



Exponering av bisfenol A från fiskkonserver

Jen Pham

2014

Miljövetenskap

Examensarbete för kandidatexamen 15 hp

Lunds universitet

Exponering av bisfenol A från fiskkonserver

Jen Pham

2014

Examensarbete för kandidatexamen 15 hp, Lunds universitet

Handledare: Bo A. Jönsson & Christian Lindh, Arbets- och miljömedicin, Lunds universitet

Abstract

Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor which is very present in our surrounding environment. As a component mainly used in plastics and in the inner linings in cans, BPA can also be found in our bodies due to migration into food. Once the substance is reaching the components of the body it is biotransformed into a more water soluble molecule called monoglucoronide. Whether to measure the unconjugated BPA or the monoglucoronide in biological samples is, in the world of scientists, still debated. Many hold that only the unconjugated BPA is acting as a endocrine disruptor but contamination of BPA from materials in lab could obscure the true levels of exposure. One could try the best to avoid contamination or instead measure the levels of monoglucoronide. Both methods were conducted in this study in order to examine if there were any exposure of BPA from canned fish to humans. 21 volunteers donated urine and blood samples after having a lunch consisting of different fishes in cans. The samples were then analyzed for unconjugated BPA and monoglucoronide in urine. Solely unconjugated BPA was analyzed in blood serum by two different techniques - one with enzyme and one without. The analyses were performed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The results revealed elevated levels of BPA in urine and in blood serum samples, with enzyme, several hours after lunch. Monoglucoronide in urine was partly detected when comparing with earlier analysis executed by the Occupational and Environmental Medicine at Lund University. This could be due to the present of other metabolites. Eating sardines or tuna gave a significant elevation of BPA in urine. Hence canned fish is a source of exposure of BPA to humans. This study demonstrates the ubiquitous nature of BPA in our daily life.

Keywords: bisphenol A, BPA, monoglucoronide, endocrine disruptor, urine, blood serum, canned fish

Innehållsförteckning

1 Inledning.....	7
1.1 Bakgrund	7
1.2 Syfte.....	9
Miljövetenskaplig relevans.....	9
Avgränsning	9
2 Metod.....	10
2.1 Prover	10
2.2 Upparbetning av prover inför analys	10
2.3 Analys av prover för fritt BPA och monoglukoronid	12
2.4 Utvärdering av mängden BPA och monoglukoronid i varje prov	12
2.5 Beräkning av koncentrationerna av BPA och monoglukoronid i varje prov.....	13
2.6 Jämförelse av resultat från urinproverna med tidigare resultat analyserat med enzym	14
2.7 Utvärdering av samband mellan exponering av fiskkonserver med resulterande halter av fritt BPA....	14
3 Resultat.....	15
3.1 Uppmätta halter av fritt BPA och monoglukoronid i urin	15
3.2 Uppmätta halter av BPA i serum.....	20
3.3 Samband mellan vad volontärerna åt och de resulterande exponeringsnivåerna	20
4 Diskussion.....	21
4.1 BPA och monoglukoronid i urin	21
4.2 Metoden med analys av monoglukoronid i urin	21
4.3 Analys av BPA i blodserum	22
4.4 Samband mellan vad volontärerna åt och de resulterande exponeringsnivåerna	22
Miljövetenskaplig relevans	23
Slutsatser	24
Tackord	25
Referenser	26

1 Inledning

1.1 Bakgrund

Bisfenol A (BPA) är en storskaligt producerad kemikalie inom plastindustrin. Ämnet är en viktig råvara vid framställning av framförallt polykarbonat plaster och epoxiharts. Dessa utgångsmaterial används sedan för tillverkning av mängder av konsumentprodukter som exempelvis nappflaskor, vattenflaskor, matlådor, CD/DVD-fodral, leksaker m m. I konservburkar av metall för mat och dryck samt i vattenledningsrör används BPA-baserade material som inre ytskiktsbeläggning för skydd mot rost och korrosion. BPA återfinns, förutom i plastprodukter och -delar, även i kassakvitton, tandfyllningar, lim, flamskyddsmedel, målarfärg, golv, linser, medicintekniska produkter, elektronik m m. (Chapin et al., 2008; Kemikalieinspektionen, 2011; Vandenberg et al., 2007, Welshons et al., 2006).

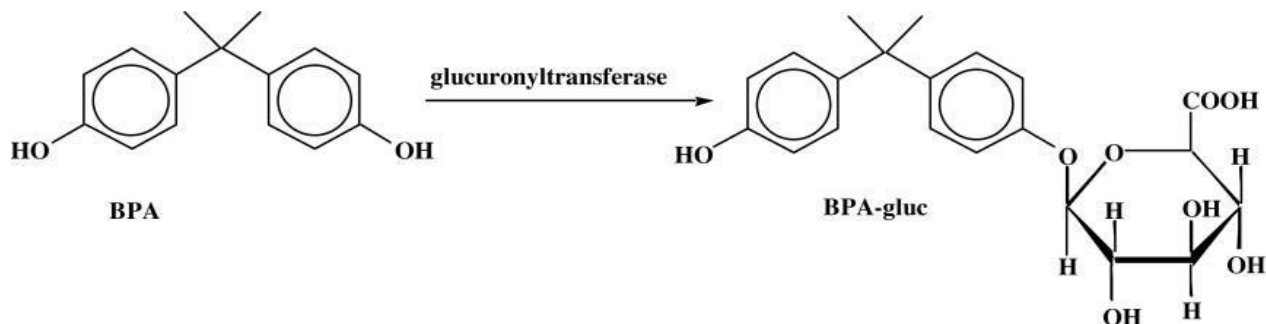
Plaster baserade på BPA började produceras för kommersiellt bruk under 50-talets senare hälft. Idag uppskattas världsproduktionen av BPA till sex miljoner ton per år där den största produktionen, sett till volym, sker i Asien följt av Europa och USA. Tillverkningsvolymerna spås öka inom den närmsta framtiden på grund av ökad efterfrågan (Vandenberg et al., 2010; Merchant Research & Consulting Ltd, 2013; Rochester, 2013). I Sverige finns det inte registrerat något företag som producerar BPA och den industriella hanteringen av både BPA och plastmaterial tillverkad av BPA är jämförelsevis begränsad. Däremot är importen till Sverige av BPA-baserade plaster och färdiga produkter mer betydande. Importen sker främst från andra EU-länder (Kemikalieinspektionen, 2011).

Den allmänna befolkningen kan exponeras för BPA genom direkt kontakt med BPA på arbetsplatser eller genom den yttre miljön. Vid provtagningar av den yttre miljön har BPA detekterats i vatten, jord, inomhus- och utomhusluft och bland dammpartiklar. BPA kan därmed inhaleras eller upptas in i kroppen vid hudkontakt. Människan kan även exponeras indirekt genom intag av föda eller dryck som har varit i kontakt med material tillverkade av BPA exempelvis ytskiktsbeläggningen i konservburkar eller dryckesflaskor (Chapin et al., 2008; Vandenberg et al., 2007; Rochester, 2013). Oralt intag är den rutt av exponering som tillför avsevärda mängder BPA (Chapin et al., 2008; Jönsson muntligen, 2014; Vandenberg et al., 2007). Chapin et al., (2008) och Vandenberg et al., (2007) rapporterar om ett flertal studier som har uppmätt läckande BPA från konservburkar till diverse matprodukter såsom fisk, frukt och grönsaker. Att rester av BPA kan migrera från konservburkar och färdiga plastprodukter under användning beror på ofullständig polymerisation¹. Även vid fullständig polymerisation kan molekyler av BPA migrera från plastmaterial ifall det har utsatts för höga temperaturer eller för sura eller basiska lösningar (Brotons et al., 1995; Vandenberg et al., 2010).

Fri, okonjugerad BPA påminner om östrogen och är därför hormonstörande. Molekylen binder till kroppens östrogenreceptorer och kan stimulera responser liknande östrogen (Gould et al. 1998; Rochester, 2013; Viñas et al., 2012). Vidare kan BPA agera som antagonist och blockera ”normala” responser genom att både konkurrera mot kroppsegna östrogen och androgen (Bonefeld-Jorgensen et al., 2007; Ritcher et al., 2007; Sohoni & Sumpter, 1998; Wetherill et al., 2007). BPA kan även interagera med andra delar, vävnader och system i kroppen exempelvis med sköldkörteln, organ, centrala nervsystemet och immunsystemet (Moriyama et al., 2002; Wetherill et al., 2007). Halveringstiden för BPA är mellan fyra till sex timmar vilket är relativt kort (Lindh muntligen, 2014; Völkel et al., 2002). BPA upptas först i mag- och tarmkanalen, vid oralt intag, och metaboliseras sedan i levern där molekylen konjugeras till vattenlöslig

¹ polymerisation - en kemisk reaktion vid vilken relativt små molekyler, monomerer, sammankopplas till en mycket större kedjemolekyl, en polymer (Polymerisation, 2014). Förenklat är BPA en monomer som krävs vid tillverkning av exempelvis polykarbonatplast som är en polymer (Rochester, 2013).

glukoronid (oftast monoglukoronid) (Pottenger et al., 2000; Snyder et al., 2000; Inoue et al., 2001; Jönsson muntligen, 2014; Völkel et al., 2002; Yamada et al., 2002). Konjugationen sker med hjälp av enzymet glukoronyltransferas (figur 1).



