



# NTNU

Kunnskap for en bedre verden

## Bacheloroppgave

**Emnekode: MB301612 Bacheloroppgave**

**Innkjøring av metode for deteksjon av  
tilsetningsstoffene Irganox 1076 og BHT i PE plast  
ved bruk av HPLC**

Kandidatnummer: 10001, 10006, 10010, 10013

Totalt antall sider inkludert forsiden: 54

Ålesund, 26.05. 2019



# NTNU

Kunnskap for en bedre verden

## Sammendrag

Plast er en av de mest allsidige materialgruppene som noensinne er produsert, og har stor variasjon i både fysisk utforming og kjemisk funksjon. I dag produseres det store mengder plast som skaper problemer for miljøet, da ikke alt plastavfall resirkuleres. Det er derfor lagt stort fokus på å motvirke denne utviklingen. En mulig løsning kan være den plastspisende larven, *Galleria mellonella*, som kan bryte ned polymerstrukturen i PE plast. Under produksjon av plast tilsettes antioksidanter som gjør plasten mer slitesterk. Når plast brytes ned, kan antioksidantene forbrukes. Konsentrasjonen av antioksidanter i *Galleria mellonella* kan fortelle noe om nedbrytingen av plast i larven. I dette arbeidet ble det innarbeidet en metode for å måle antioksidantene BHT og Irganox 1076, ved bruk av HPLC. Instrumentet ble benyttet på bakgrunn av dets evne til å separere og detektere analytter. Analysemetoden ble validert, og ga akseptable resultater om metodens linearitet, LOD, LOQ, selektivitet, presisjon og stabilitet.

Med utgangspunkt i en tidligere studie, ble det innarbeidet en metode for ekstraksjon fra PE plast for å identifisere analyttene. En ekstraksjonsmetode av antioksidanter fra plast ble også innarbeidet. Resultatene viste at 6 timers ekstraksjon i romtemperatur ga de beste resultatene. I plast ble Irganox 1076 målt til akseptable verdier, mens det ble målt betydelig lavere konsentrasjoner av BHT. Det ble konkludert med at metodens evne til å detektere analytter var tilfredsstillende.

## **Forord**

Rapporten tar for seg innarbeidelse av en metode for å detektere antioksidantene BHT og Irganox 1076, ved bruk av HPLC. Oppgaven er gitt i regi av NTNU avd. Ålesund, hvor utgangspunktet er et tidligere forskningsarbeid gjort av studentbedriften Plarva Solutions AS. Rapporten inneholder teoretisk grunnlag, innarbeidet metode og resultat fra forsøk utført på laboratoriet.

Vi vil takke vår veileder Kristine Kvangarsnes for konstruktiv tilbakemelding, råd og samarbeid. Vil også takke NTNU Campus Ålesund for økonomisk støtte og adgang til laboratorium. En stor takk til Plarva Solution AS for tilgang til larven *Galleria mellonella* og nyttig informasjon.

## Terminologi

---

### *Forkortelser*

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>BHT</b>	Butylhydroxytoluen
<b>ID</b>	Ikke Detektert
<b>Irganox 1076</b>	Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-fenyl) propionat
<b>LC-MS</b>	Væskeskromatografi-massespektrometri
<b>LOD</b>	Deteksjonsgrense
<b>LOQ</b>	Kvantifiseringsgrense
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mV</b>	Millivolt
<b>PDA</b>	Foto Diode Array (detektor)
<b>PE</b>	Polyetylen
<b>PEH/HDPE</b>	Høydensitets-polyetylen
<b>PEL/LDPE</b>	Lavdensitets-polyetylen
<b>PEM/MDPE</b>	Middeldensitets-polyetylen
<b>PET</b>	Polyetylentereftalat
<b>PP</b>	Polypropylen
<b>PVC</b>	Polyvinylklorid
<b>SD</b>	Standardavvik
<b>S/N</b>	Signal-støy (Signal to Noise)
<b>UV</b>	Ultrafiolett
<b>rpm</b>	Omdreining per minutt (rounds per minute)
<b>RSD</b>	Relativt standardavvik

---

# Innhold

<b>1 Innledning .....</b>	<b>7</b>
1.1 Bakgrunn .....	7
1.2 Spesifikasjon.....	7
1.3 Mål.....	8
<b>2 Teori.....</b>	<b>9</b>
2.1 Plast .....	9
2.2 PE plast.....	9
2.3 Nedbrytning av plast.....	10
2.4 Antioksidanter .....	12
2.5 Voksmøllen, <i>Galleria mellonella</i> .....	14
2.6 Væskekromatografi .....	15
2.6.1 Pumpe .....	16
2.6.2 Injektor .....	16
2.6.3 Kolonne.....	17
2.6.4 Detektor .....	17
2.7 Kromatogram.....	18
2.8 Validering.....	18
2.8.1 Linearitet .....	18
2.8.2 LOD og LOQ.....	19
2.8.3 Målområde .....	19
2.8.4 Analytisk spesifisitet og selektivitet .....	19
2.8.5 Repeterbarhet .....	19
2.8.6. Stabilitet.....	20
<b>3 Material og metode.....</b>	<b>21</b>
3.1 Utstyr og reagenser .....	21
3.2 Prøvematerial.....	21
3.2.1 Brødpøser .....	21
3.2.2 Larver .....	21
3.3 Innarbeidelse av metode .....	22
3.3.1 Endelig metode .....	23
3.4 Validering av metode.....	24
3.5 Ekstraksjon av antioksidanter fra plast.....	27
3.5.1 Plastekstraksjon.....	27
3.5.2 Ekstraksjon fra larver .....	29
3.6 Utrekninger.....	29
<b>4 Resultat.....</b>	<b>30</b>
4.1 Metoderesultat .....	30
4.2 Validering.....	32
4.2.1 Standardkurve.....	32
4.2.2 LOD og LOQ.....	32
4.2.3 Spesifisitet.....	33
4.2.4 Repeterbarhet .....	33
4.2.5 Stabilitet.....	35
4.3 Ekstraksjon .....	38

4.3.1	<i>Ekstraksjon av antioksidanter fra plast</i> .....	38
4.3.2	<i>Ekstraksjon fra larve</i> .....	42
<b>5</b>	<b>Diskusjon</b> .....	<b>44</b>
5.1	Metode for HPLC .....	44
5.1.1	<i>Innarbeidelse av metode</i> .....	44
5.1.2	<i>Validering</i> .....	45
5.2	Kjemikalier .....	46
5.3	Ekstraksjonsmetoden .....	47
5.3.1	<i>Ekstraksjon av BHT og Irganox fra larver</i> .....	48
5.4	Videreutvikling av metoden .....	48
5.5	Fremtidsaspekt.....	49
<b>6</b>	<b>Konklusjon</b> .....	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Referanseliste</b> .....	<b>51</b>

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

For ett par tiår tilbake var plast hovedsakelig et estetisk problem, men i nyere tid har plast i tillegg vist seg å være et økende miljøproblem på grunn av produktets lange nedbrytningstid. I en studie gjort av Bertocchini, mfl. (1) ble det oppdaget larver som konsumerte PE plast. Denne oppdagelsen kan bidra til positive ringvirkninger for miljøet, fordi larven kan brukes som en aktiv forkjemper for å redusere mengden plastavfall. Utgangspunktet for valg av oppgave ble basert på felles interesse for miljø. Temaet i oppgaven er svært relevant for vår utdanning fordi den fokuserer på et fagområde som stadig blir mer aktuelt.

Oppgaven dreier seg om å undersøke antioksidant som et tilsetningsstoff i polyetylen (PE), mer spesifikt LDPE plast. Flere forskningsartikler viste at BHT og Irganox 1076 er to typiske tilsetningsstoffer i PE plast som kan detekteres (2, 3). Det ble derfor besluttet å se på disse analyttene. Perioden til rådighet var 22.01.2019 til 28.05.2019.

## 1.2 Spesifikasjon

Utgangspunktet for oppgaven var innarbeidelse av en metode for å detektere monomerer fra PET plast som *Galleria mellonella* hadde konsumert, ved bruk av HPLC. Ved nærmere undersøkelser viste det seg at larvene hadde konsumert PE plast. PE plast brytes ned til etylenglykol (frostvæske) (1), noe som ikke kunne analyseres på grunn av manglende utstyr ved NTNU. Det ble dermed bestemt å se på antioksidanter tilsatt i PE plast, istedenfor plastmonomerer. Antioksidanter brukes som tilsetningsstoff i plast, hovedsakelig for å hindre oksidativ degradering ved ultrafiolett stråling (4). Det er også kjent at antioksidanter kan stabilisere polymerer (5, 6).

### **1.3 Mål**

Hensikten med bacheloroppgaven er å innarbeide en metode på HPLC som egner seg til deteksjon av antioksidantene BHT og Irganox 1076. Et delmål er å finne ut om metoden i tillegg kan detektere andre komponenter fra PE plast, og fra larven som har konsumert plast. Konsentrasjon av antioksidanter målt i plast, sammenlignet med konsentrasjon av antioksidanter målt fra larven, kan si noe om mengden plast som brytes ned i larven.



## 2 Teori

### 2.1 Plast

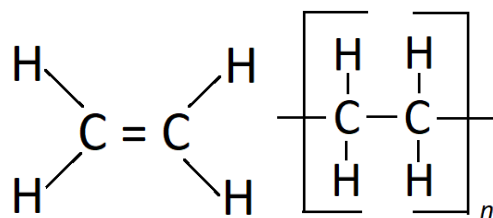
Plast er et menneskeskapt materiale sammensatt av ulike syntetiske polymerer (7). Polymerene kan bestå av karbon, hydrogen, oksygen og klor, som er derivater fra en rekke ulike kilder som kull, naturgass og petroleum (8). Det er også, i liten grad, en økning av plantebaserte polymerer (9, 10). Plast er en av de mest allsidige materialgruppene som noensinne er produsert, og har stor variasjon i både fysisk utforming og kjemisk funksjon. Materialet benyttes i stor grad til oppbevaring og beskyttelse av mat, klær og medisinske applikasjoner (9). De vanligste plasttypene er polypropylen (PP), polyvinylklorid (PVC) og polyetylen (PE) (8, 9, 11).

Plastproduksjon hadde oppstart for rundt 70 år siden, og i løpet av de siste 15 årene har den globale årlige produksjonen doblet seg (9, 12). I 2016 ble det på verdensbasis produsert 335 millioner tonn plast ifølge tall fra PlasticsEurope (13). Plast produseres i dag i store kvantum, men det har i nyere tid blitt et større fokus på å redusere produksjonsmengden (4).

### 2.2 PE plast

Polyetylen, også kalt PE, er en syntetisk polymer som opptar bortimot 40 % av den totale plastmengden på verdensbasis (11). På grunn av den lange strukturen og sammensetningen har PE en enorm styrke. I tillegg er den motstandsdyktig mot nedbrytning og er et godt egnet materiale for en rekke bruksområder, som krever et slitesterkt produkt (4, 11). Styrken til polymeren skyldes antall forgreninger; desto færre forgreninger den har, jo sterkere og høyere densitet vil materialet ha. Ut fra dette kan PE deles inn i ulike kategorier; lavdensitet (PEL/LDPE), middels densitet (PEM/MPDE), og høydensitet (PEH/HDPE) (14).

