



Water Research Center
Tel Aviv University

דצמבר 2016

דו"ח מסכם

**אפיון איכותי כמותי לניטור חומרים משבשי פעילות
הורמונלית במי נחל הקישון**

עבור רשות נחל הקישון

המעבדה להידרוכימיה והמרכז לחקר המים בראשות פרופ' דרור אבישר

בית הספר למדעי כדור הארץ, הפקולטה למדעים מדויקים

אוניברסיטת תל אביב

תקציר:

מטרת עבודת אפיון זו הייתה לבדוק הימצאות של חמישה חומרים משבשי פעילות הורמונלית (EDCs) במספר נקודות דיגום באפיק נחל הקישון. נבדקו נקודות, (1) במעלה הנחל (אפשרות לזיהומים טבעיים, חקלאיים, סניטריים- פארק גילמה ויגור גשר אירל) (2) בנקודות בהן ישנה הזרמה יזומה נקודתית (דרך צינור) של קולחין ממקורות תעשייתיים (כרמל אולפנים ובז"ן) (3) במורד נקודות זיהום אלו בגוף המים של הנחל (גשר הרכבת). שיטות אנליטיות פותחו ותוקפו לגילוי וכימות החומרים באמצעות פרוצדורת (Solid Phase SPE Extraction) ושימוש ב-HPLC-MS. התוצאות שהתקבלו מצביעות על נוכחות של שני חומרים מתעשיית הפלסטיק (BPA, TBBA) במורד הנחל, לאחר הזרמת השפכים התעשייתיים, אך לא במעלה הנחל.

1. מבוא

1.1 מזהמים משבשי פעילות הורמונלית EDCs

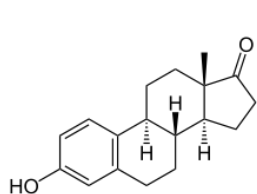
קבוצה גדולה וחדשה של מזהמים אורגניים-סינתטיים (Emerging Contaminates - ECs) אותרו בשנים האחרונות בסביבות טבעיות והראו תופעות מזיקות למערכות חיים שונות. חומרים אלו זוהו בעיקר במי שפכים עירוניים, בשפכים של מפעלי ייצור תרופות, בתי חולים, אתרי הטמנת פסולת וסביבות מימיות טבעיות. ריכוזם של מזהמים אלה בסביבה מימית עלול לנוע בין ננוגרמים בודדים לליטר ועד למספר בודד של מיקרוגרמים. חומרים אלו עלולים לגרום לפגיעות אקולוגיות שונות כגון: הפרעה במערכת האנדוקרינית של אורגניזמים מפותחים, עמידות מיקרוביולוגיות, ואגירה בקרקע, בצמחים ובבעלי חיים.

תת קבוצה של המזהמים הנ"ל הנם חומרים משבשי פעילות הורמונלית (Endocrine Disruptors Chemicals - EDCs). חומרים אלו, דוגמת הורמונים וסטרואידים, מופרשים בקביעות מבני-אדם ובעלי חיים לסביבה הטבעית. הסטרואידים הטבעיים הכוללים את (א) הורמון המין הנקבי אסטראדיול ($17\text{-}\beta\text{-Estradiol}$, E2) אשר משפיע על תפקוד מערכת הרבייה והמין, ואת (ב) תוצר פירוק שלו, ההורמון המין הנקבי אסטרון (Estrone, E1) המופרש גם מהשחלות, מדאיגים במיוחד, מאחר והם נמצאו כפוטנטיים. פעילותם הפיזיולוגית עשויה לשבש פעילות הורמונלית אצל יצורים ביולוגיים.

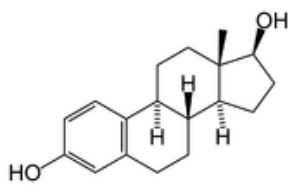
שפכים ממקורות אנושיים עלולים להכיל גם אסטרוגנים סינתטיים כגון (ג) $17\text{-}\alpha\text{-Ethinyl}$ אסטראדיול (EE2), החומר הפעיל בגלולה למניעת היריון, אשר משפיע על יצורים ביולוגיים כבר בריכוז נמוך של 1 ng/L.