Figur 1 Molekylstruktur av BPA och monoglukoronid (BPA-gluc) samt biotransformation eller s k konjugering av BPA i människa. Enzymet glukoronyltransferas sätter på glukorongrupp, en sockermolekyl, vilket gör BPA vattenlösligt och molekylerna kan därmed utsöndras i urin. Bildkälla: Völkel et al., 2005.

Monoglukoronid skickas sedan till blodomloppet och vidare till njurarna där den utsöndras i urin. Denna metabolit förefaller vara den mest närvarande då BPA intas oralt och är inte biologisk aktiv (Jönsson muntligen, 2014; Völkel et al., 2002).

Mekanismer av hur BPA leder till ett visst sjukdomstillstånd är många gånger oklart då det endokrina systemet och kroppens andra system är komplexa. Många nyligen utförda epidemiologiska studier har ändå, med signifikanta resultat, påvisat samband mellan exponering av BPA med ett flertal olika sjukdomstillstånd (Becker et al., 2009; Calafat et al., 2008; Rochester, 2013; vom Saal & Hughes, 2005; Welshons et al., 2006). Detta stärker bevisen på att BPA är en riskfylld kemikalie (Rochester, 2013). Enligt Rochesters studie, där författaren har tittat på över nittio studier om BPA och dess hälsoeffekter, är exponering av BPA starkast relaterat till negativa konsekvenser av beteende- och nervsystemets utveckling hos barn samt till minskad fertilitetsförmåga hos vuxna (Rochester, 2013). Numera är BPA-forskarna även oroliga över exponering av låga doser av BPA eftersom sådan exponering bedöms vara mer relevanta och förekommande i vår miljö. Därutöver påvisar dem också negativa hälsoeffekter (Rochester, 2013). Men det finns också studier som inte funnit några samband mellan BPA och hälsoeffekter samt studier där dem i resultaten inte uppmätt några betydande mängder av BPA i kroppen (Gyllenhammar et al., 2013; Völkel et al., 2005).

Svårigheter kring analys av BPA

Forskarna mäter många gånger olika former utav BPA vilket kan leda till att olika slutsatser dras kring ämnet. Exempelvis har många studier mätt på den totala halten av BPA, det vill säga både fritt BPA och monoglukoronid. Ifall detta är korrekt är omdiskuterat då många menar att monoglukoronid är en ofarlig metabolit vilket i sådana fall skulle bidra till ett överskattat resultat för vissa grupper. Andra mäter bara på fritt BPA, vilket är den biologiskt aktiva formen, som tidigare nämnt, men det problem som uppkommer vid denna metodik är kontaminering. Kontaminering av prover med fritt BPA är en viktig aspekt när det kommer till analys av BPA eftersom molekylerna finns överallt och kontamineringshalterna kan därför skymma de låga halterna som finns i de biologiska matriserna (Calafat et al., 2013; Jönsson muntligen, 2014). Även om detta är allmänt känt bland forskarna kan det vara okänt för andra aktörer som exempelvis ska paketera prover. Ett sätt att undkomma kontaminering är att använda glukoronidas i analysmetoden. Detta enzym klipper bindningen mellan BPA och sockergruppen och därmed kan man välja att bara mäta på den avklippa molekylerna av BPA som har passerat kroppen. Alternativt är att bara mäta halter utav monoglukoronid men eftersom denna inte anses farlig är denna metod inte vanlig.

1.2 Syfte & frågeställningar

Eftersom BPA är en vanlig och utbredd kemikalie, och även en misstänkt riskkemikalie, syftar denna studie till att undersöka om det sker någon exponering av BPA från olika fiskkonserver. Att enbart analysera för monoglukoronid har tidigare inte genomförts i någon omfattande utsträckning vilket är intressant i metodutvecklingssyfte för BPA på Arbets- och miljömedicin avdelningen (AMM) på Lunds universitetssjukhus. Följande frågeställningar ämnar jag att besvara:

- Exponeras vi människor för BPA när vi äter fiskkonserver? Går det att se i urin? Går det att se i blod?
- Om ja, vilka fiskkonserver ger mest exponering?
- Om exponering av BPA sker, är det då möjligt att detektera monoglukoronid i urin?
- Om ja, hur skiljer sig mina analyser av monoglukoronid med AMM:s tidigare analyser av total BPA?

Miljövetenskaplig relevans

Min studie är miljövetenskaplig intressant eftersom vi dagligen omges av BPA och därmed de hälsorisker det för med sig. Det är dessutom oerhört viktigt, ur ett folkhälsoperspektiv, att utveckla analysmetoder för att i framtiden kunna förbättra dem och tydliggöra i vilka mängder vi människor faktiskt exponeras för. Identifiering av exponering av hormonstörande ämnen är ett led i arbetet mot att uppnå miljömålet *Giftfri miljö* samt för eventuell omvärdering av dagens omtvistade TDI² inom EU som är satt till 50 µg/kg kroppsvikt/dag (Rochester, 2013). I framtiden kan lagar kring BPA även komma att förändras med tanke på en förväntad ökad användning av plaster tillverkade av material som är baserade på BPA.

Avgränsning

I denna studie kommer jag inte att fördjupa mig kring huruvida orsaksförloppen av de eventuella hälsoeffekterna som kan komma av exponering. Halterna av BPA som har uppmäts kommer vara från humana biologiska matriser och inte från djur eller från vår yttre omgivande miljö.

² Tolerabelt dagligt intag (TDI) anger den mängd av ett ämne som en människa bedöms kunna få i sig via födan varje dag under hela sitt liv utan att det ska ge några negativa hälsoeffekter (Kemikalieinspektionen, 2011).

2 Metod

Jag har valt att analysera prover från deltagarna i denna studie på AMM:s laboratorium, och efter deras metodik, då de har erbjudit mig dessa prover och de har även mycket erfarenheter kring analys av BPA. Vidare är AMM:s laboratorium ett referenslaboratorium för BPA. Metodiken är utarbetad av Lindh, Amilon och Maxe år 2014.

Metoden är i vissa avsnitt uppdelad i understycken där (I) beskriver metodiken för urinanalyserna och (II) för analyserna i blodserum. I urin analyserades både fritt BPA och monoglukoronid. I blodserum analyserades fritt BPA med och utan glukoronidas. Hädanefter benämns ”blodserum” som ”serum”.

2.1 Prover

I. Urinproverna kommer ifrån ett tidigare projekt där 21 frivilliga personer, under mars 2014, intog olika sorter utav fiskkonserver till lunch. Anledningen till varför man hade valt fiskkonserver var för att dessa produkter misstänktes innehålla BPA. Läckage av BPA i konservburkar sker också i högre grad till fet mat (Lindh muntligen, 2014). Testpersonerna var av blandade kön och åldrar med boende i Lund omnejd. Insamlingen av urin skedde en gång innan lunch (U-1) och sedan fyra timmar efter lunch (U-2), åtta timmar efter lunch (U-3) samt en sista gång morgonen därpå (U-4) för varje person. Urinproverna har sedan lagrats i polypropylenrör, fria från BPA, i frys med en temperatur på -20°C , på AMM.

II. Fem frivilliga personer, som ingick i det projekt som nämndes ovan, lämnade även blodprover till AMM för analys av BPA i blod. Provtagningen skedde en gång före intag av fiskkonserver vid lunchtid och sedan ytterligare en gång efter lunch, klockan 15:30, för varje person. Sedan centrifugerades proven för att skilja fram serum i blod. Serumet överfördes sedan till polypropylenrör för lagring i frys med en temperatur på -20°C , på AMM.