Polyetylen fremstilles fra etylen (*Figur 1*) som gjennomgår en polymerisasjon før den tilsettes antioksidanter, pigmenter, fyllstoffer og smøremidler som forsterker de fysiske egenskapene (15). Antioksidanter brukes også i polymerindustrien for å hindre termisk nedbrytning av polymerer under produksjon (16).



*Figur 1: Struktur for Etylen (venstre) og polyetylen (høyre) (14)*

Polyetylen inngår i termoplastiske polymerer, noe som betyr at den kan omformes ved oppvarming og kan derfor resirkuleres ubestemt antall ganger. Dette skyldes at monomere som polymerer består av, bindes ved hjelp av van der Waalske krefter. Disse kreftene fører til at nøytrale molekyler tiltrekkes hverandre i en svak binding, som kan brytes ved høy temperatur (15, 17).

### 2.3 Nedbrytning av plast

Plast har lang nedbrytningstid, som først og fremst skyldes de sterke kovalente bindingene i polymerene som binder plasten sammen (18). Plast brytes ned til makroplast, videre til mikroplast og tilslutt nanoplast (11, 19). Nedbrytningsprosessen varierer basert på egenskapene til plastproduktet og polymerens kjemiske sammensetning (11, 18, 19). Plast betegnes som et ikke-degraderende stoff og skaper således et problem ved at det brytes ned i liten grad over en lengre tidsperiode (4, 11). For eksempel tar det mellom 10-20 år for en plastpose og 450 år for en plastflaske, før de brytes ned fullstendig (*Tabell 1*)(19).

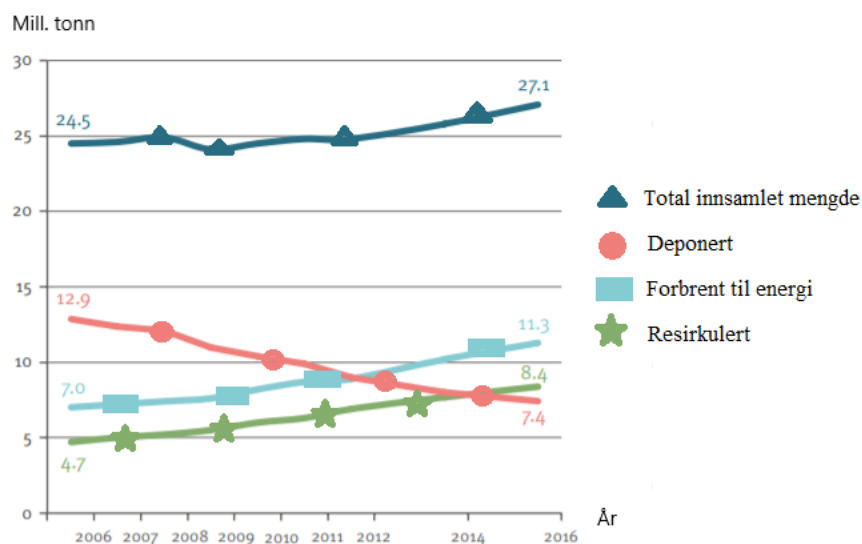
Tabell 1: Nedbrytingstid til ulike plastprodukter (19)

Produkter	Tid før det brytes ned (år)
Plastpose	10 – 20
Isoporkopp	50
Drikkeholder i plast	400
Engangsbleie	450
Plastflaske	450

Polymerene utsettes for kjemisk, fysisk og biologisk eksponering som på ulike måter endrer polymerstrukturen. Polymerdegradering kan klassifiseres basert på faktorer som forårsaker nedbrytning. Klassene er foto-oksidativ-, termisk-, ozon-indusert-, mekanokjemisk-, katalytisk- og biokjemisk degradering (18, 20).

I Norge er det anslått at 94% av all marin plast ender på havbunnen. Her tar nedbrytningsprosessen lenger tid på grunn av lavere temperatur, mindre oksygen og lys. Det fører til at plasten ikke utsettes for samme type degradering som ved og over havoverflaten (19). Forurensning av plast kan medføre at marine organismer konsumerer makro- og mikroplast, som videre kan indusere bioakkumulering, hvor miljøgifter oppkonsentreres i en organisme (4). Ved nedbryting av plast kan miljøgifter frigjøres. Samtidig kan det skje biomagnifisering som gir konsentrasjonsøkning av forurensete stoffer mellom leddene i en næringskjede.

Plastavfallshåndteringen utvikles i riktig retning; mengde plast som resirkuleres i Europa har økt med 79 % på 10 år (13). Det er i dag en økning av mengde innsamlet plast, samt økning i plast som resirkuleres og omgjøres til energi. I tillegg synker mengden plast som deponeres (13) (Figur 2). Selv om utviklingen går i riktig retning, er plastavfall fremdeles et problem.



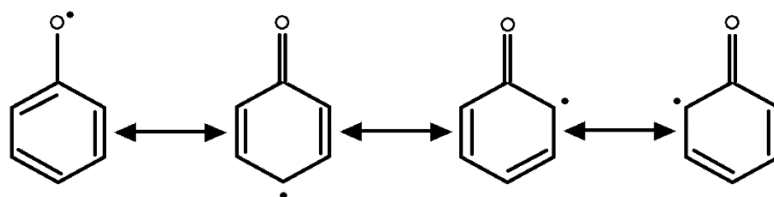
\* PET, PP, eller PA ikke tatt i betraktning

Figur 2: Innsamlet og resirkulert plast de siste 10 år i Europa (13)

## 2.4 Antioksidanter

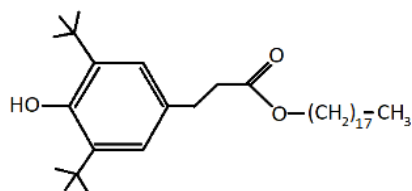
Antioksidanter er komponenter som hindrer oksidasjon og beskytter mot frie radikaler (21, 22). De kan deles inn i primære eller sekundære antioksidanter (22). Primære antioksidanter kan redusere frie radikaler som dannes, og blir på den måten selv oksidert. De sekundære antioksidantene, også kalt forebyggende antioksidanter, inhiberer generering av frie radikaler (23). Frie radikaler kan blant annet dannes ved UV-stråling. De er atomer eller molekylforbindelser som er ekstremt reaktiv, fordi de har et elektron for mye eller for lite (22, 24, 25).

Fenoler kan fungere som antioksidanter, hvor det dannes radikaler når et hydrogen spaltes av molekylet (21). Den sekskantede formen til benzenringen gjør at radikalen kan være i strukturen, men likevel holdes stabil (Figur 3). Stabiliseringen skyldes at ladningen kan flyttes rundt og danne dobbeltbindinger ulike steder i benzenringen. Ved å bruke fenoler som tilsetningsstoff i plast, hindres frie radikaler fra å reagere med produktet (26).

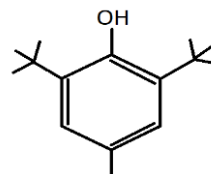


Figur 3: Stabilisering av fritt radikal (26)

Antioksidantene BHT (Figur 5) og Irganox 1076 (Figur 4, heretter omtalt som Irganox) inneholder en fenylgruppe. Egenskapene til disse er vist i Tabell 2. BHT er uløselig i vann, men løselig i kjemikalier som toluen, metanol, etanol, isopropanol, etylmetyl keton, aceton, petroleum, eter, benzen, og de fleste andre typer hydrokarbonløsemidler. BHT er en av de mest vanlige antioksidantene som tilsettes plastemballasje for å hindre termisk degradering (16, 27). Irganox brukes til å stabilisere polymerer som blir utsatt for høy temperatur over lengre tid (5). Irganox er også uløselig i vann, men kan løses i enkelte kjemikalier som metanol, toluen, sykloheksan og kloroform (28).



Figur 4: Strukturformel for Irganox



Figur 5: Strukturformel for BHT

Tabell 2: Egenskaper til BHT og Irganox (16, 27-29)

Egenskaper	BHT	Irganox
Kjemisk familie	Fenol	Ester
Molekylvekt (g/mol)	220,34	531
Kjemisk formel	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub> O <sub>3</sub>
Smeltepunkt (°C)	70	50 - 55
Kokepunkt (°C)	265	323
Bruksområde	Antioksidant	Antioksidant

## 2.5 Voksmøllen, *Galleria mellonella*

*Galleria mellonella* er en art av ordenen Lepidoptera. Larven er av stor interesse fordi den kan bryte ned polymerstrukturen til PE (8, 30). Den har en kremhvitt farge som gradvis blir mørkere etter hvert som den utvikler seg (*Figur 6*). I tillegg er den utstyrt med tre skarpe tenner som er viktig for larvens destruktive natur, samt gir larven en adaptiv fordel (30).



Figur 6: Voksmøllarven *Galleria mellonella*

Voksmøllen lever sitt larvestadium som en parasitt i biekolonier over hele verden. Den har utviklet habitat og fôringsstrategier som er svært forskjellig fra andre møll da den livnærer seg på blant annet honning og bivoks (8, 30). Naturlig forekommende bivoks er en substans bestående av palmitoleat (langkjedet fettsyre), langkjedede hydrokarboner og alifatiske

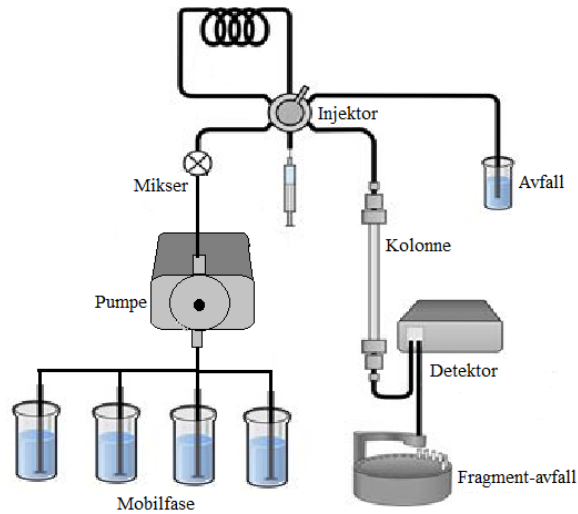
alkoholer. De alifatiske alkoholene er bygd opp av hydrokarbonkjeder hvor et eller flere hydrogenatomer er byttet ut med en hydroksylgruppe (OH-gruppe). PE plast har veldig lik struktur som bivoksen, da begge består av en langkjedet og lineær ryggrad av karbonatomer. Den strukturelle likheten er antakeligvis årsaken til at larven kan bryte ned plasten (8).

