

Riikliku programmi “Põllumajanduslikud
rakendusuringud ja arendustegevus
aastatel 2009–2014” lisa 4

Tartu Ülikool
Keemia Instituut

Perfluoroalküülühendite analüüsimeetodi arendus ja toidust saadavuse hinnang

Projekti juht: Koit Herodes
Projekti täitjad: Mari Reinik,
Ivo Leito,
Tõiv Haljasorg,
Jaan Saame,
Viljar Pihl,
Anneli Kruve

Tartu 2013

Sissejuhatus.

Käesolevas projektis olid uuritavateks aineteks perfluoroalküülühendite (PFC – *perfluoro compounds*) kuuluvad järgmised ühendid:

- Perfluorooktaanhape ja vastavad soolad (PFOA) – $F(CF_2)_7COO^-$
- Perfluorononaanhape ja vastavad soolad (PFNA) – $F(CF_2)_8COO^-$
- Perfluorooktüülsulfoonhape ja vastavad soolad (PFOS) – $F(CF_2)_8SO_3^-$

Uuritud ainete näol on tegemist lineaarse ahelaga täielikult fluoreeritud ühenditega, mis kuuluvad suuremasse PFC-de gruppi. Käesolevas projektis uuriti kalades PFOA, PFNA ja PFOS sisaldust, kuna need ained on leidnud kõige laiemat kasutust.

PFC-sid kasutatakse laialdaselt tööstuslikes ja tarbijarakendustes, sealhulgas kangaste ja vaipade plekikindlate katete (nt Gore-Tex®), plastikute, toiduga kokkupuutuvatele paberist toodetele õlikindlate katete, tulekustutusvahetude, poleerimisvahendite ja insektitsiidide koostises, ning pindaktiivsete ainetena tööstuses (nt Tefloni® valmistamisel), kaevandustes ja nafta puurimisel. PFOA, PFNA ja PFOS kuuluvad just sellesse pindaktiivsete ainete rühma, mistõttu nad satuvad keskkonda ja neid on avastatud nii kalade, lindude kui ka imetajate organismidest.

Suur osa keskkonda paisatavatest ainetest lagunevad kas hüdrolyüüsi või fotolüüsi teel või mikroorganismide ainevahetuse tulemusena. Keemiline side süsiniku ja fluori vahel on aga sedavõrd püsiv, et PFC-d looduses ei lagune ja bioakumuleeruvad elusorganismides. Seega kuuluvad PFC-d püsivate orgaaniliste saasteainete (POP – *persistent organic pollutant*) hulka. 2009. aastal lisati PFOS Stockholmi konventsiooni POP ainete nimekirja. [1] Stockholmi konventsioon näeb ette, et lepinguosalised peavad teostama seiret püsivate orgaaniliste ainete üle ja nende suhtes kohaldatakse tootmis- ja kasutamispõhiseid piiranguid.

Erinevalt teistest halogeenorgaanilistest ühenditest ei akumuleeru PFC-d mitte rasvkoos vaid maksas, neerudes ja vereserumis. Seda seletatakse PFOA ja PFOS seondumisega valkudega (nt albumiiniga). [2]

PFC-sid seostatakse vähi tekkega imetajatel [2,3] ja seetõttu on USA keskkonnaagentuuril (EPA) soovitanud kuulutada PFOA näriliste kantserogeeniks, mis võib omada toimet ka inimestele ning EPA on algatanud programmid PFOA kasutuse vähendamiseks ja toime uurimiseks. [4] PFC-d on ka sisesekreetsioonisüsteemi kahjustajad. [5]

Toiduahelas olevaid saasteaineid käsitlev Euroopa Toiduohutusameti teaduskomisjon võttis 2008. aastal vastu PFOSi, PFOAd ja nende soolasid käsitleva teadusliku arvamuse. [6] Toiduohutusamet soovitas koguda edasisi andmeid PFASi tasemete kohta toidus.

Euroopa Komisjon võttis 2010. a. märtsis vastu soovitusel, et liikmesriigid peaksid läbi viima seiret PFC leidumise kohta toidus. [7]. Soovitatakse analüüsida PFOS ja PFOA ning võimalusel nende lähteainete ja nendega sarnaste ühendite sisaldust.