מזהמים משבשי פעילות הורמונלית נוספים אשר עלו לאחרונה לתודעה ונחשבים כמזיקים לסביבה ולפעילות הביולוגית הם (ד) ביספנול A (BPA), חומר כימי בשימוש בתעשיית הפלסטיקה, אשר פוגע בפוריות של נשים וגברים ועשוי לשבש את הפעילות ההורמונלית אצל תינוקות. (ה) טטראברומו-ביספנול A (TBBA), חומר מעכב בעירה שמשמש כתוסף גם

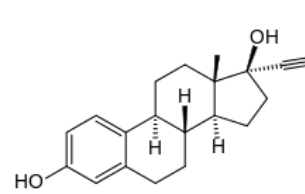
למוצרי פלסטיק וטקסטיל וחשוד כחומר המשבש את המערכת האנדוקרינית והחיסונית אצל תינוקות.



ביספניול A-17- α -אתיניל אסטרדיול

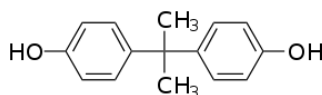


אסטרון (E1)

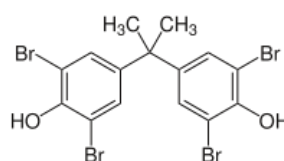


אסטרדיול (E2)

(EE2)



ביספניול A (BPA)



טטראברומו-ביספניול A (TBBA)

1.2 אזור הסקירה

נחל הקישון הינו אחד הנחלים הגדולים והחשובים בישראל ובין המורכבים שבהם. אגן הניקוז שלו משתרע על שטח של 1,100 קמ"ר. הנחל איתן לרוב אורכו. הוא זורם מגינן בשומרון, לאורך כ- 70 ק"מ, דרך עמק יזרעאל ועמק זבולון, עד יציאתו לים במפרץ חיפה.

במורד צומת העמקים מתנקזים אל הנחל כמה יובלים, החשובים בהם הם נחל ציפורי המנקז את בקעת בית נטופה, ונחל הגדורה המנקז את מערב הרי שפרעם ואזור קריית ביאליק.

נחל הקישון היה בעבר הנחל המזוהם ביותר מבין נחלי החוף והיה סמל לזיהום ומטרד סביבתי קשה, אשר הביא להתמוטטות המערכת האקולוגית בו. במעלה הקישון ולאורך יובליו ישנם עשרות מוקדי זיהום המשפיעים באופן מתמיד או מזדמן על איכות הנחל. הזיהום במעלה הקישון הוא חקלאי בעיקרו, וכמעט ללא תרומה תעשייתית. רובו של הזיהום בחלק זה נובע מדישון וממי נקז מהשדות שמקורם בקולחין. בנוסף, זורמים לנחל מי נגר עילי וכן מים שמקורם בשפכים מרפתות ומשקי חי אחרים. תמלחות וזיהום תעשייתי מצויים אף הם במקטע זה, אך בכמות מועטה.

מורד הקישון מצוי בלב העיר חיפה, באזורי תעשייה כבדה, כבישים, תשתיות, מחלפים ושימושי קרקע נוספים, הגורמים לקיטוע רצף הנחל. מקטע נחל זה סובל מזיהום חמור ומתמשך שמקורו משפכים/קולחים תעשייתיים ועירוניים. מקור הזיהום הינו מהמפעלים הפטרוכימיים, מפעלי דשנים וממכוני טיהור ושפכים עירוניים כגון: חיפה כימיקלים, בתי זיקוק, כרמל אולפנינים, דשנים, גדות ביוכימיה. חומרים מזהמים יכולים להיות דשנים, הורמונים, זרחות, חומרי הדברה, חומרי ניקוי (דטרגנטים), חנקות, כלורידים, שפכים, תרופות, תשטיפים ועוד.

2. מטרות

עבודת האפיון המובאת כאן בוצעה לצורך ניטור ראשוני של 5 חומרים (המפורטים למעלה) במעלה ובמורד אפיק נחל הקישון.

