1,06
Dijalizna kesa	2,19	2,00	1,06
Kesa za prijem krvi	2,21	1,98	1,00

10.2. Rezultati određivanja uticaja faktora na migraciju ftalata iz plastičnog artikla u mlečne proizvode

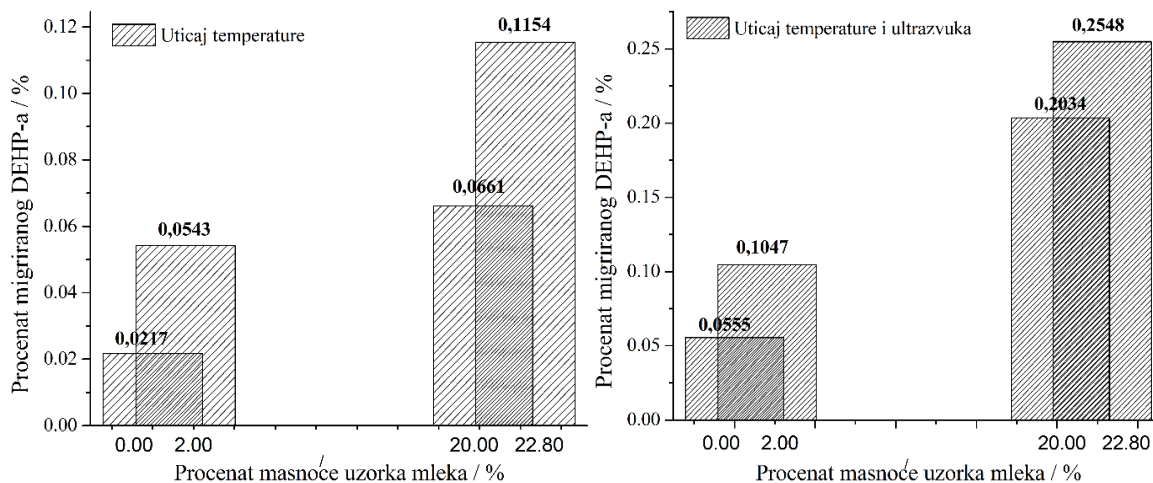
Cilj ove analize bio je poređenje uticaja sledećih faktora: (1) vremena izlaganja uzoraka mleka i mlečnih proizvoda plastičnoj ambalaži kao izvoru DEHP-a na temperaturi od 60°C 60 minuta, sa krajnjim ukupnim vremenom izlaganja od 60 h i (2) vremena izlaganja uzoraka mleka i mlečnih proizvoda plastičnoj ambalaži pod dejstvom ultrazvuka kao dodatnog efekta već postavljenog migracionog testa na temperaturi od 60°C (poglavlje 6.12.2). Takođe, izvršeno je i poređenje mlečnih proizvoda kao recipijenata DEHP-a u funkciji sadržaja masti u navdenim proizvodima. Najpre je utvrđeno da je sadržaj DEHP-a u uzorcima mleka ispod granice detekcije nakon čega su izvršeni migracioni testovi. Dobijeni rezultati migracionih testova i analize GC-MS tehnikom navedeni su u Tabeli 39.

Tabela 39. Uticaj faktora na migraciju DEHP-a u uzorke mlečnih proizvoda

Recipijent	Masa dijalizne kese (g)	Masa DEHP-a u dijaliznoj kesi (g)	Ukupno vreme migracije (min)	Maksimalna količina migriranog DEHP-a (µg)	Procenat migriranog DEHP-a (%)
(1)	Voda	1,7410	2500	135,67±1,23	0,02
	Surutka u prahu	1,6113	2950	311,83±1,40	0,05
	Mleko u prahu	1,6200	2900	384,66±3,61	0,07
	Infant formula	1,4560	3000	601,29±2,73	0,12
(2)	Voda	1,4709	1450	292,16±1,37	0,06
	Surutka u prahu	1,4924	2700	559,45±0,78	0,10
	Mleko u prahu	1,6049	2800	1170,33±1,96	0,20
	Infant formula	1,4502	2700	1323,36±1,87	0,25

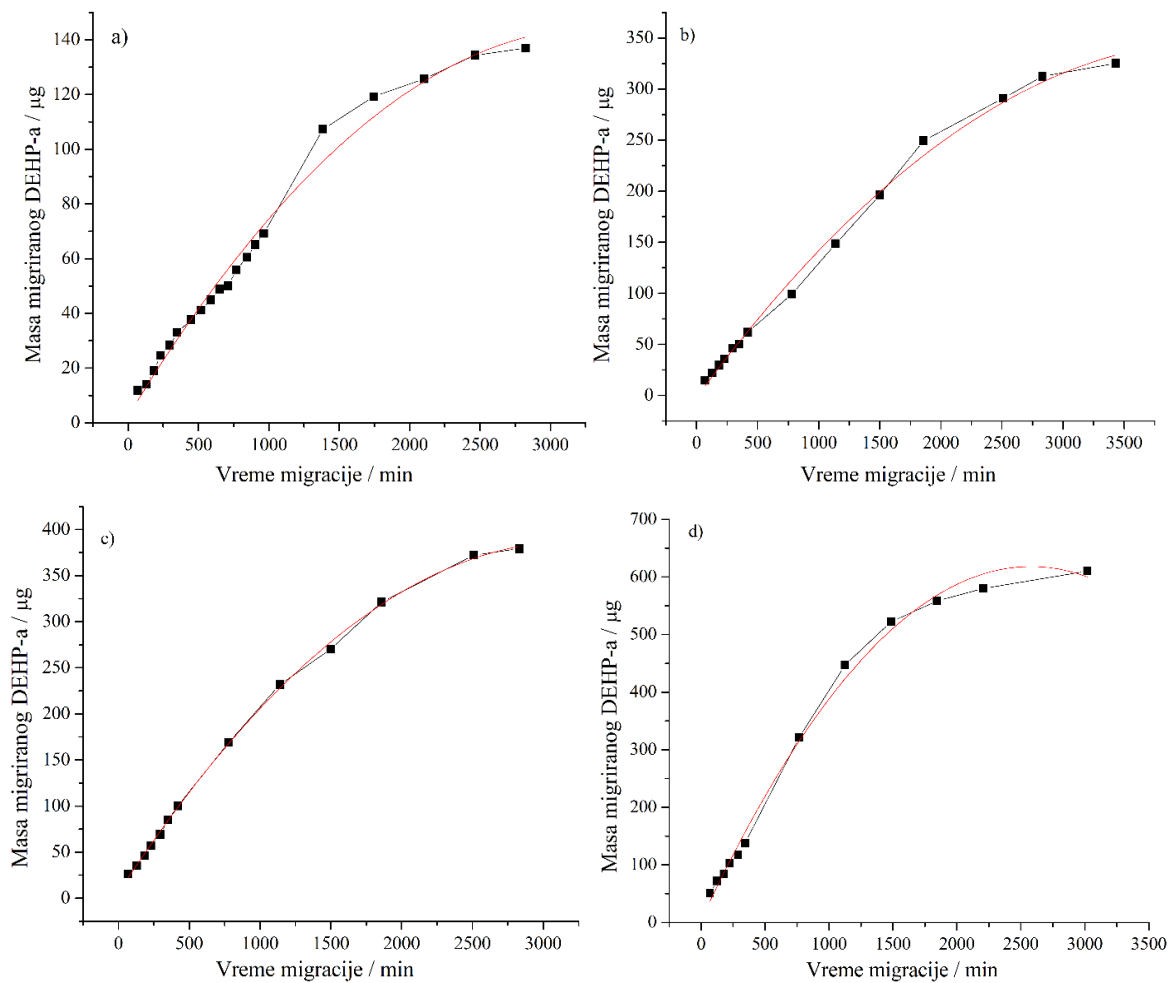
Upoređujući različite uzorke mlečnih proizvoda kao recipijenata DEHP-a iz plastičnog artikla, mlečni proizvod sa najvišim procentom masti bio je najbolji recipijent za migrirani DEHP, jer je DEHP nepolarni molekul sa najvećom tendencijom prelaska u nepolarni medijum kao što je masna hrana. S obzirom na to da infant formula sadrži 22,80% mlečne masti, to je ujedno i ispitivani mlečni proizvod koji se pokazao kao najbolji recipijent DEHP-a. Potom sledi mleko u prahu sa 20% sadržaja mlečne masti, surutka u prahu sa 2% sadržaja mlečne masti i voda bez sadržaja mlečne masti. Isti trend migracije DEHP-a ustanovljen je u oba postavljena eksperimenta, i u uslovima migracije pod dejstvom povišene temperature i u uslovima potpomognute migracije ultrazvukom, s tim da

migracija potpomognuta ultrazvučnim talasima ima veći efekat na migraciju DEHP-a (Slika 25.). Maksimalna količina migriranog DEHP-a je bila 601,29 μg , 384,66 μg , 311,83 μg i 135,67 μg za infant formulu, mleko u prahu, surutku u prahu i vodu, redom. Istim redom opada i masa migriranog DEHP-a pod dejstvom ultrazvuka, pri čemu su količine migriranog DEHP-a sledeće: 1323,36 μg , 1170,33 μg , 559,45 μg i 292,16 μg .