PFC-de analüüsiks on teistes liikmesriikides kasutatud vedelikkromatograafiat massispektromeetrilise detektoriga (LC/MS). Nimetatud tehnika on kasutusel terve rea saasteainete sisalduste määramiseks toidus mitmetes Eesti laborites ning teadusasutustes. Vaatamata LC/MS tehnika laialdasele rakendatavusele, esineb selle kasutamisel nüansse, millega mitteametamine võib põhjustada ekslikke analüüsitulemusi. Seega on nende instrumentide efektiivseks kasutamiseks vaja asjatundlikult koostatud ja usaldusväärselt valideeritud meetodikaid. Seire soovitusel täitmiseks ning toidu kaudu saadava PFC-dest

tulenevate riskide hindamiseks on vaja vastav analüüsimeetod välja töötada, valideerida ja juurutada. Eestis ei ole PFC-de sisaldust toidus seni määratud.

Eestis on analoogiliste ühendite analüüsil on suurimad kogemused Terviseameti Tartu laboril (TA). TA on riiklikuks referentlaboriks mõningate püsivate orgaaniliste saasteainete, nagu mittedioksiinilaadsed PCBd (polükloreeritud bifenuülid) ning PAHd (polütsükliised aromaatsed süsivesinikud), analüüsi valdkonnas. Lisaks on TA labor aastaid analüüsinud loomsete toodete proove kloororgaaniliste pestitsiidide jääkide ning bromeeritud tuleohtlikkuse vähendajate sisalduse suhtes. Olemas on meetodiarenduseks sobilik aparatuur (LC/MS/MS).

Käesoleva arendustöö teostamisel tehti koostööd Tartu Ülikooli keemia instituudi katsekojaga (TÜ), kellega TA laboril on pikaajaline koostöö. Ühiselt on välja arendatud meetodikad Sudaan-värvainete ja mükotoksiinide määramiseks (mõlemad meetodikad on praegu TA laboris kasutusel).

Analüüside teostamiseks kasutatav meetod peab vastama Komisjoni soovitusel 2010/161/EL esitatud nõuetele [7]. Kui meetod läheb rutiinkasutusse seire läbiviimiseks, siis tuleb see akrediteerida.

Projekti eesmärgid.

Teema üldeesmärgiks oli PFC analüüsimeetodi juurutamine TA laboris.

Konkreetsed eesmärgid:

1. PFC analüüsimeetodi väljatöötamine ja arendamine.
2. Meetodi nõuetekohane valideerimine ja akrediteerimine.

Projekti tegevused.

Käesoleva projekti läbiviimisel osales kaks asutust: Tartu Ülikooli keemia instituudi katsekoda (TÜ) ja Terviseameti Tartu labor (TA). TÜ rolliks oli meetodi väljatöötamine selliselt, et seda oleks võimalik TA-s rutiinkasutusse võtta. Sellest lähtuvalt viidi töid läbi mõlema asutuse laborites. Proovide ettevalmistuse meetodika töötati välja TÜ-s, samuti uuriti TÜ-s võimalusi analüüsitavaite ainete kromatograafilise lahutuse saavutamiseks. LC/MS meetodika optimeeriti TÜ-s vaid niipalju, kui see oli vajalik proovide ettevalmistusmeetodi väljatöötamisel. TA-s optimeeriti LC/MS meetod, viidi läbi valideerimine ja proovide analüüs.

Proovide ettevalmistus.

Proovide ettevalmistusmeetodika baseerub kirjanduses toodud [8] meetodikale – QuEChERS. See meetodika võimaldas saada ekstrakti, mis ei põhjusta segavat maatriksiefekti. Võimaliku maatriksiefekti arvessevõtmiseks teostati ka maatriksvastav kalibreerimine ehk perfluorühendite standardlahused valmistati samuti kala QuEChERS' ekstraktidesse. QuEChERS meetodit kasutatakse muuhulgas ka näiteks pestitsiidijääkide analüüsimisel köögiviljades. Selle meetodi kasutamise eelnev kogemus lihtsustas selle kasutuselevõttu nii TÜ kui TA laboris.