דגימות מי הנחל נדגמו ע"י רשות נחל הקישון ב-5 נקודות שונות לאורך הנחל:

1. פארק גילמה (מעלה הנחל) – מה שנכנס במעלה הנחל. דגימת רקע לזיהום התעשייתי שבמורד.
2. גשר אירי יגור (מעלה הנחל) – ניקוז הקיבוץ וחקלאות. דגימת רקע לזיהום התעשייתי שבמורד.
3. מוצא כרמל אולפינים (מורד הנחל) – מפעל המייצר מונומורים ופולימרים לתעשיית הפלסטיק
4. מוצא בתי הזיקוק (בז"ן) (מורד הנחל) - זיקוק נפט גולמי ותוצרי המשך של תעשיית הנפט.
5. גשר הרכבת (מורד הנחל) – נקודת דיגום המאפיינת את מרבית ההזרמות של מפרץ חיפה (למעט גדות ביוכימיה).

3. שיטות הבדיקה

א. דיגום, והכנת הדוגמאות לאנליזה:

דגימת מי הנחל בנקודות השונות נעשתה ע"י רשות נחל הקישון. הדגימות נשמרו בקירור, הובאו באותו היום למעבדה וסוננו באמצעות פילטר PVDF 0.45µm.

ריכוז וניקוי של הדוגמא נעשה ע"י העברת 250 מ"ל דוגמא בעמודת SPE מסוג Oasis HLB של חברת Waters, השבת האנליטים הרצויים באמצעות תערובת של

Acetone:Acetonitrile:Water:Diethylamine ביחסים של (67:23:10:2), נידוף בזרם חלש של חנקן אינרטי תוך כדי חימום ל-40°C והמסה מחדש בתמיסת 16mM Ammonium Formate (pH=8) ו-Methanol ביחס של (85:15). (לשיטה האנליטית המלאה ראה נספח 2).

ב. אנליזה כרומטוגרפית LC-MS:

אנליזת הדוגמאות התבצעה באמצעות מכשיר HPLC (Agilent 1100) וגלאי מסוג QTOF Premier mass spectrometer (Waters) ביוניזציה שלילית (negative mode). הפרדות החומרים בוצעו באמצעות קולונה מסוג Kinetex Evo 50x2.1mm 2.6µ בטמפי של 40°C וע"י גרדיאנט מריצים של מים ו-Methanol המכילים 0.005% תמיסת אמוניה.

זיהוי החומרים התבצע ע"י גילוי המסה המדויקת של כל חומר, וכן ע"י השוואת זמן יציאה בדוגמא אל מול סטנדרט. הכימות התבצע אל מול עקומת כיוול של תמיסות סטנדרט. (לשיטה האנליטית המלאה ראה נספח 2)

כל דוגמא נעשתה ב-triplicate (3 הכנות זהות)

4. תוצאות

הטבלה להלן מציגה סיכום של התוצאות שהתקבלו ביחידות של ppt (ng/L). גבול הגילוי (LOD) של השיטה הינו 4ng/L עבור החומרים BPA, E1, E2, EE2 ו-8ng/L עבור TBBA. ערכים שנתקבלו מתחת לגבול זה או כאשר לא נצפו כלל, מדווחים כ-ND (Not detected). גבול הכימות (LOQ) של השיטה הינו 12ng/L עבור החומרים BPA, E1, E2, EE2 ו-24ng/L עבור TBBA. ערכים שבין גבול הכימות לגבול הגילוי, מעידים על הימצאות החומר אך לא ניתנים לכימות ומדווחים כקטנים מגבול הכמות (<LOQ).

טבלה 1: נוכחות EDC's הנבדקים על פי נקודות הדיגום

תוצאות מוצגות ביחידות של ng/L (parts per trillion) - ממוצע של 3 דוגמאות					
TBBA	BPA	E1	E2	EE2	
ND	ND	ND	ND	ND	נחל - פארק ג'למה
ND	ND	ND	ND	ND	נחל - יגור גשר אירי
38.8	130.2	<12	<12	<12	בז"ן
72.6	381.4	ND	ND	ND	כרמל אולפינים
91.9	162.8	<12	<12	13.0	נחל - גשר הרכבת

5. דיון בתוצאות

5.1 דיון בתוצאות השיטה האנליטית:

לצורך ביצוע בדיקות האפיון, פותחה שיטה אנליטית (נספח 2) אשר נבדקה במספר פרמטרים בכדי להוכיח את תקפותה. כתהליך מקדים לאנליזת הדוגמאות ובמהלכה, בוצעו מספר בקורות על השיטה האנליטית, על מנת לאשרר את תקפותה:

א. לינאריות:

נבדקה ע"י ניתוח של 6-8 תמיסות סטנדרט בריכוזים שנעים בין $1.0\mu\text{g/L}$ - $100\mu\text{g/L}$ (שווה ערך לריכוז חומרים סופי בדוגמא של 4ng/L - 400ng/L). התאמה לינארית (R^2) של לא פחות מ-0.995 התקבלה עבור כל הדוגמאות. השיטה יכולה להיחשב כלינארית בתחום שנבדק.