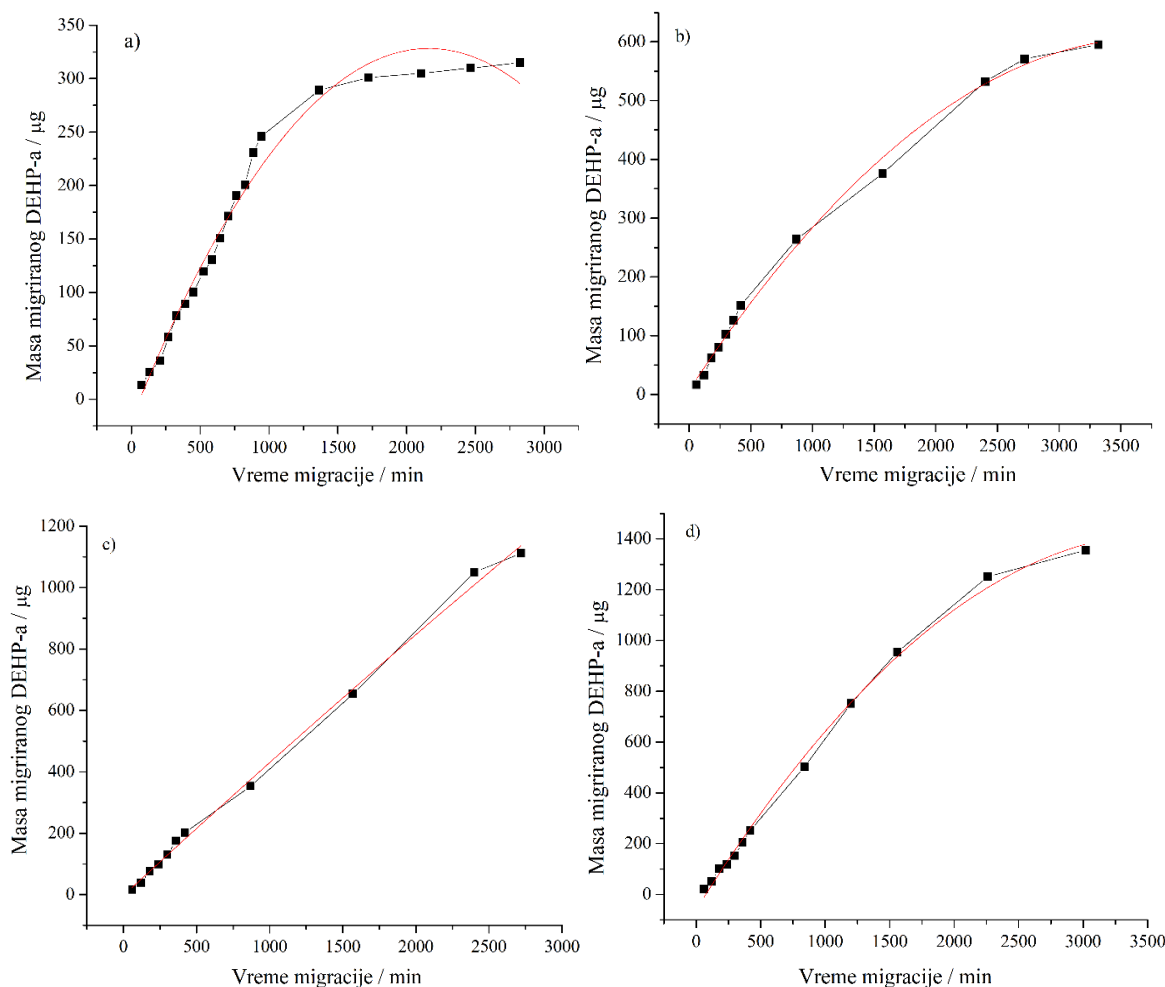


Slika 25. Uticaj temperature i ultrazvuka na migraciju DEHP-a iz plastične ambalaže u matrikse hrane različitog procenta masnoće

Ispitivanje vremena izlaganja plastične ambalaže navedenim uticajima pokazalo je da sa povećanjem vremena izlaganja navedenog plastičnog artikla povećanoj temperaturi ili ultrazvuku raste i masa migriranog DEHP-a u mlečnim proizvodima. Masa linearno raste sa vremenom, nakon čega dolazi do zasićenja, što ukazuje pojava platoa na krivoj $m = f(t)$, gde je m masa migriranog DEHP-a a t vreme izlaganja uticaju različitih faktora. Ovaj plato pokazuje da se pod uticajem temperature i ultrazvuka posle određenog vremena ne odvija migracija (Slika 26. i 27.).



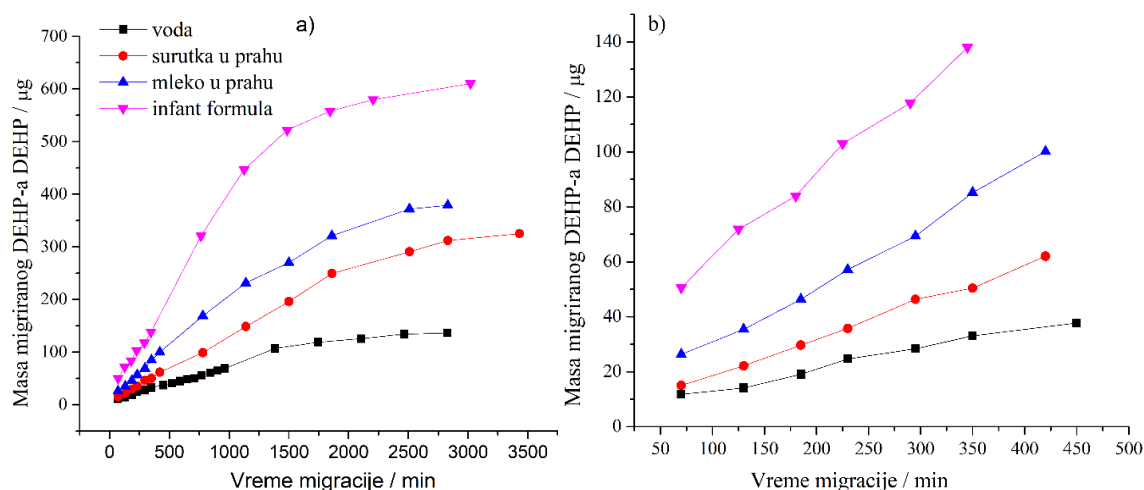
Slika 26. Masa migriranog DEHP sa porastom vremena izlaganja plastične ambalaže uticaju temperature u mlečne proizvode: a) vodu, b) surutku u prahu, c) mleko u prahu, d) infant formulu



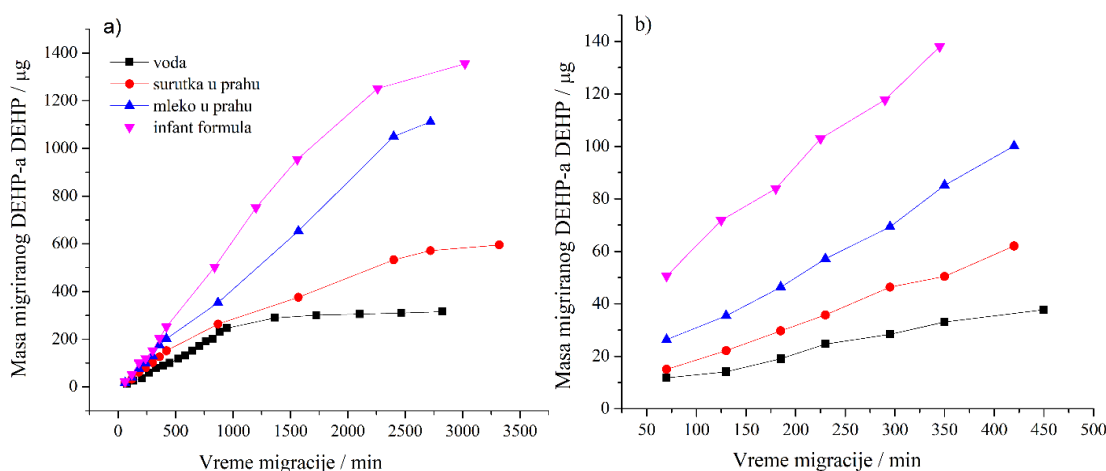
Slika 27. Masa migriranog DEHP-a sa porastom vremena izlaganja plastične ambalaže uticaju temperature potpomognutim uticajem ultrazvuka u mlečne proizvode: a) vodu, b) surutku u prahu, c) mleko u prahu, d) infant formulu

Sa dobijenih grafika se vidi da je maksimalna količina migriranog DEHP-a postignuta brže zahvaljujući kombinovanom efektu povećane temperature i ultrazvuka u poređenju sa efektom samo temperature na migraciju DEHP-a. Primena ultrazvuka kao dodatnog efekta na migraciju DEHP-a u vodu je smanjila vreme izlaganja plastičnog ambalažnog materijala sa 2500 min na 1450 min, zasićenje je postignuto 1000 min brže (Tabela 39.). Vreme izlaganja plastičnog ambalažnog materijala je skraćeno i za ostale recipijente DEHP-a pod uticajem ultrazvuka za 100 do 300 minuta u odnosu na vreme izlaganja tog materijala samo uticaju temperature. Razlog za ovu razliku u vremenima izlaganja je taj što je voda, kao polarni molekul, samo „skinula“ molekule DEHP-a sa površine plastike, dok nepolarni uzorci mleka mogu da rastvaraju DEHP iz plastičnih materijala i za to je potreban duži period.

Kada se posmatra kriva rasta migriranog DEHP sa vremenom izlaganja ($m = f(t)$) primećuje se da je navedeni odnos mase i vremena izlaganja linearan u prvom vremenskom periodu od 450 min (Slika 28. i 29.) sa većim nagibom krive, što pokazuje da sa malim porastom vremena dolazi do veće promene u masi izluženog DEHP-a. Takođe se na osnovu tabelarnih podataka vidi da se u ovom periodu dogodi 30% migracije DEHP-a (Tabela 40.).



Slika 28. Masa migriranog DEHP pod uticajem temperature a) u vremenskom periodu od 3500 minuta, b) u vremenskom periodu od 450 minuta



Slika 29. Masa migriranog DEHP pod uticajem temperature potpomognutom sa uticajem ultrazvuka a) u vremenskom periodu od 3500 minuta, b) u vremenskom periodu od 450 minuta

Tabela 40. Masa migriranog DEHP-a pod uticajem temperature i ultrazvuka u različitim vremenskim intervalima

Masa migriranog DEHP-a u uzorke mlečnih proizvoda (μg)				
	Vremenski interval izlaganja plastičnog artikla uticaju temperature		Vremenski interval izlaganja plastičnog artikla uticaju temperature sa dodatnim efektom ultrazvuka	
	450 min	3000 min	450 min	3000 min
Voda	37,99	142,93	110,35	275,75
Surutka u prahu	67,45	315,59	142,35	582,73
Mleko u prahu	104,91	385,72	193,83	1247,18
Infant formula	199,81	601,72	283,71	1376,69

Ukoliko se uporede efekti temperature i ultrazvuka, u bilo kom vremenskom periodu migracija DEHP-a je veća pod uticajem ultrazvuka kao dodatnog efekta temperature. Stepenn migracije DEHP-a u mleko u prahu kao recipijenta pod uticajem povećene temperature i dejstva ultrazvuka porastao je za 223,34%, 128,79% za infant formulu, 92,93% za vodu, 84,65% za surutku u prahu.

Povećana efikasnost migracije DEHP-a je posledica snage i energije koju stvaraju oscilacije proizvedene ultrazvukom. Pod uticajem energije ultrazvuka, dolazi do migracije DEHP-a najpre sa površine plastike, nakon čega se kasnije usled koncentracionog gradijenta javlja i migracija DEHP-a iz unutrašnjih slojeva PVC plastičnog artikla.

10.3. Rezultati određivanja migracije ftalata u model recipijent i veštačku pljuvačku

Nakon odgovarajuće pripreme uzoraka i razvoja metode tečno-tečne ekstrakcije ftalata iz veštačke pljuvačke opisane u poglavlju 6.11., pripremljeni uzorci su snimljeni korišćenjem GC-MS tehnike i rezultati kvantitativnog određivanja ftalata su prikazani u Tabeli 41.

Tabela 41. *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz veštačke pljuvačke optimizovanom metodom

Nivo spajka ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>Recovery</i> (%)				
	DMP	DBP	BBP	DEHP	DOP
1	79,44	63,16	91,11	77,15	82,23
2	76,30	66,27	95,64	73,12	79,21
3	64,20	60,18	86,31	76,89	80,36
4	71,11	64,98	90,60	77,10	79,32
6	66,57	65,41	90,52	80,91	82,10

Srednja vrednost *Recovery* vrednosti za DEHP sa standardnom devijacijom iznosi ($77,03 \pm 2,76$)%. Ovo je vrednost koja će se koristiti za praćenje stepena migracije DEHP-a iz PVC igračkama u veštačku pljuvačku, s obzirom na to da je u PVC igračkama detektovan i kvantifikovan samo DEHP.