Kromatograafiline (LC) lahutus ja MS/MS analüüs.

Väljatöötatava meetodika eesmärgiks on kolme perfluoroalküülühendi: perfluorooktaanhape (PFOA), perfluorononaanhape (PFNA) ja perfluorooktaansulfoonhappe (PFOS) määramine kala toiduks tarbitavate osade kudedes.

LC-MS/MS meetodika töötati põhiliselt välja 2011. aastal, selles kasutati YMC-Triart C18 (150x3.0 mm) (YMC) kolonni ja eluendi lisandiks heksafluoro-2-metüül-2-propanooli (HFTB). Kasutades YMC kolonni ja HFTB-d eluendi lisandina saavutati aksepteeritav lahutus perfluorooktaansulfonaadi (PFOS) ja perfluorononaanhappe (PFNA) piikide vahel. Kuna kirjanduses [9] on saadud häid tulemusi ka Atlantis T3 kolonniga, siis 2012. a. katsetati ka selle kolonniga analüütide lahutamist. Atlantis T3 kolonniga siiski ei saavutatud ootuspärast lahutust ning lahutuse saamiseks katsetati hoopis YMC kolonniga, mille omadustest (hüdrofoobsus) võib eeldada, et analüütide retentsioon kolonnis on märgatavalt parem. Selgus, et kromatograafiline lahutus ja piikide kujud on paremad YMC kolonni ja HFTB lisandit kasutamisel.

Polüfluoreeritud alkoholid (sh HFTB) on uudsed eluendi lisandid, mis on kasutusele võetud TÜ katsekojas [10, 11]. Analüütide retentsiooni mehhanism HFTB lisandit kasutades on keeruline [12], mistõttu katsetati ka fluoreeritud faasiga pöördfaaskolonni (Epic FO-LB column (150 mm x 3 mm, 3 µm, 120 Å) (ES Industries)) – piisavat lahutust saavutada ei õnnestunud. Lisaks tekitas nimetatud kolonn väga tugeva taustamüra (*column bleed*).

Seega, lõplik analüüsimeetodika kasutab analüütilist kolonni Triart C18, 150x3.0 mm, 3 µm (YMC) ja eluendi komponente A: 5 mM HFTB vesilahus, pH=10.0 (pH reguleerimiseks kasutatakse ammoniaagi vesilahust) ja B: metanool.

Detekteerimiseks kasutati ESI sisendiga MS/MS kolmekordse kvadrupooliga massispektromeetrit Quattro Micro (Micromass). Kasutusel on negatiivsete ioonide režiim. Fragmenteerimise tingimused on optimeeritud iga analüüsitava ühendi jaoks eraldi. Analüüsil kasutatavad fragmentatsioonid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Massianalüsaatoris toimunud ioonreaktsioonid.

Ühend	Ioonreaktsioon	Tütarioon
PFOA	413 → 369 Q	F3C-(CF2)5-CF2-
	413 → 169	F3C-CF2-CF2-
PFNA	463 → 419 Q	F3C-(CF2)6-CF2-
	463 → 169	F3C-CF2-CF2-
PFOS	499 → 99	F-SO3-
	499 → 80 Q	SO3-

Q-tähedega on tähistatud kvantiseerimiseks kasutatav ioonreaktsioon.

2011. aastal tekitas probleeme perfluorühendite kõrge taustasignaali, mis oli tingitud kasutatavatest materjalidest või solventidest. 2012. aastal on taustasignaali püsivalt vähenenud. Seostame seda tendentsi perfluorühendite väljapesemisega kromatograafilisest süsteemist. Kuna taustasignaali on ühe päeva piires konstantne, siis ei põhjusta see analüüsil olulisi probleeme.

Meetodi valideerimine ja akrediteerimine.

Meetodika valideerimine viidi läbi juhindudes USA FDA valideerimisjuhendist [13]. Meetodi arendamisel võeti aluseks Euroopa komisjoni soovitus [7]: „Ideaalvariandis peaksid regeneratsioonimäärad olema vahemikus 70–120 % ning koguseline piir 1 µg/kg.“ Toodud sõnastuses interpreteeriti „regeneratsioonimäär“ kui saagis ja „koguseline piir“ kui meetodika määramispiir (LOQ).