Nedbrytingen av langkjedede hydrokarboner er det viktigste steget i biodegraderingen av PE plast. Aktiviteten har ikke blitt rapportert i mikroorganismer, noe som sannsynligvis skyldes at de mangler enzymer og mekanismer som kan bidra til bionedbrytning. På grunn av dette gjennomføres det omfattende studier på insekter for å undersøke om noen av disse kan brukes istedenfor (8).

Ved hjelp av fettsyrerelaterte metabolske enzym som karboksylesterase og lipase, og larvens egen mikroflora, kan den bryte ned bivoks til mindre komponenter (8). Deretter drar den nytte av næringsstoffer i form av energi som blir tilgjengelig fra nedbrytingen (30). Det er ukjent hvor mye *Galleria mellonella*s egne enzymer og tarmflora faktisk påvirker nedbrytingen av bivoks, og dermed nedbrytingen av PE plast. En studie gjort av Kong, mfl. (8), tyder på at de metabolske enzymene i larven hovedsakelig bryter ned de lange hydrokarbonkjedene. Mikrofloraen spiller imidlertid en betydelig rolle for dekomponering av de korte fettsyrekjedene, fra voks, til nedbrytningsproduktene. Dette betyr at uten en fungerende tarmflora vil ikke larven kunne utnytte bivoksen fullstendig (8).

## **2.6 Væskekromatografi**

Væskekromatografi er en kromatografisk metode som benyttes for separasjon og deteksjon av analytter i en løsning. Instrumentet består hovedsakelig av en pumpe, injektor, kolonne og detektor (*Figur 7*). Separasjonen baseres på at analyttene fordeler seg kontinuerlig mellom en flytende mobilfase og en fast stasjonærfase. Hvordan stoffene fordeler seg i de ulike fasene skyldes ulikheter i stoffenes fysiske og kjemiske egenskaper. Kromatografi kan for eksempel brukes til å se på protein, lipid, aminosyre, fett og farmasøytiske produkt (31).



Figur 7: Oversikt over væskerkromatografi (HPLC-instrument)(32)

### 2.6.1 Pumpe

Pumpen sørger for konstant gjennomstrømning av mobilfase i systemet. I et system kan det være flere pumper, eller én Pumpe koblet til flere mobilfasebeholdere (Figur 7). Dette tillater ulik mobilfasekomposisjon gjennom analyseforløpet.

### 2.6.2 Injektor

Injektoren har som oppgave å introdusere en prøveløsning med en analytt til HPLC systemet. Etter injeksjonen vil analytten og mobilfasen sendes gjennom kolonnen for separasjon. Injektoren brukt i dette forsøket var en autosampler.



### **2.6.3 Kolonne**

Kolonnen inneholder den stasjonære fasen, hvor separasjon av analytter skjer. Separasjonsprinsippet kan deles inn i reversfase og normalfase. I reversfase er kolonnen upolar, mens mobilfasen som går gjennom, er polar. Upolare komponenter vil ha større affinitet til den stasjonære fasen, og blir derfor værende lenger i kolonnen, enn komponenter med større affinitet til den mobile fasen. Normalfaseprinsippet er motsatt fra reversfase ved at det benytter en upolar mobilfase (33). Prinsippet brukt i dette forsøket var revers fase HPLC med en kolonne av typen C-18.

Flere faktorer kan påvirke mobilfasehastigheten i systemet. Løsemiddelstyrke og komposisjon av mobilfase må vurderes for å sikre at analytter elueres og separeres best mulig. I tillegg er temperaturen til kolonneovnen viktig for å kunne skille analyttene. Økt temperatur kan gi bedre flyt gjennom kolonnen og vesentlig kortere retensjonstid, viskositeten går da ned og det blir mindre slitasje. Samtidig kan en kort retensjonstid resultere i dårligere separasjon, dersom toppene i kromatogrammet overlapper hverandre.

### **2.6.4 Detektor**

Det er utviklet mange ulike detektorer som kan benyttes i forbindelse med væskechromatografi, eksempelvis; fotometrisk, spektrofotometrisk, fluorometrisk eller massespektrometrisk (MS). Formålet til detektoren er å detektere analytter etter hvert som de elueres fra kolonnen, deretter omgjøre deteksjonen til et elektrisk signal som avleses på en datamaskin. En UV-detektor måler lysmengde som absorberes fra en analytt ved bestemt bølgelengde ( $\lambda$ ). Den kan måle bølgelengder i det synlige spekteret av stråler fra bølgelengde 190 til 700 nm. Analytter som egner seg for UV-deteksjon inneholder typiske umettede bindinger, aromatiske grupper eller funksjonelle grupper med heteroatomer (31).

## 2.7 Kromatogram

Et kromatogram er en grafisk fremstilling av analytter i en prøveløsning. X-aksen representerer retensjonstid som viser hvor lang tid de ulike analyttene bruker fra injisering til eluering. Y-aksen viser signalstyrke i mV. Ved bruk av UV-detektor vil kvalitative analyser baseres på retensjonstid. Kvantitative analyser beregnes ut fra høyde og areal på toppene (“peak hight”) i kromatogrammet (31).

## 2.8 Validering

Før en ny metode kan tas i bruk på laboratoriet må den gjennomgå validering. Valideringen kontrollerer den innarbeidede metoden, ved å bedømme hvor pålitelig og presist resultat den kan gi. Dersom en metode ikke gjennomgår validering bør den ikke brukes til analyse i laboratoriesammenheng. Analyseresultatene vil da verken være konklusive eller mulig å kvalitetssikre (34, 35). Omfanget av valideringen bestemmes på bakgrunn av hva metoden skal brukes til (36). ISO/IEC 17025 standard for kjemiske analyselaboratorier, inneholder de parameterne som bør inngå i en validering. Standarden ble brukt som utgangspunkt for å bestemme valideringsparameterne for metoden brukt i denne oppgaven.

### 2.8.1 Linearitet

For å se på metodens linearitet kan en standardkurve brukes. Det vil da være en forutsetning at den er lineær for at den kan benyttes til kvantifisering av ukjente konsentrasjoner. Regresjonskoeffisienten,  $R^2$ , indikerer hvor lineær kurven er. En  $R^2$  over 0,95 er en akseptabel verdi, da den ideelt sett skal være tilnærmet lik 1.

### **2.8.2 LOD og LOQ**

Nedre kvantifiseringsgrense (LOQ) angir lavest konsentrasjon av en analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon i aktuell analysetid. Nedre deteksjonsgrense (LOD) angir lavest målbar verdi av en analytt som er mulig å fastslå i en prøve (36).

### **2.8.3 Målområde**

Målområde defineres av standardkurven. Når kurven er lineær kan den nedre og øvre grensen defineres ut fra forventede verdier, så lenge den nedre grensen ikke settes lavere enn LOD. Grunnen til dette er at en grense lavere enn LOD ikke vil gi deteksjon. Skal en metode brukes til kvantifisering av en analytt, må målområdet være over LOQ-verdien.

### **2.8.4 Analytisk spesifisitet og selektivitet**

Selektivitet sier noe om analysemetodens evne til å skille analytter fra hverandre ved tilstedeværelse av andre komponenter i en prøve. Sannsynligheten for at toppene som avleses i kromatogrammet tilsvarer de analyttene som skal detekteres, sier noe om spesifisitet. Når den analytiske spesifisiteten er høy, kan overlapping oppstå. Overlapping er en systematisk målefeil som skyldes at én eller flere komponenter forstyrrer resultatet. Det kan føre til at det forekommer topper i kromatogrammet med større areal enn forventet (37).

### **2.8.5 Repeterbarhet**

Repeaterbarhet gir et estimat på den minste måleusikkerheten som kan oppnås med analysemetoden. Analyse av en prøve med bestemt konsentrasjon gjentatte ganger over en kort tidsperiode, indikerer hvor repeterbar metoden er (36).

### ***2.8.6. Stabilitet***

Stabilitet sier noe om hvor lenge en stokkløsning er holdbart. Gjennom et stabilitetsforsøk kan det vurderes hvor det er best å oppbevare en analytt, samt hvor lenge den kan benyttes i analysesammenheng.

## **3 Material og metode**

### **3.1 Utstyr og reagenser**

Reagenser som ble brukt i metoden var acetonitril (ACN) av LC-MS grad, metanol av HPLC grad, og maursyre. BHT og Irganox ble kjøpt i pulverform fra Sigma-Aldrich. Disse ble løst i metanol, da dette ble brukt i metoden det var tatt utgangspunkt og viste seg å være et egnet løsemiddel (38). Mobilfase A inneholdt maursyre og ultrafiltrert vann med forholdet 1:1000, mens mobilfase B besto av 100 % acetonitril, ACN.

Instrumentet benyttet i dette forsøket var HPLC, *high performance liquid chromatography* av typen Shimadzu Nexera XR UHPLC koblet til SIL-20ACXR injektor (autosampler) og en Restek raptor ARC-18 kolonne. I enden av systemet var det koblet en Shimadzu Prominence SPD-M20A Diode Array Detector (PDA). Andre instrumenter som Thermo scientific nitrogenavdamper, IKA ultra-turrax og en PSU-10i orbital shaker, ble også brukt i forsøket.

### **3.2 Prøvematerial**

#### ***3.2.1 Brødposer***

Plasten som ble brukt i forsøket var brødposer av typen First price levert fra UNIL AS (39). Disse ble oppbevart i romtemperatur gjennom hele forsøksperioden.

#### ***3.2.2 Larver***

Under forsøket ble det brukt innsamlet materiale fra et tidligere arbeid. Den plastspisende larven, *Galleria mellonella*, ble brukt i et forskningsprosjekt utført av studentbedriften Plarva Solutions AS. Studentbedriften startet forsøk med larvene den 25.05.2018, hvor larvene ble

matet med LDPE plast i en uke. Etter avsluttet forsøk (06.2018) ble larvene fryst ned til -80 °C.

Forsøket til Plarva Solutions AS ble utført med 350 larver, fordelt på sju beholdere, med 50 larver i hver. Larvene ble delt inn i generasjoner basert på hva de ble matet med. I to av beholderne ble larvene matet med LDPE-plast, to av beholderne inneholdt plast oppbevart i saltvann, to av beholderne inneholdt plast og honning, og den siste beholderen inneholdt honning og havregryn. Ca. 285 larver ble, etter endt forsøk hos Plarva Solutions AS, overlevert til instituttet for biologiske fag (IBA), NTNU Ålesund, hvor de ble oppbevart i fryser på -80 °C fram til analysestart.

### **3.3 Innarbeidelse av metode**

Ved innkjøring av metoden ble det tatt utgangspunkt i en metode hvor det ble ekstrahert antioksidanter fra intravenøsposer, laget av PP og PE plast (38). Denne metoden benyttet en Luna-fenyl heksyl kolonne; 150 × 4,6 mm; 3µm. Det ble imidlertid brukt en C-18 kolonne i dette forsøket. Gjennom en rekke tester ble det gjort justeringer som gjorde det mulig å detektere antioksidanter fra brødpose av PE plast. For å finne de mest gunstige instrumentparameterne ble ulik mengde mobilfase, mobilfasehastighet og injeksjonsvolum testet. Blant annet viste det seg at antioksidantene ikke ble eluert ved samme parametere som metoden til Legrand, mfl. (38). Optimalisering var nødvendig for å unngå at noen komponenter ble værende igjen i kolonnen og forstyrret de ytterligere analysene. Parameterne ble fastslått, og konsentrasjonen av mobilfase B (ACN) ble testet fra 40-95% gjennom analyseforløpet. Ved for lav konsentrasjon av ACN ble ikke alle komponentene fullstendig eluert fra kolonnen og måtte derfor økes ytterligere.