Nakon odgovarajuće pripreme uzoraka PVC igračkama i postavljanja migracionih testova opisanih u poglavlju 6.12.3. izvršeno je određivanje ftalata u model recipijentu nakon 6, 15 i 30 dana trajanja migracionog testa pomoću GC-MS tehnike. Na osnovu poznatog masenog% DEHP-a u analiziranim igračkama, izračunat je procenat migracije ftalata iz svake analizirane igračke u model recipijentu nakon 6, 15 i 30 dana trajanja migracionog testa i podaci su prikazani u Tabeli 42.

Na osnovu podataka prikazanih u Tabeli 42. zaključuje se da je procenat migracije DEHP-a veći kod Igračke 7 nakon svakog migracionog testa, u različitim vremenskim periodima. Razlog za to je najverovatnije taj što su PVC igračke sečene na parčiće površine $0,5 \text{ cm}^2$, a s obzirom na to da je parče Igračke 12 veće debljine, površina od $0,5 \text{ cm}^2$ je samim tim i veće mase. Kontakt model recipijenta i DEHP-a u plastičnom materijalu je verovatniji i manje vremena je potrebno da dođe do migracije DEHP-a u model recipijent kada je u pitanju artikal Igračka 8.

Tabela 42. Procenat migracije DEHP-a u odnosu na masu DEHP-a u PVC igrački u *n*-heksan

PVC igračka	Masa PVC igračke (g)	Masa DEHP-a u PVC igrački (µg)	% migracije u odnosu na masu ftalata u PVC igrački		
			6 dana	15 dana	30 dana
Igračka 8	0,0246	9057	64,70	77,29	85,92
Igračka 12	0,0426	11519	60,97	73,26	80,63

Uzimajući u obzir *Recovery* vrednost za efikasnost ekstrakcije DEHP-a iz veštačke pljuvačke nakon optimizacije LLE metode u iznosu od $(77,03 \pm 2,76)\%$ i rezultate dobijene očitavanjem koncentracije DEHP-a migriranog u veštačku pljuvačku nakon migracionih testova u trajanju od 6, 15 i 30 dana i migracionog testa koji simulira realnu situaciju žvakanja igračke u ustima od strane deteta u toku 1 dana u trajanju od 20 minuta, dobijaju se podaci prikazani u Tabeli 43. i 44.

Rezultati pokazuju da do migracije gotovo da i ne dolazi. Stepen migracije za DEHP se kreće od 0,005 do 0,028% za Igračku 8, dok se za Igračku 12 ovaj stepen kreće od 0,014 do 0,030%. Ukoliko pratimo trend migracije u toku jednog dana, odnosno migracije koja se odvija u „realnim“ uslovima (20 minuta žvakanja oponaša 20 minuta *Vortexa*), masa DEHP-a koja se izluži je 3,25 µg za Igračku 8, a 6,21 za Igračku 12 µg. Masa migriranog DEHP-a u odnosu na masu deteta od 10 kg u tom uzrastu iznosi 0,325 µg kg⁻¹, odnosno 0,621 µg kg⁻¹, što je dalako ispod TDI vrednosti za DEHP koja iznosi 0,05 mg kg⁻¹.

Tabela 43. Procenat migracije DEHP-a u veštačku pljuvačku u odnosu na masu DEHP-a u Igrački 8

Igračka 8				
Trajanje migracije	Masa PVC igračke (g)	Masa DEHP-a u PVC igrački (µg)	Maksimalna količina migriranog DEHP-a (µg)	Stepen migracije DEHP-a (%)
1 dan	0,1661	61158	3,25	0,005
6 dana	0,0389	14324	1,62	0,011
15 dana	0,0388	14286	2,14	0,015
30 dana	0,0183	6738	1,86	0,028

Tabela 44. Procenat migracije DEHP-a u veštačku pljuvačku u odnosu na masu DEHP-a u Igrački 12

Igračka 12				
Trajanje migracije	Masa PVC igračke (g)	Masa DEHP-a u PVC igrački (μg)	Maksimalna količina migriranog DEHP-a (μg)	Stepen migracije DEHP-a (%)
1 dan	0,1632	44129	6,21	0,014
6 dana	0,0491	13276	2,10	0,016
15 dana	0,0441	11924	2,14	0,018
30 dana	0,0415	11221	3,36	0,030

10.4. Rezultati određivanja uticaja faktora na migraciju ftalata iz PVC igračkaka u model recipijent i veštačku pljuvačku

Nakon zračenja PVC Igračke 8 i Igračke 12, površine 1 cm^2 , UV-A i UV-C svetlošću određeni vremeski period (UV-A – 1, 2, 4, 6, 12, 24 h, UV-C – 1 i 2 h), kao faktora uticaja na promenu u strukturi polimera a samim tim i na migraciju DEHP-a iz navedenih artikala, određen je stepen migracije DEHP-a iz navedenih plastičnih igračkaka. Stepen migracije je izračunat nakon izvođenja sledećih migracionih testova: migracije DEHP-a u model recipijent (nakon 6,15 i 30 dana) i migracije DEHP-a u veštačku pljuvačku (nakon 6, 15 i 30 dana i u toku jednog dana) i izvođenjem tečno-tečne ekstrakcije DEHP-a iz veštačke pljuvačke optimizovanom metodom.

Najpre je izvršena kvantifikacija DEHP-a u ozračenim igračkama rastvaranjem igračkaka u THF-u po optimizovanoj metodi i snimanjem uzoraka pomoću GC-MS tehnike, kako bi se na osnovu mase DEHP-a u ozračenim igračkama izračunao stepen migracije DEHP-a. Rezultati kvantifikacije su dati u Tabeli 45. Prikazani rezultati pokazuju uticaj UV-A i UV-C svetlosti na svojstva PVC igračkaka po pitanju sadržaja DEHP-a. Zračenjem igračkaka, dolazi do slabljenja jačine interakcije između DEHP-a i polimera i dolazi do migracije DEHP-a u atmosferu, što utiče na smanjenje mas% DEHP-a u igračkama sa povećanjem vremena zračenja. Maseni procenti DEHP-a u Igrački 12 opadaju od vrednosti 27,04 do vrednosti 19,58 mas%, dok je ovaj raspon za Igračku 8 od 36,82 do 30,81 mas%.

UV-A zračenje u trajanju od 2 h dovodi do najznačajnije promene u procentnom sastavu PVC igračkaka, dok se daljim zračenjem procentni sastav DEHP-a smanjuje postepeno.

Takođe, u Tabeli 45. nalaze se i rezultati migracionih testova DEHP-a u model recipijent nakon 6, 15 i 30 dana trajanja migracije DEHP-a. Za razliku od migracije DEHP-a iz neozračenih igračkaka gde je procenat iznosio 80,63% za Igračku 12 i 85,92% za Igračku 8 nakon 30 dana, procenat migracije nakon zračenja igračkaka raste na 97,25% za Igračku 12 i 99,41% za Igračku 8 u odnosu na masu igračke. Isti trend važi i za migracione testove u trajanju od 6 i 15 dana, što potvrđuje da zračenje narušava veze koje postoje između DEHP-a i polimera u PVC igračkama, čime se omogućava lakša migracija DEHP-a.

Tabela 45. Stepen migracije DEHP-a iz ozračenih PVC igračkaka u model recipijent

PVC igračka	Vrsta zračenja	Vreme zračenja (h)	DEHP (mas%)	% izluženog ftalata u odnosu na masu ftalata u PVC igrački				
				6 dana	15 dana	30 dana		
Igračka 12	–	0	27,04±1,92	60,97 ^a	73,26 ^{a,b}	80,63 ^b		
		2	21,87±2,25	65,60 ^a	80,46 ^{a,b}	87,14 ^b		
		4	21,45±1,08	66,19 ^a	81,37 ^{a,b}	88,01 ^b		
		6	20,75±2,46	67,76 ^a	81,66 ^{a,b}	89,49 ^b		
		12	21,67±1,12	70,87 ^a	83,30 ^{a,b}	90,44 ^b		
	UV-A	24	21,13±1,13	71,52 ^a	84,45 ^{a,b}	91,59 ^b		
		UV-C	1	20,03±0,11	75,68 ^a	88,86 ^{a,b}	96,47 ^b	
			2	19,58±0,17	76,25 ^a	90,49 ^{a,b}	97,25 ^b	
		Igračka 8	–	0	36,82±1,17	64,70 ^a	77,29 ^{a,b}	85,92 ^b
				1	33,75±0,21	67,73 ^a	84,98 ^{a,b}	90,69 ^b
2	33,32±0,75			71,39 ^a	83,84 ^{a,b}	86,92 ^b		
4	33,59±1,02			68,48 ^a	84,84 ^{a,b}	91,72 ^b		
6	33,50±1,98			72,02 ^a	83,23 ^{a,b}	87,14 ^b		
UV-A	12		33,04±1,41	73,75 ^a	84,75 ^{a,b}	91,61 ^b		
	24		33,39±1,12	75,08 ^a	86,30 ^{a,b}	90,27 ^b		
	UV-C		1	31,22±0,17	79,56 ^a	90,44 ^{a,b}	99,16 ^b	
			2	30,81±0,19	79,67 ^a	91,81 ^{a,b}	99,41 ^b	

a-b vrednosti označene istim slovom u redu se statistički ne razlikuju značajno za nivo $p < 0.05$ (Tukey's HSD test)

U cilju određivanja značajne razlike između rezultata dobijenih nakon različitog perioda migracije (6, 15 i 30 dana), dobijene masene koncentracije DEHP-a navedene u

Tabeli 45. upoređene su korišćenjem *Tukey's HSD* testa. Vrednosti značajne razlike (HSD) za svaki par rezultata su izračunate pomoću programa *Origin*[®], za $p < 0,05$, i upoređene su sa tabličnom vrednošću 3,70 (HAMPTON *et al.*, 2006). Dobijeni rezultati pokazuju da postoji značajna razlika u migraciji DEHP-a nakon 6 i 30 dana za sve analizirane igračke. Značajna razlika u migraciji DEHP-a nakon 6 i 15 dana migracije, kao i nakon 15 i 30 dana ne postoji.

U Tabeli 46. nalaze se rezultati izvršenih migracionih testova u trajanju od 6, 15 i 30 dana, kao i u toku jednog dana, u kojima dolazi do migracije DEHP-a iz ozračenih igračaka u veštačku pljuvačku. Rezultati pokazuju da ne dolazi do značajne migracije DEHP-a u veštačku pljuvačku, što je slučaj i sa neozračenim igračkama. Razlog za to je polarnost recipijenta (veštačka pljuvačka je polarna), za razliku od *n*-heksana gde je migracija DEHP-a značajna jer se radi o nepolarnom rastvaraču.