Metoodika valideerimine reaalseste proovidega viidi läbi kasutades proovina lõhekala. Lõhekala valik tuleneb tema rasvasusest, nimelt kõrge rasvasisalduse tõttu on lõhe üks keerukamaid maatrikseid ja seetõttu esindab „halvimat juhtumit“.

Metoodika valideerimise tulemused on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Metoodika valideerimise tulemused.

		PFOA	PFNA	PFOS
	LOD [ug/kg]	0.3	0.2	0.6
	LOQ [ug/kg]	0.8	0.5	2.1
Kordustäpsus	(korduvus, n = 5)			
1 ug/kg	Keskmine	1.04	1.11	1.14
	St.dev	0.07	0.05	0.21
	CV %	7%	4%	19%
10 ug/kg	Keskmine	9.88	11.43	11.15
	St.dev	0.53	0.67	0.35
	CV %	5%	6%	3%
100 ug/kg	Keskmine	102.7	109.98	113.67
	St.dev	9	4.16	2.17
	CV %	2%	4%	2%
Saagis, % (n = 5)				
	1 ug/kg	90	94	101
	10 ug/kg	102	108	103
	100 ug/kg	109	106	109

Seega on metoodika oma parameetritelt väga lähedal Euroopa komisjoni soovitus [1] „ideaalvariandile“.

Metoodika on vormistatud vastavalt Terviseameti Tartu labori tavadele. Samuti on plaanis avaldada analüüsimetoodika ja valideerimisandmed teaduskirjanduses – artikli käsikiri on koostamisel.

Vajadusel akrediteeritakse metoodika TA laboris 2013. aastal. Akrediteerimise eeltingimuseks on üldjuhul pädevuskatsetel osalemine. Pädevuse demonstreerimiseks sobib osalemine laboritevahelisel võrdlusmõotmisel. 2012. aastal ei õnnestunud leida ühtki perfluoroalküühendite võrdlusmõotmist. Teine võimalus pädevuse demonstreerimiseks on sertifitseeritud võrdlusmaterjali analüüs. Õnnestus leida ainult üks sertifitseeritud võrdlusmaterjali müüja, kuid materjali kogus oli käesoleva metoodika jaoks liiga väike, mistõttu selle ostmisest loobuti. Sertifitseeritud võrdlusmaterjalide tootmise vajalikkust on rõhutanud ka Euroopa Toiduohutusamet [6].

Eesti inimese PFC-de toidust saadavuse hindamiseks analüüsiti kalaproove. Kalaproovid osteti Tartust kaubandusvõrgust lähtudes sellest, milliseid kalaliike terves Eestis enim süüakse ning kust Eesti inimesed kõige sagedamini oma toidulauale kala ostavad. Kalaproovid osteti Tartu Rimi Hypermarketitest (Rimi Eesti Food AS), Selverist (Selver AS) ja Tartu Sadamaturult (OÜ Sadamahalduse).

Analüüsiti PFC-de sisaldus Eestis tarbitavates kalades. Tulemused on toodud tabelis 3 (iga proovi analüüsiti kaks korda).

Tabel 3. Eestis tarbitavates kalades sisaldunud perfluoroalküülühendite sisaldused.