### 3.3.1 Endelig metode

Betingelsene for den endelige metoden vises i *Tabell 3* og *Tabell 4*. Temperaturen til kolonnen blir vanligvis valgt til mellom 0-60 °C. I dette forsøket ble det valgt en kolonnetemperatur på 30 °C (*Tabell 3*) (40).

*Tabell 3: Oversikt over parameterne i metoden*

<b>Parametere</b>	<b>Angitte verdier</b>
<i>Mobilfase B</i>	ACN (grad: LC-MS)
<i>Mobilfase A</i>	Maursyre, 0,1% (grad: LC-MS)
<i>Deteksjons bølgelengde (UV)</i>	280 nm
<i>Injeksjonsvolum</i>	10 µL
<i>Kolonnetemperatur</i>	30 °C
<i>Mobilfasehastighet</i>	0.6 ml /min
<i>Analysetid</i>	35 min

Tabell 4: Mobilfasegradient og -hastighet i metoden (HPLC)

Analysetid (min)	Mobilfasehastighet (ml/min)	Mobilfase B, ACN (%)	Mobilfase A, 0,1 % Maursyre (%)
0	0,6	40	60
0-0,5	0,6	40	60
0,5-6	0,6	80	20
6-13	0,6	100	0
13-23,5	0,6	100	0
25,5-26	1	100	0
26-27	0,6	100	0
27-35	0,6	40	60

Etter at den endelige metoden var innarbeidet, ble det gjennomført en metodeevaluering for å systematisk vurdere om metoden var akseptabel for både BHT og Irganox.

### 3.4 Validering av metode

Under innarbeidelsen av metoden, ble stokkløsning av BHT og Irganox benyttet til validering. Stokkløsningen ble laget ved å løse 10,0 mg analytt i 10,0 ml MeOH, (1 mg/ml, 1000 ppm). Nonsterile hydrophilic PVDF Syringe Filters med porestørrelse 0,22 µm, ble brukt for å filtrere stokkløsningen. Bruk av filter er én av flere faktorer som sikrer gode prøver, samtidig utelukkes feilkilder ved dårlig prøvetillaging, og ødeleggelse av kolonnen forhindres. Stokkløsningen ble dekket med aluminiumsfolie og lagret kaldt i kjøleskap (4 °C) over natten, før den ble brukt i analysesammenheng. Videre ble det laget en fortynningsrekke av stokkløsning, med ACN (Tabell 5).



Tabell 5: Fortynninger fra stokkløsning

<b>Endelig fortynning (ppm=mg/L)</b>	<b>Volum av stokkløsning, 1000 ppm (µl)</b>	<b>Volum av ACN (µl)</b>
30	30	970
15	15	975
10	10	990
8	8	992
6	6	994
4	4	996
2	2	998
1	1	999
<b>Konsentrasjon (ppm=mg/L)</b>	<b>Fortynning av 1 ppm (µl)</b>	<b>Volum av ACN (µl)</b>
0,5	500	500
0,4	400	600
0,3	300	700
0,2	200	800
0,1	100	900

Metodens linearitet ble undersøkt ved å lage et spekter av fortynninger fra 0,1-10 ppm, da ekstraksjonsresultatene ble forventet innenfor det gitte området. Verdiene fra analysene ble brukt til å sette opp en standardkurve.

Deteksjons- og kvantifiseringsgrensen ble bestemt ved hjelp av S/N-verdier fra fortynningsrekken. S/N-verdier defineres ut fra mengde signalstyrke i forhold til bakgrunnsstøy. En rekke standardløsninger med gradvis lavere konsentrasjon ble analysert for å finne S/N-verdier for kvantifiseringsgrense (LOQ), S/N tilnærmet 10, og deteksjonsgrense (LOD), S/N tilnærmet 3.

Analytisk spesifisitet ble undersøkt ved analyse av standardene for å se om det var mulig å identifisere og skille analyttene fra hverandre i kromatogrammet. Det ble i tillegg analysert ekstraksjonsprodukt fra plast for å se på metodens selektivitet.

For repeterbarhet ble en prøve med konsentrasjon på 1,5 ppm analysert 10 ganger fortløpende. Ut fra verdiene ble RSD (relativt standardavvik) beregnet, noe som kunne indikere om konsentrasjonsverdiene hadde store avvik i forhold til hverandre. RSD burde ikke overskride 5 %, fordi det betyr at metoden er lite repeterbar og det vil da være nødvendig å gjøre modifiseringer.

For å undersøke stabiliteten til antioksidantene, ble tre sett med tripler plassert under ulike temperaturer i ett par uker. Det ble laget ett sett med tre analyseprøver med konsentrasjoner på 10 ppm som ble plassert i kjøleskap (4 °C). Ett sett med prøver på 17 ppm ble plassert i instrumentet for å undersøke stabilitet i romtemperatur. De tre siste prøvene, på 17 ppm, ble plassert i fryser (-20 °C).

## **3.5 Ekstraksjon av antioksidanter fra plast**

### ***3.5.1 Plastekstraksjon***

Plast ble klippet til ulike størrelser og tilsatt forskjellig mengde ACN i reagensrør. Videre ble det utført ekstraksjon ved ulike temperaturer og tidsintervall, før alle prøvene ble homogenisert ved vortexing. Etter ekstraksjonen ble plasten fjernet og ACN med ekstraksjonsproduktet pipettert over i vialer. Mengde ekstraksjonsmiddel, ekstraksjonstid og temperatur varierte (*Tabell 6*) for å finne optimal ekstraksjonsmetode.

Tabell 6: Oversikt over ekstraksjonsmetoder fra brødposer

Metode (nr.)	Tid (timer)	Temperatur (°C)	ACN (ml)	Plast (mg)
1*	6	25	3	450
2*	6	25	5	450
3*	6	40	3	450
4*	6	40	5	450
5*	23	25	3	450
6*	23	25	5	450
7*	23	40	3	450
8*	23	40	5	450
9*	48	25	3	450
10*	48	25	5	450
11*	48	40	3	450
12*	48	40	5	450
13**	5	25	0,6	1,8
14***	6	25	0,6	3,6
15***	6	40	0,6	3,6
16***	24	25	0,6	3,6
17***	24	40	0,6	3,6

\* Plast med areal  $31 \times 8,5 \text{ cm}^2$

\*\* Plast med areal  $1 \times 1 \text{ cm}^2$

\*\*\* Plast med areal  $1 \times 2 \text{ cm}^2$

Det ble utført et utvidet forsøk på *Metode 14* og *Metode 15* (Tabell 6), der ekstraksjonsmiddelet ble pipettert av, og nytt ble tilsatt. Ekstraksjonen fortsatte deretter i 18 timer. Det ble på den måten ekstrahert analytter fra plasten i to omganger, for å se om det fortsatt ble ekstrahert tilsetningsstoffer av interesse etter endt 6 timers ekstraksjon.

### 3.5.2 Ekstraksjon fra larver

Larvene ble tatt direkte fra fryseren på -80 °C. Fra hver generasjon ble 10 larver veid inn for å finne totalvekten, og tilsatt i reagensrør. Deretter ble 2 ml ACN tilsatt i rørene før homogenisering med ultra-turrax i 2 min (5000 rpm). Det ble videre tilsatt enda 1 ml ACN til rørene, før løsningen igjen ble kjørt med ultra-turraxen i 1 min (9000 rpm). Larvemassen ble så plassert på en orbital shaker i romtemperatur for ekstraksjon i 6 timer. Etter endt ekstraksjon, ble toppsjiktet med ACN overført til nytt rør. Nitrogenavdamperen ble stilt inn på 40 °C for hurtig avdampning slik at BHT og Irganox ble oppkonsentrert. Til slutt ble det tilsatt 500 µl ACN for å løse analyttene.

### 3.6 Utregninger

For å beregne middelerverdi, standardavvik og RSD verdier ble dataprogrammet Excel (Microsoft 2019) benyttet.

**Formel for middelerverdi ( $\bar{X}$ ):**

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{Formel 1}$$

**Formel for Standardavvik (SD):**

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad \text{Formel 2}$$

**Formel for relativt standardavvik (RSD %):**

$$RSD (\%) = \frac{SD \times 100}{\bar{x}} \quad \text{Formel 3}$$

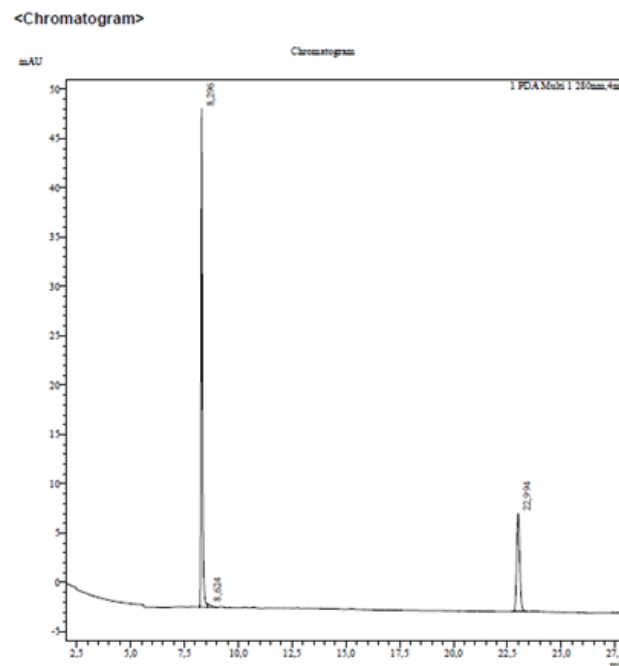
n = antall elementer

$\sum x_i$  = summen av  $x_i$

## 4 Resultat

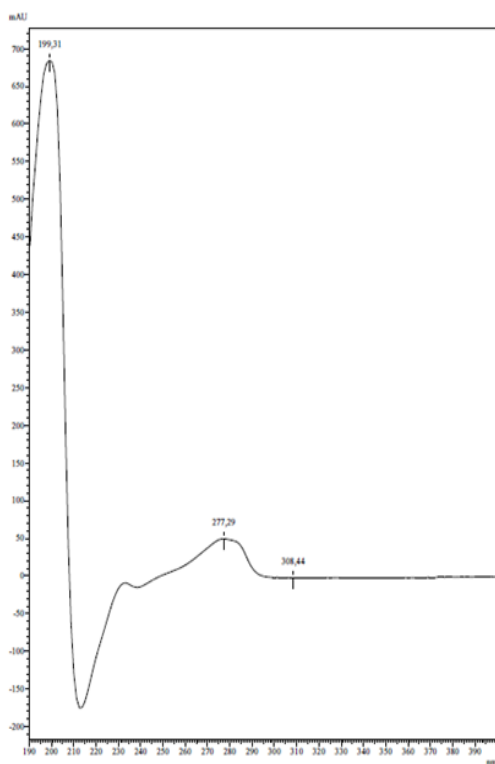
### 4.1 Metoderesultat

Kromatogrammet i *Figur 8* viser god separasjon med tydelige topper, uten hale for standardene BHT og Irganox (30 ppm). BHT hadde en retensjonstid på 8,3 min og Irganox på 22,9 min.