Tabela 46. Stepen migracije DEHP-a iz ozračenih PVC igračaka u veštačku pljuvačku

PVC igračka	Vrsta zračenja	Vreme zračenja (h)	% izluženog ftalata u odnosu na masu ftalata					
			U toku dana	6 dana	15 dana	30 dana		
Igračka 8	UV-A	0	0,01	0,01	0,02	0,03		
		1	0,02	0,04	0,02	0,02		
		2	0,01	0,02	0,04	0,02		
		4	0,01	0,02	0,03	0,02		
		6	0,01	0,03	0,03	0,02		
		12	0,01	0,02	0,03	0,02		
		24	0,02	0,01	0,03	0,02		
	UV-C	1	0,01	0,02	0,02	0,02		
		2	0,01	0,01	0,01	0,02		
		Igračka 12	UV-A	0	0,01	0,02	0,02	0,03
				2	0,02	0,02	0,03	0,02
				4	0,02	0,03	0,05	0,02
				6	0,02	0,03	0,03	0,02
				12	0,01	0,02	0,02	0,02
24	0,01			0,01	0,02	0,02		
UV-C	1			0,01	0,03	0,08	0,02	
	2	0,01	0,02	0,02	0,02			

ZAKLJUČAK

U cilju realizacije postavljenih ciljeva istraživanja, primenjene su sledeće metode i tehnike:

- Tečno-tečna ekstrakcija (LLE) u cilju ekstrahovanja ftalata iz matriksa hrane u odgovarajući rastvarač ili smešu rastvarača, pri čemu je izvršen izbor najboljeg ekstrakcionog sredstva radi dobijanja bistrog i homogenog ekstrakta u cilj postizanja najveće *Recovery* vrednosti.
- Gasna hromatografija kuplovana sa masenom spektrometrijom (GC-MS) u cilju detekcije i kvantifikacije ftalata, pri čemu je korišćena kolona niske polarnosti, jonizacija elektronom i režim praćenja jednog jona. Jon koji se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju DnBP-a, BBP-a, DEHP-a i DnOP-a je m/z 149, dok se za identifikaciju i kvantifikaciju DMP-a koristi jon m/z 163.
- Infracrvena spektroskopija sa *Fourier*-ovom transformacijom (FTIR) u cilju određivanja ftalata u PVC plastičnim artiklima.

Na osnovu prezentovanih rezultata i diskusije, može se zaključiti sledeće:

- 1) Optimizovana je i validovana metoda za ekstrakciju i određivanje ftalata u uzorcima mleka i mlečnih proizvoda

Metoda ekstrakcije ftalata iz uzoraka mleka *n*-heksanom je brza i jednostavna, *Recovery* vrednosti za sve ispitivane ftalate i relativna standardna devijacija ovih vrednosti pokazuju dobru tačnost i preciznost metode. Ekstrakcioni postupak sadrži sledeće karakteristike: *n*-heksan kao ekstrakciono sredstvo, odnos zapremine rastvarača i zapremine uzorka 2:1, pri čemu se vrši obogaćivanje ekstrakta podvrgavanjem ekstrakta novoj zapremini rastvarača, radi dobijanja konačnog odnosa zapremine rastvarača prema zapremini uzorka 1:50, i vreme ekstrakcije od 15 do 30 minuta, uz ručno mućkanje kao način agitacije.

Efikasnost ekstrakcije DnBP-a, BBP-a i DEHP-a raste sa procentom razblaženja mleka, pri čemu su *Recovery* vrednosti za veća razblaženja mleka veće za 60-80% u poređenju sa razblaženjem mleka od 50 v/v% . Niska *Recovery* vrednost (oko 10%) za uzorak sa 50% udela mleka je usled hidrofobne prirode ftalata koji su rastvorljiviji u globulama mlečne masti što dalje uzrokuje manji prelaz ftalata iz mleka u nepolarni ekstrakt. *Recovery* vrednosti za ftalate u uzorcima vode (0 v/v% mleka) su najveće, kreću se u opsegu od 75 do 135%.

Ova metoda se pokazala neefikasnom za ekstrakciju DMP-a, što pokazuju niske *Recovery* vrednosti, koje su posledica toga što je DMP ftalat sa najmanjom molarnom

masom, sa jednim ugljenikovim atomom u bočnom lancu ugljovodonika, sa najvećom rastvorljivošću u vodi od ostalih ispitivanih ftalata i sa najmanjom vrednošću koeficijenta ravnotežne raspodele ftalata između oktanol i vode.

Isti trend smanjenja *Recovery* vrednosti je primećen i za spajk sa nižom koncentracijom ftalata od $3 \mu\text{g L}^{-1}$ i za spajk sa višom koncentracijom ftalata od $6 \mu\text{g L}^{-1}$.

2) Optimizovana je metoda za ekstrakciju i određivanje ftalata u uzorcima alkoholnih pića – rakijama i vinu

Metoda ekstrakcije ftalata iz belih rakija – votke i rakije od jabuka je brza i pouzdana i na osnovu rezultata parametri za najefikasniji postupak ekstrakcije su sledeći: korišćenje *n*-heksana kao ekstrakcionog sredstva, ručno mućkanje u trajanju od 5 min kao tip agitacije, bez ponavljanja ekstrakcije. Uklanjanje većeg dela etanola iz rakija pre ekstrakcije ima značaj kod određivanja DMP-a, na šta ukazuje povećanje *Recovery* vrednosti za DMP od 27 na 110%. Kada su u pitanju DnBP, BBP, DEHP i DnOP, uklanjanje etanola iz rakija nema uticaj na povećanje *Recovery* vrednosti. *Recovery* vrednosti za ova četiri ftalata iznose od 62 do 110% za evaporisane bele rakije i od 27 do 90% za neevaporisane bele rakije.

Metoda ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina je brza i pouzdana i na osnovu dobijenih *Recovery* vrednosti ekstrakcije ftalata iz sintetičkog vina može se zaključiti da je najefikasnije sredstvo za ekstrakciju ftalata *n*-heksan, pH vrednost pri kojoj se odvija najefikasnija ekstrakcija DMP-a, BBP-a, DEHP-a, DnOP-a je 3,42, a pH vrednost za najefikasniju ekstrakciju DnBP-a je 5,60. Povećanjem procenta sadržaja šećera, kao i povećanjem procenta sadržaja alkohola u sintetičkom vinu, efikasnost ekstrakcije ftalata se smanjuje. Primena reekstrakcije, kao i promena odnosa zapremine ekstrakcionog sredstva prema zapremini uzorka, nema uticaja na efikasnost ekstrakcije. Takođe, ustanovljeno je da primenjena tri tipa agitacije ne utiču na povećanje ili smanjenje *Recovery* vrednosti i ovaj trend je isti pri primeni drugih uslova ekstrakcije. Ovaj trend ostaje isti za sve ftalate, pa tako *Recovery* vrednosti za DMP ostaju najmanje (62,65-63,24%) bez obzira na primenjen tip agitacije, dok su *Recovery* vrednosti za BBP, DEHP i DnOP u opsegu 75,28 – 84,25% pri pH 3,42, a *Recovery* vrednosti za DnBP u opsegu 96,51 – 108,22% pri pH 5,60.

3) Optimizovana je metoda za određivanje ftalata u PCM-u i PVC igračkama GC-MS i FTIR tehnikama analize

Razvijena je metoda određivanja ukupnog sadržaja ftalata u PCM artiklima i PVC igračkama primenom GC-MS tehnike. Utvrđeno je da analizirani PCM artikli sadrže DEHP

u znatnoj količini, od 5,19 do 28,75 mas%, i da PVC igračke sadrže DEHP u količini od 10,27 do 53,24 mas%.

Takođe, razvijena je i metoda kvalitativnog i kvantitativnog određivanja ukupnog sadržaja ftalata u PCM artiklima primenom FTIR tehnike. Rezultati kvantitativne analize korišćenjem FTIR tehnike pokazuju da se ukupni sadržaj ftalata u PCM artiklima kreće u rasponu od 4,98 do 27,50 mas%, što je u slaganju sa određivanjem ftalata GC-MS tehnikom.

Metoda određivanja FTIR tehnikom je brza, pouzdana, efikasna, jeftinija i zahteva manje koraka u pripremi u odnosu na GC-MS tehniku. Nedostatak ove metode je taj što se ovom metodom određuje ukupan sadržaj ftalata, bez identifikacije svakog ftalata ponaosob, dok se GC-MS analizom vrši potuno odvajanje ftalata. Iz tog razloga, FTIR se može koristiti kao preliminarna tehnika za određivanje sadržaja ftalata u PVC proizvodima, nakon čega se može obaviti i GC-MS analiza ukoliko rezultati dobijeni FTIR tehnikom budu pozitivni.

Takođe, ovim istraživanjem je pokazano da je metoda rastvaranja PVC artikala u THF-u, potom taloženja polimera *n*-heksanom ili metanolom, efikasna u uklanjanju ftalata iz PVC artikala, čiji je krajnji rezultat čvrsta i kruta neplastificirana plastika.

4) Određen je stepen migracije ftalata iz PCM-a u model recipijent

Rezultati migracionih testova ftalata iz PCM artikala u model recipijent nakon 30 dana pokazuju da se koncentracija izluženog DEHP u *n*-heksan kreće od 5,19 do 28,76 mas% u odnosu na masu PVC artikla.

U radu je izvršeno poređenje potencijala migracije ftalata iz plastičnih artikala, odnosno praćen je koeficijent raspodele ftalata između plastike i heksana, $K_{P/H}$, pri čemu veća vrednost $K_{P/H}$ pokazuje da ftalati teže migriraju iz plastike u recipijent. S obzirom na to da je u ovoj plastici GC-MS tehnikom utvrđeno prisustvo samo DEHP-a, ovde nije izvršeno poređenje potencijala migracije više ftalata, već je praćena promena potencijala migracije sa vremenom migracije.

DEHP teže migrira iz cevi za dijalizu, dijalizne kese i kese za prijem krvi iz seta za transfuziju, u poređenju sa ostalim PCM artiklima, pri čemu su razlike veoma male. Sa porastom vremena migracije, migracija DEHP se odvija brže i lakše, jer jačina veze između DEHP i polimera opada, na šta ukazuju vrednosti za $K_{P/H}$ koje su manje nakon vremena migracije od 15 dana u poređenju sa vrednostnima $K_{P/H}$ za 6 dana.

5) Određen je stepen migracije ftalata iz FCM-a u model recipijent

Postavljanjem scenarija koji obezbeđuje što veći stepen migracije ftalata upotrebom

n-heksana kao recipijenta ftalata i daljom analizom migracije ftalata iz PET, LDPE, HDPE, PP, PS i PC plastike utvrđeno je da do migracije iz ovih ne-PVC artikala ne dolazi, tako da su ispitivani FCM artikli bezbedni za korišćenje.

