

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Χημείας

Εργαστήριο

Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:

«Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος»

Θέμα Διατριβής:

«Προσδιορισμός Βρωμιωμένων Διφαινυλικών

Αιθέρων στα Ούρα με τη μέθοδο Αέριας

Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας με

Αρνητικό Χημικό Ιοντισμό»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

ΑΡΤΕΜΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Ηράκλειο 2011

Προσδιορισμός Βρωμιωμένων Διφαινυλικών
Αιθέρων στα Ούρα με τη μέθοδο Αέριας
Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας με
Αρνητικό Χημικό Ιοντισμό

Determination of brominated diphenyl ethers in
urine with the method Gas Chromatography- Mass
Spectrometry with Negative Chemical Ionization

Αφιερωμένο σε όσους δεν το βάζουν κάτω...

Επιβλέπων Καθηγητής:

- Στεφάνου Ευρυπίδης
Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

- Στεφάνου Ευρυπίδης
Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
- Μιχαλόπουλος Νικόλαος
Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
- Περγαντής Σπυρίδων
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος» και υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Στεφάνου Ευρυπίδη.

Ευχαριστώ τόσο τη γενική συνέλευση του τμήματος για την εισαγωγή μου στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, όσο και τον κ. Στεφάνου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη εργασία και κάνοντάς μου εύστοχες υποδείξεις όταν συναντούσα κάποια δυσκολία. Ακόμη, ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Μιχαλόπουλο και κ. Περγαντή, διότι δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην εξεταστική μου επιτροπή.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τη Δρ. Αποστολάκη Μαρία, η οποία ήταν εκείνη που ουσιαστικά πρότεινε το γενικό πλαίσιο της πειραματικής διαδικασίας που εφαρμόστηκε, αλλά και υπεύθυνη συντήρησης της οργανολογίας που χρησιμοποιήθηκε. Γενικά, την ευχαριστώ διότι, στο πλαίσιο που είχε αρμοδιότητα, μπόρεσε να κατευθύνει επιτυχώς κομμάτια αυτής της εργασίας.

Από εκεί και έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, δηλαδή τους: Δρ. Κουβαράκη Αντώνη, Δρ. Τζιάρα Θράσο και Δρ. Καργάκη Σοφία για την πολύτιμη βοήθειά τους όποτε τη χρειάστηκα, αλλά και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Περράκη Αντωνία, Διακομανώλη Μαρίνα, Γκαϊτατζή Μπέττυ, Μυριδάκη Αντώνη και Ιακωβίδη Μηνά, για το πολύ ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο, στις δύσκολες συνθήκες της καθημερινότητάς μου. Βέβαια, πάνω σε αυτό το κομμάτι, θέλω να ευχαριστήσω και αρκετούς φοιτητές από το γειτονικό εργαστήριο του κ. Μιχαλόπουλου, δηλαδή τους: Παύλο, Χριστίνα, Μάνο, Θάνο, Μαρία, Βάσω, Ευρυδική και Φωτεινή. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω ξανά όσους από τους παραπάνω συμμετείχαν στη λήψη των πραγματικών μου δειγμάτων.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους καθώς και την οικογενειά μου, για την στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, αλλά και για την κατανόησή τους στις μεγάλες περιόδους απουσίας μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους: Κάλλια, Αλέξη, Θάνο, Γιώργο, Ρούσο και Αριάδνη! Περισσότερο όμως από όλους για την ολοκλήρωση αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος, θέλω να ευχαριστήσω τα ιδρύματα «Μαρία Μανασάκη» και «Αθανασιάδη-Μποδοσάκη» για την οικονομική βοήθεια που μου παρείχαν, χωρίς την οποία δε θα μπορούσα να ανταπεξέλθω στις ανάγκες διαβίωσής μου στη διάρκεια αυτών των σπουδών, ούτε και θα είχα το ψυχικό σθένος να υπομείνω τις δύσκολες απαιτήσεις τους. Τους ευχαριστώ όλους από καρδιάς!

Περίληψη:

Οι πολυβρωμιωμένοι διαφαινυλικοί αιθέρες (PBDEs) ανήκουν στην κατηγορία των βρωμιωμένων επιβραδυντικών φλόγας (BFRs). Η χρήση τους έχει αυξηθεί τα 30 τελευταία χρόνια εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής συνθετικών χημικών τα οποία απαιτούν πυροπροστασία, προκειμένου τα τελικά προϊόντα στα οποία τα συνθετικά αυτά απαντώνται, να έχουν περιορισμένη πιθανότητα ανάφλεξης. Χαρακτηριστικά, αυτά τα επιβραδυντικά φλόγας χρησιμοποιούνται σε κατασκευαστικά υλικά, υφάσματα, χαλιά, καναπέδες, στρώματα, ηλεκτρικές συσκευές, τηλεοράσεις, ηλεκτρονικούς υπολογιστές, μεταφορικά μέσα, κ.ά.

Το γεγονός όμως ότι δε συνδέονται χημικά με το υλικό στο οποίο κάθε φορά προστίθενται, κάνει δυνατή την απομάκρυνσή τους από το εκάστοτε υλικό καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του, ειδικά εάν αυτό εκτείνεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Συνεπώς, η διαρκής έκθεση του περιβάλλοντος σε αυτές τις ενώσεις, σε συνδυασμό με την υψηλή τους ανθεκτικότητα και ικανότητα να βιοσυσσωρεύονται, μπορεί να καθορίσει την παρουσία τους στο περιβάλλον και τους διάφορους ιστούς για πολλά χρόνια. Πράγματι, παρόλο που η παραγωγή και η χρήση τους απαγορεύτηκε το 2004 σε πολλές χώρες του αναπτυγμένου κόσμου, οι ποσότητες που αναμένεται να απελευθερωθούν στο ήδη βεβαρυσμένο περιβάλλον από τα προϊόντα που ήδη έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά είναι πολύ υψηλές, και μάλιστα θα υφίστανται για πολλά χρόνια.

Παρόλο που έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες τα τελευταία 30 χρόνια για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων σε αρκετές περιβαλλοντικές μήτρες (αέρια σωματίδια, ιζήματα, λυματολάσπη), σε θηλαστικά, σε ψάρια, αλλά και στο ανθρώπινο σώμα (αίμα, μητρικό γάλα, λιπώδης ιστός), το ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό τους σε ούρα και ειδικά σε ανθρώπινα ούρα είναι ανύπαρκτο, πιθανώς εξαιτίας της υψηλής λιποφιλίας αυτών των ενώσεων.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας, ήταν αρχικά η ανάπτυξη μιας κατάλληλης μεθόδου για τον προσδιορισμό των μελών αυτής της κατηγορίας ενώσεων στα ανθρώπινα ούρα, στην περίπτωση που απεκκρίνονται στην αρχική τους μορφή, δηλαδή μη-μεταβολισμένα. Επειδή όμως, τα επίπεδα αυτών των ενώσεων στα ούρα ίσως φτάσουν πολύ χαμηλές τιμές συγκεντρώσεων (έως τα χαμηλά pg/ml ούρων), η λήψη αρκετής ποσότητας δείγματος και η εφαρμογή της υγρής-υγρής εκχύλισης, κρίθηκαν απαραίτητες.

Βέβαια, η εύρεση της καταλληλότερης μεθόδου για τη συγκεκριμένη ανάλυση, βασίστηκε στην αποδοτικότερη, βάσει ποιοτικών χαρακτηριστικών, μέθοδο για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών που συγκρατούν αυτές τις φαινολικές ενώσεις. Η μέθοδος αυτή περιελάμβανε την προσθήκη μεθανόλης σε 10 ml ούρων, ανακτήσεις στην περιοχή του 83-96% και όρια ανίχνευσης στην περιοχή των 0,190-1,651 pg/ml ούρων για τα μέλη που υπήρχαν στο πρότυπο ανάκτησης που χρησιμοποιήθηκε.

Από εκεί και έπειτα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε, εκτός από την υγρή-υγρή εκχύλιση, περιελάμβανε και την αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας, για το διαχωρισμό και την ανίχνευση αυτών των ενώσεων αντίστοιχα. Μάλιστα, στο φασματογράφο μάζας κρίθηκε σκόπιμη η εφαρμογή του αρνητικού χημικού ιοντισμού, τεχνική η οποία παρόλο που είναι λιγότερο «σκληρή» από τον ηλεκτρονικό ιοντισμό, έχει αποδειχθεί ότι παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία στη συγκεκριμένη ανάλυση, καθώς οι ανάλυτες που μελετάμε (PBDEs) περιέχουν τα πολύ ηλεκτραρνητικά άτομα βρωμίου.

Τελικά, η εφαρμογή της επιλεγμένης μεθόδου σε πιθανώς εκτεθειμένα ανθρώπινα δείγματα ούρων, από άτομα διαφόρων ηλικιών και επαγγελματιών και από δότες που άνηκαν και στα δύο φύλα, έδειξε ότι οι ανιχνεύσιμες ποσότητες μη-μεταβολισμένων PBDEs στα δείγματα αυτά, και συγκεκριμένα οι ποσότητες των μελών BDE-47 και BDE-99 που ανιχνεύτηκαν,

βρίσκονται στα επίπεδα των τυφλών δειγμάτων της συγκεκριμένης μεθόδου. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή της ποσότητας του μέλους BDE-47 στα πραγματικά δείγματα βρέθηκε ίση με $9,4 \pm 3,1$ pgr, ενώ η αντιστοιχή τιμή του στα τυφλά δείγματα ήταν ίση με $9,0 \pm 3,6$ pgr σε 10 ml ούρων. Αντίστοιχα, η μέση τιμή της ποσότητας του μέλους BDE-99 στα πραγματικά δείγματα βρέθηκε ίση με $2,3 \pm 0,7$ pgr, ενώ η αντιστοιχή τιμή του στα τυφλά δείγματα ήταν ίση με $4,6 \pm 2,5$ pgr.

Abstract:

The polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) belong to the category of brominated flame retardants (BFRs). Their use has been increased through the last 30 years owing to the huge production of polymers and resins which must be flame-retarded, so that the total products in which these synthetic materials are used are as less flammable as possible. The specific flame retardants are used in buildings materials, textiles, carpets, sofas, mattresses, electrical appliances, televisions, computers, means of transportation, etc.

However, the retardants of this class are not chemically-combined to the materials. As a result, they can leach out of them over their entire life, especially when they are exposed to high temperatures. Consequently, the continuous exposure of the environment in combination with their high persistence potential and the ability to accumulate, could determine their presence in the environment as well as in tissues for many years. Indeed, although their production and use were banned in 2004 in many countries of developed world, the amounts which are predicted to be released from the products that have been promoted in markets by now are huge, and they will be present for many years to come.

Although a large variety of studies has been published through the last 30 years for the determination of these retardants in different environmental matrices (such as airborne particles, sediments and sewage sludge), in mammals, in fishes, even in human body (blood, maternal milk, adipose tissue), the interest for their determination in urine and especially in human's urine is inexistent, probably due to their high lipophilic potential.

For that reason, the basic aim of the present study was the finding of a suitable method for the determination of these compounds in human's urine, in the case that they are excreted from the body in their initial form, namely as non-metabolized compounds. Basically, the necessity of a large volume uptake of the samples and the application of the liquid-liquid extraction, were

inevitable, because of the very low concentration levels expected in human's urine (maybe below the low pgr/ml of urine).

However, the choice of the most suitable method for the specific analysis, was based on the most effective (according to quality parameters) method for the denaturation of the proteins hold these phenolic compounds. The method selected, included the addition of methanol in 10 ml urine, recoveries in the region of 83-96% and detection limits in the region of 0,190-1,651 pgr/ml urine for the congeners composed the recovery standard used.

Besides, the method developed, included the gas chromatography in combination with mass spectrometry, for the separation and the detection of these compounds, respectively. Moreover, the application of negative chemical ionization to the mass spectrometer was intentional, because our analytes (PBDEs) contain the very electronegative atoms of bromine. This technique has proved to provide better sensitivity to the specific analysis, although it is less «tough» from electron ionization.

Finally, the application of the selected method in human's urine samples potentially exposed to these compounds, from people of different sex, age and occupation, proved that the detected amounts of non-metabolized PBDEs in these samples, and especially the amounts of the congeners BDE-47 and BDE-99, are similar to their levels in blank samples of the specific method. Specifically, the mean value of the amount of the the congener BDE-47 in the real samples was $9,4 \pm 3,1$ pgr, while the same value in the blank samples was $9,0 \pm 3,6$ pgr in 10 ml urine. Respectively, the mean value of the amount of the the congener BDE-99 in the real samples was $2,3 \pm 0,7$ pgr, while the same value in the blank samples was $4,6 \pm 2,5$ pgr.

Συντομογραφίες:

<u>Συντομογραφία</u>	<u>Επεξήγηση</u>	<u>Ελληνική απόδοση</u>
ΣPBDEs	Sum of PBDEs	Συνολική ποσότητα PBDEs
ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrene	Ακρονιτρίλιο Βουταδιένιο Στυρένιο
ASE	Accelerated solvent extraction	Σύστημα ταχείας εκχύλισης
BFRs	Brominated flame retardants	Βρωμιωμένα επιβραδυντικά φλόγας
CI	Chemical ionization	Χημικός ιοντισμός
CV	Coefficient of variation	Συντελεστής διακύμανσης
CYP (enzymes)	Cytochrome P450 (enzymes)	(Ενζυμα) Κυτοχρωμα (τος) P450
DCM	Dichloromethane	Διχλωρομεθάνιο
ECD	Electron capture detector	Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων
ECNI	Electron capture negative ionization	Αρνητικός ιοντισμός σύλληψης ηλεκτρονίων
ECPL	Environmental chemical processes laboratory	Εργαστήριο Περιβαλλοντικών χημικών διεργασιών
EI	Electron impact ionization	Ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων
EPA	Environmental protection agency	Υπηρεσία προστασίας του περιβάλλοντος
EU	European union	Ευρωπαϊκή ένωση
FRs	Flame retardants	Επιβραδυντικά φλόγας
GC	Gas chromatography	Αέρια χρωματογραφία
GPC	Gel permeation chromatography	Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
HBCDD	Hexabromocyclododecane	Εξαβρωμοκυκλοδωδεκάνιο
HOCS	Hydrophobic organic compounds	Υδρόφοβες οργανικές ενώσεις
HRMS	High resolution mass spectrometer	Φασματογράφος μάζας υψηλής διαχωριστικότητας

<u>Συντομογραφία</u>	<u>Επεξήγηση</u>	<u>Ελληνική απόδοση</u>
IDL	Instrumental detection limit	Όριο ανίχνευσης του οργάνου
IPCS	International program for chemical safety	Διεθνές πρόγραμμα για την ασφάλεια των χημικών
IQL	Instrumental quantification limit	Όριο ποσοτικοποίησης του οργάνου
IS	Internal standard	Εσωτερικό πρότυπο
LLE	Liquid-liquid extraction	Υγρή-υγρή εκχύλιση
LOD	Limit of detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of quantification	Όριο ποσοτικοποίησης
LRAT	Long range atmospheric transport	Ατμοσφαιρική μεταφορά ευρείας κλίμακας
LRMS	Low resolution mass spectrometer	Φασματογράφος μάζας χαμηλής διαχωριστικότητας
MDL	Method detection limit	Όριο ανίχνευσης της μεθόδου
MeO-PBDEs	Methoxy-PBDEs	Μεθύξο-PBDEs
MS	Mass spectrometer	Φασματογράφος μάζας
MtBE	Methyl-tert-butyl-ether	Τετρα-μέθυλο βουτυλαιθέρας
NCI	Negative chemical ionization	Αρνητικός χημικός ιοντισμός
OH-PBDEs	Hydroxy-PBDEs	Υδρόξο-PBDEs
PBBs	Polybrominated biphenyls	Πολυβρωμιωμένα διφαινόλια
PBDDs	Polybrominated dibenzo-p-dioxins	Πολυβρωμιωμένες διβενζο-p-διοξίνες
PBDEs	Polybrominated diphenyl ethers	Πολυβρωμιωμένοι διφαινολικοί αιθέρες
PBDFs	Polybrominated dibenzofurans	Πολυβρωμιωμένα διβενζο-φουράνια
PCBs	Polychlorinated biphenyls	Πολυχλωριωμένα διφαινόλια
PCI	Positive chemical ionization	Θετικός χημικός ιοντισμός
POPs	Persistent organic compounds	Ανθεκτικοί οργανικοί ρυπαντές
PVC	Polyvinyl chloride	Πολυβινυλοχλωρίδιο

<u>Συντομογραφία</u>	<u>Επεξήγηση</u>	<u>Ελληνική απόδοση</u>
RRF	Relative response factor	Σχετικός συντελεστής απόκρισης
RS	Recovery standard	Πρότυπο ανάκτησης
RSD	Relative standard deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
SD	Standard deviation	Τυπική απόκλιση
SIM	Selective ion monitoring	Παρακολούθηση χαρακτηριστικού ιόντος
SOM	Soil organic matter	Οργανική ύλη εδάφους
SPE	Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
STPs	Sewage treatment plants	Εγκαταστάσεις επεξεργασίας βοθρολυμάτων
SVOCs	Semi-volatile organic compounds	Ημιπτητικές οργανικές ενώσεις
TBBPA	Tetrabromobisphenol A	Τετράβρωμο-διφαινόλη Α
TEF	Toxic equivalent factor	Παράγοντας ισοδύναμης τοξικότητας
TLC	Thin layer chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδος
TTR	Transthyretin	Τρανσθυρετινη
USEPA	United states environmental protection agency	Υπηρεσία προστασίας περιβάλλοντος των Η.Π.Α.
UV (light)	Ultra violet (light)	Υπεριώδες (φως)
WHO	World health organization	Παγκόσμιος οργανισμός υγείας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: -----	20
1.1. Τα επιβραδυντικά φλόγας (FRs):-----	20
1.2. Τα βρωμιωμένα επιβραδυντικά φλόγας (BFRs):-----	21
1.3. Οι πολυβρωμιωμένοι διφαινυλικοί αιθέρες (PBDEs):-----	25
1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά, τρόπος παραγωγής, δυνατές χρήσεις: -----	255
1.3.2. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες: -----	32
1.3.2.1. Λιποφιλία: -----	33
1.3.2.2. Τάση ατμών:-----	34
1.3.2.3. Διαλυτότητα: -----	35
1.3.2.4. Η σταθερά Henry:-----	36
1.3.2.5. Ανθεκτικότητα: -----	37
1.4. Οι PBDEs στο Περιβάλλον: -----	38
1.4.1. Πηγές εκπομπής PBDEs στο περιβάλλον:-----	38
1.4.2. Τύχη των PBDEs στο περιβάλλον: -----	39
1.4.2.1. Μεταφορά μέσω της ατμόσφαιρας:-----	39
1.4.2.2. Εναπόθεση στα αιωρούμενα σωματίδια της ατμόσφαιρας και ξηρή εναπόθεση:-----	40
1.4.2.3. Εναπόθεση στις σταγόνες της βροχής και υγρή εναπόθεση: -----	41
1.4.2.4. Αντίδραση με οξειδωτικές ρίζες της ατμόσφαιρας: -----	42
1.4.2.5. Φωτόλυση/Φωτοδιάσπαση: -----	42
1.4.2.6. Μικροβιακή αποικοδόμηση:-----	44
1.4.2.7. Βιομετατροπή σε άλλες τοξικές ενώσεις: -----	44
1.4.2.8. Κατάληξη σε υδατινούς αποδέκτες: -----	45
1.4.2.9. Προσρόφηση σε ιζήματα, εδάφη και λυματολάσπη:-----	46
1.4.2.10. Βιοσυσσώρευση/Βιομεγέθυνση στους έμβιους οργανισμούς: ---	47
1.4.3. Επίπεδα των PBDEs στο περιβάλλον:-----	49
1.4.3.1. Αέρας/Σκόνη: -----	49
α. Επίπεδα σε εξωτερικούς χώρους: -----	49
β. Επίπεδα σε εσωτερικούς χώρους:-----	51
1.4.3.2. Υδατινοί αποδέκτες/ιζήματα: -----	54

1.4.3.3. Εδάφη/ Λυματολόαση:	57
1.4.3.4. Έμβιοι οργανισμοί:	61
α. Χερσαίοι οργανισμοί:	61
β. Οργανισμοί γλυκού νερού:	62
γ. Θαλάσσιοι οργανισμοί:	63
1.5. Οι PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό:	65
1.5.1. Πηγές έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs:	65
1.5.2. Συσχέτιση των πηγών έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs με τα επίπεδά τους στον οργανισμό του:	68
1.5.2.1. Επίπεδα PBDEs σε τροφή και ανθρώπινο οργανισμό:	68
1.5.2.2. Επίπεδα PBDEs σε αέρα/σκόνη και ανθρώπινο οργανισμό:	73
1.5.2.3. Επίπεδα PBDEs λόγω εσωτερικής έκθεσης:	77
1.5.2.4. Συνολικά επίπεδα PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό:	78
1.5.3. Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα των PBDEs:	79
1.5.3.1. In vivo πειράματα σε κύτταρα:	81
1.5.3.2. In vitro πειράματα σε κύτταρα:	82
1.5.3.3. Μεταβολική πορεία σε ολόκληρο τον ανθρώπινο οργανισμό:	83
1.5.3.4. Προτεινόμενοι μηχανισμοί στο αίμα ποντικών:	87
α. Διάσπαση του δεσμού του διφαινυλικού αιθέρα:	89
β. Υδροξυλίωση:	90
γ. Αποβρωμίωση και Υδροξυλίωση:	93
1.5.3.5. Προτεινόμενοι μηχανισμοί στο ανθρώπινο αίμα:	94
α. Διάσπαση του δεσμού του διφαινυλικού αιθέρα:	96
β. Υδροξυλίωση:	97
1.5.4. Επίπεδα των μεταβολισμένων PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό:	99
1.5.5. Τοξικότητα των PBDEs:	103
1.6. Μέθοδοι προσδιορισμού PBDEs σε ανθρώπινα δείγματα:	105
1.6.1. Εκχύλιση, καθαρισμός και απομόνωση των PBDEs:	105
1.6.1.1. Εφαρμοσμένες μέθοδοι στο αίμα:	105
1.6.1.2. Εφαρμοσμένες μέθοδοι στο μητρικό γάλα:	109
1.6.1.3. Εφαρμοσμένες μέθοδοι στα ούρα:	111
1.6.2. Διαχωρισμός και ανίχνευση των PBDEs:	112
1.6.2.1. Διαχωρισμός των PBDEs:	112

1.6.2.2. Ανίχνευση των PBDEs: -----	113
α. Ανίχνευση με EI-LRMS: -----	114
β. Ανίχνευση με ECNI-LRMS: -----	115
γ. Σύγκριση των τεχνικών EI-LRMS, ECNI-LRMS και EI-HRMS: -----	116
δ. Ανίχνευση με ECD: -----	117
2. ANTIKEIMENO KAI STOXOI: -----	119
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ:-----	121
3.1. Αναλυτική οργανολογία:-----	121
3.1.1. Εισαγωγή:-----	121
3.1.2. Αέρια χρωματογραφία: -----	122
3.1.3. Φασματογράφος μάζας:-----	123
3.1.3.1. Πηγή ιόντων (ion source): -----	124
3.1.3.2. Αναλυτής μαζών (mass analyzer):-----	128
3.1.3.3. Ανιχνευτής μαζών (mass detector): -----	129
3.2. Εναρκτήριοι διαδικασίες στο φασματογράφο μάζας:-----	130
3.2.1. Καθορισμός θερμοκρασιακού προγράμματος:-----	130
3.2.2. Εφαρμογή παρακολούθησης χαρακτηριστικού ιόντος (SIM): -----	131
3.2.3. Βαθμονόμηση του συστήματος: -----	133
3.3. Βελτιστοποίηση παραμέτρων στο φασματογράφο μάζας: -----	134
3.3.1. Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας της πηγής ιοντισμού: -----	134
3.3.2. Βελτιστοποίηση της ενέργειας ηλεκτρονίων: -----	135
3.3.3. Βελτιστοποίηση του ρεύματος ηλεκτρονίων: -----	137
3.4. Προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου: -----	139
3.5. Άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οργάνου: -----	142
3.5.1. Γενικά: -----	142
3.5.2. Χρήσιμες μαθηματικές σχέσεις: -----	143
3.5.2.1. Στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων: -----	143
3.5.2.2. Ο Σχετικός Συντελεστής Απόκρισης (RRF): -----	144
3.5.3. Ορθότητα των μετρήσεων: -----	145
3.5.4. Πιστότητα των μετρήσεων:-----	147
3.5.4.1. Πιστότητα των μετρήσεων την ίδια αναλυτική ημέρα: -----	147
3.5.4.2. Πιστότητα των μετρήσεων σε διαφορετικές αναλυτικές ημέρες: -----	148

3.5.5. Αποδοτικότητα της χρωματογραφικής στήλης: -----	149
3.5.6. Διαχωριστική ικανότητα της χρωματογραφικής στήλης:-----	150
3.5.7. Ευαισθησία του οργάνου: -----	151
3.5.7.1. Σταθερότητα σήματος του ανιχνευτή:-----	152
3.5.7.2. Γραμμική απόκριση του ανιχνευτή: -----	153
3.5.8. Εξειδίκευση του οργάνου:-----	154
3.6. Σημαντικές παρατηρήσεις επί της πειραματικής διαδικασίας-----	155
3.7. Απαιτούμενα διαλύματα, αντιδραστήρια και υαλικά: -----	163
3.7.1. Εσωτερικό πρότυπο και πρότυπο ανάκτησης: -----	156
3.7.1.1. Εσωτερικό πρότυπο (Internal standard, IS): -----	156
3.7.1.2. Πρότυπο ανάκτησης (Recovery standard, RS): -----	157
3.7.2. Απαιτούμενα αντιδραστήρια και υαλικά: -----	159
3.7.2.1. Απαιτούμενα αντιδραστήρια (στερεά, υγρά, αέρια):-----	159
3.7.2.2. Απαιτούμενα υαλικά:-----	160
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ:-----	163
4.1. Εισαγωγή:-----	163
4.2. Προτεινόμενες μέθοδοι για τον προσδιορισμό μη-μεταβολισμένων PBDEs σε ανθρώπινα ούρα βασισμένες στην υγρή-υγρή εκχύλιση:-----	164
4.2.1. Μέθοδος βασισμένη στην προσθήκη ισοπροπανόλης και HCl για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών: -----	165
4.2.1.1. Αναλυτική διαδικασία:-----	165
4.2.1.2. Ανάλυση δειγμάτων (τυφλών και αγνώστων):-----	168
4.2.1.3. Τροποποίηση της αναλυτικής διαδικασίας:-----	171
4.2.2. Μέθοδος βασισμένη στην προσθήκη μεθανόλης για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών: -----	174
4.2.2.1. Αναλυτική διαδικασία:-----	174
4.2.2.2. Ανάλυση τυφλών δειγμάτων (blanks): -----	175
4.2.2.3. Ανάλυση αγνώστων δειγμάτων (samples):-----	178
4.2.2.4. Προσδιορισμός των ανακτήσεων (recoveries):-----	179
4.2.2.5. Όρια ανίχνευσης της μεθόδου (MDL): -----	180
4.2.2.6. Τροποποίηση της αναλυτικής διαδικασίας:-----	183
4.2.3. Μέθοδος βασισμένη στην προσθήκη μεθανόλης και HCl για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών: -----	184
4.2.3.1. Ανάλυση τυφλών δειγμάτων (blanks): -----	184

4.2.3.2. Ανάλυση αγνώστων δειγμάτων (samples):-----	186
4.2.3.3. Προσδιορισμός των ανακτήσεων (recoveries):-----	187
4.2.3.4. Όρια ανίχνευσης της μεθόδου (MDL): -----	189
4.2.3.5. Τροποποίηση της αναλυτικής διαδικασίας:-----	191
4.2.4. Μέθοδος βασισμένη στην προσθήκη φορμικού οξέος για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών: -----	192
4.3. Τελική επιλογή μεθόδου για τον προσδιορισμό μη-μεταβολισμένων PBDEs σε ανθρώπινα ούρα και η εφαρμογή της:-----	194
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:-----	202
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ: -----	203
Παραρτήματα:-----	219
I. Παράρτημα A-1: χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας τυφλών δειγμάτων: -----	220
II. Παράρτημα A-2: χρωματογραφήματα αγνώστων (πραγματικών) δειγμάτων: -----	234
III. Παράρτημα A-3: χρωματογραφήματα ανακτήσεων μεθόδων: -----	241
IV.Παράρτημα A-4: χρωματογραφήματα από εμβολιασμό PBDEs σε πραγματικό δείγμα και καμπόλες βαθμονόμησης για τους PBDEs σε αυτό το δείγμα-----	243

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Τα επιβραδυντικά φλόγας (FRs):

Τα επιβραδυντικά φλόγας (FRs) είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται σε πολυμερή, πλαστικά, υφάσματα, χρώματα και άλλα υλικά που έχουν τη βάση τους στο πετρέλαιο, προκειμένου να βελτιώσουν τις πυροπροστατευτικές τους ιδιότητες. Βέβαια, η κύρια χρήση τους είναι στα πολυμερή και τα πλαστικά των ειδών ηλεκτρονικού και ηλεκτρολογικού εξοπλισμού όπως: τηλεοράσεων, ηλεκτρονικών υπολογιστών, τμημάτων αυτοκινήτων, πινάκων ηλεκτρικών κυκλωμάτων, καλωδίων κ.ά. (Hyötyläinen et al., 2002).

Από χημικής άποψης, τα επιβραδυντικά φλόγας μπορεί να είναι *υδρογονούχης βάσης ενώσεις, ανόργανες ενώσεις, οργανικοί φωσφορικοί εστέρες αλογονωμένοι ή μη, καθώς και άλλες χλωριωμένες ή βρωμιωμένες οργανικές ενώσεις* (Hyötyläinen et al., 2002, Alaei et al., 2003). Επίσης, τα επιβραδυντικά φλόγας μπορούν να διαχωριστούν σε δραστικά και σε προσθετικά ανάλογα με τη χρήση τους. Τα πρώτα, είναι ομοιοπολικώς ενωμένα στο πολυμερές και επομένως είναι λιγότερο πιθανό να διαχυθούν στο περιβάλλον πριν το προϊόν αποσυντεθεί ή καεί. Τα δεύτερα από την άλλη, απλά προστίθενται ή διαλύονται στο υλικό, με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολη η απομάκρυνσή τους από αυτό (Hyötyläinen et al., 2002, Darnerud et al., 2001).

Ανόργανα FRs είναι κυρίως άλατα, όπως το τρι-ενυδατωμένο αργίλιο, το φωσφορικό αμμώνιο και το βορικό οξύ. Τα ανόργανα FRs αποτελούν το 50% της συνολικά παραγόμενης ποσότητας FRs και πολλές φορές χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά με οργανικά FRs, ώστε να αυξήσουν την ικανότητα επιβράδυνσης της ανάφλεξης των διαφόρων υλικών. Τα οργανικά FRs μπορεί να περιέχουν αλογόνα ή φωσφόρο και άζωτο και αποτελούν το 25% και 20% της συνολικά παραγόμενης ποσότητας FRs, αντίστοιχα (WHO, 1997).

Ένας βασικός λόγος που αρκετά FRs είναι αλογονωμένα, είναι ότι κατά τη διάρκεια της καύσης παράγονται, μεταξύ άλλων, ελεύθερες ρίζες

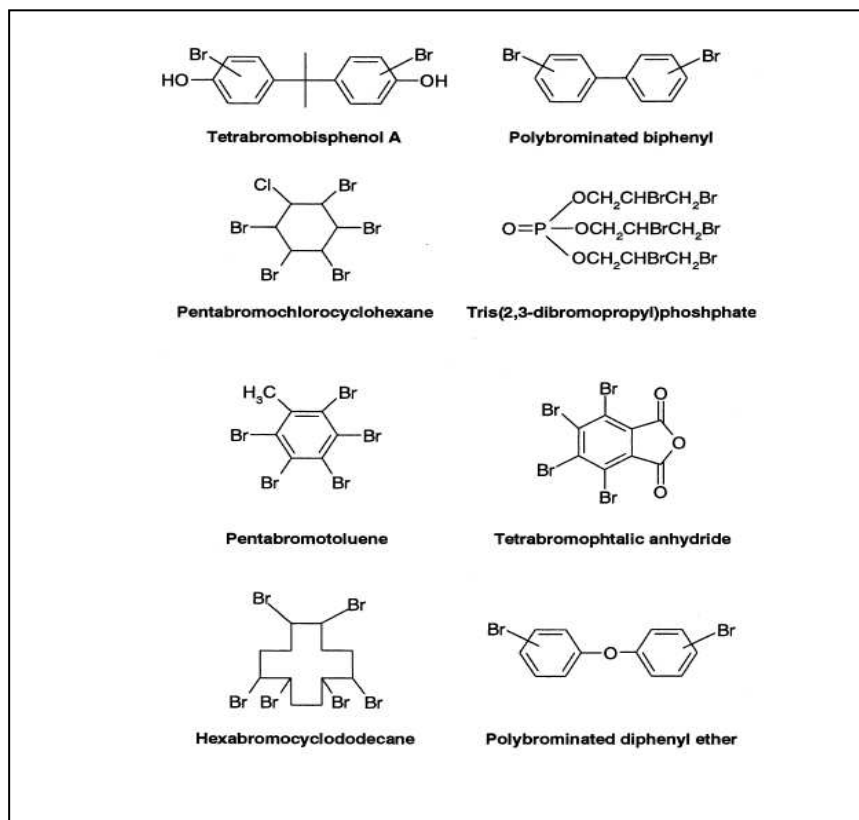
ισχυρά οξειδωτικές (κυρίως ρίζες OH και H), τις οποίες τα αλογόνα έχουν τη δυνατότητα να αιχμαλωτίσουν και έτσι να διακόψουν την εξάπλωση της φλόγας. Μάλιστα, η ικανότητα αυτή αυξάνεται με το μέγεθος του αλογόνου, δηλαδή ακολουθείται η σειρά: I>Br>Cl>F. Ωστόσο, οι φθοριωμένες ενώσεις είναι αρκετά σταθερές και αποσυντίθενται σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες από τις συνήθεις συνθήκες καύσης της οργανικής ύλης, ελευθερώνοντας τα αλογόνα τους πολύ αργά για να είναι αποτελεσματικές. Από την άλλη, οι ιωδιωμένες ενώσεις δεν είναι καθόλου σταθερές και αποσυντίθενται σε ελάχιστα υψηλές θερμοκρασίες. Συμπερασματικά, μόνο χλωριωμένες και βρωμιωμένες ενώσεις χρησιμεύουν ως FRs (Alaee et al., 2003, Rahman et al., 2001).

Τελικά όμως, λόγω της μεγαλύτερης αποτελεσματικότητάς τους στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών και λόγω της απομάκρυνσής τους από το εκάστοτε υλικό σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (λόγω του ασθενούς δεσμού C-Br), οι βρωμιωμένες ενώσεις έχουν γίνει πιο δημοφιλή FRs συγκριτικά με τις αντίστοιχες χλωριωμένες (το 39% του συνολικού αριθμού των FRs είναι βρωμιωμένα). Βέβαια, η θερμική σταθερότητα σε όλη τη διάρκεια ζωής του εκάστοτε υλικού, καθώς και η συμβατότητα με το εκάστοτε πολυμερές, είναι δεδομένα χαρακτηριστικά και για τις δύο κατηγορίες ενώσεων (Alaee et al., 2003, Rahman et al., 2001, De Boer et al., 2003).

1.2. Τα βρωμιωμένα επιβραδυντικά φλόγας (BFRs):

Υπάρχουν περισσότερες από 75 διαφορετικές αλειφατικές, αρωματικές, κύκλο-αλειφατικές, φαινολικές και άνυδρο-φθαλικές ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται σαν βρωμιωμένα επιβραδυντικά φλόγας (BFRs). Οι πιο συνηθισμένες από αυτές είναι: η τετραβρωμο-διφαινόλη Α (TBBPA), το εξαβρωμο-κυκλοδωδεκάνιο (HBCDD), τα πολυβρωμιωμένα διαφαινόλια (PBBs) και τέλος οι πολυβρωμιωμένοι διφαινολικοί αιθέρες (PBDEs) (Hyoëtylääinen et al., 2002). Οι δομές των ενώσεων αυτών, καθώς και μερικών ακόμα συνηθισμένων BFRs, παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.

Για την πυροπροστασία του εκάστοτε υλικού, είναι αναγκαία η προσθήκη του επιλεγμένου βρωμιωμένου επιβραδυντικού φλόγας σε ποσοστό 5-30% της συνολικής μάζας του, ανάλογα την περίπτωση (Darnerud et al., 2001, Kierkegaard et al., 2009, Mandalakis et al., 2008, Hwang et al., 2008).



Εικόνα 1: Μερικά από τα πιο συνηθισμένα BFRs (Hyoëtäläinen et al., 2002)

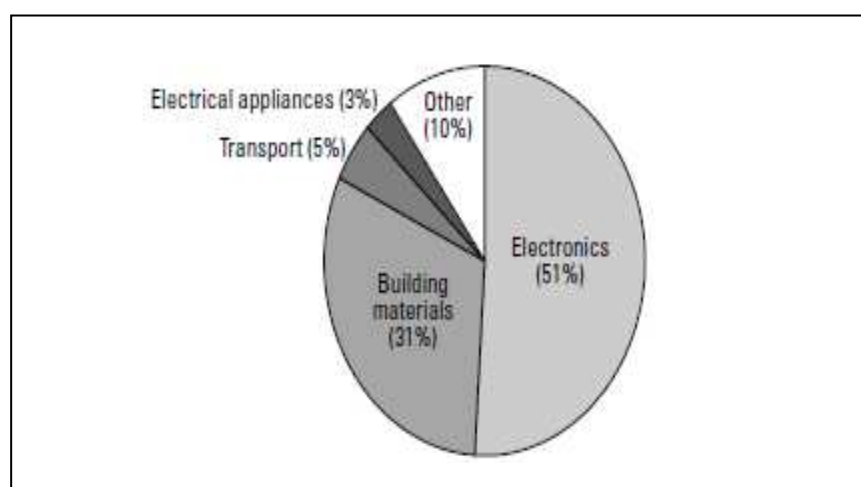
Τα BFRs χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο ενσωμάτωσής τους στα πολυμερή. Οι κατηγορίες αυτές είναι: τα βρωμιωμένα μονομερή, οι δραστικές βρωμιωμένες ενώσεις και οι προσθετικές βρωμιωμένες ενώσεις. Ένα βρωμιωμένο μονομερές (πχ. στυρένιο ή βουταδιένιο) χρησιμοποιείται στην παραγωγή πολυμερών τα οποία έπειτα είτε αναμειγνύονται με μη αλογονωμένα πολυμερή, είτε εισάγονται στο αρχικό μείγμα πριν τον πολυμερισμό ώστε να προκύψει ένα πολυμερές που να περιέχει και βρωμιωμένα αλλά και μη-βρωμιωμένα μονομερή. Στις άλλες δύο κατηγορίες αναφερθήκαμε. Μιλώντας με παραδείγματα, απλώς θα πούμε ότι η TBBPA ανήκει στα δραστικά BFRs, ενώ το HBCDD και οι PBDEs ανήκουν στα προσθετικά BFRs (Alaee et al., 2003).

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται μια λίστα που δείχνει την εικόνα της ετήσιας παραγωγής σημαντικών πολυμερών το έτος 2000, σε συσχέτιση με το BFR που προστίθεται ανά περίπτωση. Επίσης, στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται η κατανομή της χρήσης των BFRs ανά κατηγορία προϊόντων στα μέσα της δεκαετίας του 1990.

Πίνακας 1: Ετήσια παραγωγή πολυμερών το 2000 και το περιεχόμενο αυτών σε BFRs (Alaee et al., 2003)

Polymer	BFR content (%)	Type of BFR	Annual production (1000 TPA)
Polystyrene foam	0.8–4	HBCDD	600
High-impact polystyrene	11–15	d-PBDE, Br PS	350
Epoxy resin	19–33	TBBPA	300
Polyamides	13–16	d-PBDE, Br PS	200
Polyolefins	5–8	d-PBDE, DBS	200
Polyurethanes	10–18	p-PBDE, Br Polyols	150
Polyterephthalate	8–11	Br PS, der-TBBPA	150
Unsaturated polyesters	13–28	TBBPA	150
Polycarbonate	4–6	Br PS, der-TBBPA	100
Styrene copolymers	12–15	o-PBDE, Br PS	50

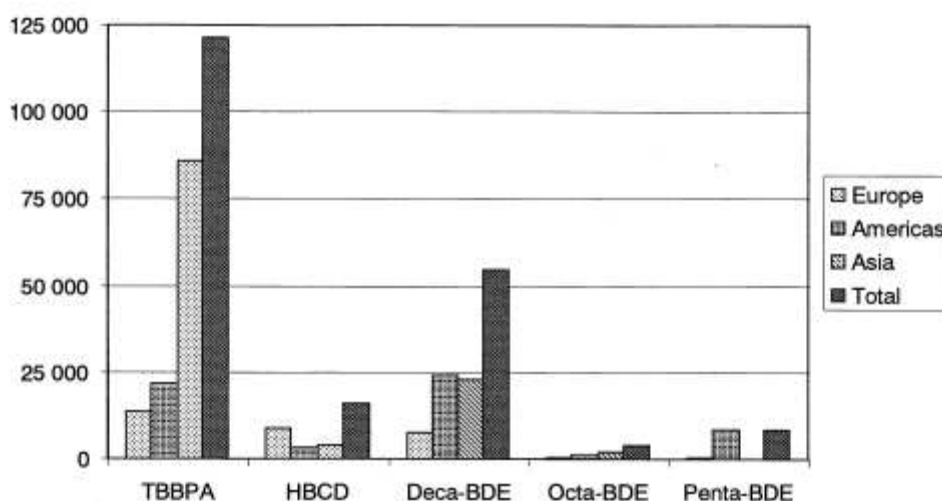
HCBDD, hexabromocyclododecane; PBDE, polybrominated diphenyl ethers (d: deca, o: octa, and p: penta formulations); TBBPA, tetrabromobisphenol A, (der: derivative); Br PS, brominated polystyrene; DBS, propylene dibromo styrene; Br Polyols, esters of TBBPA; TPA, tonnes per annum (metric).



Εικόνα 2: Κατανομή της χρήσης των BFRs ανά κατηγορία προϊόντων (Darnerud et al., 2001)

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 η ετήσια παραγωγή σε BFRs ήταν 150.000 τόνοι, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 30% της συνολικής παραγωγής των FRs. Το 1/3 της παραγωγής των BFRs άνηκε στους PBDEs, άλλο 1/3 άνηκε στην TBBPA και το υπόλοιπο ποσοστό στα υπόλοιπα BFRs (κυρίως PBBs). Με την πάροδο του χρόνου όμως, τα ποσοστά αυτά άλλαξαν. Για παράδειγμα, τα αποτελέσματα της ετήσιας παραγωγής των κυριότερων BFRs το έτος 1999, δίνονται στον Πίνακα 2. Φαίνεται ότι η συνολική παραγωγή ξεπέρασε τους 200.000 τόνους με την Ασία να κρατούσε τα πρωτεία της παραγωγής (το 56%), ενώ η TBBPA κρατούσε τα πρωτεία του πιο άφθονου BFR παγκοσμίως (πάνω από 70%). Η κύρια χρήση αυτής της ένωσης είναι σαν δραστικό BFR στις επόξυ-ρητίνες που χρησιμοποιούνται στους πίνακες ηλεκτρικών κυκλωμάτων (Hyoëtyläinen et al., 2002, Darnerud et al., 2001). Τέλος, το 2004 η συνολική παραγωγή των BFRs έφτασε τους 490.000 τόνους (Mandalakis et al., 2008).

Πίνακας 2: Ετήσια παραγωγή BFRs το 1999 σε Ευρώπη, Ασία και Αμερική (Hyoëtyläinen et al., 2002)

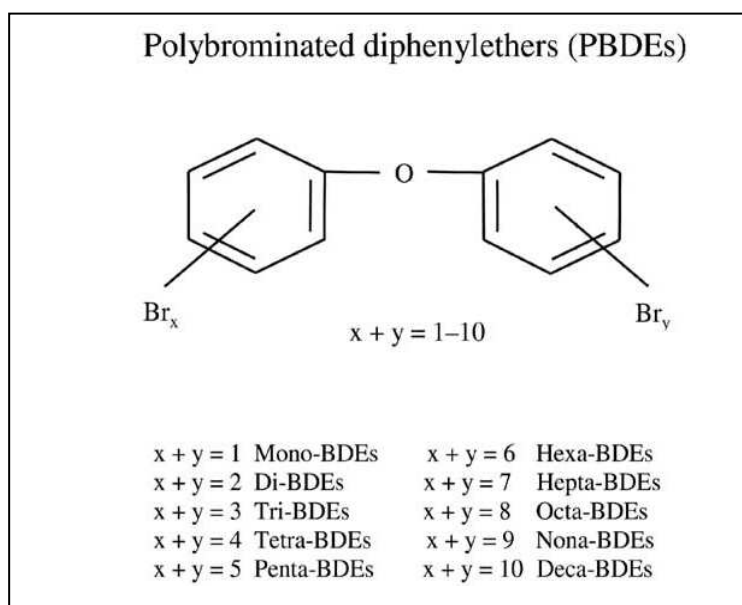


1.3. Οι πολυβρωμιωμένοι διφαινυλικοί αιθέρες (PBDEs):

1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά, τρόπος παραγωγής, δυνατές χρήσεις:

Όπως αναφέραμε, οι πολυβρωμιωμένοι διφαινυλικοί αιθέρες (PBDEs) ανήκουν στην κατηγορία των προσθετικών βρωμιωμένων επιβραδυντικών φλόγας (BFRs). Εξακολουθούν και κατέχουν τη δεύτερη θέση στην παραγωγή των BFRs μετά την TBBPA (Alaee et al., 2003).

Παράγονται με μια διαδικασία βρωμίωσης ενός διφαινυλικού αιθέρα παρουσία ενός καταλύτη Friedel-Craft (πχ. $AlCl_3$) σε διαλύτη συνήθως διβρωμομεθάνιο, αν και οι ακριβείς συνθήκες συνήθως δεν αποκαλύπτονται. Το μόριο ενός διφαινυλαιθέρα περιέχει 10 άτομα υδρογόνου οποιοδήποτε από τα οποία μπορεί να αντικατασταθεί από άτομο βρωμίου, οδηγώντας έτσι στους μονοβρωμιωμένους έως τους δεκαβρωμιωμένους διφαινυλαιθέρες και σε ένα αριθμό μελών που φτάνει τα 209. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των ισομερών για τους μόνο-, δι-, τρι-, τέτρα-, πέντα-, έξα-, έπτα-, όκτα-, έννια- και δέκα-βρωμιωμένους διφαινυλικούς αιθέρες είναι 3, 12, 24, 42, 46, 42, 24, 12, 3 και 1 αντίστοιχα (Alaee et al., 2003, Rahman et al., 2001). Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται η γενική μορφή των PBDEs καθώς και η ονοματολογία τους ανά σειρά ομολόγων μελών.



Εικόνα 3: Δομή και ονοματολογία των PBDEs (Eljarrat et al., 2004)

Έπειτα, στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται κάποια από τα μέλη της οικογένειας των PBDEs σε σειρά αυξανόμενου αριθμού ατόμων βρωμίου, τα οποία παρασκευάστηκαν σε εργαστήρια κυρίως για ταυτοποίηση των μελών αυτών, αλλά και για τοξικολογικές μελέτες (De Wit, 2002).

Πίνακας 3: Μέλη PBDEs που έχουν παρασκευαστεί σε εργαστήριο (De Wit, 2002)

Name	Congener number
2-Bromodiphenyl ether	BDE-1
3-Bromodiphenyl ether	BDE-2
4-Bromodiphenyl ether	BDE-3
2,4-DiBDE	BDE-7
2,4'-DiBDE	BDE-8
2,6-DiBDE	BDE-10
3,4-DiBDE	BDE-12
3,4'-DiBDE	BDE-13
4,4'-DiBDE	BDE-15
2,2',4-TrBDE	BDE-17
2,3',4-TrBDE	BDE-25
2,4,4'-TrBDE	BDE-28
2,4,6-TrBDE	BDE-30
2,4',6-TrBDE	BDE-32
2',3,4-TrBDE	BDE-33
3,3',4-TrBDE	BDE-35
3,4,4'-TrBDE	BDE-37
2,2',4,4'-TeBDE	BDE-47 ^a
2,2',4,5'-TeBDE	BDE-49
2,2',4,6'-TeBDE	BDE-51
2,3',4,4'-TeBDE	BDE-66
2,3',4',6-TeBDE	BDE-71
2,4,4',6-TeBDE	BDE-75
3,3',4,4'-TeBDE	BDE-77
2,2',3,4,4'-PeBDE	BDE-85 ^a
2,2',4,4',5-PeBDE	BDE-99 ^a
2,2',4,4',6-PeBDE	BDE-100
2,3,4,5,6-PeBDE	BDE-116
2,3',4,4',6-PeBDE	BDE-119
2,2',3,3',4,4'-HxBDE	BDE-128
2,2',3,4,4',5'-HxBDE	BDE-138
2,2',3,4,4',6'-HxBDE	BDE-140
2,2',4,4',5,5'-HxBDE	BDE-153
2,2',4,4',5,6'-HxBDE	BDE-154
2,3,4,4',5,6-HxBDE	BDE-166
2,2',3,4,4',5,6-HpBDE	BDE-181
2,3,3',4,4',5,6-HpBDE	BDE-190

Η διαδικασία της βρωμίωσης των PBDEs σε βιομηχανικό επίπεδο, οδηγεί συνήθως σε μείγμα ομολόγων και ισομερών PBDEs και όχι σε μια καθαρή μορφή. Τα τρία μείγματα που παράγονται και που είναι εμπορικά διαθέσιμα είναι: το πέντα-, το όκτα- και το δέκα-BDE μείγμα (Alaee et al., 2003, Rahman et al., 2001, Darnerud et al., 2001, Kierkegaard al., 2009).

Αναλυτικότερα, το πέντα-BDE μείγμα είναι ένα παχύρευστο υγρό που αποτελείται από: 24-38% τέτρα-BDEs (κυρίως από τον BDE-47), 50-60% πέντα-BDEs (κυρίως από τον BDE-99 και λιγότερο από τον BDE-100) και 4-8% έξα-BDEs (τους BDE-153 και BDE-154). Βέβαια, στο μείγμα έχουν βρεθεί και ίχνη από τα εξής έξι μέλη: BDE-17, -28, -66, -85, -138, και -183 (Sjödin et al., 1998). Το μείγμα αυτό χρησιμοποιείται κυρίως στον αφρό πολυουρεθάνης, τις επόξυ- και φαινόλο- ρητίνες, αλλά και τα υφάσματα. Εξαιτίας της πολύ συχνής προσθήκης του στον αφρό πολυουρεθάνης, είναι παρόν σε προϊόντα όπως τα χαλιά, οι καναπέδες και τα στρώματα (Alaee et al., 2003, De Wit, 2002, Vonderheide et al., 2008, Hassanin et al., 2004, Qiu et al., 2007).

Τα κύρια μέλη που περιέχει (BDE-47, -99, -100) είναι τα ίδια που έχουν βρεθεί σε βιολογικές μήτρες, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου ιστού (De Wit, 2002). Η πλειοψηφία (>97%) της παραγωγής του μείγματος βρίσκεται στη Βόρεια Αμερική, όπου οι συγκεντρώσεις των βασικών μελών που περιέχει είναι αυξημένες σε χλωρίδα, πανίδα και μητρικό γάλα (Luross et al., 2000, She et al., 2002, Ikononou et al., 2002, Norstrom et al., 2002, Ryan et al., 2002). Η χρήση αυτού του μείγματος εθελοντικά έχει σταματήσει στην Ιαπωνέζικη βιομηχανία. Στην Ευρώπη η χρήση του απαγορεύτηκε το 2004 (μετά από πρόταση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής το 2001). Την ίδια χρονιά, απαγορεύτηκε η παραγωγή και η χρήση του και σε 10 πολιτείες των ΗΠΑ, ενώ προτάθηκε η εθελοντική κατάργηση της παραγωγής του στις υπόλοιπες πολιτείες. Αυτό συνέβη διότι, αν και το μείγμα αυτό συνεισφέρει μόνο στο 10% στην αγορά των BFRs, είναι ένα από τα πιο άφθονα είδη της κατηγορίας αυτής στο περιβάλλον, υποδεικνύοντας τη βιοσυσσώρευση των μελών του μείγματος με την πάροδο του χρόνου, ή εναλλακτικά την πιθανή αποικοδόμηση των υψηλότερων μελών της οικογένειας των PBDEs (Alaee et al., 2003, Rahman et al., 2001, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008, De Boer et al., 2003, Frederiksen et al., 2009, Qiu et al., 2007).

Το όκτα-BDE μείγμα είναι μια λευκή σκόνη με όχι σταθερή σύσταση λόγω του ελέγχόμενου βαθμού βρωμίωσης που απαιτείται. Πάντως το BDE-

183 (ένα όκτα-BDE) βρίσκεται πάντα σε αφθονία στο μείγμα. Το μείγμα αυτό παρασκευάζεται σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα άλλα δύο και χρησιμοποιείται κυρίως στις ρητίνες τύπου ABS, τα πολυαμίδια και τα πολυανθρακικά. Το μέλος BDE-183 έχει βρεθεί σε χλωρίδα, πανίδα (Luross et al., 2002, Rice et al., 2002) ιζήματα (Allchin et al., 1999) και ανθρώπινο ορό αίματος (Sjödín et al., 1999). Στην Ευρώπη η χρήση του μείγματος αυτού επίσης απαγορεύτηκε το 2004 (μετά από πρόταση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής). Την ίδια χρονιά, απαγορεύτηκε η παραγωγή και η χρήση του και σε 10 πολιτείες των ΗΠΑ, ενώ προτάθηκε η εθελοντική κατάργηση της παραγωγής του στις υπόλοιπες πολιτείες (Alaee et al., 2003, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008, Hassanin et al., 2004, Frederiksen et al., 2009).

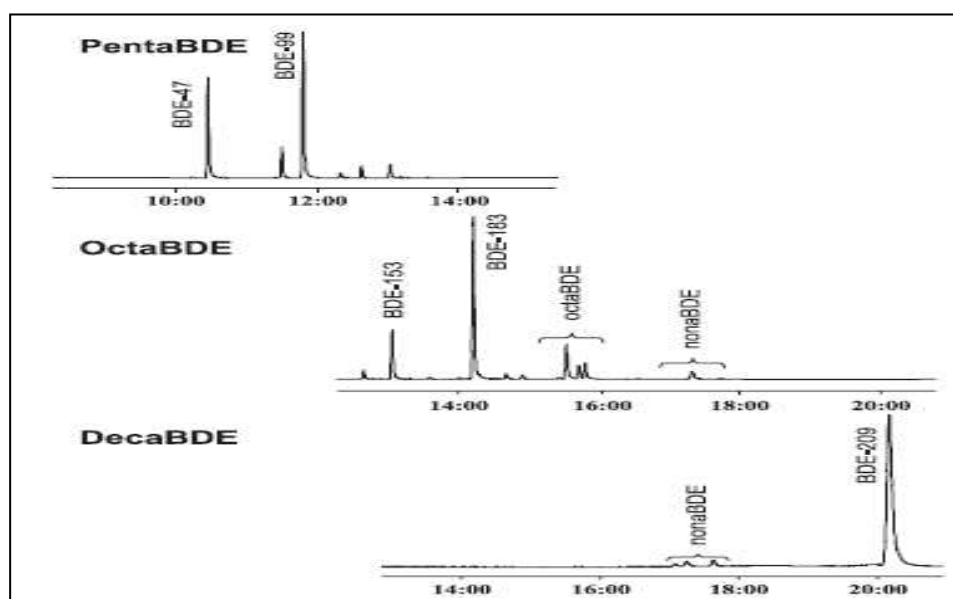
Το δέκα-BDE μείγμα είναι επίσης μια λευκή σκόνη που αποτελείται κυρίως από το BDE-209 (το δέκα-BDE) σε ποσοστό 97-98%, αλλά και από ένα μικρό ποσοστό έννια-BDEs (0.3-3%). Το μείγμα αυτό χρησιμοποιείται ουσιαστικά σε κάθε τύπο πολυμερούς συμπεριλαμβανομένων των: πολυανθρακικών, ρητινών πολυεστέρα, πολυολεφινών, πολυστυρενίου, ABS, πολυαμινών, PVC, ελαστικών και υφασμάτων. Το μέλος BDE-209 είναι το κύριο μέλος που έχει βρεθεί σε ιζήματα και λυματολάσπη (Zegers et al., 2000, de Boer et al., 2000a, Allchin et al., 1999, Hale et al., 2001), ενώ έχει βρεθεί και σε ορό ανθρώπινου αίματος (Sjödín et al., 1999, 2001), αλλά και αυγά γερακιού (Sellström et al., 2001, Herzke et al., 2001). Το μείγμα αυτό εξακολουθεί να παράγεται και να χρησιμοποιείται. Βέβαια, αρκετές χώρες παγκοσμίως έχουν προτείνει την κατάργησή του, αλλά αυτή δεν έχει τεθεί σε εφαρμογή. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις βιομηχανιών έχουν υπάρξει εθελοντικές κινήσεις μείωσης των εκπομπών του συγκεκριμένου μείγματος. Τέλος, στη Σουηδία μετά το 2007 έχει περιοριστεί αυστηρά η χρήση του, ενώ στην υπόλοιπη Ευρώπη η απαγόρευση της χρήσης του έχει τεθεί σε ισχύ από τις 1 Ιουλίου 2008 (Alaee et al., 2003, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008, Mandalakis et al., 2009, Frederiksen et al., 2009).