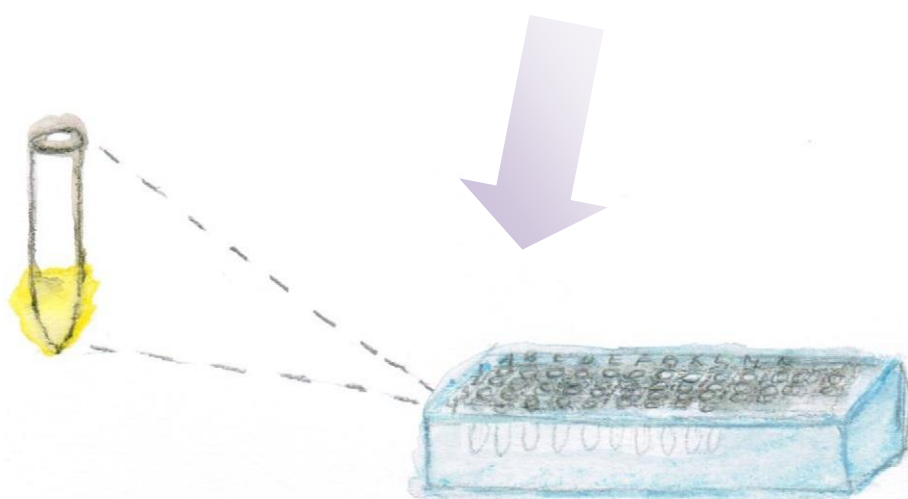
2.2 Upparbetning av prover inför analys

I. Innan påbörjad analys förbereddes urinproverna (4 x 21 st), rena prover utan kemikalier (kemblank), kontrollprover med känd undre samt övre koncentration av BPA och en serie av standardprover spikat med kända koncentrationer av BPA (50, 25, 10, 5, 2.5, 0.5 och 0 ng BPA/ml urin) samt en serie av standardprover för monoglukoronid (50, 25, 10, 5, 2.5, 0.5 och 0 ng monoglukoronid/ml urin). Normalurinen, med ett lågt innehåll av BPA, som används till standardkurvan är fastställd sen innan. Glasinsatser preparerades därför med upptinat urin, ren BPA eller monoglukoronid, intern standarder (IS), buffertlösningar och lösningsmedel enligt tabell 1 i en 96-hålsplatta (figur 2).

Tabell 1 Lista för upparbetningen av urinprover, blodserumprover samt tillhörande standarprover för standardkurva, kemblank och kontrollprover som behövs för att analysera för BPA och monoglukoronid. Vid analys av serum utan glukoronidas tillsattes inga enzym.

INNEHÅLL	
URIN	Standardkurva 200 µl normalurin + 100 µl 1M ammoniumacetat pH 6,5 + 25 µl BPA 400/200/80/40/4/0 ng/ml eller monoglukoronid 400/200/80/40/4/0 ng/ml + 25 µl metanol + 25 µl IS
	Kemblank 200 µl MQ-vatten + 100 µl 1M ammoniumacetat pH 6,5 + 25 µl metanol + 25 µl IS

	Kontrollprov	200 µl kontrollurin + 100 µl 1M ammoniumacetat pH 6,5 + 25 µl metanol + 25 µl IS
	Prov	200 µl urin 100 µl 1M ammoniumacetat pH 6,5 + 25 µl metanol + IS
SERUM	Standardkurva	100 µl normalserum + 10 µl 1M ammoniumacetat pH 6,5 + 25 µl BPA 200/80/40/20/4/2/0 ng/ml + 10 µl glukoronidas + 25 µl metanol + 25 µl IS + 200 µl acetonitril
	Kemblank	100 µl MQ-vatten + 10 µl 1M ammoniumacetat pH 6,5 + 10 µl glukoronidas + 25 µl metanol + 25 µl IS + 200 µl acetonitril
	Kontrollprov	100 µl kontrollurin (inga kontrollprover för serum) + 10 µl 1M ammoniumacetat pH 6,5 + 10 µl glukoronidas + 25 µl metanol + 25 µl IS + 200 µl acetonitril
	Prov	100 µl serum + 10 µl 1M ammoniumacetat pH 6,5 + 25 µl metanol + 25 µl IS + 200 µl acetonitril



Figur 2 Upparbetade prov i glasinsatser i en 96-hålsplatta.

Dubbletter för alla prov gjordes på ytterligare plattor för kontroll vilket resulterade i totalt fyra plattor. Alla pipettspetsar och laboratorieglas som användes var dessförinnan sköljda med vatten och därefter med 95 % etanol för att få bort eventuell löst BPA. 96-hålsplattorna med de olika proverna förslöts sedan med en förslutningsmatta och mixades sedan kort i Multi-Tube Vortexer VWR. Efteråt centrifugerades plattorna i centrifug Sigma 4-16 i tio minuter med rcf 3000. Kemblank-proverna var till för att se ifall det tillkommer andra ämnen eller mer utav BPA under laborationens gång vilka dras bort från den ursprungliga registrerade värdet (formel 1). Standardproverna var till för att kunna fastställa standardkurvor för fritt BPA samt för glukoronid. Referenspunkterna till kurvorna var därför spikade med kända koncentrationer av rent BPA respektive rent glukoronid i normalurin. Standardkurvorna användes sedan för att räkna ut den mängd av BPA eller monoglukoronid som finns i ett okänt prov med hjälp av standardkurvans ekvation (tabell 2). Kontrollproverna i sin tur används för att säkerställa standardkurvans validitet. Lösningen med intern standarden D14-BPA, vilket tillsattes till alla prover enligt tabell 1 ovan, behövdes för att kunna kompensera för de felkällor som sen uppkommer i analysdelen (formel 1).

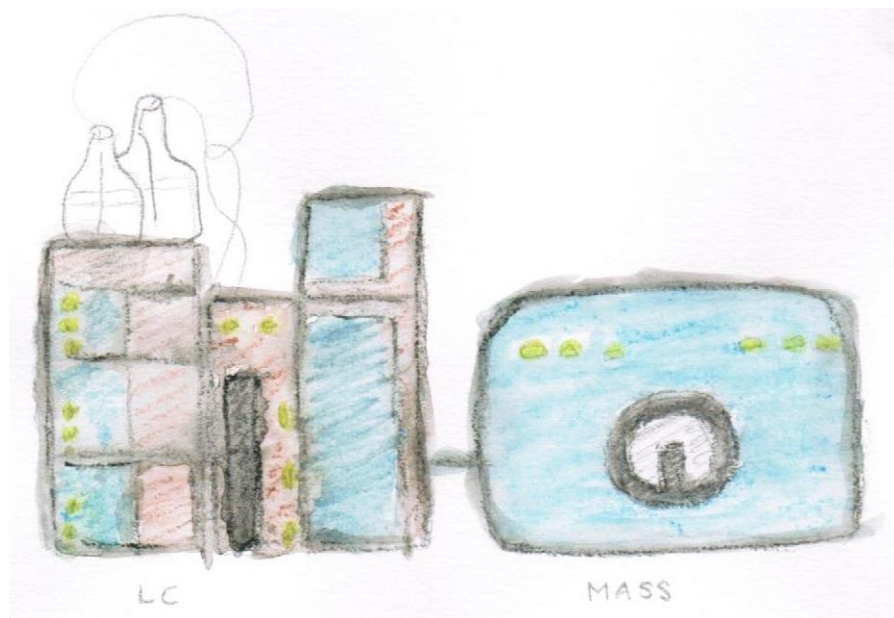
II. Serumproverna (2 x 5 st) förberedes med samma tillvägagångssätt enligt tabell 1 efter upptining och med samma materiel som användes vid upparbetning av urinproverna. Eftersom blodproverna analyserades för fritt BPA med och utan glukoronidasmotoden gjordes två uppsättningar av varje prov varav den ena uppsättningen fick enzymet glukoronidas tillsatt. En serie av standardprover utarbetades även för serumproverna. Även för serumproverna gjordes dubbletter för kontroll och därmed gjordes totalt två 96-hålsplattor. Kontrollproverna för serum är dem som tidigare användes till urin eftersom kontrollprover för serum inte fanns tillgängliga. Samtliga 96-hålsplattor inkuberades sedan i 37°C, i Heidolph Inkubator Titramax 1000, med rpm 500 i 30 minuter. I detta moment optimerar man enzymaktiviteten i proverna. Proverna tilläts därefter svalna till rumstemperatur innan resterande lösningar tillsattes enligt tabell 1. Alla lösningar i tabell 1 tillsattes manuellt genom vanlig pipettering förutom acetonitril. Denna tillsattes samtidigt till alla prover i varje platta i en så kallad multipipetterbot av typen Liquidator 96 Ranin Pipetting 360°.

Acetonitril tillsattes för att denaturera proteinerna i serum för att eliminera störande molekyler vid senare analyser. Plattorna skakades därefter i en Multi-Tube Vortexer VWR i 30 minuter och placerades sedan i centrifug Sigma 4-16 i tio minuter med rcf 2600.