Nr	Kala	Päritolu	Sisaldus, ug/kg*		
			PFOA	PFNA	PFOS
1	Vikerforell	Karilatsi	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOD
2	Koger	Läänemeri	<LOD	<LOQ	<LOQ
			<LOD	<LOD	<LOQ
3	Karpkala	Härjanurme	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOD
4	Lest	Läänemeri	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOD
5	Angersäga	Sõmerpalu	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOD
6	Atlandi lest	Norra	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOQ	<LOD
7	Kilu	Läänemeri	<LOD	<LOD	<LOQ
			<LOD	<LOD	<LOQ
8	Säinas	Lämmijärv	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOQ
9	Vimb	Läänemeri	<LOD	0.6	<LOQ
		Põhjarannik	<LOD	0.7	<LOQ
10	Siig	Läänemeri	<LOD	<LOD	<LOD
		Põhjarannik	<LOD	<LOD	<LOD
11	Latikas_1	Emajõgi	<LOD	<LOQ	<LOQ
			<LOD	<LOQ	<LOQ
12	Haug	Emajõgi	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOD
13	Räim	Läänemeri	<LOD	<LOD	<LOD
		Põhjarannik	<LOD	<LOD	<LOD
14	Ahven_1	Läänemeri	<LOD	<LOQ	<LOQ
			<LOD	<LOQ	<LOQ
15	Ahven_2	Võrtsjärv	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOD
16	Latikas	Võrtsjärv	<LOD	<LOQ	<LOD
			<LOD	<LOQ	<LOD
17	Lõhefilee	Norra	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOD
18	Lõhe	Norra	<LOD	<LOD	<LOD
			<LOD	<LOD	<LOD
19	Koha	Emajõgi	<LOD	0.6	<LOQ
			<LOQ	<LOQ	<LOQ

* - „<LOD“ – ei detekteeritud, „<LOQ“ – esineb jälgedena

Analüüsitud 19-st kalaproovist tuvastati ühe või mitme perfluoroalküülühendi sisaldumist seitsmes proovis. Neist kahe proovi (Vimb Läänemere põhjarannikult ja Koha Emajõe) korral ületas leitud aine (PFNA) sisaldus määramispiiri.

Statistikaameti andmete järgi (2007. aasta kohta) osteti ühe leibkonna liikme kohta värsket kala ja kalatooteid ca 0,7 kg kuus. Päevaseks tarbimiseks teeb see 23 g päevas inimese kohta. See näitaja on ilmselt madalam kui tegelik tarbimine, kuna ei sisalda isepüütud ja käest-kätte ostetut. Täpsemate andmete puudumisel kasutame hinnangut 25 g kala inimese kohta päevas.

Uuritud kalade keskmist PFC-de kontsentratsiooni on võimalik hinnata mitmel viisil:

- minimaalne keskmine kontsentratsioon saadakse siis, kui võtta <LOD sisaldus arvutustes nulliks, <LOQ puhul võetakse tavaliselt väärtuseks $(LOD+LOQ)/2$ ja numbrilise sisalduse korral siis vastav number;
- maksimaalne keskmine kontsentratsioon saadakse, kui <LOD võetakse numbriliselt võrdseks LOD-ga, <LOQ numbriliselt võrdseks LOQ-ga ja arvutatakse seejärel keskmine.

Kirjeldatud skeemide abil saadud hinnangud on toodud tabelis 4. Eeldades, et inimene sööb päevas keskmiselt 25 g kala, saab ta kalast keskmiselt 0.02 µg PFC päevas. Kindlasti on elanikegrupe, kes tarvitavad keskmisest märgatavalt rohkem kala, näiteks kalurid. Kui hinnata kaluri keskmiseks päevaseks kalatarbimiseks 200 g, siis saab ta kalast keskmiselt 0.35 µg PFC päevas.

Tabel 4. PFC-de keskmised sisaldused kalades.

	Keskmine sisaldus, µg/kg		
	PFOA	PFNA	PFOS
Minimaalne	0.01	0.13	0.46
Maksimaalne	0.31	0.31	1.11

Projekti käigus omandatud uued teadmised/oskused.

QuEChERS meetodit on kasutatud nii taimset kui loomset päritolu proovide ettevalmistuseks. Nii TÜ kui TA laboril olid enne projekti algust olemas kogemused QuEChERS meetodi kasutamiseks taimse materjali korral. QuEChERS meetodi kasutamine loomsete proovide analüüsiks omandati käesoleva projekti käigus.

HFIP ja HFTB on uudsed LC/MS jaoks sobivad eluendi lisandid, mis võeti kasutusele TÜ-s ja mille positiivne mõju ravimite LC lahutusele ja MS detekteerimisele on tõestatud. [10,11] PFC-de lahutamiseks ei olnud siiani HFIP ega HFTB lisandit kasutatud. Käesolevas projektis näidati, et HFTB lisand võimaldab kromatograafiliselt lahutada ka PFOS ja PFNA piigid, mis muude eluendisüsteemidega ei ole võimalik olnud. Samas ei häiri HFTB lisand mingil viisil ainete MS-detekteerimist.