Εξαιτίας της προσθήκης των δύο τελευταίων μειγμάτων σε πολυμερή ABS, πολυστυρένια και πολυαμιδία, είναι συνεπακόλουθη η παρουσία τους στα βασικά τμήματα ηλεκτρονικών υπολογιστών, τηλεοράσεων, ηλεκτρικών συσκευών, αυτοκινήτων κ.ά. (Vonderheide et al., 2008, Hwang et al., 2008, Hassanin et al., 2004).

Ακολούθως, στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η συνήθης σύνθεση των τριών τεχνικά παραγόμενων μειγμάτων PBDEs, ενώ στην Εικόνα 4 δίνονται τυπικά χρωματογραφήματα των μειγμάτων αυτών.

Πίνακας 4: Η γενική σύνθεση των τεχνικά παραγόμενων μειγμάτων PBDEs (De Wit, 2002)

Τεχνικό μείγμα	Ομόλογες ομάδες	Ποσοστό(%)
Πέντα-BDE	Τέτρα-βρωμιωμένα μέλη	24-38
	Πέντα-βρωμιωμένα μέλη	50-60
	Έξα-βρωμιωμένα μέλη	4-8
Όκτα-BDE	Έξα-βρωμιωμένα μέλη	10-12
	Έπτα-βρωμιωμένα μέλη	44
	Όκτα-βρωμιωμένα μέλη	31-35
	Έννια-βρωμιωμένα μέλη	10-11
	Δέκα-βρωμιωμένα μέλη	<1
Δέκα-BDE	Έννια-βρωμιωμένα μέλη	<3
	Δέκα-βρωμιωμένα μέλη	97-98



Εικόνα 4: Τυπικά χρωματογραφήματα των τριών εμπορικά διαθέσιμων μειγμάτων PBDEs (Alaee et al., 2003)

Σύμφωνα με το IPCS το οποίο εκδόθηκε από τον WHO (1994), η άδεια για την παρασκευή των εμπορικών μειγμάτων PBDEs έχει δοθεί σε οκτώ κύριους παρασκευαστές σε Ευρώπη, Ηνωμένες Πολιτείες και Ιαπωνία (Η Ευρώπη δεν παράγει το πέντα-BDE μείγμα). Μάλιστα, ο WHO όρισε ως επιτρεπτή ετήσια κατανάλωση των PBDEs παγκοσμίως τους 40000 τόνους. Αναλυτικότερα: 30000 τόνους για το δέκα-BDE μείγμα, 6000 τόνους για το όκτα-BDE μείγμα και 4000 τόνους για το πέντα-BDE μείγμα (Rahman et al., 2001, Darnerud et al., 2001). Η επιτρεπτή παραγωγή για το δέκα-παράγωγο είναι μεγαλύτερη διότι έχει αναφερθεί ότι απορροφάται ελάχιστα, αποικοδομείται ταχέως και δεν βιοσυσσωρεύεται, αποτελώντας έτσι ένα από τα λιγότερο τοξικά παράγωγα των PBDEs. Ωστόσο αυτό είναι σχετικό, αφού το παράγωγο αυτό κατά την αποικοδόμησή του δίνει τα χαμηλότερου μοριακού βάρους παράγωγα (τρι- έως έξα-) τα οποία είναι πολύ τοξικά, απορροφώνται εύκολα και αποικοδομούνται πολύ αργά (Hyoëtylaëinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008).

Παρόλα αυτά, καθώς οι ιδιότητες των PBDEs τους κάνουν να είναι αποδοτικά FRs, οι απαιτήσεις για την παραγωγή τους ήταν αυξημένη τα τελευταία 30 χρόνια. Βέβαια, από πλευράς έκθεσης του περιβάλλοντος και του ανθρώπου, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ποια BFRs χρησιμοποιούνται και σε ποια υλικά, καθώς και πόσο εύκολη είναι η απομάκρυνσή τους από αυτά. Δυστυχώς όμως, κάποιες από αυτές τις πληροφορίες είναι δύσκολο να δοθούν.

Ωστόσο, όπως έγινε γνωστό, τα BFRs προστίθενται σε ποσοστό 5-30% στους περισσότερους τύπους ρητινών και πολυμερών με το δέκα-BDE μείγμα και την TBBPA να είναι οι ουσίες με την μεγαλύτερη χρήση στην κατηγορία τους. Γενικά, οι κύριες χρήσεις των PBDEs είναι σε πολυστυρένια, πολυμερή ABS, αφρό πολυουρεθάνης, υφάσματα, μονωτικά καλώδια, και φυσικά σε είδη ηλεκτρονικού και ηλεκτρολογικού εξοπλισμού. Αυτές τουλάχιστον είναι κατά 80-90% οι κύριες χρήσεις τους στις Ηνωμένες Πολιτείες. Στην Ευρώπη, το PVC έχει καταγραφεί ως το κύριο υλικό όπου η χρήση των PBDEs είναι η

μεγαλύτερη. Ακολουθεί η χρήση τους στο πολυπροπυλένιο. Το μεν πρώτο πολυμερές χρησιμοποιείται κυρίως στην κατασκευή καλωδίων, ενώ το δεύτερο σε ηλεκτρικές συσκευές και καλώδια (Hyoëtylaëinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, Darnerud et al., 2001).

Στον Πίνακα 5 που ακολουθεί, παρουσιάζεται μια αναλυτική λίστα με τις ρητίνες και τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται οι PBDEs, την κύρια εφαρμογή αυτών των συνθετικών, αλλά και τα τελικά προϊόντα οπού αυτά απαντώνται.

Πίνακας 5: Οι κύριες εφαρμογές των συνθετικών όπου χρησιμοποιούνται οι PBDEs (Rahman et al., 2001)

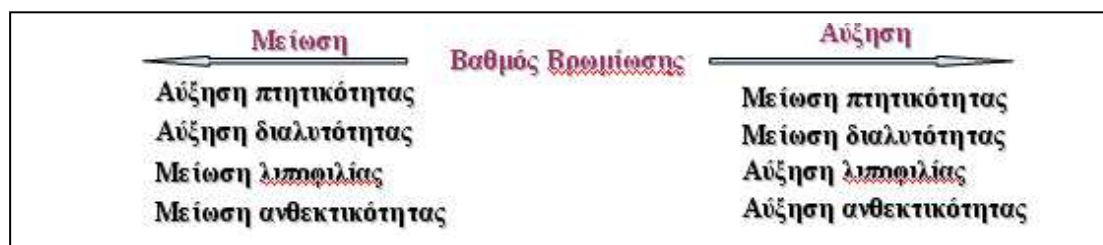
Resin or polymer	Principal applications	Final product
Acrylonitrile-butadiene-styrene	Molded parts	Television sets, computer casings, hairdryers, automotive parts
Epoxy	Circuit boards, protective coatings	Computers, ship interiors, electronic parts
Paints/laquers	Coatings	Marine and industry laquers for protection of containers.
Phenolics	Printed circuit boards	Paper laminates/glass prepegs for printed circuit boards
Polyacrylonitrile	Panels, electrical components	Lighting panels, housing of electrical appliances
Polyamide	Electrical connectors, automotive interior parts	Computers, connectors, automotive industry, transportation
Polybutylene terephthalate	Electrical components, connectors	Switches, fuses, stereos
Polyethylene/cross-linked polyethylene	Cross-linked wire cable, foam tubing, weather protection, moisture barriers	Power cables, insulation of heating tubes, marine appliances, building control instruments
Polyethylene terephthalate	Electrical components	Boxes, relays, coils, bobbins
Polypropylene	Conduits, electronics devices	Television and electronic devices, electro-mechanical parts, underground junction boxes
Polystyrene/high impact polystyrene	Television cabinets and back covers, electrical housing	Smoke detectors, office machines, housing of electrical appliances
Polyvinyl chloride	Cable sheets	Wire and cables, floor mats
Polyurethane	Cushioning/packaging materials	Furniture, sound insulation, wood imitation
Rubber	Transportation	Conveyor belts, foamed pipes for insulation
Textiles	Coatings	Carpets, automotive seating, furniture, tents, military safety clothing
Unsaturated (thermoset) polymers	Circuit boards, coatings	Electrical equipment, military/marine applications, construction panels

1.3.2. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες:

Οι PBDEs είναι μη πολικές οργανικές ενώσεις και έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές, βιοσυσσωρευτικές και τοξικολογικές ιδιότητες με τους ανθεκτικούς οργανικούς ρυπαντές (POPs), κάνοντάς τους να ανήκουν στην κατηγορία των POP-like ρυπαντών (Branchi et al., 2003, Cai et al., 2008, Hassanin et al., 2004, Frederiksen et al., 2009).

Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται από μεγάλη τοξικότητα και ανθεκτικότητα αφού αποικοδομούνται αρκετά δύσκολα. Η λιποφιλία τους είναι υψηλή και μάλιστα αυξάνεται με αυξανόμενο βαθμό βρωμίωσης. Επίσης, τα μέλη με υψηλό βαθμό βρωμίωσης είναι λιγότερο πτητικά από τα λιγότερο βρωμιωμένα. Ακόμη, αν και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες μεταβάλλονται αρκετά από μέλος σε μέλος (διότι δεν παίζει ρόλο μόνο ο βαθμός βρωμίωσης, αλλά και η θέση των ατόμων βρωμίου στους δακτυλίους), οι PBDEs έχουν γενικά χαμηλή τάση ατμών και μικρή διαλυτότητα στο νερό, ιδιότητες οι οποίες μειώνονται περισσότερο καθώς αυξάνεται ο βαθμός βρωμίωσης. Τέλος, παρουσιάζουν πολύ υψηλά σημεία ζέσεως, τα οποία κυμαίνονται από 310 έως 425 °C (De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Branchi et al., 2003, Wong et al., 2001, Tittlemier et al., 2002, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008, Watanabe et al., 2003).

Στην Εικόνα 5, απεικονίζεται η γενική τάση της μεταβολής των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των PBDEs σε σχέση με το βαθμό βρωμίωσής τους.



Εικόνα 5: Μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των PBDEs σε σχέση με το βαθμό βρωμίωσής τους

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των PBDEs είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την κατανόηση της συμπεριφοράς των ενώσεων αυτών στο περιβάλλον αρχικά, και έπειτα στον άνθρωπο. Οι ιδιότητες αυτές τους προσδίδουν υψηλή τοξικότητα, λιποδιαλυτότητα και ανθεκτικότητα, με αποτέλεσμα να είναι δεδομένη η βιοσυσσώρευση και η βιομεγέθυνσή τους κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας (Hyoëtylaëinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Cetin et al., 2005, Vonderheide et al., 2008). Για το λόγο αυτό, αμέσως τώρα θα αναφερθούμε εκτενέστερα στις ιδιότητες αυτές.

1.3.2.1. Λιποφιλία:

Η εκτίμηση για το αν μια οργανική ένωση παρουσιάζει λιπόφιλη η υδρόφιλη τάση, γίνεται με βάση τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}). Ο συντελεστής αυτός περιγράφει την κατανομή των οργανικών ενώσεων στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής αυτός, τόσο περισσότερο μια ένωση μεταφέρεται στην οργανική φάση (της οκτανόλης) και συνεπώς τόσο πιο λιπόφιλη είναι (Στεφάνου, 2006).

Γενικά, η λιποφιλία των PBDEs αυξάνει με την αύξηση των ατόμων βρωμίου πάνω στο διαφαινυλαιθέρα. Συνεπώς, τα μέλη με μεγαλύτερο βαθμό βρωμίωσης παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές K_{ow} (και $\log K_{ow}$). Ενδεικτικά, ακολούθως δίνονται οι τιμές του $\log K_{ow}$ για διάφορες ομόλογες ομάδες των PBDEs. Οι τιμές αυτές για τα τέτρα-βρωμιωμένα μέλη κυμαίνονται από 5.9 έως 6.2, για τα πέντα-βρωμιωμένα μέλη από 6.5 έως 7.0, για τα όκτα-βρωμιωμένα μέλη από 8.4 έως 8.9, ενώ για το δέκα-βρωμιωμένο μέλος η τιμή του $\log K_{ow}$ φτάνει το 10. Οι υψηλές αυτές τιμές δείχνουν την μεγάλη τάση των PBDEs να συσσωρεύονται στο λίπος των ζωντανών οργανισμών και γενικά σε οποιοδήποτε περιβαλλοντικό μέσο πλούσιο σε οργανικό υλικό (De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008, Watanabe et al., 2003).

1.3.2.2. Τάση ατμών:

Η τάση ατμών σε μια ορισμένη θερμοκρασία, εκφράζει τη μερική πίεση των ατμών πάνω από ένα υγρό (ή στερεό), όταν το υγρό (ή το στερεό) αυτό βρίσκεται σε ισορροπία με τους ατμούς του στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Η τάση ατμών είναι συνώνυμη με την πιητικότητα της ουσίας (Ebbing et al., 2002).

Οι PBDEs συγκαταλέγονται στις ημιπητικές οργανικές ενώσεις (SVOCs) και παρουσιάζουν μεγάλο εύρος πιητικοτήτων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ενώσεις που παρουσιάζουν τάση ατμών μεταξύ 10^{-4} και 10^{-11} atm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η τάση ατμών και η θερμοκρασία περιβάλλοντος θεωρούνται ως οι καθοριστικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία κατανομής των PBDEs και γενικά των SVOCs μεταξύ αέριας και σωματιδιακής φάσης, αλλά και μεταξύ αέριας και υδατικής φάσης (Su et al., 2007, Cetin et al., 2005, Vonderheide et al., 2008). Επίσης, η τάση ατμών είναι ένα σημαντικό εργαλείο για να κατανοήσουμε τη σειρά έκλουσης των ομολόγων μελών των PBDEs κατά την ανάλυσή τους με αέρια χρωματογραφία (GC).

Σε γενικές γραμμές, τα μέλη της οικογένειας των PBDEs έχουν χαμηλή τάση ατμών η οποία παρουσιάζει σημαντική μείωση καθώς αυξάνει ο αριθμός των ατόμων βρωμίου στο διφαινυλαιθέρα. Ωστόσο, εκτός από το βαθμό βρωμίωσης, η τάση ατμών των PBDEs επηρεάζεται αρκετά και από τις θέσεις που λαμβάνουν τα άτομα βρωμίου πάνω στο διφαινυλαιθέρα και ιδιαίτερα από τον αριθμό των ατόμων βρωμίου σε όρθο- θέσεις. Βρέθηκε ότι η παρουσία ατόμων βρωμίου σε όρθο- θέσεις προκαλεί ιδιαίτερη αύξηση στην τάση ατμών των PBDEs. Αυτό συμβαίνει, διότι λόγω αυτής της αλληλεπίδρασης, οι διαμοριακές δυνάμεις των αντίστοιχων μελών εξασθενούν. Συνεπώς, σε καθεμία από τις ομόλογες ομάδες των PBDEs, τα μέλη που έχουν άτομα βρωμίου σε όρθο- θέσεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση ατμών σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας (De Wit, 2002, Wong et al., 2001, Tittlemier et al., 2002, Kierkegaard et al., 2009, Watanabe et al., 2003).

Οι τιμές της τάσης ατμών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, αντιστοιχούν συνήθως στα τεχνικά μείγματα των PBDEs. Για το πέντα-BDE μείγμα, η τάση ατμών είναι ίση με 4.69×10^{-5} Pa (Stenzel and Nixon, 1997), για το όκτα-BDE μείγμα η τάση ατμών κυμαίνεται μεταξύ 1.58×10^{-6} και 4.68×10^{-7} Pa (Tittlemier et al, 2002), ενώ για το δέκα-BDE μείγμα η τιμή της τάσης ατμών είναι ίση με 2.95×10^{-9} Pa (Wania and Dugani, 2003) στους 25 °C. Επιπλέον, οι Wong et al. (2001) έχουν υπολογίσει τις τιμές της τάσης ατμών για ορισμένα μέλη PBDEs και βρήκαν ότι αυτές κυμαίνονται από 0.1 έως 10^{-6} Pa για τα μόνο- έως τα έπτα- βρωμιωμένα μέλη των PBDEs αντίστοιχα. Τέλος, έχουν βρεθεί οι τιμές της τάσης ατμών και για ορισμένες ομόλογες ομάδες των PBDEs. Συγκεκριμένα, η τιμή αυτή για τους τέτρα-BDEs κυμαίνεται μεταξύ 2.7 και 3.3×10^{-4} Pa, για τους πέντα-BDEs μεταξύ 2.9 και 7.3×10^{-5} Pa, ενώ για τους όκτα-BDEs μεταξύ 1.2 και 2.7×10^{-7} Pa στους 20 °C. Έτσι λοιπόν, επιβεβαιώνεται γενικά ότι η τάση ατμών των PBDEs ελαττώνεται με αύξηση του βαθμού βρωμίωσής τους (Darnerud et al., 2001, Stenzel et al., 1997, Tittlemier et al., 2002, Wania et al., 2003).

1.3.2.3. Διαλυτότητα:

Ως διαλυτότητα μιας ένωσης στο νερό, ορίζεται η μέγιστη ποσότητα της ένωσης που μπορεί να διαλυθεί σε συγκεκριμένο όγκο νερού και σε καθορισμένη θερμοκρασία, ώστε να προκύψει κορεσμένο διάλυμα (Ebbing et al., 2002).

Η διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων στο νερό είναι σημαντική ιδιότητα, διότι επηρεάζει τις διαδικασίες μεταφοράς και τους χρόνους παραμονής τους στο υδάτινο περιβάλλον. Επίσης, ενώσεις με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα παρουσιάζουν υψηλούς συντελεστές προσρόφησης σε σωματίδια, εδάφη και ιζήματα, καθώς και υψηλούς συντελεστές βιοσυσσώρευσης. Σε αυτήν την κατηγορία ενώσεων ανήκουν και οι PBDEs (Hyoëtyläinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Cetin et al., 2005).

Οι PBDEs, όπως έγινε γνωστό, έχουν αρκετά χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Η διαλυτότητα των εμπορικά διαθέσιμων μειγμάτων πέντα-BDE και δέκα-BDE είναι 13.3 και <0.1 $\mu\text{gr}/\text{lt}$ αντίστοιχα (EU 2001). Επίσης, έχουν βρεθεί οι τιμές της διαλυτότητας κάποιων ομόλογων ομάδων PBDEs. Συγκεκριμένα, για τους πέντα-BDEs η συνολική διαλυτότητα είναι 0.9 ngr/lt , ενώ για το δέκα-BDE μέλος η τιμή αυτή αγγίζει τα 20-30 $\mu\text{gr}/\text{lt}$, αν και είναι αμφίβολη. Σε γενικές γραμμές, η διαλυτότητα των PBDEs στο νερό ελαττώνεται με αύξηση του βαθμού βρωμίωσης (Darnerud et al., 2001, Tittlemier et al., 2002, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008, Watanabe et al., 2003).

1.3.2.4. Η σταθερά Henry:

Η σταθερά του νόμου του Henry ουσιαστικά είναι ο λόγος της συγκέντρωσης (μερικής πίεσης) μιας οργανικής ένωσης στην αέρια φάση, προς την συγκέντρωση της ένωσης αυτής στην υδατική φάση, σε κατάσταση ισορροπίας και σε δεδομένη θερμοκρασία (Στεφάνου, 2006). Συνεπώς, ενώσεις με υψηλές τιμές τάσης ατμών και χαμηλούς συντελεστές ενεργότητας στο νερό, έχουν υψηλή τάση μεταφοράς από την υδατική στην αέρια φάση, έως ότου εξισορροπηθούν τα χημικά δυναμικά των δύο φάσεων σε δεδομένη θερμοκρασία. Τέτοιες ενώσεις θα έχουν και υψηλές σταθερές Henry.

Συνεπώς, η σταθερά Henry παίζει θεμελιώδη ρόλο στην περιγραφή των περιβαλλοντικών διεργασιών που περιλαμβάνουν μεταφορά ενώσεων μεταξύ της αέριας και της υδατικής φάσης. Η διάλυση των PBDEs στις σταγόνες τις βροχής και η εναπόθεσή τους στην επιφάνεια της γης, καθώς και η απορρόφηση ή εξάτμιση τους από τις υδάτινες μάζες (λίμνες, ποτάμια και θάλασσες) είναι οι κύριες διεργασίες μεταφοράς (Cetin et al., 2005).

Οι τιμές των σταθερών Henry που αναφέρονται στη βιβλιογραφία κυμαίνονται μεταξύ 2.07×10^{-4} (για το διβρωμιωμένο μέλος BDE-15) και $7.30 \times 10^{-8} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (για το επταβρωμιωμένο μέλος BDE-183). Άλλη μελέτη έδωσε το αποτέλεσμα 4.83 (για το τριβρωμιωμένο μέλος BDE-28) και 0.04 $\text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (για το δεκαβρωμιωμένο μέλος BDE-209). Σε γενικές γραμμές

πάντως, η τιμή της σταθεράς Henry στην οικογένεια των PBDEs ελαττώνεται σημαντικά με αύξηση του βαθμού βρωμίωσης (Tittlemier et al., 2002, Cetin et al., 2005).

1.3.2.5. Ανθεκτικότητα:

Όπως αναφέρθηκε, οι PBDEs χαρακτηρίζονται από μεγάλη λιποφιλία και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Οι ιδιότητες αυτές σε συνδυασμό με την αργή διαδικασία αποικοδόμησής τους (φυσικής, χημικής ή βιολογικής) και τον αρκετά υψηλό χρόνο ημιζωής τους, προσδίδουν στους PBDEs υψηλή ανθεκτικότητα, ικανότητα βιοσυσσώρευσης, αλλά και μακροσκελή μεταφορά στην ατμόσφαιρα και το περιβάλλον γενικότερα. Απορροφώνται στα σωματίδια του αέρα, στο έδαφος και τα ιζήματα, ενώ έχουν την τάση να συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς (Hyötyläinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Branchi et al., 2003, Cetin et al., 2005, Vonderheide et al., 2008). Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι όταν το BDE-209 (το δεκαβρωμιωμένο μέλος των PBDEs) εκτεθεί είτε σε θερμοκρασίες πάνω από τους 300 °C, είτε σε UV ή ορατή ακτινοβολία ενώ έχει διαλυθεί σε οργανικούς διαλύτες, αποικοδομείται ταχέως, υφίσταται αποβρωμίωση και σχηματίζει παράγωγους PBDEs με μικρότερο μοριακό βάρος (Hyötyläinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008).

Στον Πίνακα 6 που ακολουθεί, παρουσιάζονται κάποιες από τις φυσικοχημικές ιδιότητες κάποιων ομόλογων ομάδων PBDEs.

Πίνακας 6: Φυσικοχημικές ιδιότητες ομόλογων ομάδων PBDEs (Darnerud et al., 2001)

	TetraBDE	PentaBDE	OctaBDE	DecaBDE
Chemical formula	C ₁₂ H ₆ OBr ₄	C ₁₂ H ₅ OBr ₅	C ₁₂ H ₂ OBr ₈	C ₁₂ OBr ₁₀
Molecular mass	485.8	564.8	801.5	959.2
Vapor pressure (Pa)	2.7–3.3 × 10 ⁻⁴ (20°C)	2.9–7.3 × 10 ⁻⁵ (20°C)	1.2–2.7 × 10 ⁻⁷ (20°C)	< 1 × 10 ⁻⁴ (25°C) 670 (306°C)
Melting point (°C)	79–82 (BDE-47)	92 (BDE-99) 97–98 (BDE-100)	~ 200	290–306
Boiling point (°C)	—	> 300°C (decomposition)	—	(Decomposition)
Water solubility (µg/L)	—	0.0009 (20°C)	—	(20–30 ?)
Log K _{ow}	5.9–6.2	6.5–7.0	8.4–8.9	10

—, no information given; ?, unreliable value.

1.4. Οι PBDEs στο Περιβάλλον:

1.4.1. Πηγές εκπομπής PBDEs στο περιβάλλον:

Η ολοένα και αυξανόμενη παραγωγή συνθετικών πολυμερών, μέχρι πρόσφατα είχε αυξήσει και τις ανάγκες στην παραγωγή FRs. Αυτή η αύξηση, σαφώς επηρεάζει και τα επίπεδα των FRs στο περιβάλλον.

Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα επιβραδυντικά BFRs, διαχέονται στο περιβάλλον καταρχήν από τα σημεία εκροών των βιομηχανιών παραγωγής τους, των βιομηχανιών που τα χρησιμοποιούν κατά την παραγωγή συνθετικών πολυμερών, αλλά και των εγκαταστάσεων που πραγματοποιούν ανακύκλωση πολυμερών. Ωστόσο, τα BFRs έχουν τη δυνατότητα να απομακρύνονται αλλά και να αποικοδομούνται από τα υλικά όπου χρησιμοποιούνται, καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, συνήθως στις περιπτώσεις αύξησης της θερμοκρασίας. Οι PBDEs συγκεκριμένα, αναφέραμε ότι ανήκουν στην κατηγορία των προσθετικών BFRs και το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τον σχετικά ασθενή δεσμό C-Br, κάνει ευκολότερη την απομάκρυνσή τους από το εκάστοτε υλικό όπου αυτοί απαντώνται. Για το λόγο αυτό, ο ηλεκτρονικός και ηλεκτρολογικός εξοπλισμός αναμένεται να αποτελούν σημαντικές πηγές εκπομπών (Hyötyläinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, Vonderheide et al., 2008).

Επιπλέον, τα απόβλητα των παραπάνω βιομηχανιών, καθώς και τα βεβαρυμμένα με PBDEs οικιακά απόβλητα, αποτελούν σημαντικές πηγές ρύπανσης του περιβάλλοντος. Τα απόβλητα αυτά, είτε αποτεφρώνονται με καύση, είτε θάβονται σε χώρους υγειονομικής ταφής (ΧΥΤΑ), δημιουργώντας με τον έναν ή τον άλλο τρόπο επιπλέον εστίες μόλυνσης του περιβάλλοντος, αν και δεν υπάρχουν μελέτες που να επιβεβαιώνουν την ύπαρξη PBDEs στους ΧΥΤΑ, ενώ οι σχετικές μελέτες για την απελευθέρωση PBDEs κατά την καύση των απορριμμάτων είναι ελάχιστες (Rahman et al., 2001, Darnerud et al., 2001, Vonderheide et al., 2008). Το μόνο σίγουρο είναι ότι οι PBDEs λόγω των υψηλών συντελεστών προσρόφησης τους σε σωματίδια, εδάφη και ιζήματα, μακροπρόθεσμα θα παραμείνουν στο περιβάλλον.

Τέλος, δεν θα πρέπει να ξεχάσουμε και την απομάκρυνση των PBDEs λόγω πτητικότητας, από τα υλικά όπου αυτοί χρησιμοποιούνται. Αν και όπως αναφέραμε, οι PBDEs ανήκουν στις ημιπτητικές οργανικές ενώσεις (SVOCs), το γεγονός ότι προστίθενται απλά στα υλικά χωρίς να υπάρχει χημική αντίδραση, κάνει ευκολότερη την απομάκρυνσή τους από αυτά μέσω εξάτμισης (Darnerud et al., 2001). Ο ίδιος λόγος κάνει και τις εγκαταστάσεις ανακύκλωσης πλαστικού, ηλεκτρικού και ηλεκτρονικού υλικού, αλλά και τα σημεία μαζικής διάθεσης αποβλήτων, να αποτελούν σημαντικές πηγές ρύπανσης του περιβάλλοντος (Watanabe et al., 2003).

1.4.2. Τύχη των PBDEs στο περιβάλλον:

1.4.2.1. Μεταφορά μέσω της ατμόσφαιρας:

Όπως έγινε αντιληπτό, σημαντικές ποσότητες PBDEs εισέρχονται στην ατμόσφαιρα λόγω εξάτμισης ή καύσης. Έπειτα, λόγω της κίνησής τους, οι αέριες μάζες μεταφέρουν τους PBDEs από τα βιομηχανικά και τα αστικά κέντρα προς τις απομακρυσμένες περιοχές. Καθώς η απόσταση από τα κέντρα αυτά μεγαλώνει, η ευρεία μεταφορά των PBDEs γίνεται και πιο σημαντική. Η ευρείας κλίμακα ατμοσφαιρική μεταφορά (LRAT) των PBDEs, υπολογίζεται με μοντέλα μεταφοράς, με εύρεση του κάθε μέλους της οικογένειας ανά γεωγραφικό πλάτος, αλλά και με εύρεση του κάθε μέλους στο εκάστοτε απομακρυσμένο σημείο. Η LRAT παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην μεταφορά και την κατανομή των PBDEs σε τοπικό αλλά και παγκόσμιο επίπεδο (Wania et al., 2003, Vonderheide et al., 2008).

Βέβαια, η συγκέντρωση των PBDEs στην ατμόσφαιρα μιας απομακρυσμένης περιοχής δεν οφείλεται πάντα σε φαινόμενα μεταφοράς ευρείας κλίμακας. Η πιθανή εξάτμιση PBDEs από κοντινές περιοχές πρέπει να εξεταστεί, ελέγχοντας παράλληλα τις μετεωρολογικές συνθήκες της περιοχής, αλλά και τα επίπεδα ρύπανσης και σωματιδιακού φορτίου της.

Τελικά, η ικανότητα για LRAT των PBDEs μπορούμε να πούμε ότι είναι μεγαλύτερη για τα λιγότερο βρωμιωμένα μέλη τα οποία είναι και πιο πτητικά, ενώ για τα περισσότερο βρωμιωμένα μέλη η ικανότητα αυτή

συνδέεται άμεσα με την απόσταση που μπορούν να διανύσουν στην ατμόσφαιρα τα σωματίδια όπου αυτά είναι συνήθως προσροφημένα, σε συνδυασμό πάντα με τις μετεωρολογικές συνθήκες (Kierkegaard et al., 2009).

1.4.2.2. Εναπόθεση στα αιωρούμενα σωματίδια της ατμόσφαιρας και ξηρή εναπόθεση:

Οι PBDEs στην ατμόσφαιρα βρίσκονται εν μέρει στην αέρια και εν μέρει στη σωματιδιακή φάση, με μια συμπεριφορά ανάλογη των SVOCs. Μάλιστα, τα μέλη με μικρό βαθμό βρωμίωσης ανιχνεύονται κυρίως στην αέρια φάση, ενώ τα μέλη με υψηλό βαθμό βρωμίωσης ανιχνεύονται κυρίως στη σωματιδιακή φάση (Ter Schure et al., 2002, Hassanin et al., 2004). Αναφέραμε όμως ότι η τάση ατμών των PBDEs ελαττώνεται με αύξηση του βαθμού βρωμίωσής τους. Αναλογικά λοιπόν, οι PBDEs με τάση ατμών μεταξύ 10^{-4} και 10^{-8} mm Hg βρίσκονται τόσο στην αέρια όσο και στην σωματιδιακή φάση, οι PBDEs με τιμές μεγαλύτερες των 10^{-4} mm Hg βρίσκονται κυρίως στην αέρια φάση, ενώ οι PBDEs με τιμές μικρότερες των 10^{-8} mm Hg βρίσκονται κυρίως στη σωματιδιακή φάση (Tittlemier et al., 2002, Kierkegaard et al., 2009, Eisenreich et al., 1981, Watanabe et al., 2003).

Βέβαια, δεν πρέπει να ξεχάσουμε ότι εκτός από την τάση ατμών, η αέρια/σωματιδιακή κατανομή των PBDEs επηρεάζεται και από την θερμοκρασία που επικρατεί στην ατμόσφαιρα κάθε περιοχής (Su et al., 2007, Vonderheide et al., 2008, Hassanin et al., 2004). Τέλος, η κατανομή αυτή επηρεάζεται φυσικά και από το είδος, την ποσότητα και το οργανικό περιεχόμενο της σωματιδιακής επιφάνειας, το είδος και την ποσότητα των ατμών και την αντίστασή τους στη μεταφορά μάζας, τη συγκέντρωση του αέρα, καθώς και από τις γενικές μετεωρολογικές συνθήκες (Ter Schure et al., 2002, Eisenreich et al., 1981, Leister et al., 1994).

Όλες αυτές οι παράμετροι, με τη σειρά τους θα επηρεάσουν και την ξηρή εναπόθεση των αερομεταφερόμενων σωματιδίων (στα οποία έχει δεσμευτεί οργανικό φορτίο με τη μορφή αερολύματος) στις επιφάνειες του εδάφους και της θάλασσας, και γενικά τη τύχη των PBDEs στην ατμόσφαιρα.

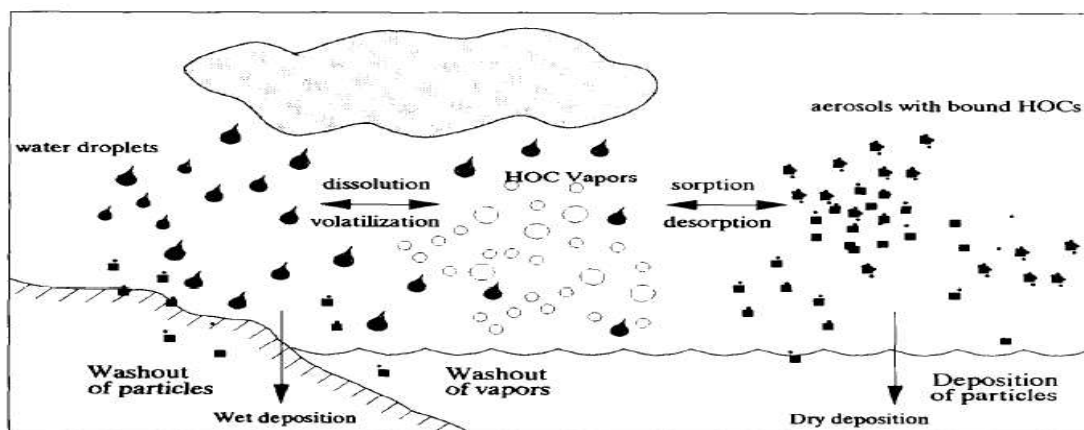
1.4.2.3. Εναπόθεση στις σταγόνες της βροχής και υγρή εναπόθεση:

Στην ατμόσφαιρα, οι SVOCs μπορεί να βρεθούν καταρχήν στην αέρια φάση, έπειτα προσροφημένοι σε σωματίδια (με τη μορφή αερολύματος) και τέλος διαλυμένοι στους υδρατμούς. Στους υδρατμούς, οι SVOCs μπορεί είτε να διαλυθούν απευθείας από την αέρια φάση, είτε να ενσωματωθούν στις σταγόνες μέσω της δέσμευσή τους σε σωματίδια. Οι διαδικασίες αυτές συμβαίνουν είτε κατά το σχηματισμό μιας σταγόνας, είτε κατά τη διάρκεια της πτώσης της. Σε κάθε περίπτωση πάντως, από τα μέλη SVOCs (εδώ PBDEs) που βρίσκονται στην ατμόσφαιρα, εκείνα που έχουν τη μικρότερη σταθερά Henry και διαλύονται ευκολότερα στις υδάτινες μάζες, θα είναι και εκείνα με την ευκολότερη μεταφορά στις σταγόνες της βροχής (Ter Schure et al., 2002, Eisenreich et al., 1981, Leister et al., 1994).

Η σταθερά Henry, μπορεί επίσης να καθορίσει και την κατεύθυνση της ισορροπίας που δημιουργείται, ακόμα και όταν μια σταγόνα έχει να διανύσει λίγα μέτρα. Όμως, η υγρή/αέρια κατανομή επηρεάζεται επίσης από το είδος, την ποσότητα και το μέγεθος των σωματιδίων, το είδος και την ποσότητα των ατμών και την ικανότητα διάχυσής τους στη σταγόνα, αλλά και την αέρια/σωματιδιακή κατανομή. Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει και το μέγεθος της σταγόνας. Χαρακτηριστικά, οι προσροφημένοι σε σωματίδια PBDEs ενσωματώνονται ευκολότερα μέσα σε ένα σύννεφο, παρά κάτω από αυτό (δηλ. μέσα σε μια σταγόνα) (Ter Schure et al., 2002, Eisenreich et al., 1981).

Όπως καταλαβαίνουμε, η διάλυση των αερίων της ατμόσφαιρας που βρίσκονται σε ιχνοποσότητες στους εκεί υδρατμούς, μπορεί να επηρεάσει την κατακόρυφη κατανομή των αερίων αυτών, καθώς και να συνεισφέρει στην μεταφορά τους στις επιφάνειες του εδάφους και της θάλασσας (υγρή εναπόθεση).

Στην Εικόνα 6 που ακολουθεί, παρουσιάζονται σε ένα απλό σχέδιο όλες οι διαδικασίες που περιγράψαμε στις δύο τελευταίες ενότητες και που αφορούν στις διεργασίες εναπόθεσης γενικά των υδρόφοβων οργανικών ρυπαντών (HOCs).



Εικόνα 6: διεργασίες εναπόθεσης των υδρόφοβων οργανικών ρυπαντών (HOCs)

(Leister et al., 1994)

1.4.2.4. Αντίδραση με οξειδωτικές ρίζες της ατμόσφαιρας:

Οι ρίζες υδροξυλίου είναι τα κυριότερα οξειδωτικά της ατμόσφαιρας και όταν αντιδρούν με τους PBDEs (όπως αντιδρούν με τις περισσότερες ενώσεις στην αέρια φάση) παράγονται οι αντίστοιχοι υδρόξυ-PBDEs, αν και το φαινόμενο είναι εντονότερο για τους μόνο- και δι- BDEs. Οι ενώσεις αυτές έχουν βρεθεί στις σταγόνες της βροχής, το χιόνι και τα επιφανειακά ύδατα. Μάλιστα, έχουν ανιχνευτεί και σε θαλάσσιους οργανισμούς (Vonderheide et al., 2008, Ueno et al., 2008, Raff et al., 2006). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ταχύτητα αντίδρασης των PBDEs με τις ρίζες υδροξυλίου μειώνεται με αύξηση του βαθμού βρωμίωσης. Εκτός όμως από τις ρίζες υδροξυλίου, οι PBDEs τόσο στην αέρια όσο και στη σωματιδιακή φάση, αντιδρούν και με άλλες οξειδωτικές ενώσεις που βρίσκονται στην ατμόσφαιρα, όπως οι νιτρικές ρίζες (NO_3) και το όζον (O_3) (Raff et al., 2006).

1.4.2.5. Φωτόλυση/Φωτοδιάσπαση:

Η αναλογία των διαφόρων μελών PBDEs στα τεχνικώς παραγόμενα μείγματα δεν ανταποκρίνεται συνήθως στις ποσότητες αυτών στα διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα, υποδεικνύοντας έτσι κάποια μετατροπή τους στο περιβάλλον, συνήθως φωτολυτική αποβρωμίωση (Hyoëtyläinen et al., 2002).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, όταν το BDE-209 (το δεκαβρωμιωμένο μέλος των PBDEs) εκτεθεί είτε σε UV είτε σε ορατή ακτινοβολία ενώ έχει διαλυθεί σε

οργανικούς διαλύτες, αποικοδομείται ταχέως, υφίσταται αποβρωμίωση και σχηματίζει παράγωγους PBDEs με μικρότερο μοριακό βάρος οι οποίοι έχουν έως έξι άτομα βρωμίου (Hyoëtylaëinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Kierkegaard et al., 2009, Vonderheide et al., 2008). Για παράδειγμα, οι υψηλές συγκεντρώσεις των μελών BDE-47 (ένας τέτρα-BDE) και BDE-99 (ένας πέντα-BDE) που παρατηρούνται στην ατμόσφαιρα, είναι πιθανό να οφείλονται στην φωτολυτική αποβρωμίωση του μέλους BDE-209. Η τάση για φωτολυτική αποβρωμίωση, παρατηρείται επίσης και στους υπόλοιπους PBDEs με μεγάλο μοριακό βάρος (Kierkegaard et al., 2009, Watanabe et al., 2003, Mandalakis et al., 2008).

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές εργαστηριακές μελέτες για τον έλεγχο της φωτοδιάσπασης του BDE-209 σε αρκετές μήτρες, όπως: σε διαλύτη τολουόλιο, σε silica gel, σε άμμο, σε ιζήματα, σε δείγμα εδάφους, σε λυματολάσπη, αλλά και σε σκόνη. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η αποικοδόμηση του μέλους αυτού, καθώς και ο σχηματισμός αλλά και η αποικοδόμηση των μελών με χαμηλότερο μοριακό βάρος, έγιναν άμεσα στο τολουόλιο, ενώ στις υπόλοιπες μήτρες η διαδικασία αυτή ήταν αρκετά αργή. Χαρακτηριστικά, ο χρόνος ημιζωής του BDE-209 όταν αυτό εκτίθεται σε UV ακτινοβολία και είναι διαλυμένο σε τολουόλιο, είναι 15 λεπτά, ενώ ο αντίστοιχος χρόνος του μέλους αυτού όταν η έκθεση της ακτινοβολίας γίνει σε άμμο, είναι 12 ώρες (De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Vonderheide et al., 2008, Watanabe et al., 2003).

Η φωτοδιάσπαση του δέκα-BDE πραγματοποιήθηκε επίσης όσο αυτό ήταν διαλυμένο στο νερό, αλλά σε αυτήν την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός PBDEs χαμηλότερου μοριακού βάρους (Darnerud et al., 2001). Ωστόσο, η φωτοδιάσπαση των PBDEs αναμένεται να είναι σημαντική διαδικασία στα επιφανειακά ύδατα και την ατμόσφαιρα, όπου η ηλιακή ακτινοβολία διαχέεται απεριόριστα. Η αποικοδόμησή τους σε νερό και ατμόσφαιρα μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητά τους στο έδαφος, τα ιζήματα, αλλά και τη λυματολάσπη (Vonderheide et al., 2008).

1.4.2.6. Μικροβιακή αποικοδόμηση:

Όπως αναφέρθηκε, οι PBDEs, και ειδικότερα εκείνοι με μεγαλύτερο μοριακό βάρος, είναι ανθεκτικοί στην βιολογική αποικοδόμηση, αν και τα δεδομένα είναι περιορισμένα. Πράγματι, κανένα προϊόν βιοαποικοδόμησης σε ιζήματα δεν παρατηρήθηκε για το μέλος BDE-209 μετά από τετράμηνη επώαση. Ωστόσο, μέλη χαμηλότερου μοριακού βάρους (με 1, 2 ή 3 άτομα βρωμίου) τα οποία όμως δεν χρησιμοποιούνται ως BFRs, έχει βρεθεί ότι υφίστανται βιοαποικοδόμηση, αν και τα μέλη αυτά δεν χρησιμοποιούνται τελικά ως πηγή άνθρακα από τους μικροοργανισμούς. Γενικότερα, τα μέλη αυτά υπάρχουν στο περιβάλλον ως προϊόντα φωτολυτικής αποικοδόμησης των μελών μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Darnerud et al., 2001).

Πρέπει να αναφερθεί, ότι η μικροβιακή αποικοδόμηση σε συνδυασμό με τη φωτολυτική, είναι εν μέρει υπεύθυνες για την μείωση του φορτίου των PBDEs στα επιφανειακά ύδατα, το οποίο αγγίζει τα επίπεδα των $\mu\text{g/l}$, σε σχέση με τα επίπεδα των $\mu\text{g/l}$ που αντιστοιχούν κανονικά στη διαλυτότητα των PBDEs (Vonderheide et al., 2008).

Επίσης, οι υδρόξυ-PBDEs, ένα δυνατό προϊόν οξείδωσης των PBDEs από τους μικροοργανισμούς (και από τις ρίζες OH της ατμόσφαιρας), έχουν πρόσφατα βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε επιφανειακά ύδατα που είναι κοντά σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Συνεπώς, μπορεί να ειπωθεί ότι ο βαθμός στον οποίο οι PBDEs είναι διαθέσιμοι στα διάφορα τμήματα του περιβάλλοντος, μπορεί να καθορίσει και τον βαθμό της βιολογικής αποικοδόμησης σε κάθε τμήμα, αν και δεν υπάρχουν άμεσες μελέτες για την βιοδιαθεσιμότητα των PBDEs και γενικά για τους POPs. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μάλιστα, είναι δυνατόν οι υδρόξυ-PBDEs να προϋπήρχαν στις ανθρώπινες απεκκρίσεις (Vonderheide et al., 2008, Ueno et al., 2008).

1.4.2.7. Βιομετατροπή σε άλλες τοξικές ενώσεις:

Τόσο η αποτέφρωση των απορριμμάτων (κατά κύριο λόγο), όσο και η φωτοδιάσπαση των PBDEs ενώ είναι διαλυμένοι σε οργανικό διαλύτη,

μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό τόσο πολυβρωμιωμένων διβενζοφουρανίων (PBDFs), όσο και πολυβρωμιωμένων διβενζο-διοξινών (PBDDs), ενώσεις οι οποίες είναι περισσότερο τοξικές και ανθεκτικές στο περιβάλλον από τους αντίστοιχους PBDEs (Rahman et al., 2001, Darnerud et al., 2001, Watanabe et al., 2003, De Boer et al., 2003).

Ο σχηματισμός αυτών των ενώσεων στις περιπτώσεις της αποτέφρωσης των απορριμμάτων, εξαρτάται άμεσα από τις συνθήκες της καύσης. Ωστόσο, σε έναν καλά ελεγχόμενο σύγχρονο καυστήρα, οι εκπομπές των ενώσεων αυτών έτσι και αλλιώς θα είναι αρκετά περιορισμένες (και η καταστροφή των PBDEs θα είναι πλήρης) (Darnerud et al., 2001, De Boer et al., 2003).

Από εκεί και έπειτα, ο σχηματισμός και η εκπομπή αυτών των τοξικών ενώσεων γίνεται και σε άλλες πηγές. Για παράδειγμα, μπορούν να σχηματιστούν τόσο κατά τη σύνθεση των BFRs, όσο και κατά την παρασκευή των πολυμερών όπου τα BFRs απαντώνται. Μπορούν επίσης να σχηματιστούν κατά τη διάρκεια της χρήσης κάποιων προϊόντων και συσκευών που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες (πχ. τηλεοράσεις). Τέλος, μπορούν να σχηματιστούν κατά τη διάρκεια τυχαίων περιστατικών πυρκαγιάς σε εγκαταστάσεις με ηλεκτρονικό και ηλεκτρολογικό εξοπλισμό, αλλά και απλούστερα σε σημεία μαζικής διάθεσης απορριμμάτων (Rahman et al., 2001, Darnerud et al., 2001).

1.4.2.8. Κατάληξη σε υδάτινους αποδέκτες:

Όπως αναφέρθηκε, ένας βασικός τρόπος με τον οποίο οι PBDEs εισέρχονται στο περιβάλλον είναι οι εκροές των βιομηχανιών που τα παρασκευάζουν, καθώς οι εκροές των αντίστοιχων βιομηχανιών συνθετικών πλαστικών. Οι PBDEs όμως έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό και μεγάλη λιποφιλία, με αποτέλεσμα να προσροφώνται άμεσα στις επιφάνειες αιωρούμενων σωματιδίων αλλά και σε οποιοδήποτε μέσο πλούσιο σε οργανικό υλικό, από όπου καταλήγουν στα ιζήματα του εκάστοτε αποδέκτη (λίμνη, ποτάμι, θάλασσα). Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα οι PBDEs να παραμένουν κοντά στα σημεία εκροής τους. Βέβαια, υπάρχει και η

δυνατότητα απορρόφησης στους λιπώδεις ιστούς των έμβιων οργανισμών του κάθε οικοσυστήματος (μέσω στόματος ή δέρματος), αλλά και της μακροσκελούς τους μεταφοράς (εναλλακτικά και μέσω της θαλάσσιας κυκλοφορίας). Από εκεί και έπειτα όμως, όπως έγινε αντιληπτό, η τύχη του κάθε μέλους καθορίζεται από πολλούς παράγοντες όπως: η τάση ατμών και η σταθερά Henry, η φωτολυτική και η βιολογική αποικοδόμηση κ.ά.

1.4.2.9. Προσρόφηση σε ιζήματα, εδάφη και λυματολάσπη:

Έγινε γνωστό ότι οι PBDEs παρουσιάζουν υψηλούς συντελεστές προσρόφησης σε σωματίδια (π.χ. ατμοσφαιρικά και σκόνης), ιζήματα και εδάφη (Hyoëtyläinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Cetin et al., 2005).

Με τον όρο ιζήματα αναφερόμαστε συνήθως στα ιζήματα των υδάτινων αποδεκτών. Σε αυτά προσροφώνται συνήθως οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους PBDEs, με αποτέλεσμα αυτοί τελικά να παραμένουν κοντά στα σημεία εκροής τους. Τα ιζήματα μπορεί να χρησιμοποιηθούν και σαν δείκτης χρόνιας έκθεσης του εκάστοτε αποδέκτη, αφού αν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις PBDEs αυξάνονται όσο λαμβάνονται ιζήματα από μικρότερα βάθη, σημαίνει ότι ο αποδέκτης αυτός βρίσκεται διαρκώς εκτεθειμένος (Rahman et al., 2001, Watanabe et al., 2003).

Έπειτα, είναι πολύ ενδιαφέρον να εξεταστεί η δυνατότητα εύρεσης PBDEs σε δείγματα εδάφους, μιας και η ποιότητα του εδάφους είναι ενδεικτική της μικροβιακής, της φυτικής, της ζωικής, αλλά και μέσω της τροφικής αλυσίδας, της ανθρώπινης έκθεσης κάθε οικοσυστήματος. Επιπλέον, το έδαφος έχει μεγάλη συγγένεια με τις HOCs, λόγω του πολύ αργού ρυθμού αποσύνθεσής τους σε αυτά, και έτσι μπορεί να λειτουργήσει σαν μια φυσική δεξαμενή για αυτούς. Ακόμη και για τις SVOCs, είναι γνωστό ότι ο χρόνος ημιζωής τους στα εδάφη μπορεί να είναι πολύ μεγάλος (από μήνες μέχρι αρκετά χρόνια), τονίζοντας περισσότερο την ανάγκη παρακολούθησης και χαρακτηρισμού τους. Ωστόσο, η κατανομή αυτού του είδους ενώσεων στο έδαφος επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως: η απόσταση από τα

σημεία εκπομπών, η LRAT, αλλά και η μεταφορά τους προς την ατμόσφαιρα, η υγρή και ξηρή εναπόθεση, οι κλιματολογικές συνθήκες, το είδος της βλάστησης και το είδος του εδάφους, η ταφή τους στο έδαφος, αλλά και η πιθανότητα αποσύνθεσής τους (Cai et al., 2008, Hassanin et al., 2004).

Τέλος, δε θα πρέπει να αγνοήσουμε την προσρόφηση των PBDEs στη λυματολάσπη, η οποία προέρχεται από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων και η οποία είναι σημαντική πηγή έκθεσης του περιβάλλοντος σε PBDEs. Η λάσπη αυτή επίσης είναι εμπλουτισμένη με τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους PBDEs και κυρίως με το μέλος BDE-209, ενώ στο εκάστοτε έκλουσμα κυριαρχούν τα περισσότερα υδατοδιαλυτά, μικρότερου μοριακού βάρους PBDEs. Παρόλο που το έκλουσμα αυτό δεν είναι γενικά βεβαρυσμένο σε PBDEs, ο συνολικός όγκος του που καταλήγει στην εκροή είναι υψηλός, με αποτέλεσμα να αποτελεί μια πολύ σημαντική πηγή PBDEs στα επιφανειακά ύδατα (Vonderheide et al., 2008).

1.4.2.10. Βιοσυσσώρευση/Βιομεγέθυνση στους έμβιους οργανισμούς:

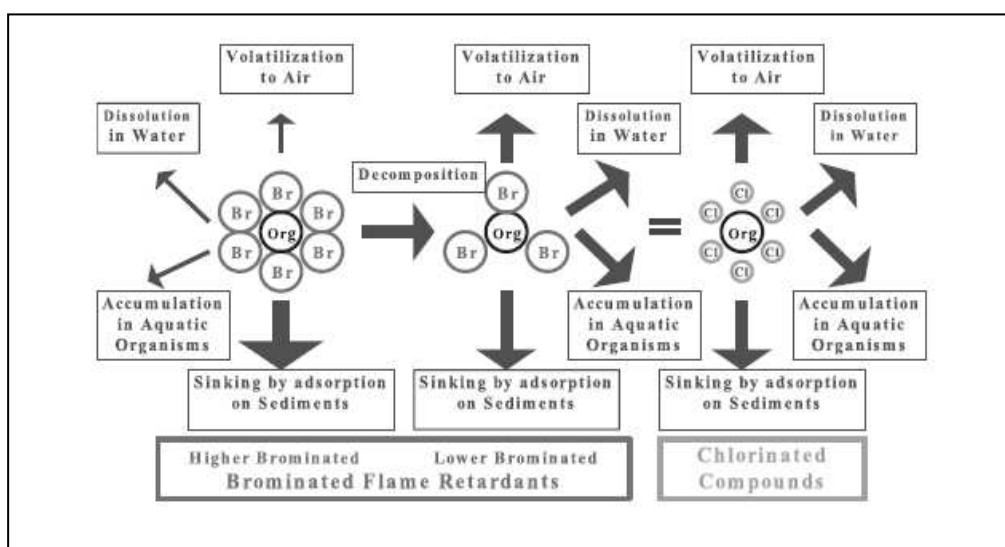
Οι έμβιοι οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να αναδιανέμουν τις συγκεντρώσεις των PBDEs στο περιβάλλον, μέσω της λήψης αυτών από τα αβιοτικά μέσα (βιοσυσσώρευση). Γενικά, το φαινόμενο της βιοσυσσώρευσης είναι εντονότερο στις περισσότερες λιπόφιλες ενώσεις (όπως οι PBDEs), σε σχέση με τις περισσότερες υδρόφιλες, οι οποίες αντίθετα μεταβολίζονται ή αποβάλλονται από το σώμα (Vonderheide et al., 2008). Συγκεκριμένα για τους PBDEs, τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι τα περισσότερα βρωμιωμένα μέλη (με τουλάχιστον επτά άτομα βρωμίου) δε βιοσυσσώρευονται σε σημαντικό βαθμό, εξαιτίας της χαμηλής λήψης τους από τους οργανισμούς. Επίσης, οι τέτρα- και πέντα-BDEs βιοσυσσωρεύονται περίπου στον ίδιο βαθμό, ακολουθούν οι τρι-BDEs, ενώ οι έξα-BDEs βιοσυσσωρεύονται πολύ λιγότερο (De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001).

Η αναδιανομή των PBDEs στο περιβάλλον μπορεί να πραγματοποιηθεί σε περιφερειακή αλλά και σε παγκόσμια κλίμακα, εξαιτίας της μετανάστευσης και της διασποράς των ειδών, κυρίως των ψαριών και των

πουλιών. Επίσης, σημαντική αναδιανομή σε μικρότερη κλίμακα μπορεί να συμβεί όταν ένας οργανισμός μετακινείται από ένα μέρος του οικοσυστήματος σε ένα άλλο (Vonderheide et al., 2008).

Παρόλο που οι συγκεντρώσεις των PBDEs που μεταφέρονται στο περιβάλλον μέσω των έμβιων οργανισμών είναι μικρότερες σε σχέση με τις συγκεντρώσεις που μεταφέρονται φυσικά στον αέρα και τους υδάτινους αποδέκτες, είναι σημαντικότερες για την έκθεση του (ήδη εκτεθειμένου) ανθρώπου σε αυτούς, μέσω της τροφικής αλυσίδας (βιομεγέθυνση). Ωστόσο, οι αναλύσεις με σκοπό την εύρεση των επιπέδων των PBDEs σε αβιοτικά μέσα και τη συσχέτιση με τα επίπεδά τους στους έμβιους οργανισμούς των οικοσυστημάτων, είναι ελάχιστες. Αυτό οφείλεται στο ότι δεν υπάρχουν οι παράγοντες βιοσυσώρευσης των PBDEs στα διάφορα είδη στις διάφορες τοποθεσίες, παράγοντες οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την κατασκευή μοντέλων για την μεταφορά και γενικά για την τύχη των PBDEs στο περιβάλλον (Vonderheide et al., 2008).

Στην Εικόνα 7 που ακολουθεί, παρουσιάζεται σε ένα γενικό σχήμα η περιβαλλοντική τύχη των BFRs κατά βάση, με σκοπό την σύνοψη των διαδικασιών που κατά κύριο λόγο μπορούν να πραγματοποιηθούν κατά την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον.



Εικόνα 7: Περιβαλλοντική τύχη των BFRs (συνοπτικά) (Watanabe et al., 2003)

1.4.3. Επίπεδα των PBDEs στο περιβάλλον:

1.4.3.1. Αέρας/Σκόνη:

α. Επίπεδα σε εξωτερικούς χώρους:

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα, προσδιόρισε τα επίπεδα των PBDEs σε αέρια και σωματιδιακή φάση στο κέντρο μιας αστικής περιοχής (Αθήνα) και σε προάστια μιας ημιαστικής περιοχής (Ηράκλειο).