ב. גבולות גילוי ודיווח:

גבול הגילוי (LOD) נקבע כנקודה הנמוכה ביותר בעקומת הכיול הלינארי בה התקבל שטח אינטגרציה עבור החומר הנבדק, ויחס סיגנל/רעש (Signal to Noise ratio) של לפחות 3. הגבול נקבע על 4ng/L עבור כל החומרים, למעט TBBA לו נקבע גבול של 8ng/L .

גבול הכימות (LOQ) נקבע כנקודה בה יחס Signal to Noise ממוצע של 3 הזרקות הוא לא פחות מ-6, והריכוז החומר בנקודה זו לפחות פי 3 מערך גבול הגילוי. הגבול נקבע על 12ng/L עבור כל החומרים, למעט TBBA לו נקבע גבול של 24ng/L .

ג. הדירות:

הדירות המערכת הכרומטוגרפית נקבעה ע"י הזרקות חוזרות (control) של תמיסת סטנדרט בריכוז של $50\mu\text{g/L}$. ערכי relative standard deviation (RSD) של פחות מ-10% נחשבים כהדירות מספיקה לשיטה זו. ערכי RSD של בין 5.5%-9.8% התקבלו עבור כל החומרים.

הדירות הדוגמאות נקבעה ע"י ביצוע 3 הכנות מכל דוגמא (triplicate) ובדיקת ערכי RSD לכל חומר, במידה שמעל LOQ. ערכים הקטנים מ-10% נחשבים כהדירות מספיקה לשיטה זו. למעט TBBA, ערכי RSD שהתקבלו קטנים מ-7.4%.

תוצאות TBBA הראו שונות גבוהה בין הדוגמאות, כאשר בחלק מה-triplicates דוגמא אחת מראה ערכים השונים עד פי 5 מדוגמא אחרת.

TBBA הינו חומר בעייתי לגילוי באמצעות יוניזציה סטנדרטית ב-MS, ובייחוד כאשר משולב בסקירה עם עוד חומרים (כמו במקרה הזה) וכאשר מעורבת מטריצה עם חומרים אורגניים מומסים רבים (שפכים, מי נחל). לעיתים יצריך שיטה ופרוצדורות הכנה שונות.

משיקולי תקציב הוחלט לבדוק TBBA בעבודת אפיון זו בשיטה אחת יחד עם 4 החומרים האחרים, מה שהוביל לשונות הגבוהה בין הדוגמאות. יחד עם זאת, מהתוצאות שהתקבלו, ניתן לקבוע בביטחון רב, טווח של ערכי TBBA הנמצאים בדוגמאות:

טבלה 2: נוכחות TBBA על פי נקודות הדיגום

TBBA(ng/L)	נקודת דגימה
ND	נחל - פארק ג'למה
ND	נחל - יגור גשר אירי
20-84.7	בז"ן
36.9-108.8	קרמל אולפינים
32.3-91.9	גשר הרכבת

ד. יעילות מיצוי:

יעילות המיצוי (Extraction efficiency) נבדקה עבור כל נקודת דגימה ב-duplicate, באמצעות הוספת ריכוז ידוע (spike) של תמיסת סטנדרט לדוגמאות (בנוסף ל-triplicate שנבדק עבור כל נקודת דגימה), והחלת כל תהליך הכנת הדוגמא גם על דוגמאות אלו. אחוזי ההשבה (%recovery) עבור כל דוגמא כזו נבדקו (לאחר החסרה של כמות החומר שנתגלתה בדוגמאות המקוריות) והריכוז הסופי תוקן ע"י חישוב התוצאה שהתקבלה בממוצע ה-triplicate של הדוגמאות המקוריות אל מול ממוצע %recovery כפי שנתקבל מדוגמאות spike (כלומר נרמול ל-100% אחוזי השבה).