- 6) Utvrđen je uticaj temperature i ultrazvučnih talasa na migraciju ftalata iz plastičnog artikla u mlečne proizvode

Masa migriranog DEHP-a iz plastičnog artikla u mlečne proizvode linearno raste u prvih 450 min izlaganja povećanoj temperaturi i ultrazvučnim talasima, nakon čega dolazi do formiranja platoa na krivi zavisnosti mase migriranog DEHP-a u funkciji vremena. Upoređujući efekte temperature i ultrazvučnih talasa na migraciju, zaključak je da je uticaj ultrazvučnih talasa na migraciju DEHP-a iz plastičnog artikla u mlečne proizvode jači od uticaja temperature, zato što ultrazvuk narušava strukturu plastičnog materijala i ubrzava difuziju i oslobađanje ftalata. Ovaj trend važi za sve ispitivane mlečne proizvode. Takođe, utvrđeno je da se masa migriranog DEHP-a menja u zavisnosti od sadržaja masti u mlečnim proizvodima. Migracija DEHP-a opada sa smanjenjem sadržaja masti u mlečnim proizvodima, što se dešava ovim redosledom – infant formula > mleko u prahu > surutka u prahu > voda.

- 7) Određen je stepen migracije ftalata iz PVC igračaka u model recipijent i veštačku pljuvačku

Rezultati postavljenih migracionih testova pokazuju da do migracije DEHP-a u veštačku pljuvačku gotovo i da ne dolazi. Stepenn migracije za DEHP se kreće u opsegu od 0,005 do 0,030 mas%. Migracionim testom koji simulira “realne uslove” žvakanja dečje igračke od strane deteta uzrasta oko jedne godine, izračunata je masa migriranog DEHP-a iz analiziranih igračaka u odnosu na masu deteta od 10 kg u navedenom uzrastu i iznosi 0,325 $\mu\text{g kg}^{-1}$, odnosno 0,621 $\mu\text{g kg}^{-1}$, što je dalako ispod TDI vrednosti za DEHP koja iznosi 0,05 mg kg^{-1} .

- 8) Utvrđen je uticaj UV-A i UV-C radijacije na migraciju ftalata iz PVC igračaka u model recipijent i veštačku pljuvačku

Zračenjem PVC igračaka UV-A i UV-C svetlošću dolazi do slabljenja jačine interakcije između DEHP-a i polimera i dolazi do oslobađanja DEHP-a u atmosferu, što utiče na smanjenje mas% DEHP-a u igračkama sa povećanjem vremena zračenja.

Takođe, rezultati migracionih testova DEHP-a iz ozračenih igračkama u model recipijent nakon 6, 15 i 30 dana trajanja migracije DEHP-a pokazuju da procenat migracije nakon zračenja igračkama raste na 97,25% za Igračku 12 i 99,41% za Igračku 8 u odnosu na masu igračke, što potvrđuje da UV-A i UV-C zračenje narušava veze koje postoje između DEHP-a i polimera u PVC igračkama, čime se omogućava lakša migracija DEHP-a.

Rezultati izvršenih migracionih testova pokazuju nizak stepen migracije DEHP-a iz ozračenih igračkama u veštačku pljuvačku, što je slučaj i sa neozračenim igračkama. Razlog za to je polarnost recipijenta (veštačka pljuvačka je polarna), za razliku od *n*-heksana gde je migracija DEHP-a značajna jer se radi o nepolarnom rastvaraču.

LITERATURA

-
- Ait Bamai Y., Shibata E., Saito I., Araki A., Kanazawa A., Morimoto K., Nakayama K., Tanaka M., Takigawa T., Yoshimura T., Chikara H., Saijo Y., Kishi R., Exposure to house dust phthalates in relation to asthma and allergies in both children and adults, *Science of the Total Environment* (2014) **1**:485-86
(<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.059>)
- Amanzadeh H., Yamini Y., Moradi M., Abdossalmi Asl Y., Determination of phthalate esters in drinking water and edible vegetable oil samples by headspace solid phase microextraction using graphene/polyvinylchloride nanocomposite coated fiber coupled to gas chromatography-flame ionization detector, *Journal of Chromatography A* (2016) **1465**:38-46
(<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.068>)
- ACC (American Chemistry Council), Plastic Packaging Resins (2011)
([Codes \(americanchemistry.com\)](http://Codes.americanchemistry.com))
- Amin M.M., Ebrahimpour K., Parastar S., Shoshtari-Yeganeh B., Hashemi M., Method development of di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites detection by dispersive liquid-liquid microextraction gas chromatography-mass spectrometry from urine, *International Journal of Environmental Health Engineering* (2018) **7(4)**
(<https://www.ijehe.org/text.asp?2018/7/1/4/233097>)
- Anderson W., Castle L, Scotter M., Massey R., Springall C, A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters, *Food Additives and Contaminants* (2001) **18(12)**:1068-74
(<https://doi.org/10.1080/02652030110050113>)
- Andjelković T., Bogdanović D., Kostić I., Kocić G., Nikolić G., Pavlović R., Phthalates leaching from plastic food and pharmaceutical contact materials by FTIR and GC-MS, *Environmental Science and Pollution Research*, 2021
(<https://doi.org/10.1007/s11356-021-12724-0>)
- Axelsson J., Rylander L., Rignell-Hydbom A., Lindh C., Jönsson B., Giwercman A., Prenatal phthalate exposure and reproductive function in young men, *Environmental Research* (2015) **138**:264-270 (<https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.024>)
- Bach C., Dauchy X., Chagnon MC., Etienne S., Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed, *Water Research* (2012) **46(3)**:571-583
(<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.062>)
-

-
- Bogdanović D., Anđelković D., Kostić I., Kocić G., Anđelković T., The effects of temperature and ultrasound on the migration of di-(2-ethylhexyl) phthalate from plastic packaging into dairy products, *Bulgarian Chemical Communication*, (2019) **51(2)**:242-248 (<https://doi.org/10.34049/bcc.51.2.5027>)
- Bornehag CG., Sundell J., Weschler C., Sigsgaard T., Lundgren B., Hasselgren M., Hägerhed-Engman L., The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study, *Environmental Health Perspectives* (2004), **112(14)**:1393-7 (<https://doi.org/10.1289/ehp.7187>)
- Bošnjir J., Puntarić D., Galić A., Škes I., Dijanić T., Klarić M., Grgić M., Čurković M., Šmit Z., Migration of Phthalates from Plastic Containers into Soft Drinks and Mineral Water, *Food Technology and Biotechnology* (2007), **45(1)**:91–95 (<https://hrcak.srce.hr/30442>)
- Carrillo J., Salazar C., Moreta C., Tena M., Determination of phthalates in wine by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry: Fibre comparison and selection, *Journal of Chromatography A* (2007) **1164**:248-261 (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.059>)
- Carrillo JD., Martinez MP., Tena MT., Determination of phthalates in wine by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. Use of deuterated phthalates as internal standards, *Journal of Chromatography A* (2008) **1181**:125-130 (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.053>)
- Casjuana N. And Lacorte S., New Methodology for the Determination of Phthalate Esters, Bisphenol A, Bisphenol A Diglycidyl Ether, and Nonylphenol in Commercial Whole Milk Samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004) **52**:3702–3707 (<https://doi.org/10.1021/jf040027s>)
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Department of Health and Human Services, Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, Atlanta, USA (2009)
- Chen H., Wang C., Wang X., Hao N., Liu J., Determination of phthalate esters in cosmetics by gas chromatography with flame ionization detection and mass spectrometric detection, *International Journal of Cosmetic Science* (2005) **27**:205–210 (<http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-2494.2005.00249.x>)
-

-
- Chingin K., Chen H., Gamez G., Zhu L., Zenobi R., Detection of Diethyl Phthalate in Perfumes by Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* (2009) **81(1)**:123-129 (<https://doi.org/10.1021/ac801572d>)
- Cousins I., Mackay D., Parkerton T., Physical-Chemical Properties and Evaluative Fate Modelling of Phthalate Esters, *Series Anthropogenic Compounds – Phthalate Esters, The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 3, Part Q (2003) p. 57–84, Springer, Berlin, Heidelberg, (<https://doi.org/10.1007/b11463>)
- Criado M., Fernandez Pinto V., Badessari A., Cabral D., Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water, *International Journal of Food Microbiology* (2005) **99**: 343-349 (<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.036>)
- Duca G., Sturza R., Lazakovich D., The study of phthalates migration in wine products by GC-MS method, *Chemistry Journal of Moldova: General, Industrial and Ecological Chemistry* (2012) **7(2)**:98-102 ([1 fisier nr. 2 2012 indd.indd \(asm.md\)](http://1.fisier.nr.2.2012.indd.indd(asm.md)))
- Dural E., Determination of Selected Phthalates in Some Commercial Cosmetic Products by HPLC-UV, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* (2020) **23(10)**:1010-1022 (<https://doi.org/10.2174/1386207323666200630113850>)
- Earls AO, Axford IP, Braybrook, JH, Gas chromatography–mass spectrometry determination of the migration of phthalate plasticisers from polyvinyl chloride toys and childcare articles, *Journal of Chromatography A* (2003) **983**:237-246 ([https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01736-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01736-3))
- EC (European commission), Opinion on Medical Devices Containing DEHP Plasticised PVC; Neonates and Other Groups Possibly at Risk from DEHP Toxicity, Health & Consumer protection directorate - General (2002) ([PVC_Final.2002.doc \(europa.eu\)](http://PVC_Final.2002.doc(europa.eu)))
- EC (European Commission), Institute for Health and Consumer Protection, Toxicology and Chemical Substance (TCS), European Chemicals Bureau, Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), Summary risk assessment report, European Communities, Sweden (2008)
- EC (European commission), Standard operation procedure for Determination of release of phthalate plasticizers in saliva simulant, Appendix 1 of report V3932, Ref. Ares 4242543 (2015)

-
- EC (European commission), Safety Gate: the EU rapid alert system for dangerous non-food products (<http://ec.europa.eu/rapex>)
- ECHA (European Chemicals Agency), Evaluation of new scientific evidence concerning the restrictions contained in annex XVII to regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), Review of new available information for di-n-octyl phthalate (DNOP) (2010) (https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/dnop_echa_review_report_2010_6_en.pdf)
- ECHA (European Chemicals Agency), Evaluation of new scientific evidence concerning the restrictions contained in annex XVII to regulation (EC) NO 1907/2006 (REACH), Review of new available information for dibutyl phthalate (DBP) (2010) (https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/DnBP_echa_review_report_2010_6_en.pdf)
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency), Drinking Water Contaminants, EPA-816-F-09-0004 (2009) (<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations#Organic>)
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency), Final Scope of the Risk Evaluation for Butyl Benzyl Phthalate (1,2-Benzenedicarboxylic acid, 1-butyl 2-(phenylmethyl) ester), EPA-740-R-20-015 (2020) ([Final Scope of the Risk Evaluation for Butyl Benzyl Phthalate CASRN 85-68-7 \(epa.gov\)](#))
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency), Dimethyl phthalate (2000) (<https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/dimethyl-phthalate.pdf>)
- European Union, Commission directive 2002/72/EC of 6 August 2002 relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs, *Official Journal of the European Communities* (2002) **45(L220)**:18-58 ([EUR-Lex - L:2002:220:TOC - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](#))
- European Union, Regulation (EC) No 1907/2006 Of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC,
-