Από την Αθήνα συλλέχθηκαν δύο δείγματα, ενώ από το Ηράκλειο έξι. Η συνολική συγκέντρωση των PBDEs σε αέρια και σωματιδιακή φάση βρέθηκε στην περιοχή των 21-30 pg/m^3 στην Αθήνα, ενώ η αντίστοιχη τιμή στο Ηράκλειο ήταν στην περιοχή των 4-44 pg/m^3 , δίνοντας έναν συνολικό μέσο όρο $15 \pm 15 \text{ pg}/\text{m}^3$. Βέβαια, η κατανομή μεταξύ αέριας και σωματιδιακής φάσης διέφερε σημαντικά στις δύο περιοχές. Στην Αθήνα, οι PBDEs βρέθηκαν κυρίως στη σωματιδιακή φάση σε ποσοστό 71-76%, ενώ στο Ηράκλειο βρέθηκαν κυρίως στην αέρια φάση σε ποσοστό 69-92%. Χαρακτηριστικά, οι συγκεντρώσεις των PBDEs στη σωματιδιακή φάση στο Ηράκλειο βρέθηκαν στην περιοχή των 1-4 pg/m^3 , ενώ οι αντίστοιχες τιμές στην Αθήνα ήταν 15 και 23 pg/m^3 . Αυτή η διαφορά λογικά οφείλεται στα σημαντικώς υψηλότερα επίπεδα αιωρούμενων σωματιδίων, καθώς και στις σημαντικώς χαμηλότερες ατμοσφαιρικές θερμοκρασίες που υπήρξαν κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών στην Αθήνα (Mandalakis et al., 2009, Μπέσης, 2008). Εξάλλου, έχει αναφερθεί η σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας που επικρατεί στην ατμόσφαιρα κάθε περιοχής, στην αέρια/σωματιδιακή κατανομή των PBDEs (Su et al., 2007, Vonderheide et al., 2008).

Έπειτα, προκειμένου να γίνει μια σύγκριση με άλλες μελέτες, υπολογίστηκε το άθροισμα των έξι πιο συχνά απαντώμενων και με αξιοπιστία προσδιορισμών PBDEs, δηλαδή των: BDE-28, -47, -99, -100, -153 και -154. Έτσι, βρέθηκε ότι η τιμή που αντιστοιχεί στο άθροισμα Σ_6 PBDEs των παραπάνω μελών, κυμαινόταν από 3 έως 41 pg/m^3 για τα ληφθέντα ελλαδικά δείγματα (Mandalakis et al., 2009, Μπέσης, 2008). Οι τιμές αυτές είναι γενικά σε συμφωνία με τα επίπεδα των PBDEs στο ατμοσφαιρικό

περιβάλλον σε άλλες αστικές και βιομηχανικές χώρες ανά τον κόσμο. Για παράδειγμα, η τιμή αυτή στο Ηνωμένο Βασίλειο βρέθηκε 10-33 pg/m^3 (Harrad et al., 2004), στην Ιαπωνία 1.5-52 pg/m^3 (Hayakawa et al., 2004), στη Τουρκία 4.5-64 pg/m^3 (Cetin and Odabasi, 2008) και στον Καναδά 39-48 pg/m^3 (Shoeib et al., 2004). Ωστόσο, η αντίστοιχη τιμή στις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν σχετικά υψηλότερη, αφού βρέθηκε στην περιοχή των 34-77 pg/m^3 (Strandberg et al., 2001).

Ένα επίσης σημαντικό συμπέρασμα από αυτή τη μελέτη, ήταν το ότι από τα διάφορα μέλη PBDEs, στον ατμοσφαιρικό αέρα κυριαρχούν τα εξής τρία: BDE-47, -99 και -100. Τα μέλη αυτά βρέθηκαν και στα οκτώ συλλεχθέντα δείγματα και ήταν υπεύθυνα για το 67-87% της συνολικά απαντώμενης ποσότητας PBDEs στην ατμόσφαιρα. Η μέση τιμή της συνολικής ποσότητας (σε άερια και σωματιδιακή φάση) των μελών αυτών στην ατμόσφαιρα βρέθηκε 8, 5 και 1 pg/m^3 αντίστοιχα. Ανάλογα αποτελέσματα έδειξε ακόμα μια μελέτη από την ίδια ομάδα επιστημόνων, με βάση την οποία τα μέλη αυτά κυριάρχησαν σε εννέα ελλαδικά δείγματα ατμοσφαιρικού αέρα (όπου ο γεωμετρικός μέσος του αθροίσματος των PBDEs βρέθηκε ίσος με 18 pg/m^3). (Mandalakis et al., 2008, Mandalakis et al., 2009, Μπέσης, 2008). Παλιότερα αποτελέσματα, έχουν δείξει επίσης ότι τα τρία αυτά μέλη είναι τα επικρατέστερα μέλη PBDEs στην ατμόσφαιρα της Σουηδίας (Kierkegaard et al., 1999b) και του Ηνωμένου Βασιλείου (Peters et al., 1999b), ενώ τα μέλη BDE-47 και BDE-99 είναι τα επικρατέστερα μέλη PBDEs στην ατμόσφαιρα της Αρκτικής (Alaee et al., 1999) και των Ηνωμένων Πολιτειών (Dodder et al., 2000).

Το γεγονός αυτό, αποτελεί στοιχείο επιβεβαίωσης της φωτολυτικής αποβρωμίωσης των υψηλά βρωμιωμένων μελών PBDEs, αλλά και της οξειδωσης των χαμηλά βρωμιωμένων μελών από τις ρίζες υδροξυλίου. Για το λόγο αυτό, τα ενδιάμεσα βρωμιωμένα μέλη PBDEs (με τέσσερα και πέντε άτομα βρωμίου) κυριαρχούν στην ατμόσφαιρα, αποδεικνύοντας παράλληλα και τη μεγάλη χρήση του πέντα-BDE μείγματος, όπου αυτά απαντώνται

(Kierkegaard et al., 2009, Mandalakis et al., 2008, Mandalakis et al., 2009, Μπέσης, 2008).

Ένα ακόμη ενδιαφέρον συμπέρασμα της ελληνικής μελέτης στην οποία βασιζόμαστε, ήταν ότι οι PBDEs κατανέμονται διαφορετικά στα σωματίδια διαφορετικών μεγεθών. Συγκεκριμένα, σε όλα τα δείγματα, πάνω από το 46% της συνολικής ποσότητας των PBDEs, βρέθηκε ότι ήταν προσροφημένη στα σωματίδια μεγέθους χαμηλότερου των 0.57mm. Μάλιστα, κάποια από τα πιο πτητικά PBDEs (όπως τα BDE-15 και BDE-17) βρίσκονταν προσροφημένα στα σωματίδια μεγέθους μεγαλύτερου των 0.57mm, ενώ τα βαρύτερα και λιγότερο πτητικά μέλη βρίσκονταν προσροφημένα στα μικρότερα σωματίδια. Εξαιτίας αυτής της κατανομής, οι PBDEs αναμένεται να έχουν μεγάλους χρόνους παραμονής στην ατμόσφαιρα και μεγάλη πιθανότητα για LRAT. Το πιο σημαντικό όμως είναι, ότι λόγω της προσρόφησής τους στα μικρότερα σωματίδια, οι PBDEs έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται και να συσσωρεύονται στα βαθύτερα τμήματα του αναπνευστικού μας συστήματος (Mandalakis et al., 2009, Μπέσης, 2008).

β. Επίπεδα σε εσωτερικούς χώρους:

Αν και οι μελέτες που υπάρχουν για την εύρεση των επιπέδων των PBDEs σε εσωτερικούς χώρους είναι περιορισμένες, είναι αρκετές για να δείξουν τη σπουδαιότητα που έχει η εξάτμιση των PBDEs κυρίως από τις ηλεκτρικές και τις ηλεκτρονικές συσκευές, στα πλαστικά των οποίων αυτοί προστίθενται και οι οποίες λειτουργούν σε υψηλές θερμοκρασίες.

Μελέτη που διεξάγει στην Ελλάδα για τον προσδιορισμό των επιπέδων των PBDEs στην αέρια φάση, σε διάφορους επαγγελματικούς και οικιακούς χώρους, έδειξε καταρχήν ότι οι συγκεντρώσεις τους βρίσκονταν στην περιοχή των 3 έως 10.848 pgr/m³. Μάλιστα, ο γεωμετρικός μέσος του αθροίσματος των PBDEs σε γραφεία δημόσιου κτιρίου ήταν 205 pgr/m³ (n=5 δείγματα), σε χώρους που βρίσκονται ηλεκτρονικοί υπολογιστές και σε internet cafes η τιμή αυτή βρέθηκε ίση με 127 pgr/m³ (n=7), ενώ η τιμή αυτή σε καταστήματα πώλησης ηλεκτρονικών υπολογιστών και ηλεκτρικών ειδών βρέθηκε ίση με 85

pggr/m³ (n=5) . Οι τιμές αυτές ήταν 7-17 φορές υψηλότερες συγκριτικά με την τιμή των 12 pggr/m³ που βρέθηκε σε δύο δείγματα από καταστήματα πώλησης επίπλων. Τέλος, η τιμή αυτή βρέθηκε ίση με 8 pggr/m³ σε δείγματα πέντε ελληνικών σπιτιών και ίση με 3 pggr/m³ σε ένα δείγμα χημικού εργαστηρίου (Mandalakis et al., 2008).

Τα υψηλά επίπεδα των PBDEs στις τρεις πρώτες κατηγορίες επαγγελματικών χώρων, είναι σαφές ότι προκύπτουν εξαιτίας της παρουσίας και/ή της χρήσης ηλεκτρονικών συσκευών (υπολογιστών, τηλεοράσεων κ.ά.) σε αυτούς. Όμως, δε βρέθηκε μια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων αυτών και του αριθμού των συσκευών, όπως επίσης δε βρέθηκε και η συσχέτισή τους με τις συνθήκες εξαερισμού (φυσικού ή μη) των χώρων δειγματοληψίας. Ωστόσο, μπορεί να ειπωθεί ότι η παραγωγή θερμότητας κατά τη διάρκεια της αυξημένης λειτουργίας των ηλεκτρονικών συσκευών στις δύο πρώτες κατηγορίες επαγγελματικών χώρων, σε σχέση με την περιορισμένη λειτουργία τους στη τρίτη κατηγορία, επηρεάζει σημαντικά τις εκπομπές των PBDEs. Η υπόθεση αυτή, μπορεί να υποστηριχτεί επιπλέον βάσει της τεράστιας τιμής για τον γεωμετρικό μέσο του αθροίσματος των PBDEs που βρέθηκε σε ένα γραφείο που ρύθμιζε τις δημόσιες παροχές δικτύου και τηλεπικοινωνιών και η οποία ήταν ίση με 10.848 pggr/m³ (Mandalakis et al., 2008).

Έπειτα, προκειμένου να γίνει πάλι μια σύγκριση με άλλες μελέτες, υπολογίστηκε το άθροισμα των έξι πιο συχνά απαντώμενων και με αξιοπιστία προσδιορισίμων PBDEs. Έτσι, βρέθηκε ότι η τιμή που αντιστοιχεί στο άθροισμα Σ₆PBDEs κυμαινόταν από 47 έως 97 pggr/m³ για τις τρεις πρώτες κατηγορίες επαγγελματικών χώρων, τιμές που ήταν για παράδειγμα 1.7-3.5 φορές χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές στο Ηνωμένο Βασίλειο. Επίσης, η αντίστοιχη τιμή στους οικιακούς χώρους βρέθηκε ίση με 7 pggr/m³, τιμή επίσης 1-2 τάξεις μεγέθους χαμηλότερη από την αντίστοιχη τιμή σε άλλες χώρες της Βόρειας Ευρώπης αλλά και τις Ηνωμένες Πολιτείες (Mandalakis et al., 2008).

Η διαφοροποίηση αυτή, ειδικά σε ότι αφορά τα οικιακά επίπεδα των PBDEs, μπορεί να ερμηνευτεί ποικιλοτρόπως. Καταρχήν, μπορεί να ειπωθεί ότι τα υλικά και οι συσκευές που περιέχουν PBDEs, είναι περιορισμένα στις ελληνικές κατοικίες. Εναλλακτικά, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο φυσικός εξαερισμός στην Ελλάδα είναι εφικτός λόγω των καλύτερων κλιματικών συνθηκών, σε σχέση με τις χώρες με τις οποίες γίνεται η σύγκριση. Αυτό σημαίνει, ότι το άνοιγμα ενός παραθύρου το οποίο είναι δυνατόν να απομακρύνει ρυπαντές που βρίσκονται στο εσωτερικό ενός χώρου, είναι πιθανότερο φαινόμενο στην Ελλάδα (Mandalakis et al., 2008). Τέλος, πρέπει να συνοπologίσουμε ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες ο κάθε καταναλωτής είναι υπεύθυνος για το 95, το 40 και το 45%, της συνολικής κατανάλωσης του πέντα-, του όκτα- και του δέκα-BDE μείγματος αντίστοιχα (Hwang et al., 2008).

Βέβαια, δε θα πρέπει να αμελήσουμε και την προσρόφηση των PBDEs στα σωματίδια σκόνης που βρίσκονται στους εσωτερικούς χώρους τα οποία αποτελούν εξίσου, αν όχι περισσότερο, σημαντική πηγή έκθεσης του ανθρώπου στους PBDEs. Μελέτη που διεξάγει στη Σουηδία, έδειξε ότι τα πιο άφθονα μέλη PBDEs σε δείγματα σκόνης που λήφθηκαν από πέντε νοικοκυριά, ήταν τα μέλη BDE-47, -99 και -209, με μέσες συγκεντρώσεις 51, 79 και 470 ngr/gr αντίστοιχα. Το μέλος BDE-209 μάλιστα, αποτελούσε το 62% της συνολικής ποσότητας των PBDEs στην ατμόσφαιρα των νοικοκυριών. Συγκρινόμενες με άλλες μελέτες, οι τιμές αυτές ήταν έξι φορές χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στη Γερμανία, ενώ ήταν 2-100 φορές χαμηλότερες (ανάλογα το μέλος) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στη Βόρεια Αμερική. Ωστόσο, το μέλος BDE-209 έδειξε τη μικρότερη διαφορά στη συγκέντρωση μεταξύ Σουηδίας και Βόρειας Αμερικής (μάλλον λόγω της μικρής διαφοράς στην παραγωγή του δέκα-BDE μείγματος μεταξύ Ευρώπης και Β. Αμερικής), ενώ τα μέλη BDE-153 και BDE-154 έδειξαν τη μεγαλύτερη διαφορά (Karlsson et al., 2007).

Στην μελέτη αυτή, υπάρχουν επίσης δεδομένα και για τα επίπεδα των PBDEs στην αέρια φάση. Βρέθηκε ότι τα πιο άφθονα μέλη ήταν τα μέλη BDE-28 και BDE-47, με μέσες συγκεντρώσεις 14.8 και 124 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ αντίστοιχα. Τα μέλη BDE-99 και BDE-100 δε βρέθηκαν πάνω από τα όρια ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης μεθόδου (σε αντίθεση με την ποσοτικοποίηση τους στα δείγματα σκόνης), τα οποία ήταν 158 και 38.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ αντίστοιχα. Το ίδιο ακριβώς συνέβη και με τα μέλη BDE-153 και BDE-154, αλλά και με τα υπόλοιπα μέλη προς ανάλυση στη συγκεκριμένη εργασία. Αυτό πιθανώς να οφείλεται και στη μεγαλύτερη πτητικότητα του BDE-28 (ενός τρι-BDE) και συνεπώς τη μικρότερη ικανότητα προσρόφησης του στα σωματίδια σκόνης. Βέβαια, στη συγκεκριμένη μελέτη δε δόθηκε κάποιο ιστορικό καθαριότητας των σπιτιών όπου έγιναν οι δειγματοληψίες. Αυτό θα ήταν σχετικά χρήσιμο, διότι σε μια σκόνη που υπάρχει για καιρό στο χώρο, έχει προλάβει να αποκατασταθεί η κατανομή αέριας/σωματιδιακής φάσης, με αποτέλεσμα να έχουν απομακρυνθεί από αυτήν τα πιο πτητικά μέλη, πράγμα που δε συμβαίνει σε μια καινούργια σκόνη (Karlsson et al., 2007).

Τέλος, είναι σημαντικό να τονιστεί η ανάγκη διεξαγωγής περισσότερων ερευνών για τον προσδιορισμό γενικά των POPs σε εσωτερικούς χώρους. Δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι πάνω από το 80% της ζωής μας βρισκόμαστε σε εσωτερικούς χώρους (σπιτιού, εργασίας, μεταφορικών μέσων) και το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με αμφίβολο εξαερισμό, μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα έκθεσής μας σε αυτούς τους ρυπαντές κατά έναν παράγοντα 1000, σε σχέση με την εξωτερική μας έκθεση (Mandalakis et al., 2008, Hwang et al., 2008).

1.4.3.2. Υδάτινοι αποδέκτες/ιζήματα:

Κατά τη διάρκεια πειραμάτων που έγιναν στην Ιαπωνία το 1977 και την περίοδο 1987-1989, συλλέχθηκαν περισσότερα από 200 δείγματα από ποτάμια, τις εκβολές τους, αλλά και από τη θάλασσα. Σε κανένα δείγμα δε βρέθηκαν έξα-, όκτα- και δέκα-BDEs, με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονταν 0.04-2.5 $\mu\text{g}/\text{lt}$. Αυτό ίσως να οφειλόταν στη μικρή διαλυτότητα των μελών

αυτών. Ωστόσο, τέτρα-, πέντα-, έξα-, όκτα- και δέκα-BDEs βρέθηκαν στα αντίστοιχα ιζήματα. Μάλιστα, το μέλος BDE-209 βρέθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι οποίες κυμαίνονταν στην περιοχή των 25-11.600 ngr/gr ξηρού βάρους, σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των υπολοίπων μελών οι οποίες κυμαίνονταν κάτω από το όριο ανίχνευσης έως τα 70 ngr/gr ξηρού βάρους. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις γενικά βρέθηκαν κοντά σε βιομηχανικές περιοχές (De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Watanabe et al., 2003).

Λίγο αργότερα, δείγμα από το ανώτερο στρώμα του ιζήματος της νότιας Βαλτικής θάλασσας στη Βόρεια Ευρώπη, συλλέχθηκε για τον προσδιορισμό των μελών BDE-47, -99 και -100 (Nylund et al., 1992). Το δείγμα αυτό, περιείχε συνολικά για τα τρία αυτά μέλη, 0.52 ngr/gr ξηρού βάρους (με 2.9 ngr/gr απώλεια βάρους). Μάλιστα, βρέθηκε ότι στα 5mm βάθους τα δύο πρώτα μέλη ήταν στα επίπεδα των 1.6 και 1.1 ngr/gr (απώλειας βάρους) αντίστοιχα. Κάτω από τα 40mm, η αντίστοιχη ποσότητα του BDE-47 ήταν 0.1 ngr/gr, ενώ του BDE-99 ήταν κοντά στο όριο ανίχνευσης. Όπως αναφέραμε, το γεγονός αυτό υποδεικνύει την χρόνια έκθεση του σημείου (Rahman et al., 2001, De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001).

Επίσης, για τις ανάγκες μιας άλλης Σουηδικής μελέτης, συλλέχθηκαν δείγματα από ιζήματα ενός ποταμού στην πορεία, αλλά και αντίθετα στην πορεία του ρεύματός του. Ο ποταμός αυτός αποτελούσε την εκροή ενός εργοστασίου που κατασκεύαζε πυροπροστατευτικά υφάσματα (Sellström, 1996, 1999). Τα μέλη PBDEs που προσδιορίστηκαν, είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στην πορεία του ρεύματος του ποταμού, υποδεικνύοντας ότι πράγματι το εργοστάσιο αυτό αποτελούσε τη βασική πηγή εκπομπών τους. Όσον αφορά πάλι τα τρία μέλη που συναντάμε περισσότερο στις διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες, βρέθηκε ότι η συνολική συγκέντρωσή τους στα ιζήματα κυμαινόταν κάτω από το όριο ανίχνευσης έως τα 120 ngr/gr απώλειας βάρους. Επίσης, η αντίστοιχη τιμή για το μέλος BDE-209 (το οποίο είναι το πιο άφθονο μέλος στα ιζήματα) παρουσίασε μέγιστο στα 12.000 ngr/gr. Πρέπει να αναφερθεί, ότι όλα τα μέλη που προσδιορίστηκαν

παρουσίασαν το μέγιστο της συγκέντρωσής τους στο ίδιο δειγματοληπτικό σημείο (De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Watanabe et al., 2003).

Γενικότερα, η ανάλυση ιζημάτων από μεγάλο αριθμό εκβολών ποταμών της Ευρώπης, έδειξε ότι οι υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων για το μέλος BDE-209 εμφανίστηκαν στους ποταμούς Mersey του Ηνωμένου Βασιλείου (αγγίζοντας τα 1.700 ngr/gr ξηρού βάρους) και Schelde του Βελγίου (αγγίζοντας τα 200 ngr/gr ξηρού βάρους). Επίσης, από την ίδια έρευνα προέκυψε ότι οι υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων για τα μέλη BDE-47 και BDE-99 εμφανίστηκαν στους ποταμούς Mersey και Humber του Ηνωμένου Βασιλείου, αλλά και σε άλλους δύο ποταμούς της Ολλανδίας, δίνοντας συνολικές συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν στα 1.6-13.1 ngr/gr ξηρού βάρους (De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Watanabe et al., 2003).

Όσο αφορά τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των PBDEs στα επιφανειακά ύδατα, στη λίμνη Οντάριο της Βόρειας Αμερικής κυμαίνονταν στα 4-13 pgr/lit το 1999. Μάλιστα, τα μέλη BDE-47 και BDE-99 αποτελούσαν πάνω από το 90% των PBDEs στη διαλυτή φάση (Luckey et al., 2001). Στην Ευρώπη, τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των μελών BDE-47, -99 και -153 στα παραλιακά ύδατα της Ολλανδίας επίσης το 1999, βρέθηκαν στα 1.0, 0.5 και 0.1 pgr/lit αντίστοιχα. Επίσης, σε αυτά τα ύδατα βρέθηκε και το μέλος BDE-209 σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν στα 0.1-4.0 pgr/lit (Booij et al., 2000). Οι υψηλότερες τιμές στη Β. Αμερική, αποδεικνύουν ακόμα μια φορά την μεγαλύτερη χρήση των BFRs στην περιοχή.

Συνεπώς, η διαρκής έκθεση των υδάτινων αποδεκτών στους PBDEs αποδεικνύεται και από την αυξημένη ποσότητά τους στη διαλυτή φάση (αν και οι ενώσεις αυτές έχουν μικρή υδατοδιαλυτότητα), καθώς και από την μεγαλύτερη ποσότητά τους στα ανώτερα στρώματα των ιζημάτων σε σχέση με τα κατώτερα στρώματα. Σε κάθε περίπτωση βέβαια, τα επίπεδα αυτά είναι πάντοτε μεγαλύτερα όταν αναφερόμαστε σε εκροές βιομηχανικών περιοχών, παρά σε απομακρυσμένες περιοχές.

Επιπλέον, στα ιζήματα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις PBDEs ανήκουν σχεδόν πάντα στο μέλος BDE-209, αν και δεν εστιάζουν πάντα σε αυτό όλες οι μελέτες. Έπειτα, ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των μελών BDE-47 και BDE-99 και τέλος οι συγκεντρώσεις των μελών BDE-100, -153 και -183. Τέλος, λόγω των μη ταυτόχρονα υψηλών συγκεντρώσεων των μελών BDE-209, -99 και -47 στα ιζήματα, υπάρχει αρκετή αμφιβολία για το κατά πόσο τα δύο τελευταία μπορούν να προέρχονται από το πρώτο στους υδάτινους αποδέκτες, ή αν προέρχονται μόνο από άλλες πηγές. Βέβαια, πρέπει να συνυπολογιστεί ότι αυτά τα δύο μέλη έχουν μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα από το μέλος BDE-209 (Watanabe et al., 2003).

1.4.3.3. Εδάφη/Λυματολόαση:

Καταρχήν, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικές με τον προσδιορισμό SVOCs σε εδάφη, πόσο μάλλον για PBDEs.

Ωστόσο, για τους σκοπούς μιας ευρωπαϊκής μελέτης, λήφθηκαν δείγματα εδάφους από δασικές και καλλιεργημένες περιοχές από Νορβηγία και Ηνωμένο Βασίλειο. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν δείγματα από 16 καλλιεργημένες και από 17 δασικές τοποθεσίες του Ηνωμένου Βασιλείου, καθώς και δείγματα από 21 δασικές τοποθεσίες της Νορβηγίας. Οι συνολικές συγκεντρώσεις για όλα τα μέλη PBDEs που προσδιορίστηκαν στις περιοχές αυτές, βρέθηκαν στην περιοχή των 65-12000 ngr/kg ξηρού βάρους. Σε όλες τις περιοχές μάλλον, τα μέλη PBDEs που επικράτησαν σε ποσοστό πάνω από το 65% του συνόλου, ήταν τα BDE-47, -99, -100, -153 και -154 (Hassanin et al., 2004).

Επίσης, παρόλο που υπάρχει διαφορά στην έκταση της χρήσης των BFRs στις χώρες αυτές, διαφορά στον πληθυσμό τους και διαφορά της αστικής τους μόλυνσης, οι συγκεντρώσεις των PBDEs στις δασικές εκτάσεις των δύο χωρών βρέθηκαν περίπου στα ίδια επίπεδα. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις του συνόλου των PBDEs στις δασικές εκτάσεις του Ηνωμένου Βασιλείου και της Νορβηγίας, παρουσίασαν μια μέση τιμή στα 2500 και 970 ngr/kg ξηρού βάρους, αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι η αναλογία των

διαφόρων μελών βρέθηκε περίπου η ίδια με αυτή σε ένα εμπορικό πέντα-BDE μείγμα, οδηγούν σ' ένα χρήσιμο συμπέρασμα: Η μεταφορά των μελών αυτών από την πηγή τους, στην ατμόσφαιρα και τελικά στο έδαφος, πραγματοποιείται με παρόμοια απόδοση σε διάφορες αποστάσεις, πιθανώς διότι οι PBDEs υφίστανται ελάχιστη μετατροπή ή αποσύνθεση κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους, αλλά και της διαμονής τους στο έδαφος (Hassanin et al., 2004).

Μεταξύ των συμπερασμάτων της συγκεκριμένης μελέτης, ήταν και το ότι οι συγκεντρώσεις των PBDEs είναι υψηλότερες στις δασικές περιοχές απ' ό,τι στις καλλιεργημένες εκτάσεις, δείχνοντας μια άμεση εξάρτηση από την ποσότητα της οργανικής ύλης του εδάφους (SOM). Επίσης, οι κλίσεις των καμπυλών όπου γίνεται απεικόνιση της συγκέντρωσης του κάθε μέλους ως την ποσότητα της SOM του κάθε εδάφους, απέδειξαν ότι τα λιγότερο βρωμιωμένα μέλη υφίστανται κάποιου είδους ανταλλαγή μεταξύ ατμόσφαιρας και επιφάνειας (αφού παρουσιάζουν μεγάλη κλίση), ενώ τα περισσότερα βρωμιωμένα μέλη έχουν την τάση να παραμένουν στο έδαφος (αφού παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική κλίση). Τέλος, από δείγματα που λήφθηκαν στην περιοχή των 5-12 cm κάτω από την επιφάνεια, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των PBDEs στην περιοχή αυτή ήταν μικρότερη της επιφανειακής, αποδεικνύοντας ένα διαρκώς εκτεθειμένο περιβάλλον. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση η αναλογία των διαφόρων μελών στα δύο αυτά στρώματα παραμένει σταθερή, αποδεικνύοντας για ακόμη μια φορά ότι οι PBDEs αποσυντίθεται ελάχιστα στο έδαφος (Hassanin et al., 2004).

Έπειτα, σε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετική με τις SVOCs, αναφέρεται ότι οι σχετικές μελέτες για τον προσδιορισμό των PBDEs σε εδάφη της Κίνας είναι περιορισμένες, αφού το ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό τους στην περιοχή ξεκίνησε τη δεκαετία του 1990. Μάλιστα, οι μελέτες που έχουν γίνει για τον χαρακτηρισμό τους στα εδάφη της χώρας, εστιάστηκαν σε περιοχές εκροών ηλεκτρονικών αποβλήτων. Σε αυτές τις μελέτες εξετάστηκε αρχικά η ύπαρξη 43^{ων}, μόνο- έως έπτα-, βρωμιωμένων μελών. Οι

συγκεντρώσεις για το κάθε μέλος κυμάνθηκαν στην περιοχή κάτω από το όριο ανίχνευσης έως τα 1270 ngr/gr, ενώ οι συνολικές συγκεντρώσεις των PBDEs κυμάνθηκαν στην περιοχή των 2.0-4250 ngr/gr (Cai et al., 2008).

Στα εδάφη αυτά, με βάση τα 43 επιλεγμένα μέλη, βρέθηκε ότι τα επικρατέστερα μέλη ήταν τα: BDE-47, -66, -71, -99, -100, -138, -139, -153, -154 και -183. Μάλιστα τα μέλη BDE-47 και -99 κατείχαν το μεγαλύτερο ποσοστό, ενώ ακολούθησαν τα μέλη BDE-139, -153 και -154 (Wang et al., 2005b, Cai and Jiang, 2006). Άλλη μελέτη, η οποία συμπεριέλαβε και το μέλος BDE-209, κατέληξε ότι το μέλος αυτό ήταν το επικρατέστερο και μάλιστα κατείχε το 35-82% της συνολικής ποσότητας των PBDEs, αποδεικνύοντας παράλληλα την μεγάλη χρήση του στην αγορά της χώρας (Leung et al., 2007). Σε κάθε περίπτωση πάντως, βρέθηκε ότι οι συνολικές συγκεντρώσεις των PBDEs όσον αφορά στην κατανομή τους στα διάφορα εδάφη, αυξάνονται κατά τη σειρά: απομακρυσμένη περιοχή < χωράφι ρυζιού < περιοχή κοντά σε σημείο καύσης απορριμμάτων < σημείο εκροής αποβλήτων εργοστασίου εκτυπωτών < σημείο καύσης απορριμμάτων. Τα επίπεδα των PBDEs στα δύο πρώτα σημεία είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα Ευρωπαϊκά επίπεδα, ενώ είναι υψηλότερα στις υπόλοιπες τοποθεσίες (Cai et al., 2008).

Σε αντίθεση με την ελάχιστη βιβλιογραφία που υπάρχει για τον χαρακτηρισμό των PBDEs σε δείγματα εδάφους, το ενδιαφέρον για τον χαρακτηρισμό τους σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών αποβλήτων (STPs) είναι μεγαλύτερο, προκειμένου μέσω των απεκκρίσεων του ανθρώπου να αποσαφηνιστεί η έκθεσή του σε αυτούς, αλλά και να τονιστεί η έκθεση του περιβάλλοντος μέσω της κατάληξης τους από τις STPs και τους ΧΥΤΑ σε εδάφη και επιφανειακά ύδατα.

Ενδεικτικά, αναφέρουμε ότι σε δείγματα που συλλέχθηκαν το 1988 από μια STP στη Σουηδία, υπολογίστηκε ότι η συνολική συγκέντρωση των μελών BDE-47, -99 και -100 ήταν στην περιοχή των 20-30 ngr/gr ξηρού βάρους και μάλιστα ότι η αναλογία τους ήταν αντίστοιχη της προβλεπόμενης για το πέντα-BDE μείγμα (Nylund et al., 1992). Τα επίπεδα αυτά ήταν παρόμοια με

αυτά που βρέθηκαν λίγο αργότερα στη Γερμανία, όπου η συνολική συγκέντρωση των τέτρα- και πέντα-BDEs ήταν στην περιοχή των 0.4-15 ngr/gr, ενώ ταυτόχρονα βρέθηκαν τρι- και έξα-BDEs (Hagenmaier et al., 1992). Ωστόσο, με βάση μια μεταγενέστερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε επίσης στη Σουηδία (σε τρεις STPs), βρέθηκε ότι τα επίπεδα αυτά είχαν αυξηθεί. Μάλιστα, βρέθηκε ότι η συνολική συγκέντρωση των μελών BDE-47 και BDE-99 ήταν στην περιοχή των 100-190 ngr/gr ξηρού βάρους, ενώ παράλληλα βρέθηκε και το μέλος BDE-209 σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης που ήταν στην περιοχή των 160-260 ngr/gr ξηρού βάρους (Sellström et al., 1999).

Μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ολλανδία, παρουσιάζει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την κατανομή των PBDEs σε μια ευρύτερη περιοχή γύρω από αρκετές STPs, αφού καταγράφονται οι ποσότητές τους όχι μόνο στην εισροή και την εκροή τους, αλλά και στη σωματιδιακή φάση, τα ιζήματα και σε ζώντες οργανισμούς των γύρω ποταμών (De Wit, 2002, De Boer et al., 2003).

Καταρχήν, βρέθηκε ότι στη σωματιδιακή φάση τόσο στις εισροές όσο και τις εκροές των STPs, το μέλος BDE-209 είναι υπαρκτό και μάλιστα είναι εκείνο που αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο ποσοστό PBDEs. Συγκεκριμένα, στις εισροές η μέση τιμή συγκέντρωσης για το μέλος αυτό βρέθηκε ίση με 24 ngr/gr, ενώ στις εκροές ίση με 350 ngr/gr. Επίσης, η συνολική μέση τιμή συγκέντρωσης των μελών BDE-47 και BDE-99 που ακολουθούν σε ποσοστό, ήταν ίση με 7.5 και 22 ngr/gr για τις εισροές και τις εκροές αντίστοιχα, με το μέλος BDE-99 όμως να μην ανιχνεύεται στις εκροές. Είναι ξεκάθαρο, ότι το μέλος BDE-209 με κάποιον τρόπο μπορεί και εισέρχεται στους STPs. Επίσης, οι τιμές συγκεντρώσεων στις εκροές είναι γενικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες στις εισροές, διότι το έκλουσμα της εκροής λήφθηκε με φυγοκέντρωση, οπότε μπορεί να περιέχει λεπτά σωματίδια τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις PBDEs. Εξάλλου, τα μεγάλα σωματίδια που κατακάθονται κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας, εμπλουτίζουν τα πιο λεπτά με PBDEs (De Wit, 2002, De Boer et al., 2003).

Με βάση την ίδια μελέτη, εξετάστηκαν και δείγματα σωματιδιακής φάσης καθώς και ιζημάτων από τους παρακείμενους ποταμούς των εκροών αυτών των STPs. Για το μέλος BDE-209, η μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 71 και 22 ngr/gr στη σωματιδιακή φάση και τα ιζήματα αντίστοιχα. Επίσης, η συνολική μέση τιμή συγκέντρωσης των μελών BDE-47 και BDE-99 ήταν ίση με 4.6 και 1.7 ngr/gr στη σωματιδιακή φάση και τα ιζήματα αντίστοιχα. Για μια ακόμη φορά λοιπόν, επιβεβαιώνεται η μικρή διαλυτότητα του μέλους BDE-209 και η τάση του για ενσωμάτωση σε σωματίδια. Ωστόσο, υπάρχει ενδιαφέρον να εξεταστεί περαιτέρω το κατά πόσο είναι δυνατή η αποικοδόμησή του όσο βρίσκεται στα διαλυμένα σωματίδια. Με αυτό τον τρόπο, θα εξηγηθούν μερικώς και τα υψηλά ποσοστά των μελών BDE-47 και BDE-99 στο περιβάλλον. Τέλος, δείγματα που λήφθηκαν από ένα είδος ψαριού που ζει στα συγκεκριμένα ποτάμια, έδειξαν περίτρανα την απουσία του μέλους BDE-209 σε αυτά, αποδεικνύοντας ότι αυτό συσσωρεύεται μόνο στα ιζήματα. Στα συγκεκριμένα δείγματα, την υπεροχή κατείχε το μέλος BDE-47, ενώ το μέλος BDE-99 βρισκόταν κοντά στα όρια ανίχνευσης (De Boer et al., 2003).

1.4.3.4. Έμβιοι οργανισμοί:

α. Χερσαίοι οργανισμοί:

Η ανάλυση τεσσάρων δειγμάτων που συλλέχθηκαν από μύες το είδους πουλιού *Sturnus vulgaris* (ηλικίας 3-4 εβδομάδων) στη Σουηδία, έδειξε ότι οι μύες περιείχαν μια συνολική συγκέντρωση για τα μέλη BDE-47, -99 και -100 που ήταν στην περιοχή των 5.7-13 ngr/gr λίπους και μάλιστα ότι η αναλογία των μελών αυτών ήταν αντίστοιχη του πέντα-BDE μείγματος (Sellström et al., 1993a, Sellström, 1996).

Για τον προσδιορισμό των ιδίων μελών PBDEs επίσης στη Σουηδία, λήφθηκαν δείγματα από μυ λαγού (*Oryctolagus cuniculus*), μυ ελαφιού (*Alces alces*) και λίπος τάρανδου (*Rangifer tarandus*). Οι PBDEs αυτοί δεν ανιχνεύτηκαν στο λαγό, ενώ οι ποσότητές τους στο ελάφι και τον τάρανδο ήταν χαμηλές, δηλαδή 1.7 και 0.47 ngr/gr λίπους αντίστοιχα. Πάλι, η

αναλογία των μελών αυτών ήταν αντίστοιχη του πέντα-BDE μείγματος (Jansson et al., 1993, Sellström et al., 1993a, Sellström, 1996). Όμως, αυτά τα επίπεδα ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα σε γάλα αγελάδας στη Γερμανία, τα οποία ήταν στην περιοχή των 2.5–4.5 ngr/gr λίπους (Kruger, 1988).

β. Οργανισμοί γλυκού νερού:

Μύδια του γλυκού νερού (*Dreissena polymorpha*) αναλύθηκαν στην Ολλανδία για τον έλεγχο της παρουσίας των μελών BDE-47, -99, -153 και -209 σε αυτά. Η μέση συγκέντρωση για το μέλος BDE-209 ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Οι συγκεντρώσεις για τα υπόλοιπα τρία μέλη (με τη σειρά που είναι γραμμένα) βρίσκονταν στην περιοχή των 0.17-17 ngr/gr ξηρού βάρους, 0.4-11 ngr/gr ξηρού βάρους και <0.1-1.5 ngr/gr ξηρού βάρους, αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη αναλύθηκε και ένα είδος ψαριού (του *Abramis brama*). Η συγκέντρωση του μέλους BDE-47 βρέθηκε στην περιοχή των 0.2-130 ngr/gr ξηρού βάρους, του μέλους BDE-153 στην περιοχή των <0.04-4.1 ngr/gr ξηρού βάρους, ενώ του μέλους BDE-99 ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (de Boer et al., 2000a).

Στη Σουηδία επίσης, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τον προσδιορισμό των μελών BDE-47, -99 και -100 σε τέσσερα είδη ψαριού. Τα είδη αυτά ήταν: το *Coregonus spp*, το *Salvelinus alpinus* (ζούσε σε μια έντονα μολυσμένη λίμνη), το *Salmo trutta* και το *Esox lucius*. Στο *Salmo trutta*, η συνολική συγκέντρωση των μελών αυτών βρισκόταν στην περιοχή των 280-1200 ngr/gr λίπους, ενώ στο *Esox lucius*, στην περιοχή των 180-210 ngr/gr λίπους. Και στις δύο περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις των μελών BDE-47 και BDE-99 ήταν παρόμοιες. Όσο αφορά τα άλλα δύο είδη ψαριού, το μεν πρώτο έδωσε μια συνολική συγκέντρωση των μελών αυτών 26 ngr/gr λίπους, ενώ το δεύτερο που ζούσε στη μολυσμένη λίμνη έδωσε μια συνολική συγκέντρωση 520 ngr/gr λίπους. Και στα δύο είδη πάντως, το μέλος BDE-47 ήταν το επικρατέστερο. Ενδιαφέρον βέβαια είναι, ότι οι συγκεντρώσεις των PBDEs των δύο πρώτων ψαριών ήταν υψηλές, μάλλον εξαιτίας της μεταφοράς

ρουπαντών από τη μολυσμένη λίμνη λόγω σχετικής γειτνίασης (Jansson et al., 1993, Sellström et al., 1993a, Sellström, 1996).

Τέλος, για τις ανάγκες της ίδιας μελέτης, λήφθηκαν δείγματα από μύες ενός είδους αετού (*Pandion haliaetus*) που βρέθηκε νεκρό σε διάφορα σημεία της Σουηδίας και το οποίο τρεφόταν με τα ψάρια που αναφέραμε προηγουμένως. Η μέση συνολική συγκέντρωση των τριών μελών PBDEs που αναφέραμε ήταν ίση με 2100 ngr/gr λίπους, με το μέλος BDE-47 να είναι το επικρατέστερο σε ποσοστό 86%. Τα υψηλά αυτά επίπεδα, μάλλον αποδεικνύουν τη βιομεγέθυνση αυτών των ρουπαντών στη τροφική αλυσίδα (Jansson et al., 1993, Sellström et al., 1993a, Sellström, 1996).

γ. Θαλάσσιοι οργανισμοί:

Θαλάσσια μύδια (*Mytilus edulis*) αναλύθηκαν στην Ολλανδία για τον έλεγχο της παρουσίας των μελών BDE-47, -99, -153 και -209 σε αυτά. Οι συγκεντρώσεις των δύο τελευταίων μελών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ για τα δύο πρώτα οι συγκεντρώσεις τους βρέθηκαν στην περιοχή των 0.9-4.3 και των 0.3-1.6 ngr/gr ξηρού βάρους αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη αναλύθηκαν και δείγματα από ψάρια. Για τα δύο πρώτα μέλη, οι συγκεντρώσεις τους βρέθηκαν στην περιοχή των 0.6-20 ngr/gr και των <0.01-4.6 ngr/gr ξηρού βάρους αντίστοιχα. Τα δύο τελευταία μέλη, πάλι δεν ανιχνεύτηκαν (de Boer et al., 2000a).

Επίσης, δείγματα από ένα είδος φάλαινας αναλύθηκαν στον Καναδά και το Ηνωμένο Βασίλειο για τον έλεγχο της έκθεσής του σε PBDEs, από τους Ikononou et al. (2000) και τους Law et al. (2000) αντίστοιχα. Τα επίπεδα της συνολικής ποσότητας των τρι- ως έπτα-BDEs βρέθηκαν στην περιοχή των 350-2300 και των 440-7670 ngr/gr λίπους, στον Καναδά και το Ηνωμένο Βασίλειο αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις, το μέλος που επικράτησε σε ποσοστό ήταν το μέλος BDE-47, με συγκέντρωση που ήταν στην περιοχή των 50-1200 και των 227-6790 ngr/gr λίπους αντίστοιχα.

Ακόμη, δείγματα από ένα άλλο είδος φάλαινας με μακριά πτερύγια που κατοικεί στο Βόρειο Ατλαντικό, αναλύθηκαν για τον έλεγχο της έκθεσής

του σε 19 PBDEs. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις PBDEs βρέθηκαν στις νεότερες σε ηλικία φάλαινες, οι οποίες ήταν στην περιοχή των 3000–3160 ngr/gr λίπους, συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις που βρέθηκαν σε ενήλικες θηλυκές (840-1050 ngr/gr λίπους) και ενήλικες αρσενικές (1610 ngr/gr λίπους) φάλαινες (Lindstrom et al., 1999). Μάλιστα, η τάση αυτή επιβεβαιώθηκε και από μια δεύτερη μελέτη, όπου η μέση συγκέντρωση PBDEs στις νεότερες σε ηλικία φάλαινες ήταν 740 ngr/gr λίπους, στις ενήλικες θηλυκές φάλαινες ήταν 230 ngr/gr λίπους, ενώ στις ενήλικες αρσενικές φάλαινες ήταν 540 ngr/gr λίπους (van Bavel et al., 1999).

Τέλος, αναφέρουμε ότι δείγμα από σκώτι ενός είδος κορακιού που πετούσε σε ακτές του Ηνωμένου Βασιλείου, αναλύθηκε για να βρεθεί η κατανομή των μελών BDE-47, -99, -100, -153 και -154 σε αυτό. Βρέθηκε καταρχήν ότι η συνολική συγκέντρωση των μελών αυτών ήταν στην περιοχή των 300–6400 ngr/gr λίπους, αλλά και ότι το μέλος που κυριαρχούσε ήταν το μέλος BDE-47. Δεύτερο μέλος σε ποσοστό ήταν το μέλος BDE-100, τρίτο ήταν το μέλος BDE-99, ενώ τα άλλα δύο μέλη ήταν κοντά στα όρια ανίχνευσης (Allchin et al., 2000).

Συμπερασματικά, οι αναλογίες των μελών PBDEs στους έμβιους οργανισμούς παρουσιάζουν ένα συγκεκριμένο προφίλ ανά τον κόσμο, ασχέτως με τα επίπεδά τους, το είδος του οργανισμού που μελετάται και τα σημεία δειγματοληψίας. Με βάση αυτό το προφίλ, τα κύρια μέλη που ανιχνεύονται στους έμβιους οργανισμούς είναι τα εξής: BDE-47, -99, -100, -153 και -154, με το πρώτο να είναι πάντα το επικρατέστερο ίσως και σε ποσοστό άνω του 50% και το δεύτερο συνήθως να ακολουθεί (Watanabe et al., 2003). Μάλιστα, αυτά τα δύο μέλη είναι επίσης εκείνα που βιομεγεθύνονται περισσότερο στην τροφική αλυσίδα, αφού όπως αναφέραμε, οι τέτρα- και οι πέντα- BDEs βιοσυσσωρεύονται περισσότερο (και περίπου στον ίδιο βαθμό), ενώ οι έξα-BDEs βιοσυσσωρεύονται πολύ λιγότερο (De Wit, 2002, Darnerud et al., 2001, Watanabe et al., 2003).

Συνεπώς, το προφίλ αυτό είναι κάπως διαφορετικό σε σχέση με το αντίστοιχο που παρουσιάζουν οι PBDEs σε ατμόσφαιρα και υδάτινους αποδέκτες, όπου εκεί λόγω της παρουσίας αιωρούμενων σωματιδίων και ιζημάτων αντίστοιχα, το μέλος BDE-209 είναι εκείνο που επικρατεί. Το μέλος αυτό, λόγω του μεγάλου του μοριακού βάρους, έχει την τάση να προσροφάται σε επιφάνειες, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο βιοδιαθέσιμο και να βιοσυσσωρεύεται λιγότερο (Watanabe et al., 2003, De Boer et al., 2003). Ωστόσο, όπως έγινε γνωστό, στην αέρια φάση παρουσία UV ή ορατής ακτινοβολίας, το μέλος αυτό μπορεί να αποικοδομηθεί και να σχηματίσει PBDEs μικρότερου μοριακού βάρους (συμπεριλαμβανομένων των δύο επικρατέστερων μελών της προηγούμενης κατηγορίας), εξηγώντας έτσι εν μέρει την υψηλή παρουσία των τελευταίων αρχικά στο περιβάλλον και έπειτα στους έμβιους οργανισμούς.

1.5. Οι PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό:

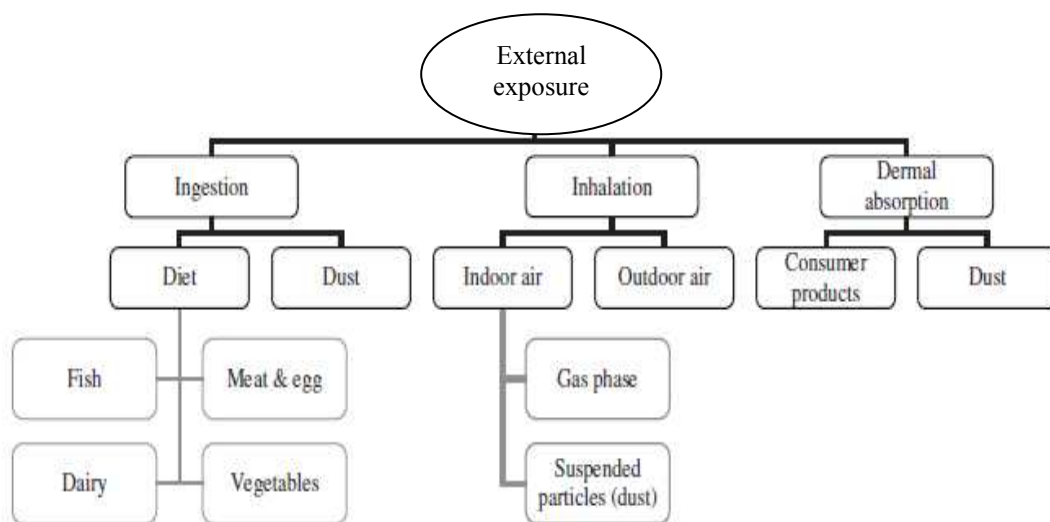
1.5.1. Πηγές έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs:

Με βάση την προηγούμενη ενότητα και την έννοια της βιομεγέθυνσης, είναι εύκολο να καταλάβουμε ότι μια κύρια, μάλλον η κυριότερη, πηγή έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs είναι η τροφή, και κυρίως η λιπαρή τροφή, καθώς και οι λιπαροί ιστοί οποιουδήποτε οργανισμού βρίσκεται ψηλά στην τροφική αλυσίδα. Χαρακτηριστικά, έχει αναφερθεί ότι ένα λιπαρό ψάρι μπορεί να συνεισφέρει έως και τα 2/3 της συνολικής λήψης του ανθρώπου σε PBDEs (Lind et al., 2002). Εκτός όμως από τα ψάρια, PBDEs συναντάμε στο κρέας, τα αυγά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τέλος, είναι δυνατή η έκθεσή μας και μέσω των λαχανικών προϊόντων (Darnerud et al., 2001, Branchi et al., 2003, Vonderheide et al., 2008, Watanabe et al., 2003, Frederiksen et al., 2009).

Ακόμα μια πηγή έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs, είναι ο αέρας σε εσωτερικούς και εξωτερικούς χώρους, μέσω της αέρας, αλλά κυρίως μέσω της σωματιδιακής φάσης. Μάλιστα, η έκθεση σε PBDEs (και κυρίως στο μέλος BDE-209) μέσω των σωματιδίων σκόνης στους εσωτερικούς χώρους, αποτελεί τον σημαντικότερο τρόπο έκθεσης στην κατηγορία αυτή. Αυτό συμβαίνει και

λόγω της τάσης των εκπεμπόμενων από τα διάφορα υλικά PBDEs να προσροφόνται στα σωματίδια, αλλά και λόγω της παρατεταμένης διαμονής του ανθρώπου σε εσωτερικούς χώρους (Darnerud et al., 2001, Branchi et al., 2003, Vonderheide et al., 2008, Watanabe et al., 2003, Frederiksen et al., 2009).

Η λήψη δια του στόματος τροφής και σκόνης, καθώς και η λήψη αερολυμάτων και σωματιδίων δια της αναπνευστικής οδού (που με βάση τους Wijesekera et al. (2002) μπορεί να ευθύνεται ακόμα και για το 27% της συνολικής ημερήσιας λήψης), αποτελούν τις κύριες πηγές εξωτερικής έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs. Ωστόσο, δεν πρέπει να λησμονήσουμε και την απορρόφησή τους μέσω του δέρματος μετά από άμεση επαφή με εκτεθειμένα αντικείμενα ή σκόνη (που με βάση τον Lorber (2008) μπορεί να ευθύνεται για το 16% της συνολικής ημερήσιας λήψης), η οποία ανήκει επίσης στην ίδια κατηγορία (Mandalakis et al., 2008, Frederiksen et al., 2009). Όλοι οι τρόποι εξωτερικής έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs που αναφέραμε, παρουσιάζονται στην Εικόνα 8 που ακολουθεί:



Εικόνα 8: Τρόποι εξωτερικής έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs (Frederiksen et al., 2009).

Εκτός όμως της εξωτερικής έκθεσης, όπως έχει αποδειχτεί, υπάρχει επίσης η δυνατότητα της βιοσυσσώρευσης PBDEs από τη μητέρα στο παιδί της, αρχικά μέσω της έκθεσης του εμβρύου όσο βρίσκεται στον πλακούντα, και έπειτα μέσω της έκθεσης του νεογνού από το μητρικό γάλα, διαδικασίες οι

οποιές συνιστούν *πηγές εσωτερικής έκθεσης* του ανθρώπου σε PBDEs (Darnerud et al., 2001, Branchi et al., 2003, Vonderheide et al., 2008, Frederiksen et al., 2009).

Από εκεί και έπειτα όμως, η συνολική έκθεση κάθε ανθρώπου σε PBDEs σχετίζεται με πολλούς παράγοντες. Καταρχήν, παίζει ρόλο η έκταση με την οποία οι PBDEs χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ή έχουν συσσωρευτεί στο περιβάλλον της χώρας διαμονής του καθενός. Αυτό φυσικά εξαρτάται από το νομοθετικό πλαίσιο της χώρας. Ωστόσο, η περιορισμένη χρήση των αντίστοιχων προϊόντων που χρησιμοποιούνται οι PBDEs, καθώς και των πιθανώς εκτεθειμένων τροφών, μπορεί να περιορίσουν κάπως την έκθεση (Branchi et al., 2003, Vonderheide et al., 2008, Frederiksen et al., 2009).

Έπειτα, σημαντικό ρόλο παίζει το επάγγελμα του καθενός. Άτομα για παράδειγμα που εργάζονται στη βιομηχανία ανακύκλωσης ηλεκτρονικού εξοπλισμού της Κίνας (όπου αποστέλλεται περίπου το 70% του παγκόσμιου ηλεκτρονικού εξοπλισμού για ανακύκλωση), είναι σίγουρα περισσότερο εκτεθειμένα (κυρίως στα βαρύτερα μέλη, όπως το BDE-183 και το BDE-209) σε σχέση με άλλους υπάλληλους γραφείου, και φυσικά σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Τέλος, έχει βρεθεί ότι σημαντικό ρόλο παίζει και η ηλικία. Μάλιστα, οι συγκεντρώσεις των PBDEs βρέθηκε ότι είναι αυξημένες στις μικρότερες ηλικίες, ακολουθώντας τη σειρά: ενήλικας < παιδί < βρέφος. Το γεγονός φανερώνει καταρχήν την εσωτερική έκθεση του βρέφους από τη μητέρα του. Επίσης, μια σημαντική αιτιολογία είναι ότι οι μικρότερες ηλικίες έχουν περισσότερη επαφή με τη σκόνη, λόγω του παιχνιδιού τους. Ακόμη, η έκθεση και μέσω της τροφής πιθανώς να είναι σημαντικότερη στις μικρότερες ηλικίες, όπου οι ιστοί ανασχηματίζονται διαρκώς. Τέλος, επειδή οι PBDEs είναι σχετικά πρόσφατοι ρυπαντές, ενδέχεται οι γονείς να μην έχουν εκτεθεί σε αυτούς σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους (Darnerud et al., 2001, Branchi et al., 2003, Vonderheide et al., 2008, Watanabe et al., 2003, Frederiksen et al., 2009).

1.5.2. Συσχέτιση των πηγών έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs με τα επίπεδά τους στον οργανισμό του:

1.5.2.1. Επίπεδα PBDEs σε τροφή και ανθρώπινο οργανισμό:

Σε μια πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση, οι Frederiksen et al. (2009), έκαναν μια προσπάθεια καταγραφής των επιπέδων PBDEs στα διάφορα τρόφιμα που πιθανώς είναι εκτεθειμένα, παρουσιάζοντας τις μέσες τιμές των PBDEs σε όλο το κόσμο ανά είδος τροφίμου, βάσει προηγούμενων δημοσιεύσεων. Το αποτέλεσμα κάθε φορά παρουσιάζεται βάσει της συνολικής ποσότητας των εξεταζόμενων μελών, η οποία συμβολίζεται ως ΣPBDEs, αν και δεν έχει δοθεί η ίδια βαρύτητα στα ίδια μέλη σε κάθε δημοσίευση.

Ξεκινώντας με τα ψάρια (εξαιτίας της μεγάλης βιοσυσσώρευσης των PBDEs σε αυτά και τη μεγάλη συνεισφορά τους στην έκθεσή μας), η μέση τιμή που βρέθηκε για την ΣPBDEs για όλα τα είδη ψαριού, ήταν 4200 pgr/gr βάρους, ενώ ο αντίστοιχος γεωμετρικός μέσος ήταν 1100 pgr/gr βάρους. Έπειτα, όσο αφορά τα οστρακόδερμα ψάρια, οι αντίστοιχες μέσες τιμές που βρέθηκαν ενδεικτικά για γαρίδες (Βέλγιο), μύδια (Ιαπωνία) και μπλε μύδια (Δανία), ήταν 51, 52 και 189 pgr/gr βάρους αντίστοιχα, τιμές σημαντικά χαμηλότερες από εκείνες στα ψάρια. Ωστόσο, σε όλα τα θαλάσσια είδη βρέθηκε ότι τα μέλη που κυριαρχούν είναι τα BDE-47, -99 και -100, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις σημαντικό ποσοστό συνεισφέρει και το μέλος BDE-49. Είναι χρήσιμο να αναφερθεί ότι και το μέλος BDE-209 έχει ανιχνευτεί στους θαλάσσιους οργανισμούς, απλά δεν εστιάζουν σε αυτό όλες οι μελέτες. Στις περιπτώσεις που έχει ανιχνευτεί, συνεισφέρει συνήθως σε ποσοστό κάτω του 10% (Frederiksen et al., 2009).