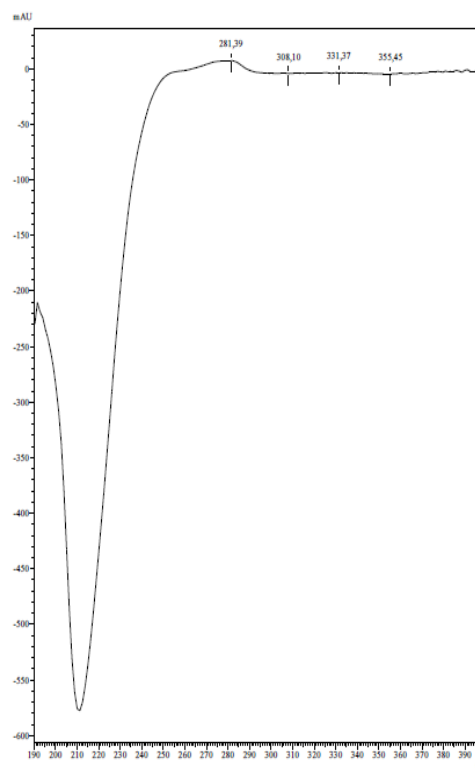


*Figur 8: Kromatogram med BHT og Irganox*

BHT og Irganox ga absorbanstopper ved bølgelengdene 200 nm og 280 nm (*Figur 9* og *Figur 10*). Ut fra UV-spekteret ble det gjennomført analyser med avlesning ved disse bølgelengdene. BHT og Irganox hadde absorpsjonsmaksimum ved ulike bølgelengde. Avlesning ved 280 nm ga best sammenlagt resultat og stabil baselinje for begge analyttene.



*Figur 9: UV spekter for BHT*

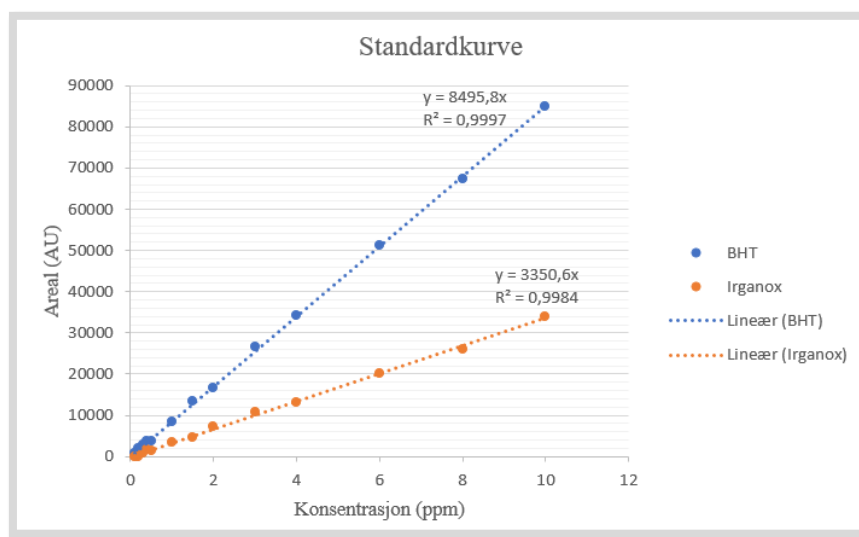


*Figur 10: UV-spekter for Irganox*

## 4.2 Validering

### 4.2.1 Standardkurve

For analyttene, BHT og Irganox, ble det laget en standardkurve (Figur 11). Kurven var lineær fra 0,1-10 ppm for både BHT og Irganox. Figuren viser kurvens regresjonskoeffisient ( $R^2$ ) på 0,9984 for Irganox og 0,9997 for BHT. Ut fra verdiene konkluderes det med at standardkurven var akseptabel for beregning av konsentrasjoner.



Figur 11: Standardkurve for BHT (illustrert i blått) og Irganox (illustrert i rødt)

### 4.2.2 LOD og LOQ

Analyseresultatene fra fortynningsrekken viste at LOD for BHT var 0,05 ppm og 0,27 ppm for Irganox. LOQ ble bestemt til 0,16 ppm for BHT og 0,90 ppm for Irganox.



### **4.2.3 Spesifisitet**

Det var enkelt å identifisere BHT og Irganox i kromatogrammet på grunn av klare skiller mellom de kromatografiske toppene (*Figur 8*). Begge analyttene ble fullstendig separert til de kjente retensjonstidene.

### **4.2.4 Repeterbarhet**

*Tabell 7* viser retensjonstid og konsentrasjon fra de 10 injeksjonene for repeterbarhetsforsøket. Resultatet viste lite variasjon i retensjonstidene ved de ulike analysene. Det ble beregnet RSD-verdier til 0,12 % for BHT og 0,22 % for Irganox, for retensjonstidene. Disse verdiene lå godt innenfor det godkjente området.

RSD for BHT konsentrasjonene var 0,796 %. RSD verdien for Irganox var 6,796 % for konsentrasjonene, og lå dermed over den bestemte grensen på 5 %. Dette skyldtes et avvik ved analyse nr. 6. Dersom analyse nr. 6 ble sett bort fra, ville RSD-verdien for repeterbarheten blitt 3,847 %, for Irganox konsentrasjonene.

Tabell 7: Retensjonstider og konsentrasjoner for repeterbarhetsforsøket

Analyse nr.	BHT		Irganox	
	Retensjonstid (min)	Konsentrasjon (ppm)	Retensjonstid (min)	Konsentrasjon (ppm)
1	8,251	2,068	22,949	1,321
2	8,283	2,069	22,843	1,483
3	8,272	2,039	22,832	1,451
4	8,272	2,032	22,821	1,360
5	8,261	2,033	22,800	1,353
6	8,261	2,021	22,800	1,154*
7	8,261	2,030	22,800	1,351
8	8,251	2,045	22,779	1,365
9	8,240	2,038	22,768	1,454
10	8,251	2,028	22,779	1,413
$\bar{X}$	<b>8,260</b>	<b>2,040</b>	<b>22,817</b>	<b>1,371</b>
SD	<b>0,012</b>	<b>0,016</b>	<b>0,050</b>	<b>0,093</b>
RSD (%)	<b>0,121</b>	<b>0,796</b>	<b>0,219</b>	<b>6,796</b>

\* Avvik

#### ***4.2.5 Stabilitet***

Konsentrasjon for BHT gikk fra 17,4 ppm i starten av forsøket til 18,4 ppm i slutten av forsøket, og Irganox fra 15,5 til 16,2 ppm (*Tabell 8*). Stabilitet av BHT og Irganox som ble analysert samme dag (Intradag) ved romtemperatur, hadde tilfredsstillende RSD-verdier. Verdiene var under 1,4 % for BHT og de fleste under 2 % for Irganox. Interdag RSD-verdiene (målt ulike dager) lå også lavt, og overskredet ikke 2,1 % for verken BHT eller Irganox.

Tabell 8: Stabilitet av BHT og Irganox i romtemperatur

Dag	Konsentrasjon BHT (ppm)			Intradag RSD for BHT (%)	Konsentrasjon Irganox (ppm)			Intradag RSD for Irganox (%)
1	17,553	17,354	17,255	0,872	15,778	15,487	15,128	2,105
2	17,665	17,290	17,264	1,287	15,404	15,238	15,201	0,707
3	17,720	17,396	17,293	1,275	15,572	15,267	15,212	1,263
4	17,696	17,408	17,375	1,008	15,798	15,363	15,131	2,196
5	17,703	17,546	17,487	0,636	15,741	15,444	15,383	1,234
6	17,978	17,598	17,536	1,350	15,815	15,496	15,479	1,215
7	17,716	17,675	17,566	0,440	15,697	15,591	15,509	0,601
8	17,934	17,666	17,606	0,986	16,290	15,411	15,481	3,105
9	17,978	17,748	17,672	0,894	15,850	15,506	15,535	1,221
10	18,096	17,870	17,779	0,911	15,887	15,640	15,497	1,259
11	18,198	17,973	17,827	1,037	16,013	15,725	15,685	1,134
12	18,102	17,934	17,938	0,533	16,011	15,804	15,714	0,961
13	18,273	18,046	17,897	1,048	15,997	15,837	15,803	0,651
14	18,293	18,058	18,003	0,849	16,181	15,862	15,910	1,077
15	18,472	18,205	18,187	0,873	16,316	16,046	16,114	0,867
16	18,594	18,340	18,277	0,911	16,418	16,047	16,046	1,326
$\bar{X}$	<b>17,813</b>				<b>15,695</b>			
SD	<b>0,338</b>				<b>0,321</b>			
Interdag RSD (%)	<b>1,898</b>				<b>2,043</b>			

Resultatene fra analysene som ble oppbevart i kjøleskap vises i *Tabell 9*. Her varierte analysene fra 9-11 ppm for både BHT og Irganox. Intradag RSD-verdien for både BHT og Irganox ble beregnet til under 3,5 %. Det ble derimot observert større variasjon i konsentrasjon mellom de ulike dagene. Interdag RSD-verdiene ble beregnet til over 5 %.

*Tabell 9: Stabilitet av BHT og Irganox lagret i kjøleskap (4°C)*

Dag	Konsentrasjon BHT (ppm)			Intradag RSD for BHT (%)	Konsentrasjon Irganox (ppm)			Intradag RSD for Irganox (%)
<b>1</b>	9,300	9,276	9,524	1,460	9,702	10,237	10,079	2,749
<b>8</b>	9,857	9,868	10,222	2,076	10,362	10,777	10,683	2,049
<b>16</b>	10,709	10,700	11,014	1,651	11,182	11,948	11,523	3,323
<b><math>\bar{X}</math></b>	<b>10,052</b>				<b>10,721</b>			
<b>SD</b>	<b>0,645</b>				<b>0,723</b>			
<b>Interdag RSD (%)</b>	<b>6,411</b>				<b>6,742</b>			

Resultatene fra analysene i fryser, viste RSD-verdier på 0,649 % for BHT og 0,919 % for Irganox (*Tabell 10*). Intradag- og Interdag RSD-verdiene for antioksidantene lå godt under 5 %, og var derfor innenfor de ønskelige grensene.