2.3 Analys av prover för fritt BPA och monoglukoronid

I. Efter centrifugering kördes urinproverna in i en vätskekromatografi-tandemmasspektrometri av typen Sciex Qtrap 5500 Applied Biosystems (LC-MS-MS) för analys (figur 3). I det första steget av systemet där provlösningen passerar vätskekromatografen (LC), tas eventuella störningar bort i en reningskolonn då proverna som analyseras innehåller låga nivåer av BPA eller monoglukoronid. Sedan förs provlösningen vidare in i det andra steget med tandem masspektrometern (MS-MS). I denna del utsätts BPA- och monoglukoronid-molekylerna först för en hög spänning, sedan vakuum och till sist för kollision med kväve i MS-MS-systemets olika kvadropoler. Molekylerna bildar då en moderjon med molekylvikten 227 g/mol för BPA och 404 g/mol för monoglukoroniden vilket är det som registreras som kvantifierbara signaler på datorn genom analyskolonnen. Denna separerar olika ämnen för att rätt ämne ska kunna identifieras och kvantifieras. Intern standarden registreras också på samma sätt.

II. Serumproverna frystes in innan analys i LC-MS-MS-systemet på grund av att instrumentet behövdes rengöras. När rengöringen var klar tinades serumproverna upp och analysen fortgick likadant som för urinproverna.



Figur 3 Vätskekromatografi-tandemmasspektrometri-systemet på AMM där urinprover samt serumprover analyserades för BPA och/eller monoglukoronid.

2.4 Utvärdering av mängden BPA och monoglukoronid i varje prov

I. Signalerna från de olika ämnen som LC-MS-MS-systemet har lyckats registrera omvandlas till olika toppar vars intensitet beskrivs på en y-axel och på x-axeln finns retentionstiden angivet i minuter. Med hjälp av tidsaxeln kan man identifiera vilket ämne uppkommande toppar representerar eftersom man vet utifrån tidigare erfarenheter vid vilken tidpunkt BPA samt monoglukoronid kommer i diagrammet. Toppen för BPA kommer runt 3.28 minuter och toppen för monoglukoronid runt 2.11 minuter. Det är areorna, A för alla prover, A_{KEM} för kemblank och A_{IS} för IS:en, under grafernas toppar som är de parametrar som behövs för att kunna räkna ut koncentrationerna av BPA och monoglukoronid (avsnitt 2.5). Vissa signaler hade registrerats fel, det vill säga att MS-MS-systemet registrerat andra toppar, och därför justerades dessa fel i programmet MultiQuant™ Software. I detta program kontrollerades även att intern standarden låg i rätt position i relation till registrerat ämne och retentionstid.

II. Samma utvärderingsmetodik tillämpades för serumproverna. BPA:s retentionstid var 3.45

2.5 Beräkning av koncentrationerna av BPA och monoglukoronid i varje prov

I. Standardkurvor utformades för BPA och monoglukoronid utifrån de kända koncentrationerna av respektive ämne som tillsattes i standardproverna samt av de utslag standardproverna gav från MS-MS-systemet (tabell 2). Alla beräkningar utfördes sedan i Excel.

Tabell 2 Standardkurvornas ekvationer och R²-värden samt för vilka prover som koncentrationen av BPA eller monoglukoronid kan beräknas för.

	PROVER	ANALYSÄMNE	STANDARDKURVANS EKVATION
URIN	Platta 1; pers. 1 - 10	BPA	$y = 0.099x + 0.020$; R ² = 0.996
	Platta 2; pers. 1 - 10	BPA	$y = 0.091x + 0.063$; R ² = 0.987
	Platta 1; pers. 1 - 10	monoglukoronid	$y = 22461x - 3915$; R ² = 0.996
	Platta 2; pers. 1 - 10	monoglukoronid	$y = 5995x + 5918$; R ² = 0.987
	Platta 1; pers. 11 - 21	BPA	$y = 0.106x + 0.025$; R ² = 0.996
	Platta 2; pers. 11 - 21	BPA	$y = 0.078x + 0.064$; R ² = 0.991
	Platta 1; pers. 11 - 21	monoglukoronid	$y = 7032x + 3248$; R ² = 0.998
	Platta 2; pers. 11 - 21	monoglukoronid	$y = 5995x + 5918$; R ² = 0.987
SERUM	Platta 1; pers 3, 5, 15, 17 & 18	BPA med glukoronidas	$y = 0.049x + 0.009$; R ² = 0.997
	Platta 1; pers 3, 5, 15, 17 & 18	BPA utan glukoronidas	$y = 0.045x + 0.021$; R ² = 0.999
	Platta 2; pers 3, 5, 15, 17 & 18	BPA med glukoronidas	$y = 0.048x + 0.012$; R ² = 0.999
	Platta 2; pers 3, 5, 15, 17 & 18	BPA utan glukoronidas	$y = 0.046x + 0.018$; R ² = 0.999

Innan standardkurvorna kan utnyttjas för att räkna ut koncentrationen av BPA och monoglukoronid divideras alla A-värden och A_{KEM} med respektive A_{IS}. Sedan subtraheras A_{KEM} av respektive ämne från den erhållna kvoten för att få y för varje prov (formel 1).

Formel 1:
$$\left(\frac{A_n}{A_{IS}}\right) - \left(\frac{A_{KEM}}{A_{IS}}\right) = y$$

där A_n = area under graf som representerar mängden BPA eller monoglukoronid i n:te provet; A_{KEM} = area under graf som representerar mängden BPA eller monoglukoronid i kemblank-proverna; A_{IS} = area under graf som representerar intern standardens mängd.

Därefter löses koncentrationerna av respektive ämne, x_{BPA} och x_{GLU}, ut ur standardkurvornas ekvationer eftersom y-värdena är kända för varje prov (tabell 2). Medelvärden av de två koncentrationerna från dubbelprov räknades ut. I ett sista steg justerades alla erhållna koncentrationer av BPA och monoglukoronid för kreatinin³, med urinens redan framtagna kreatininvärden u_{kreatinin}. Detta för att kompensera för att de olika

³ kreatinin – en molekyl, en nedbrytningsprodukt, närvarande i urin (Lindh, muntligen 2014).

urinproverna har olika densitet. Detta gjordes med formel 2 för BPA och med formel 3 för monoglukoronid.

Formel 2:
$$\frac{((x_{BPA_n} * 1000) / m_{BPA})}{u_{kreatinin}}$$

Formel 3:
$$\frac{((x_{GLU_n} * 1000) / m_{GLU})}{u_{kreatinin}}$$

där x_{BPA_n} = koncentrationen av BPA (ng/ml) i n:te provet; x_{GLU_n} = koncentrationen av monoglukoronid (ng/ml) i n:te provet; m_{BPA} = 228.29 g/mol, molekylvikten för BPA; m_{GLU} = 404.41 g/mol, molekylvikten för monoglukoronid

II. För att beräkna koncentrationerna av BPA i serum utfördes samma uträkningsförfarande som ovan förutom att formel 3 uteslöts då jag endast analyserar för fritt BPA i dessa prover. Se standardkurvorna för serumproverna i tabell 2.

2.6 Jämförelse av resultat från urinproverna med tidigare resultat analyserat med enzym

I tidigare analyser som AMM har utfört på urinproverna användes enzymet glukoronidas. Vid analys av dessa prov finns då både fritt BPA och molekyler av BPA som blivit klippta från sin sockergrupp vilka tillsammans kallas för total BPA. För att få reda på hur mycket av de totala BPA-molekyler som faktiskt har genomgått konjugering i kroppen och om de uppmätta halterna av monoglukoronid i min studie motsvarar dessa användes formel 4.

Formel 4:
$$\frac{[mono-glu\ BPA]_n}{[tot\ BPA]_n - [fri\ BPA]_n} = b$$

där $[mono-glu\ BPA]_n$ = koncentrationen av monoglukoronid (nmol/mmol) i n:te provet; $[tot\ BPA]_n$ = koncentrationen av total BPA (nmol/mmol) i n:te provet; $[fri\ BPA]_n$ = koncentrationen av fritt BPA (nmol/mmol) i n:te provet. Samtliga värden är kreatininjusterade. b = förhållandet mellan m_{GLU_n} och $([tot\ BPA]_n - [fri\ BPA]_n)$.

Om $b = 1$ förmodas att alla de avklippta molekyler av BPA, från de tidigare analyserna med glukoronidas, har konjugerat med molekyler av monoglukoronid som jag har funnit. Om $b < 1$ eller $b > 1$ ligger det andra mekanismer bakom detta förhållande.

2.7 Utvärdering av samband mellan exponering av fiskkonserver med resulterande halter av fritt BPA

Resultatet från exponeringsnivåerna av BPA i samtliga urinprover jämfördes med vad deltagarna åt. Fisklunchen är kategoriserade enligt tabell 3. Det icke-parameteriska oberoende Mann-Whitney U testet användes för att statistiskt testa kategorierna av fiskkonserver mot halterna i urinproverna U-1, U-2, U-3 och U-4. Detta test valdes eftersom mina värden inte är normalfördelade. Av den orsaken att Mann-Whitney bara kan jämföra värden mot två grupper i taget testades halterna i alla urinproverna mot parvisa kategorier (Miller & Miller, 1988).