Όσον αφορά τη συσχέτιση των επιπέδων PBDEs στα ψάρια με τα αντίστοιχα στον ανθρώπινο οργανισμό, οι Hagmar and Bergman (2001), απέδειξαν την άμεση σχέση που είχαν τα επίπεδα των PBDEs στα λιπαρά ψάρια που έτρωγαν οι κάτοικοι της περιοχής της Βαλτικής θάλασσας με τα επίπεδα του μέλους BDE-47 στο αίμα τους. Οι Ohta et al (2002), επίσης βρήκαν ότι η συχνή λήψη ψαριών από γυναίκες στην Ιαπωνία είχε άμεση

επίδραση στα συνολικά επίπεδα των PBDEs στο μητρικό τους γάλα. Τέλος, οι Darnerud et al. (1998), υπολόγισαν ότι κυρίως η λήψη ρέγκας που ζει στη Βαλτική θάλασσα και η οποία είναι εκτεθειμένη σε 528 ngr/gr λίπους PBDEs (εκ των οποίων τα 450 ngr/gr ανήκουν στο μέλος BDE-47), αλλά και άλλων τροφών, μπορεί να οδηγήσει σε μια ημερήσια παραλαβή 0.2-0.7 μgr PBDEs από τους εκεί κατοίκους.

Σε ότι αφορά τώρα το κρέας και τα αυγά, η βιβλιογραφική ανασκόπηση του 2009, αναφέρει καταρχήν ότι η τιμή της ΣPBDEs κυμαίνεται στην περιοχή των 1-102 pgr/gr βάρους για το κρέας της Ευρώπης, ενώ το αντίστοιχο εύρος για το κρέας της Β. Αμερικής είναι 154-283 pgr/gr βάρους, με τιμές σαφώς υψηλότερες, όπως αναμενόταν. Γενικά, κρέατα με μεγαλύτερο λιπιδικό περιεχόμενο (24-66%), περιείχαν μεγαλύτερες ποσότητες PBDEs, όπως επίσης αναμενόταν. Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι το μέλος BDE-209 συμπεριλήφθηκε στις περισσότερες δημοσιεύσεις. Ωστόσο, στις περισσότερες Ευρωπαϊκές μελέτες το μέλος αυτό βρέθηκε σε συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ανίχνευσης, ενώ στις αντίστοιχες Αμερικάνικες μελέτες οι συγκεντρώσεις του ήταν στην περιοχή των 40-80 pgr/gr βάρους. Σε ότι αφορά τα αυγά από κοτόπουλο, η τιμή για την ΣPBDEs βρέθηκε στην περιοχή των 35-74 pgr/gr βάρους στην Ευρώπη, ενώ ήταν ίση με 85 pgr/gr βάρους στη Β. Αμερική (Frederiksen et al., 2009).

Έπειτα, επειδή η παρουσία των PBDEs έχει γίνει γνωστή και σε άλλες λιπαρές τροφές, όπως το βούτυρο, τα λίπη και τα λάδια, η βιβλιογραφική ανασκόπηση του 2009 αναφέρει ότι οι τροφές αυτές δίνουν μια τιμή για την ΣPBDEs, η οποία κυμαίνεται στην περιοχή των 119-569 pgr/gr βάρους. Άλλα προϊόντα ζωικής προέλευσης, όπως τα προϊόντα στερεού και υγρού γάλακτος, στην ίδια ανασκόπηση αναφέρεται ότι τα μεν πρώτα δίνουν μια τιμή για την ΣPBDEs που κυμαίνεται στην περιοχή των 18-34 pgr/gr βάρους, ενώ τα δεύτερα δίνουν μια τιμή για την ΣPBDEs ίση με 0.8 pgr/gr βάρους. Οι τιμές μεταξύ Ευρώπης και Β. Αμερικής είναι γενικά παρόμοιες στις τροφές που

αναφέρονται σ' αυτήν την παράγραφο, αν και δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες στη Β. Αμερική σχετικές με αυτήν την κατηγορία (Frederiksen et al., 2009).

Τέλος, αναφέρεται ότι τα επικρατέστερα μέλη PBDEs που συναντώνται σε αυτήν την κατηγορία τροφών, είναι τα μέλη BDE-47, -99 και -209. Αξιοσημείωτο επίσης είναι, ότι οι Gomara et al. (2006) έδειξαν ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν υψηλότερα ποσοστά για τα βαρύτερα μέλη PBDEs (όπως π.χ. τα μέλη BDE-183, -196, -197 και -209), συγκριτικά με τα θαλασσινά προϊόντα. Το γεγονός αυτό, αν και απροσδόκητο αφού δεν αναμένεται η βιοσυσσώρευση των πολύ βαρύτερων μελών PBDEs, υποδεικνύει κάποια επιμόλυνση κατά τη διαδικασία παραγωγής των προϊόντων αυτών. Ωστόσο, επειδή επίσης υψηλότερα ποσοστά (συγκριτικά με τα θαλασσινά προϊόντα) έχουν βρεθεί για το μέλος BDE-209 σε κρέατα και αυγά, μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτό μπορεί τελικά να είναι φυσιολογικό, διότι η πανίδα του χερσαίου οικοσυστήματος είναι πιο κοντά στις πρωτογενείς πηγές τροφής (συγκριτικά με τους θαλάσσιους οργανισμούς), οι οποίες μπορεί να είναι περισσότερο επιβαρυνμένες στα βαρύτερα μέλη, μέσω των υδάτων, του εδάφους αλλά και της ατμόσφαιρας (Vonderheide et al., 2008, Frederiksen et al., 2009).

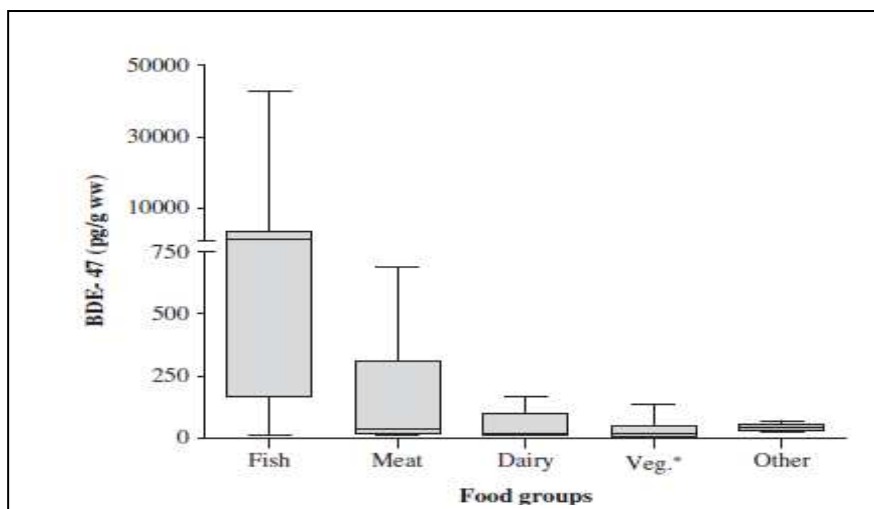
Σε ότι αφορά την παρουσία των PBDEs στα λαχανικά, αυτή γενικά αναμένεται να είναι μικρότερη σε σχέση με την παρουσία τους στις προηγούμενες κατηγορίες, εξαιτίας της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς τους σε νερό και τη χαμηλότερη θέση τους στη τροφική αλυσίδα. Πράγματι, οι περισσότερες Ευρωπαϊκές μελέτες έδειξαν ότι οι ποσότητες των PBDEs στα λαχανικά ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης, ενώ στις περιπτώσεις που αυτοί ανιχνεύτηκαν, βρέθηκαν στην περιοχή των 1.3-17 pgr/gr καθαρού βάρους. Ωστόσο, οι Ohta et al. (2002) έδειξαν ότι τα λαχανικά της Ιαπωνίας περιέχουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες PBDEs. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το σπανάκι, οι πατάτες και τα καρότα, περιείχαν 134, 47.6 και 38.4 pgr/gr καθαρού βάρους PBDEs αντίστοιχα, με το φυλλωτό σπανάκι να παρουσιάζει τις μεγαλύτερες ποσότητες, εξαιτίας ίσως της επιμόλυνσής του από την

ατμόσφαιρα. Τέλος, αναφέρθηκε ότι τα λαχανικά αυτά παρουσίασαν διαφορές και σε ότι αφορά την αναλογία των μελών PBDEs. Στο σπανάκι, βρέθηκε ότι επικρατούν τα περισσότερα πτητικά μέλη BDE-28 και BDE-47, ενώ περιείχε και ένα μικρό ποσοστό του λιγότερου πτητικού μέλους BDE-153. Το μέλος BDE-209 δεν συμπεριλήφθηκε στη μελέτη αυτή (Branchi et al., 2003, Frederiksen et al., 2009).

Η μελέτη των Ohta et al. (2002), αναφέρει επίσης ότι τα επίπεδα των PBDEs στα λαχανικά της Ιαπωνίας παραδόξως ήταν αρκετά υψηλότερα σε σχέση με τα επίπεδά τους σε τοπικά κρέατα. Συγκεκριμένα, το χοιρινό κρέας, το βοδινό κρέας και το κοτόπουλο της περιοχής, περιείχαν 63.6, 16.2 και 6.25 pgr/gr καθαρού βάρους PBDEs αντίστοιχα. Ωστόσο, όλες οι παραπάνω ποσότητες ήταν σημαντικά χαμηλότερες συγκριτικά με εκείνες που βρέθηκαν στα ψάρια της περιοχής, και οι οποίες βρίσκονταν στην περιοχή των 17.7-1720 pgr/gr καθαρού βάρους (Branchi et al., 2003, Vonderheide et al., 2008, Frederiksen et al., 2009).

Τέλος, οι μελέτες για τον έλεγχο της παρουσίας των PBDEs στις υπόλοιπες κατηγορίες τροφίμων, όπως το fast food, τα γλυκά και τα πόσιμα υγρά, είναι ελάχιστες. Τα αποτελέσματα, για παράδειγμα, των δύο μελετών που αφορούν στον έλεγχο της παρουσίας PBDEs σε fast food σε Ευρώπη και Β. Αμερική, είναι παρόμοια. Συγκεκριμένα, η τιμή της ΣPBDEs κυμαίνεται στην περιοχή των 39-52 pgr/gr βάρους στην Ευρώπη, ενώ είναι ίση με 76 pgr/gr βάρους στη Β. Αμερική. Το μέλος BDE-209 δεν συμπεριλήφθηκε στη μελέτη της Β. Αμερικής, ενώ η ποσότητά του στην Ευρωπαϊκή μελέτη ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (Frederiksen et al., 2009).

Στην Εικόνα 9 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η έκθεση της κάθε κατηγορίας τροφίμων σε PBDEs, βασισμένη στο μέλος BDE-47 το οποίο συνήθως είναι και το επικρατέστερο.



Εικόνα 9: Επίπεδα του μέλους BDE-47 (σε pgr/gr) σε κάθε κατηγορία προϊόντων (Frederiksen et al., 2009).

* Η συγκέντρωση του μέλους BDE-47 δεν ήταν διαθέσιμη στα λαχανικά, οπότε χρησιμοποιήθηκε η τιμή ΣPBDEs

Βάσει υπολογισμών για την εύρεση της ημερήσιας λήψης PBDEs σε μια ανθρώπινη διατροφή που περιέχει θεωρητικά όλες τις παραπάνω κατηγορίες, με βάση την κατανομή τους σε κάθε κατηγορία, προέκυψε ότι η ημερήσια λήψη κυμαίνεται στην περιοχή των 91-117 ngr ανά άτομο, χωρίς τον συνυπολογισμό του μέλους BDE-209. Αν όμως εκτιμηθεί η πραγματική κατάσταση πάνω στις διατροφικές συνήθειες, με βάση τα στατιστικά στοιχεία κατανάλωσης κάθε χώρας, τότε η παραπάνω τιμή ελαττώνεται ελαφρώς, αφού κυμαίνεται στην περιοχή των 23-88 ngr ανά άτομο, τόσο σε Ευρώπη όσο και σε Αμερική (συνυπολογίζοντας τώρα και το μέλος BDE-209) (Frederiksen et al., 2009).

Όπως γίνεται αντιληπτό, οι διατροφικές συνήθειες επηρεάζονται καθοριστικά από γεωγραφικούς και πολιτισμικούς παράγοντες. Συνεπώς, και οι ποσότητες των PBDEs που απορροφώνται από κάθε κατηγορία προϊόντων είναι λογικό να μην είναι σταθερές ανά τον κόσμο. Για παράδειγμα, στην Ιαπωνία όπου παραδοσιακά καταναλώνεται αρκετό ψάρι, το ψάρι είναι ο βασικός τρόπος έκθεσης των Ιαπωνέζων σε PBDEs μέσω της τροφής (Ohta et al., 2002). Αυτό ισχύει επίσης και στη Σκανδιναβία. Χαρακτηριστικά, στη Σουηδία το ψάρι οφείλεται για το 47% της λήψης PBDEs μέσω της τροφής (Darnerud et al., 2006), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στη Φιλανδία είναι 55%

(Kiviranta et al., 2004). Αντίθετα, στη Βόρεια Αμερική όπου υπάρχει λιγότερη τάση στην κατανάλωση ψαριού, η έκθεση των κατοίκων σε PBDEs από την τροφή γίνεται μέσω της κατανάλωσης κρέατος και λιπαρών. Μάλιστα, οι Schecter et al. (2006) υπολόγισαν ότι τα αντίστοιχα ποσοστά κατανάλωσης στη Β. Αμερική ήταν 10-20% και 60-70%.

Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι πλέον τα περισσότερα εκτεθειμένα σε PBDEs τρόφιμα, αναμένεται να είναι εκείνα που προέρχονται από τον αναπτυσσόμενο κόσμο, μιας και η παραγωγή/χρήση των PBDEs στο δυτικό κόσμο ουσιαστικά έχει σταματήσει. Μέχρι όμως αυτό να γίνει πραγματικότητα, η Β. Αμερική θα κρατάει γενικότερα τα πρωτεία της εσωτερικής και εξωτερικής έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs (Frederiksen et al., 2009).

1.5.2.2. Επίπεδα PBDEs σε αέρα/σκόνη και ανθρώπινο οργανισμό:

Καταρχάς, επειδή έχουμε ήδη αναφερθεί στα επίπεδα των PBDEs σε αέρα και σκόνη, σε αυτή την ενότητα θα αναφερθούμε σύντομα στην έκθεση του ανθρώπου από τον αέρα και τη σκόνη σε εσωτερικούς χώρους, μιας και αυτή αποτελεί μια πολύ σημαντική πορεία εξωτερικής έκθεσης του ανθρώπου σε PBDEs. Χαρακτηριστικά, με βάση τα δεδομένα που παρουσιάσαμε και στην ενότητα 1.4.3.1., μπορούμε να πούμε ότι σε πολλές περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις των PBDEs σε εσωτερικούς χώρους είναι τουλάχιστον οι διπλάσιες συγκρινόμενες με αυτές στους εξωτερικούς. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνει ότι ο εσωτερικός αέρας δεν μολύνεται από τον εξωτερικό, αλλά οι πηγές μόλυνσης βρίσκονται εντός του εκάστοτε κλειστού χώρου.

Κοιτώντας πάλι τη βιβλιογραφική ανασκόπηση των Frederiksen et al. (2009), παρατηρούμε ότι έγινε επίσης μια προσπάθεια καταγραφής των επιπέδων PBDEs σε οικιακούς και εργασιακούς χώρους σε παγκόσμιο επίπεδο, βάσει προηγούμενων δημοσιεύσεων. Τα αποτελέσματα συνήθως δίνονται βάσει της συνολικής ποσότητας ΣPBDEs, αν και δεν έχει δοθεί η ίδια βαρύτητα στα ίδια μέλη σε κάθε δημοσίευση.

Σε ότι αφορά την οικιακή σκόνη, η τιμή της ΣPBDEs στην ηπειρωτική Ευρώπη συμπεριλαμβανομένου του μέλους BDE-209, βρίσκεται στην περιοχή των 70-684 ngr/gr ξηρού βάρους, ενώ χωρίς την προσθήκη του μέλους αυτού, η τιμή της ΣPBDEs βρίσκεται στην περιοχή των 10-217 ngr/gr ξηρού βάρους. Μάλιστα, τα επίπεδα των τέτρα-, πέντα- και έξα-BDEs βρέθηκαν μια τάξη μεγέθους μικρότερη στα δείγματα οικιακής σκόνης της Ευρώπης συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα της Β. Αμερικής (32 και 429 ngr/gr ξηρού βάρους για το μέλος BDE-47 στις δύο ηπείρους αντίστοιχα). Επίσης, σημαντικά μεγαλύτερες βρέθηκαν και οι ποσότητες του μέλους BDE-209 στα δείγματα οικιακής σκόνης της Β. Αμερικής. Και στις δύο ηπείρους πάντως, το μέλος αυτό είναι το πιο άφθονο μέλος PBDEs στην οικιακή σκόνη, και μάλιστα αποτελεί το 32-97% του συνολικού ποσοστού PBDEs σε αυτήν. Σε ότι αφορά τώρα την ατμόσφαιρα αυτών των οικιακών χώρων, η τιμή της ΣPBDEs στην Ευρώπη συμπεριλαμβανομένου του μέλους BDE-209, βρίσκεται στην περιοχή των 4-411 pgr/m³ ξηρού βάρους. Η αντίστοιχη περιοχή τιμών για την ΣPBDEs στη Β. Αμερική, είναι η περιοχή των 2-3600 pgr/m³ ξηρού βάρους, δηλαδή μεγαλύτερη έως και μια τάξη μεγέθους. Βέβαια, για την ατμόσφαιρα των οικιακών χώρων, τα δεδομένα είναι ελάχιστα και στις δύο ηπείρους για να θεωρήσουμε αυτή την παρατήρηση ως τελείως αξιόπιστη (Frederiksen et al., 2009).

Η Δανέζικη υπηρεσία προστασίας περιβάλλοντος (2006), υπολόγισε ότι η ημερήσια λήψη σκόνης (από εσωτερικούς και εξωτερικούς χώρους) από έναν ενήλικα, βρίσκεται στην περιοχή των 2-100 mgr. Έπειτα, ο Lorber (2008) υπολόγισε ότι στη λήψη (δια δέρματος, στόματος και αναπνοής) αυτής της ποσότητας σκόνης, μπορεί σε μια σπάνια περίπτωση, να οφείλεται ακόμη και το 82% της ημερήσιας λήψης PBDEs (συμπεριλαμβανομένου του μέλους BDE-209) από τον ανθρώπινο οργανισμό (υπονοώντας ότι τελικά περίπου το 16% λαμβάνεται μέσω της τροφής), αν και πρέπει να υπάρχουν αρκετά δεδομένα για το μέλος BDE-209 σε τροφές και σκόνη για να ειπωθεί με ακρίβεια κάτι τέτοιο.

Σε αυτό το σημείο, κρίνεται σωστό να αναφερθεί ξανά ότι πράγματι η Ελληνική μελέτη στην οποία βασιστήκαμε για την εύρεση PBDEs στην ατμόσφαιρα οικιακών χώρων στην ενότητα 1.4.3.1, δίνει μια τιμή για την ΣPBDEs η οποία είναι 1-2 τάξεις μεγέθους χαμηλότερη από την αντίστοιχη τιμή άλλων χωρών της Βόρειας Ευρώπης. Ωστόσο, η Σουηδική μελέτη που αναφέραμε στην ίδια ενότητα για την εύρεση PBDEs σε σωματίδια σκόνης οικιακών χώρων, δίνει μια τιμή για την ΣPBDEs η οποία είναι αναμενόμενη για τα Ευρωπαϊκά δεδομένα.

Να θυμηθούμε ότι η ίδια Ελληνική μελέτη αναφέρει και τα επίπεδα PBDEs σε διάφορους εργασιακούς χώρους. Δε θα αναφέρουμε ξανά αυτά τα επίπεδα, απλώς θα τα μετατρέψουμε σε ημερήσια πρόσληψη PBDEs δια της αναπνευστικής οδού. Συνεπώς, για τους εργασιακούς χώρους που μελετήθηκαν: γραφεία δημοσίου κτηρίου, χώροι με υπολογιστές/internet cafes, καταστήματα πώλησης υπολογιστών/ηλεκτρικών ειδών και καταστήματα πώλησης επίπλων, οι αντίστοιχες τιμές για την ημερήσια εισπνοή PBDEs από τους εργαζόμενους βρέθηκε ότι είναι 1.4, 0.9, 0.6 και 0.2 ngr, τιμές που είναι σημαντικά χαμηλότερες από την αναμενόμενη ημερήσια πρόσληψη PBDEs δια της τροφής, η οποία είναι περίπου 77 ngr. Για το λόγο αυτό, οι ποσότητες των PBDEs που εισέρχονται στον οργανισμό δια της αναπνευστικής οδού, αποτελούν περίπου το 1% της ημερήσιας πρόσληψης PBDEs για τους συγκεκριμένους εργαζόμενους (Mandalakis et al., 2008).

Έπειτα, ενδιαφέρον να αναφερθεί είναι ότι και στη Σουηδική μελέτη επιχειρήθηκε να γίνει μια εκτίμηση για το πόσο τα επίπεδα PBDEs στη σκόνη του περιβάλλοντα χώρου καθορίζουν έπειτα τα επίπεδά τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις πλάσματος αίματος από ένα ενήλικο άτομο κάθε νοικοκυριού. Μετά από αυτές τις αναλύσεις, γενικά οι ποσότητες για όσα από τα μέλη PBDEs ανιχνεύτηκαν, βρίσκονταν κοντά στα όρια ανίχνευσης. Ωστόσο, τα μέλη που επικράτησαν ήταν τα BDE-47, -153 και -209. Σε ένα δείγμα όπου ανιχνεύτηκαν επίσης τα μέλη BDE-28, -99 και -154, επιχειρήθηκε να γίνει η καμπύλη συσχέτισης της

ποσότητας αυτών των μελών (εκτός του μέλους BDE-209) στη σκόνη και στο αντίστοιχο πλάσμα αίματος. Η καμπύλη αυτή παρουσίασε αρκετά καλή γραμμικότητα. Ωστόσο, επειδή για μηδενική συγκέντρωση στη σκόνη, η καμπύλη παρουσιάζει θετική κλίση, καταλαβαίνουμε ότι πρέπει να συνυπολογιστούν και άλλοι τρόποι έκθεσης σε PBDEs και όχι μόνο η σκόνη, όπως ήταν αναμενόμενο. Τέλος, με προσθήκη του μέλους BDE-209 σε αυτή την καμπύλη, η όποια θετική συσχέτιση προέκυψε προηγουμένως, χάνεται (Karlsson et al., 2007).

Όπως μάλλον έγινε αντιληπτό, η έκθεση του ανθρώπου σε PBDEs μπορεί να ειπωθεί ότι ουσιαστικά είναι ανεξάρτητη της εργασίας του καθενός, ακόμα και αν η εργασία αυτή εμπεριέχει διαρκή ενασχόληση με ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Αυτό ισχύει όμως μόνο για τις συμβατικές εργασίες. Οι Frederiksen et al. (2009), αναφέρουν ότι η πολύ υψηλή τιμή της ΣPBDEs στο αίμα των εργαζόμενων στις βιομηχανίες ανακύκλωσης ηλεκτρονικού εξοπλισμού σε Ασία και Σκανδιναβία, συσχετίζεται πολύ καλά με την αντίστοιχη τιμή της στην ατμόσφαιρα των χώρων ανακύκλωσης. Συγκεκριμένα, η τιμή της ΣPBDEs αυτής της κατηγορίας βρίσκεται στην περιοχή των 3,8-8.500 ngr/gr λιπιδικού βάρους στο αίμα αυτών των εργαζόμενων, ενώ η αντίστοιχη τιμή της στον εργασιακό τους χώρο βρίσκεται στην περιοχή των 33.000-77.000 pgr/m³, τιμή η οποία είναι έως και τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σε συμβατικούς εργασιακούς χώρους (δηλαδή την τιμή των 41-766 pgr/m³). Σε όλους αυτούς τους υπολογισμούς, συμπεριλαμβάνεται και το μέλος BDE-209. Μάλιστα, τα επικρατέστερα μέλη τόσο στο αίμα των εργαζομένων αυτών όσο και στην ατμόσφαιρα των αντίστοιχων εργασιακών χώρων, είναι τα μέλη BDE-47, -99, -153, -183 και -209, τα οποία επίσης κυριαρχούν στα εμπορικά μείγματα PBDEs. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι και τα περισσότερο βρωμιωμένα μέλη PBDEs όπως τα μέλη BDE-183 και BDE-209, μπορούν να συσσωρευτούν στους ανθρώπινους ιστούς, αν και παραμένουν πολύ λιγότερο σε αυτούς, εξαιτίας των πολύ μικρότερων χρόνων ζωής τους.

1.5.2.3. Επίπεδα PBDEs λόγω εσωτερικής έκθεσης:

Όπως αναφέραμε, η έννοια εσωτερική έκθεση εκφράζει τη δυνατότητα της βιοσυσσώρευσης PBDEs από τη μητέρα στο παιδί της, αρχικά μέσω της έκθεσης του εμβρύου όσο βρίσκεται στον πλακούντα, και έπειτα μέσω της έκθεσης του νεογνού από το μητρικό γάλα.

Σε ότι αφορά την έκθεση από το μητρικό γάλα, οι Jones-Otazo et al. (2005) υπολόγισαν ότι τα βρέφη του Καναδά (ηλικίας 0-0.5 έτους) λαμβάνουν μέσω του μητρικού γάλατος, το 92% της συνολικής ληφθήσας ποσότητας PBDEs. Το υπόλοιπο ποσοστό προέρχεται από την απορρόφηση και την εισπνοή σκόνης. Επίσης, σε μια προσπάθεια υπολογισμού της ημερήσιας λήψης PBDEs του βρέφους από το μητρικό γάλα στη Σουηδία, οι Ahlborg et al. (1988) βρήκαν ότι αυτή ήταν ίση με 0.11 μgr, δηλαδή ίση με 20 μgr σε έξι μήνες. Ο υπολογισμός αυτός βασίστηκε στην υπόθεση ότι το μητρικό γάλα περιέχει 3.7% λίπος και ότι τα βρέφη καταναλώνουν ημερησίως 700 ml γάλατος για έξι μήνες. Έπειτα, οι Meironyite et al. (1999) βρήκαν ότι αυτή η τιμή στη Σουηδία ήταν ουσιαστικά η ίδια μετά από μια δεκαετία, αφού βρέθηκε στην περιοχή των 0.05-0.10 μgr. Πάλι έγινε η υπόθεση ότι τα βρέφη ζυγίζουν 5 kgr και ότι καταναλώνουν ημερησίως 700 ml γάλατος. Η μικρή ίσως πτώση της τιμής αυτής, πιθανώς αντικατροπτρίζει την προσπάθεια της Σουηδικής Κυβέρνησης να περιορίσει τη χρήση γενικά των BFRs στο τέλος της δεκαετίας του 1990, με αποτέλεσμα και το μητρικό γάλα να είναι μάλλον λιγότερο εκτεθειμένο. Πρέπει βέβαια να αναφερθεί ότι τα επικρατέστερα μέλη PBDEs στο μητρικό γάλα, που μάλλον μεταβιβάζονται και στα βρέφη, είναι τα μέλη BDE-47, -99, -100, -153 και -154, με το πρώτο να είναι το κυρίαρχο σε υψηλά ποσοστά (Hyoëtyläinen et al., 2002, Darnerud et al., 2001, Branchi et al., 2003, Frederiksen et al., 2009).

Σε ότι αφορά τέλος την έκθεση του εμβρύου στον πλακούντα, έχει βρεθεί ότι λόγω του χαμηλού λιπιδικού φορτίου του αίματος στον ομφάλιο λώρο, το έμβρυο τελικά εκτίθεται μάλλον στα λιγότερο λιπόφιλα μέλη PBDEs. Δηλαδή μεταξύ των δύο επικρατέστερων μελών στο ανθρώπινο αίμα, των

BDE-47 και BDE-153, στον ομφάλιο λώρο απαντάται το μέλος BDE-47 (Frederiksen et al., 2009).

1.5.2.4. Συνολικά επίπεδα PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό:

Καταρχάς, με αφορμή την προηγούμενη ενότητα, βάσει των Frederiksen et al. (2009), η τιμή της ΣPBDEs στο μητρικό γάλα Ευρωπαϊκών δειγμάτων μετά το 1988, βρίσκεται στην περιοχή των 1.7-6.3 ngr/gr λιπιδικού βάρους (μη-συμπεριλαμβανομένου του μέλους BDE-209). Η αντίστοιχη τιμή στην Ασία βρίσκεται στην περιοχή των 0.91-3.8 ngr/gr λιπιδικού βάρους και είναι ελαφρώς χαμηλότερη της Ευρωπαϊκής. Τέλος, αν και δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την αντίστοιχη τιμή της ΣPBDEs στη Βόρεια Αμερική, αναφέρεται ότι είναι μια τάξη μεγέθους υψηλότερη σε σχέση με τις προηγούμενες (Frederiksen et al., 2009). Πρέπει βέβαια να αναφερθεί, ότι τα επικρατέστερα μέλη PBDEs στο μητρικό γάλα είναι αυτά που καταγράψαμε προηγουμένως.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι οι Darnerud et al. (1998) υποστήριξαν ότι τα επίπεδα των PBDEs στο μητρικό γάλα σχετίζονται θετικά με τις συνήθειες καπνίσματος και τη μάζα σώματος των γυναικών, ενώ δεν εμφανίζουν κάποια συσχέτιση με την ηλικία τους, τη συχνότητα κατανάλωσης ψαριού, την επαγγελματική επαφή με ηλεκτρονικούς υπολογιστές ή το βάρος του βρέφους.

Έπειτα, επίσης βάσει των Frederiksen et al. (2009), τα επίπεδα του μέλους BDE-47 στα δείγματα του ανθρώπινου αίματος (και συγκεκριμένα του ορού αίματος) μετά το 1988, βρίσκονται στην περιοχή των 0.24-2.4 και 0.63-46 ngr/gr λιπιδικού βάρους σε Ευρώπη και Β. Αμερική αντίστοιχα, αποδεικνύοντας ότι και σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα στη Β. Αμερική είναι μια τάξη μεγέθους υψηλότερα. Τέλος, αν και τα δεδομένα για τα επίπεδα του μέλους αυτού στο ανθρώπινο αίμα είναι περιορισμένα σε Ασία και Ωκεανία, αναφέρεται ότι αυτά βρίσκονται στην περιοχή των 1.5-28 και 2.7-20 ngr/gr λιπιδικού βάρους αντίστοιχα (Frederiksen et al., 2009).

Σε ότι αφορά τώρα στην παρουσία των PBDEs στο λιπώδη ιστό του ανθρώπου, θα αναφερθούμε στο μέσο άθροισμα συγκεκριμένων τέτρα-, πέντα- και έξα-BDE μελών που μελετήθηκαν (σε ngr/gr λιπιδικού βάρους). Το άθροισμα αυτό βρέθηκε ίσο με 4.1 στην Ισπανία (Meneses et al., 1999), με 3.7 στο Βέλγιο (Covaci et al., 2002), με 11.8 στη Φιλανδία (Strandman et al., 2000) και με 59.4 στην Καλιφόρνια (She et al., 2002). Ακόμη μια φορά λοιπόν, αποδεικνύεται ότι τα επίπεδα στη Β. Αμερική είναι υψηλότερα.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι τα επικρατέστερα μέλη PBDEs τόσο στο ανθρώπινο αίμα, όσο και στον λιπώδη ιστό του ανθρώπου είναι τα μέλη BDE -47, -99, -100, -153, -154 και -183, με το μέλος BDE-47 να είναι το κυρίαρχο και το μέλος BDE-153 να παίζει πλέον έναν επίσης κυρίαρχο ρόλο στους ανθρώπινους ιστούς (De Wit, 2002, Vonderheide et al., 2008, Watanabe et al., 2003).

1.5.3. Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα των PBDEs:

Ο μεταβολισμός των PBDEs και των BFRs γενικά, είναι μια σπουδαία διαδικασία η οποία μας βοηθάει να κατανοήσουμε τη βιοσυσώρευσή τους, τη λήψη τους και τη διαθεσιμότητά τους στους διάφορους ιστούς, την πιθανή τοξικότητά τους, και γενικά την τύχη τους στους εκτεθειμένους οργανισμούς (Hakk et al., 2003, Qiu et al., 2007).

Με βάση την ερευνητική δουλειά που έχει γίνει πάνω στο θέμα του μεταβολισμού των BFRs, έχει βρεθεί ότι τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν είναι η οξειδωτική και η αναγωγική τους αποβρωμίωση παρουσία ενζύμων, αλλά και η βιομετατροπή τους συνήθως σε υδροξυλιωμένες ενώσεις, είτε μέσω ενεργοποίησης της των ενζύμων της μονοξυγενάσης του κυτοχρώματος P450 (CYP) της φάσης I, είτε και μέσω ενεργοποίησης των ενζύμων σύζευξης (π.χ. γλυκυρονοσουλτρανοφεράσες, σουλφοτρανοφεράσες και τρανοφεράσες της S-γλουταθειονίνης) της φάσης II. Οι συγκεκριμένες κατηγορίες ενζύμων ενεργοποιούνται παρουσία ξενοβιοτικού υλικού, με σκοπό την έναρξη του μεταβολισμού του (Darnierud et al., 2001, Hakk et al., 2003, Qiu et al., 2007).

Από τις 22 οικογένειες των ενζύμων του τύπου CYP που είναι γνωστές στα θηλαστικά, μόνο οι τρεις (οι CYP1, CYP2 και CYP3) είναι σημαντικές στον βασικό μεταβολισμό των ανθρωπογενών ενώσεων. Οι μεταβολίτες που προκύπτουν στη φάση I (όπως οι υδροξύ-μεταβολίτες) έπειτα μεταβολίζονται περαιτέρω στη φάση II μέσω των ενζύμων σύζευξης, αν και είναι δυνατή η ενεργοποίηση προστατευτικών μηχανισμών (όπως η ισχυρή δέσμευση στις αρχικές πρωτεΐνες) οι οποίοι οδηγούν στην κατακράτηση των ενώσεων στον αρχικό ιστό. Συνεπώς, οι διαφορές μεταξύ των ρυπαντών στην ενεργοποίηση και την ικανότητα δέσμευσης των ενζύμων που ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες, είναι εκείνες που τελικά καθορίζουν την κατανομή αυτών (και των υπόλοιπων μελών της οικογενείας τους) στους διάφορους ιστούς, την πιθανή τοξικότητά τους, και γενικά την τύχη τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Πάντα όμως, θα πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη και τις υπόλοιπες πιθανές μεταβολικές πορείες κάθε ένωσης (όπως η αποβρωμίωση στην περίπτωση των BFRs) (Hakk et al., 2003).

Όσον αφορά τους PBDEs, η γνώση σχετικά με την τύχη τους στους διάφορους οργανισμούς δυστυχώς είναι περιορισμένη, και μάλιστα έχει ανακύψει μέσα από πειράματα (in vivo και in vitro) που έχουν γίνει κυρίως σε τρωκτικά (ποντίκια και αρουραίους). Ωστόσο, τα μεταβολικά μονοπάτια που αναφέρθηκαν για τα BFRs, ακολουθούνται και από τους PBDEs. Γενικά, σε αυτήν την ενότητα θα επικεντρωθούμε στην βιβλιογραφία που υπήρχε μέχρι το 2003 σχετικά με την παρουσία των PBDEs κυρίως στα τρωκτικά και την κατανομή τους στους διάφορους ιστούς, έπειτα θα αναφερθούμε σε μια πρόσφατη μελέτη η οποία χρησιμοποίησε πλάσμα αίματος ποντικών για να εξηγήσει λεπτομερέστερα τη μεταβολική πορεία των PBDEs σε αυτά, και τέλος θα αναφερθούμε σε μια από τις ελάχιστες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος, με σκοπό τη σύγκριση της μεταβολικής πορείας των PBDEs σε ποντίκια και άνθρωπο.

1.5.3.1. In vivo πειράματα σε κύτταρα:

Παλαιότερα *in vivo* πειράματα που έγιναν σε εντερικά και ηπατικά κύτταρα (μεταξύ αυτών και ανθρώπου), απλά έχουν επιβεβαιώσει ότι τόσο τα εμπορικά διαθέσιμα μείγματα-BDE όσο και μεμονωμένα μέλη PBDEs, έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τα ένζυμα της φάσης I και II που έχουμε αναφέρει. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι και οι δύο παραπάνω κατηγορίες PBDEs ενεργοποιούν τα ένζυμα CYP1A1 και CYP1A2 (Hakk et al., 2003)

Όπως καταρχήν αποδείχθηκε από την αυξημένη δραστηριότητα της EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase), το τεχνικώς παραγόμενο πέντα-BDE μείγμα Bromkal 70, σε μια δόση 3-10 mgr/kg, ενεργοποιεί το ένζυμο CYP1A1 σε μικροκύτταρα από αρουραίο του τύπου Wistar (von Meyerinck et al., 1990). Έπειτα, αποδείχθηκε ότι η EROD επίσης ενεργοποιείται ελαφρώς με την παρουσία των μεμονωμένων μελών BDE-77, BDE-119 και BDE-126, σε συγκεντρώσεις 25-50 nM. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε ηπατικά κύτταρα κοτόπουλου και αρουραίου, σε σειρά ηπατικών κυττάρων ανθρώπου (HepG2), αρουραίου (H4IIE) και πέστροφας (RTL-W1), καθώς και σε σειρά εντερικών κυττάρων ανθρώπου (Caco-2) (Chen et al., 2001).

Σε μια άλλη μελέτη, βρέθηκε ότι μια δόση των 30 mgr/kg/ημέρα (για 4 ημέρες) των μελών BDE-71 και BDE-79, ενεργοποιεί την EROD 10 με 20 φορές, την PROD (pentoxyresorufin-O-depentylase ή CYP2B1) 30 με 40 φορές, ενώ ενεργοποιεί 3 με 4 φορές το ένζυμο UDPGT της φάσης II, σε ηπατικά κύτταρα απογαλακτισμένου θηλυκού αρουραίου του τύπου Long Evans (Zhou et al., 2001). Τέλος, βρέθηκε ότι μια δόση των 0.1 mmol/kg/ημέρα (για 14 ημέρες) από δύο μείγματα που περιείχαν 24% τέτρα- και 50% πέντα-BDEs το πρώτο, και 45% έπτα- και 30% όκτα-BDEs το δεύτερο, προκάλεσε επίσης παρατεταμένη ενεργοποίηση του ενζύμου UDPGT σε ηπατικά κύτταρα αρουραίου (Carlson, 1980).

1.5.3.2. In vitro πειράματα σε κύτταρα:

Παλιότερα *in vitro* πειράματα που έγιναν σε ηπατικά κύτταρα αρουραίου, προσπάθησαν να αποδείξουν τη δυνατότητα μεταβολισμού των PBDEs σε αυτά (Hakk et al., 2003).

Καταρχήν, χρειάζεται να αναφέρουμε ότι οι ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των thyroxine-like ορμονών, όπως οι υδρόξυ-PBDEs, έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύονται ισχυρά στην ανθρώπινη τρανσθυρετίνη (TTR) (η οποία είναι μια μεταφορική πρωτεΐνη για τις θυρεοειδείς ορμόνες όπως η θυροξίνη (T4) και η θυρονίνη (T3)) παρουσία ιχνηθετημένης με ¹²⁵I θυροξίνης (Brouwer et al., 1998, Meerts et al., 2000). Επίσης, μέσω φασματοσκοπίας περίθλασης ακτίνων Χ, έχει αποδειχθεί ότι οι βρωμοφαινόλες (επίσης πιθανοί μεταβολίτες των PBDEs) δεσμεύονται στο κεντρικό κανάλι του μορίου της TTR μέσω της υδρόξυ- ομάδας (Ghosh et al., 2000).

Η *in vitro* μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Meerts et al. (2000), περιγράφει τη δυνατότητα μεταβολισμού των PBDEs σε ηπατικά μικροκύτταρα αρουραίου, μέσω ενεργοποίησης ενζύμων της φάσης I. Αρχικά αναφέρεται ότι 17 μέλη PBDEs (δι- έως έπτα-BDEs) επώαστηκαν μαζί με τα ηπατικά μικροκύτταρα παρουσία των επιθυμητών ενζύμων CYP2B, CYP1A και CYP4A3 (ενός κάθε φορά). Έπειτα, το έκλουσμα από την κάθε επώαση (που θεωρητικά περιέχει OH-PBDEs) μεταφέρθηκε σ' ένα σύστημα T4-TTR, για τον έλεγχο του ανταγωνισμού μεταξύ των μεταβολισμένων παραγώγων και της θυροξίνης (T4), για πρόσδεση στην TTR. Αξιόλογος ανταγωνισμός παρατηρήθηκε από τα δι- έως τα πέντα-BDEs στο εκχύλισμα του μείγματος του CYP2B, με το σύστημα T4-TTR. Αντίθετα, τα άλλα δύο εκχυλίσματα ήταν πολύ λιγότερο ενεργά. Τέλος, τα έξα- και τα έπτα-BDEs δεν έδειξαν ουσιαστική ενεργότητα σε κανένα από τα τρία μείγματα, υποδεικνύοντας αργό ή ανύπαρκτο *in vitro* μεταβολισμό στους αρουραίους.

Το τελικό συμπέρασμα, ήταν ότι παρουσία του ενζύμου CYP2B (και λιγότερο των ενζύμων CYP1A και CYP4A3) πραγματοποιείται μεταβολισμός PBDEs χαμηλού μοριακού βάρους σε αρουραίους, αν και δεν προσδιορίστηκαν οι αντίστοιχοι υδρόξυ- μεταβολίτες (Meerts et al., 2000, Hakk et al., 2003).

1.5.3.3. Μεταβολική πορεία σε ολόκληρο τον οργανισμό:

Καταρχήν, θα αναφερθούμε σε δύο μελέτες οι οποίες ασχολήθηκαν με τη βιοσυγκέντρωση των μελών που περιέχονται στα εμπορικά μείγματα Bromkal-70 (ένα πέντα-BDE μείγμα) και DE-79 (ένα όκτα-BDE μείγμα), καθώς και τη διαθεσιμότητα τους σε αρσενικούς αρουραίους του τύπου Sprague-Dawley. Για την πραγματοποίηση των μελετών αυτών, οι αρουραίοι τράφηκαν με 33 ngr κάθε μείγματος (ενός κάθε φορά) ανά ημέρα, για 21 ημέρες. Βρέθηκε, ότι δεν υπήρξαν διαφορές μεταξύ της βιοσυγκέντρωσης των μελών του Bromkal-70 στους ιστούς που μελετήθηκαν με την αναλογία των μελών αυτών στο μείγμα (Hakk et al., 2001). Αντιθέτως, στην περίπτωση του DE-79 βρέθηκε ότι η βιοδιαθεσιμότητα των μελών ελαττώνεται με αύξηση του βαθμού βρωμίωσης. Μάλιστα, βρέθηκε ότι τα περισσότερα βρωμιωμένα μέλη μεταβολίζονται, χωρίς όμως να αποδειχθεί ότι προκύπτουν άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας με μικρότερο μοριακό βάρος (Huwe et al., 2002). Τέλος, βρέθηκε ότι η παρουσία του μέλους BDE-153 ήταν έντονη στους ιστούς που μελετήθηκαν και στις δύο εργασίες, γεγονός που αποδεικνύει την μεγάλη βιοδιαθεσιμότητά του.

Οι Orn και Klasson-Wehler (1998), απέδειξαν ότι η απορρόφηση μιας δόσης 14.5 mgr/kg του ιχνηθετημένου μέλους ¹⁴C-BDE-47, επίσης στον οργανισμό αρσενικών αρουραίων του τύπου Sprague-Dawley, είναι υψηλή. Συγκεκριμένα, περίπου το 87% της δια στόματος δόσης του μέλους αυτού, παρέμεινε στους διάφορους ιστούς τις πρώτες πέντε ημέρες, ενώ το 14% και <0.5% απεκκρίθηκε με τα κόπρανα και τα ούρα αντίστοιχα. Επίσης, η υψηλότερη συγκέντρωση του μέλους βρέθηκε με διαφορά στον λιπώδη ιστό, ακολουθούμενη από την παρουσία του καταρχήν στους πνεύμονες και έπειτα

στο ήπαρ και τα νεφρά, ενώ ελάχιστη ποσότητα του μέλους βρέθηκε και στο μυαλό των αρουραίων. Χρήσιμο να αναφερθεί, είναι επίσης το γεγονός ότι στον λιπώδη ιστό, το μυαλό και τα νεφρά, το μέλος αυτό βρέθηκε μόνο στην αρχική του μορφή, ενώ στους πνεύμονες και το ήπαρ εμφανίστηκαν και ίχνη (<1% της συνολικής παρουσίας του ιχνηθετημένου μέλους στους ιστούς) υδρόξυ- μεταβολιτών. Τέλος, μετά και την ανάλυση των κοπράνων των αρουραίων, βρέθηκε ότι το εκεί κλάσμα αρχικής μορφής/μεταβολισμένης μορφής παίρνει τιμές μεγαλύτερες του 85%. Βέβαια, μετά την προσπάθεια χαρακτηρισμού της μικρής ποσότητας των μεταβολιτών στα κόπρανα, εκτιμήθηκε ότι υπάρχουν έξι μεταβολίτες, εκ των οποίων οι δύο είναι όρθο-OH-τέτρα-BDEs, ο ένας είναι μέτα-OH-τέτρα-BDE, άλλοι δύο είναι πάρα-OH-τέτρα-BDEs, ενώ υπάρχουν και ίχνη ενός θειολο(SH)-τέτρα-BDE μεταβολίτη. Πρέπει να αναφερθεί ότι περαιτέρω ανάλυση δεν πραγματοποιήθηκε στα ούρα, λόγω της ελάχιστης ποσότητας του ιχνηθετημένου μέλους σε αυτά.

Με βάση την ίδια μελέτη των Orn και Klasson-Wehler (1998), φαίνεται ότι σε αντίθεση με τους αρουραίους, τα ποντίκια έχουν μεγαλύτερη ικανότητα μεταβολισμού του ιχνηθετημένου μέλους ¹⁴C-BDE-47. Περίπου το 33% μιας δόσης 14.5 mgr/kg που επίσης δόθηκε δια στόματος σε ποντίκια, απεκκρίθηκε με τα ούρα μέσα σε πέντε ημέρες. Μάλιστα, μόνο το 20% περίπου του μέλους που βρέθηκε στα ούρα ήταν στην αρχική του μορφή. Ωστόσο, το υπόλοιπο ποσοστό (το οποίο αντιστοιχούσε στο μεταβολισμένο μέλος) δεν μπόρεσε να χαρακτηριστεί. Βέβαια, υπήρξε η υποψία της αποσύνθεσης του μέλους αυτού σε μικρότερες ενώσεις. Επίσης, αναφέρεται ότι πάνω από το 20% της δόσης που χορηγήθηκε, απεκκρίθηκε με τα κόπρανα μέσα σε πέντε ημέρες, όπου επίσης το μεγαλύτερο ποσοστό του μέλους ήταν σε μεταβολισμένη μορφή. Μάλιστα, οι μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν υποστηρίζεται ότι είναι οι ίδιοι με αυτούς που ανιχνεύτηκαν στους αρουραίους. Τελικά, μόνο το 47% περίπου της αρχικής δόσης παρέμεινε στους διάφορους ιστούς τις πρώτες πέντε ημέρες. Στους ιστούς αυτούς (λιπώδης ιστός, πνεύμονες, ήπαρ και νεφρά) η βιοσυγκέντρωση του ιχνηθετημένου μέλους βρέθηκε περίπου η ίδια, με βάση την κλίμακα αναγωγής σε λιπιδικό

βάρος. Τέλος, στη συγκεκριμένη εργασία αναφέρεται και η δυνατότητα σχηματισμού δραστικών ενδιάμεσων επίσης σε πνεύμονες, ήπαρ και νεφρά. Συγκεκριμένα στο ήπαρ, αναμένεται η παρουσία επτά μεταβολιτών (πέντε μόνο-OH-τέτρα-BDEs και δύο μόνο-OH-τρι-BDEs μεταβολιτών), παρόλο που πάνω από το 99% του ιχνηθετημένου μέλους βρίσκεται εκεί στην αρχική του μορφή.

Ο Hakk et al. (2002) μελέτησαν αυτή τη φορά, τη τύχη του ιχνηθετημένου μέλους ¹⁴C-BDE-99 στους ιστούς και τις απεκκρίσεις συμβατικών αρουραίων. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκαν δια του στόματος 2.2 mgr/kg του μέλους αυτού σε αρουραίους. Καταρχήν, αναφέρεται ότι το μέλος αυτό παρέμεινε κατά βάση σε λιπόφιλους ιστούς μετά από 72 ώρες, όπως στο λιπώδη ιστό και το δέρμα. Κανένας άλλος ιστός δεν περιείχε πάνω από 1% της αρχικής δόσης μέχρι εκείνη τη χρονική στιγμή. Βέβαια, ίχνη από υδρόξυ- μεταβολίτες βρέθηκαν στο ήπαρ, παρόλο που στους παραπάνω ιστούς βρέθηκε μόνο η αρχική μορφή του μέλους. Έπειτα, βρέθηκε ότι ο μεταβολισμός του σε υδατοδιαλυτά παράγωγα είναι ελάχιστος, αφού το συνολικό ποσοστό της αρχικής δόσης στα ούρα των αρουραίων ήταν κάτω από 1% μετά από 72 ώρες. Το ποσοστό αυτό ανήκει αποκλειστικά σε μεταβολίτες, οι οποίοι όμως δεν χαρακτηρίστηκαν. Ωστόσο, βρέθηκε ότι η απομάκρυνση του μέλους αυτού μέσω των κοπράνων είναι ο κύριος τρόπος περιορισμού τους στον οργανισμό των αρουραίων, αφού το συνολικό ποσοστό της αρχικής δόσης στα κόπρανα των αρουραίων ήταν ίσο με 43% μετά από 72 ώρες. Στα κόπρανα μάλιστα, βρέθηκαν ιχνηθετημένοι μεταβολίτες, οι οποίοι σε αρκετές περιπτώσεις είχαν τη τάση να μετατρέπονται στην αρχική μορφή του ιχνηθετημένου μέλους. Ως επαλήθευση, αναφέρεται ότι τα κόπρανα περιέχουν χαμηλές ποσότητες μεταβολιτών (<10% της συνολικής παρουσίας του ιχνηθετημένου μέλους στους ιστούς), ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό του μέλους εκεί βρίσκεται στην αρχική του μορφή. Μετά την προσπάθεια χαρακτηρισμού της μικρής ποσότητας των μεταβολιτών στα κόπρανα (με ταυτόχρονο χαρακτηρισμό κοπράνων και άλλου τύπου αρουραίου), εκτιμήθηκε ότι υπάρχουν εννέα

μεταβολίτες, εκ των οποίων οι δύο είναι μόνο-OH-πέντα-BDEs, άλλοι δύο είναι μόνο-OH-τέτρα-BDEs, τρεις είναι δι-OH-πέντα-BDEs, ενώ υπάρχουν και δύο θειολο(SH)-πέντα-BDEs μεταβολίτες.

Όσον αφορά το μέλος BDE-209, οι El Dareer et al. (1987) μετά την εισαγωγή του μέλους αυτού στην τροφή αρσενικών αρουραίων του τύπου Fisher 344, κατέληξαν στο ότι η απορρόφησή του στα έντερα είναι ελάχιστη και ανεξάρτητη της συγκέντρωσής της δόσης (σ' ένα εύρος 0.025-5.0% της συνολικής διατροφής). Γενικότερα, η συνολική απορρόφησή του στους ιστούς είναι ελάχιστη (<1% της δόσης), με το ήπαρ να περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό του μέλους, το οποίο από 0.449% μετά από 24 ώρες λήψης της δόσης, έπεσε στο 0.016% στις 72 ώρες. Πάνω από το 99% της δόσης απεκκρίθηκε με τα κόπρανα μετά από 72 ώρες, ενώ μόνο το 0.012% απεκκρίθηκε με τα ούρα στο ίδιο χρονικό διάστημα. Τα κόπρανα μάλιστα περιείχαν και μεταβολίτες, οι οποίοι αν και δεν χαρακτηρίστηκαν, αποτελούσαν το 1.5-27.9% της συνολικής ποσότητας του μέλους αυτού στα κόπρανα. Στην ίδια μελέτη, αναφέρονται επίσης τα αποτελέσματα της βιοδιαθεσιμότητας του μέλους αυτού στους αρουραίους, μετά από ενδοφλέβια δόση 1.07 mgr/kg. Βρέθηκε ότι το 74% της δόσης απεκκρίθηκε με τα κόπρανα μετά από 72 ώρες, ενώ μόνο το 0.13% απεκκρίθηκε με τα ούρα στο ίδιο χρονικό διάστημα. Τα κόπρανα επίσης περιείχαν μεταβολίτες, οι οποίοι αν και δεν χαρακτηρίστηκαν, αποτελούσαν το 63% της συνολικής ποσότητας του μέλους αυτού στα κόπρανα. Τέλος, μέσω της ενδοφλέβιας δόσης οι μύες και το δέρμα απορρόφησαν το 12.9 και το 7.25% αντίστοιχα.

Σε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού των μεταβολιτών του μέλους BDE-209 που περιέχονται στα κόπρανα των αρουραίων, οι Morck και Klasson-Wehler (2001), χορήγησαν δια στόματος 3.0 mgr/kg του μέλους αυτού σε αρσενικούς αρουραίους του τύπου Sprague-Dawley. Βρέθηκε, ότι πάνω από το 90% της δόσης απεκκρίθηκε με τα κόπρανα μετά από 72 ώρες, ενώ μόνο το 0.05% απεκκρίθηκε με τα ούρα στο ίδιο χρονικό διάστημα. Μετά την προσπάθεια χαρακτηρισμού των μεταβολιτών στα κόπρανα (με ταυτόχρονο

χαρακτηρισμό κοπράνων και άλλου τύπου αρουραίου), εκτιμήθηκε ότι οι μεταβολίτες αυτοί προέρχονται από οξειδωτική αποβρωμίωση του μέλους και περιλαμβάνουν μονο-OH- και όρθο-MeO-OH- BDEs. Η μεθόξυ- ομάδα εκτιμάται ότι εισάγεται μέσω της catechol-O-methyl τρανοφεράσης, παρόλο που η πορεία σχηματισμού της εικαζόμενης ενδιάμεσης όρθο-κατεχόλης δεν είναι γνωστή. Είναι γνωστό όμως, ότι οι μεταβολίτες της όρθο-κατεχόλης έχουν τη δυνατότητα να οξειδωθούν σε κινόνες, οι οποίες είναι πολύ δραστικά ενδιάμεσα, οπότε μπορεί να εξηγηθεί η μεγάλη απορρόφησή τους στα κόπρανα. Τέλος, επειδή ο σχηματισμός ενός κυκλικού αρωματικού επόξυ-ενδιαμέσου είναι απίθανος στην περίπτωση του μέλους BDE-209 (όπου όλοι οι άνθρακες είναι βρωμιωμένοι), αναφέρεται ότι η αποβρωμίωση προηγείται της οξείδωσης. Ωστόσο, τα μόνα μέλη PBDEs που βρέθηκαν μετά την αποβρωμίωση, ήταν οι εννια-BDEs.

1.5.3.4. Προτεινόμενοι μηχανισμοί στο αίμα ποντικών:

Ο Xinghua Qiu et al. (2007), συνέλεξαν πλάσμα αίματος ποντικών για να εξηγήσουν λεπτομερέστερα τη μεταβολική πορεία των PBDEs σε αυτά, αλλά και να επιβεβαιώσουν αρκετά δεδομένα μέχρι εκείνη τη στιγμή. Για το σκοπό των πειραμάτων, χορηγήθηκαν σε ποντίκια είτε δια του στόματος είτε υποδερμικά, 45 mg/kg DE-71, ενός εμπορικού πέντα-BDE μείγματος. Μετά τη διαδικασία των εκχυλίσεων στο πλάσμα, μπόρεσαν να διαχωριστούν τα κλάσματα που περιείχαν τις ουδέτερες και τις φαινολικές ενώσεις των PBDEs αντίστοιχα.