- 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, *Official Journal of the European Union* (2006) **49(L396)**:1-849 ([EUR-Lex - 32006R1907 - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](#))
- European Union, Directive 2007/47/EC of the European Parliament and of the Council of 5 September 2007 amending Council Directive 90/385/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to active implantable medical devices, Council Directive 93/42/EEC concerning medical devices and Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market, *Official Journal of the European Union* (2007) **50(L247)**:21-55 (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007L0047&from=EN>)
- European Union, Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Official Journal of the European Union* (2011) **54(L12)**:1-89 (https://doi.org/10.3000/17252555.L_2011.012.eng)
- Fanchauster-Noti, A., Grob, K., Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: Investigation of the sources, tips and tricks, *Analytica Chimica Acta* (2007) **582**:353–360 (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.012>)
- Faouzi M., Dine T., Gressier B., Kambia K., Luyckx M., Pagniez D., Brunet C., Cazin M., Belabed A., Cazin J., Exposure of hemodialysis patients to di-2-ethylhexyl phthalate, *International Journal of Pharmaceutics* (1999) **180**:113–121 ([https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00411-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00411-6))
- FDA (U.S. Food and Drug Administration), Safety assessment of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from PVC medical devices, Center for Devices and Radiological Health, Rockville, MD (2001) ([Safety Assessment of Di\(2-ethylhexyl\)phthalate \(DEHP\) Released from PVC Medical Devices \(fda.gov\)](#))
- Fierens T. , Servaes K., Van Holderbeke M., Geerts L., De Henauw S., Sioen I., Vanermen G., Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market, *Food and Chemical Toxicology* (2012) **50**:2575-2583 (<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.029>)
- Fierens T., Holderbeke V., Willems H., De Henauw S. , Sioen I., Transfer of eight phthalates through the milk chain – A case study, *Environment International* (2013) **51**:1-7 (<https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.10.002>)
- Frederiksen H., Skakkebæk N., Andersson A.M., Metabolism of phthalates in humans, *Molecular Nutrition & Food Research* (2007) **51**:899–911

(<https://doi.org/10.1002/mnfr.200600243>)

- Gao X., Yang B., Tang Z., Luo X., Wang F., Xu H., Cai X., Determination of phthalates released from paper packaging materials by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatographic Science* (2014) **52(5)**:383-389 (<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt046>)
- Gimeno P., Thomas S., Bousquet C., Maggio A.F., Civade C., Brenier C., Bonnet P.A., Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC–MS, *Journal of Chromatography B* (2014) **949-950**:99-108 (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.037>)
- Gobas F., Mackintosh C., Webster., Ikonomou M., Parkerton T., Robillard K., Bioaccumulation of Phthalate Esters in Aquatic Food-Webs, *Series Anthropogenic Compounds – Phthalate Esters, The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 3, Part Q (2003) p. 201-225, Springer, Berlin, Heidelberg
(<https://doi.org/10.1007/b11467>)
- Gray, E., J. Ostby, J., M. Price, Veeramachaneni, R., and Parks, L., Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat, *Toxicological Sciences* (2000) **58(2)**:350-365
(<https://doi.org/10.1093/toxsci/58.2.350>)
- Green R., Hauser R., Calafat A., Weuve J., Schettler T., Ringer S., Huttner K., Hu H., Use of Di(2-ethylhexyl) Phthalate-Containing Medical Products and Urinary Levels of Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in Neonatal Intensive Care Unit Infants, *Environmental Health Perspectives* (2005) **113(9)**:1222-1225
(<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7932>)
- Guo Z., Wang S., Wei D., Wang M., Zhang H., Gai P., Duan J., Development and application of a method for analysis of phthalates in ham sausages by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Meat Science* (2010) **84(3)**:484-490 (<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.002>)
- Hadjmohammadi M.R., Ranjbari E., Utilization of homogeneous liquid–liquid extraction followed by HPLC-UV as a sensitive method for the extraction and determination of phthalate esters in environmental water samples, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (2012) **92(11)**:1312-1324
(<http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2011.603049>)
-

-
- Houlihan J., Brody C., Schwan B., Not to pretty: Phthalates, Beauty Products & the FDA, Environmental Working Group, Coming Clean and Health Care Without Harm (2002) ([NotTooPretty.pdf \(ewg.org\)](#))
- Hauser R., Calafat A., Phthalates and human health, *Occupational and Environmental Medicine* (2005) 62:806-818 (<http://doi.org/10.1136/oem.2004.017590>)
- Hampton R., Havel J., Introductory biological statistics, 2nd ed. (2006) p. 99-120, Waveland Press, Long Grove, IL
- Higgins F., Rapid and reliable phthalate screening in plastics by portable FTIR spectroscopy, Application note – Consumer products, Agilent Technologies, 2013 ([1586.pdf \(grupobiomaster.com\)](#))
- Hinton R., Mitchell F., Mann A, Chescoe D, Price S., Nunn A., Grasso P., Bridges J., Effects of phthalic acid esters on the liver and thyroid, *Environmental health perspectives* (1986) 70:195-210 (<https://doi.org/10.1289/ehp.8670195>)
- Hubinger J., Havery D., Analysis of consumer cosmetic products for phthalate esters, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, (2006) 57:127-137 ([Volume 57 No 2 page 31 \(scconline.org\)](#))
- IPCS (International Programme on Chemical Safety), Diethyl Phthalate, Concise International Chemical Assessment Document 52, WHO, Geneva, Switzerland (2003) (<https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad52.pdf>)
- IPCS (International Programme on Chemical Safety), Butyl benzyl phthalate, Concise International Chemical Assessment Document 17, WHO, Geneva, Switzerland (1999) ([Documents\CICAD17-2.PDF \(who.int\)](#))
- Jahreis S., Trump S., Bauer M., Bauer T., Thurmann L., Feltens R., Wang Q., Grutzmann K., Roder S., Averbek M., Weichenhan D., Plass C., Sack U., Borte M., Dubourg V., Schuurmann G., Simon J., Bergen M., Hackermuller J., Eils R., Lehmann I., Polte T., Maternal Phthalate Exposure Promotes Allergic Airway Inflammation over Two Generations Via Epigenetic Modifications, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2017) 141(2):741-753 (<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.017>)
- Jaworek K., Czaplicka M., Determination of Phthalates in Polymer Materials – Comparison of GC/MS and GC/ECD Methods, *Polímeros* (2013) 23(6):718-724 (<http://dx.doi.org/10.4322/polimeros.2014.014>)

-
- Jeon SH., Kim YP., Kho Y., Shin JH., Ji WH., Yun Gyong Y., Development and Validation of Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometric Method for Quantitative Determination of Regulated Plasticizers in Medical Infusion Sets, *Journal of Analytical Methods in Chemistry* (2018) 2018:9470254 (<https://doi.org/10.1155/2018/9470254>)
- Jurica K., Brčić Karačonji, I., Lasić, D., Vukić Lušić D., Jurica Anić S., Lušić D., Determination of phthalates in plum spirit and their occurrence during plum spirit production, *Acta Alimentaria* (2016) **45(1)**:141–148 (<https://doi.org/10.1556/066.2016.45.1.17>)
- Jurica K., Ursulin-Trstenjak N., Vukic Lusic D., Smit Z., Phthalates in alcoholic beverages, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* (2013) **64**:317-325 (<https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2295>)
- Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunninghamc M., Faustman E., Foster P., Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Jennfer Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyll R., Williams P., Zacharewski T., NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate, *Reproductive Toxicology* (2002) **16**:529–653 ([https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(02\)00032-1](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(02)00032-1))
- Kissin Y., Liu X., Pollick D., Brungard N., Chang M., Ziegler-Natta catalysts for propylene polymerization: Chemistry of reactions leading to the formation of active centers, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* (2008) **287(1–2)**: 45-52 (<https://doi.org/10.1016/j.molcata.2008.02.026>)
- Kondo F., Ikai Y., Hayashi R., Okumura M., Takatori S., Nakazawa H., Izumi S. Makino T., Determination of Five Phthalate Monoesters in Human Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (2010) **85**:92–96 (<https://doi.org/10.1007/s00128-010-0051-8>)
- Korfali S., Sabra R., Jurdi M., Taleb R., Assessment of Toxic Metals and Phthalates in Children's Toys and Clays, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (2013) **65**:368-381 (<https://doi.org/10.1007/s00244-013-9925-1>)
- Kostić I., Anđelković T., Anđelković D., Bojić A., Cvetković T., Pavlović D., Quantification of DEHP into PVC components of intravenous infusion containers and peritoneal dialysis set before and after UV-A treatment, *Bulgarian Chemical Communication* (2017) **49(2)**:360-365
-

-
- Krylov V., Mosyagin P., Bulanova S., Peculiarities of gas chromatographic-mass spectrometric determination of o-phthalic acid esters in low alcohol wines coupled with emulsion liquid-phase microextraction preconcentration, *Advanced Chemistry Journal of Organic & Inorganic Chemistry* (2018) **4**:19 (<https://doi.org/10.21767/2472-1123-C2-006>)
- Latini G., Potential Hazards of Exposure to Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate in Babies, *Biology of the Neonate*, (2000) **78**:269–276 (<https://doi.org/10.1159/000014278>)
- Leitz J., Kuballa T., Rehm J., Lachenmeier D., Chemical Analysis and Risk Assessment of Diethyl Phthalate in Alcoholic Beverages with Special Regard to Unrecorded Alcohol, *Plos One* (2009) **4**(12):e8127 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008127>)
- Li J., Cai Y., Shi Y., Mou S., Jiang G., Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles, *Talanta*, (2008) **74**:498-504 (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.06.008>)
- Liang P., Linlin Zhang L., Peng L., Qian Li Q., Zhao E., Determination of phthalate esters in soil samples by microwave assisted extraction and high performance liquid chromatography, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, (2010), **85**(2):147-151 (<https://doi.org/10.1007/s00128-010-0078-x>)
- Long G., Winefordner JD., Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition, *Analytical Chemistry* (1983) **55**(7):712a-724a (<https://doi.org/10.1021/ac00258a724>)
- Lorz P., K. Towae F., Enke W., Jackh R., Bhargava N., Hillesheim W., Phthalic Acid and Derivatives, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (2007) p. 1-36, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (https://doi.org/10.1002/14356007.a20_181.pub2)
- Lowry S., Bradley M., Using FT-IR Spectroscopy to Characterize Plastics and Other Materials, *Advanced materials & processes*, Thermo Fisher Scientific, Madison, Wisconsin, 2011 ([Using FT-IR Spectroscopy to Characterize Plastics and Other Materials \(asminternational.org\)](https://www.asminternational.org))
- Luo Q., Liu ZH., Yin H., Dang Z., Wu PX., Zhu NW., Lin Z., Liu Y., Migration and potential risk of trace phthalates in bottled water: A global situation, *Water Research* (2018), **147**:362-372 (<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.002>)
-