Tabell 10: Stabilitet av BHT og Irganox ved lagring i fryser (-20 °C)

Dag	Konsentrasjon BHT (ppm)			Intradag RSD BHT (%)	Konsentrasjon Irganox (ppm)			Intradag RSD Irganox (%)
<b>1</b>	17,846	17,918	17,808	0,313	16,368	16,056	16,064	1,099
<b>16</b>	18,058	18,105	17,958	0,415	16,381	16,334	16,285	0,293
$\bar{X}$	<b>17,949</b>				<b>16,248</b>			
<b>SD</b>	<b>0,116</b>				<b>0,149</b>			
<b>Interdag RSD (%)</b>	<b>0,649</b>				<b>0,919</b>			

### 4.3 Ekstraksjon

#### 4.3.1 Ekstraksjon av antioksidanter fra plast

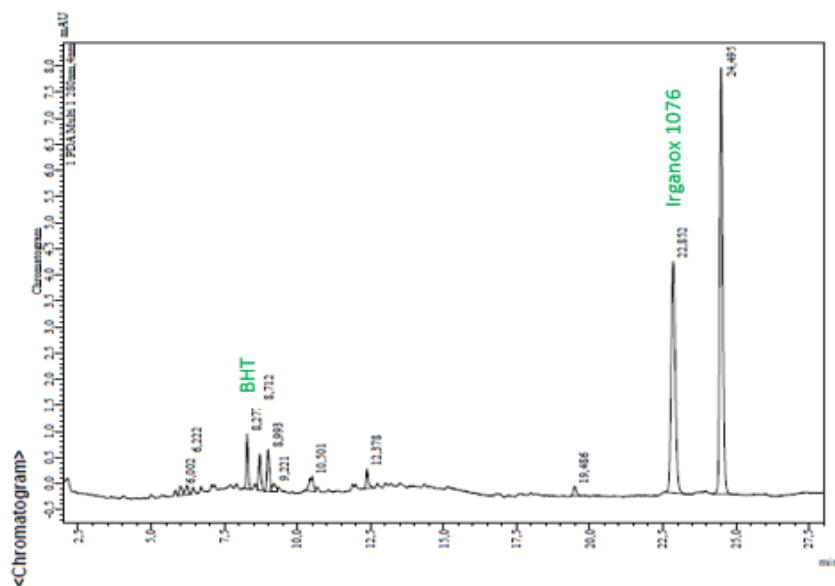
Tabell 11 viser resultatet fra plastekstraksjon. BHT fikk verdier over 0,05 ppm (LOD) i de fleste tilfellene, men under 0,16 ppm (LOQ). Målingene av BHT var lave i forhold til de gjennomsnittlige gode konsentrasjonene målt av Irganox. Det ble ikke funnet noen direkte sammenheng mellom temperatur og tid for ekstraksjonen. Figur 12 viser gjennomgående resultat fra plastekstraksjonen.

Tabell 11: Plast ekstraksjoner av BHT og Irganox med ulike metoder, N=1

Metode nr.	BHT		Irganox	
	Areal (AU)	Konsentrasjon (ppm)	Areal (AU)	Konsentrasjon (ppm)
1	4353	0,512	43432	12,962
2	4889	0,575	4790	1,430
3	745	<0,16	60641	18,099
4	466	<0,16	47105	14,059
5	671	<0,16	75842	22,635
6	ID	ID	34476	10,290
7	1120	<0,16	66794	19,935
8	522	<0,16	51108	15,253
9	1342	<0,16	85393	25,486
10	720	<0,16	51611	15,404
11	ID	ID	45564	13,599
12	2642	0,311	26626	7,947

ID: Ingen deteksjon

<0,16 (verdi under LOQ)



Figur 12: Kromatogram av plastekstraksjon (BHT og Irganox, avmerket)

### Ekstraksjon fra 1×1 cm<sup>2</sup> brødpose

Det ble gjennomført parallelle ekstraksjoner med 1×1 cm<sup>2</sup> plast, hvor *Metode 13* i *Tabell 6* ble benyttet. Første parallell for BHT fikk verdi under LOQ (<0,16), den andre parallellen ble ikke detektert. For Irganox ble begge parallellene detektert, men ingen av analyttene hadde verdier over LOQ (<0,90). Resultat vises ikke i tabell.

### Ekstraksjon fra 1×2 cm<sup>2</sup> brødpose

*Tabell 12* viser resultatene fra plastekstraksjon, *Metode 16* og *Metode 17* (*Tabell 6*). For mange av analysene ble ikke BHT detektert (*Tabell 12*). For Irganox var de fleste verdiene over LOQ. Som vist i tabellen ble det observert avvikende verdier.



Tabell 12: Viser kontinuerlig ekstraksjon i 24 timer, N=3

Metode nr.	Temperatur (°C)	Konsentrasjon (ppm)	
		BHT	Irganox
16	Romtemperatur (ca. 25)	ID	0,914
		4,628*	<0,90
		0,514	1,095
17	40	2,558*	0,976
		ID	1,102
		ID	<0,90

ID: Ingen deteksjon

<0,9 (verdi under LOQ)

\* Avvik

Samtidig med forsøket i *Tabell 12*, ble det gjennomført et forsøk med ekstraksjon i 6 timer på 25 °C og 40 °C (*Tabell 13*). I disse og ved 24 timers ekstraksjon (*Tabell 13*), var det også få analyser som detekterte BHT. De fleste analysene ga konsentrasjoner av Irganox under LOQ. Ekstraksjonsforsøkene i begge tabellene ble gjennomført for å kontrollere om det antatte tidsintervallet på 6 timer, var mest optimal. Avvik var også observert i *Tabell 13*, på lik linje som *Tabell 12*.

Tabell 13: Ekstraksjoner av 6 timer, N = 3

Metode nr.	Temperatur (°C)	Konsentrasjon (ppm)	
		BHT	Irganox
14	Romtemperatur (ca. 25)	2,964*	<0,90
		1,590*	<0,90
		ID	<0,90
15	40	ID	1,015
		ID	<0,90
		ID	1,144

ID: Ingen deteksjon

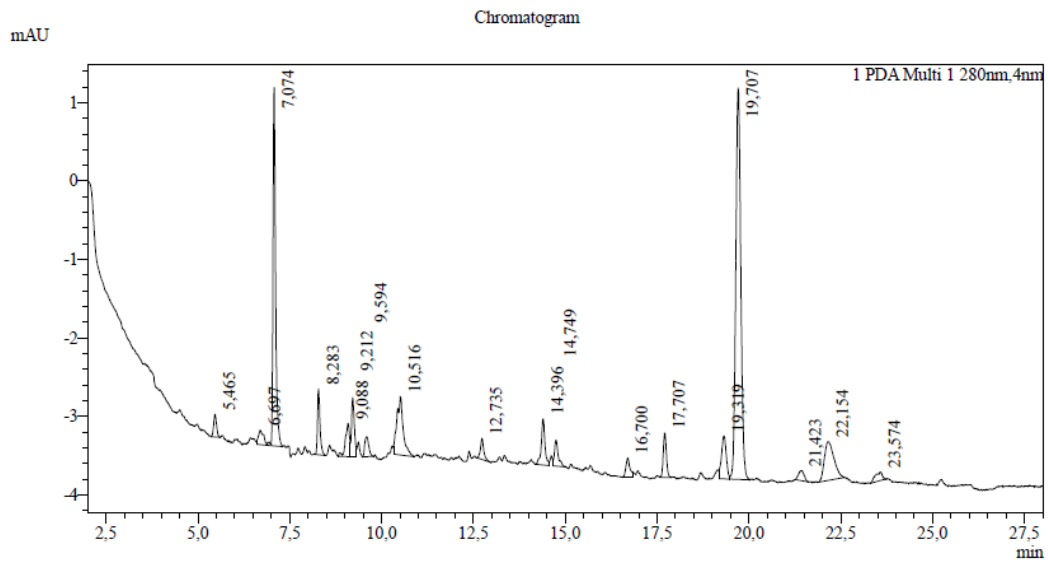
<0,90 (verdi under LOQ)

\* Avvik

Det var ingen stor forskjell på 6- og 24 timers ekstraksjon. Resultatet fra den utvidede testen av *Metode 14* og *Metode 15* (Tabell 6) viste ingen deteksjon for noen av analyttene ved analysene ved 25 °C eller 40 °C. Fikk derimot deteksjon på to av målingene ved 25 °C for Irganox, men disse var imidlertid under LOQ.

#### 4.3.2 Ekstraksjon fra larve

På bakgrunn av tidligere forsøk, samt ingen videre ekstraksjonsprodukt ved tilsetning av ny ACN, ble 6 timer ved 25 °C (*Metode 14*, Tabell 6) benyttet for ekstraksjon fra larvene. Resultatene fra *Figur 13* viser et representativt kromatogram som var typisk for ekstraksjon fra alle larvegenerasjonene.



Figur 13: Kromatogram fra larveekstraksjon

Det ble observert en relativt stor topp med lik retensjonstid som BHT (*Figur 13*). Denne toppen ble ikke identifisert som BHT. Kromatogrammet viser ingen topper som kunne identifiseres som Irganox.

## 5 Diskusjon

### 5.1 Metode for HPLC

#### 5.1.1 Innarbeidelse av metode

Ved innarbeidelse av metoden ble det gjennomført optimalisering av mobilfasehastighet, trykk, injeksjonsvolum og bølgelengde. Først ble forholdet mellom mobilfasene optimalisert for å sikre at fullstendig mengde analytt ble pumpet gjennom hele systemet. Ved lav prosent av mobilfase B (ACN) ble ikke analyttene fullstendig eluert, og konsentrasjonen av ACN ble derfor økt. Ved valg av temperatur i kolonnen ble det tatt hensyn til at en forhøyet temperatur økte risikoen for slitasje, fordi den stasjonære fasen kunne blitt degradert og analyttene brutt ned. En temperatur på 30 °C, sammen med den høye mobilfasekonsentrasjonen, førte til økt viskositet for både analyttene og mobilfase (40). Analyttene ble da fullstendig eluert.

Det ble bestemt å bruke en ARC-18 kolonne (15 cm × 2,1 mm), fordi kolonnen var tilgjengelig. Denne er mer beskyttet enn en standard C-18 kolonne, noe som gjør at kolonnen tåler addering av syre og lavere pH i systemet. Det gjør at kolonnen også egnes til analyse i forbindelse med HPLC-MS.

Metoden ble testet på HPLC koblet til UV-detektor. Detektoren viste god sensitivitet og deteksjon av analyttene. BHT og Irganox ble undersøkt på 200 nm og 280 nm, og begge analyttene ga synlig absorbanstopp ved begge bølgelengdene. Det ble observert at BHT hadde høyest absorbanstopp ved 200 nm, samtidig hadde også Irganox en tilfredsstillende topp på 200, men ikke i like stor grad som BHT. Avlesning ved 200 nm viste at baselinjen sank på grunn av gradient i mobilfase. Derfor ble det gjennomført et nytt forsøk ved 280 nm, for å kontrollere baselinjen. Ved 280 nm forble baselinjen stabil, samtidig ga bølgelengden gode lesbare resultater for absorpsjonen til begge analyttene (*Figur 11 og 12*).