Tabell 3 Fiskkonserverna som volontärerna intog till lunch är kategoriserade i fyra olika kategorier. Antalet personer i respektive kategori står under kolumn N.

KATEGORI	FISKKONSERV	N (personer)
1	1 - 1 ½ burk sardin á 120 g	8
2	1 burk tonfisk á 100 g	5
3	1 burk sardin + 1 burk makrill. 1 burk makrill á 125 g. Totalt 245 g.	5
4	1 burk sardin + 1 burk tonfisk. Totalt 220 g.	3

3 Resultat

3.1 Uppmätta halter av fritt BPA och monoglukoronid i urin

BPA detekterades i samtliga urinprover, även i proverna U-1 (tabell 4). Halterna i proverna U-1 är emellertid försumbara med några undantag. Urinproverna U-1 för person 1, 15 och 19 hade dock något högre halter av BPA innan intag av fisk. I de flesta urinprover uppmättes de högsta halterna av BPA i proverna U-2 och i proverna U-3. Hos person 3, 12, 15 och 20 uppmättes emellertid de högsta halterna av BPA i proverna U-4. Person 11 är svår att utvärdera då denna endast lämnat tre prover.

Även monoglukoronid återfanns i samtliga urinprover (tabell 4). De högsta förhöjda halterna av monoglukoronid uppmättes i urinproverna U-2 följt av urinproverna U-3, U-1 och U-4. Generellt syns en trend där halterna av monoglukoronid är högre än halterna av fritt BPA i urin. Enstaka urinprover hade försumbara halter av monoglukoronid. Halterna av monoglukoronid av samtliga urinprover från person 4 går inte att utvärdera då detta resultat anses orimliga.

$b < 1$ för nästan samtliga urinprover (tabell 4). För person 1, 5, 16 och 19 i urinproverna U-1 var $b > 1$. Flera urinprover hos person 16 var $b > 1$. $b = 1$ återfanns hos person 1 i proverna U-3 och U-4 samt hos person 19 i prov U-4.

Tabell 4 Redovisning av resultaten på de uppmätta koncentrationerna av fritt BPA och monoglukoronid (nmol/mmol) från alla urinprover från samtliga 21 volontärer. Fjärde kolumnen från vänster visar koncentrationerna på total BPA (nmol/mmol), vilka är resultatet analyserat med glukoronidas, från en tidigare analys på samma urinprover utförd av AMM. Samtliga prover är justerade för kreatinin. U-1 = urinprov taget innan lunch, U-2 = urinprov taget fyra timmar efter lunch, U-3 = urinprov taget åtta timmar efter lunch och U-4 = urinprov taget morgonen därpå. Kvoten b beskriver förhållandet mellan den uppmätta koncentrationen av monoglukoronid och koncentrationen av klippt BPA från de tidigare analyserna med glukoronidas.

* Fel/problem vid analys/upparbetning utav prover. **Försumbara koncentrationer av BPA/monoglukoronid.

Prov	Fritt BPA (nmol/mmol)	Mono-glu. BPA (nmol/mmol)	Total BPA (nmol/mmol)	b
Pers-1 U-1	0,30	3,45	0,87	6,00
Pers-1 U-2	0,63	2,93	4,05	0,86
Pers-1 U-3	0,46	2,36	2,00	1,53
Pers-1 U-4	0,24	1,30	1,52	1,02

Pers-2 U-1	0,02**	0,24	1,60	0,15
Pers-2 U-2	0,30	3,47	10,87	0,33
Pers-2 U-3	0,42	1,53	7,13	0,23
Pers-2 U-4	0,05**	0,52	2,28	0,23

Pers-3 U-1	0,05**	0,52	1,25	0,43
Pers-3 U-2	0,17	1,74	6,98	0,26
Pers-3 U-3	0,30	1,76	9,02	0,20
Pers-3 U-4	0,31	0,64	3,36	0,21

Pers-4 U-1	0,08**	271,10*	0,23	1841,34*
Pers-4 U-2	0,13	258,68*	1,25	230,75*
Pers-4 U-3	0,17	148,06*	2,03	79,78*

Prov		Fritt BPA (nmol/mmol)	Mono-glu. BPA (nmol/mmol)	Total BPA (nmol/mmol)	b
Pers-4	U-4	0,16	377,94*	1,57	268,28*
Pers-5	U-1	0,14	0,12	0,18	2,51
Pers-5	U-2	0,05	0,77	2,62	0,30
Pers-5	U-3	0,19	0,56	2,42	0,25
Pers-5	U-4	0,06**	0,20	0,60	0,37
Pers-6	U-1	-0,03**	0,05**	0,08	0,47
Pers-6	U-2	0,33	1,43	7,09	0,21
Pers-6	U-3	0,32	0,94	4,38	0,23
Pers-6	U-4	0,13	0,17	1,19	0,16
Pers-7	U-1	0,00**	0,15	0,31	0,50
Pers-7	U-2	0,01**	0,87	4,29	0,20
Pers-7	U-3	0,27	0,78	5,12	0,16
Pers-7	U-4	0,07**	0,23	1,13	0,21
Pers-8	U-1	0,14	0,10	0,58	0,22
Pers-8	U-2	0,21	1,51	7,54	0,21
Pers-8	U-3	0,14	1,40	7,37	0,19
Pers-8	U-4	0,06**	0,29	2,05	0,14
Pers-9	U-1	0,08**	0,06**	0,31	0,25
Pers-9	U-2	0,18	1,37	5,92	0,24
Pers-9	U-3	0,02**	0,84	3,48	0,24
Pers-9	U-4	0,04**	0,14	0,86	0,18
Pers-10	U-1	0,08**	0,04**	0,36	0,16
Pers-10	U-2	0,09**	1,03	3,91	0,27
Pers-10	U-3	0,24	0,36	4,25	0,09
Pers-10	U-4	0,14	0,19	0,95	0,23
Pers-11	U-1	0,11	0,44	0,82	0,63
Pers-11	U-3	0,09**	0,98	3,28	0,31
Pers-11	U-4	0,06**	0,56	0,90	0,66
Pers-12	U-1	-0,01**	0,48	1,15	0,42
Pers-12	U-2	0,37	0,62	3,12	0,22
Pers-12	U-3	0,28	0,71	4,21	0,18
Pers-12	U-4	0,51	0,68	2,38	0,36
Pers-13	U-1	0,06**	0,10	0,47	0,26
Pers-13	U-2	0,38	0,87	4,17	0,23
Pers-13	U-3	0,33	1,36	5,95	0,24
Pers-13	U-4	0,09**	0,24	1,13	0,23
Pers-14	U-1	0,13	0,25	0,52	0,63
Pers-14	U-2	0,05**	2,07	10,28	0,20
Pers-14	U-3	0,12	1,62	5,66	0,29
Pers-14	U-4	0,08	0,60	1,14	0,57
Pers-15	U-1	0,65	0,21	0,90	0,86
Pers-15	U-2	0,43	2,06	7,99	0,27
Pers-15	U-3	0,35	2,26	9,86	0,24
Pers-15	U-4	1,22	0,81	4,17	0,27

Prov		Fritt BPA (nmol/mmol)	Mono-glu. BPA (nmol/mmol)	Total BPA (nmol/mmol)	b
Pers-16	U-1	0,04**	21,70	0,64	36,13
Pers-16	U-2	0,31	10,42	1,99	6,21
Pers-16	U-3	0,11	5,92	10,34	0,58
Pers-16	U-4	0,30	3,88	8,33	0,48
Pers-16	U-5	0,11	2,45	0,99	2,78

Pers-17	U-1	0,02**	0,07**	0,36	0,22
Pers-17	U-2	1,96	0,89	5,39	0,26
Pers-17	U-3	1,33	1,07	8,16	0,16
Pers-17	U-4	0,31	0,99	5,84	0,18