-
- McKee R., Butala J., David R., Gans G., NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps, *Reproductive Toxicology* (2004) **18**:1-22 (<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2003.09.002>)
- Milojković D., Anđelković D., Kocić G., Anđelković T., Evaluation of a method for phthalate extraction from milk related to the milk dilution ratio, *Journal of Serbian Chemical Society* (2015) **80(8)**:983–996 (<https://doi.org/10.2298/JSC141204028M>)
- Milojković D., Anđelković T., Kocić G., Gas-chromatography mass spectrometry determination of phthalate esters concentration in water samples, *12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Beograd, Srbija (2014), Proceedings, 925-928
- Milojković D., Anđelković D., Anđelković T., Nikolić R., Kocić G., Stojiljković N., Determination of di-n-butyl phthalate and di-n-octyl phthalate in water samples by GC-MS, *51th Meeting of the Serbian Chemical Society*, Niš, Srbija (2014), Proceedings, 78-81
- Monakhova Y., Kuballa T., Leitz J., Lachenmeier D., Determination of Diethyl Phthalate and Polyhexamethylene Guanidine in Surrogate Alcohol from Russia, *International Journal of Analytical Chemistry* (2011), **17**:1-7 (<https://doi.org/10.1155/2011/704795>)
- Moreira M., Andre L., Cardeal Z., Analysis of Phthalate Migration to Food Simulants in Plastic Containers during Microwave Operations, *International Journal of Environmental Research and Public Health* (2014) **11(1)**:507-526 (<https://doi.org/10.3390/ijerph110100507>)
- Mortensen G., Main K., Andersson AM., Leffers H., Skakkebæk N., Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC–MS–MS), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2005) **382**:1084–1092 (<https://doi.org/10.1007/s00216-005-3218-0>)
- Müller AM., Nielsen E., Ladefoged O., Human exposure to selected phthalates in Denmark, The Danish Veterinary and Food Administration, Søborg (2003)
- Net S., Sempere R., Delmont A., Paluselli A., Ouddane B., Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices, *Environmental Science & Technology* (2015) **49**:4019–4035 (<https://doi.org/10.1021/es505233b>)
-

-
- Pérez-Palacios T., Ruiz J., Ferreira I.M.P.L.V.O., Petisca C., Antequera T., Effect of solvent to sample ratio on total lipid extracted and fatty acid composition in meat products within different fat content, *Meat Science* (2012), **91(3)**:369-373
(<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.021>)
- Petersen JH, Breindahl T., Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae, *Food Additives and Contaminants* (2000) **17(2)**:133-41
(<https://doi.org/10.1080/026520300283487>)
- Petersen JH., Jensen LK., Phthalates and food-contact materials: enforcing the 2008 European Union plastics legislation, *Food Additives and Contaminants* (2010) **27(11)**:1608-1616 (<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2010.501825>)
- Petrošacki reporter, List Asocijacije Potrošaca Srbije, ISSN 1452-6980 (2007) br. 8
- Qian S., Ji H., Wu X.X., Li N., Yang Y., Bu J., Xiaoming Zhang X., Ling Qiao L., Yu H., Xu N., Zhang C., Detection and quantification analysis of chemical migrants in plastic food contact products, *Plos One* (2018) **13(12)**:e0208467
(<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208467>)
- Rowdhwal, SSS and Chen, J., Toxic effects of di-2-ethylhexyl phthalate: An overview, *BioMed Research International* (2018), Hindawi
(<https://doi.org/10.1155/2018/1750368>)
- Rudel R., Perovich L., Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air, *Atmospheric Environment* (2008) **43(1)**:170-81
(<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.09.025>)
- Sablayrolles C., Montrejaud-Vignoles M., Benanou D., Patria L., Treilhou M., Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables, *Journal of Chromatography A* (2005) **1072**:233–242
(<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.074>)
- Saeidnia S., Phthalates, *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed. (2014) p. 928–933, Academic Press, Elsevier Inc., London (<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00963-5>)
- Sanzo F., Lim P., Han W., Determination of Carbon Number Distributions of Complex Phthalates by Gas Chromatography–Mass Spectrometry With Ammonia Chemical Ionization, *Journal of Chromatographic Science* (2015) **53(10)**:1639–1645
(<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv092>)

-
- Sathyanaarayana S., Karr C., Lozano P., Brown E., Calafat A., Liu F., Swan S., Baby Care Products: Possible Sources of Infant Phthalate Exposure, *Pediatrics* (2008) **121(2)**:260-268 (<https://doi.org/10.1542/peds.2006-3766>)
- Shea K. and Committee on Environmental Health, Pediatric Exposure and Potential Toxicity of Phthalate Plasticizers, *Pediatrics* (2003) **111(6)**:1467-1474 (<https://doi.org/10.1542/peds.111.6.1467>)
- Shen H., Jiang H., Mao H., Pan G., Zhou L., Cao Y., Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods, *Journal of Separation Science* (2007) **30(1)**:48-54 (<https://doi.org/10.1002/jssc.200600215>)
- Silano V., Baviera JMB., Bolognesu C., Chesson A., Cocconcelli PS., Crebelli R., Gott DM., Grob K., Lampi E., Mortensen A., Riviere G., Steffensen IL., Tlustos C., Van Loveren H., Vernis L., Zorn H., Cravedi JP., Fortes C., Pocas MDFT., Waalkens-Berendsen I., Wolfle D., Arcella D., Cascio C., Castoldi AF., Volk K., Castle L., Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzyl-phthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and diisodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials, *The Efsa Journal* (2019) **17(12)**:5838-5923 (<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5838>)
- Sorensen LK., Determination of phthalates in milk and milk products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2006) **20(7)**:1135-1143 (<https://doi.org/10.1002/rcm.2425>)
- Staples C., Peterson D., Parkerton T., Adams W., The environmental fate of phthalate esters: A literature review, *Chemosphere* (1997) **35(4)**:667-749 ([https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00195-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00195-1))
- Stringer R., Labounskaia I., Santillo D., Johnston P., Siddorn J., Stephenson A., Determination of the Composition and Quantity of Phthalate Ester Additives in PVC Children's Toys, *Greenpeace Research Laboratories Technical Note 06/97*, Greenpeace Research Laboratories, University of Exeter, Department of Biological Sciences, UK (1997) ([toy final 1997.PDF \(greenpeace.to\)](#))
- Tsumura Y., Ishimitsu S., Kaihara A., Yoshii II K., Nakamura Y., Tonogai Y., Di(2-ethylhexyl) phthalate contamination of retail packed lunches caused by PVC gloves used in the preparation of foods, *Food Additives and Contaminants* (2001a) **18(6)**:569-579 (<http://dx.doi.org/10.1080/02652030120071>)
-

-
- Tsumura Y., Ishimitsu S., Saito I., Sakai H., Kobayashi Y., Tonogai Y., Eleven phthalate esters and di(2-ethylhexyl) adipate in oneweek duplicate diet samples obtained from hospitals and their estimated daily intake, *Food Additives and Contaminants* (2001b) **18**:449-460 (<http://dx.doi.org/10.1080/02652030117484>)
- U.S. Congress, Public Law 110-314: Consumer product safety improvement act of 2008 (2008) [Consumer Product Safety Improvement Act of 2008 - Public Law 110-314-Aug. 14 2008 \(cpsc.gov\)](#)
- Visser R., Reliability of proficiency test results for metals and phthalates in plastics, *Accreditation and Quality Assurance* (2009), **14**:29-34 (<https://doi.org/10.1007/s00769-008-0465-8>)
- Wallace D., Dibutyl Phthalate, *Encyclopedia of Toxicology*, 2nd ed. (2005) p. 1-2, Academic Press, Elsevier Inc., London (<https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00309-4>)
- Wams T.J., Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant – a review, *Science of The Total Environment* (1987), **66**:1-16 ([https://doi.org/10.1016/0048-9697\(87\)90072-6](https://doi.org/10.1016/0048-9697(87)90072-6))
- Waring R.H. and Harris R.M., Endocrine disrupters – a threat to women’s health? *Maturitas* (2011) **68**:111-115 (<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.10.008>)
- Wenzl T., Methods for the determination of phthalates in food, JRC Scientific and Technical Reports (2009) (<https://doi.org/10.2787/1406>)
- WHO (World Health Organization), Di(2-Ethylhexyl) phthalate in Drinking Water, Guidelines for drinking water quality, 2nd ed. Vol.2. (1996) ([Microsoft Word - GDWQ.2ndEdit.Di 2-ethylhexy phthalate.doc \(who.int\)](#))
- Yinon J., Mass Spectral Fragmentation Pathways in Phthalate Esters. A Tandem Mass Spectrometric Collision-induced Dissociation Study, *Organic mass spectrometry* (1988) **23(11)**:755-759 (<https://doi.org/10.1002/oms.1210231104>)
- Young A., Allen J., Kim UJ., Sellar S., Webster T., Kannan K., Ceballos D., Phthalate and Organophosphate Plasticizers in Nail Polish: Evaluation of Labels and Ingredients, *Environmental Science and Technology* (2018) **52(21)**: 12841-12850 (<https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04495>)
- Zaater M., Tahboub Y., Al Sayyed A., Determination of Phthalates in Jordanian Bottled Water using GC–MS and HPLC–UV: Environmental Study, *Journal of Chromatographic Science* (2014) **52(5)**:447-452 (<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt059>)
-

- Zhou X., Shao X, Shu J., Liu M., Liu H., Feng X., Liu F., Thermally stable ionic liquid-based sol–gel coating for ultrasonic extraction–solid-phase microextraction–gas chromatography determination of phthalate esters in agricultural plastic films, *Talanta* (2012) **89**:129-135 (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.001>)
- Zota A., Calafat A., Woodruff T., Temporal Trends in Phthalate Exposures: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2010, *Environmental Health Perspectives* (2010) **122(3)**:235-242 (<https://doi.org/10.1289/ehp.1306681>)

BIOGRAFIJA

Danica S. Bogdanović (rođena Milojković) rođena je 04.09.1987. godine. Osnovnu školu „Dušan Tasković Srećko“ u Sićevu završila je 2002. godine i nosilac je Vukove diplome. Gimnaziju „Stevan Sremac“ u Nišu završila je 2006. godine i nosilac je Vukove diplome. Osnovne studije na Prirodno-matematičkom fakultetu – odsek Hemija upisala je školske 2006/2007. godine. Školske 2007/2008. godine je bila stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije. Od školske 2007/2008. do školske 2010/2011. godine bila je stipendista grada Niša za talentovane učenike i studente. Osnovne studije završila je 03.10.2011. godine sa prosečnom ocenom 9,48 (devet, 48/100) i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Doktorske akademske studije na katedri za Industrijsku i primenjenu hemiju, na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, upisala je školske 2011/2012. godine. Položila je sve ispite predviđene studijskim programom sa prosečnom ocenom 10,00 (deset) i ostvarila 150 ESPB. 2013. godine dobila je stipendiju za naj-studenta prirodnih nauka koju dodeljuje Fondacija Hemofarm. Naučno-stručno veće Univerziteta u Nišu je dana 01.02.2019. godine usvojilo temu doktorske disertacije „Kontaminacija hrane ftalatima usled njihove migracije iz plastične ambalaže“ (br. odluke 8/17-01-001/19-008) i imenovalo dr Tatjanu Anđelković, redovnog profesora Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu za mentora disertacije (br. odluke 8/17-01-001/19-009).