Metoden det ble tatt utgangspunkt i, avleste analysene ved 220 nm og brukte et spekter som gikk fra 200-280 nm (38). En annen studie har sett på polyetylen pellets med BHT og Irganox, hvor en bølgelengde ( $\lambda$ ) på 280 nm med HPLC har gitt lesbare resultater (3). De fleste fenolene har et absorpsjonsmaksimum i nærheten av 280nm (21, 41), og på bakgrunn av dette ble det besluttet å fortsette med 280 nm. Som en kvalitetssikring ble det i forsøket undersøkt om analyttene ga synlig absorbanstopper også ved 200 nm.

### **5.1.2 Validering**

Som vist fra tidligere er målområdet bestemt fra 0,1-10 ppm. Det ble likevel utført tester på 15 ppm og 30 ppm for å sjekke om en høyere konsentrasjon lå innenfor det lineære området, noe det gjorde. Kunne på bakgrunn av dette si at metoden var tilfredsstillende for et større spekter av konsentrasjoner enn det som er tatt med i forsøket.

Ved de innledende analysene (ikke vist i resultat) av LOD og LOQ ble det målt uforutsigbare verdier, som gjorde det vanskelig å finne de nøyaktige grenseverdiene. Den mest logiske årsaken var at antioksidantene ikke hadde blitt fullstendig løst i metanol, og trengte derfor lenger tid enn forventet. På bakgrunn av dette ble det bestemt at stokkløsningen skulle stå over natten for å sikre at analyttene ble fullstendig løst, og LOD og LOQ ble bestemt.

Nøyaktighet sier noe om hvor nært analysesvaret ligger en sann verdi (36). Det kan gjøres ved å benytte en referanseprøve eller å "spike" prøven. Fordi det ikke var en referanseprøve eller PE plast, fritt for tilsetningsstoffer tilgjengelig, ble det bestemt å ikke undersøke nøyaktigheten.

Det ble besluttet at RSD-verdiene for repeterbarheten i denne oppgaven, ikke skulle overskride 5 %. Grensen ble satt ut fra hvor stor toleransen var for usikkerheten i forhold til den virkelige verdien. RSD-verdien fra resultatet for Irganox overskred 5 %, noe som skyldtes den avvikende verdien til analyse nr. 6 (*Tabell 7*). Fordi det var snakk om et lukket system under analyseforløpet, kunne avviket skyldes en luftboble ved injeksjon. Det ble konstatert at avviket skyldtes en tilfeldig feil, da analysen ikke ga konsekvenser for de

videre analysene. I tillegg ble det ikke observert det samme avviket ved analyse nr. 6 for BHT. Derfor ble det bestemt å ikke gjennomføre valideringsforsøket på nytt. Når verdien ved analyse nr. 6 ikke ble inkludert i beregningen av RSD, ble RSD for repeterbarhet til Irganox 3,847 %. Ut fra dette vurderes repeterbarheten til metoden som stabil.

Konsentrasjonen målt ved stabilitetsforsøket hadde en tidvis liten økning (*Tabell 8-10*). ACN er kjent som et relativt flyktig stoff (42), og konsentrasjonsøkningen kunne derfor forklares med at ACN mulig hadde fordampet over tid. Fordamping av løsemiddelet resulterte i en økning av analyttkonsentrasjonen. Imidlertid hadde ikke økningen av Interdag RSD-verdien stor betydning for stabiliteten. RSD-verdiene lå innenfor 5 % for både romtemperatur og frys, men overskred 5 % for prøvene oppbevart i kjøleskap. Det ble bestemt at prøvene var stabile, selv med en overskridende RSD-verdi.

Kjøleskapsstabiliteten hadde relativt få analyser, noe som ga større utslag på standardavviket ved avvikende verdier, enn en stabilitet med flere analyser. Større antall analyseverdier gir gjennomsnittlig bedre RSD-verdi; avvik påvirker ikke resultatet i like stor grad. For de gitte RSD-verdiene har det blitt gjort en vurdering på om antioksidantene i romtemperatur, kjøleskap og frys er stabile i minst to uker.

## 5.2 Kjemikalier

Valg av løsemiddel og ekstraksjonsmiddel under forsøket ble valgt på grunnlag av studier om lignende forsøk, og tidsperioden som var disponert. Det ble bestemt å bruke metanol som løsemiddel og ACN som ekstraksjonsmiddel, både ved plastekstraksjon og larveekstraksjon. Tidligere studier viser at metanol er et godt egnet løsemiddel, og ACN blir ofte brukt som ekstraksjonsmiddel for BHT og Irganox på bakgrunn av sine gode egenskaper (21, 38, 43). Faktorer som påvirker resultatene kan være ufullstendig løste reagenser, kvaliteten, holdbarheten og håndtering av prøvene.

### 5.3 Ekstraksjonsmetoden

I de første forsøkene hadde bitene fra brødposen et areal på  $31 \times 8,5 \text{ cm}^2$ , en vekt som tilsvarte 450 mg, og var tilsatt 10 ml ACN. Ekstraksjonene hadde behov for mindre løsemiddel enn forventet. Derfor ble mengden ekstraksjonsmiddel justert ned til 5 ml og videre til 3 ml, slik at plastbiten fremdeles ble dekket av ekstraksjonsmiddelet. Resultatet fra de store plastbitene ( $31 \times 8,5 \text{ cm}^2$ ), *Metode 1-12, Tabell 6*, viste ingen klar sammenheng mellom temperatur, tid, mengde løsemiddel og mengde ekstraksjonsprodukt. Det ble derfor bestemt å bruke  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , og gjøre utvidede tester med 6 timers ekstraksjoner. Videre ble det gjennomført forsøk på  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  plast, men raskt besluttet å doble plastmengden ( $1 \times 2 \text{ cm}^2$ ), slik at dette tilsvarte like mye som 10 larver hadde spist til sammen.

For brødposen ble det gjort utvidede tester på ekstraksjon i 6 timer for å sikre at ekstraksjonstiden ble optimal. Disse blir vist i *Tabell 12* og *Tabell 13*.

Ekstraksjonsmiddelet ble tilsatt i to omganger, og det viste seg at det ikke ble ekstrahert ut mer produkt etter de første 6 timene. *Tabell 12* viser resultatene fra ekstraksjon av  $1 \times 2 \text{ cm}^2$  i 24 timer, som bekrefter at økt ekstraksjonstid ikke ga økt ekstraksjonsprodukt. Andre studier viste til ekstraksjon av annen type plast over flere dager (38). Men ettersom resultatet i dette forsøket tilsa at plasten krevde kortere ekstraksjonstid, kunne det av den grunn konkluderes med at det var tilstrekkelig å ekstrahere brødposene i 6 timer.

Resultatet fra plastekstraksjonene viste at BHT ble ekstrahert i mindre grad enn Irganox. Flere analyseresultat fikk verdier under deteksjonsgrensen for BHT, mens analyseresultatene for Irganox ga verdier under kvantifiseringsgrensen. Rundt retensjonstiden når Irganox ble eluert, var det få eller ingen andre topper, mens for retensjonstiden til BHT var det derimot noen omliggende topper. I *Tabell 12* og *Tabell 13* ble det observert avvikende verdier som kunne skyldes at andre topper overlappet ved retensjonstiden til BHT. Dette kunne ha forårsaket de forhøyede konsentrasjonsverdiene. Fordi BHT og Irganox hadde så ulik retensjonstid, kunne de ikke forveksles med hverandre (*Figur 12*). Det viste dermed at metoden ekstraherte andre tilsetningsstoffer fra plasten.

Studien i artikkelen som var utgangspunktet for metoden, detekterte Irganox, men viste ved gjentagende tilfeller at BHT ikke ble detektert (38). Det samme gjaldt andre lignende

studier av Schabron, mfl. (3), og av Lichtenthaler, mfl. (2). En studie av Perrin, mfl. (44), fikk lite ekstraksjonsprodukt av BHT, og viste at ACN ikke fungerte som et optimalt ekstraksjonsmiddel for antioksidanten. Dette kunne vært en forklaring på hvorfor det ble detektert mindre BHT ved ekstraksjonsforsøkene. I tillegg kunne det skyldes mindre mengde BHT i plasten som ble brukt til ekstraksjonen, enn Irganox.

### **5.3.1 Ekstraksjon av BHT og Irganox fra larver**

Parameterne som ga best resultat av BHT og Irganox under plastekstraksjonen, ble brukt videre for ekstraksjon fra larvene. Resultatene viste at ekstraksjonene fra larvene ikke ga deteksjon av analyttene. I *Figur 13* observeres det en topp med lik retensjonstid som BHT, men fordi det ble kontrollert ved 200 nm ble det konstatert at BHT ikke identifiseres. Disse gjennomgående avvikene som ble målt fra de ulike larvegenerasjonene, tyder på at én eller flere topper overlappet. Selv om BHT og Irganox ikke ble detektert, viste metoden at den fungerte for både ekstraksjon og deteksjon av andre komponenter.

Det var på forhånd usikkert hvilke tilsetningsstoffer som var i plasten larvene hadde konsumert. Da forsøket ble startet var det ikke mulig å bruke plast som tilsvarte den Plarva Solutions AS benyttet. Det var derfor ikke mulig å vite om mangel på BHT og Irganox i plasten var grunnen til at de ikke ble detektert, eller om andre faktorer hadde en innvirkning. Som tidligere nevnt ville deteksjon av mengden analytt i *Galleria mellonella*, sammenlignet med mengden analytt i plast, si noe om i hvor stor grad larven kunne bryte ned plasten. Fordi larveekstraksjonen ikke ga noe resultat, er det ikke mulig å si noe om mengde plast som blir brutt ned i larven i denne sammenhengen.

## **5.4 Videreutvikling av metoden**

Metoden som ble innarbeidet krevde opprinnelig ikke en mobilfase tilsatt maursyre. Bruk av maursyre gjør det imidlertid enklere å videreutvikle metoden til LC-MS. Maursyre ble tilsatt i mobilfase A for å ionisere analyttene i prøveløsningen, slik at analyttene kunne bli separert og detektert med MS. LC-MS er en mer sensitiv metode og kan derfor detektere



BHT og Irganox ved lavere konsentrasjoner enn en UV-detektor. Samtidig ville det vært lettere for LC-MS å skille analytter fra hverandre.

## 5.5 Fremtidsaspekt

Som videre metodeutvikling ville det vært av interesse å se på et bredere spekter av antioksidanter. Det er stor sannsynlighet for at plasten larven hadde spist inneholdt andre antioksidanter enn bare BHT og Irganox. Metoden har vist at den kan detektere andre analytter fra plast og i larven. Den innarbeidede metoden kan også videreutvikles slik at den inkluderer andre matrikser tilsatt antioksidanter. Hadde forsøket vart over en lenger periode ville det blitt utført forsøk med “spikede” prøver. Dette vil øke innholdet av BHT og Irganox, og sikre målbare verdier over deteksjon- og kvantifiseringsgrensene. En annen løsning for å unngå mangelfull deteksjon, som ved  $1 \times 2 \text{ cm}^2$ , kunne vært å doble mengden plast brukt ved ekstraksjon til  $1 \times 4 \text{ cm}^2$ .