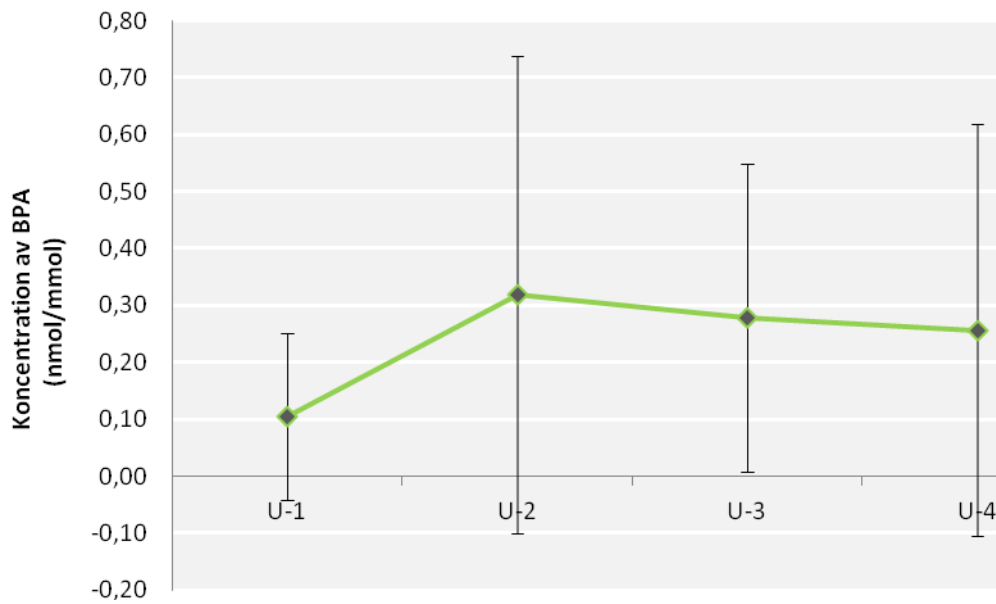
Pers-18	U-1	0,05**	0,36	0,81	0,47
Pers-18	U-2	0,34	1,79	7,93	0,24
Pers-18	U-3	0,34	2,00	7,95	0,26
Pers-18	U-4	0,09**	0,80	1,32	0,65

Pers-19	U-1	0,21	1,35	0,58	3,72
Pers-19	U-2	0,08**	1,13	2,35	0,50
Pers-19	U-3	0,08**	0,67	2,10	0,33
Pers-19	U-4	0,01**	0,94	0,82	1,17

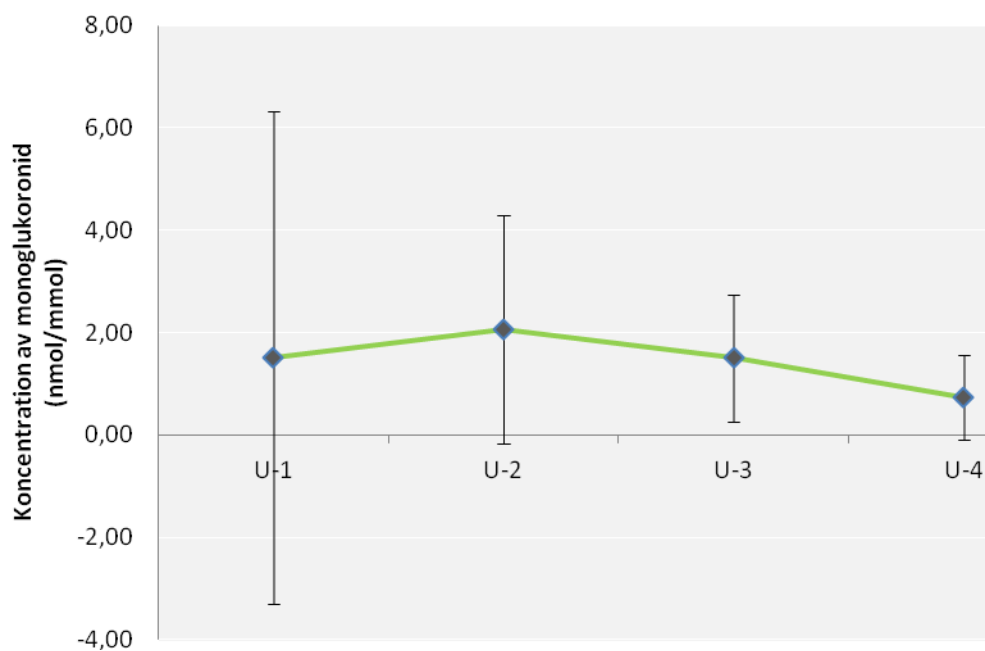
Pers-20	U-1	0,02**	0,06**	0,13	0,56
Pers-20	U-2	0,05**	0,57	1,72	0,34
Pers-20	U-3	0,04**	0,34	1,04	0,34
Pers-20	U-4	0,12	0,12	0,72	0,20

Pers-21	U-1	0,07**	0,35	0,58	0,69
Pers-21	U-2	0,30	3,72	13,90	0,27
Pers-21	U-3	0,53	2,70	14,69	0,19
Pers-21	U-4	0,36	1,38	4,88	0,30

Sammantaget syns en förhöjd koncentration av både fritt BPA och monoglukoronid i urin (nmol/mmol), specifikt mellan urinproverna U-1 och U-2, det vill säga fyra timmar efter intag av fiskkonserver (figur 4 och figur 5). Koncentrationerna av de båda molekylerna avtar sedan med tiden. Koncentrationen av monoglukoronid är generellt högre i alla urinprov jämfört med koncentrationerna av BPA i respektive urinprov vilket också kan utläsas i de två diagrammen.



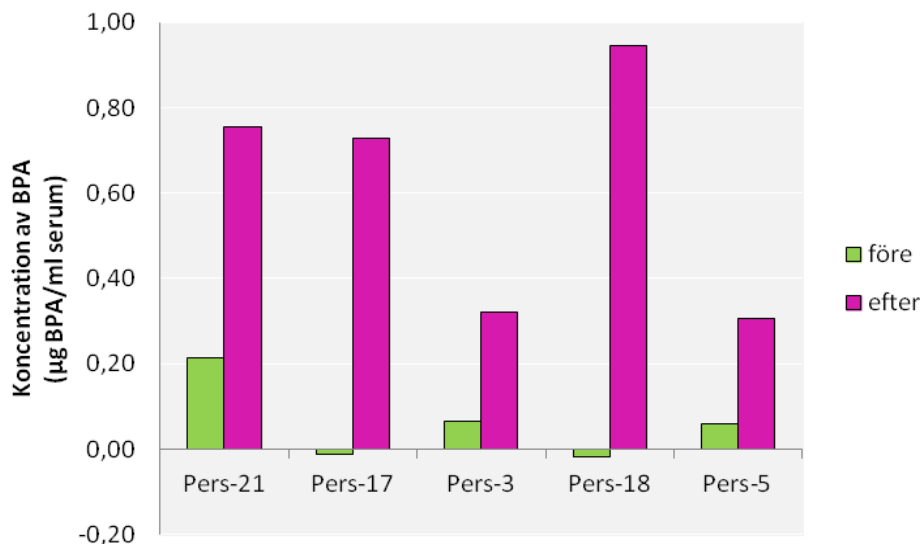
Figur 4 Koncentration av fritt BPA (nmol/mmol) i urin hos 21 volontärer efter exponering av fiskkonserver. De uppmätta halterna är kategoriserade efter vilken tidpunkt urinproven är insamlade; U-1 = urinprov taget innan lunch, U-2 = urinprov taget fyra timmar efter lunch, U-3 = urinprov taget åtta timmar efter lunch och U-4 = urinprov taget morgonen därpå. Samtliga värden är justerade för kreatinin.



Figur 5 Koncentration av monoglukoronid (nmol/mmol) i urin hos 21 volontärer efter exponering av fiskkonserver. De uppmätta halterna är kategoriserade efter vilken tidpunkt urinproven är insamlade; U-1 = urinprov taget innan lunch, U-2 = urinprov taget fyra timmar efter lunch, U-3 = urinprov taget åtta timmar efter lunch och U-4 = urinprov taget morgonen därpå. Samtliga värden är justerade för kreatinin.

3.2 Uppmätta halter av BPA i serum

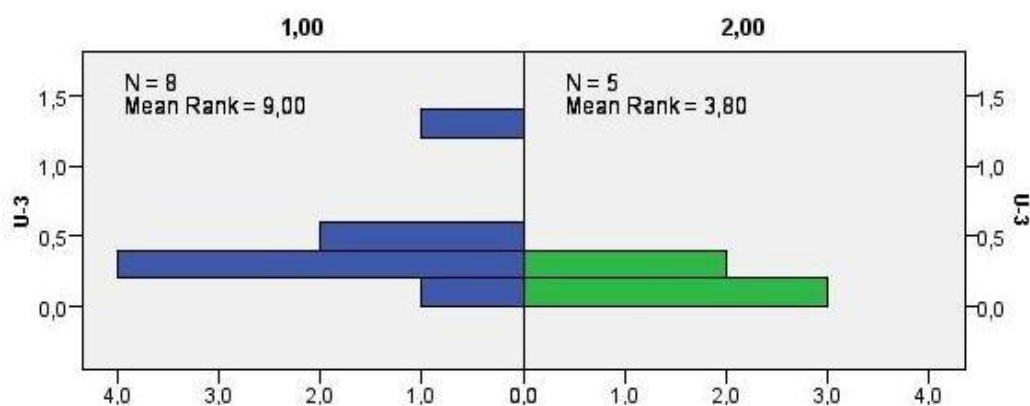
Resultatet från analys för BPA av serum med enzym, glukoronidas, påvisar förhöjda halter av total BPA i blod efter intag av fiskkonserver (figur 6). Person 18 var den som uppnådde de högsta halterna av BPA i blod och hade även den största skillnaden mellan koncentration av BPA före och efter intag av fiskkonserver. Däremot kunde inte förhöjda halter av BPA i serum klargöras vid analys utan enzym.