Καταρχήν, τα επικρατέστερα μέλη PBDEs που υπάρχουν στο εμπορικό αυτό μείγμα, είναι τα μέλη BDE-47 και BDE-99 σε περίπου ίδιες ποσότητες (επικρατεί το δεύτερο μέλος), ενώ ακολουθούν τα μέλη BDE-100, BDE-153 και BDE-154. Σε μικρότερες τέλος ποσότητες, βρίσκονται τα μέλη BDE-28 και BDE-85. Στο κλάσμα με τους ουδέτερους (μη-μεταβολισμένους) PBDEs, φάνηκε ότι οι λόγοι των μελών BDE-47, BDE-100 και BDE-154 ως προς το μέλος BDE-99, ήταν σχεδόν οι ίδιοι με τους αντίστοιχους στο εμπορικό μείγμα. Ωστόσο, ο λόγος αυτός για το μέλος BDE-153 βρέθηκε πολύ

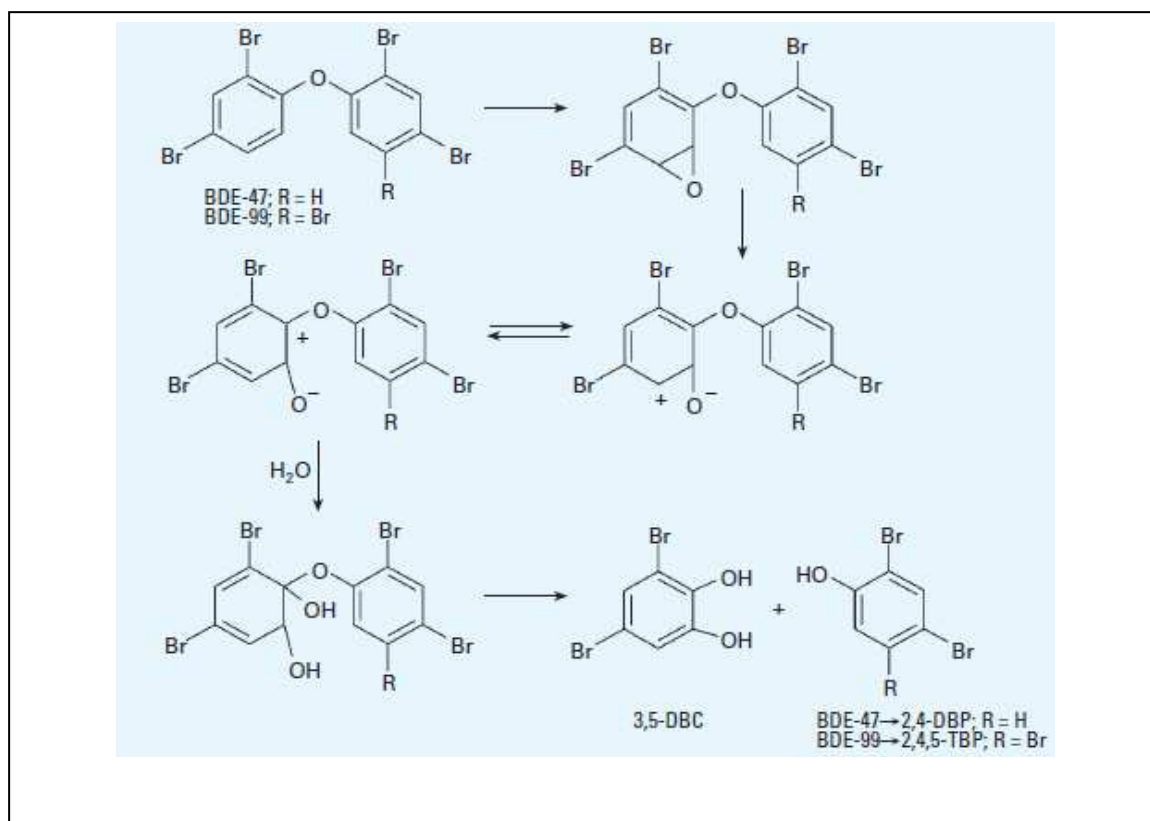
υψηλότερος από τον αναμενόμενο, τόσο μετά τη χορήγηση δια του στόματος, όσο και μετά την ενδοφλέβια χορήγηση. Το γεγονός αποδεικνύει την υψηλή βιοδιαθεσιμότητα του μέλους αυτού, αλλά και την αδυναμία μεταβολισμού του (Qiu et al., 2007).

Το συμπέρασμα αυτό, μπορεί να εξαχθεί και αν σκεφτούμε ότι οι κύριες διεργασίες που απομακρύνουν τους PBDEs από το αίμα, είναι η μεταφορά τους σε άλλους ιστούς καθώς και ο μεταβολισμός τους. Από τη στιγμή όμως, που η κύρια αποθήκη του μέλους BDE-153 έχει βρεθεί ότι είναι ο λιπώδης ιστός και από τη στιγμή που το μέλος αυτό υπάρχει πιθανότητα να βρεθεί εκεί σε συγκεντρώσεις ανάλογες ή και υψηλότερες με αυτές του μέλους BDE-99, προκύπτει ότι η μοναδική αιτία που μπορεί να εξηγήσει τα υψηλά επίπεδά του στο αίμα, είναι ένας διαφορετικός τρόπος μεταβολισμού. Πιθανολογείται μάλιστα, ότι το μέλος αυτό είναι ανθεκτικό στην ενζυμική αποσύνθεση στο ήπαρ του ποντικού. Αυτό εικάζεται διότι το ήπαρ είναι ο κύριος ιστός στον οποίο οι χημικές ενώσεις μεταβολίζονται, οπότε μάλλον δεν υπάρχει ενζυμική εκλεκτικότητα για τον εκεί μεταβολισμό του (Qiu et al., 2007).

Σε ότι αφορά τώρα το κλάσμα των φαινολικών ενώσεων, εκεί εκτός από αναμενόμενους μεταβολισμένους υδρόξυ- PBDEs, ανιχνεύτηκαν και κάποιες βρωμοφαινόλες. Συγκεκριμένα, οι έξι υδρόξυ- PBDEs που ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν ήταν οι: 4'-HO-BDE-17, 2'-HO-BDE-28, 4-HO-BDE-42, 3-HO-BDE-47, 6-HO-BDE-47 και ο 4'-HO-BDE-49. Επίσης, ανιχνεύτηκε και ο 4-HO-BDE-90, ο οποίος όμως δεν μπόρεσε να ποσοτικοποιηθεί λόγω συνέκλουσης με άλλη κορυφή. Τέλος, οι τρεις βρωμοφαινόλες που ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν ήταν οι: 2,4-DBP, 2,4,5-TBP και η 2,4,6-TBP. Με βάση όλους αυτούς τους μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν, προτάθηκαν τρεις πιθανοί μηχανισμοί για την μεταβολική τύχη των PBDEs στα ποντίκια, οι οποίοι είναι: η διάσπαση του δεσμού του διφαινυλικού αιθέρα, η υδροξυλίωση και τέλος η αποβρωμίωση/υδροξυλίωση (Qiu et al., 2007).

α. Διάσπαση του δεσμού του διφαινυλικού αιθέρα:

Καταρχήν, παραλείποντας την 2,4,6-TBP (εξαιτίας της υψηλής παρουσίας της στα τυφλά δείγματα), η παρουσία των βρωμοφαινολών 2,4-DBP και 2,4,5-TBP δηλώνει σίγουρα τη διάσπαση του δεσμού του διαφαινυλαιθέρα. Συγκεκριμένα, όπως προβλέπεται στο σχήμα της Εικόνας 10 που παρουσιάζεται παρακάτω, η 2,4-DBP είναι μεταβολίτης του μέλους BDE-47, ενώ η 2,4,5-TBP είναι μεταβολίτης του μέλους BDE-99.



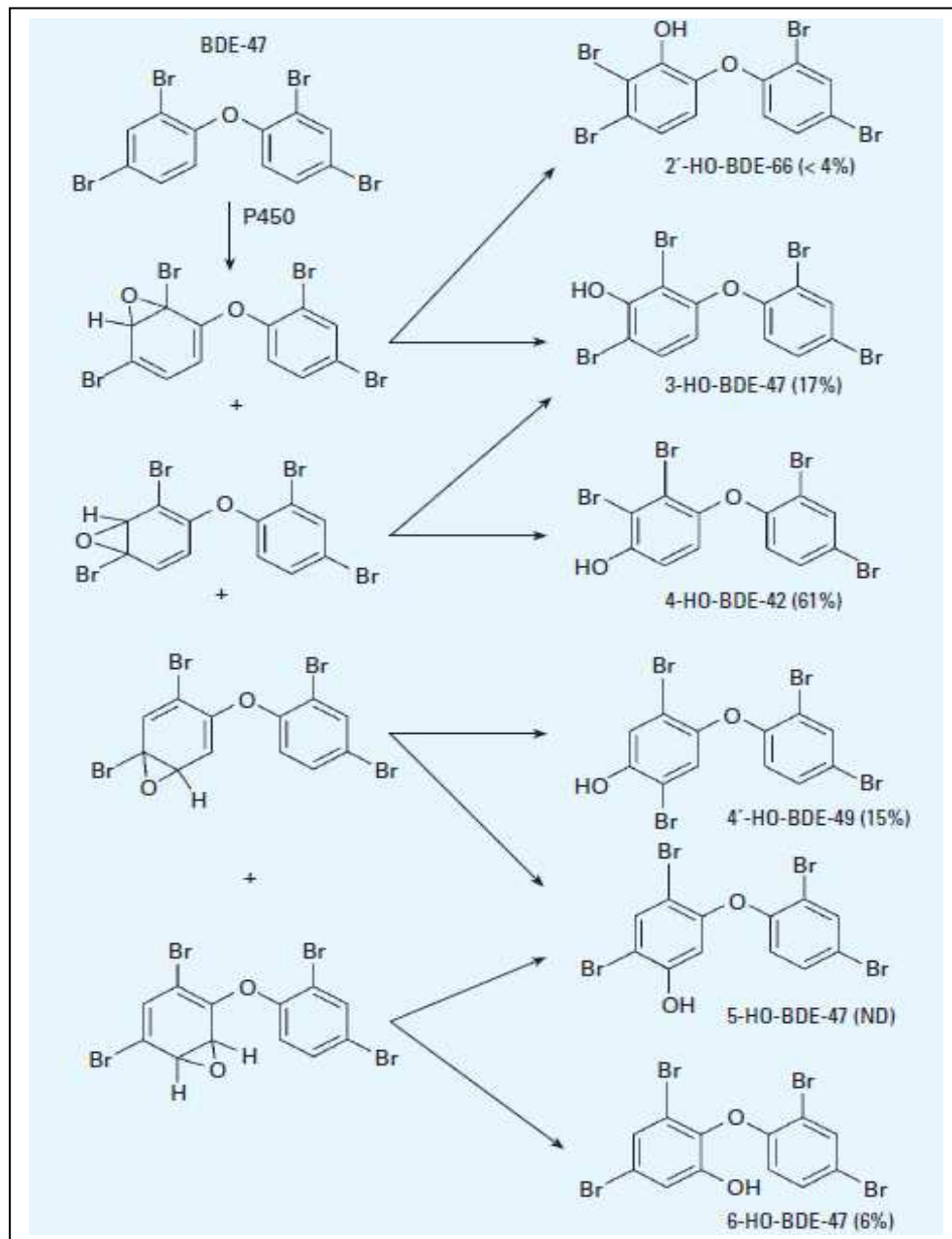
Εικόνα 10: Προτεινόμενος μηχανισμός για τη διάσπαση του δεσμού του διαφαινυλαιθέρα των μελών BDE-47 και BDE-99 στα ποντίκια (Qiu et al., 2007)

Με βάση αυτόν τον μηχανισμό, τα μέλη BDE-47 και BDE-99 μπορούν να σχηματίσουν ένα κυκλικό αρωματικό επόξυ- ενδιάμεσο, το οποίο με πυρηνόφιλη προσβολή ενός μορίου νερού μπορεί να οδηγήσει σε μια νέα διφαινυλική δομή, η οποία τελικά υφίσταται διάσπαση του δεσμού του διαφαινυλαιθέρα. Πληροφορίες σχετικά με τα απαιτούμενα ένζυμα για τη διάσπαση, δεν αναφέρονται στη συγκεκριμένη εργασία. Ωστόσο, επειδή αναφέρεται ότι οι συγκεντρώσεις των δύο προαναφερθέντων βρωμοφαινολών ήταν υψηλότερες σε σχέση με τις περισσότερες συγκεντρώσεις των υδρόξυ-PBDEs, προτάθηκε ότι ο μηχανισμός αυτός αποτελεί ένα σημαντικό μεταβολικό μονοπάτι για τους PBDEs στα ποντίκια.

Τέλος, αναφέρεται ότι ο λόγος της συγκέντρωσης της 2,4-DBP ως προς τη συγκέντρωση της 2,4,5-TBP, βρέθηκε ίσος με 0.89, τιμή παραπλήσια του λόγου της συγκέντρωσης του BDE-47 ως προς τη συγκέντρωση του BDE-99 στο εμπορικό μείγμα DE-71, ο οποίος είναι ίσος με 0.82. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι ο μηχανισμός αυτός έχει μια λογική βάση. Ωστόσο, πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, αφού ειδικά ο σχηματισμός μιας βρωμοκατεχόλης (βλ. 3,5-DBC στο σχήμα) δεν έχει αναφερθεί ποτέ ξανά ως τελικός μεταβολίτης των PBDEs σε τρωκτικά ή άλλα ζώα. Εξάλλου, ούτε στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η συγκεκριμένη ένωση, εξαιτίας της έλλειψης του ανάλογου πρότυπου διαλύματος.

β. Υδροξυλίωση:

Η υδροξυλίωση, έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα σημαντικό μεταβολικό μονοπάτι για τους PBDEs στα ζώα. Με βάση την υπόθεση ότι όλοι οι OH-τέτρα-BDEs προέρχονται από ένα κυκλικό αρωματικό επόξυ- ενδιάμεσο του μέλους BDE-47, και ότι όλοι αυτοί οι μεταβολίτες έχουν τον ίδιο χρόνο παραμονής στο αίμα των ποντικιών, τότε ο μηχανισμός που προτείνεται για το σχηματισμό τους, παρουσιάζεται στην Εικόνα 11 που ακολουθεί:



Εικόνα 11: Προτεινόμενος μηχανισμός για την υδροξυλίωση του μέλους BDE-47 στα ποντίκια, και ποσοστό των μεταβολιτών του με βάση τη βιβλιογραφική αναφορά Qiu et al., 2007

Καταρχήν, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η υδροξυλίωση των PBDEs απαιτεί την παρουσία ενζύμων του κυτοχρώματος P450, τα οποία ευθύνονται τόσο για την απευθείας υδροξυλίωση, όσο και για την υδροξυλίωση μέσω 1,2 μετατόπισης των μελών αυτής της οικογένειας. Για παράδειγμα, οι μεταβολίτες 3-HO-BDE-47 και 6-HO-BDE-47 προέρχονται με απευθείας

υδροξυλίωση του μέλους BDE-47, ενώ οι μεταβολίτες 4-HO-BDE-42 και 4'-HO-BDE-49 προέρχονται μέσω 1,2 μετατόπισης του μέλους αυτού. Μάλιστα, αξιοσημείωτο είναι ότι αυτοί οι δύο παρά-OH-PBDEs, αποτέλεσαν πάνω από το 75% των OH-τέτρα-BDEs στη συγκεκριμένη εργασία. Το γεγονός αυτό, μάλλον υποδηλώνει ότι κατά την υδροξυλίωση του μέλους BDE-47, η ομάδα OH- προτιμά να τοποθετηθεί σε παρά- θέση στο διφαινυλικό δακτύλιο, με μια παράλληλη 1,2 μετατόπιση του αρχικού παρά- ατόμου βρωμίου.

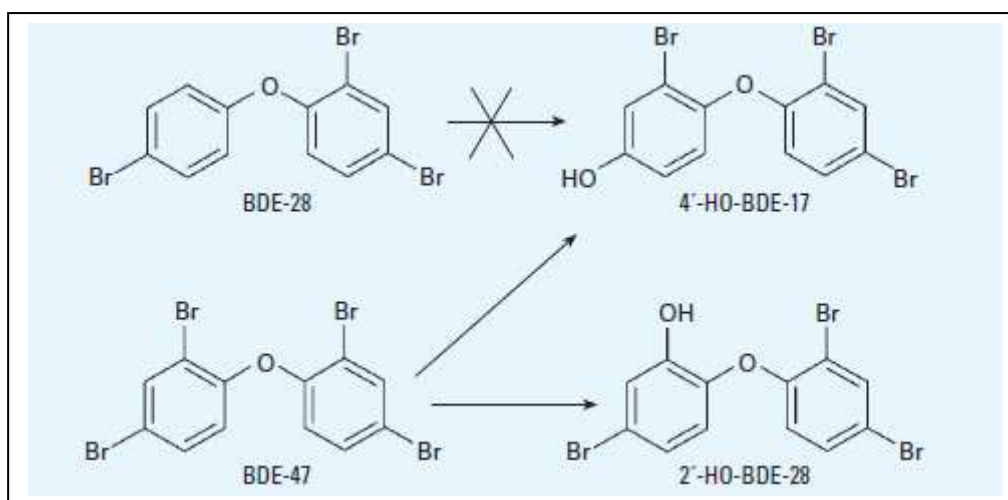
Εκτός όμως από τον επιλεκτικό σχηματισμό των μεταβολιτών 4-HO-BDE-42 και 4'-HO-BDE-49, τα υψηλά ποσοστά τους στο αίμα των ποντικών μπορεί να υποδηλώνουν και την εκτεταμένη παραμονή τους εκεί, και μάλιστα ότι έχουν σπουδαίο βιολογικό ρόλο. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι αυτοί οι μεταβολίτες έχουν τέσσερις φορές υψηλότερη συγγένεια με την ανθρώπινη TTR, σε σχέση με τη θυροξίνη (T4). Συνεπώς, οι παρά-OH-PBDEs, μάλλον είναι οι περισσότερο thyroxine-like OH-PBDEs. Σε κάθε περίπτωση πάντως, οι ενώσεις αυτές χρίζουν μεγαλύτερης τοξικολογικής προσοχής.

Πρέπει επίσης να αναφέρουμε, ότι ο μεταβολίτης 2'-HO-BDE-66 ουσιαστικά δεν ποσοτικοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, διότι συνεκλούεται με τον μεταβολίτη 3-HO-BDE-47, ο οποίος τελικά είναι αυτός που ποσοτικοποιήθηκε, διότι μέσω του φάσματος μάζας βρέθηκε ότι η κοινή κορυφή αντιστοιχεί κυρίως στη δεύτερη ένωση. Βέβαια, εκτός από όλους τους παραπάνω μόνο-OH-τέτρα-BDEs, στην εργασία αυτή βρέθηκε και ένας δι-OH-τέτρα-BDE, ο οποίος ωστόσο δεν μπόρεσε να προσδιοριστεί ακριβώς.

Τέλος, εκτός από τους OH-τέτρα-BDEs, στη συγκεκριμένη εργασία ανιχνεύτηκαν και τρεις OH-πέντα-BDEs (πιθανώς προερχόμενοι από το μέλος BDE-99), από τους οποίους βέβαια προσδιορίστηκε ο ένας (ο παρά- 4-HO-BDE-90), πάλι εξαιτίας της έλλειψης πρότυπων διαλυμάτων. Ωστόσο, οι άλλοι δύο που δεν προσδιορίστηκαν βρίσκονταν σε μεγαλύτερη αφθονία, και μάλιστα τα φάσματα μάζας τους έδειξαν ότι η ομάδα OH- βρίσκεται σε μετά- θέση στο διφαινυλικό δακτύλιο, δείχνοντας μια διαφορετική προτίμηση σε σχέση με τους παρά- OH-τέτρα-BDEs.

γ. Αποβρωμίωση και Υδροξυλίωση:

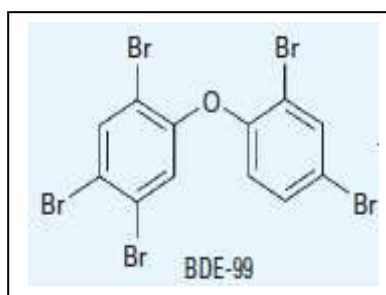
Η αποβρωμίωση ακολουθούμενη από υδροξυλίωση, είναι επίσης ένα γνωστό μεταβολικό μονοπάτι για τους PBDEs. Στη συγκεκριμένη εργασία, βρέθηκαν δύο ΟΗ-τρι-BDEs, ο 4'-HO-BDE-17 και ο 2'-HO-BDE-28. Παρόλο που όπως αναφέραμε, στο εμπορικό μείγμα DE-71 βρέθηκαν και ίχνη του τρι-BDE-28 και παρόλο που το μέλος αυτό επίσης ανιχνεύτηκε στο αίμα των ποντικών, οι υψηλές συγκεντρώσεις που βρέθηκαν για τους δύο παραπάνω μεταβολίτες, δεν είναι λογικό να προέρχονται από απευθείας υδροξυλίωση του μέλους BDE-28. Είναι πιο λογικό να υποθέσουμε ότι αυτά τα δύο ισομερή προέρχονται από μια διαδικασία αποβρωμίωσης/υδροξυλίωσης ενός πιο άφθονου μέλους με μεγαλύτερο βαθμό βρωμίωσης, όπως το μέλος BDE-47 (βλ. Εικόνα 12). Εξάλλου, δεν υπάρχουν στοιχεία που να δηλώνουν ότι ένα άτομο βρωμίου είναι δυνατόν να μετατοπιστεί από μια πάρα- σε μια όρθο- θέση στο διφαινυλαιθέρα, όπως απαιτείται στη συγκεκριμένη περίπτωση.



Εικόνα 12: Η αποβρωμίωση/υδροξυλίωση του μέλους BDE-47 μπορεί να οδηγήσει σε ΟΗ-τρι-BDEs μεταβολίτες, ενώ του μέλους BDE-28 δεν μπορεί (Qiu et al., 2007)

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών αυτής της κατηγορίας, βρέθηκαν αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που προκύπτουν με απευθείας υδροξυλίωση. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι η απευθείας υδροξυλίωση αποτελεί

σημαντικότερη διαδικασία σε σχέση με την αποβρωμίωση/υδροξυλίωση, τουλάχιστον για το μέλος BDE-47 στο οποίο αναφερόμαστε. Σε αυτό το σημείο, πρέπει επίσης να σχολιαστεί το ότι οι HO-τέτρα-BDEs που αναφέραμε, υποθέσαμε ότι προέρχονται αποκλειστικά από απευθείας υδροξυλίωση του μέλους BDE-47, ενώ με βάση την τελευταία μεταβολική πορεία, θα μπορούσαν να προέρχονται και από την αποβρωμίωση/υδροξυλίωση του μέλους BDE-99. Κάτι τέτοιο όμως κρίνεται απίθανο, εάν γίνει η σύγκριση των συντακτικών δομών των μελών BDE-47 και BDE-99, με τις αντίστοιχες δομές των HO-τέτρα-BDEs.



Εικόνα 13: Η συντακτική δομή του μέλους BDE-99 (Qiu et al., 2007)

1.5.3.5. Προτεινόμενοι μηχανισμοί στο ανθρώπινο αίμα:

Η ίδια ομάδα επιστημόνων (Xinghua Qiu et al., 2009), συνέλεξε πλάσμα αίματος εγκύων γυναικών και των εμβρύων τους, προκειμένου να εξετάσουν πιθανή συσχέτιση της μεταβολικής πορείας των PBDEs σε ανθρώπους και ποντίκια. Συγκεκριμένα, 16 δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από τον ομφάλιο λόρο 16 νεογνών αμέσως μετά τον τοκετό. Επίσης, συλλέχθηκαν και 4 μητρικά δείγματα αίματος. Με τη συμπλήρωση ενός ερωτηματολογίου, οι συγκεκριμένες 4 γυναίκες δεν φάνηκε να έχουν οποιαδήποτε αναγνωρίσιμη επαγγελματική έκθεση σε PBDEs. Όλα τα δείγματα, μετά τη συλλογή τους φυλάχθηκαν στους 4 °C. Ακολούθησε η φυγοκέντρησή τους στις 800 rpm, ώστε να απομονωθεί το κάθε πλάσμα, το οποίο έπειτα καταψύχθηκε στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή του. Μετά τη διαδικασία των εκχυλίσεων, μπόρεσαν να διαχωριστούν τα κλάσματα που περιείχαν τις ουδέτερες και τις φαινολικές ενώσεις των PBDEs αντίστοιχα.

Καταρχήν, σε ότι αφορά τους ουδέτερους PBDEs, και στα 20 ληφθέντα δείγματα ανιχνεύτηκαν τα 6 κύρια μέλη που υπάρχουν στο εμπορικό πέντα-μείγμα DE-71, το οποίο η συγκεκριμένη ομάδα επιστημόνων χρησιμοποίησε σαν δείγμα αναφοράς, τόσο στην προηγούμενη όσο και στην παρούσα μελέτη. Να θυμήσουμε ότι τα μέλη αυτά είναι τα εξής: BDE-28, -47, -99, -100, -153 και -154. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το ποσοστό του μέλους BDE-99 (το επικρατέστερο μέλος στο μείγμα DE-71) βρέθηκε πολύ χαμηλότερο στα ανθρώπινα δείγματα σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό στο εμπορικό πέντα-μείγμα. Αντιθέτως, τα ποσοστά των μελών BDE-47 και BDE-153 ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά στο εμπορικό πέντα-μείγμα. Αυτό συνεπάγεται ότι το ουδέτερο μέλος BDE-99 κατανέμεται λιγότερο στο αίμα, πιθανώς επειδή μεταβολίζεται ευκολότερα. Πράγματι, όπως έχουμε αναφέρει, έχει αποδειχθεί ότι το συνηθέστερα επικρατέστερο μέλος PBDEs στο ανθρώπινο αίμα είναι το μέλος BDE-47, ενώ στο αίμα κατοίκων λιγότερο εκτεθειμένων περιοχών έχει βρεθεί ότι το επικρατέστερο μέλος αυτής της οικογένειας μπορεί να είναι και το μέλος BDE-153 (Qiu et al., 2009).

Σε ότι αφορά τώρα το κλάσμα των φαινολικών ενώσεων, εκεί εκτός από αναμενόμενους μεταβολισμένους υδρόξυ- PBDEs, ανιχνεύτηκαν και κάποιες βρωμοφαινόλες, όπως και στην περίπτωση των ποντικών. Συγκεκριμένα, οι επτά υδρόξυ- PBDEs που ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν ήταν οι: 4-HO-BDE-42, 3-HO-BDE-47, 5-HO-BDE-47, 6-HO-BDE-47, 4'-HO-BDE-49, 5'-HO-BDE-99 και ο 6'-HO-BDE-99, μέλη όχι ακριβώς ίδια με τα αντίστοιχα στα ποντίκια. Από την άλλη, οι τρεις βρωμοφαινόλες που ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν ήταν οι ίδιες με αυτές στα ποντίκια, δηλαδή οι: 2,4-DBP, 2,4,5-TBP και η 2,4,6-TBP. Τέλος, ο μέσος λόγος των συγκεντρώσεων όλων αυτών των υδρόξυ- μεταβολιτών ως προς τις συγκεντρώσεις των ουδέτερων μελών PBDEs, βρέθηκε ίσος με 0.85. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει συγκρίσιμες ποσότητες των δύο αυτών κατηγοριών, καθώς και υψηλή βιοδιαθεσιμότητα των μεταβολιτών των PBDEs στο ανθρώπινο αίμα (Qiu et al., 2009).

Με βάση όλα αυτά τα δεδομένα, προτάθηκαν δυο πιθανοί μηχανισμοί για την μεταβολική τύχη των PBDEs στους ανθρώπους, οι οποίοι είναι: η διάσπαση του δεσμού του διφαινυλικού αιθέρα και φυσικά η υδροξυλίωση (Qiu et al., 2009).

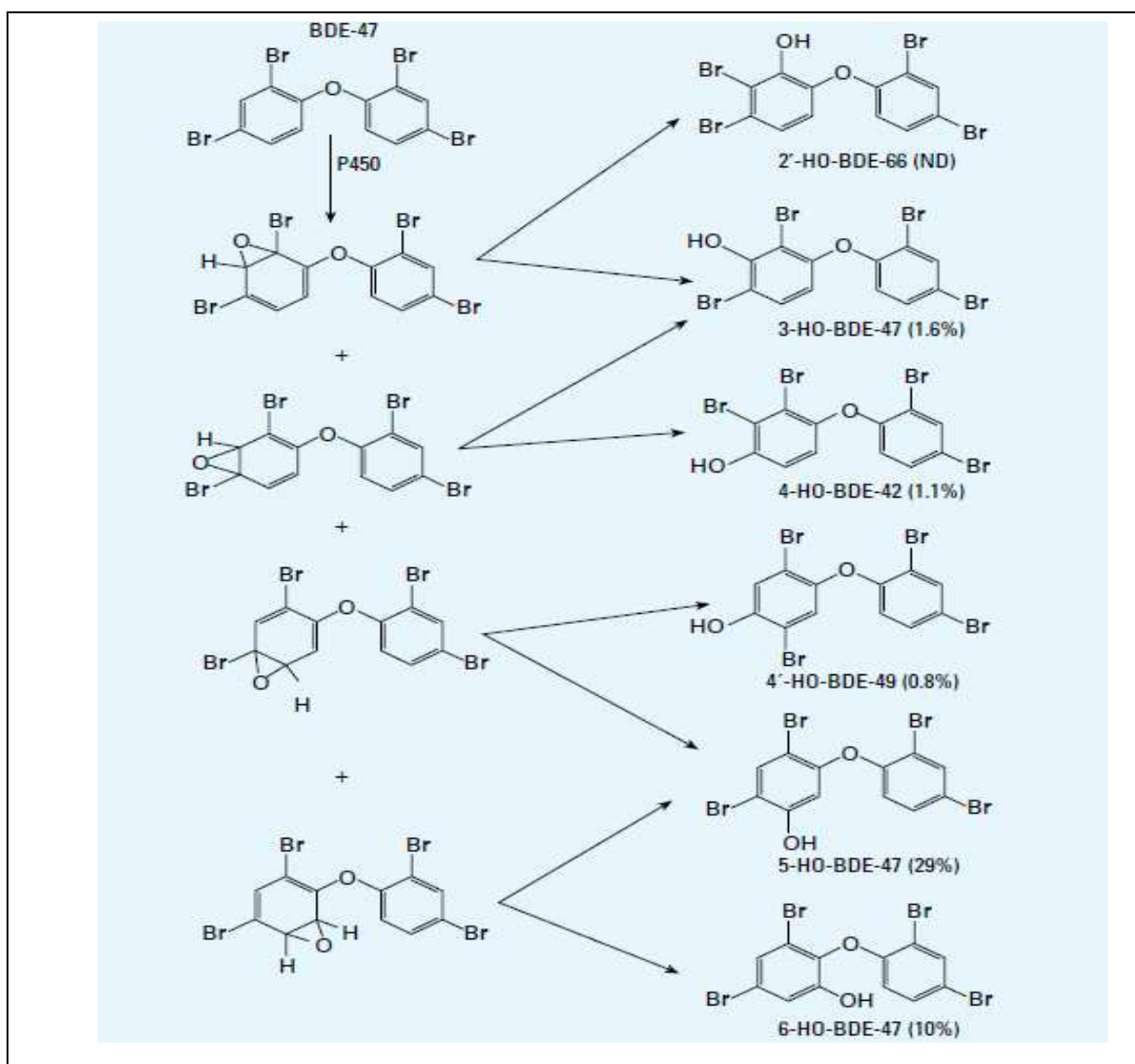
α. Διάσπαση του δεσμού του διφαινυλικού αιθέρα:

Καταρχήν, όπως και στην περίπτωση του αίματος των ποντικών, η παρουσία των τριών βρωμοφαινόλων, δηλώνει σίγουρα τη διάσπαση του δεσμού του διφαινυλαιθέρα. Συγκεκριμένα, όπως αναφέραμε και στην ενότητα 1.5.3.4, η 2,4-DBP είναι πιθανός μεταβολίτης του μέλους BDE-47, ενώ η 2,4,5-TBP είναι πιθανός μεταβολίτης του μέλους BDE-99. Τέλος, με μια ανάλογη μηχανιστική λογική (η οποία περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός κυκλικού αρωματικού επόξυ- ενδιάμεσου), η 2,4,6-TBP μπορεί να είναι μεταβολίτης τόσο του μέλους BDE-100, όσο και του μέλους BDE-154.

Σε αυτό το σημείο, πρέπει να αναφέρουμε ότι οι δύο από τις τρεις βρωμοφαινόλες, και συγκεκριμένα η 2,4-DBP και η 2,4,6-TBP, εμφανίστηκαν στα τυφλά δείγματα της χρησιμοποιούμενης μεθόδου της συγκεκριμένης μελέτης. Εξάλλου, έχει γίνει γνωστό ότι οι δύο αυτές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως επιβραδυντικά φλόγας στη βιομηχανία (WHO 1997). Ωστόσο, η παρουσία τους στο αίμα σε επίπεδα τουλάχιστον δεκαπλάσια από τα αντίστοιχα επίπεδα στα τυφλά δείγματα, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τη μήτρα του πραγματικού δείγματος. Μάλιστα, ο μέσος λόγος των συγκεντρώσεων των βρωμοφαινόλων ως προς τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων υδρόξυ- PBDEs, βρέθηκε ίσος με 0.52. Συνεπώς, μπορούμε να καταλήξουμε στο ότι παρόλο που οι βρωμοφαινόλες μπορεί να προέρχονται και από άλλες πηγές, οι συγκεντρώσεις τους στο ανθρώπινο αίμα σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των υπόλοιπων υδρόξυ- PBDEs, είναι μια ισχυρή απόδειξη για το ότι η διάσπαση του δεσμού του διφαινυλικού αιθέρα είναι ένα σημαντικό μεταβολικό μονοπάτι για τους PBDEs στους ανθρώπους.

β. Υδροξυλίωση:

Με βάση την υπόθεση ότι όλοι οι ΟΗ-τέτρα-ΒDEs προέρχονται από ένα κυκλικό αρωματικό επόξυ- ενδιάμεσο του μέλους ΒDE-47, και ότι όλοι αυτοί οι υδροξυ- μεταβολίτες έχουν τον ίδιο χρόνο παραμονής στο ανθρώπινο αίμα, τότε ο μηχανισμός που μπορεί να προταθεί για το σχηματισμό τους παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα (Εικόνα 14), και λογικά, είναι ακριβώς ο ίδιος με αυτόν που ισχύει και στα ποντίκια:



Εικόνα 14: Προτεινόμενος μηχανισμός για την υδροξυλίωση του μέλους ΒDE-47 στον άνθρωπο, και ποσοστό των μεταβολιτών του με βάση τη βιβλιογραφική αναφορά Qiu et al.,

2009

Καταρχήν, σε σχέση με το αίμα των ποντικών όπου οι επικρατέστεροι ΟΗ-τέτρα-BDEs βρέθηκαν ότι είναι ο 4-OH-BDE-42 και ο 4'-HO-BDE-49 και οι οποίοι προέρχονται από 1,2 μετατόπιση του μέλους BDE-47, στο ανθρώπινο αίμα η κατάσταση είναι διαφορετική, αφού επικρατούν οι μεταβολίτες 5-OH-BDE-47 και 6-OH-BDE-47 οι οποίοι δεν προέρχονται από 1,2 μετατόπιση. Αυτά τα δύο μέλη μάλιστα (εκ των οποίων επικρατέστερο είναι το μέλος 5-OH-BDE-47), ευθύνονται για την παρουσία του 90% των ΟΗ-τέτρα-BDEs στο ανθρώπινο αίμα.

Αυτές οι διαφορές μεταξύ των δύο ειδών, μάλλον οφείλονται σε διαφορετικούς τρόπους έκφρασης των ενζύμων της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, τα οποία είναι υπεύθυνα για την υδροξυλίωση. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από πολλές μικρότερες οικογένειες (των CYP), και κάθε μια από αυτές παρουσιάζει διαφορετική εκλεκτικότητα κατά την οξείδωση ενός αλογονωμένου βενζολικού δακτυλίου. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι μάλλον ένζυμα διαφορετικής οικογένειας CYP ενεργοποιούνται κατά την υδροξυλίωση των PBDEs στους ανθρώπους και στα ποντίκια, με αποτέλεσμα κατά την υδροξυλίωση των PBDEs στα ποντίκια να υπάρχει η προτίμηση για το σχηματισμό παρά- ΟΗ-τέτρα-BDEs μέσω 1,2 μετατόπισης.

Μάλιστα, έχουμε αναφέρει ότι οι συγκεκριμένοι υδρόξυ- μεταβολίτες PBDEs (όπως και ο 3-OH-BDE-47) παρουσιάζουν τετραπλάσια συγγένεια με την ανθρώπινη TTR, σε σχέση με τη θυροξίνη (T4). Ωστόσο, δεν μπορεί να θεωρηθεί δευτερεύουσας σημασίας η αντίστοιχη τριπλάσια συγγένεια με την ανθρώπινη TTR που παρουσιάζει ο μεταβολίτης 5-OH-BDE-47 (Hamers et al., 2008), ο οποίος είναι ο επικρατέστερος στο ανθρώπινο αίμα. Συνεπώς, και ο συγκεκριμένος μεταβολίτης χρίζει μεγαλύτερης τοξικολογικής προσοχής.

Εκτός όμως από τους παραπάνω πέντε ΟΗ-τέτρα- μεταβολίτες που παρουσιάζονται στην Εικόνα 14, στο ανθρώπινο αίμα ανιχνεύτηκαν και δύο ΟΗ-πέντα- μεταβολίτες και συγκεκριμένα ο 5'-HO-BDE-99 και ο 6'-HO-BDE-99 (εκ των οποίων επικρατέστερος είναι ο 5'-OH-BDE-99), μέλη τα οποία λόγω συντακτικής δομής είναι πιθανότερο να προέρχονται από το μέλος BDE-99.

Μάλιστα, ο μέσος λόγος της συνολικής συγκέντρωσης των δύο αυτών μεταβολιτών ως προς τη συνολική συγκέντρωση των δύο επικρατέστερων ΟΗ-τέτρα- μεταβολιτών, βρέθηκε ίσος με 0.84, τιμή σημαντικά μεγαλύτερη από τη τιμή του μέσου λόγου της συγκέντρωσης του μέλους BDE-99 ως προς τη συγκέντρωση του μέλους BDE-47, η οποία ήταν ίση με 0.39, υποδηλώνοντας ότι πράγματι το μέλος BDE-99 μεταβολίζεται ευκολότερα σε σχέση με το μέλος BDE-47 στον ανθρώπινο οργανισμό.

Πρέπει τέλος να αναφέρουμε, ότι σε αντίθεση με το αίμα των ποντικών, στο ανθρώπινο αίμα δε βρέθηκαν οι μεταβολίτες 4'-HO-BDE-17 και 2'-HO-BDE-28 σε κανένα δείγμα. Όπως εξηγήσαμε στην ενότητα 1.5.3.4, αυτοί οι ΟΗ-τρι-BDEs προέρχονται από μια διαδικασία αποβρωμίωσης/υδροξυλίωσης του μέλους BDE-47, διαδικασία η οποία φαίνεται ότι δεν πραγματοποιείται στο ανθρώπινο αίμα.

1.5.4. Επίπεδα των μεταβολισμένων PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό:

Όπως έγινε αντιληπτό, δεν υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία σχετική με την μεταβολική πορεία των PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό και ειδικά με τα μεταβολικά μονοπάτια που αυτοί ακολουθούν στο αίμα. Βασιζόμενοι ωστόσο στη βιβλιογραφία που χρησιμοποιήσαμε στην προηγούμενη ενότητα, μπορούμε σαν μια πρώτη ένδειξη να καταγράψουμε κάποια αποτελέσματα για τη Βόρεια Αμερική.

Η μέση συγκέντρωση όλων των φαινολικών- μεταβολιτών των PBDEs, συμπεριλαμβανομένων των ΟΗ-PBDEs και των βρωμοφαινολών, βρέθηκε ότι είναι ίση με 79 ngr/gr λίπους σε δείγματα αίματος από 16 έμβρυα και 4 μητέρες στη Βόρεια Αμερική. Μάλιστα, το εύρος αυτής της συγκέντρωσης ήταν από 2.0 έως και 900 ngr/gr λίπους (Qiu et al., 2009). Στον Πίνακα 7 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κάθε μεταβόλιτη ξεχωριστά για τα έμβρυα και τις μητέρες, αλλά και τα συνολικά αποτελέσματα για τα 20 δείγματα:

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των PBDEs σε έμβρυα και μητέρες της Βόρειας Αμερικής σε ngr/gr λίπους (Qiu et al., 2009)

Compound or congener	Fetal samples (n=16)			Maternal samples (n=4)			Combined samples (n=20)		
	Mean ± SE	Median	% of total mean	Mean ± SE	Median	% of total mean	Mean ± SE	Median	% of total mean
Phenolic metabolite									
2,4-DBP	20 ± 12	4.7	21	1.5 ± 0.5	1.3	21	16 ± 9.6	3.5	21
2,4,5-TBP	7.9 ± 6.0	1.2	8.2	0.2 ± 0.03	0.2	3.6	6.4 ± 4.8	0.7	8.1
2,4,6-TBP	5.6 ± 1.3	5.1	5.7	0.8 ± 0.3	0.6	12	4.6 ± 1.1	3.0	5.9
4'-HO-BDE-17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2'-HO-BDE-28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4-HO-BDE-42	0.9 ± 0.3	ND	0.9	ND	ND	ND	0.9 ± 0.3	ND	1.1
3-HO-BDE-47	1.6 ± 1.1	0.4	1.7	0.1 ± 0.02	0.09	1.3	1.3 ± 0.8	0.3	1.6
5-HO-BDE-47	28 ± 16	5.7	29	1.6 ± 0.5	1.4	23	23 ± 13	4.2	29
6-HO-BDE-47	9.9 ± 4.9	1.0	10	0.3 ± 0.1	0.2	3.9	7.9 ± 4.0	0.8	10
4'-HO-BDE-49	0.9 ± 0.2	ND	0.9	0.3 ± 0.06	0.3	3.5	0.7 ± 0.2	ND	0.8
5'-HO-BDE-99	22 ± 15	4.3	23	2.0 ± 0.6	1.7	28	18 ± 12	3.1	23
6'-HO-BDE-99	1.9 ± 1.0	0.6	1.9	0.3 ± 0.04	0.3	3.7	1.5 ± 0.8	0.4	1.9
Total	97 ± 55	22		7.0 ± 1.7	6.3		79 ± 44	19	

Με βάση αυτόν τον πίνακα, επιβεβαιώνεται ότι από τους ΟΗ-τέτρα- μεταβολίτες που υπάρχουν στο ανθρώπινο αίμα, επικρατέστερος είναι ο 5-ΟΗ-BDE-47, ενώ από τους ΟΗ-πέντα- μεταβολίτες επικρατέστερος είναι ο 5'-ΟΗ-BDE-99. Τελικά όμως, παρόλο τον ευκολότερο μεταβολισμό του μέλους BDE-99 σε σχέση με το μέλος BDE-47, από τους δύο παραπάνω μεταβολίτες ο επικρατέστερος στην κατηγορία των ΟΗ-PBDEs, βλέπουμε ότι είναι ο 5-ΟΗ-BDE-47 (23±13 και 18±12 ngr/gr λίπους αντίστοιχα). Επίσης, βλέπουμε ότι οι τρεις βρωμοφαινόλες που εμφανίζονται στο αίμα, βρίσκονται σε συγκρίσιμα με τους υπόλοιπους μεταβολίτες επίπεδα. Ωστόσο, πρέπει να γίνει γνωστό ότι οι βρωμοφαινόλες 2,4-DBP και 2,4,6-TBP βρίσκονται στα τυφλά δείγματα σε ποσοστά 9% και 7% της συνολικής ποσότητας των μεταβολιτών αυτών στα 20 δείγματα, αντίστοιχα (Qiu et al., 2009).

Πρέπει επίσης να αναφερθεί, ότι πιθανοί μεταβολίτες των PBDEs είναι και οι μεθόξυ(MeO)-PBDEs. Ωστόσο, όπως έγινε αντιληπτό, κανένας από τους μεταβολίτες αυτής της κατηγορίας δεν ανιχνεύτηκε στην συγκεκριμένη εργασία (Qiu et al., 2009).

Τέλος, πρέπει να διεξαχθεί επίσης το συμπέρασμα ότι οι συγκεντρώσεις όλων αυτών των μεταβολιτών ήταν υψηλότερες στα εμβρυικά σε σχέση με τα μητρικά δείγματα, παρόλο που δεν μπόρεσε να γίνει περαιτέρω συσχέτιση, διότι ακόμη και για τα 4 μητρικά δείγματα που λήφθηκαν, μόνο για το ένα έγινε γνωστή η αντιστοιχία του δείγματος αυτού με το ανάλογο δείγμα εμβρύου (Qiu et al., 2009).

Σε συμφωνία με την ελάχιστη υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετική με τα επίπεδα των μεταβολιτών των PBDEs στο αίμα, και η αντίστοιχη βιβλιογραφία για τα επίπεδά τους στο μητρικό γάλα είναι πενιχρή. Ωστόσο, το μητρικό γάλα θεωρείται σημαντικός δείκτης της έκθεσης σε PBDEs αρχικά της μητέρας και έπειτα, μέσω εσωτερικής έκθεσης, και του εμβρύου.

Η βιβλιογραφία στην οποία θα βασιστούμε για το μητρικό γάλα (Lacorte et al., 2009), αναφέρεται στην ανάλυση 37 μητρικών δειγμάτων διαφορετικών ημερών εγκυμοσύνης από 11 εργαζόμενες έγκυες μητέρες της Ισπανίας. Οι διατροφικές συνήθειες, η ηλικία, το επάγγελμα, το κάπνισμα, η περίοδος γαλακτισμού και ο αριθμός των παιδιών, λήφθηκαν υπόψη για κάθε μητέρα, για τον προσδιορισμό τόσο των μεταβολισμένων, όσο και των μη-μεταβολισμένων PBDEs σε αυτά τα δείγματα. Μάλιστα, οι διατροφικές συνήθειες όλων των γυναικών κρίθηκαν μεσογειακές, διότι περιλαμβάνουν καθημερινή κατανάλωση γάλατος και συχνή κατανάλωση ψαριού μες τη βδομάδα (1-3 φορές).

Σε κάποια δείγματα αυτών των γυναικών βρέθηκαν καταρχήν οι εξής πέντε υδρόξυ- μεταβολίτες: ο 4'-OH-BDE-17, ο 2'-OH-BDE-74, ο 6'-OH-BDE-66, ο 2'-OH-BDE-75 και ο 6-OH-BDE-47, με τους τρεις πρώτους να είναι οι επικρατέστεροι. Οι συνολικές συγκεντρώσεις όλων αυτών των μεταβολιτών βρέθηκαν μεταξύ 25.8 και 2080 pgr/gr λίπους στα διάφορα δείγματα. Επίσης, σε κάποια δείγματα αυτών των γυναικών βρέθηκαν και οι εξής έξι μεθόξυ-μεταβολίτες: ο 2'-MeO-BDE-28, ο 4'-MeO-BDE-17, ο 2'-MeO-BDE-75, ο 6-MeO-BDE-47, ο 2'-MeO-BDE-74 και ο 6'-MeO-BDE-66. Οι συνολικές

συγκεντρώσεις όλων αυτών των μεταβολιτών βρέθηκαν μεταξύ 13.2 και 4188 pg/gr λιπών στα διάφορα δείγματα (Lacorte et al., 2009).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυτές οι δύο κατηγορίες μεταβολιτών βρέθηκε ότι συσχετίζονται ελαφρώς στα διάφορα δείγματα ($R^2 \approx 0.5$). Συγκεκριμένα, οι μεθόξυ- μεταβολίτες των PBDEs εμφανίζονται σε διπλάσιες συγκεντρώσεις στο μητρικό γάλα από τους αντίστοιχους υδρόξυ- μεταβολίτες, υποδεικνύοντας είτε τον ταυτόχρονο σχηματισμό τους, είτε την ταυτόχρονη λήψη τους στο γάλα. Η δεύτερη εικασία βασίζεται στο ότι οι μεθόξυ-PBDEs μάλλον προέρχονται από φυσικές πηγές, καθώς ουσιαστικά δεν έχει καταγραφεί ποτέ ότι προέρχονται από τη βιομετατροπή των PBDEs (Lacorte et al., 2009).

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει και το ότι το σύνολο των συγκεντρώσεων όλων των πιθανών μεταβολιτών δε συσχετίζεται καθόλου με το σύνολο των μη-μεταβολισμένων PBDEs στα διάφορα δείγματα ($R^2 < 0.01$). Το ίδιο ισχύει και για τους μεμονωμένους μεταβολίτες σε σχέση με τους μεμονωμένους μη-μεταβολισμένους PBDEs. Αυτό μπορεί να σημαίνει είτε ότι η βιολογική αποικοδόμηση των PBDEs δεν είναι μια σημαντική διαδικασία στους ανθρώπους (πράγμα ουσιαστικά απίθανο), είτε ότι οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες απεκκρίνονται άμεσα από το γάλα. Βέβαια, ας μη ξεχνάμε ότι το συγκεκριμένο αποτέλεσμα προέκυψε με τον συνυπολογισμό των αμφιβόλου προέλευσης μεθόξυ-PBDEs (Lacorte et al., 2009).

Συμπερασματικά, περισσότερη έρευνα απαιτείται για την εύρεση των επιπέδων των πραγματικών μεταβολιτών των PBDEs καταρχήν στο αίμα και το μητρικό γάλα, και έπειτα στους υπόλοιπους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Για να συμβεί αυτό, πρέπει να ξεκαθαριστούν τα μεταβολικά μονοπάτια των PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς και η ικανότητα λήψης τους, η βιοδιαθεσιμότητά τους και η απέκκρισή τους από τους διάφορους ιστούς. Για τους σκοπούς αυτούς, απαιτείται πληθώρα προτύπων διαλυμάτων και όχι η στόχευση σε συγκεκριμένους μεταβολίτες.

1.5.5. Τοξικότητα των PBDEs:

Τα δεδομένα που υπάρχουν για την τοξικότητα των PBDEs είναι περιορισμένα. Μάλιστα, τα δεδομένα αυτά δεν περιλαμβάνουν αποτελέσματα ούτε για μεμονωμένα μέλη PBDEs, αλλά ούτε και για τα τεχνικώς παραγόμενα μείγματα PBDEs, αφού οι σχετικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε εμπορικά μείγματα PBDEs, των οποίων μεν η σύσταση των ακαθαρσιών ήταν συνήθως γνωστή, αλλά η σύσταση των βασικών ισομερών ήταν συνήθως άγνωστη. Επιπλέον, δεν υπάρχουν γενικώς στοιχεία για το εάν τα χρησιμοποιούμενα μείγματα περιείχαν ακαθαρσίες από αλογονωμένες dioxin-like ενώσεις (π.χ. τα PBDFs και οι PBDDs), οι οποίες λόγω δομικής ομοιότητας με τους PBDEs μπορεί να επιδρούν στον οργανισμό με παρόμοιο τρόπο. Εξάλλου, ούτε για τις dioxin-like ενώσεις είναι γνωστές οι τοξικολογικές τους επιπτώσεις, παρόλο που εμφανίζουν μια σημαντική τιμή TEF. Παρόλα αυτά, μετά την χορήγηση τέτοιων μειγμάτων σε κύτταρα, ανθρώπους, τρωκτικά, λαγούς και άλλα είδη, έχουν προκύψει διάφορα συμπεράσματα για την τοξικότητα των PBDEs (Rahman et al., 2001, Darnerud et al., 2001).

Καταρχάς, σε ότι αφορά στην οξεία τοξικότητα των PBDEs, αυτή είναι μικρή. Βρέθηκε ότι έχουν ελαφριές ερεθιστικές ιδιότητες, ενώ δεν ευαισθητοποιούν το δέρμα. Τα όργανα που κατά βάση στοχοποιήθηκαν, ήταν το ήπαρ, τα νεφρά και ο θυροειδής αδένας, και τα οποία ελαφρώς διογκώθηκαν ή/και παρουσίασαν μικρές ιστοπαθολογικές αλλαγές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι γενικά τα διάφορα μέλη PBDEs παρουσιάζουν παρόμοιο τοξικολογικό προφίλ, εξαιρουμένου του μέλους BDE-209 το οποίο είναι λιγότερο δραστικό (Darnerud et al., 2001).

Σε ότι αφορά στη γονιδιακή τοξικότητα, οι PBDEs δεν φάνηκαν θετικοί στους άμεσους ελέγχους. Αντίθετα, παρουσία υψηλών δόσεων του μέλους BDE-209 για τον έλεγχο εμφάνιση καρκινογένεσης σε ποντίκια, εμφανίστηκαν αυξημένα περιστατικά διογκώματος και καρκινομάτων σε ηπατικά κύτταρα και θυροειδή αδένες. Ανάλογη αντίδραση υπήρξε και στους

αρουραίους, όπου εμφανίστηκαν αυξημένα περιστατικά διογκώματος σε ηπατικά κύτταρα και πάγκρεας (Darnerud et al., 2001).

Έπειτα, προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση των PBDEs στην αναπαραγωγικότητα ζώων, χορηγήθηκαν ποσότητες σε έγκυες μητέρες. Εκτός του ότι στα έμβρυα εμφανίστηκε καταρχήν μεγαλύτερη τοξικότητα από τις μητέρες τους, σε πολλές περιπτώσεις υπήρξε και ανώμαλη ανάπτυξη αυτών των εμβρύων. Σε ότι αφορά τώρα τον έλεγχο της νευρολογικής επίδρασης των PBDEs, χορηγήθηκαν χαμηλές ποσότητες τέτρα- και πέντα-BDEs σε ποντίκια, την ευαίσθητη περίοδο της ανάπτυξης του εγκεφάλου. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά, καθώς νευρολογικές διαταραχές εμφανίστηκαν στην ενήλικη ζωή τους. Επίσης, εκτεθειμένοι άνθρωποι σε PBBs και PBDEs λόγω βεβαρυμμένης ατμόσφαιρας στον εργασιακό χώρο, βρέθηκε ότι εμφάνισαν υποθυροειδισμό και μειωμένη ικανότητα μεταφοράς νευρικών σημάτων σε αισθητήριους νευρώνες, παρόλο που η αντιστοιχία των ευρυμάτων αυτών με την έκθεση μόνο σε PBDEs είναι αμφίβολη (Darnerud et al., 2001).

Τέλος, τα διαθέσιμα δεδομένα προτείνουν ότι παρόλη τη δομική ομοιομότητα με τις dioxin-like ενώσεις, οι PBDEs είναι αθηνείς τους ανταγωνιστές για τη δέσμευση στον υποδοχέα AhR (Aryl hydrocarbon hydroxylase receptor), ο οποίος βοηθά την στην ενεργοποίηση των ενζύμων CYP1A1 και CYP1A2. Συνεπώς, πιθανολογείται ότι ο μηχανισμός δράσης των PBDEs στο κύτταρο είναι διαφορετικός από αυτόν των dioxin-like ενώσεων. Ωστόσο, επειδή όπως αναφέραμε οι υδρόξυ-PBDEs ανήκουν στην κατηγορία των thyroxine-like ενώσεων, η ικανότητά τους να δεσμεύονται αποτελεσματικά στις μεταφορικές πρωτεΐνες (π.χ. στην ανθρώπινη TTR) των θυροειδών ορμονών και να προκαλούν μεταβολή της θυροειδούς ομοιόστασης, μάλλον εισάγει έναν διαφορετικό και χαρακτηριστικό μηχανισμό τοξικότητας των PBDEs και των βασικών μεταβολιτών του (Darnerud et al., 2001).

1.6. Μέθοδοι προσδιορισμού PBDEs σε ανθρώπινα δείγματα:

Πριν την έναρξη του πειραματικού μέρους της παρούσας διατριβής, κρίνεται εύστοχη η παρουσίαση των εναλλακτικών τρόπων ανάλυσης των PBDEs αλλά και γενικότερα των OHCs, κυρίως σε ανθρώπινα δείγματα αλλά και σε δείγματα τρωκτικών ή άλλων ζώων. Οι μήτρες που επιλέξαμε για το συγκεκριμένο σκοπό, περιλαμβάνουν αίμα (ορό ή πλάσμα), μητρικό γάλα και όπου ήταν δυνατόν, ούρα, προκειμένου να περιοριστούμε σε υγρά δείγματα, όπως αυτά που πρόκειται να αναλύσουμε.

1.6.1. Εκχύλιση, καθαρισμός και απομόνωση των PBDEs:

1.6.1.1. Εφαρμοσμένες μέθοδοι στο αίμα:

Πρωταρχικό στάδιο για την απομόνωση των PBDEs από το αίμα, κρίνεται πάντα η αποδιάταξη των πρωτεϊνών όπου αυτοί είναι προσδεμένοι. Ένας κλασικός τρόπος που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για το σκοπό αυτό, τόσο σε ορό όσο και σε πλάσμα αίματος, είναι η κατεργασία σταδιακά με διάλυμα HCl (6 M) και ισοπροπανόλη (Qiu et al., 2007, Covaci et al., 2003, Hovander et al., 2000, Qiu et al., 2009). Εναλλακτικά, σε ορό αίματος για το σκοπό αυτό, έχει γίνει κατεργασία με φορμικό οξύ (Keller et al., 2009, Kalantzi et al., 2010) αλλά και με μεθανόλη (Atuma et al., 1999). Τέλος, σε πλάσμα αίματος έχει γίνει κατεργασία και με μείγμα φορμικού οξέος/ισοπροπανόλης (Karlsson et al., 2007, Covaci et al., 2003).