טבלה 3: אחוזי השבה של החומרים הנבדקים

TBBA	BPA	E1	E2	EE2	
46.6%	65.3%	77.1%	73.0%	63.9%	Avg %recovery

באופן כללי, תוצאות של % recovery מעל 60% מצביעות על השיטה כאמינה. נוסף על כך, מכיוון שבדיקת ה-extraction efficiency מתבצעת בצורה המתוארת לעיל, ניתן להתייחס לתוצאות שהתקבלו כמדויקת מאוד. זאת בגלל שלכל מטריצה של דוגמא מחושב % on-line recovery המעיד על יעילות השיטה לאותה מטריצה ספציפית (מטריצה = נקודת דגימה במקרה זה), ואשר מושפעת מהפרמטרים הייחודיים של כל דוגמא (למשל כמות החומר האורגני המומס שיכול להשתנות בצורה קיצונית יחסית, אפילו באותה היממה, ותלוי בין השאר בגורמי מזג האוויר כמו גם בפעילות אנושית אקראית). גישה זו עומדת אל מול ולידציה חד פעמית של מטריצה מידגמית, בה, על אף שייתכן % recovery גבוה יותר (כתלוי בשיטת המיצוי), הווריאביליות גבוהה יותר ואין התחשבות בתנאים ובמטריצה של הדוגמא הספציפית הנבדקת.

5.2 דיון בתוצאות כלליות, השלכות סביבתיות ומסקנות:

תוצאות עבודת האפיון מעידות כי חומרים משבשי פעילות הורמונאלית לא נמדדו במעלה הנחל (נקודות רקע). לעומת זאת, במורד הנחל, במוצאי השפכים/קולחים של המפעלים שנבדקו למי הנחל, נמצאו ריכוזים של BPA (בז"ן 130 ננוגרם/ליטר, כרמל אולפינים 381 ננוגרם/ליטר) ו TBBA (בז"ן 39 ננוגרם/ליטר, כרמל אולפינים 73 ננוגרם/ליטר), שבהחלט מעידים על זיהום בנחל מחומרים משבשי פעילות הורמונאלית אלו, הנובע מהזרמת שפכים שמקורם במפעלים אלו. במורד הזרימה, אזור המאופיין בערבוב ומיהול של כל המים והמקורות הזיהום השונים מהמעלה, נמצא ריכוז של BPA כ 163 ננוגרם/ליטר ו TBBA כ 92 ננוגרם/ליטר, המעיד כי חומרים אלו, למרות פקטור המיהול עם מי הנחל, עדיין נמדדו במי הנחל, ובריכוזים יחסית משמעותיים. המצאות של החומרים הללו במי הנחל ועקב היותם חומרים משבשי פעילות הורמונאלית, עשוי לגרום לנזק למרכיבים ביוטיים החיים במערכת אקוויטית זו.

השפעות אפשריות של BPA על אוכלוסיות של חלזונות, קיימים בספרות כבר מערכים של 50ng/L (Oehlmann et al., 2006) ועל ימיושים החל מערכים של 80ng/L (Watts et al., 2001). ראשנים (Levy et al., 2004) ודגים קטנים כגון טרוטה חומה (Lahnsteiner et al., 2005) עשויים להיות מושפעים החל מריכוזים של 1000ng/L - 2000ng/L .

TBBA ידוע כפוגע ביצורים מימיים גדולים כגון דגי טרוטה ודגי זברה, אך בריכוזים הגבוהים בכ-2 סדרי גודל מהמצאים בדו"ח זה (Kuiper et al., 2007; Ronisz et al., 2004). אם זאת, קיים מחסור במחקר עדכני על יצורים אקוויטיים קטנים, דו-חיים וחרקי מים, ואין לשלול אפקטים שלילים של TBBA, כבר בסדר גודל הערכים שנמצאו, על אוכלוסיות אלו. פגיעה אקוויטית על פעילות גוף אנושי אינה ידועה עבור הריכוזים שנמצאו לחומרים אלה, אולם גם כאן, אין לשלול כרגע פגיעה מסוימת כתוצאה מחשיפה כרונית ממושכת. חשוב לציין כי המחקר העניין זה נמצא בתחילת הדרך ואין עדיין מספיק מידע בכדי להסיק מסקנות חד משמעויות על העדר השפעה ונזק. כיוון שחסר מחקר וחסר מידע, ראוי תמיד לנהוג בעיקרון הזהירות המונעת הקובע שבמידה ויש ספק אין ספק.