Ellers kan det være hensiktsmessig å gjøre utvidede forsøk på de ulike larvegenerasjonene. Dette kan være et spennende tema for å finne svar på om plastnedbrytningen i larven påvirkes av hva den har konsumert.

## **6 Konklusjon**

Metode for kvantifisering av antioksidantene BHT og Irganox ble innarbeidet. Ut fra de ulike resultatene for valideringsparameterne konkluderes det med at den innarbeidede metoden var hensiktsmessig. Det ble funnet kvantifiserbare mengder av Irganox i plast, mens innholdet av BHT var for lavt til å kunne kvantifiseres og detekteres.

Antioksidantene ble imidlertid ikke detektert i larvene.

## 7 Referanseliste

1. Bombelli P, Howe CJ, Bertocchini F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology* [Internet]. 2017 24.04.2019; 27(8):[R292-R3 pp.]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982217302312>.
2. Lichtenthaler RG, Ranfelt F. Determination of antioxidants and their transformation products in polyethylene by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1978;149:553-60.
3. Schabron JF, Fenska LE. Determination of BHT, Irganox 1076, and Irganox 1010 antioxidant additives in polyethylene by high performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. 1980;52(9):1411-5.
4. Hahladakis JN, Velis CA, Weber R, Iacovidou E, Purnell P. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*. 2018;344:179-99.
5. Heiserman WM, Can SZ, Walker RA, Begley TH, Limm W. Interfacial behavior of common food contact polymer additives. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007;311(2):587-94.
6. Rani M, Shim WJ, Han GM, Jang M, Song YK, Hong SH. Benzotriazole-type ultraviolet stabilizers and antioxidants in plastic marine debris and their new products. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2017 2017/02/01/; 579:[745-54 pp.]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716324652>.
7. Craine L. E. HCM, Hart D. J., Hart H. *Organic Chemistry*. 13 ed: Cengage Learning, Inc; 2011. 608 p.
8. Kong HG, Kim HH, Chung J-h, Jun J, Lee S, Kim H-M, et al. The *Galleria mellonella* Hologenome Supports Microbiota-Independent Metabolism of Long-Chain Hydrocarbon Beeswax. *Cell Reports*. 2019;26(9):2451-64.e5.
9. Gourmelon G. Global Plastic Production Rises, Recycling Lags. *Vital Signs*. 2015:7.
10. Luo Z, Li P, Cai D, Chen Q, Qin P, Tan T, et al. Comparison of performances of corn fiber plastic composites made from different parts of corn stalk. *Industrial crops and products*. 2017;95:521-7.
11. Sivan A. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011;22(3):422-6.
12. Europe P. *Plastics-the Facts 2014/2015*. *Plastics The Material for the 21st Century*2015.
13. Europe P. *Plastics-the Facts 2017*. *Plastics The Material for the 21st Century*. [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org)2017.

14. Dissado LAoF, J. C. . Electrical Degradation and Breakdown in Polymers. London, United Kingdom Peter Peregrinus Ltd.; 1992. Available from:  
[https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=8Tm7dH99-XEC&oi=fnd&pg=PR7&dq=L.+A.+Dissado,+J.+C.+Fothergill+%E2%80%9DElectrical+Degradation+and+Breakdown+in+Polymers%E2%80%9D,+IET,+1992&ots=mjgejRInxP&sig=ZWestubP Ct4i\\_4E7i1fTopBRp2w&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=8Tm7dH99-XEC&oi=fnd&pg=PR7&dq=L.+A.+Dissado,+J.+C.+Fothergill+%E2%80%9DElectrical+Degradation+and+Breakdown+in+Polymers%E2%80%9D,+IET,+1992&ots=mjgejRInxP&sig=ZWestubP Ct4i_4E7i1fTopBRp2w&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).
15. Mayer M. What is a thermoplastic polymer? Sciencing.com: Sciencing 2018 [Available from: <https://sciencing.com/thermoplastic-polymer-5552849.html>].
16. Schwope AD, Till DE, Ehntholt DJ, Sidman KR, Whelan RH, Schwartz PS, et al. Migration of BHT and Irganox 1010 from low-density polyethylene (LDPE) to foods and food-simulating liquids. *Food and Chemical Toxicology*. 1987;25(4):317-26.
17. Dr. Redwing R. Thermoplastic and Thermosetting Polymers [www.e-education.psu.edu](http://www.e-education.psu.edu/PennState): PennState; 2018 [cited 2018. Available from: <https://www.e-education.psu.edu/matse81/node/2209>].
18. Singh B, Sharma N. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*. 2008;93(3):561-84.
19. Miljødirektoratet. Forsøpling av havet 2019 [updated 28.01.2019. Available from: <https://www.miljostatus.no/Forsopling-av-havet/>].
20. El-Tonsy M, A. A. AlSaati S, H. Oraby A. Degradation of Low Density Polyethylene Due To Successive Exposure to Acid Rain and UV Radiation 2015. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/283785093\\_Degradation\\_of\\_Low\\_Density\\_Polyethylene\\_Due\\_To\\_Successive\\_Exposure\\_to\\_Acid\\_Rain\\_and\\_UV\\_Radiation?fbclid=IwAR3Dz2NYGChBjROFpaRYZwHOD\\_S2hlCgI9gzucyoG09BBYB2oDlShr4JLYA](https://www.researchgate.net/publication/283785093_Degradation_of_Low_Density_Polyethylene_Due_To_Successive_Exposure_to_Acid_Rain_and_UV_Radiation?fbclid=IwAR3Dz2NYGChBjROFpaRYZwHOD_S2hlCgI9gzucyoG09BBYB2oDlShr4JLYA).
21. Akkbik M, Assim ZB, Ahmad FB. Optimization and Validation of RP-HPLC-UV/Vis Method for Determination Phenolic Compounds in Several Personal Care Products. *Int J Anal Chem*. 2011;2011:858153-.
22. Gómez-Estaca J, Lopez-de-Dicastillo C, Hernández-Muñoz P, Catalá R, Gavara R. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;35(1):42-51.
23. Al-Malaika S, Axtell F, Rothern R, Gilbert M. Chapter 7 - Additives for Plastics. In: Gilbert M, editor. *Brydson's Plastics Materials (Eighth Edition)*: Butterworth-Heinemann; 2017. p. 127-68.
24. A. K. Har antioksidanter helseeffekter?2010 14.02.2019. Available from: <https://www.bioingenioren.no/fag/fag-oversiktsartikkel/har-antioksidanter-helseeffekter/>.
25. Albertsson A-C, Andersson SO, Karlsson S. The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* [Internet]. 1987 1987/01/01/; 18(1):[73-87 pp.]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014139108790084X>.

26. Coultate TP. FOOD the chemistry of its Components 5ed. Cambridge, UK. : RSC publishing 2009.
27. Babich H. Butylated hydroxytoluene (BHT): A review. Environmental Research [Internet]. 1982 1982/10/01/; 29(1):[1-29 pp.]. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013935182900020>.
28. AG BS. Irganox 1076-Phenolic primary antioxidant for processing and long-term thermal stabilization: BASF the Chemical Company 2010 [Available from:  
<http://www.gapchemical.com/Upload/file/20170323/2017032310010588588.pdf>.
29. Ciba Speciality Chemicals I. IRGANOX 1076-Phenolic Primary Antioxidant for Processing and Long-Term Thermal Stabilization 1976 [Available from:  
[http://www.polivinilplastik.com/pdf/Irganox\\_1076.pdf](http://www.polivinilplastik.com/pdf/Irganox_1076.pdf).
30. Kwadha CA, Ong'amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. Insects. 2017;8(2):61.
31. Tietz. Fundamentals of clinical chemistry. 7th ed. Portland: Saunders; 2008.
32. Hegyi G, Kardos J, Kovács M, Málnási-Csizmadia A, Nyitray L, Pál G, et al. Introduction to practical biochemistry 2013. Available from:  
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch06s05.html>.
33. Kazakevich YV, LoBrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Hoboken, UNITED STATES: John Wiley & Sons, Incorporated; 2007. Available from:  
<http://ebookcentral.proquest.com/lib/ntnu/detail.action?docID=281847>.
34. Rykiel EJ. Testing ecological models: the meaning of validation. Ecological Modelling. 1996;90(3):229-44.
35. Kvalitetskontroll NK-K. Validering / verifisering av kilinsk kjemiske analyser Noklus.no: Noklus; 2002 [updated Februar 2002. Available from:  
[http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val\\_NKK.pdf&fbclid=IwAR1mDv2yvof5-yi-f1OYmQv8pFTG7g9nFX4L\\_1htR02bwJF6I1TQ8our-5s](http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val_NKK.pdf&fbclid=IwAR1mDv2yvof5-yi-f1OYmQv8pFTG7g9nFX4L_1htR02bwJF6I1TQ8our-5s).
36. Hovind H, Krysell, M., Lund, U., Magnusson, B. og Mäkinen, I. Intern Kvalitetskontroll. 2018. p. 8, 31 og 6.
37. Behdad S. NA Dok. nr. 48a Klinisk kjemi 1ed: Nosk Akkreditering; 2004. p. 3.
38. Legrand P, Desdion A, Boccadifuoco G, Dufaÿ Wojcicki A, Worsley A, Boudy V, et al. Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018;155:298-305.

39. Engros E. Brødposer 6l eureka.no: Eureka engros; [Available from: <https://eureka.no/eureka/hushjem-artikler/papir-plast-folie/plastposer-folie-film/plastposer-folie-film/brodposer-6l-100stk-first-price/>].
40. Guillaume D, Heinisch S, Rocca JL. Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2004;1052(1):39-51.
41. Schabron JF, Hurtubise RJ, Silver HF. Chromatographic and spectrometric methods for the separation, characterization, and identification of alkylphenols in coal-derived solvents. *Analytical Chemistry*. 1979;51(9):1426-33.
42. Roth C. Acetonitril  $\geq 99,5\%$ , for syntese for syntese: Roth; 20.10.2015 [updated 30.05.2018; cited 2019 10.05.]. 3.0 no:[Available from: [https://www.carlroth.com/downloads/sdb/no/4/SDB\\_4380\\_NO\\_NO.pdf](https://www.carlroth.com/downloads/sdb/no/4/SDB_4380_NO_NO.pdf)].
43. Abad MJ, Bouza, R., Dopico Garcia, M. S., Gonzalez Rodriguez, M. V., Gonzalez Soto, E. and Lopez, J. M. Extraction and quantification of antioxidants from low-density polyethylene by microwave energy and liquid chromatography. . *Artical [Internet]*. 2004 13.09.2004; 521(2):[179-88 pp.]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267004007779>.
44. Perrin C, Meyer L. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. *Food Chemistry*. 2002;77(1):93-100.