Μετά την κατεργασία αυτή, ακολουθεί η εκχύλιση των PBDEs από το αίμα. Ένας παραδοσιακά εφαρμοσμένος τρόπος εκχύλισης αίματος, είναι η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE). Η LLE μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία ενός μείγματος εξανίου/MtBE (1:1) (Qiu et al., 2007, Covaci et al., 2003, Hovander et al., 2000, Keller et al., 2009, Qiu et al., 2009), ενός μείγματος εξανίου/DCM (4:1) (Keller et al., 2009), ή ενός μείγματος εξανίου/διαιθυλαιθέρα (1:1) (Atuma et al., 1999).

Την LLE μπορεί εναλλακτικά να αντικαταστήσει η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), κατά την οποία το υγρό κατεργασμένο μείγμα εισάγεται σε ένα

μικροφουσίγγιο με στερεό υπόστρωμα. Συγκριτικά με την LLE, η SPE είναι λιγότερο απαιτητική σε χρόνο ανάλυσης και ποσότητες διαλυτών, αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μεγάλων ποσοτήτων αίματος, εξαιτίας του υψηλού σωματιδιακού φορτίου του αίματος (Keller et al., 2009). Μετά την είσοδο στο μικροφουσίγγιο, το δείγμα εκλούεται διαδοχικά είτε με μείγματα ισοπροπανόλης/ύδατος, μεθανόλης/ύδατος και εξανίου/DCM (Karlsson et al., 2007), είτε με μείγμα ισοπροπανόλης/ύδατος (Covaci et al., 2003), είτε με HCl και μείγμα μεθανόλης/ύδατος (Keller et al., 2009), είτε με DCM (Kalantzi et al., 2010).

Το εκχύλισμα που προκύπτει από την εκάστοτε εκχύλιση, πρέπει ακολούθως να καθαριστεί, προκειμένου να απομακρυνθούν οι συνεκλούμενες βρωμιές και κυρίως τα λιπίδια του αίματος. Υπάρχουν δύο τρόποι απομάκρυνσης των λιπιδίων: οι καταστροφικοί και οι μη καταστροφικοί (Hyoëtylaëinen et al., 2002, Covaci et al., 2003, Hovander et al., 2000).

Η καταστροφική απομάκρυνση των λιπιδίων συνήθως επιτυγχάνεται είτε με απευθείας προσθήκη πυκνού H_2SO_4 στο εκχύλισμα, είτε με την προσθήκη πυκνού H_2SO_4 στο εκχύλισμα και την εισαγωγή του σε μια μικροστήλη η οποία περιέχει εμποτισμένη με H_2SO_4 silica. Από τη μία, η απευθείας προσθήκη ακολούθως απαιτεί πολλά στάδια εκχυλίσεων και φυγοκεντρήσεων με αποτέλεσμα να είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, και από την άλλη, η όξινη silica απαιτεί προσεκτικό χειρισμό προς αποφυγή εισπνοής των λεπτών σωματιδίων της (απαιτείται η χρήση μάσκας χειρουργείου). Εναλλακτικά, η καταστροφική απομάκρυνση των λιπιδίων μπορεί να επιτευχθεί είτε με την απευθείας εισαγωγή του εκχυλίσματος σε μια μικροστήλη η οποία περιέχει εμποτισμένη με KOH silica, είτε σε μια μικροστήλη που διαδοχικά περιέχει ουδέτερη, όξινη και βασική (δηλαδή πολυστρωματική) silica. Έχει αποδειχθεί ότι οι PBDEs είναι σταθεροί τόσο σε όξινες, όσο και σε βασικές συνθήκες (Covaci et al., 2003).

Από την άλλη, η μη καταστροφική απομάκρυνση των λιπιδίων επιτυγχάνεται με εφαρμογή είτε της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (GPC), είτε της χρωματογραφίας προσρόφησης, ή με συνδυασμό των δύο. Χαρακτηριστικά, η χρήση της GPC συνήθως απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού του εκχυλίσματος, το οποίο επιλέγεται να είναι η εισαγωγή του εκλούσματος της GPC σε μια στήλη με ένα προσροφητικό υλικό. Το προσροφητικό αυτό, μπορεί να είναι ουδέτερη silica, alumina ή Florisil. Στην περίπτωση που εφαρμόζεται μόνο η χρωματογραφία προσρόφησης, χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός προσροφητικών υλικών για καλύτερο καθαρισμό. Πάντως, και οι δύο αυτές μέθοδοι βοηθούν καθοριστικά στην απομάκρυνση ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος, όπως τα λιπίδια. Πρέπει τέλος να γνωρίζουμε ότι η silica και το Florisil έχουν μικρότερη λιπιδική χωρητικότητα συγκριτικά με την alumina. Γενικότερα, η παρουσία πυκνού H₂SO₄ επιτρέπει την (καταστροφική) απομάκρυνση μεγαλύτερης ποσότητας λιπιδίων (Covaci et al., 2003).

Στην περίπτωση της LLE, έχει εφαρμοστεί τόσο η καταστροφική, όσο και η μη καταστροφική απομάκρυνση των λιπιδίων. Για την εφαρμογή της καταστροφικής απομάκρυνσης, συνήθως χρησιμοποιείται η συνδυασμένη μέθοδος προσθήκης π. H₂SO₄ και εισαγωγής σε μια μικροστήλη με όξινη silica, ακολουθούμενη από ξέπλυμα με εξάνιο (Hovander et al., 2000, Atuma et al., 1999), με εξάνιο και με μείγμα εξανίου/DCM (3:2) (Qiu et al., 2007, Qiu et al., 2009), ή με DCM (Qiu et al., 2007, Hovander et al., 2000). Για την εφαρμογή της μη καταστροφικής απομάκρυνσης, έχει χρησιμοποιηθεί η εισαγωγή του εκχυλίσματος σε στήλη GPC ακολουθούμενη από ξέπλυμα με DCM (Keller et al., 2009).

Στην περίπτωση της SPE, επίσης έχει εφαρμοστεί τόσο η καταστροφική, όσο και η μη καταστροφική απομάκρυνση των λιπιδίων. Για την εφαρμογή της καταστροφικής απομάκρυνσης, έχει χρησιμοποιηθεί στήλη προσρόφησης που περιέχει όξινη και βασική silica ακολουθούμενη από ξέπλυμα με εξάνιο (Karlsson et al., 2007), κατεργασία με π. H₂SO₄ ακολουθούμενη από ξέπλυμα

διαδοχικά με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, με μείγμα μεθανόλης/ύδατος και με μείγμα αιθανόλης/DCM (Covaci et al., 2003), αλλά και μικροστήλη με όξινη silica ακολουθούμενη από ξέπλυμα με μείγμα εξανίου/DCM (Kalantzi et al., 2010). Για την εφαρμογή της μη καταστροφικής απομάκρυνσης, έχει χρησιμοποιηθεί συνδυασμός στήλης προσρόφησης που περιέχει alumina με στήλη GPC, ακολουθούμενος από ξέπλυμα με DCM (Keller et al., 2009).

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ της LLE και της SPE στην ανάλυση των BFRs, είναι ότι με την πρώτη μέθοδο οι ουδέτερες φαινολικές ενώσεις μπορούν άμεσα να διαχωριστούν από τις υδρόξυ-φαινολικές ενώσεις. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός διαλύματος KOH (50% σε νερό και 50% σε αιθανόλη), το οποίο προστίθεται στο αρχικό εκχύλισμα, δηλαδή πριν την απομάκρυνση των λιπιδίων. Μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων και την επανεκχύλιση της υδατικής φάσης, μπορεί τελικά να διαχωριστούν οι ουδέτεροι PBDEs (στην οργανική φάση) από τους υδρόξυ-PBDEs (στην υδατική φάση) (Qiu et al., 2007, Covaci et al., 2003, Hovander et al., 2000, Qiu et al., 2009).

Πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία της υδατικής φάσης, απαιτείται η οξίνισή της παρουσία διαλύματος HCl και η εκχύλιση της δύο φορές με ένα μείγμα εξανίου/MtBE (9:1), προκειμένου να απομονωθούν οι υδρόξυ-PBDEs στην καινούργια οργανική φάση. Επειδή όμως οι υδρόξυ-φαινολικές ενώσεις δεν μπορούν να κατεργαστούν με π. H₂SO₄, και επειδή ο αναλυτικός διαχωρισμός πραγματοποιείται συνήθως σε άπολη χρωματογραφική στήλη, απαιτείται πρώτα η μετατροπή τους στις αντίστοιχες ουδέτερες μεθυλιωμένες ενώσεις παρουσία περίσσειας διαζωμεθανίου. Με την μετατροπή αυτή και την πιθανή εναλλαγή διαλύτη, οι μεθόξυ-φαινολικές ενώσεις μπορούν πλέον να υποστούν οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία είναι αναγκαία (Qiu et al., 2007, Covaci et al., 2003, Hovander et al., 2000, Qiu et al., 2009).

Τέλος, χρήσιμο να αναφερθεί είναι ότι εφαρμόζοντας όλη τη διαδικασία απομόνωσης των PBDEs (ουδέτερων και μεταβολισμένων) με LLE, αρχικά παρουσία μιας στήλης GPC, έπειτα με προσθήκη π. H₂SO₄, και τέλος

με συνδυασμό της προσθήκης π. H_2SO_4 και της εισαγωγής σε μια μικροστήλη με όξινη silica, αποδείχθηκε ότι η τελευταία εναλλακτική παρουσιάζει τις καλύτερες ανακτήσεις τόσο για τους ουδέτερους όσο και για τους μεταβολισμένους PBDEs. Επιπλέον, αυτή η εναλλακτική απαιτεί λιγότερο αναλυτικό χρόνο και επίσης είναι πιο οικονομική. Για τους λόγους αυτούς, είναι δικαιολογημένη η συχνή χρήση της (Covaci et al., 2003, Hovander et al., 2000).

1.6.1.2. Εφαρμοσμένες μέθοδοι στο μητρικό γάλα:

Διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ανθρώπινου μητρικού γάλατος. Οι συγκεκριμένες τεχνικές είναι δυνατόν να πραγματοποιούν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών σε μεταγενέστερο στάδιο και όχι εξ' αρχής.

Καταρχήν, όπως είναι αναμενόμενο, η LLE εφαρμόζεται και στην περίπτωση της ανάλυσης του μητρικού γάλατος. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται εξ' αρχής παρουσία οξαλικού καλίου. Ακολούθως, η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται παρουσία μείγματος ακετόνης/εξανίου (2:1). Έπειτα, η οργανική φάση εξατμίζεται μέχρι ξηρού και τα λίπη επαναδιαλύονται σε εξάνιο, όπου προστίθεται π. H_2SO_4 για την καταστροφή τους. Η νέα οργανική φάση ξεπλένεται με υπερκάθαρο νερό και το τελικό μείγμα αφού ξηραθεί σε Na_2SO_4 , εισάγεται μέσω ενός αυτοματοποιημένου συστήματος, αρχικά σε μια στήλη προσρόφησης με πολυστρωματική silica όπου ξεπλένεται με εξάνιο, και ακολούθως σε μια στήλη προσρόφησης με alumina όπου ξεπλένεται με μείγμα εξανίου/DCM (Toms et al., 2007).

Έπειτα, για την εφαρμογή της SPE, το δείγμα κατεργάζεται με ένα μείγμα φορμικού οξέος/ισοπροπανόλης πριν εισαχθεί στο μικροφυσίγγιο, ώστε να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Μετά την εισαγωγή του στο μικροφυσίγγιο, το δείγμα ξεπλένεται μ' ένα μείγμα ύδατος/ισοπροπανόλης και ακολούθως κατεργάζεται με π. H_2SO_4 , ώστε να πραγματοποιηθεί η καταστροφή των λιπιδίων. Ακολούθως, το μικροφυσίγγιο

ξεπλένεται διαδοχικά με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, με μείγμα μεθανόλης/ύδατος και με μείγμα αιθανόλης/DCM. Βέβαια, επειδή στην περίπτωση του γάλατος τα λιπίδια είναι αυξημένα, απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού παρουσία όξινης silica, απ' την οποία οι αναλύτες εκλύονται μ' ένα μείγμα εξανίου/DCM (Covaci et al., 2003, Thomsen et al., 2002).

Εναλλακτικά, το δείγμα μπορεί να αλεστεί και να εισαχθεί σε ένα σύστημα επιταχυνόμενης υγρής εκχύλισης (ASE), η οποία λειτουργεί με εφαρμογή υψηλής πίεσης. Η εκχύλιση πραγματοποιείται παρουσία ενός μείγματος εξανίου/DCM (2:1). Ακολούθως, το εκχύλισμα κατεργάζεται με π. H_2SO_4 για την απομάκρυνση όχι μόνο των λιπιδίων, αλλά και των πρωτεϊνών που ουσιαστικά έχουν αποδιαταχθεί. Το τελικό εκχύλισμα επαναδιαλύεται σε εξάνιο (Lacorte et al., 2009).

Τέλος, για το σκοπό της συγκεκριμένης ανάλυσης, το δείγμα μπορεί επίσης να εισαχθεί σε μια στήλη γης διατόμων, όπου εκλύεται με διαιθυλαιθέρα. Το έκλουσμα ακολούθως εισάγεται σε μια στήλη GPC για την απομάκρυνση των λιπιδίων, όπου ξεπλένεται με ένα μείγμα εξανίου/DCM. Τέλος, το έκλουσμα που προκύπτει εισάγεται σε μια στήλη προσρόφησης που περιέχει silica, όπου επίσης ξεπλένεται με ένα μείγμα εξανίου/DCM (Sudaryanto et al., 2008).

Παρομοίως, το δείγμα μπορεί να εκχυλιστεί αρχικά με ακετονιτρίλιο και το εκχύλισμα να εισαχθεί σε μια στήλη με alumina. Εκεί, το εκχύλισμα ξεπλένεται με εξάνιο και το δεύτερο έκλουσμα που προκύπτει εισάγεται σε μια στήλη με silica, στην οποία το έκλουσμα αυτό ξεπλένεται πρώτα με εξάνιο και έπειτα με ένα μείγμα εξανίου/DCM. Το τελικό έκλουσμα εισάγεται σε μια στήλη GPC, όπου επίσης ξεπλένεται με ένα μείγμα εξανίου/DCM (Hyoëtylaëinen et al., 2002).

1.6.1.3. Εφαρμοσμένες μέθοδοι στα ούρα:

Όπως αναφέραμε, το ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό PBDEs σε ανθρώπινα ούρα είναι ανύπαρκτο. Η όποια γνώση για την ύπαρξη PBDEs σε ούρα, έχει προκύψει κυρίως μετά από αναλύσεις δειγμάτων από τρωκτικά. Αποτελέσματα τέτοιων αναλύσεων αναφέραμε στην ενότητα 1.5.3.3., σε μια προσπάθεια καταγραφής της μεταβολικής πορείας των PBDEs σε πολλούς ιστούς του ίδιου οργανισμού (αρουραίου ή ποντικιού). Στη συγκεκριμένη ενότητα βασιστήκαμε στη βιβλιογραφία των Hakk et al. (2003), η οποία με τη σειρά της βασίστηκε σε αρκετές προγενέστερες δημοσιεύσεις.

Εξετάζοντας καταρχήν τη μεταβολική πορεία του ιχνηθετιμένου μέλους ^{14}C -BDE-47 σε ποντίκια και αρουραίους, οι Orn και Klasson-Wehler (1998) βρήκαν μέρος της αρχικά χορηγημένης ποσότητας του μέλους αυτού (καθώς και μεταβολίτες του) στα ούρα αυτών των τρωκτικών. Ανατρέχοντας στη μέθοδο που εφάρμοσαν για την απομόνωση αυτού του μέλους σε αυτά τα ούρα, απλά βρήκαμε μια περιληπτική περιγραφή για την απομόνωση των μεταβολιτών αυτού του μέλους. Συγκεκριμένα, μέρος των ούρων εκχυλίστηκε με εξάνιο και ακολούθως οι μεταβολίτες στην υδατική φάση υπέστη υδρόλυση παρουσία αραιού διαλύματος οξέος. Τέλος, οι μεταβολίτες αυτοί εκχυλίστηκαν με τολουόλιο και μεθυλιώθηκαν παρουσία διαζωμεθανίου πριν την ανάλυσή τους στο GC-MS. Περαιτέρω πληροφορίες δεν μπορέσαμε να αντλήσουμε από τη συγκεκριμένη αναφορά.

Έπειτα, Οι Hakk et al. (2002) μελέτησαν αυτή τη φορά τη τύχη του ιχνηθετιμένου μέλους ^{14}C -BDE-99 στους ιστούς και τις απεκκρίσεις αρουραίων. Ανατρέχοντας στη μέθοδο που εφάρμοσαν για την απομόνωση του μέλους αυτού καθώς και μεταβολιτών του σε αυτά τα ούρα, απλά βρήκαμε μια επίσης περιληπτική περιγραφή. Συγκεκριμένα, μέρος των ούρων εκχυλίστηκε με εξάνιο και το εκχύλισμα αναλύθηκε με τη ξεπερασμένη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος (TLC), με την προσθήκη (α) μείγματος εξανίου/μεθυλενοχλωριδίου για την απομόνωση του ουδέτερου μέλους ^{14}C -BDE-99 (β) μείγματος τετραυδροφουρανίου/οξικού αιθυλεστέρα/εξανίου για

την απομόνωση των αναμενόμενων μεταβολιτών παρουσία των ενζύμων της φάσης I και (γ) μείγματος τετραυδροφουρανίου/μεθανόλης/οξικού οξέος για την απομόνωση των αναμενόμενων μεταβολιτών παρουσία των ενζύμων της φάσης II. Έπειτα, όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με εφαρμογή UV ακτινοβολίας στα χρησιμοποιούμενα πλακίδια.

Όσον αφορά το μέλος BDE-209, αναφέραμε ότι οι El Dareer et al. (1987) χορήγησαν το μέλος αυτό στην τροφή αρουραίων και βρήκαν ότι μετά από 72 ώρες το 0.012% της αρχικής του ποσότητας απεκκρίθηκε με τα ούρα. Ωστόσο, επειδή η συγκεκριμένη αναφορά δεν ήταν διαθέσιμη on-line, δεν μπορέσαμε να αντλήσουμε τις σχετικές πληροφορίες για τη μέθοδο που εφαρμόστηκε για την εύρεση αυτού του ποσοστού. Τέλος, επίσης σε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού των μεταβολιτών του μέλους BDE-209 στα κόπρανα και τα ούρα αρουραίων, οι Morck και Klasson-Wehler (2001) χορήγησαν δια στόματος ποσότητα του μέλους αυτού σε αρουραίους. Βρέθηκε ότι μετά από 72 ώρες το 0.05% της αρχικής του ποσότητας απεκκρίθηκε με τα ούρα. Ωστόσο, επειδή ούτε η συγκεκριμένη αναφορά ήταν διαθέσιμη on-line, δεν μπορέσαμε να αντλήσουμε πάλι τις σχετικές πληροφορίες.

1.6.2. Διαχωρισμός και ανίχνευση των PBDEs:

1.6.2.1. Διαχωρισμός των PBDEs:

Καταρχάς, ο κλασικός τρόπος διαχωρισμού των PBDEs είναι μέσω της αέριας χρωματογραφίας (GC). Προκειμένου να επιτευχθεί επαρκής διαχωρισμός μεταξύ των διαφόρων μελών PBDEs, αλλά και μεταξύ των μελών αυτών με άλλους συνεκλουόμενους ρυπαντές, κρίνεται αναγκαία η χρήση μιας μακριάς τριχοειδούς στήλης (30-50 μέτρων) με μικρή εσωτερική διάμετρο (<0.25 mm). Η στήλη αυτή, πρέπει επίσης να είναι μη-πολική ή ημιπολική. Στήλες αυτού του τύπου είναι εκείνες που περιέχουν 100% phenyl-methylpolysiloxane ως στατική φάση (όπως η στήλη DB-1), αλλά και εκείνες που περιέχουν 5% phenyl-methylpolysiloxane (όπως οι στήλες DB-5, CP-Sil 8 και AT-5). Όλες αυτές οι στήλες παρουσιάζουν πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα για τον συγκεκριμένο διαχωρισμό. Ωστόσο, πρέπει πρώτα να

ελέγχονται για πιθανές συνεκλούσεις των υπό ανάλυση ρυπαντών, των αντίστοιχων ενώσεων από τα πρότυπα διαλύματα, αλλά και οποιονδήποτε άλλων ενώσεων μπορεί να είναι παρούσες στα υπό ανάλυση δείγματα (Covaci et al., 2003).

Πρέπει να αναφέρουμε, ότι στην περίπτωση του προσδιορισμού του μέλους BDE-209 είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται άλλη στήλη, και συγκεκριμένα πιο κοντή στήλη (10-15 μέτρα). Αυτό προτείνεται διότι στις υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται στην εκάστοτε στήλη για την εξαέρωση των αναλυτών, το μέλος αυτό παρουσιάζει μεγάλη πιθανότητα αποικοδόμησης σε μικρότερες ενώσεις. Εξάλλου, αυτή η ευαισθησία του στις υψηλές θερμοκρασίες, είναι η αιτία για την οποία το μέλος αυτό θεωρείται πολύ καλό επιβραδυντικό φλόγας. Συνεπώς, ο χρόνος παραμονής του στη στήλη πρέπει να είναι ο κατά το δυνατόν μικρότερος. Σε κάθε περίπτωση πάντως, η μέγιστη επιτρεπτή θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο φούρνο του χρωματογράφου είναι οι 300 °C, τιμή η οποία δεν πρέπει να εφαρμόζεται για πολύ ώρα (πριν το τέλος του επλεγμένου θερμοκρασιακού προγράμματος) (Hyoëtylääinen et al., 2002, Rahman et al., 2001, Covaci et al., 2003).

Τέλος, σημαντικό να αναφερθεί στο κομμάτι του διαχωρισμού των PBDEs και των BFRs γενικά, είναι ότι τα τελευταία χρόνια οι πολυδιάστατες αεριοχρωματογραφικές τεχνικές εφαρμόζονται ολοένα και περισσότερο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη δισδιάτατη αέρια χρωματογραφία (GC x GC). Η αυξημένη επλεκτικότητα που προσδοκάται, οφείλεται στην συνεχώς αυξανόμενη παρουσία και άλλων αλογονομένων ρυπαντών στα περιβαλλοντικά δείγματα, ταυτόχρονα με τα διάφορα BFRs (Covaci et al., 2003).

1.6.2.2. Ανίχνευση των PBDEs:

Σε ότι αφορά τώρα την ανίχνευση των BFRs, οι συνήθεις χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι ο ανιχνευτής μάζας (MS), καθώς και ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Μάλιστα, για τη συγκεκριμένη

ανάλυση, στον ανιχνευτή μάζας (MS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο μια πηγή πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI), όσο και μια πηγή χημικού ιοντισμού σύλληψης ηλεκτρονίων, ρυθμισμένη σε negative ion mode (ECNI). Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι ο ανιχνευτής μάζας έχει τη δυνατότητα λειτουργίας τόσο σε χαμηλή διαχωριστική ικανότητα (LRMS), όσο και σε υψηλή διαχωριστική ικανότητα (HRMS). Η πρώτη λειτουργία εφαρμόζεται ευκολότερα, ενώ η δεύτερη είναι πιο απαιτητική και παρουσιάζει υψηλότερο κόστος. Αν και η δεύτερη λειτουργία παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα της υψηλότερης επιλεκτικότητας και ευαισθησίας, χρησιμοποιείται αποκλειστικά σε EI mode (Covaci et al., 2003).

α. Ανίχνευση με EI-LRMS:

Κατά μια έννοια, η ανίχνευση των PBDEs με EI-LRMS έχει διχάσει. Από τη μια, είναι αποδεδειγμένη η σχετικά χαμηλή της ευαισθησία, ειδικά για τα περισσότερα βρωμιωμένα μέλη (έπτα- έως δέκα-BDEs), και από την άλλη έχει βρεθεί ότι με ένεση μεγάλου όγκου δείγματος (20 μl) είναι δυνατή η ανάλυση των PBDEs σε ανθρώπινους ιστούς, όπου βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Βέβαια, το μόνο σίγουρο είναι ότι η συγκεκριμένη τεχνική παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης τόσο του μοριακού ιόντος κάθε αναλύτη, όσο και πολλών ακόμη ιόντων που προκύπτουν από τη σταδιακή θραυσματοποίηση και την απομάκρυνση ατόμων βρωμίου κατά τον ηλεκτρονικό ιοντισμό. Συνεπώς, η «σκληρή» αυτή τεχνική μπορεί να δώσει σημαντικές δομικές πληροφορίες για κάθε αναλύτη και άρα καλή επιλεκτικότητα, με αποτέλεσμα να είναι λογική η επιλογή της κατά την ανάλυση μειγμάτων οργανοαλογονωμένων ενώσεων (Eljarrat et al., 2002, Ackerman et al., 2005, Covaci et al., 2003).

Μάλιστα, με τη συγκεκριμένη τεχνική, τα επικρατέστερα ιόντα που εμφανίζονται είναι το ιόν του μοριακού ιόντος $[M]^+$ για τους μόνο- έως τους τέτρα-BDEs, και το ιόν $[M-Br_2]^+$ για τους πέντα- έως τους έπτα-BDEs, το οποίο αντιστοιχεί στην απομάκρυνση δύο ατόμων βρωμίου. Τα ιόντα αυτά, είναι εκείνα που έπειτα μέσω της εφαρμογής επιλεγμένης παρακολούθησης

ιόντων (SIM), θα βοηθήσουν στην αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των PBDEs στο εκάστοτε δείγμα (Eljarrat et al., 2002, Covaci et al., 2003).

β. Ανίχνευση με ECNI-LRMS:

Η εφαρμογή αρνητικού ιοντισμού είναι λογική στην περίπτωση των PBDEs, όπου τα ηλεκτραρνητικά άτομα βρωμίου μπορούν να σταθεροποιήσουν το αρνητικό τους φορτίο μέσω ιοντισμού σύλληψης ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια αυτά προέρχονται από τη σύγκρουση ενός δραστικού αερίου (μεθανίου ή αμμωνίας) με τα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας της πηγής ιοντισμού (αναλυτικότερα βλ. ενότητα 3.1.3.1.). Βέβαια, για την πραγματοποίηση του ιοντισμού σύλληψης ηλεκτρονίων, η ενέργεια των ηλεκτρονίων της πηγής ιοντισμού πρέπει να είναι σχετικά χαμηλή (~70 eV) (Covaci et al., 2003).

Η συγκεκριμένη τεχνική είναι αρκετά ευαίσθητη (εξαιτίας και του αποδοτικού ιοντισμού) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό χαμηλών ποσοτήτων BFRs σε μεγάλη ποικιλία δειγμάτων. Ωστόσο, η τεχνική αυτή είναι πιο «μαλακή» από την προηγούμενη, με αποτέλεσμα εκτός των αναμενόμενων ιόντων βρωμίου [Br]- τα οποία είναι και τα επικρατέστερα, μόνο κάποια επιπλέον αρνητικά ιόντα να εμφανίζονται. Χαρακτηριστικά, το μοριακό ιόν είναι δυνατόν να μην εμφανιστεί καθόλου με αυτή τη τεχνική. Όπως καταλαβαίνουμε, τα ιόντα βρωμίου είναι εκείνα που στη συγκεκριμένη περίπτωση μέσω της εφαρμογής της μεθόδου SIM, βοηθούν στον ποσοτικό προσδιορισμό των PBDEs. Όλα τα παραπάνω όμως, περιορίζουν τη δυνατότητα αυτής της τεχνικής να διακρίνει συνεκλουόμενες κορυφές και συνεπώς προκύπτει κάποια αμφιβολία για την επιλεκτικότητά της (Eljarrat et al., 2002, Ackerman et al., 2005, Covaci et al., 2003).

Πρέπει τέλος να σημειωθεί, ότι τα ληφθέντα φάσματα αυτής της τεχνικής επηρεάζονται καθοριστικά από το είδος και την πίεση του χρησιμοποιούμενου δραστικού αερίου για τον χημικό ιοντισμό, τη θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού, αλλά και το χρησιμοποιούμενο όργανο.

Επίσης, οι παραμέτροι που καθορίζουν την επαναληψιμότητα των μετρήσεων αυτής της τεχνικής είναι η καθαρότητα του φέροντος αερίου, η θερμοκρασία και η πίεση της πηγής ιοντισμού, το χρησιμοποιούμενο όργανο και οι συνθήκες βαθμονόμησής του, καθώς και οι ίδιες οι συγκεντρώσεις των αναλυτών (Covaci et al., 2003).

γ. Σύγκριση των τεχνικών EI-LRMS, ECNI-LRMS και EI-HRMS:

Όπως έγινε αντιληπτό, με τη τεχνική EI-LRMS παρέχονται περισσότερες δομικές πληροφορίες λόγω της παρατηρούμενης εκτεταμένης θραυσματοποίησης, με αποτέλεσμα η τεχνική αυτή να θεωρείται περισσότερο επιλεκτική. Ωστόσο, η ευαισθησία της είναι χαμηλή, ειδικά για τα περισσότερα βρωμιωμένα μέλη PBDEs. Από την άλλη, με τη τεχνική ECNI-LRMS δεν παρέχεται καμία δομική πληροφορία, αφού ουσιαστικά τα ιόντα [Br]⁻ είναι αυτά με τη μεγαλύτερη κλασματική αφθονία για τα περισσότερα μέλη. Αν και αυτό το γεγονός περιορίζει φαινομενικά την επιλεκτικότητα της τεχνικής, η τεχνική αυτή παρουσιάζει αρκετά καλή επιλεκτικότητα ως προς τα διάφορα μέλη PBDEs. Για το λόγο αυτό, σε συνδυασμό με την υψηλή ευαισθησία της, εφαρμόζεται εκτενώς στην ανάλυση των PBDEs. Ωστόσο, το ιδανικό θα ήταν αυτές οι δύο τεχνικές να χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά (Eljarrat et al., 2002, Ackerman et al., 2005, Covaci et al., 2003).

Βέβαια, είναι αποδεδειγμένο μέσω της χρήσης πρότυπων διαλυμάτων, ότι μεταξύ αυτών των δύο μεθόδων, η ECNI-LRMS παρουσιάζει σημαντικά καλύτερα όρια ανίχνευσης για τους PBDEs, τα οποία μπορούν να φτάσουν στα επίπεδα των χαμηλών fg (Eljarrat et al., 2002, Ackerman et al., 2005).

Σε ότι αφορά τώρα τη τεχνική EI-HRMS, εξαιτίας του υψηλού της κόστους και της πολυπλοκότητας της εφαρμογής της, η χρήση της δεν είναι εκτενώς διαδεδομένη. Ωστόσο, η τεχνική αυτή είναι προτιμότερη, καταρχήν λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας της (συγκριτικά με την EI-LRMS), αλλά και λόγω της υψηλότερης επιλεκτικότητάς της (συγκριτικά με την ECNI-LRMS). Τα ιόντα που παρακολουθούνται σε αυτή τη τεχνική, είναι παρόμοια με αυτά

της τεχνικής EI-LRMS, απλώς τα επιλεγμένα ιόντα μπορούν να προσδιοριστούν ακριβέστερα (Covaci et al., 2003).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει τέλος το γεγονός ότι η τεχνική EI-HRMS έχει εφαρμοστεί συγκριτικά με την ECNI-LRMS στην ανάλυση προτύπων διαλυμάτων, αλλά και βιολογικών δειγμάτων (αίματος και μητρικού γάλατος). Οι δύο αυτές τεχνικές αποδείχθηκε ότι είναι εξίσου κατάλληλες στον προσδιορισμό των PBDEs, αφού παρουσίασαν παραπλήσιες επαναληψιμότητες και παραπλήσια όρια ανίχνευσης (Covaci et al., 2003, Thomsen et al., 2002).

δ. Ανίχνευση με ECD:

Παρόλο που με τη χρήση του ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) παρουσιάζεται υψηλή ευαισθησία για άλλες οργανοαλογονωμένες ενώσεις (όπως οι PCBs και τα οργανοχλωριωμένα μικροβιοκτόνα), για τα BFRs δεν ισχύει κάτι ανάλογο, με αποτέλεσμα ο ανιχνευτής αυτός να έχει χρησιμοποιηθεί μόνο σε περιπτώσεις όπου οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις των BFRs ήταν υψηλές (Covaci et al., 2003).

Παρόλο το χαμηλό κόστος αγοράς και συντήρησης του συγκεκριμένου ανιχνευτή, υπάρχουν αρκετά μειονεκτήματα κατά την εφαρμογή του στην ανίχνευση των BFRs. Καταρχήν, παρουσιάζει σχετικά καλή ευαισθησία μόνο για βρωμιωμένες ενώσεις με τουλάχιστον τέσσερα άτομα βρωμίου. Επίσης, η ευαισθησία του γενικά ως προς τις οργανοαλογονωμένες ενώσεις, δεν εξαρτάται μόνο από το βαθμό αλογόνωσης, αλλά και από τη θέση των ατόμων των αλογόνων στους δακτυλίους. Ακόμη, ο ανιχνευτής αυτός παρουσιάζει καλή γραμμικότητα μόνο σε μια στενή περιοχή συγκεντρώσεων. Περιορισμένη είναι τέλος και η επιλεκτικότητά του, αφού όλα τα μόρια του δείγματος που περιέχουν κάποιο αλογόνο παρουσιάζουν κάποιο σήμα σε αυτόν τον ανιχνευτή, με αποτέλεσμα η ανάλυση για παράδειγμα των PBDEs να παρεμποδίζεται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων PCBs. Σημαντικό ρόλο στην επιλεκτικότητά του παίζουν βέβαια η χρησιμοποιούμενη στήλη διαχωρισμού, αλλά και η θερμοκρασία του φούρνου (Covaci et al., 2003).

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι ανιχνευτής ECNI-LRMS δικαιολογημένα χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση των PBDEs. Καταρχήν, παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τους ανιχνευτές EI-LRMS και ECD, αλλά και υψηλότερη επιλεκτικότητα σε σχέση με τον ανιχνευτή ECD. Επιπλέον, παρουσιάζει ανάλογη ευαισθησία με το δύσχρηστο και ακριβό ανιχνευτή EI-HRMS. Ακολούθως, στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν οι τέσσερις ανιχνευτές που αναφέραμε σε αυτήν την ενότητα για τον προσδιορισμό των BFRs.

Πίνακας 8: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα χρησιμοποιούμενων ανιχνευτών για την ανίχνευση των BFRs (Covaci et al., 2003)

Detection	Advantages	Drawbacks
ECD	purchase cost maintenance cost ease of use	fair sensitivity for BFRs instability of linear range very low selectivity
EI-LRMS	facilitates the use of labelled standards good selectivity	low sensitivity
ECNI-LRMS	good sensitivity good selectivity for brominated compounds	frequent source maintenance required
EI-HRMS	good sensitivity very good selectivity	purchase cost maintenance cost difficult to use higher "down-time"

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Όπως αναφέρθηκε, η σχετική βιβλιογραφία πάνω στο θέμα του προσδιορισμού των PBDEs σε ανθρώπινα ούρα είναι ανύπαρκτη με βάση τη δική μας πληροφόρηση. Με αφορμή αυτό το γεγονός, ο βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η εύρεση και η ανάπτυξη μιας μεθόδου εκχύλισης, καθαρισμού και απομόνωσης, κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό μη-μεταβολισμένων PBDEs, στην περίπτωση που αυτοί εμφανιστούν σε ανθρώπινα ούρα. Επίσης, σημαντικός σκοπός αυτής της εργασίας, είναι η βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του συστήματος GC-MS που λειτουργεί σε ECNI mode για το διαχωρισμό και την ανίχνευση αυτών των ρυπαντών, καθώς και ο προσδιορισμός των ποιοτικών χαρακτηριστικών του συστήματος για τις συγκεκριμένες αναλύσεις.

Ειδικότερα, σε ότι αφορά καταρχήν το σύστημα GC-MS, οι επιμέρους στόχοι που τέθηκαν ήταν:

- ✓ Η εύρεση της κατάλληλης μεθόδου SIM για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των PBDEs με εφαρμογή ECNI
- ✓ Η βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας, της ενέργειας των ηλεκτρονίων και του ρεύματος των ηλεκτρονίων της πηγής ιοντισμού
- ✓ Η εύρεση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των PBDEs σε αυτό το σύστημα
- ✓ Ο έλεγχος της πιστότητας και της ορθότητας του οργάνου στις συνθήκες βέλτιστης λειτουργίας της εφαρμοσμένης μεθόδου για την ανάλυση των PBDEs με εφαρμογή ECNI
- ✓ Η εύρεση των υπόλοιπων χρωματογραφικών χαρακτηριστικών και των χαρακτηριστικών του ανιχνευτή μάζας

Έπειτα, σε ότι αφορά τη μέθοδο εκχύλισης, καθαρισμού και απομόνωσης των PBDEs, οι επιμέρους στόχοι που τέθηκαν ήταν:

- ✓ Η εύρεση μιας μεθόδου ικανή να διαχωρίζει τους μεταβολισμένους από τους μη-μεταβολισμένους PBDEs, παρόλο που η ανάλυση των πρώτων δεν είναι στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας
- ✓ Η εύρεση μιας μεθόδου που να παρουσιάζει κατά το δυνατόν καθαρά τυφλά δείγματα (απαλλαγμένα από PBDEs και βρωμίες), υψηλές ανακτήσεις και χαμηλά όρια ανίχνευσης (αντίστοιχα με αυτά του οργάνου)
- ✓ Η εφαρμογή της επιλεγμένης μεθόδου σε πραγματικά δείγματα ούρων για τον προσδιορισμό μη-μεταβολισμένων PBDEs σε αυτά
- ✓ Ο έλεγχος της εφαρμογής της επιλεγμένης μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα συγκεντρώσεων PBDEs

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Αναλυτική οργανολογία:

3.1.1. Εισαγωγή:

Για το σκοπό της παρούσας εργασίας, οι αναλύσεις κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθούν σε ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας (Agilent 6890) συνδυασμένη με έναν φασματογράφο μάζας (Agilent 5973), δηλαδή σε ένα σύστημα GC-MS. Η επιλογή αυτού του συστήματος έγινε κυρίως με βάση την υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία, την υψηλή αποδοτικότητα και διαχωριστική ικανότητα, και φυσικά τα πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης που μπορεί να παρέχει, σε συνδυασμό πάντα με μικρούς χρόνους ανάλυσης. Στην Εικόνα 15 που ακολουθεί, παρουσιάζεται το σύστημα GC-MS που μόλις αναφέραμε.



Εικόνα 15: Χρησιμοποιούμενο σύστημα GC-MS

3.1.2. Αέρια χρωματογραφία:

Στην αέρια χρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλουση στη στήλη πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου το οποίο αποτελεί την κινητή φάση η οποία, σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, δεν αλληλεπιδρά με τις ενώσεις του υπό ανάλυση δείγματος. Ο μόνος της ρόλος είναι η διακίνηση του δείγματος κατά μήκος της στήλης. Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ του επιλεγμένου αδρανούς αερίου (κινητή φάση) και ενός μη πτητικού υγρού, ακινητοποιημένου στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού (στατική φάση). Βέβαια, η πολικότητα της στατικής φάσης θα πρέπει να είναι παρόμοια με αυτήν των διαχωριζόμενων ενώσεων. Όταν αυτή η αντιστοιχία είναι ικανοποιητική, η σειρά έκλουσης καθορίζεται τελικά από την πτητικότητα των ενώσεων (Skoog et al., 2002, Χατζηγιωάννου, 2000).

Στην περίπτωση των άπολων PBDEs, χρησιμοποιείται άπολη στατική φάση. Τελικά, η πτητικότητα των διαφόρων μελών είναι αυτή που καθορίζει την σειρά έκλουσής τους. Για το λόγο αυτό, τα λιγότερο βρωμιωμένα μέλη τα οποία είναι πιο πτητικά, εξέρχονται πρώτα. Όμως, η πτητικότητα ως φυσικοχημική ιδιότητα, δεν εξαρτάται μόνο από τον αριθμό των ατόμων βρωμίου, αλλά και από τη θέση τους στο διφαινυλικό δακτύλιο. Σε αυτό το γεγονός στηρίζεται και ο διαχωρισμός των διάφορων ισομερών με την αέρια χρωματογραφία.

Για τις αναλύσεις των PBDEs χρησιμοποιήθηκε η τριχοειδής στήλη DB5-MS. Τα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης στήλης είναι τα εξής:

- Στατική φάση 5% phenyl-methyl-polysiloxane
- Μήκος 30 m
- Εσωτερική διάμετρος 0.25 mm
- Πάχος στατικής φάσης 0.25 μm

Οι χρησιμοποιούμενες τριχοειδείς στήλες, εκτός του ότι βοηθούν στην αποτελεσματική εισαγωγή μικρών ποσοτήτων του δείγματος στο φασματογράφο μάζας, βοηθούν παράλληλα και στη διατήρηση του υψηλού κενού που απαιτεί ο φασματογράφος (Stefanou, 2008).

Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε αέριο Ήλιο σε σταθερή ροή 1 ml/min. Το Ήλιο χρησιμοποιείται παρά το υψηλό του κόστος, λόγω της αδράνειας του έναντι του υλικού κατασκευής του χρωματογράφου, του πληρωτικού υλικού της στήλης, αλλά και των διαχωριζόμενων ενώσεων. Επιπλέον, έχει μικρή πυκνότητα (ιξώδες) επιτρέποντας έτσι τη χρήση στηλών μεγάλου μήκους, δίνοντας τη δυνατότητα αύξησης του αριθμού των θεωρητικών πλακών αλλά και αύξησης της ταχύτητας ροής του, με αποτέλεσμα αφενός την αύξηση της αποτελεσματικότητας της στήλης και αφετέρου την επίτευξη ταχέων διαχωρισμών (Χατζηγιάννου, 2000).

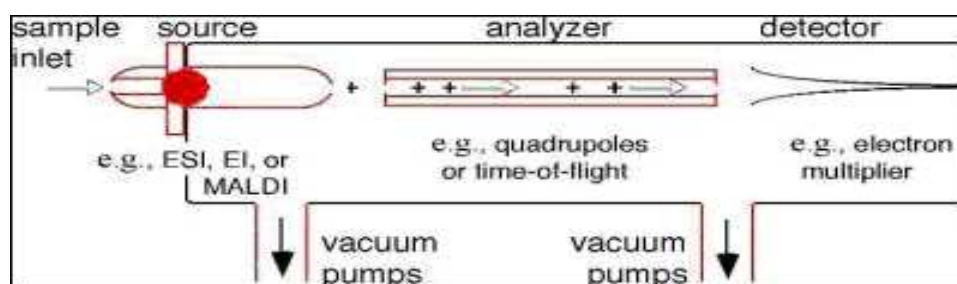
Τέλος, η εισαγωγή του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη πραγματοποιήθηκε με on-column injection από αυτόματο δειγματολήπτη (τον autosampler 7673), λαμβάνοντας 2 μl δείγματος. Επίσης, πριν την αναλυτική στήλη προστίθεται μια μικρή προστατευτική στήλη (guard column) ή προστήλη (pre-column), με σκοπό να αυξηθεί ο χρόνος ζωής της, απομακρύνοντας τυχόν αιωρούμενα σωματίδια και προσμίξεις από τον/τους διαλύτη/τες.

3.1.3. Φασματογράφος μάζας:

Η αρχή λειτουργίας του συστήματος αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας συμπεριλαμβάνει την εξάτμιση του δείγματος στο θάλαμο εισαγωγής του αέριου χρωματογράφου, τη διέλευση των ενώσεων του δείγματος σε μια τριχοειδή στήλη υπό τη ροή του φέροντος αερίου, το διαχωρισμό των ενώσεων στην έξοδο της στήλης και τέλος την ανίχνευσή τους από τον φασματογράφο μάζας. Ο φασματογράφος μάζας με τη σειρά του αποτελείται από τέσσερα τμήματα: την εισαγωγή του δείγματος από την χρωματογραφική στήλη, την πηγή ιοντισμού για τη μετατροπή των ενώσεων σε αεριώδη ιόντα, τον αναλυτή μαζών για την ταξινόμηση των ιόντων και

τέλος τον ανιχνευτή των ιόντων αυτών. Βέβαια, εκτός από αυτά τα τμήματα, κάθε φασματομέτρο μάζας περιλαμβάνει αντλίες δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και ηλεκτρονικό υπολογιστή για την ταχεία παρουσίαση, επεξεργασία και ερμηνεία του προκύπτοντος φάσματος, αλλά και τον έλεγχο της λειτουργίας του συνολικού συστήματος (Skoog et al., 2002, Stefanou, 2008).

Στο σχήμα που ακολουθεί (Εικόνα 16), παρουσιάζονται συνοπτικά τα βασικά τμήματα ενός φασματογράφου μάζας. Στα τμήματα αυτά θα αναφερθούμε εκτενέστερα αμέσως τώρα.



Εικόνα 16: Τα βασικά τμήματα ενός φασματογράφου μάζας (Stefanou, 2008)

3.1.3.1. Πηγή ιόντων (ion source):

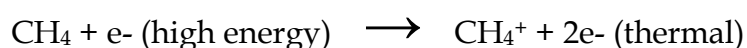
Ως γνωστόν, οι αναλύτες μας (PBDEs) περιέχουν τα πολύ ηλεκτραρνητικά άτομα βρωμίου, οπότε υπάρχει η δυνατότητα σταθεροποίησης του αρνητικού τους φορτίου συνήθως μέσω του ιοντισμού σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture ionization). Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνιστάται η εφαρμογή του αρνητικού χημικού ιοντισμού (NCI) στο φασματογράφο μάζας (MS).

Καταρχήν, εξερχόμενες οι αέριες ουσίες από τη χρωματογραφική στήλη, εισέρχονται μέσω της γραμμής μεταβίβασης (transfer line) στην πηγή ιόντων. Εκεί, όπως και στην περίπτωση του ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI), ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα ρηνίου και επιταχύνονται με μια τάση περίπου 70 eV η οποία εφαρμόζεται μεταξύ του νήματος (filament) και μιας ανόδου. Έπειτα, ο χημικός ιοντισμός (CI) απαιτεί τον ιοντισμό των αέριων ουσιών του δείγματος μέσω της σύγκρουσής τους με ηλεκτρόνια τα οποία δημιουργούνται με βομβαρδισμό

ενός δραστικού αερίου με τα αρχικά ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Συνήθως χρησιμοποιούνται θετικά ιόντα (στον PCI), αλλά μερικές φορές όπως στην περίπτωση μας, όπου οι αναλύτες περιέχουν πολύ ηλεκτροαρνητικά άτομα, χρησιμοποιείται χημικός ιονισμός με αρνητικά ιόντα (NCI) (Skoog et al., 2002, Stefanou, 2008, Covaci et al., 2003).

Σε κάθε περίπτωση πάντως, πρέπει να πραγματοποιηθεί τέτοια τροποποίηση στην πηγή ιοντισμού ώστε η πίεση του δραστικού αερίου να διατηρείται περίπου στο 1 Torr, ενώ η πίεση των προς ανάλυση ουσιών να διατηρείται κάτω από τα 10^{-5} Torr. Με αυτές τις αλλαγές, το αέριο αντιδραστήριο εισάγεται στην περιοχή ιοντισμού σε τέτοια ποσότητα, ώστε ο λόγος των συγκεντρώσεων αντιδραστηρίου/δείγματος να είναι 10^3 έως 10^4 . Λόγω της μεγάλης αυτής διαφοράς συγκεντρώσεων, η αρχική δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντιδρά αποκλειστικά με τα μόρια του δραστικού αερίου (Skoog et al., 2002).

Στη δική μας περίπτωση, το δραστικό αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μεθάνιο. Συνεπώς, η αρχική αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην περιοχή ιοντισμού, είναι η εξής:



Έπειτα, τα χαμηλότερης ενέργειας θερμικά ηλεκτρόνια που προκύπτουν, είναι εκείνα που τελικά αντιδρούν με τις αέριες ουσίες του δείγματος πραγματοποιώντας έναν ιοντισμό σύλληψης ηλεκτρονίων (MSD Agilent 5973, Instrumental manual).

Σε αυτό το σημείο, πρέπει να αναφερθεί ότι από τη στιγμή που για να ανιχνευτούν οι εξεταζόμενοι αναλύτες με NCI είναι απαραίτητη η λειτουργία της πηγής ιοντισμού σε negative ion mode, τα οποιαδήποτε θετικά ιόντα που δημιουργούνται δεν ανιχνεύονται. Ωστόσο, τα θετικά αυτά ιόντα παραμένουν στην πηγή, με αποτέλεσμα την πιθανή καταστολή της αντίδρασης σύλληψης των θερμικών ηλεκτρονίων από τις αναλυόμενες ουσίες. Τέλος, με το να μη δημιουργούνται αρνητικά ιόντα του δραστικού

αερίου, το ανύπαρκτο σήμα υποβάθρου είναι μια σημαντική αιτία για τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που επιτυγχάνονται με τον NCI (MSD Agilent 5973, Instrumental manual).

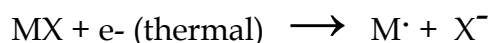
Χρήσιμο επίσης να αναφερθεί, είναι ότι για να πραγματοποιηθεί ο NCI στο εργαστήριό μας, στο κενό που δημιουργείται πρέπει να υπάρχει πίεση $2.5 \cdot 10^{-5}$ torr, τιμή που αντιστοιχεί στο 40% της μέγιστης ροής του μεθανίου δηλαδή στη τιμή 2 ml/min.

Όπως έγινε αντιληπτό, την αρχική αντίδραση του δραστικού αερίου, ακολουθεί ο ιοντισμός των προς ανάλυση ουσιών μέσω της σύλληψης των ηλεκτρονίων χαμηλής ενέργειας, ο οποίος περιγράφεται με τη γενική αντίδραση:



Στην αντίδραση αυτή, με MX συμβολίζουμε το μόριο της προς ανάλυσης βρωμιωμένης ουσίας (όπου $X=Br$) και με $MX^{\cdot-}$ την αντίστοιχη ανιοντική ρίζα που προκύπτει. Βέβαια, στις περιπτώσεις που η προκύπτουσα ανιοντική ρίζα είναι ασταθής, πραγματοποιείται η αντίστροφη αντίδραση σχεδόν ακαριαία (MSD Agilent 5973, Instrumental manual).

Τον ιοντισμό σύλληψης ηλεκτρονίων, συχνά αντικαθιστά ο ιοντισμός σύλληψης ηλεκτρονίων ακολουθούμενος από διάσπαση (dissociative electron capture ionization). Από τον ιοντισμό, αυτή τη φορά προκύπτει μια ρίζα και ένα ανιόν (συνήθως του ηλεκτραρνητικού στοιχείου), διαδικασία που περιγράφεται με τη γενική αντίδραση:

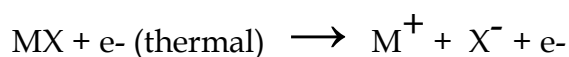


Στην αντίδραση αυτή, με MX συμβολίζουμε το μόριο της προς ανάλυσης βρωμιωμένης ουσίας (όπου $X=Br$) και με X^- το ανιόν του βρωμίου (Br^-). Επίσης, στις περιπτώσεις που τα προϊόντα είναι ασταθή,

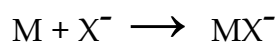
πραγματοποιείται η αντίστροφη αντίδραση σχεδόν ακαριαία (MSD Agilent 5973, Instrumental manual).

Πρέπει να αναφέρουμε, ότι η συγκεκριμένη αντίδραση είναι πολύ συνηθισμένη στην περίπτωση των PBDEs, αφού τα ανιόντα του βρωμίου τα οποία αντιστοιχούν στους λόγους $m/z = 79$ και 81 , είναι τα επικρατέστερα ιόντα της θραυσματοποίησης για τα περισσότερα μέλη. Χαρακτηριστικά ιόντα αυτού του μηχανισμού είναι επίσης τα ιόντα $[HBr_2]^-$, τα οποία αντιστοιχούν στο λόγο $m/z = 161$ (Eljarrat et al., 2002). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι αυτός ο μηχανισμός δεν παρέχει την ίδια ευαισθησία με τον κλασικό ιοντισμό σύλληψης ηλεκτρονίων, καθώς και ότι τα φάσματα μάζας που παρέχει εμφανίζουν γενικά χαμηλότερες αφθονίες για τα μοριακά ιόντα (MSD Agilent 5973, Instrumental manual).

Ακόμη δύο μηχανισμοί που μπορούν να αντικαταστήσουν τον ιοντισμό σύλληψης ηλεκτρονίων, είναι ο σχηματισμός ζεύγους ιόντων (ion pair formation), αλλά και οι αντιδράσεις ιόντων-μορίων (ion-molecule reactions). Ο πρώτος μηχανισμός παρέχει τη δυνατότητα σχηματισμού ενός κατιόντος και ενός ανιόντος, και περιγράφεται με τη γενική αντίδραση:



Στην αντίδραση αυτή, με MX συμβολίζουμε το μόριο της προς ανάλυσης βρωμιωμένης ουσίας (όπου $X=Br$), με X^- το ανιόν του βρωμίου (Br^-) και με M^+ το κατιόν του υπόλοιπου θραύσματος. Ο δεύτερος μηχανισμός πραγματοποιείται όταν οξυγόνο, υδρατμοί και άλλες βρωμιές είναι παρούσες στην πηγή του χημικού ιοντισμού. Οι αντιδράσεις ιόντων-μορίων είναι 2 με 4 φορές πιο αργές από τον ιοντισμό σύλληψης ηλεκτρονίων και παρέχουν χαμηλότερες ευαισθησίες. Ο μηχανισμός αυτός περιγράφεται με τη γενική αντίδραση:



Στην αντίδραση αυτή, με X^- συμβολίζουμε το ανιόν (συνήθως υδροξυλίου ή αλογόνου) της εμφανιζόμενης βρωμιάς που έχει προκύψει απευθείας από τα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας του filament, και με MX^- το ανιόν που προκύπτει με το μόριο της προς ανάλυσης ουσίας (M). Γίνεται φανερό, ότι όσο περισσότερες αντιδράσεις τέτοιου είδους πραγματοποιούνται, τόσο λιγότερες θα είναι οι αντιδράσεις ιοντισμού σύλληψης ηλεκτρονίων και τόσο η ευαισθησία της ανάλυσης θα μειώνεται. Για το λόγο αυτό, όλες οι πιθανές πηγές μόλυνσης (συνήθως ατμοσφαιρικό οξυγόνο και υδρατμοί) πρέπει να ελαχιστοποιούνται (MSD Agilent 5973, Instrumental manual).

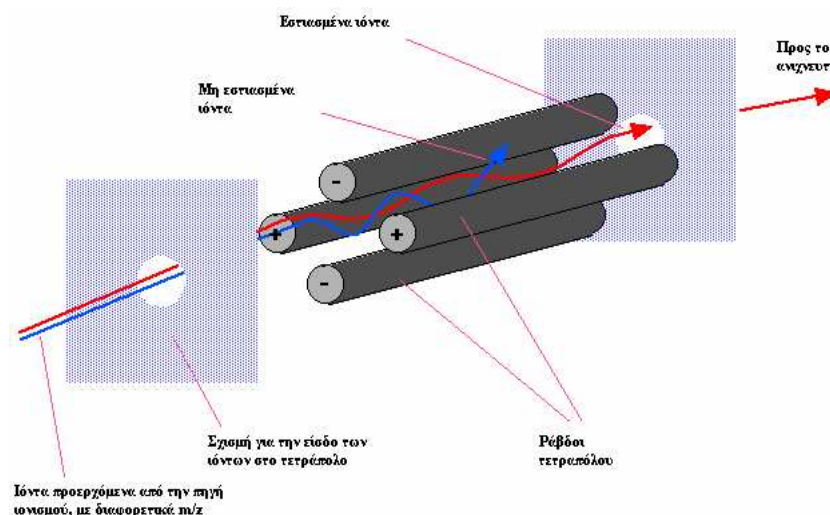
3.1.3.2. Αναλυτής μαζών (mass analyzer):

Τα αέρια ιόντα που παράγονται από την πηγή ιοντισμού, οδηγούνται μέσω της περιοχής επιτάχυνσης των ιόντων στον αναλυτή μαζών, με μια χαμηλή τάση που εφαρμόζεται μεταξύ της πρώτης επιταχυντικής πλάκας και των απωθητών (repellers), η οποία είναι ικανή να δημιουργήσει μια ταινιωτή δέσμη ιόντων. Στην περίπτωση του φασματογράφου μάζας Agilent 5973, ο χρησιμοποιούμενος αναλυτής για το διαχωρισμό των αέριων ιόντων της δέσμης, είναι το τετραπολικό φίλτρο.