בנוסף, במעלה הנחל (על פי נקודות הדיגום שנדגמו), לא נמדד כל ריכוז של ההורמונים שנבחנו. בנקודת זרימה של מפעל בז"ן נמדדו ריכוזים הנמוכים מ 12 ננוגרם/ליטר (על פי ה LOQ) אך גבוהים מ 4 ננוגרם/ליטר (LOD), וכן ריכוזים דומים נמדדו במורד הנחל בנקודת דיגום גשר הרכבת. ראוי לציין כי מידת הפוטנטיות (potency) של חומרים אלו ובעיקר E2 הינה גבוהה מאוד, ועל פי נתונים שנבדקו במחקרים קודמים (Segner et al., 2003; Nimrod and Benson, 1998), נמצא כי כבר בריכוז שנע בין 1-5 ננוגרם לליטר, הובחן שיבוש במערכת ההורמונאלית במספר מינים שחיים במערכת אקוויטית, אשר הביא למגוון עיוותים ושיבושים בגופם, וזאת כתוצאה מזיהום של חומרים אלו במי הנחל.

מפתיע הדבר כי הורמונים אלו לא נמדדו במעלה הנחל כתוצאה מהזרמת שפכים/קולחים עירוניים, כיוון שבדרך כלל מקורות אלו מהווים את הספק העיקרי של הורמונים נשיים (אסטרוגנים), למקורות המים.

מומלץ בעתיד לבדוק את מוצא השפכים/קולחים של הערים והישובים מסביב לנחל וכן את מעלה הנחל בסמיכות למוצאים אלו, ביחד לחומרים אלו.

ראוי לציין כי עבודת אפיון זו "מצלמת" תמונה רגעית יחסית של נוכחות חומרים אלו במי הנחל. זאת כיוון שיתכן כי סוג ההזרמות ממקור תעשייתי משתנה, הן בתוכן הכימי והן בעוצמה. כמו כן, גשמים שמגבירים את יחס המיהול בין מי הנחל למזהמים. חשוב לציין כי חלק מחומרים אלו אף יעדיף בתנאים מסוימים להיספח לפאזה המוצקה כגון חלקיקים אורגניים ואי אורגניים המצויים במי הנחל, פרקציה אשר לא נמדדת כחומר מומס. בנוסף, חומרים אלו עשויים לשקוע בקרקעית הנחל ולהוות חלק מהבוצה וכן לעבור תהליכי פירוק ביולוגי וכימי. על כן יש לקחת בחשבון את כל התהליכים הללו כאשר מבצעים מאזן מסה של חומר מזהם במקור מים. באפיון זה נלקחה בחשבון ונמדדה רק הפרקציה המסיסה, כלומר דגימות בגוף המים בלבד. על כן, מומלץ בעתיד לבצע סקר מקיף של חומרים אלו במספר רב יותר של נקודות דיגום, בזמנים ומועדים שונים הן בפאזה המסיסה המימית והן בפאזה המוצקה (חלקיקים ובוצה).

D. Avisar

פרופ' דרור אבישר

ראש המעבדה להידרוכימיה

והמרכז לחקר המים

Avio Kaplan

אביב קפלן

טכנאי ראשי המעבדה להידרוכימיה

- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Bachmann, J., Oetken, M., Lutz, I., Kloas, W., & Ternes, T. A. (2006). Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environmental health perspectives*, 114, 127.
- Watts, M. M., Pascoe, D., & Carroll, K. (2001). Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquatic Toxicology*, 55(1), 113-124.
- Levy, G., Lutz, I., Krüger, A., & Kloas, W. (2004). Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research*, 94(1), 102-111.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., & Weismann, T. (2005). Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquatic Toxicology*, 75(3), 213-224.
- Ronisz, D., Finne, E. F., Karlsson, H., & Förlin, L. (2004). Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout. *Aquatic toxicology*, 69(3), 229-245.
- Kuiper, R. V., Van den Brandhof, E. J., Leonards, P. E. G., Van der Ven, L. T. M., Wester, P. W., & Vos, J. G. (2007). Toxicity of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in zebrafish (*Danio rerio*) in a partial life-cycle test. *Archives of toxicology*, 81(1), 1-9.
- Nimrod, A. C., & Benson, W. H. (1998). Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. *Aquatic toxicology*, 44(1), 141-156.
- Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C. R., Maack, G., Pascoe, D., ... & Wenzel, A. (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(3), 302-314.