Mõlema osaleva labori jaoks oli uudne ka kogemus analüüsida selliste ainete jälgi, mis esinevad laborites kasutatavates materjalides. Näiteks põhjustasid LC süsteemist väljaleostuvad PFC-d taustapiike kromatogrammidel. Alles siis kui nende piikide päritolu ja ajas püsivus oli välja selgitatud oli töö jätkamine võimalik.

Tulemused ja järeldused.

Töötati välja ja valideeriti meetodika PFOA, PFNA ja PFOS analüüsimiseks kalades. Meetod on laiendatav teistele PFC-dele ja teistele loomset ja/või taimset päritolu proovidele.

Projekti tulemusena on Eestis on labor – Terviseameti Tartu labor, mis on võimeline rutiinselt määrama PFC-de sisaldusi toidus. Analüüsimeetodi dokumentatsioon on TA laborile üle antud.

Seega on Eestil võimalik täita Euroopa komisjoni soovitus esitatud nõudeid PFC-de seire kohta. Seire käivitumisel saab võimalikuks anda hinnang elanikkonna poolt toiduga omastatavate PFC-de koguste kohta.

Eestis kõige enam tarbitavate kalade analüüs näitas, et PFC-de sisaldus neis ületas määramispiiri vaid kahe kalaproovi korral (Läänemere Põhjaranniku vimb ja Emajõe koha).

Kasutatud proovide ettevalmistuse meetodit on võimalik kasutada ka teiste loomse päritoluga proovide korral. Samuti on võimalik LC/MS meetodikat laiendada teistele PFC-le ja sarnaselt käituvatele saasteainetele. Seega on võimalik analüüsida suuremat hulka saasteaineid erinevates proovides.

Kirjandusviited

1. Stockholmi konventsioon: <http://chm.pops.int>
2. Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., & Seed, J. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 99(2), (2007) 366–94. doi:10.1093/toxsci/kfm128
3. Butenhoff, J. L., Kennedy, G. L., Chang, S.-C., & Olsen, G. W. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity study with ammonium perfluorooctanoate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 298(1-3), (2012) p. 1. doi:10.1016/j.tox.2012.04.001
4. USA keskkonnaagenteur: <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/>
5. Gao, Y., Li, X., & Guo, L.-H. Assessment of estrogenic activity of perfluoroalkyl acids based on ligand-induced conformation state of human estrogen receptor. *Environmental science & technology*, 47(1), (2013), p. 634. doi:10.1021/es304030x
6. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food chain on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. *The EFSA Journal* 653 (2008), p. 1.
7. Euroopa Komisjoni soovitus 17.03.2010 toidus leiduvate perfluoritud alküülühendite seire kohta (2010/161/EL)
8. Lacina, O., Hradkova, P., Pulkrabova, J., Hajslova, J. Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish. *J. Chrom. A* 1218, (2011), p. 4312.
9. Luque, N., Gomez, A.B., van Leeuwen, S., Rubio, S. Analysis of perfluorinated compounds in biota by microextraction with tetrahydrofuran and liquid chromatography/ion isolation-based ion-trap mass spectrometry, *J. Chrom A.*, 1217 (2010), p. 3774.
10. Kipper, K., Herodes, K., Leito, I., Nei, L. Two fluoroalcohols as components of basic buffers for liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometric determination of antibiotic residues. *Analyst*, (2011), 136, p.4587.
11. Karin Kipper, doktoritöö „Fluoroalkoholid LC-ESI-MS komponendina: kasutatavus ja rakendused“, juhendaja: Koit Herodes, kaitstud: 31.08.2012.

12. Kipper, K., Herodes, K., Leito, I. Fluoroalcohols as novel buffer components for basic buffer solutions for liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry: Retention mechanisms. *J. Chrom. A*, 1218, (2011), p. 8175.
13. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center of Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001).