Figur 6 Koncentration av BPA (µg BPA/ ml serum) i serum hos fem volontärer före och ungefär tre och en halv timmar efter exponering av fiskkonserver.

3.3 Samband mellan vad volontärerna åt och de resulterande exponeringsnivåerna

Inget signifikant samband hittades vid jämförelse mellan de uppmätta exponeringsnivåerna av fri BPA i de flesta urinproverna och de fyra kategorierna av fiskkonserver, hos de 21 deltagarna (figur 7). Däremot påvisades ett signifikant resultat vid jämförelse mellan kategori 1 och 2 och exponeringsnivåerna av BPA i urin ($p < 0,05$).



Figur 7 På y-axlarna visas koncentrationerna av BPA i urin U-3, som var insamlat åtta timmar efter exponering av fiskkonserver, hos några av de 21 volontärer. x-axlarna visar antalet personer med urinprov U-3. Staplarna i kategori 1 (till vänster) och staplarna i kategori 2 (till höger) representerar de urinprover från de två skilda kategorierna. N = 8 personer åt av fiskkonserver från kategori 1 vilket är en burk med sardiner. N = 5 personer åt av fiskkonserver från kategori 2 vilket är en burk med tonfisk. Att koncentrationerna av BPA i U-3 beror på lunch från kategori 1 eller 2 är signifikant ($p < 0,05$).

4 Diskussion

4.1 BPA och monoglukoronid i urin

Resultatet från min studie fann både halter av fritt BPA och monoglukoronid i samtliga urinprover från de 21 personer som deltog. Hos de flesta av deltagarna detekterades både fritt BPA och monoglukoronid redan i de urinprover som insamlades innan lunch även om halterna är oerhört låga. För tre personer (person 1, 15 och 19) var halterna av urinproverna som togs innan lunch något högre (tabell 4). Att BPA och monoglukoronid detekterades i samtliga prover samt att vissa personer bar på högre halter innan exponering av fiskkonserver tyder på att det finns en del i befolkningen som är exponerade för BPA från omgivningen eller annan mat. Att halterna sedan ökar efter intag av fiskkonserver, som synes i urinproverna insamlade fyra timmar efter lunch, är ett bevis på att exponering för BPA från fiskkonserver sker.

Resultatet (figur 4 och 5) visar på stora individuella skillnader mellan halterna av BPA vid urinprovtagningstillfällena och man kan även utläsa personer vars halter av BPA skiljer sig något från det generella exponeringsförloppet (där deltagarna har låga halter innan exponering av fiskkonserver, sedan något högre halter efter exponering vilket sedan avtar ju längre tid som har passerat efter exponeringen). Exempelvis har person 1 högsta halten av monoglukoronid i det första urinprovet och sedan sjunker halterna under studiens gång (tabell 4). Återigen kan detta vara ett tecken på en annan exponeringskälla än fiskkonserverna men detta kan även beror på att person 1 är effektiv i att utsöndra BPA i urin. Kanske är den sistnämnda förklaringen mer trolig eftersom halterna av fritt BPA hos person 1 inte är anmärkningsvärd. Samma mönster hittas hos person 16 men där är halterna monoglukoronid mycket högre än snittet. Antingen är denna person väldigt exponerad för BPA men en mer sannolik förklaring är att detta prov kan ha upparbetats felaktigt eller analyserats fel i instrumentet. Det finns även andra faktorer som kan förklara individuella skillnader i metabolism av BPA. Exempelvis spelar ålder och sjukdomstillstånd roll (Chapin et al., 2008). För att minimera individuella skillnader i liknande studier i framtiden borde deltagarna ha fått likadana förutsättningar från början det vill säga likadana fiskkonserver och mängder (Lindh, muntligen 2014). Men de flesta uppnår de högsta halterna av BPA och monoglukoronid i de urinprov som lämnats fyra eller åtta timmar efter exponering. Åtta timmar är relativt sent vid jämförelse med halveringstiden för BPA.

En trend som framkom av resultaten var att halterna av monoglukoronid var högre än halterna av fritt BPA i urin. Detta är rimligt då BPA är en molekyl som kroppen snabbt strävar efter att metabolisera och utsöndra. I figur 4 och i figur 5 avtar halterna av BPA och monoglukoronid efter exponering av fiskkonserver. Halterna av fri BPA sjunker för många personer aldrig ner till noll under detta tidfönster vilket pekar på att biologiskt aktivt BPA finns närvarande i nästan ett dygn efter exponering av fiskkonserver.

I mars 2014 analyserade AMM i Lund samtliga urinprover för total BPA, med glukoronidas, i urin (tabell 4). Eftersom kvoten $b < 1$ för nästan samtliga urinprover innebär detta att jag inte har lyckats detektera alla molekyler av monoglukoronid som förmodligen finns i proven. Dålig känslighet för monoglukoronid i mätinstrument kan vara en orsak till detta. En annan tänkbar orsak är om det även finns diglukoronid eller andra metaboliter av BPA i den uppmätta halten av total BPA (Lindh, muntligen 2014).

4.2 Metoden med analys av monoglukoronid i urin

Många andra studier analyserar främst för total BPA och i många fall också för fri BPA. AMM i Lund vill i framtiden undersöka möjligheterna med att utveckla analysmetoder för monoglukoronid istället eftersom man då direkt kan utesluta kontaminering då monoglukoronid inte kan komma från omgivningen. Att mätinstrumentet detekterade monoglukoronid i proverna var därför positivt. Svårigheterna kring denna metod kan i början vara att det inte finns så många andra studier att jämföra med. Eftersom sockergrupper

också sätts på andra molekyler som kroppen vill bli av med är det viktigt att verkligen säkerställa att det är monoglukoroniden som instrumenten registrerar. Vid misstanke av eventuell närvaro av andra metaboliter av BPA bör man också finna analysmetoder för dessa för att korrekt uppmäta exponeringshalter av BPA. Nya kostnader tillkommer med nya metoder och materiel är alltså en fråga som måste övervägas. I denna studie hade jag inte tillgång till någon intern standard vilket skulle ha stärkt resultatet. För framtida mätningar av monoglukoronid måste denna införskaffas.

De uppmätta halterna i urinproverna som analyserades för monoglukoronid hos person 4 är helt orimliga och kan endast förklaras som metodikfel och/eller störningar i mätinstrument.

Forskarna anser inte att monoglukoronid är farlig och antagligen har det därför inte blivit vedertaget att analysera för monoglukoronid. Denna metabolit har dock en fördelaktig egenskap, att den bara kan bildas i kroppen och då utesluter kontaminering. Dessutom, enligt min mening, är det inte felaktigt att analysera för monoglukoronid som ett mått på exponering av BPA eftersom passagen för BPA till att bli monoglukoronid är lång. BPA hinner genom denna rutt interagera med olika delar utav kroppen innan den omvandlas till monoglukoronid. Hur detta ter sig, dess kinetik, det vill säga när och var BPA interagerar med de olika systemen i vår kropp är föremål för framtida studier.

4.3 Analys av BPA i blodserum

I blod är halterna av fritt BPA svåra att upptäcka eftersom halterna är mycket låga på grund av kroppens snabba metabolism av ämnet. Fritt BPA i blod indikerar dock intern exponering och därför anses det bland vissa forskargrupper mer relevant att mäta (Jönsson, muntligen 2014; Vandenberg et al., 2010). I ett av mina två försök, där jag använde mig utav enzymet glukoronidas, påvisades total BPA i serum efter intag av fiskkonserver hos de fem personer som lämnade blod. När jag däremot analyserade för fritt BPA utan glukoronidas fann jag inget. För att fritt BPA ska kunna detekteras utan glukoronidas krävs det troligen högre halter utav BPA. Ackumulation av fritt BPA i blod har tidigare inte upptäckts men BPA kan absorberas och lagras i andra ställen i kroppen för att sedan utsöndras i små doser till blodomloppet igen (Fernandez et al., 2007). Med detta sagt är det inte sannolikt att kunna upptäcka fritt BPA i blod efter fiskkonserver utan glukoronidas. Möjligen kan volymen av insamlade de blodproverna vara större för att BPA ska kunna detekteras. Person 18 hade högsta halterna av total BPA i serum (figur 6). Man kan koppla detta till att denna person åt två stycken burkar utav fiskkonserver från kategori 1 vilket är en av dem fiskkonserver som gav signifikant förhöjda koncentrationer av BPA i urin.