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές κυλινδρικές ράβδους (πόλους), οι οποίες είναι συμμετρικά τοποθετημένες ως προς τη δέσμη των ιόντων και διαγωνίως συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με τον πόλο μιας πηγής τάσεως, η οποία παρέχει μια συνεχή (V_1) και εναλλασσόμενη (V_2) τάση. Για δεδομένη συχνότητα ω και για δεδομένες τιμές V_1 και V_2 , μόνο κάποια ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z θα εξέλθουν από το τετραπολικό φίλτρο, ενώ τα υπόλοιπα θα προσκρούσουν στους πόλους και θα χάσουν το φορτίο τους. Η σάρωση των τιμών m/z μπορεί να επιτευχθεί είτε μεταβάλλοντας την εφαρμοζόμενη συχνότητα ω και διατηρώντας τις τιμές των τάσεων σταθερές, είτε διατηρώντας σταθερή τη συχνότητα και μεταβάλλοντας τις τιμές των τάσεων, έτσι ώστε ο λόγος τους (V_1/V_2) να είναι πάντα σταθερός. Σε κάθε περίπτωση πάντως, στον ανιχνευτή θα φτάσουν μόνο ιόντα των οποίων οι

τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών, τα οποία ωστόσο έχουν διαχωριστεί επιτυχώς (Skoog et al., 2002, Stefanou, 2008).

Στην Εικόνα 17 που ακολουθεί, παρουσιάζεται το εσωτερικό τμήμα ενός τετραπολικού φίλτρου.



Εικόνα 17: Το εσωτερικό τμήμα του τετραπολικού φίλτρου (Stefanou, 2008)

3.1.3.3. Ανιχνευτής μαζών (mass detector):

Μετά την έξοδο τους από το τετραπολικό φίλτρο, τα διαχωρισμένα ιόντα προσπίπτουν στον ανιχνευτή του συστήματος, ο οποίος παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού των ιόντων και του φορτίου τους. Στη δική μας περίπτωση, ο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι ένας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electromultiplier).

Ο μεταλλάκτης αυτός αποτελείται από μια σειρά διακριτών δυνόδων, η οποία βρίσκεται σε διαδοχικώς αυξανόμενα δυναμικά. Ιόντα τα οποία προσκρούουν στην πρώτη επιφάνεια δυνόδου κοντά στην είσοδο, εκβάλλουν ηλεκτρόνια τα οποία στη συνέχεια προσκρούουν στην επόμενη δύνοδο, προκαλώντας έτσι την αποδέσμευση περισσότερων ηλεκτρονίων, φαινόμενο που ενισχύεται διαρκώς σε κάθε πρόσκρουση. Τελικά οι μεταλλάκτες αυτού του τύπου, παρέχουν εσωτερική ενίσχυση του ηλεκτρικού σήματος της τάξης του 10^6 ή και μεγαλύτερη (Skoog et al., 2002).

Τέλος, η έξοδος του ανιχνευτή συνδέεται με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή για την ταχεία συλλογή, επεξεργασία και ερμηνεία των ληφθέντων φασμάτων.

3.2. Εναρκτήριες διαδικασίες στο φασματογράφο μάζας:

3.2.1. Καθορισμός θερμοκρασιακού προγράμματος:

Όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της αέριας χρωματογραφίας (ισόθερμη αέρια χρωματογραφία), συχνά είναι σχεδόν αδύνατον να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός και ανίχνευση των συστατικών ενός μείγματος, ειδικά όταν αυτά είναι πολυάριθμα ή όταν τα σημεία ζέσεώς τους ή/και οι πολικότητές τους καλύπτουν ευρείες περιοχές. Αυτό συμβαίνει διότι οι κορυφές των πτητικότερων συστατικών αλληλεπικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό, ενώ οι κορυφές των λιγότερο πτητικών συστατικών είναι μικρού ύψους και πλατιές. Για τους λόγους αυτούς, κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή της θερμοπρογραμματιζόμενης αέριας χρωματογραφίας, κατά την οποία η θερμοκρασία της στήλης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της έκλουσης των συστατικών με βάση προκαθορισμένο πρόγραμμα. Με την εφαρμογή αυτή, επιτυγχάνονται διακριτές κορυφές για ενώσεις των οποίων τα σημεία ζέσεως βρίσκονται σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών, και μάλιστα σε πολύ μικρότερο χρόνο απ' ό,τι με την ισόθερμη λειτουργία της στήλης. Επιπλέον, με αυτόν τον τρόπο οι κορυφές γίνονται οξύτερες και πιο ομοιόμορφες, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποσοτικό προσδιορισμό (Χατζηιωάννου, 2000).

Στην περίπτωση μας, η θερμοκρασία στο θάλαμο εισαγωγής του δείγματος και στο φούρνο της χρωματογραφίας ήταν 93 °C και 90 °C αντίστοιχα. Μετά την εισαγωγή του δείγματος, ακολουθούσε πρόγραμμα αύξησης της θερμοκρασίας στον θάλαμο εισαγωγής, αλλά και στο φούρνο. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου διαρκούσε 36,83 min και είχε ως εξής:

- Αρχική θερμοκρασία 90 °C
- Αύξηση έως τους 140 °C με ρυθμό 50 °C/min
- Αύξηση έως τους 220 °C με ρυθμό 15 °C/min
- Αύξηση έως τους 295 °C με ρυθμό 10 °C/min

Τέλος, οι θερμοκρασίες της γραμμής μεταφοράς, της πηγής ιόντων και του τετραπολικού φίλτρου διατηρήθηκαν στους 295, 250 και 150 °C αντίστοιχα.

3.2.2. Εφαρμογή παρακολούθησης χαρακτηριστικού ιόντος (SIM):

Η παρακολούθηση χαρακτηριστικού ιόντος (SIM) αποτελεί μία μέθοδο όπου κατά την εφαρμογή της, παρακολουθείται είτε ένα συγκεκριμένο ιόν είτε ένα ζευγάρι ιόντων. Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη στην περίπτωση ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων ενώσεων σε σύνθετα μείγματα, όταν το φάσμα μάζας τους είναι γνωστό. Με τη τεχνική αυτή, καταρχήν εξασφαλίζονται υψηλή ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης. Αυτό συμβαίνει διότι ο χρόνος μέτρησης του σήματος του/των επιλεγμένου/νων ιόντος/ων, είναι υψηλότερος σε σχέση με αυτόν της πλήρους σάρωσης (Full Scan), όπου στον ίδιο περίπου χρόνο πρέπει να υπολογιστεί το σήμα όλων των ιόντων κάθε ένωσης. Λόγω της επιλεγμένης παρακολούθησης ιόντων, η τεχνική SIM παρέχει τελικά και μια ταχύτερη ανάλυση. Είναι προφανές, ότι οι περιοχές του φάσματος που περιέχουν ιόντα εκτός των επιλεγμένων, δεν παρακολουθούνται (Μπέσης, 2008).

Ένα μειονέκτημα της τεχνικής SIM είναι η σχετικά μειωμένη εξειδίκευσή της, η οποία έγκειται στο γεγονός ότι ενώσεις οι οποίες κατά τη θραυσματοποίησή τους αποδίδουν ιόντα με ταυτόσημους λόγους m/z με τα επιλεγμένα, δημιουργούν πρόβλημα στο χαρακτηρισμό των επιθυμητών ενώσεων. Για τη βελτιστοποίηση της τεχνικής SIM μπορούν να χρησιμοποιηθούν στοιχεία από την πλήρη σάρωση (Full Scan). Με τη μέθοδο Full Scan παρέχεται ένα πλήρες φάσμα σε όλη την κλίμακα μαζών μιας ένωσης, εφόσον ο αναλυτής μαζών σαρώνει όλες τις μάζες χωρίς καμία

διακοπή. Η μέθοδος αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην ταυτοποίηση αγνώστων ενώσεων ενός μείγματος, καθώς και στον προσδιορισμό των μοριακών τους βαρών. Συνεπώς, η μέθοδος Full Scan παρέχει περισσότερες πληροφορίες για το δείγμα συγκριτικά με τη μέθοδο SIM, ωστόσο όπως αναφέρθηκε δεν χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, διότι αφιερώνει λιγότερο χρόνο στην μέτρηση του σήματος κάθε ιόντος (Μπέσης, 2008).

Γίνεται κατανοητό, ότι πριν την ανάλυση κάθε δείγματος είναι αναγκαία η πλήρης σάρωση (Full Scan) του φάσματος των επιθυμητών ενώσεων (από πρότυπα διαλύματα), τόσο για την ταυτοποίησή τους όσο και για την εύρεση του/των κατάλληλου/ων ιόντος/ων που θα χρησιμοποιηθεί/ούν ακολούθως στη μέθοδο SIM, η οποία τελικά θα βοηθήσει στην ανίχνευση των αναμενόμενων ιχνοποσοτήτων.

Πίνακας 9: Κύρια ιόντα μελών PBDEs μετά από Full Scan με NCI

Χρόνος κατακράτησης (min)	Μέλος PBDE	Βαθμός βρωμίωσης	Κύριο ιόν (ή ομάδα ιόντος) μετά από Full Scan
8,623	BDE-7	2	Br- (m/z= 79,81)
9,229	BDE-15	2	Br- (m/z= 79,81)
10,846	BDE-17	3	Br- (m/z= 79,81)
11,177	BDE-28	3	Br- (m/z= 79,81)
12,812	BDE-49	4	Br- (m/z= 79,81)
12,921	BDE-71	4	Br- (m/z= 79,81)
13,144	BDE-47	4	Br- (m/z= 79,81)
13,464	BDE-66	4	Br- (m/z= 79,81)
13,949	BDE-77	4	Br- (m/z= 79,81)
14,658	BDE-100	5	Br- (m/z= 79,81)
14,887	BDE-119	5	Br- (m/z= 79,81)
15,212	BDE-99	5	Br- (m/z= 79,81)
16,316	BDE-85	5	Br- (m/z= 79,81)
16,59	BDE-126	5	Br- (m/z= 79,81)
16,858	BDE-154	6	Br- (m/z= 79,81)
17,99	BDE-153	6	Br- (m/z= 79,81)
18,43	13C-BDE-139	6	Br- (m/z= 79,81)
19,739	BDE-138	6	Br- (m/z= 79,81)
20,602	BDE-156	6	Br- (m/z= 79,81)
21,271	BDE-184	7	[M-HBr ₃]- (m/z= 409)
22,179	BDE-183	7	Br- (m/z= 79,81)
23,62	BDE-191	7	[M-HBr ₂]- (m/z= 487)
30,644	BDE-197	8	[M-HBr ₃]- (m/z= 409)
33,164	BDE-196	8	Br- (m/z= 79,81)

Στη δική μας περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε ένα standard (50-250 pgr/μl) που περιείχε 23 φυσικά (native) μέλη PBDEs και ένα ιχνηθετημένο (label) μέλος PBDE. Στον Πίνακα 9 που προηγείθηκε, παρουσιάστηκαν τα μέλη αυτά, ο χρόνος κατακράτησής τους, καθώς και το επικρατέστερο ιόν (ή ομάδα ιόντος) κάθε μέλους μετά από Full Scan με NCI.

Παρατηρούμε ότι για τα περισσότερα μέλη, το πιο άφθονο ιόν είναι συνήθως το ιόν βρωμίου [Br]⁻. Στις περιπτώσεις των βαρύτερων μελών (με 7 ή 8 άτομα βρωμίου), μπορεί το πιο άφθονο ιόν να είναι εκείνο που αντιστοιχεί στην απομάκρυνση της ομάδας -HBr₂ ή -HBr₃ από το μοριακό ιόν (σε συμφωνία με την αναφορά των Ackerman et al., 2005). Η τιμή m/z που δίνεται σε παρένθεση, σε αυτές τις περιπτώσεις αντιστοιχεί στη μεσαία κορυφή m/z από μια πληθώρα κορυφών (ομάδας ή cluster) που προκύπτουν με την απομάκρυνση της αντίστοιχης ομάδας. Τέλος, αξιοσημείωτο είναι το ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων (εξαιρουμένων των μελών BDE-7, BDE-15, BDE-77, BDE-126 και BDE-191) μικρότερη ή σημαντικότερη αφθονία παρουσιάζουν και οι κορυφές που αποτελούν το cluster του ιόντος [HBr₂]⁻, δηλαδή οι κορυφές με m/z = 159, 161 και 163.

Με βάση τα παραπάνω συμπεράσματα, κρίθηκε σκόπιμο η SIM μέθοδος που θα αναπτύξουμε για τον προσδιορισμό των PBDEs με NCI, να περιέχει καταρχήν τις τιμές m/z = 79 και 81 που αντιστοιχούν στο ιόν [Br]⁻, καθώς και τις τιμές m/z = 159, 161 και 163 που αντιστοιχούν στο ιόν [HBr₂]⁻.

3.2.3. Βαθμονόμηση του συστήματος:

Η βαθμονόμηση του συστήματος GC-MS λαμβάνει χώρα σε καθημερινή βάση πριν τη χρήση του ώστε να εξασφαλιστεί η βέλτιστη λειτουργία του. Πρόκειται για μία αυτοματοποιημένη διαδικασία (autotune), κατά την οποία χρησιμοποιείται η πέρφλουρο-τριβούτυλο-αμίνη (C₁₂F₂₇N, PFTBA) ως αέριο βαθμονόμησης. Το αέριο αυτό βρίσκεται σε έναν μικρό θάλαμο κατασκευασμένο από γυαλί, ο οποίος είναι τοποθετημένος στην κορυφή του χώρου εκκένωσης. Με τη βαθμονόμηση αυτή, επιτυγχάνεται η αυτόματη ρύθμιση των παραμέτρων του φασματομέτρου μαζών ώστε να

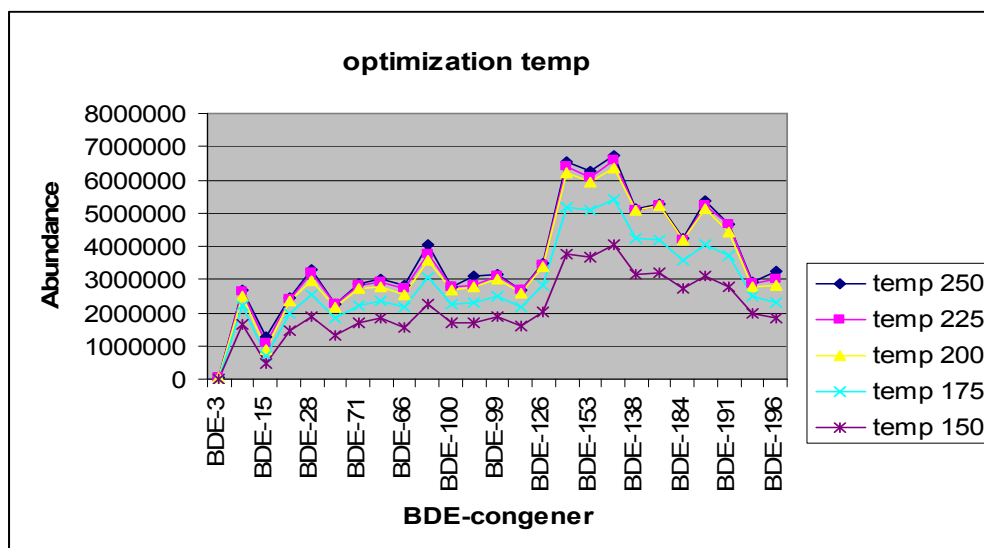
ανταποκρίνονται στα προκαθορισμένα κριτήρια που υπαγορεύονται κατά τη λειτουργία του οργάνου. Κατόπιν, υπολογίζονται με ακρίβεια οι μάζες όλων των κορυφών μέσω συσχέτισης του χρόνου σάρωσης των κορυφών αυτών με τον αντίστοιχο χρόνο των κορυφών του αερίου βαθμονόμησης, του οποίου το φάσμα μάζας καθώς και οι ακριβείς μάζες όλων των κορυφών είναι γνωστά εκ των προτέρων (Μπέσης, 2008).

3.3. Βελτιστοποίηση παραμέτρων στο φασματογράφο μάζας:

Εκτός όμως από τις παραπάνω διαδικασίες που πάντα κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν κατά τη λειτουργία ενός συστήματος GC-MS με σκοπό την ανάλυση ιχνοποσοτήτων, κρίθηκε επίσης απαραίτητη η βελτιστοποίηση τριών ακόμη παραμέτρων που έχουν μεγάλη σημασία κατά την εφαρμογή του αρνητικού χημικού ιοντισμού και μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ευαισθησία της ανάλυσης και τα όρια ανίχνευσης των αναλυτών. Οι παράμετροι αυτοί είναι: η θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού (ion source temperature), η ενέργεια των υψηλής ενέργειας ηλεκτρονίων που προέρχονται από το filament (electron energy), καθώς και το ρεύμα των ηλεκτρονίων αυτών (emission current) (Ackerman et al., 2005).

3.3.1. Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας της πηγής ιοντισμού:

Χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα σε τολουόλιο των ενώσεων που καταγράψαμε προηγουμένως, συγκέντρωσης 4-19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ και εφαρμόζοντας μέθοδο SIM παρακολουθώντας μόνο το ανιόν $[\text{Br}^-]$, ελέγξαμε αρχικά την διαφορά που παρουσιάζουν οι αφθονίες των κορυφών των PBDEs στις εξής θερμοκρασίες της πηγής ιοντισμού: 150, 175, 200, 225 και 250 $^{\circ}\text{C}$, τιμές που επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία (Eljarrat et al., 2002, Ackerman et al., 2005). Πρέπει να αναφερθεί ότι βάσει του κατασκευαστή, η μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή θερμοκρασίας της πηγής ιοντισμού είναι 300 $^{\circ}\text{C}$. Ολοκληρώνοντας τις κορυφές όλων των μελών PBDEs σε όλες τις θερμοκρασίες της πηγής ιοντισμού, προέκυψε το εξής διάγραμμα (Εικόνα 18):

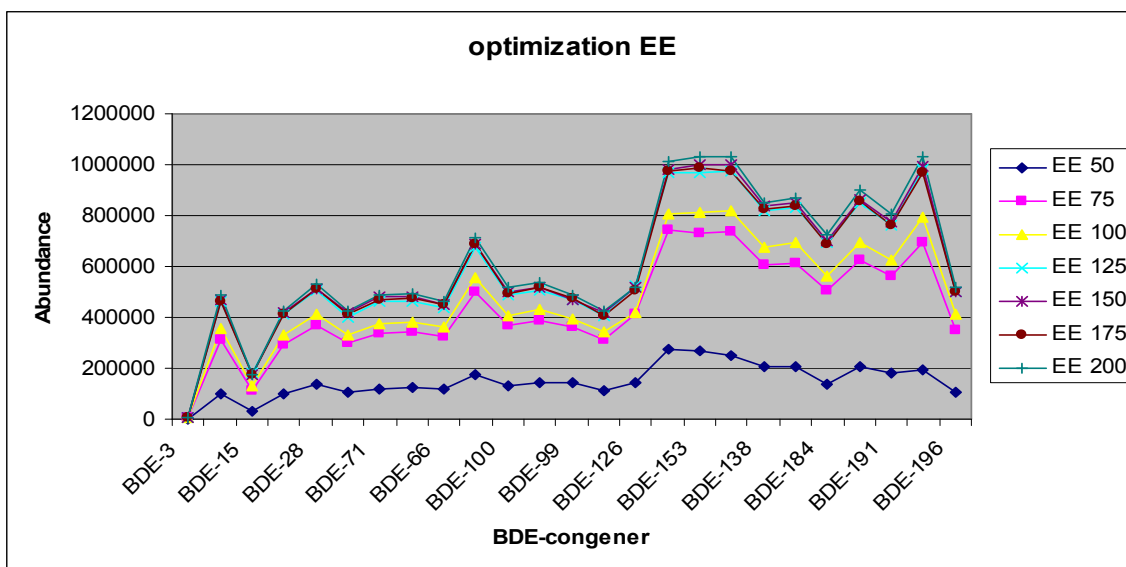


Εικόνα 18: Επίδραση της θερμοκρασίας της πηγής ιοντισμού στο εμβαδόν των κορυφών των PBDEs

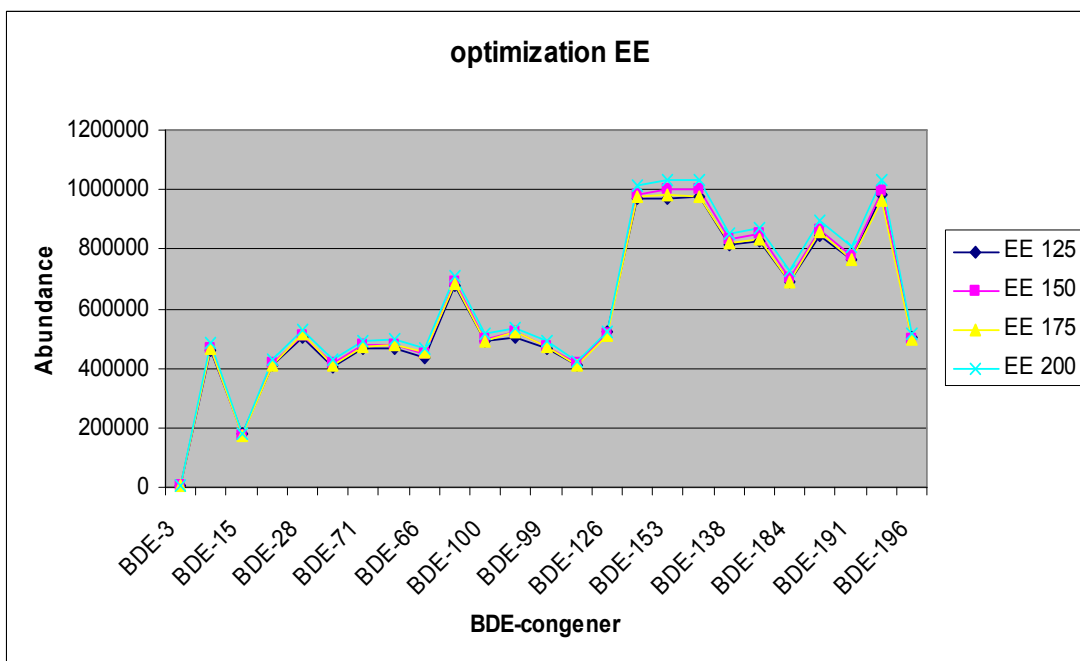
Με βάση το παραπάνω διάγραμμα, καταλήγουμε στο ότι με μικρή διαφορά, η βέλτιστη θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού είναι οι 250 °C. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αντίστοιχο της βιβλιογραφίας (Eljarrat et al., 2002, Ackerman et al., 2005).

3.3.2. Βελτιστοποίηση της ενέργειας ηλεκτρονίων:

Διατηρώντας τη θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού στους 250 °C, ακολούθως ελέγξαμε την διαφορά που παρουσιάζουν οι αφθονίες των κορυφών των PBDEs στις εξής ενέργειες ηλεκτρονίων: 50, 75, 100, 125, 150, 175 και 200 eV, τιμές που επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία των Ackerman et al. (2005). Ολοκληρώνοντας τις κορυφές όλων των μελών PBDEs σε όλες τις ενέργειες ηλεκτρονίων, προέκυψε το εξής διάγραμμα (Εικόνα 19):



Εικόνα 19α: Επίδραση της ενέργειας ηλεκτρονίων στο εμβαδόν των κορυφών των PBDEs



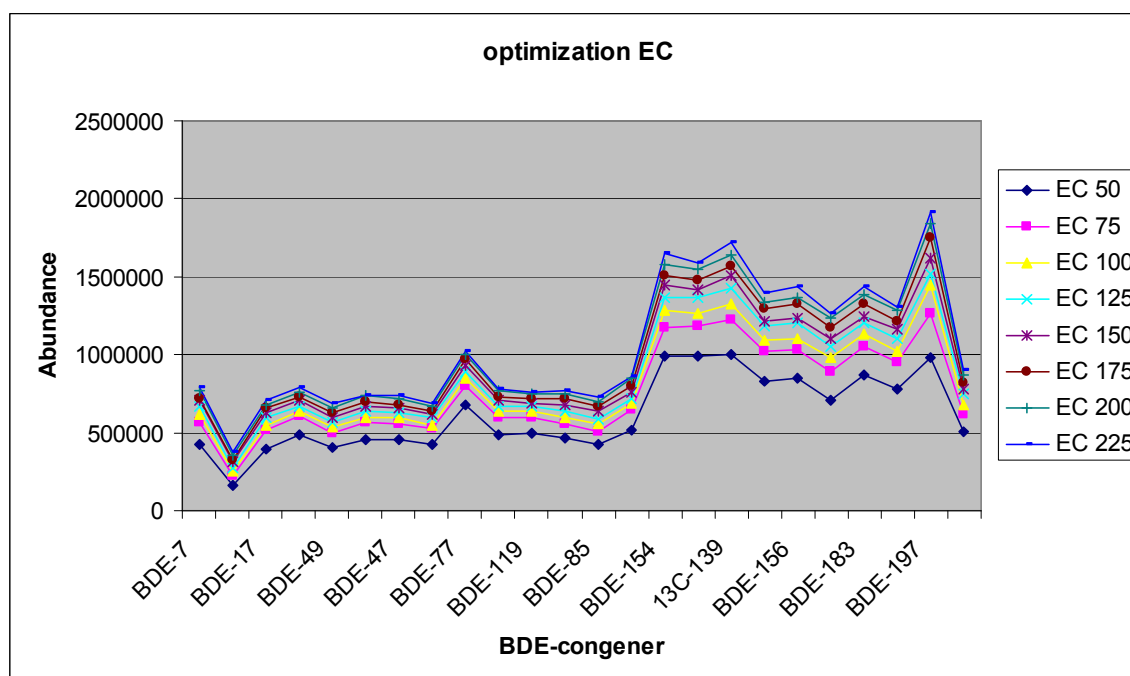
Εικόνα 19β: Επίδραση της ενέργειας ηλεκτρονίων στο εμβαδόν των κορυφών των PBDEs

Με βάση αυτό το αποτέλεσμα, βλέπουμε ότι οι τέσσερις μεγαλύτερες τιμές ενέργειας ηλεκτρονίων παρέχουν περίπου τις ίδιες αφθονίες. Αυτό φαίνεται καλύτερα εάν εστιάσουμε στην επίμαχη περιοχή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 19b.

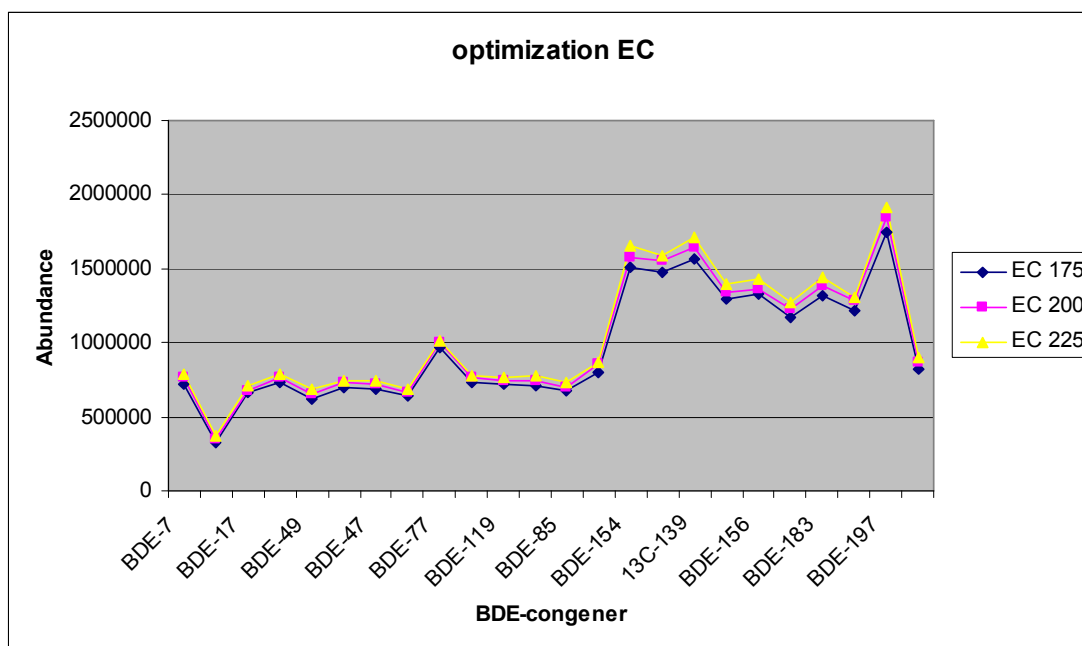
Εξαιτίας των ελαχίστων αυτών διαφορών, κρίθηκε σκόπιμη η επιλογή της τιμής των 125 eV για την ενέργεια των ηλεκτρονίων, τιμή που αντιστοιχεί στην ενέργεια των ηλεκτρονίων που δημιουργείται στο filament κατά τη διάρκεια της αυτόματης βαθμονόμησης (autotune). Πάντως, η γενικώς αναλογική σχέση που επικρατεί μεταξύ της αύξησης της ενέργειας των ηλεκτρονίων και της αυξανόμενης αφθονίας των κορυφών, επιβεβαιώνεται και στη βιβλιογραφία για τα ανιόντα βρωμίου (Ackerman et al., 2005).

3.3.3. Βελτιστοποίηση του ρεύματος ηλεκτρονίων:

Διατηρώντας τη θερμοκρασία της πηγής ιοντισμού στους 250 °C και την ενέργεια ηλεκτρονίων του filament στα 125 eV, ακολούθως ελέγξαμε την διαφορά που παρουσιάζουν οι αφθονίες των κορυφών των PBDEs στα εξής ρεύματα ηλεκτρονίων: 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 και 225 μA , τιμές που επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία των Ackerman et al. (2005). Ολοκληρώνοντας τις κορυφές όλων των μελών PBDEs σε όλα τα ρεύματα ηλεκτρονίων, προέκυψε το εξής διάγραμμα (Εικόνα 20):



Εικόνα 20α: Επίδραση του ρεύματος ηλεκτρονίων στο εμβαδόν των κορυφών των PBDEs



Εικόνα 20b: Επίδραση του ρεύματος ηλεκτρονίων στο εμβαδόν των κορυφών των PBDEs

Με βάση αυτό το αποτέλεσμα, βλέπουμε ότι αυξανόμενης της τιμής του ρεύματος ηλεκτρονίων, οι αφθονίες σταδιακά αυξάνονται. Η αναλογική αυτή σχέση επιβεβαιώνεται και στη βιβλιογραφία για τα ανιόντα βρωμίου (Ackerman et al., 2005). Αυτό φαίνεται καλύτερα και εάν εστιάσουμε στην περιοχή των τριών υψηλότερων τιμών του ρεύματος ηλεκτρονίων (όπου όμως αυτή η αύξηση είναι μικρότερη), όπως φαίνεται στην Εικόνα 20b.

Εξαιτίας λοιπόν της σταδιακής αύξησης της αφθονίας με αυξανόμενη την τιμή του ρεύματος ηλεκτρονίων, κανονικά θα έπρεπε να επιλέξουμε την τιμή των 225 μA ως βέλτιστη. Ωστόσο, επειδή βάσει του κατασκευαστή η τιμή αυτή είναι η μέγιστη επιτρεπόμενη για το ρεύμα των ηλεκτρονίων, επιλέχθηκε η αμέσως προηγούμενη τιμή (220 μA), που όπως εξάλλου βλέπουμε δεν παρουσιάζει ουσιαστική διαφορά στις αφθονίες με τη βέλτιστη τιμή.

3.4. Προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου:

Μετά τη βελτιστοποίηση όλων των σημαντικών αναλυτικών παραμέτρων που μπορούν να ρυθμιστούν στον φασματογράφο μάζας, ήμασταν σε θέση να προσδιορίσουμε τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που μπορεί να παρέχει η χρησιμοποιούμενη οργανολογία για τα διάφορα μέλη PBDEs.

Ως όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται η ελάχιστη ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευτεί με αξιοπιστία, διακρίνοντας το σήμα του αναλύτη από το σήμα του θορύβου. Γενικά, ως ανιχνεύσιμη ποσότητα θεωρείται εκείνη στην οποία ο λόγος του σήματος του αναλύτη ως προς το σήμα του θορύβου (S/N), είναι ίσος με 3.

Για τον προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης των ενώσεών μας, παρασκευάστηκαν 8 αραιά διαλύματα του ίδιου προτύπου διαλύματος με τα 24 μέλη PBDEs που αναφέραμε προηγουμένως. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αυτών αναφέρονται παρακάτω ανά κατηγορία μελών.

Τα μέλη με 2, 3, 4 και 5 άτομα βρωμίου στα 8 αυτά διαλύματα είχαν τις εξής συγκεντρώσεις:

#std	συγκέντρωση (fg/μl)	#std	συγκέντρωση (fg/μl)
1	3714	5	522
2	1794	6	349
3	1208	7	177
4	710	8	120

Τα μέλη με 6, 7 και 8 άτομα βρωμίου στα 8 αυτά διαλύματα είχαν τις εξής συγκεντρώσεις:

#std	συγκέντρωση (fg/μl)	#std	συγκέντρωση (fg/μl)
1	7429	5	1044
2	3588	6	698
3	2415	7	354
4	1421	8	240

Τέλος, το ιχνηθετημένο μέλος 13C-BDE-139 (με 6 άτομα βρωμίου), στα 8 αυτά διαλύματα είχε τις εξής συγκεντρώσεις:

#std	συγκέντρωση (fg/μl)	#std	συγκέντρωση (fg/μl)
1	8876	5	1247
2	4287	6	834
3	2885	7	423
4	1698	8	287

Με βάση αυτές τις συγκεντρώσεις, υπολογίσαμε την αντίστοιχη ποσότητα κάθε μέλους που εισέρχεται στον αέριο χρωματογράφο μέσω του injector, ο οποίος για τη συγκεκριμένη εργασία λάμβανε 1 μl κάθε διαλύματος. Έπειτα, ολοκληρώνοντας τις κορυφές κάθε μέλους σε κάθε διάλυμα, καταγράψαμε τις αντίστοιχες τιμές που δίνει το πρόγραμμα ολοκλήρωσης για τις τιμές S/N (οι οποίες αντιστοιχούν στην ένδειξη Pk-pk S/N του προγράμματος). Τέλος, για κάθε μέλος κατασκευάσαμε καμπύλες βαθμονόμησης των τιμών S/N σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες ποσότητες του (σε fg). Με βάση αυτές τις καμπύλες (της μορφής $y=ax$), υπολογίσαμε την ποσότητα κάθε μέλους που αντιστοιχεί στην τιμή $S/N=3$. Αυτή η τιμή αντιπροσωπεύει και το όριο ανίχνευσης του οργάνου (LOD ή IDL). Πρέπει να αναφερθεί, ότι το πιο πυκνό από τα παραπάνω διαλύματα (std #1) δεν συμπεριλήφθηκε στην καμπύλη βαθμονόμησης στις περιπτώσεις όπου η απουσία του έδινε καλύτερη γραμμικότητα στο εκάστοτε μέλος (η οποία εκφράζεται από την τιμή του R^2).

Τα αποτελέσματα των ορίων ανίχνευσης των διαφόρων μελών PBDEs που προέκυψαν με την παραπάνω διαδικασία, καταγράφονται στον Πίνακα 10 που ακολουθεί:

Πίνακας 10: Όρια ανίχνευσης των PBDEs σε NCI

Μέλος PBDE	Όριο ανίχνευσης (fgr)
BDE-7	66
BDE-15	323
BDE-17	81
BDE-28	91
BDE-47	83
BDE-49	74
BDE-66	113
BDE-71	74
BDE-77	106
BDE-85	135
BDE-99	128
BDE-100	107
BDE-119	114
BDE-126	131
BDE-138	288
BDE-153	179
BDE-154	126
BDE-156	333
BDE-183	300
BDE-184	349
BDE-191	429
BDE-196	1000
BDE-197	714
BDE-13C-139	203

Ακολουθώς, από τις ίδιες καμπύλες βαθμονόμησης υπολογίσαμε και τα όρια ποσοτικοποίησης των μελών αυτών.

Ως όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), ορίζεται η ελάχιστη ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να προσδιοριστεί με αξιοπιστία. Γενικά, ως προσδιορίσιμη ποσότητα θεωρείται εκείνη στην οποία ο λόγος του σήματος του αναλύτη ως προς το σήμα του θορύβου (S/N), είναι ίσος με 10.

Συνεπώς, με βάση τις ίδιες καμπύλες βαθμονόμησης, υπολογίσαμε και την ποσότητα κάθε μέλους που αντιστοιχεί στην τιμή S/N=10. Αυτή η τιμή αντιπροσωπεύει το όριο ποσοτικοποίησης του οργάνου (LOQ ή IQL).

Τα αποτελέσματα των ορίων ποσοτικοποίησης των διαφόρων μελών PBDEs που προέκυψαν, καταγράφονται στον Πίνακα 11 που ακολουθεί:

Πίνακας 11: Όρια ποσοτικοποίησης των PBDEs σε NCI

Μέλος PBDE	Όριο ποσοτικοποίησης (fgr)
BDE-7	220
BDE-15	1075
BDE-17	269
BDE-28	304
BDE-47	275
BDE-49	246
BDE-66	377
BDE-71	245
BDE-77	355
BDE-85	450
BDE-99	427
BDE-100	357
BDE-119	380
BDE-126	437
BDE-138	962
BDE-153	595
BDE-154	418
BDE-156	1111
BDE-183	1000
BDE-184	1163
BDE-191	1429
BDE-196	3333
BDE-197	2381
BDE-13C-139	676

3.5. Άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οργάνου:

3.5.1. Γενικά:

Είναι πάντα σημαντικό σε μια αναλυτική τεχνική, να ελέγχεται το κατά πόσο τα αποτελέσματα που παρέχει είναι αξιόπιστα. Η αβεβαιότητα του αποτελέσματος είναι μια σημαντική παράμετρος η οποία εκφράζει την κλίμακα μέσα στην οποία η τιμή της μετρούμενης ποσότητας ενδέχεται να είναι αναληθής, συμπεριλαμβάνοντας όλα τα πιθανά σφάλματα, τυχαία και συστηματικά. Εξαρτάται από την *ορθότητα* (accuracy), αλλά και από την *πιστότητα* (precision) του οργάνου μέτρησης. Όσο χαμηλότερες είναι αυτές οι δύο παράμετροι, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αβεβαιότητα της μέτρησης (Skoog et al., 2002, Μεσαρχάκη, 2009).

Η ορθότητα είναι το μέτρο της εγγύτητας της πειραματικής τιμής προς την «πραγματική τιμή» της μετρούμενης ποσότητας. Ουσιαστικά δείχνει το ποσό κοντά βρίσκεται η πειραματική τιμή στη θεωρούμενη πραγματική τιμή, η οποία έχει προκύψει από πληθώρα μετρήσεων. Από την άλλη, η πιστότητα είναι το μέτρο της εγγύτητας μεταξύ ανεξάρτητων μετρήσεων που λήφθηκαν με ακριβώς τον ίδιο τρόπο, ασχέτως με την εγγύτητά τους προς την «πραγματική τιμή». Πρόκειται για θεμελιώδες στατιστικό μέγεθος που σχετίζεται με τη διασπορά μιας ομάδας μετρήσεων από τη μέση τιμή τους. Συνήθη μέτρα του μεγέθους αυτού είναι: η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση, η διακύμανση και ο συντελεστής διακύμανσης (ή μεταβλητότητας) των μετρήσεων (Skoog et al., 2002, Μεσαρχάκη, 2009).

Βέβαια, όταν μιλάμε για ποσοτική χημική ανάλυση με χρήση χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματογράφο μάζας, δεν είναι αρκετός ο έλεγχος μόνο της ορθότητας και της πιστότητας του οργάνου. Υπάρχουν ακόμη κάποιες ποιοτικές παράμετροι που είναι καθοριστικές για την αποτελεσματική λειτουργία του. Αυτές είναι: η *αποδοτικότητα* (efficiency) και η *διαχωριστική ικανότητα* (resolution) της χρωματογραφικής στήλης, καθώς και η *ευαισθησία* (sensitivity) και η *γραμμικότητα* (linearity) του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Σημαντικό τέλος να ελεγχθεί, είναι και η *εξειδίκευση* (specificity) του οργάνου ως προς τις αναλυόμενες ενώσεις.

Πριν αναφερθούμε εκτενώς σε όλες αυτές τις παραμέτρους, κρίνεται σκόπιμο να παραθέσουμε πρώτα κάποιες θεμελιώδεις μαθηματικές σχέσεις, απαραίτητες στην επικύρωση των παραμέτρων αυτών.

3.5.2. Χρήσιμες μαθηματικές σχέσεις:

3.5.2.1. Στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων:

Όπως αναφέραμε, προκειμένου να εξετάσουμε την πιστότητα μιας σειράς μετρήσεων, χρησιμοποιούμε κάποια από τα θεμελιώδη στατιστικά μεγέθη τα οποία είναι: η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση, η διακύμανση και ο συντελεστής διακύμανσης (ή μεταβλητότητας) των μετρήσεων αυτών. Πρέπει λοιπόν αρχικά να ορίσουμε αυτά τα μεγέθη:

α) Μέση τιμή (mean value):

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n X_i$$

Όπου: n ο αριθμός των μετρήσεων, $\sum_{i=1}^n X_i$ το άθροισμα των μετρήσεων και \bar{X} η μέση τιμή τους.

β) Τυπική απόκλιση (standard deviation, SD ή s):

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

γ) Σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD)

$$RSD = \frac{s}{\bar{X}}$$

δ) Διακύμανση (variance): s^2

ε) Συντελεστής διακύμανσης (coefficient of variation, CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100\% = RSD \cdot 100\%$$

3.5.2.2. Ο Σχετικός Συντελεστής Απόκρισης (RRF):

Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός μέλους PBDE σε ένα άγνωστο δείγμα, είναι ο υπολογισμός του σχετικού συντελεστή απόκρισης του (Relative Response Factor, RRF) ως προς ένα εσωτερικό πρότυπο (internal standard, IS). Ο υπολογισμός του συντελεστή αυτού είναι εφικτός ύστερα από την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων. Συγκεκριμένα, γνωστές ποσότητες από τα υπό ανάλυση μέλη και από το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο (θα αναφερθούμε παρακάτω) αναμιγνύονται μεταξύ τους, και το πρότυπο διάλυμα που

προκύπτει εισάγεται στο σύστημα GC-MS υπό τις ίδιες συνθήκες που πρόκειται να αναλυθούν και τα δείγματα.

Η επιφάνεια που ολοκληρώνεται στο χρωματογράφημα που προκύπτει και η ποσότητα του κάθε μέλους στο διάλυμα, καθώς και οι αντίστοιχες τιμές για το εσωτερικό πρότυπο, αντικαθιστώνται στην ακόλουθη σχέση για τον υπολογισμό του RRF κάθε μέλους:

$$RRF_{PBDE(x)} = \frac{A_{PBDE(x)} \cdot C_{IS}}{A_{IS} \cdot C_{PBDE(x)}}$$

Στη σχέση αυτή, με $RRF_{PBDE(x)}$ συμβολίζεται ο σχετικός συντελεστής απόκρισης για το x μέλος PBDE, $A_{PBDE(x)}$ και A_{IS} είναι η επιφάνεια ολοκλήρωσης της κορυφής του υπό ανάλυση x μέλους και του εσωτερικού πρότυπου αντίστοιχα, ενώ $C_{PBDE(x)}$ και C_{IS} είναι οι αντίστοιχες ποσότητές τους στο πρότυπο διάλυμα.

Έπειτα, λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα του εσωτερικού πρότυπου που προστέθηκε σε ένα άγνωστο δείγμα ($C_{IS\Delta}$) και γνωρίζοντας την τιμή του σχετικού συντελεστή απόκρισης ενός x μέλους PBDE ($RRF_{PBDE(x)}$), η ποσότητα του υπό ανάλυση x μέλους στο αρχικό δείγμα ($C_{PBDE(x)\Delta}$) μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί από την παρακάτω σχέση:

$$C_{PBDE(x)\Delta} = \frac{A_{PBDE(x)\Delta} \cdot C_{IS\Delta}}{A_{IS\Delta} \cdot RRF_{PBDE(x)}}$$

Στη σχέση αυτή, με $A_{PBDE(x)\Delta}$ και $A_{IS\Delta}$ συμβολίζονται η επιφάνεια ολοκλήρωσης της κορυφής του υπό ανάλυση x μέλους και του εσωτερικού προτύπου αντίστοιχα, στο χρωματογράφημα του αγνώστου δείγματος.

3.5.3. Ορθότητα των μετρήσεων:

Η ορθότητα ή ακρίβεια (accuracy) ορίσαμε ότι είναι το μέτρο της εγγύτητας της πειραματικής τιμής προς την «πραγματική τιμή» της μετρούμενης ποσότητας. Η παράμετρος αυτή σε μια αναλυτική μέθοδο, μπορεί να αποδοθεί ως η ανάκτηση (recovery) του αναλύτη, δηλαδή το

ποσοστό της αρχικά προστεθειμένης ποσότητας του αναλύτη (ή της ποσότητας του αναλύτη στο δείγμα) που κατορθώνεται να προσδιοριστεί μετά την ανάλυση.

Για τον προσδιορισμό της ανάκτησης, χρησιμοποιήσαμε δύο πρότυπα διαλύματα PBDEs. Το ένα περιείχε ένα εύρος συγκεντρώσεων 4-19 pg/ml για τα διάφορα μέλη PBDEs συμπεριλαμβανομένου του εσωτερικού προτύπου, ενώ το άλλο περιείχε ένα εύρος συγκεντρώσεων 2-9 pg/ml για τα διάφορα μέλη. Το πρώτο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του RRF κάθε μέλους, ενώ το δεύτερο διάλυμα θεωρήθηκε σαν άγνωστο δείγμα με σκοπό την εύρεση της πειραματικής τιμής κάθε μέλους σε αυτό. Όπως αντιλαμβανόμαστε, η επί τοις εκατό ανάκτηση ορίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$\% \text{ανάκτηση} = \frac{\text{πειραματική ποσότητα}}{\text{πραγματική ποσότητα}} \cdot 100\%$$

Ενδεικτικά, στον Πίνακα 12 που ακολουθεί, αναφέρουμε την τιμή της επί τοις εκατό ανάκτησης για τρία μέλη διαφορετικού βαθμού βρωμίωσης, από αποτελέσματα μιας αναλυτικής ημέρας:

Πίνακας 12: Η ακρίβεια του οργάνου εκφρασμένη σε % ανάκτηση

Μέλος PBDE	Πραγματική ποσότητα (fgr)	Πειραματική ποσότητα (fgr)	% ανάκτηση
<i>Τέτρα-BDE-47</i>	3320	3274	98,6
<i>Πέντα-BDE-99</i>	3320	3251	97,9
<i>Έξα-BDE-153</i>	6639	6521	98,2

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώνουμε ότι η επιλεγμένη μέθοδος παρουσιάζει εξαιρετική ακρίβεια.

3.5.4. Πιστότητα των μετρήσεων:

Η πιστότητα (precision) των μετρήσεων είναι συνώνυμη με την έννοια επαναληψιμότητα (repeatability). Η επαναληψιμότητα λοιπόν, αποτελεί μέτρο της διασποράς των μετρήσεων του ίδιου δείγματος από μια τη μέση τιμή τους, κάτω από τις ίδιες συνθήκες (ίδιο όργανο, ίδιος αναλυτής, σε σύντομο χρονικό διάστημα). Συνήθως προσδιορίζεται σε μια αναλυτική ημέρα, αλλά μπορεί να προσδιοριστεί και σε διαφορετικές αναλυτικές ημέρες.

3.5.4.1. Πιστότητα των μετρήσεων την ίδια αναλυτική ημέρα:

Για τον προσδιορισμό αυτό, χρησιμοποιήσαμε τα ίδια πρότυπα διαλύματα PBDEs με τα προηγούμενα. Το πρώτο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον προσδιορισμό του RRF κάθε μέλους, ενώ το δεύτερο διάλυμα επίσης θεωρήθηκε σαν άγνωστο δείγμα, με σκοπό την εύρεση της πειραματικής τιμής κάθε μέλους σε αυτό. Το δεύτερο διάλυμα το αναλύσαμε τρεις φορές την ίδια αναλυτική ημέρα.

Ακολούθως, στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα ληφθέντα αποτελέσματα για την ποσότητα των ίδιων μελών PBDEs με τα προηγούμενα, καθώς και για τους χρόνους κατακράτησής τους (retention time, t_R), εκφρασμένα σε %RSD.

Πίνακας 13a: Επαναληψιμότητα της ποσότητας κάποιων μελών PBDEs την ίδια αναλυτική ημέρα

Μέλος PBDE	Μέση τιμή πειραματικής ποσότητας (fgf)	Τυπική απόκλιση τιμών πειραματικής ποσότητας	% RSD
<i>Τέτρα-BDE-47</i>	3241	28,4	0,88
<i>Πέντα-BDE-99</i>	3163	34,1	1,08
<i>Έξα-BDE-153</i>	6502	51,0	0,78

Πίνακας 13b: Επαναληψιμότητα του χρόνου κατακράτησης κάποιων μελών PBDEs
την ίδια αναλυτική ημέρα

Μέλος PBDE	Μέση τιμή χρόνου κατακράτησης (min)	Τυπική απόκλιση τιμών χρόνου κατακράτησης	% <i>RSD</i>
<i>Τέτρα-BDE-47</i>	13,085	$8,3 \cdot 10^{-3}$	0,06
<i>Πέντα-BDE-99</i>	15,132	$8,9 \cdot 10^{-3}$	0,06
<i>Έξα-BDE-153</i>	17,855	$14 \cdot 10^{-3}$	0,008

3.5.4.2. Πιστικότητα των μετρήσεων σε διαφορετικές αναλυτικές ημέρες:

Για τον προσδιορισμό αυτό, χρησιμοποιήσαμε τα ίδια πρότυπα διαλύματα PBDEs με τα προηγούμενα. Το πρώτο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον προσδιορισμό του RRF κάθε μέλους, ενώ το δεύτερο διάλυμα επίσης θεωρήθηκε σαν άγνωστο δείγμα, με σκοπό την εύρεση της πειραματικής τιμής κάθε μέλους σε αυτό. Το δεύτερο διάλυμα το αναλύσαμε σε τρεις διαδοχικές αναλυτικές ημέρες.

Ακολούθως, στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα ληφθέντα αποτελέσματα για την ποσότητα των ιδίων μελών PBDEs με τα προηγούμενα, καθώς και για τους χρόνους κατακράτησής τους (retention time, t_R), εκφρασμένα σε %RSD.

Πίνακας 14a: Επαναληψιμότητα της ποσότητας κάποιων μελών PBDEs σε
διαφορετικές αναλυτικές ημέρες

Μέλος PBDE	Μέση τιμή πειραματικής ποσότητας (fgr)	Τυπική απόκλιση τιμών πειραματικής ποσότητας	% <i>RSD</i>
<i>Τέτρα-BDE-47</i>	3259	26,0	0,80
<i>Πέντα-BDE-99</i>	3243	41,0	1,26
<i>Έξα-BDE-153</i>	6502	28,7	0,44

Πίνακας 14b: Επαναληψιμότητα του χρόνου κατακράτησης κάποιων μελών PBDEs σε διαφορετικές αναλυτικές ημέρες

Μέλος PBDE	Μέση τιμή χρόνου κατακράτησης (min)	Τυπική απόκλιση τιμών χρόνου κατακράτησης	% <i>RSD</i>
<i>Τέτρα-BDE-47</i>	13,078	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0,01
<i>Πέντα-BDE-99</i>	15,127	$3,8 \cdot 10^{-3}$	0,03
<i>Έξα-BDE-153</i>	17,847	$8,7 \cdot 10^{-3}$	0,05

Σύμφωνα με τα κριτήρια της Αμερικάνικης Υπηρεσίας Περιβάλλοντος (USEPA), η πιστότητα για επαναλαμβανόμενες αναλύσεις του ίδιου δείγματος, πρέπει να είναι μικρότερη του $\pm 10\%$ από μέρα σε μέρα ενώ πρέπει να είναι μικρότερη του $\pm 7\%$ σε μια συγκεκριμένη ημέρα. Σύμφωνα με τους τέσσερις παραπάνω πίνακες, οι τιμές του %RSD που υπολογίστηκαν είναι σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με τα επιτρεπτά όρια. Εύκολα λοιπόν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η χρησιμοποιούμενη μέθοδος παρουσιάζει εξαιρετική επαναληψιμότητα.

3.5.5. Αποδοτικότητα της χρωματογραφικής στήλης:

Μέτρο της αποδοτικότητας (efficiency) μιας χρωματογραφικής στήλης, είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών της. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός αυτός (και όσο το ύψος των πλακών είναι μικρότερο), τόσο μεγαλύτερη είναι και η αποδοτικότητα της στήλης κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, παρέχοντας παράλληλα στενές και συμμετρικές κορυφές. Οι αποδοτικότητες σε αριθμούς θεωρητικών πλακών κυμαίνονται από μερικές εκατοντάδες έως αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες (Skoog et al., 2002, Χατζηγιάννου, 2000).

Πειραματικά, ο αριθμός των θεωρητικών πλακών προσδιορίζεται με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

Όπου: N ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, t_R ο χρόνος κατακράτησης κάθε ένωσης και w το εύρος της κορυφής αυτής της ένωσης.

Για τους δικούς μας υπολογισμούς, χρησιμοποιήθηκε ένα τυχαίο χρωματογράφημα ενός πρότυπου διαλύματος PBDEs, το οποίο περιείχε ένα εύρος συγκεντρώσεων 2-9 $\mu\text{g/l}$ για τα διάφορα μέλη. Ενδεικτικά, στον Πίνακα 15 που ακολουθεί, αναφέρουμε την τιμή του αριθμού των θεωρητικών για τρία μέλη διαφορετικού βαθμού βρωμίωσης:

Πίνακας 15: Η αποδοτικότητα της στήλης εκφρασμένη σε αριθμούς θεωρητικών πλακών

Μέλος PBDE	Χρόνος κατακράτησης (min)	Εύρος της κορυφής	Αριθμός θεωρητικών πλακών
<i>Τέτρα-BDE-47</i>	13.077	0.052	1.011.881
<i>Πέντα-BDE-99</i>	15.130	0.050	1.465.068
<i>Έξα-BDE-153</i>	17.857	0.061	1.371.126

Εύκολα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η χρησιμοποιούμενη μέθοδος παρουσιάζει και εξαιρετική αποδοτικότητα.

3.5.6. Διαχωριστική ικανότητα της χρωματογραφικής στήλης:

Η διαχωριστική ικανότητα (resolution, R_s) μιας χρωματογραφικής στήλης, αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει δύο ενώσεις. Υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$R_s = 2 \cdot \frac{t_{R(B)} - t_{R(A)}}{W_A + W_B}$$

Όπου: $t_{R(A)}$ και $t_{R(B)}$ οι χρόνοι κατακράτησης των δύο διαδοχικών ενώσεων που διαχωρίζονται, και w_A και w_B το αντίστοιχο εύρος κάθε κορυφής.

Για τους δικούς μας υπολογισμούς, χρησιμοποιήθηκε ένα τυχαίο χρωματογράφημα του ίδιου πρότυπου διαλύματος PBDEs, το οποίο περιείχε ένα εύρος συγκεντρώσεων 2-9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για τα διάφορα μέλη. Ενδεικτικά, στον Πίνακα 16 που ακολουθεί, αναφέρουμε την τιμή της διαχωριστικής ικανότητας για τρία ζεύγη μελών διαφορετικού βαθμού βρωμίωσης:

Πίνακας 16: Η διαχωριστική ικανότητα της χρωματογραφικής στήλης

Ζεύγος μελών PBDEs	Χρόνοι κατακράτησης (min)	Εύρος κάθε κορυφής	Διαχωριστική ικανότητα
(Τέτρα)BDE-47 και BDE-66	13.077 και 13.416	0.052 και 0.063	5,90
(Πέντα)BDE-119 και BDE-99	14.803 και 15.130	0.046 και 0.050	6,81
(Εξά)BDE-153 και 13C-BDE-139	17.857 και 18.292	0.061 και 0.060	7,19

Όταν η διαχωριστική ικανότητα της στήλης για δύο διαδοχικές κορυφές είναι τουλάχιστον ίση με 1.5, τότε οι κορυφές αυτές ουσιαστικά έχουν διαχωριστεί πλήρως, όπως στην περίπτωση μας. Εάν η διαχωριστική ικανότητα είναι ίση με 1.0, τότε η ζώνη της ένωσης Α περιέχει περίπου και 4% της ένωσης Β, καθώς και το αντίστροφο. Αντίθετα, εάν η διαχωριστική ικανότητα είναι 1.5, τότε τα αντίστοιχα ποσοστά επικάλυψης είναι περίπου 0.3%, ενώ εάν είναι κάτω από 1.0 τότε τα ποσοστά επικάλυψης είναι πολύ μεγαλύτερα από 4% (Skoog et al., 2002).

3.5.7. Ευαισθησία του οργάνου:

Η ευαισθησία (sensitivity) ενός οργάνου είναι το μέτρο της ικανότητάς του να διακρίνει μικρές διαφορές στη συγκέντρωση ενός αναλύτη. Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας, ελέγχεται η σταθερότητα (stability) του σήματος του ανιχνευτή, καθώς και η γραμμικότητα (linearity) των εκάστοτε αναλυτών σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων.