Reagents and solvents:

- D.I water for HPLC (BioLab)
- Methanol (BioLab)
- Acetonitrile (BioLab)
- Diethylamine (Sigma)
- KH_2PO_4 (Scharlau)
- Ammonium solution 32% (Merck)
- Ortho-Phosphoric acid 85% (BioLab)
- Ammonium Formate (Sigma)

Analytical standards:

- Bisphenol A (BPA) (Fluka)
- Estradiol (E2) (Sigma)
- 3,3',5,5' – tetrabromobisphenol A (TBBA) (Fluka)
- Estrone (E1) (Riedel-de Haen)
- 17 α -Ethinylestradiol (EE2) (Fluka)

Equipment:

- Oasis HLB 500mg/6mL SPE cartridges (Waters)
- Pipetman pipetors (100-1000 μL ; 1-5mL) (Gilson)
- Balance (Metler Toledo)
- pH meter (Metler Toledo)
- Pump (Vacumbrand)
- Reacti-Therm III (Thermo)
- HPLC Agilent 1100
- QTOF Premier mass spectrometer (Waters)
- Kinetex Evo 50x2.1mm, 2.6 μ column + Gemini column guard (Phenomenex)

Solution preparation:
Solution A preparation: ACN:Acetone:Water:Diethylamine (25:60:15:2%)
Solution B preparation: 0.05M K ₂ HPO ₄ – adjusted to pH 3.5 with H ₃ PO ₄
Solution C preparation: Solution B: ACN (95:5%) Ammonium Formate 16mM adjusted to pH~8.0 with diluted NH ₃ solution
Solution D preparation: A.F. buffer: MeOH (80:15%)
Procedure:
Filter the samples with 0.45µm PVDF.
Adjust the sample to pH 3.5 with H ₃ PO ₄ .
Assembly cartridges OASIS 500mg/6cc HLB on manifold
Activate with 5.0mL solution A.
Wash with 10.0mL solution B.
Load 250mL sample at flow rate of 3-5mL/min (X3). Spike 2 columns with 0.1mL of the spike solution.
Wash with 10.0mL solution C.
Assemble 13*100mm glass tubes to collect the extraction solvent.
Extract with 4.5mL solution A. drip about 1mL -> close the valve and wait 5minutes -> open the valve and drip all solvent. Repeat the procedure (total 9mL – no need the 5 minutes hold for the 2 nd time).
Vapor with low flow of N ₂ at 40°C
Dissolved the remain sediment with 1.0mL solution D.
Transfer into HPLC vial. Store at 2-10°C

HPLC Conditions:

Column: Kinetex EVO C18, 50x2.1mm, 2.6 μ .

Guard column: Gemini-NX C18, 4x2.0mm.

Column temp.: 40°C

Mobile phase:

Sol. B = 0.005% ammonium in Water (0.16mL ammonium solution 32% in 1L water).

Sol. D = 0.005% ammonium in MeOH(0.16mL ammonium solution 32% in 1L MeOH).

Flow rate: 0.5mL/min

Gradient program:

Time[min]	%B (0.005 NH3 in water)	%D (0.005 NH3 in MeOH)
0	85	15
1.5	85	15
10	30	70
11	30	70
12	10	90
14.5	10	90
16	85	15

Post-run: 4 minutes.

Injection volume: 100.0 μ L

***Note: connect the line directly from the column to the column switch, bypassing the UV detector and column switch.**

Detector: ESI negative mode.

Retention times and mass:

	TBBA	BPA	E1	E2	EE2
RT (min)	4.64	9.41	10.41	10.51	10.73
(M-H)	542.747	227.102	269.149	271.165	295.166