Varför halterna av BPA i serum är negativa (figur 6) beror på manuella justeringar av kemblank vilket resulterat i större halter av BPA i kemblank än vad som finns i de tagna blodproven. Det kan också beror på att större halter av BPA faktiskt förekom i kemblank på grund av misstag under upparbetning.

Kontrollprover av urin för analys av serum fungerade men för att korrekt analysera BPA i serum bör kontrollprover av serum införskaffas på AMM.

4.4 Samband mellan vad volontärerna åt och de resulterande exponeringsnivåerna

Att fiskkonserver från kategori 1 och 2 bidrog till exponeringshalterna i urinproverna U-3 var det enda sambandet som var signifikant (figur 7). Detta innebär att halterna av fritt BPA blev högre i urin insamlat åtta timmar för dem personer som åt sardiner eller tonfisk jämfört med de övriga personerna. De övriga som åt fiskkonserver i kategori 3 och 4 åt dubbelt så mycket fisk jämfört med de i kategori 1 och 2 men uppnådde trots detta inte högre halter av BPA. Kategori 4 åt dessutom utav både dem fiskkonserver som jag funnit signifikant för. Person 18, som nämnt i avsnitt ovan, åt däremot två burkar sardiner (kategori 1) och fick halter av BPA i blod som var högre än de andra. Utifrån detta resultat borde de som åt av kategori 3 eller 4 ha fått signifikant förhöjda halter av BPA i kroppen men att det förmodligen var för få personer som åt av dessa kategorier och då för få deltagande i studien. Mängden av fisk i kategori 3 och 4 var ju dubbelt så mycket som i kategori 1 och 2 som jag fick utslag för. Att högsta

halter av BPA återfanns åtta timmar efter lunch tyder på att deltagarna tycks metabolisera BPA senare än genomsnittet, vilket jag även nämnde innan i avsnitt 4.1, men här med signifikans.

Miljövetenskaplig relevans

Resultatet i denna studie visar att BPA kan vara vanligt förekommande i vardagen för många grupper i vår befolkning. Många matprodukter är paketerade i konservburkar men exponering av BPA från dessa är många gånger inte undersökta förutom bland nyfikna populärvetenskapliga institutioner. För att bli kvitt med oenigheter kring BPA i forskningsvärlden bör identifikationsstudier av exponering likt denna utvidgas bland andra produktområden och medier i miljön. Detta skulle eventuellt stärka populärvetenskapliga studier och punktera oenigheter kring BPA. Identifikationsstudier av exponering för BPA tillsammans med fler epidemiologiska studier och analysmetodutveckling kan bilda en stark grund för beslutsunderlag gällande BPA-baserade produkter och eventuell omvärdering av dagens TDI för BPA i den närmsta framtiden. Detta för att kunna komma längre i arbetet gällande miljömålet *Giftfri miljö* och även inom EU:s kemikalielagstiftning.

Slutsatser

Fiskkonserver är en exponeringskälla av BPA då förhöjda halter av denna molekyl har uppmätts både i urin och i blod hos deltagarna i denna studie efter enbart en lunch. Signifikanta halter uppnåddes vid intag av sardiner eller tonfisk. Också dess metabolit, monoglukoronid, fanns närvarande i urin vilket betyder att kontaminering från omgivande labbutrustning helt kan uteslutas. Metodutveckling krävs dock för att stärka resultat från analyser för monoglukoronid i urin. Troligen finns det även andra metaboliter av BPA i urin vilka vi med dagens metoder inte kan se. Halterna av BPA i blod var svåra att detektera men blev möjligt med enzymet glukoronidas. Utsöndringen av BPA bland deltagarna föreligger något långsammare jämfört med den generella befolkningen och många har kvar halter av BPA morgonen efter dagen då lunchen intogs vilket kan medföra ökade risker för exponering av BPA i kroppen för dessa.

Tackord

Jag vill hjärtligen tacka Bo A. Jönsson, Christian Lindh och Margareta Maxe, på Arbets- och miljömedicin avdelningen, Lunds universitetssjukhus, för att ni har bidragit med tid och kunskaper och möjliggjort detta arbete.

Referenser

Vetenskapliga artiklar:

- Becker, K., Güen, T., Seiwert, M., Conrad, A., Pick-Fuß, H., Müller, J., ... & Kolossa-Gehring, M. (2009). GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *International journal of hygiene and environmental health*, 212(6), 685-692.
- Biedermann, S., Tschudin, P., & Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(1), 571-576.
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., Long, M., Hofmeister, M. V., & Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental Health Perspectives*, 115, 69.
- Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V., & Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental Health Perspectives*, 103(6), 608.
- Calafat, A. M., Koch, H. M., Swan, S. H., Hauser, R., Goldman, L. R., Lanphear, B. P., ... & Wolff, M. S. (2013). Misuse of blood serum to assess exposure to bisphenol A and phthalates. *Breast Cancer Res*, 15, 403.
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environmental health perspectives*, 116(1), 39.
- Carwile, J. L., & Michels, K. B. (2011). Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003–2006. *Environmental research*, 111(6), 825-830.
- Chapin, R. E., Adams, J., Boekelheide, K., Gray, L. E., Hayward, S. W., Lees, P. S., ... & Woskie, S. R. (2008). NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. Birth Defects Research Part B: *Developmental and Reproductive Toxicology*, 83(3), 157-395.
- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufik, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., ... & Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive toxicology*, 24(2), 259-264.
- Gould, J. C., Leonard, L. S., Maness, S. C., Wagner, B. L., Conner, K., Zacharewski, T., ... & Gaido, K. W. (1998). Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Molecular and cellular endocrinology*, 142(1), 203-214.
- Gyllenhammar, I., Tröger, R., Glynn, A., Rosén, J., Hellenäs, K. E., & Lignell, S. (2014). Serum levels of unconjugated bisphenol A are below 0.2 ng/ml in Swedish nursing women when contamination is minimized. *Environment international*, 64, 56-60.
- Joskow, R., Barr, D. B., Barr, J. R., Calafat, A. M., Needham, L. L., & Rubin, C. (2006). Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *The Journal of the American Dental Association*, 137(3), 353-362.
- Meeker, J. D., Calafat, A. M., & Hauser, R. (2009). Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environmental science & technology*, 44(4), 1458-1463.
- Melzer, D., Rice, N. E., Lewis, C., Henley, W. E., & Galloway, T. S. (2010). Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PloS one*, 5(1), e8673.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., ... & Nakao, K. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(11), 5185-5190.

- Richter, C. A., Birnbaum, L. S., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Talsness, C. E., ... & vom Saal, F. S. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive toxicology*, 24(2), 199-224.
- Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155.
- Sohoni, P., & Sumpter, J. P. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology*, 158(3), 327-339.
- Vandenberg, L., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J., & Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental health perspectives*, 118(8), 1055-1070.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2), 139-177.
- Viñas, R., Jeng, Y. J., & Watson, C. S. (2012). Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. *International journal of environmental research and public health*, 9(8), 2694-2714.
- Vom Saal, F. S., & Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental health perspectives*, 113(8), 926.
- Völkel, W., Bittner, N., & Dekant, W. (2005). Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(11), 1748-1757.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G. A., Filser, J. G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical research in toxicology*, 15(10), 1281-1287.
- Welshons, W. V., Nagel, S. C., & vom Saal, F. S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147(6), 56-69.
- Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., ... & Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 178-198.

Övriga källor:

- Kemikalieinspektionen. (2011). *Bisfenol A - Rapport från ett regeringsuppdrag*. Rapport 2:11. Bromma. Kemikalieinspektionen.
- Merchant Research & Consulting Ltd. (2013). *World BPA production grew by over 372,000 tonnes in 2012*. Hämtad 22 april 2014, från <http://mcgroup.co.uk/news/20131108/bpa-production-grew-372000-tonnes.html>
- Polymerisation (2014). | ne.se. Hämtad 24 april, 2014 från <http://www.ne.se/polymerisation>

Litteratur

- Miller, J. C., & Miller, J. N. (2003). *Statistics for analytical chemistry* (2. uppl.). West Sussex: Ellis Horwood Limited.

Personlig kommunikation

- Jönsson, Bo A. (2014). Arbets- och miljömedicin, Lunds universitet. bo_a.jonsson@med.lu.se
- Lindh, Christian. (2014). Arbets- och miljömedicin, Lunds universitet. christian.lindh@med.lu.se



LUNDS UNIVERSITET

Miljövetenskaplig utbildning

Centrum för klimat- och
miljöforskning

Ekologihuset

22362 Lund