Na sednici Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta 04.04.2012. godine izabrana je u zvanje istraživač-pripravnik, 25.03.2015. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik i 20.03.2019. godine reizabrana je u zvanje istraživač-saradnik. Od 20.02.2012. godine angažovana je kao istraživač na projektu „Proizvodnja novih dijetetskih mlečnih proizvoda za rizične populacije zasnovana na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi markera zdravstvenog rizika konzumiranja mleka“ (evidencioni broj Projekta – TR 31060), finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Školske 2013/2014. godine angažovana je u svojstvu saradnika za izvođenje vežbi iz predmeta *Hemija životne sredine I i Zagađivači i zaštita od zagađivanja*, školske 2014/2015. godine iz predmeta *Zagađivači i zaštita od zagađivanja*, školske 2017/2018. godine iz predmeta *Hemija voda i zemljišta*, školske 2018/2019. i 2019/2020. godine iz predmeta *Hemija voda i zemljišta i Hemodinamika zagađujućih supstanci*, školske 2020/2021. godine iz predmeta *Osnove hemije životne sredine i Hemodinamika zagađujućih supstanci*.

Bila je polaznik škole „*The Mass Spectrometry in Environmental Pollutants Detection*“ 2011., 2012., 2013., 2015. i 2019. godine, koju su organizovali Prirodno-matematički fakultet u Nišu i *Université Pierre et Marie Curie*, Pariz (Francuska), i dobitnik je

odgovarajućih sertifikata. Od 2011.-2013. godine učestvovala je na Festivalu nauke „Nauk nije bauk“ u organizaciji gimnazije „Svetozar Marković“ u Nišu. Član je Srpsko hemijskog društva (evidencioni broj 3114).

Danica Bogdanović je autor i koautor jednog rada objavljenog u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), dva rada objavljena u međunarodnim časopisima (M23), jednog rada u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51), jednog rada objavljenog u istaknutom nacionalnom časopisu (M52), dva rada u nacionalnom časopisu (M53), devet radova saopštenih na skupovima međunarodnog značaja objavljeni u celini (M33), pet radova saopštenih na skupovima međunarodnog značaja objavljenih u izvodu (M34), dva rada saopštena na skupovima nacionalnog značaja objavljena u celini (M63) i jednog rada saopštenog na skupu nacionalnog značaja objavljeni u izvodu (M64).

BIBLIOGRAFIJA

M₂₂ – radovi objavljeni u istaknutom međunarodnom časopisu

1. Andjelković T., **Bogdanović D.**, Kostić I., Kocić G., Nikolić G., Pavlović R., Phthalates leaching from plastic food and pharmaceutical contact materials by FTIR and GC-MS, *Environmental Science and Pollution Research* (2021) (IF₂₀₁₉=3.306)
(<https://doi.org/10.1007/s11356-021-12724-0>)

M₂₃ – radovi objavljeni u međunarodnom časopisu

2. **Milojković D.**, Anđelković D., Kocić G., Anđelković T., Evaluation of Method for Phthalate extraction from Milk Related to Milk Dilution, *Journal of the Serbian Chemical Society* (2015) **80(8)**:983-996 (IF₂₀₁₆=1.015)
(<https://doi.org/10.2298/JSC141204028M>)
3. **Bogdanović D.**, Anđelković D., Kostić I., Kocić G., Anđelković T., The effects of temperature and ultrasound on the migration of di-(2-ethylhexyl) phthalate from plastic packaging into dairy products, *Bulgarian Chemical Communication* (2019) **51(2)**:242-248 (IF₂₀₁₇=0.322)
(<https://doi.org/10.34049/bcc.51.2.5027>)

M₂₄ – rad objavljen u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja

4. **Bogdanović D.**, Anđelković T., Kostić I., Kocić G., Simultaneous determination of five phthalates in white spirits using liquid-liquid extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Advanced technologies* (2019) **8(1)**:59-64
(<https://doi.org/10.5937/SavTeh1901059B>)

M₅₂ – rad objavljen u istaknutom nacionalnom časopisu

5. Anđelković T., Kocić G., Anđelković D., Kostić I., **Milojković D.**, The Signal Response Linearity in phthalates determination using ESI-MS Method with LOOP injection technique, *Advanced technologies* (2015) **4(1)**:42-48
(<http://www.tf.ni.ac.rs/images/casopisi/sveska4vol1/c5.pdf>)

M₅₃ – rad objavljen u nacionalnom časopisu

6. **Milojković D.**, Anđelković T., Kocić G., Ftalati - izvori, izluživanje, degradacija, određivanje, toksičnost, legislativa, *Hemijski pregled* (2012) **53(4):**86-90
7. **Milojković D.**, Krstić N., Nikolić R., Biološki značaj kalcijuma, *Hemijski pregled* (2014) **55(3):**63-68

M₃₃ – radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja objavljeni u celini

8. **Milojković D.**, Anđelković T., Nikolić R., Kostić I., Cvetković T., Pavlović D., Anđelković D., ESI-MS and UV/VIS characterization of Chromium(III)-2,2'-bipyridine interaction, *11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Beograd, Srbija (2012) Proceedings, 701-703
9. Kostić I., Anđelković T., **Milojković D.**, Cvetković T., Pavlović D., Anđelković D., Analysis of copper-salicylic acid complexes by ESI-MS, *11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Beograd, Srbija (2012) Proceedings, 698-700
10. **Milojković D.**, Anđelković T., Kocić G., Gas-chromatography mass spectrometry determination of phthalate esters concentration in water samples, *12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Beograd, Srbija (2014) Proceedings, 925-928
11. Anđelković T., **Bogdanović D.**, Kostić I., G. Nikolić, B. Kostić, Kocić G., Determination of phthalates in PVC by FTIR and a precipitation method, *27th International Conference Ecological Truth and Environmental Research*, Bor, Srbija (2019) Proceedings, 93-98
12. Anđelković T., **Bogdanović D.**, Kostić I., Kocić G., Study of di-n-ethyl hexyl phthalate migration from plastic materials, *27th International Conference Ecological Truth and Environmental Research*, Bor, Srbija (2019) Proceedings, 99-104
13. Anđelković T., Kostić I., Kocić G., Cvetković T., **Bogdanović D.**, Investigation of ammonium hydroxide effect on DnBP extraction from milk samples, *27th International Conference Ecological Truth and Environmental Research*, Bor, Srbija (2019) Proceedings, 105-109
14. Anđelković T., **Bogdanović D.**, Kostić I., Kocić G., Comparison of the influence of temperature and ultrasound on DEHP migration from plastic packaging into food

recipients, *28th International Conference Ecological Truth and Environmental Research*, Kladovo, Srbija (2020) Proceedings, 24-29

- 15.** Anđelković T., **Bogdanović D.**, Kostić I., Nikolić G., Kostić B., Cvetković T., Kocić G., Determination of phthalates in PVC medical devices by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *28th International Conference Ecological Truth and Environmental Research*, Kladovo, Srbija (2020) Proceedings, 30-35
- 16.** Anđelković T., **Bogdanović D.**, Kostić I., Anđelković D., Kocić G., *The migration of DEHP from plastic packaging into dairy products with different fat content*, *28th International Conference Ecological Truth and Environmental Research*, Kladovo, Srbija (2020) Proceedings, 148-153

M₃₄ – Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja objavljeni u izvodu

- 17.** Anđelković T., Anđelković D., Nikolić R., **Milojković D.**, Kostić I., Cvetković T., Kocić G., ESI-MS ispitivanje interakcije hroma(III) i benzoeeve, salicilne I ftalne kiseline kao markera oksidativnog stresa, *6th Symposium Chemistry and Environmental Protection EnviroChem 2013 with international participation*, Vršac, Srbija (2013) Book of Abstracts, 192-193
- 18.** Anđelković T., Anđelković D., Kostić I., Nikolić R., **Milojković D.**, Cvetković T., Pavlović D., Investigation of interaction of lead(II) with salicylic acid as oxidative stress compound by ESI-MS, *6th Symposium Chemistry and Environmental Protection EnviroChem 2013 with international participation*, Vršac, Srbija (2013) Book of Abstracts, 194-195
- 19.** **Milojković D.**, Anđelković D., Kocić G., Kostić I., Ivanović M., Anđelković T., Effect of temperature on the migration of di-(2-ethylhexyl)phthalate from polyvinyl chloride dialysis bags to model solutions, *7th Symposium Chemistry and Environmental Protection with international participation, EnviroChem 2015*, Palić, Srbija (2015) Book of Abstracts, 214-215
- 20.** Ivanović M., Anđelković T., Anđelković D., Cvetković T., **Milojković D.**, Kostić I., Optimization of chloramphenicol extraction from water, *7th Symposium Chemistry and Environmental Protection with international participation, EnviroChem 2015*, Palić, Srbija (2015) Book of Abstracts, 239-240
- 21.** Kostić I., Anđelković T., Anđelković D., Cvetković T., Pavlović D., Ivanović M., Milojković D., Interaction between oxidative stress inducers: cobalt(II) and salicylic

acid, *7th Symposium Chemistry and Environmental Protection with international participation, EnviroChem 2015*, Palić, Srbija (2015) Book of Abstracts, 260-261

M₆₃ – radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja objavljeni u celini

- 22. Milojković D.**, Anđelković D., Anđelković T., Nikolić R., Kocić G., Stojiljković N., Determination of di-n-butyl phthalate and di-n-octyl phthalate in water samples by GC-MS, *51th Meeting of the Serbian Chemical Society*, Niš, Srbija (2014) Proceedings, 78-81

M₆₄ – radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja objavljeni u izvodu

- 23.** Kostić I., Anđelković T., Nikolić R., **Milojković D.**, Bojić A., Anđelković D., Interaction of Zn(II) ion with humic acid and humic-model ligands, *10th Symposium "Novel technologies and economic development"*, Leskovac, Srbija (2013) Book of Abstracts, 110
- 24.** Kostić I., Anđelković T., Anđelković D., **Bogdanović D.**, Branković M., Cvetković T., Kocić G., Investigation of ammonium hydroxide effect on DEHP extraction from milk samples, *13th Symposium with International participation „Novel Technologies and economic development“*, Leskovac, Srbija (2019) Proceedings, 49

IZJAVE AUTORA

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

КОНТАМИНАЦИЈА ХРАНЕ ФТАЛАТИМА УСЛЕД ЊИХОВЕ МИГРАЦИЈЕ ИЗ ПЛАСТИЧНЕ АМБАЛАЖЕ

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 12.4.2021.

Потпис аутора дисертације:

Даница Богдановић
Даница С. Богдановић

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов дисертације:

**КОНТАМИНАЦИЈА ХРАНЕ ФТАЛАТИМА УСЛЕД ЊИХОВЕ МИГРАЦИЈЕ
ИЗ ПЛАСТИЧНЕ АМБАЛАЖЕ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 12.4.2021.

Потпис аутора дисертације:

Даница С. Богдановић
Даница С. Богдановић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

КОНТАМИНАЦИЈА ХРАНЕ ФТАЛАТИМА УСЛЕД ЊИХОВЕ МИГРАЦИЈЕ ИЗ ПЛАСТИЧНЕ АМБАЛАЖЕ

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 12.4.2021.

Потпис аутора дисертације:

Даница Богдановић
Даница С. Богдановић