3.5.7.1. Σταθερότητα σήματος του ανιχνευτή:

Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας του σήματος του ανιχνευτή, ουσιαστικά ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα των εμβαδών ολοκλήρωσης των κορυφών ενός πρότυπου διαλύματος PBDEs, σε τρεις διαδοχικές αναλυτικές ημέρες. Το πρότυπο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε ένα εύρος συγκεντρώσεων 4-19 pg/l για τα διάφορα μέλη PBDEs. Είναι σημαντικό να ελέγξουμε την σταθερότητα απόκρισης του οργάνου σε αυτό το διάλυμα, διότι αυτό χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό του RRF κάθε αναλυτικής ημέρας.

Ενδεικτικά, στον Πίνακα 17 που ακολουθεί, αναφέρουμε την τιμή του μέσου όρου των εμβαδών ολοκλήρωσης για τρία μέλη διαφορετικού βαθμού βρωμίωσης, από τα αποτελέσματα των τριών διαδοχικών αναλυτικών ημερών. Τα αποτελέσματα αυτά τελικά εκφράζονται σε %RSD.

Πίνακας 17: Έλεγχος της σταθερότητας του σήματος του ανιχνευτή

Μέλος PBDE	Μέση τιμή σήματος ανιχνευτή	Τυπική απόκλιση των τιμών του σήματος του ανιχνευτή	% RSD
<i>Τέτρα-BDE-47</i>	119502	8697	7,28
<i>Πέντα-BDE-99</i>	135057	11340	8,40
<i>Έξα-BDE-153</i>	257501	16624	6,46

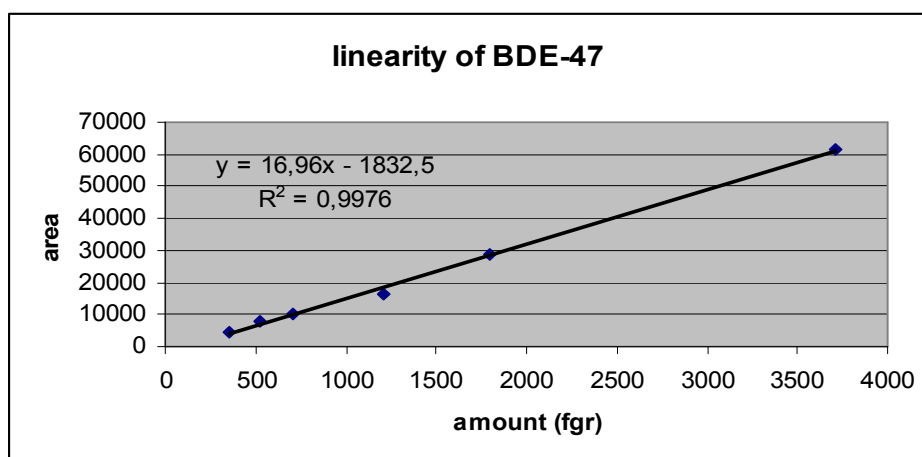
Αναφέραμε παραπάνω ότι οι αποδεκτές τιμές του %RSD όταν αφορούν στα αποτελέσματα διαφορετικών ημερών ανάλυσης του ίδιου δείγματος, βρίσκονται στην περιοχή του $\pm 10\%$. Με βάση τα δικά μας αποτελέσματα, οι τιμές αυτές βρίσκονται κάτω από αυτό το όριο του $\pm 10\%$, οπότε μπορούμε να θεωρήσουμε ότι ο ανιχνευτής μας παρουσιάζει σταθερό σήμα τις διάφορες αναλυτικές ημέρες (και σίγουρα μέσα στην ίδια αναλυτική ημέρα).

Ωστόσο, επειδή το συγκεκριμένο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε εδώ, χρησιμοποιείται όπως αναφέραμε και στον ποσοτικό προσδιορισμό, είναι σημαντικό να το αναλύουμε κάθε αναλυτική ημέρα δεδομένης της μικρής έστω διαφοροποίησης της απόκρισης του ανιχνευτή, η οποία ωστόσο επηρεάζει σημαντικά την ποσοτικοποίηση των κορυφών κάθε αναλυτικής ημέρας. Μάλιστα, φροντίζουμε να το αναλύουμε δύο φορές μέσα στην ίδια ημέρα. Μια φορά πριν την ανάλυση κάθε είδους δείγματος, και άλλη μια φορά με το πέρας αυτής.

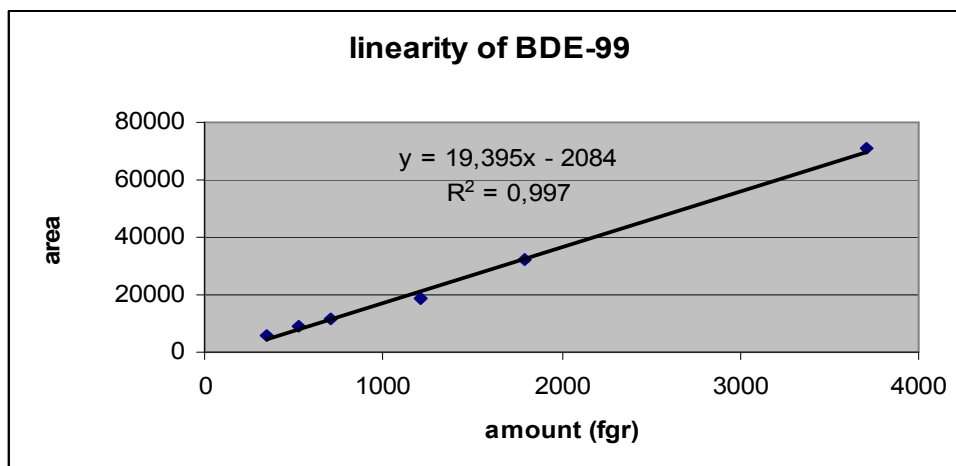
3.5.7.2. Γραμμική απόκριση του ανιχνευτή:

Είναι σημαντικό, ο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής να παρουσιάζει γραμμική απόκριση σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων των αναλυτών. Για να ελέγξουμε αυτή τη γραμμικότητα (linearity), χρησιμοποιήσαμε τα έξι πιο πυκνά από τα οκτώ διαλύματα που παρασκευάσαμε για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου. Οι κορυφές των διαφόρων μελών PBDEs στα διαλύματα αυτά για το συγκεκριμένο τώρα σκοπό, ολοκληρώθηκαν με τον κλασικό τρόπο.

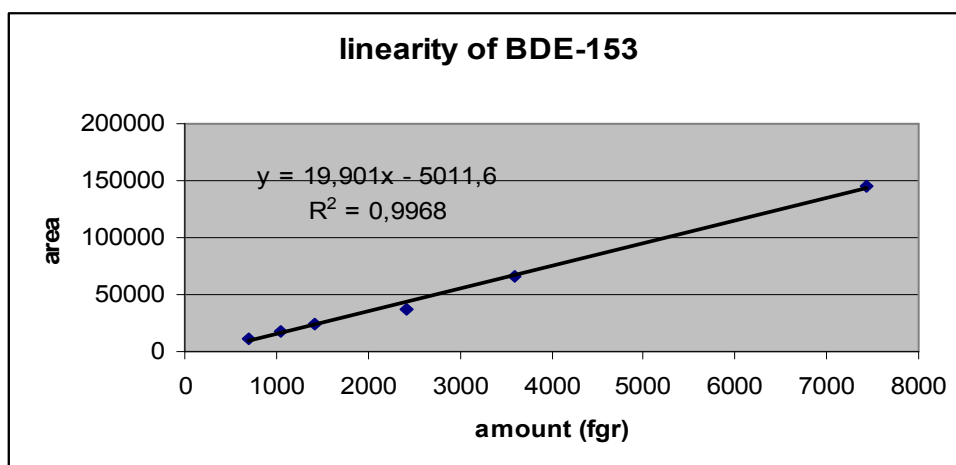
Ενδεικτικά, παρουσιάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης για τα τρία μέλη διαφορετικού βαθμού βρωμίωσης στα οποία έχουμε βασιστεί. Οι καμπύλες αυτές (της μορφής $y=ax-b$) κατασκευάστηκαν βάσει του εμβαδού ολοκλήρωσης κάθε κορυφής (area) σε συνάρτηση με την ποσότητα (σε fgr) κάθε μέλους σε καθένα από τα έξι διαλύματα.



Εικόνα 21: Γραμμικότητα του μέλους BDE-47



Εικόνα 22: Γραμμικότητα του μέλους BDE-99



Εικόνα 23: Γραμμικότητα του μέλους BDE-153

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, ο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής κρίνεται ότι παρουσιάζει πολύ καλή γραμμικότητα ως προς τους PBDEs, καθώς ο συντελεστής παλινδρόμησης (R^2) για τα μέλη που τουλάχιστον παρουσιάστηκαν, πλησιάζει τη μονάδα ($R^2 > 0,99$).

3.5.8. Εξειδίκευση του οργάνου:

Η εξειδίκευση (specificity) μιας τεχνικής, αντιστοιχεί στην ικανότητά της να επιβεβαιώσει ότι το μετρούμενο σήμα προέρχεται από το συστατικό που μας ενδιαφέρει και ότι δεν υπάρχει κάποια παρεμβολή από επιμόλυνση, συστατικό αποικοδόμησης ή ακαθαρσία. Ο προσδιορισμός της εξειδίκευσης επιτυγχάνεται με τον καθορισμό της ταυτότητας και της καθαρότητας κάθε κορυφής (Μεσαρχάκη, 2009).

Όπως έγινε αντιληπτό, ο προσδιορισμός της εξειδίκευσης στον φασματογράφο μάζας γίνεται με την αναγνώριση του φάσματος μάζας κάθε συστατικού. Η ταυτοποίηση και ο έλεγχος της καθαρότητας όλων των κορυφών είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα πριν την έναρξη οποιασδήποτε άλλης διαδικασίας, οπότε και για αυτό το λόγο η λήψη ενός πλήρους φάσματος όλων των αναλυόμενων συστατικών με Full Scan ενός πρότυπου διαλύματος, κρίνεται πάντα απαραίτητη. Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει η σύγκριση του φάσματος μάζας του προτύπου διαλύματος και της πιθανής παρεμβολής, μέσω της εκάστοτε εφαρμοζόμενης SIM μεθόδου στη διάρκεια της ανάλυσης, με κάποιες όμως αμφιβολίες.

Τέλος, η σύζευξη της χρωματογραφίας σ' ένα τέτοιο σύστημα, κάνει δυνατή την ταυτοποίηση των διαφόρων συστατικών και μέσω του χρόνου κατακράτησής τους συγκριτικά με ένα πρότυπο διάλυμα. Μάλιστα, σε αυτήν την περίπτωση, ο χρόνος κατακράτησης έχει ως αποδεκτή απόκλιση τα ± 2 δευτερόλεπτα σε σχέση με το πρότυπο συστατικό.

Όπως αναφέραμε, για τους σκοπούς της δικής μας εργασίας, η εξειδίκευση ελέγχθηκε μέσω της λήψης ενός χρωματογραφήματος από πλήρη σάρωση (Full Scan) ενός πρότυπου διαλύματος PBDEs συγκέντρωσης 50-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για τα διάφορα μέλη. Τα αποτελέσματα για το επικρατέστερο ιόν/ομάδα ιόντος, καθώς και του χρόνου κατακράτησης κάθε μέλους, καταγράφονται στον Πίνακα 9 στη σελίδα 132.

3.6. Σημαντικές παρατηρήσεις επί της πειραματικής διαδικασίας:

Καταρχήν, όπως αναφέραμε, κατά τη διάρκεια των αναλύσεων των δειγμάτων στο σύστημα GC-MS κάθε αναλυτικής ημέρας, πρέπει να τρέξουν παράλληλα τουλάχιστον δύο ενέσεις του χρησιμοποιούμενου διαλύματος RRF, μια πριν την έναρξη των ενέσεων των εκάστοτε δειγμάτων και μια με το πέρας αυτών. Μόνο έτσι προκύπτει ένας αξιόπιστος μέσος όρος για την τιμή του RRF κάθε αναλυτικής ημέρας, και κατά συνέπεια αξιόπιστες τιμές για τις ποσότητες των μελών PBDEs στο εκάστοτε δείγμα.

Έπειτα, κατά την ολοκλήρωση όλων των κορυφών, πρέπει να επιλέγεται ένα συγκεκριμένο θραύσμα (συγκεκριμένου λόγου m/z) το οποίο να υπάρχει σε μεγάλη αφθονία σε όλες τις υπό ανάλυση ενώσεις στη μέθοδο SIM που επιλέγεται. Μόνο έτσι αυξάνεται η ευαισθησία της ανάλυσης και επιτυγχάνονται καλύτερα όρια ανίχνευσης. Αυτή η απαίτηση βασίζεται σε μια λογική αντίστοιχης εκείνης που οδηγεί στην εφαρμογή μιας μεθόδου SIM έναντι της αντίστοιχης μεθόδου Full Scan. Για τις δικές μας ολοκληρώσεις, χρησιμοποιήθηκε σαν extract ion το θραύσμα με τη τιμή $m/z=79$ (όπως και στη βιβλιογραφικά αναφορά των Eljarrat et al., 2002).

3.7. Απαιτούμενα διαλύματα, αντιδραστήρια και υαλικά:

Πριν περιγράψουμε την αναλυτική διαδικασία που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των PBDEs σε ανθρώπινα ούρα, κρίνεται σκόπιμο να αναφέρουμε τα απαιτούμενα διαλύματα, αντιδραστήρια και υαλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης.

3.7.1. Εσωτερικό πρότυπο και πρότυπο ανάκτησης:

3.7.1.1. Εσωτερικό πρότυπο (Internal standard, IS):

Όπως έγινε αντιληπτό, προκειμένου να επιτευχθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των εκάστοτε αναλυτών στα διάφορα δείγματα (άγνωστα και τυφλά), είναι αναγκαίο να γίνει η προσθήκη ενός εσωτερικού προτύπου τόσο στα δείγματα αυτά, όσο και για τον υπολογισμό των αντίστοιχων RRFs.

Το χρησιμοποιούμενο εσωτερικό πρότυπο θα πρέπει να περιέχει κάποιον αναλύτη, ο οποίος: να μην υφίσταται φυσικά στο περιβάλλον, αλλά να παρουσιάζει παρόμοια χημική συμπεριφορά με τις υπό ανάλυση ενώσεις, χωρίς όμως να συνεκλούεται με κάποια από αυτές. Συνήθως προτιμώνται ιχνηθετημένα μέλη του $^{13}\text{C}_{12}$.

Για τις δικές μας ανάγκες, χρησιμοποιήθηκε ένα εσωτερικό πρότυπο που περιείχε 2 pg/ml από το ιχνηθετημένο μέλος $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-139.

3.7.1.2. Πρότυπο ανάκτησης (Recovery standard, RS):

Προκειμένου να ελεγχθεί η ακρίβεια κάθε μεθόδου, είναι αναγκαίος ο υπολογισμός του ποσοστού της αρχικής ποσότητας ενός αναλύτη στο δείγμα που κατορθώνεται να προσδιοριστεί μετά την ανάλυση. Ο υπολογισμός αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός προτύπου ανάκτησης. Το πρότυπο αυτό μπορεί να περιέχει και κάποιες από τις υπό ανάλυση ενώσεις, αρκεί να είναι ιχνηθετημένες (παρόλο που εκλούνται ταυτόχρονα με αυτές). Το πρότυπο αυτό συνήθως προστίθεται στα τυφλά δείγματα, όπου οι ποσότητες των πιθανών μελών που παρεμποδίζουν την ανάλυση των αγνώστων δειγμάτων είναι γνωστές. Γνωρίζοντας λοιπόν τις ποσότητες των ιχνηθετημένων μελών που εμβολιάζονται, και υπολογίζοντας τις τελικές τους ποσότητες στα τυφλά δείγματα, μπορούμε να βρούμε το ποσοστό ανάκτησής τους. Υψηλές ανακτήσεις των μελών αυτών, συνεπάγονται και υψηλές ανακτήσεις για τις υπό ανάλυση ενώσεις στα άγνωστα δείγματα.

Όπως καταλαβαίνουμε, για τον υπολογισμό των ανακτήσεων, κρίνεται επίσης αναγκαίος ο υπολογισμός των RRFs των ιχνηθετημένων μελών του προτύπου. Για το σκοπό αυτό, γνωστές ποσότητες από τα ιχνηθετημένα μέλη και από το εσωτερικό πρότυπο (επίσης το $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-139) αναμιγνύονται μεταξύ τους, και το πρότυπο διάλυμα που προκύπτει εισάγεται στο σύστημα GC-MS υπό τις ίδιες συνθήκες που πρόκειται να αναλυθούν και τα δείγματα.

Η επιφάνεια που ολοκληρώνεται στο χρωματογράφημα που προκύπτει και η ποσότητα του κάθε ιχνηθετημένου μέλους στο διάλυμα, καθώς και οι αντίστοιχες τιμές για το εσωτερικό πρότυπο, αντικαθιστώνται στην ακόλουθη σχέση για τον υπολογισμό του RRF κάθε μέλους:

$$RRF_{L.PBDE(x)} = \frac{A_{L.PBDE(x)} \cdot C_{IS}}{A_{IS} \cdot C_{L.PBDE(x)}}$$

Στη σχέση αυτή, με $RRF_{L.PBDE(x)}$ συμβολίζεται ο σχετικός συντελεστής απόκρισης για το x ιχνηθετημένο (label) μέλος PBDE, $A_{L.PBDE(x)}$ και A_{IS} είναι η επιφάνεια ολοκλήρωσης της κορυφής του υπό ανάλυση x ιχνηθετημένου

μέλους και του εσωτερικού πρότυπου αντίστοιχα, ενώ $C_{L.PBDE(x)}$ και C_{IS} είναι οι αντίστοιχες ποσότητες τους στο πρότυπο διάλυμα.

Έπειτα, λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα του εσωτερικού πρότυπου που προστέθηκε σε ένα τυφλό δείγμα ($C_{IS\Delta}$) και γνωρίζοντας την τιμή του σχετικού συντελεστή απόκρισης ενός x ιχνηθετημένου μέλους PBDE ($RRF_{L.PBDE(x)}$), η ποσότητα του υπό ανάλυση x ιχνηθετημένου μέλους στο τυφλό δείγμα ($C_{L.PBDE(x)\Delta}$) μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί από την παρακάτω σχέση:

$$C_{L.PBDE(x)\Delta} = \frac{A_{L.PBDE(x)\Delta} \cdot C_{IS\Delta}}{A_{IS\Delta} \cdot RRF_{L.PBDE(x)}}$$

Στη σχέση αυτή, με $A_{L.PBDE(x)\Delta}$ και $A_{IS\Delta}$ συμβολίζονται η επιφάνεια ολοκλήρωσης της κορυφής του υπό ανάλυση x ιχνηθετημένου μέλους και του εσωτερικού πρότυπου αντίστοιχα, στο χρωματογράφημα του τυφλού δείγματος.

Τέλος, γνωρίζοντας τις αρχικές ποσότητες των ιχνηθετημένων μελών που εμβολιάζονται και υπολογίζοντας τις τελικές τους ποσότητες στα τυφλά δείγματα, μπορούμε να βρούμε το ποσοστό ανάκτησής τους από τη σχέση:

$$\% \text{ανάκτηση} = \frac{\text{τελική ποσότητα}}{\text{αρχική ποσότητα}} \cdot 100\%$$

Ακολούθως, παρουσιάζεται ο Πίνακας 18 ο οποίος περιέχει τη σύσταση του προτύπου διαλύματος με τα ιχνηθετημένα μέλη PBDEs που χρησιμοποιήσαμε στον υπολογισμό των αντίστοιχων RRFs του πρότυπου ανάκτησης, καθώς και τη συγκέντρωση του κάθε μέλους σε αυτό.

Πίνακας 18: Η σύσταση του διαλύματος για τον υπολογισμό των RRFs του πρότυπου ανάκτησης

PBDE-Isomer	Concentration (pg/ul)	PBDE-Isomer	Concentration (pg/ul)
$^{13}C_{12}$ -BDE-15	1,89	$^{13}C_{12}$ -BDE-153	3,77
$^{13}C_{12}$ -BDE-28	1,89	$^{13}C_{12}$ -BDE-154	3,77
$^{13}C_{12}$ -BDE-47	1,89	$^{13}C_{12}$ -BDE-183	3,77
$^{13}C_{12}$ -BDE-99	1,89	$^{13}C_{12}$ -BDE-197	3,77
$^{13}C_{12}$ -BDE-139	1,85		

Είναι προφανές, ότι το πρότυπο διάλυμα ανάκτησης που εμβολιάζουμε στα τυφλά δείγματα έχει ακριβώς την ίδια σύσταση με το παραπάνω διάλυμα, απλά δεν περιέχει το εσωτερικό πρότυπο (το $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-139).

Πρέπει τέλος να αναφερθεί, ότι η συγκεκριμένη σύσταση του προτύπου ανάκτησης μας δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού των ακριβών ποσοστών ανάκτησης των φυσικών μελών PBDEs που υπάρχουν και στα πραγματικά δείγματα, αφού φυσικά και τεχνικά μέλη εκλούνται ακριβώς στον ίδιο χρόνο και αφού η παραπάνω σύσταση είναι αρκετά συνηθισμένη σε περιβαλλοντικά δείγματα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Όλα τα πρότυπα διαλύματα φυλάσσονται στην κατάψυξη, στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.2. Απαιτούμενα αντιδραστήρια και υαλικά:

3.7.2.1. Απαιτούμενα αντιδραστήρια (στερεά, υγρά, αέρια):

Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης χρειαστήκαμε καταρχήν τους εξής διαλύτες και διαλύματα:

Πίνακας 19: Απαιτούμενοι διαλύτες και διαλύματα

Διαλύτες	Διαλύτες	Διαλύματα (υδατικά)
ισοπροπανόλη	π. H_2SO_4	HCl 6M
εξάνιο	Μεθανόλη	KCl 1% w/v
MtBE	φορμικό οξύ	KOH 0.5M (50% σε αιθανόλη)
αιθανόλη	Τολουόλιο	
υπερκάθαρο νερό	Ακετόνη	

]

Εκτός όμως από αυτά τα υγρά αντιδραστήρια, χρειαστήκαμε και εκχυλισμένο στερεό Na_2SO_4 , καθώς και εκχυλισμένη όξινη silica 40% σε H_2SO_4 .

Το Na_2SO_4 καθαρίζεται σε μια συσκευή ASE με διαλύτες εξάνιο και DCM (50:50) σε δύο επαναλαμβανόμενους κύκλους. Ακολουθεί εξάτμιση των διαλυτών υπό κενό για 3 περίπου ημέρες.

Σε ότι αφορά τη silica, η επιλογή της κατάλληλης διαμέτρου πρέπει να γίνει βάσει της χρήσης της. Στην περίπτωση μας, η silica gel χρησιμοποιείται σε μια στήλη καθαρισμού των δειγμάτων, η οποία λειτουργεί απλά με τη βαρύτητα. Για το λόγο αυτό, από τα δύο είδη silica gel που υπήρχαν στο εργαστήριο, επιλέξαμε εκείνη με τη μεγαλύτερη διάμετρο (μικρότερης τιμής mesh). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε silica gel 70-230 mesh.

Η επιλεγμένη silica gel αρχικά καθαρίζεται με τον ίδιο τρόπο όπως το Na_2SO_4 . Όμως στην περίπτωση μας, η silica gel πρέπει επιπλέον να οξινοστεί. Για το λόγο αυτό, μετά την εξάτμιση των διαλυτών η silica gel τοποθετείται σε ηλεκτρικό φούρνο για ξήρανση στους $200\text{ }^\circ\text{C}$ για 14 ώρες. Τέλος, αφού αφηθεί κάποια ώρα στον ξηραντήρα για να κρυώσει, η οξίνισή της πραγματοποιείται παρουσία διαλύματος π. H_2SO_4 υπό ανάδευση για 24 ώρες. Για την επιθυμητή οξύτητα της silica gel (40% σε H_2SO_4) πρέπει σε 20,1 gr αυτής να προστεθούν 10 gr H_2SO_4 .

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για την επαφή μας με την όξινη silica κρίνεται απαραίτητη η χρήση μάσκας χειρουργείου.

Τέλος, για τη τελευταία συμπύκνωση των δειγμάτων χρειαστήκαμε και ήπιο ρεύμα αερίου N_2 .

3.7.2.2. Απαιτούμενα υαλικά:

Καταρχήν, όλοι οι διαλύτες που αναφέραμε προηγουμένως τοποθετούνται σε γυάλινα μπουκάλια, ενώ τα αντίστοιχα διαλύματα σε ογκομετρικές φιάλες.

Από εκεί και έπειτα, για την ανάλυση ενός δείγματος χρειαζόμαστε επιπλέον τα γυαλικά:

- 1 δοκιμαστικός σωλήνας των 30ml
- 1 δοκιμαστικός σωλήνας των 25ml
- 2 αποοειδείς φιάλες των 30ml
- 2 δοκιμαστικούς σωλήνες των 15ml
- 2 αποοειδείς φιάλες των 20ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10ml

Όλα τα παραπάνω γυαλικά πριν την αρχική χρήση τους, είναι απαραίτητο να πλυθούν προσεκτικά και έπειτα να καούν στο φούρνο. Συγκεκριμένα: πλένονται με σαπουνάδα και νερό βρύσης, έπειτα με αποιοντισμένο νερό και τέλος με ακετόνη. Αφού αφεθούν για λίγο σε ατμόσφαιρα δωματίου, τυλίγονται με αλουμινόχαρτο και καίγονται στους 400 °C στο φούρνο που χρησιμοποιείται μόνο για γυαλικά. Τα πλαστικά καπάκια των δοκιμαστικών σωλήνων, καθώς και οτιδήποτε ογκομετρικό, προφανώς δεν εισάγονται στο φούρνο.

Η ίδια διαδικασία πλυσίματος ακολουθείται και μετά από κάθε πείραμα, χωρίς όμως να χρειάζεται συχνό κάψιμο των γυαλικών. Ωστόσο, μετά το στέγνωμά τους τα γυαλικά πάντα καλύπτονται με αλουμινόχαρτο πριν τη φύλαξή τους.

Βέβαια, τα γυαλικά ξεπλένονται και πριν τη χρήση τους με τον κατάλληλο διαλύτη. Συγκεκριμένα, ξεπλένονται με εξάνιο όταν πρόκειται να ξεπλυθούν όλοι οι παραπάνω δοκιμαστικοί σωλήνες και οι αποοειδείς φιάλες για την ανάλυση, ενώ τα μπουκάλια, οι ογκομετρικοί κύλινδροι και οι ογκομετρικές φιάλες, ξεπλένονται με τον διαλύτη που πρέπει κάθε φορά να συμπληρωθούν.

Τέλος, στα απαιτούμενα γυαλικά πρέπει να συμπεριληφθούν και οι σύριγγες ακριβείας οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή όλων των πρότυπων διαλυμάτων, με αραιώση stock διαλυμάτων. Οι σύριγγες αυτές ξεπλένονται πολλές φορές με ακετόνη και τολουόλιο πριν και μετά τη χρήση τους.

Επίσης, θα αναφέρουμε ότι η μεταφορά των δειγμάτων από το ένα σκεύος στο άλλο κατά τη διάρκεια των αναλύσεων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση γυάλινων πιπετών Pasteur μιας χρήσης, ενώ η μεταφορά των ούρων στους δοκιμαστικούς σωλήνες έγινε με τη βοήθεια (πλαστικής) πιπέτας ακριβείας.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε πιθανή φωτοδιάσπαση των (βαρύτερων) μελών PBDEs, όλα τα γυάλινα σκεύη που τα περιείχαν, καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο στη διάρκεια κάθε ανάλυσης.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1. Εισαγωγή:

Όπως ήδη αναφέραμε, λόγω του ελάχιστου ενδιαφέροντος για τον προσδιορισμό των PBDEs γενικά σε ούρα και του ανύπαρκτου ενδιαφέροντος σε ανθρώπινα ούρα, η μεθοδολογία που αναπτύξαμε βασίστηκε σε συνήθεις τρόπους προσδιορισμού τους σε ανθρώπινο αίμα, καθώς και σε μητρικό γάλα.

Από τις μεθόδους που περιγράψαμε στο κεφάλαιο 1.6.1. για την απομόνωση των PBDEs, επιλέξαμε την LLE παρόλο που είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, καθώς παρέχει τη δυνατότητα διαχωρισμού των ουδέτερων από τις υδρόξυ-φαινολικές ενώσεις και συνεπώς των ουδέτερων από τους υδρόξυ-PBDEs (μεταβολισμένοι), παρόλο που η ανάλυση των υδρόξυ-PBDEs δεν ήταν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Επιπλέον, η LLE παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης μεγάλων ποσοτήτων δείγματος, πράγμα αναγκαίο στην ανάλυση ιχνοποσοτήτων.

Για να συμβεί όμως ο διαχωρισμός των δύο κατηγοριών PBDEs, είναι αναγκαίο στην οργανική φάση που προκύπτει με το πέρας της αποδιάταξης των πρωτεϊνών και την εκχύλιση των ούρων, να προστεθεί διάλυμα KOH (50% σε νερό και 50% σε αιθανόλη). Με αυτό το στάδιο δεν πειραματιστήκαμε. Αυτό που μας απασχόλησε ήταν ο τρόπος αποδιάταξης των πρωτεϊνών. Επειδή λοιπόν δοκιμάστηκαν διάφοροι τρόποι αποδιάταξης, κρίθηκε σκόπιμο όλες οι δοκιμές να καταγραφούν ως αποτελέσματα της παρούσας διατριβής.

Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου για την ανάλυση των ουδέτερων PBDEs σε ανθρώπινα δείγματα, βασίστηκε τόσο στις ποσότητές τους στα τυφλά δείγματα της εκάστοτε μεθόδου, καθώς και στις ανακτήσεις αλλά και τα όρια ανίχνευσης των μεθόδων αυτών. Η τελική επιλογή μεθόδου αποτελεί σαφώς ένα σπουδαίο αποτέλεσμα της παρούσας διατριβής, αλλά δεν ήταν το μοναδικό. Η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου σε πιθανώς εκτεθειμένα ανθρώπινα δείγματα ούρων, ήταν εξίσου σημαντική.

Ένα τελευταίο και χρήσιμο αποτέλεσμα που καταγράφεται, είναι η επιβεβαίωση ότι η επιλεγμένη μέθοδος είναι δυνατή να προσδιορίσει ουδέτερους PBDEs σε μεγάλη κλίμακα συγκεντρώσεων (ξεκινώντας περίπου από 1 pgr/ml), παρουσιάζοντας πολύ καλή γραμμικότητα μέσα σε αυτήν.

4.2. Προτεινόμενες μέθοδοι για τον προσδιορισμό μη-μεταβολισμένων PBDEs σε ανθρώπινα ούρα βασισμένες στην υγρή-υγρή εκχύλιση:

Όπως αναφέραμε, η υγρή-υγρή εκχύλιση μας δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού των ουδέτερων από τους υδρόξυ-PBDEs και για αυτό το λόγο βασιστήκαμε σε αυτήν.

Από εκεί και έπειτα, δοκιμάσαμε τους περισσότερο δυνατούς τρόπους που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την αποδιάταξη πρωτεϊνών σε αίμα και μητρικό γάλα, μιας και ουσιαστικά τρόπος αποδιάταξης σε ούρα δεν έχει καταγραφεί. Αυτοί οι τρόποι περιλαμβάνουν την κατεργασία των ούρων με ισοπροπανόλη και HCl, με μεθανόλη, αλλά και με φορμικό οξύ. Δοκιμάζοντας αυτούς τους τρόπους, παράλληλα πειραματιστήκαμε και με τις ποσότητες των διαλυτών αυτών. Σε κάθε περίπτωση, προσαρμόζαμε και τις ποσότητες των οργανικών διαλυτών που απαιτούνται για τις εκχυλίσεις κατά τη διαδικασία της απομόνωσης των PBDEs.

Αναλυτικότερα, η διαδικασία που ακολουθήσαμε με κάθε διαλύτη αποδιάταξης, καθώς και τα λεπτομερή αποτελέσματα της κάθε μεθόδου, θα παρουσιαστούν αμέσως τώρα. Όλες οι μέθοδοι πάντως, περιλαμβάνουν περιλαμβάνουν τέσσερα σταθερά στάδια τα οποία είναι καλό να γίνουν ξεκάθαρα εξ' αρχής.

Βήμα 1^ο: Απελευθέρωση των φαινολικών ενώσεων (φαινόλες, διφαινόλια και παράγωγά τους) από τις πρωτεΐνες που τις συγκρατούν, με αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακολουθεί εκχύλιση για την απομόνωσή τους.

Βήμα 2^ο: Διαχωρισμός των ουδέτερων από τις υδρόξυ-φαινολικές ενώσεις παρουσία του διαλύματος ΚΟΗ. Οι υδρόξυ-φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στην υδατική φάση (του ΚΟΗ), ενώ οι ουδέτερες φαινολικές ενώσεις στην οργανική φάση.

Βήμα 3^ο: Έλεγχος για το εάν είναι απαραίτητη η απομάκρυνση πιθανών λιπιδίων στο ουδέτερο κλάσμα, για περαιτέρω καθαρισμό.

Βήμα 4^ο: Ανάλυση του ουδέτερου κλάσματος στο GC-MS με εφαρμογή αρνητικού χημικού ιοντισμού.

4.2.1. Μέθοδος βασισμένη στην προσθήκη ισοπροπανόλης και ΗCl για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών:

4.2.1.1. Αναλυτική διαδικασία:

Η πρώτη μέθοδος στην οποία θα αναφερθούμε λόγω της συχνής χρήσης της, περιλαμβάνει την προσθήκη σταδιακά 1 ml ΗCl 6M και 6 ml ισοπροπανόλης για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αναλυτικότερα:

Βήμα 1^ο:

- Προσθήκη 5 ml ούρων και 1 ml ΗCl 6M σε δοκιμαστικό σωλήνα των 30 ml

↓ Ανάδευση για 1 λεπτό σε Vortex

- Προσθήκη 6 ml ισοπροπανόλης

↓ Ανάδευση για 1 λεπτό σε Vortex

- Εκχύλιση με 6 ml μείγματος εξανίου:ΜtBE (1:1)

1. Ανάδευση για 5 λεπτά
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
3. Μεταφορά της οργανικής φάσης σε δοκιμαστικό σωλήνα των 25 ml

- Επανεκχύλιση της υδατικής φάσης με 3 ml μείγματος εξανίου:ΜtBE

1. Ανάδευση για 5 λεπτά
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
3. Μεταφορά της οργανικής φάσης στο προηγούμενο οργανικό κλάσμα

- Εκχύλιση της οργανικής φάσης με 4 ml υδατικού δ/τος KCl 1% w/v

1. Ανάδευση για 1 λεπτό σε Vortex
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
3. Μεταφορά της οργανικής φάσης σε αποξειδή φιάλη των 30 ml

- Εκχύλιση της υδατικής φάσης του KCl με 3 ml μείγματος εξανίου: MtBE

1. Ανάδευση για 1 λεπτό σε Vortex
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
3. Μεταφορά της οργανικής φάσης στο προηγούμενο οργανικό κλάσμα

- Περιστροφική συμπίκνωση περίπου μέχρι το 0.5 ml μ'έναν rotar-varor

- Προσθήκη 8 ml εξανίου στην αποξειδή φιάλη και επανασυμπύκνωση πάλι περίπου μέχρι το 0.5 ml

Αξιζει να σημειωθεί, ότι με την προσθήκη εξανίου στο τελευταίο στάδιο, η ισοπροπανόλη που έχει περισσέψει από τη συμπίκνωση εξαιτίας του υψηλού σημείου ζεσεώς της εναλλάσσεται με το εξάνιο, το οποίο εκτός του ότι τη βοηθά να εξατμιστεί (ίσως με τη δημιουργία ενός αζεοτροπικού μείγματος), είναι και ο επιθυμητός διαλύτης των PBDEs.

Βήμα 2^ο:

- Μεταφορά του δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml και ξέπλυμα της αποξειδούς σταδιακά 3 φορές με 3,5 ml εξάνιο

- Εκχύλιση με 2 ml KOH 0.5M

1. Ανάδευση δια χειρός για 2 λεπτά
2. Ανάδευση για 1 λεπτό σε Vortex
3. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
4. Μεταφορά της οργανικής φάσης σε αποξειδή φιάλη των 30 ml

- Εκχύλιση της υδατικής φάσης του KOH με 3 ml εξάνιο

2. Ανάδευση δια χειρός για 2 λεπτά
3. Ανάδευση για 1 λεπτό σε Vortex
4. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
5. Μεταφορά της οργανικής φάσης στο προηγούμενο οργανικό κλάσμα

- Περιστροφική συμπύκνωση περίπου μέχρι το 0.5 ml μ'έναν rotar-visor

Βήμα 3^ο:

- Μεταφορά του δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml και ξέπλυμα της αποειδούς σταδιακά 3 φορές με 3,5 ml εξάνιο



- Εκχύλιση με 2 ml π. H₂SO₄

1. Ανάδευση για 2 λεπτά σε Vortex
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
3. Μεταφορά της οργανικής φάσης σε αποειδή φιάλη των 20 ml



- Εκχύλιση της υδατικής φάσης του H₂SO₄ με 3 ml εξάνιο

1. Ανάδευση για 1 λεπτό σε Vortex
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
3. Μεταφορά της οργανικής φάσης στο προηγούμενο οργανικό κλάσμα



- Περιστροφική συμπύκνωση περίπου μέχρι το 0.5 ml μ'έναν rotar-visor



- Μεταφορά του δείγματος σε πακεταρισμένη με 10 ml εξάνιο μικροστήλη pasteur, η οποία αποτελείται από εκχυλισμένο βαμβάκι, 0.5 gr εκχυλισμένης όξινης silica (40% σε H₂SO₄) και 5 mm εκχυλισμένο Na₂SO₄ (το δείγμα καταλήγει σε νέα αποειδή φιάλη των 20 ml)

Ξέπλυμα της αρχικής αποειδούς σταδιακά με 10 ml εξάνιο



- Περιστροφική συμπύκνωση περίπου μέχρι 0.2 ml μ'έναν rotar-visor



- Μεταφορά του δείγματος σε vial για τον autosampler του Agilent gc 6890 και ξέπλυμα της αποειδούς σταδιακά 3 φορές με 600 μl εξάνιο



- Συμπύκνωση παρουσία ήπιου ρεύματος αερίου N₂ περίπου μέχρι 20 μl
↓
- Προσθήκη 20 μl εσωτερικού προτύπου (¹³C₁₂-BDE-139) και ασφάλιση του vial με καπάκι

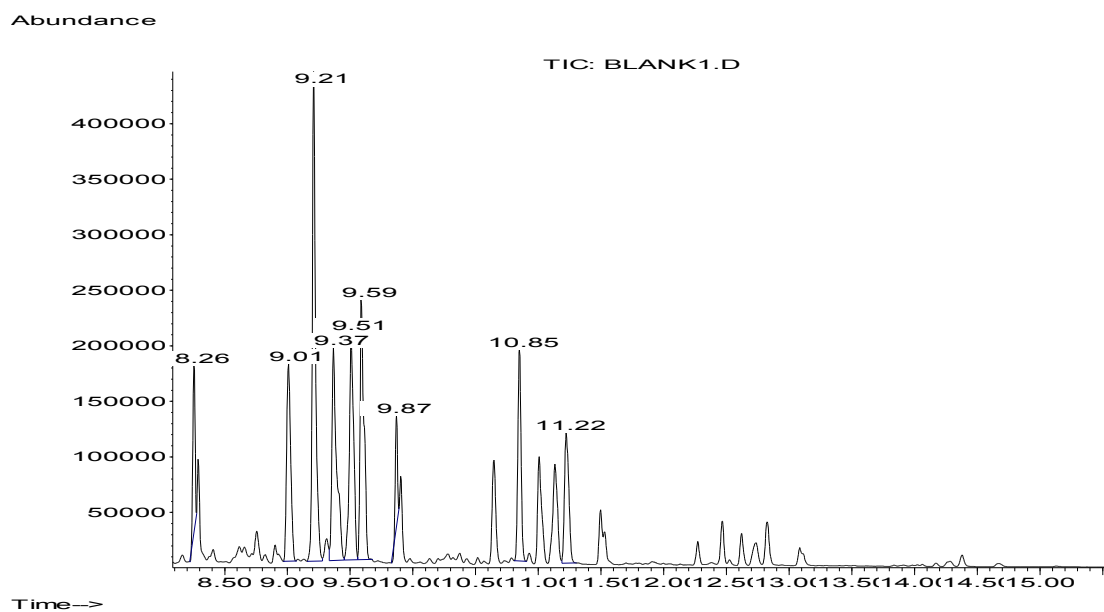
Βήμα 4^ο:

- Εισαγωγή 2 μl του δείγματος (μέσω του autosampler) στο σύστημα GC-MS και λήψη του χρωματογραφήματος και των φασμάτων μάζας των διαφόρων μελών PBDEs

4.2.1.2. Ανάλυση δειγμάτων (τυφλών και αγνώστων):

Πριν την έναρξη οποιασδήποτε ανάλυσης, θεωρείται πάντα σκόπιμο να ελεγχθεί το κατά πόσο μπορεί να υπάρξει επιμόλυνση στα πραγματικά δείγματα μέσω της συνολικής αναλυτικής διαδικασίας, χωρίς όμως την παρουσία της πραγματικής μήτρας. Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται μια μήτρα που να την προσομοιάζει αρκετά και ακολουθείται επακριβώς η αναλυτική διαδικασία που εφαρμόζεται και στα πραγματικά δείγματα. Σκοπός αυτής της ανάλυσης, είναι ο έλεγχος των τυφλών δειγμάτων και του υποβάθρου που αυτά παρουσιάζουν ως προς τις υπό ανάλυση ενώσεις.

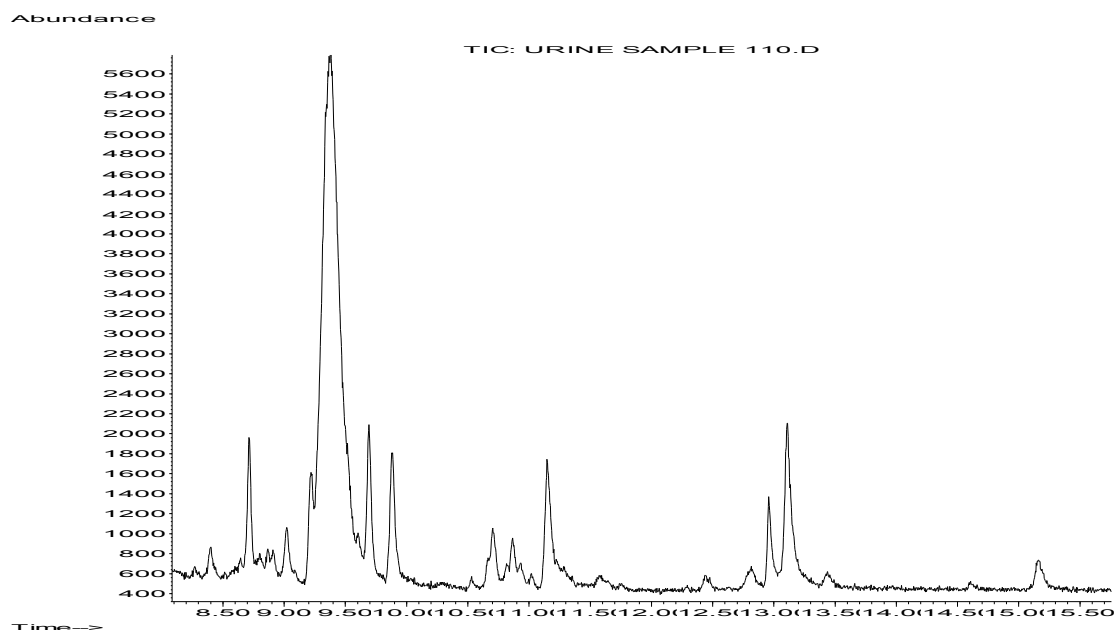
Για το σκοπό της ανάλυσης των τυφλών δειγμάτων της δικής μας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν 5 ml υπερκάθαρου νερού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές και έδωσε το χαρακτηριστικό ακόλουθο χρωματογράφημα νηματοειδούς μορφής:



Εικόνα 24: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα τυφλού δείγματος της μεθόδου 4.2.1

Τα άλλα δύο χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα Α-1. Παρατηρούμε ότι με τη συγκεκριμένη διαδικασία, τα τυφλά δείγματα παρουσιάζουν πάρα πολλές κορυφές με πολύ υψηλές αφθονίες. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει μεγάλη επιμόλυνση και ισχυρή παρεμπόδιση στον ποσοτικό προσδιορισμό των αγνώστων δειγμάτων, ακόμη και αν οι ποσότητες που εμφανίζονται σε αυτά είναι μεγαλύτερες από αυτές στα τυφλά δείγματα και ακόμη και αν οι συνεκλούμενες κορυφές αντιστοιχούν στο εκάστοτε μέλος PBDE και όχι σε κάποια ακαθαρσία.

Έπειτα, για τον έλεγχο της μορφής των χρωματογραφημάτων των αγνώστων δειγμάτων αυτής της μεθόδου, αναλύθηκαν αρχικά 3 δείγματα ούρων που παραλάβαμε στην πρώτη δειγματοληψία (Μάρτιος 2010). Και τα 3 χρωματογραφήματα που προέκυψαν, είχαν την ακόλουθη μορφή:



Εικόνα 25: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα αγνώστου δείγματος της μεθόδου 4.2.1 (ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL)

Τα άλλα δύο χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα Α-2. Για επιβεβαίωση της διαδικασίας, αναλύθηκαν και άλλα 2 δείγματα ούρων που παραλάβαμε στη δεύτερη δειγματοληψία (Οκτώβριος 2010), τα οποία επίσης παρουσιάζονται στο ίδιο παράρτημα. Και τα 2 χρωματογραφήματα που προέκυψαν είχαν επίσης την ίδια μορφή.

Η ίδια μορφή όλων των χρωματογραφημάτων των αγνώστων δειγμάτων, στα οποία παρουσιάζονται και επιπλέον κορυφές που δυσκολεύουν την ποσοτικοποίηση των πιθανών PBDEs, σε συνδυασμό με τα πολύ «βρώμικα» τυφλά δείγματα τα οποία μάλιστα παρουσιάζουν κορυφές με υψηλότερες αφθονίες συγκριτικά με τα άγνωστα δείγματα, μας αποτρέπουν από το να επιλέξουμε τη συγκεκριμένη μέθοδο ως κατάλληλη για τις αναλύσεις μας.

Όμως, πριν προχωρήσουμε στον επόμενο τρόπο αποδιάταξης των πρωτεϊνών στα ούρα, επιχειρήσαμε να τροποποιήσουμε λίγο τη συγκεκριμένη μέθοδο.

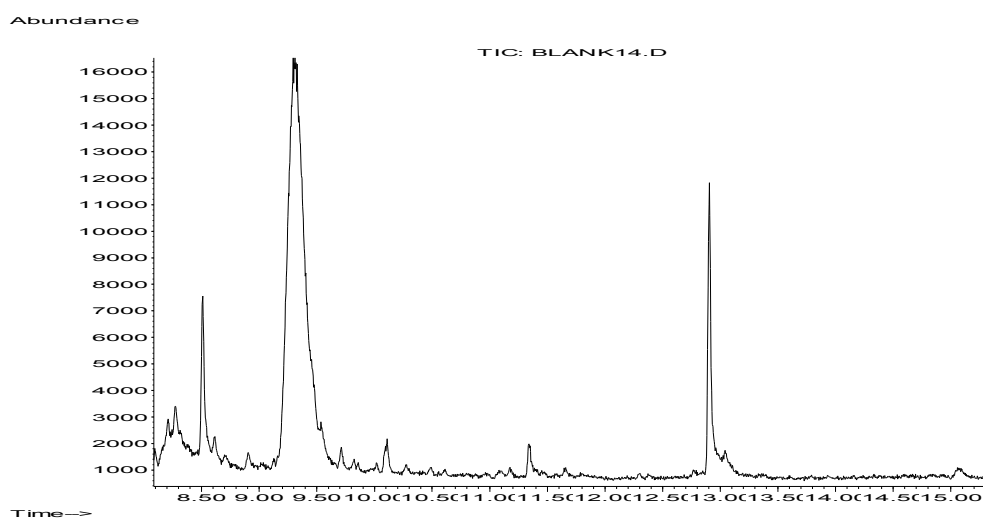
4.2.1.3. Τροποποίηση της αναλυτικής διαδικασίας:

A) Κατάργηση του βήματος 3 (της προσθήκης π. H₂SO₄):

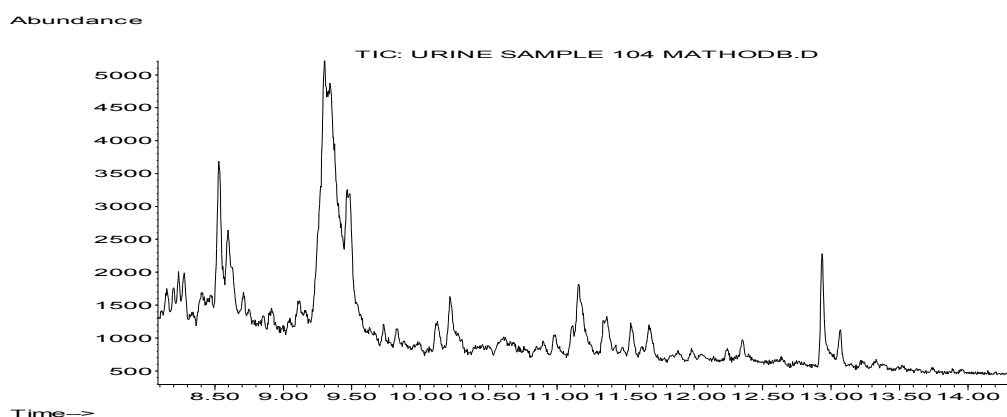
Αναφέραμε ότι ουσιαστικά κάθε φορά πρέπει να ελέγχουμε εάν είναι αναγκαία η προσθήκη του π. H₂SO₄ στη διαδικασία, μιας και ο βασικός λόγος προσθήκης του είναι η καταστροφή των λιπιδίων, τα οποία δεν αναμένονται στα ούρα. Για το λόγο αυτό, ελέγξαμε σε πρώτη φάση εάν παραβλέποντας αυτό το στάδιο μπορούμε να λάβουμε καλύτερα χρωματογραφήματα για τα δείγματα. Βέβαια, το στάδιο αυτό δεν καταργήθηκε τελείως, απλά η απαιτούμενη κατεργασία με π. H₂SO₄ και η μικροστήλη της εκχυλισμένης όξινης silica για τον καθαρισμό των υπολειμμάτων της κατεργασίας αυτής, αντικαταστάθηκαν με την προσθήκη μιας μικροστήλης που περιείχε εκχυλισμένο Na₂SO₄ απλά για την απομάκρυνση υπολειμμάτων ύδατος από τα 2 πρώτα βήματα της διαδικασίας. Συγκεκριμένα, το βήμα 3 γίνεται ως εξής:

- Μεταφορά του δείγματος σε πακεταρισμένη με 5 ml εξάνιο μικροστήλη pasteur, η οποία αποτελείται από εκχυλισμένο βαμβάκι και 2 cm εκχυλισμένο Na₂SO₄ (το δείγμα καταλήγει σε νέα αποξειδή φιάλη των 20 ml)
 - ↓ Ξέπλυμα της αρχικής αποξειδούς σταδιακά με 5 ml εξάνιο
- Περιστροφική συμπύκνωση περίπου μέχρι 0.2 ml μ'έναν rotar-vaapor
 - ↓
- Μεταφορά του δείγματος σε vial για τον autosampler του Agilent gc 6890 και ξέπλυμα της αποξειδούς σταδιακά 3 φορές με 600 μl εξάνιο
 - ↓
- Συμπύκνωση παρουσία ήπιου ρεύματος αερίου N₂ περίπου μέχρι 20 μl
 - ↓
- Προσθήκη 20 μl εσωτερικού προτύπου (¹³C₁₂-BDE-139) και ασφάλιση του vial με καπάκι

Κάνοντας αυτήν την αλλαγή, αναλύσαμε ένα τυφλό και ένα άγνωστο δείγμα. Τα αποτελέσματα που λάβαμε αναπαριστώνται στα παρακάτω χρωματογραφήματα:



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος της τροποποιημένης μεθόδου 4.2.1.A

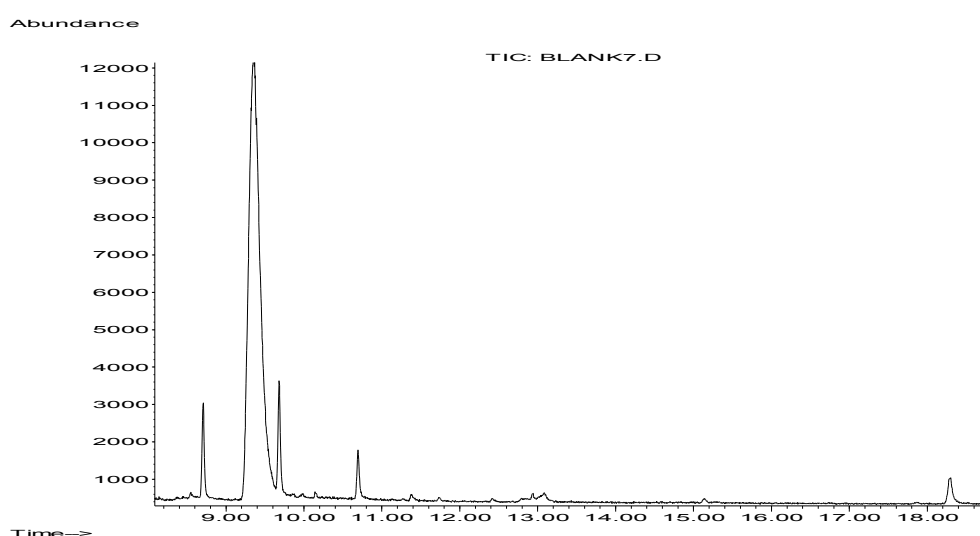


Εικόνα 27: Χρωματογράφημα αγνώστου δείγματος της τροποποιημένης μεθόδου 4.2.1.A

Τα χρωματογραφήματα αυτά, εκτός του ότι παρουσιάζουν επίσης πολλές κορυφές που δυσκολεύουν την ποσοτικοποίηση των πιθανών PBDEs, παρουσιάζουν και χειρότερο baseline, πράγμα που φαίνεται καλύτερα εάν κοιτάξουμε ολόκληρα τα χρωματογραφήματα (μέχρι τα 37 λεπτά). Τέλος, το τυφλό δείγμα εξακολουθεί να παρουσιάζει κορυφές με υψηλότερες αφθονίες συγκριτικά με το άγνωστο δείγμα. Όλα αυτά, κάνουν λογική την αποτροπή μας από το να βασιστούμε σε αυτήν την εναλλακτική μέθοδο για τις αναλύσεις μας.

B) Κατάργηση της προσθήκης του δ/τος HCl 6M:

Προβληματισμένοι για την διαφορετική μορφή μεταξύ των χρωματογραφημάτων των τυφλών και των αγνώστων δειγμάτων, καθώς και για την μη λογική διαφορά που παρουσιάζουν οι αφθονίες των κορυφών στα δείγματα αυτά και στις δύο παραπάνω μεθόδους, σκεφτήκαμε να αναλύσουμε 2 τυφλά δείγματα χωρίς την προσθήκη του δ/τος HCl 6M. Και τα 2 χρωματογραφήματα που προέκυψαν είχαν τη μορφή:



Εικόνα 28: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος της τροποποιημένης μεθόδου 4.2.1.B

Παρατηρούμε ότι αυτό το χρωματογράφημα είναι πολύ πιο καθαρό από όλα τα προηγούμενα, και κυρίως με αυτό της Εικόνας 24 που μας ενδιαφέρει. Το γεγονός, εικάζουμε ότι οφείλεται σε πιθανή αντίδραση του δ/τος HCl με την ισοπροπανόλη στο υδατικό διάλυμα του αρχικού τυφλού δείγματος, η οποία δεν πραγματοποιείται απουσία του δ/τος HCl. Πάντως, και οι δύο εναλλακτικές οδηγούν σε αποδιάταξη των πρωτεϊνών στα ούρα. Συγκρίνοντας λοιπόν αυτό το τελευταίο χρωματογράφημα με ένα αντίστοιχο αγνώστου δείγματος (χωρίς την προσθήκη δ/τος HCl 6M), θα μπορούσαμε να καταλήξουμε για την καταλληλότητα αυτής της εναλλακτικής διαδικασίας.

Ωστόσο αυτό δεν το κάναμε, διότι η αμέσως επόμενη μέθοδος που θα εφαρμόζαμε για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών περιελάμβανε την προσθήκη μεθανόλης, η οποία επίσης είναι μια αλκοόλη (όπως η ισοπροπανόλη η οποία χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εναλλακτική μέθοδο για την αποδιάταξη).

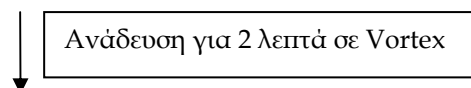
Εξάλλου συγκριτικά με τη μεθανόλη, η ισοπροπανόλη έχει τα μειονεκτήματα του υψηλότερου σημείου βρασμού (82 έναντι 65 °C), γεγονός που καθυστερεί τη περιστροφική συμπύκνωση στο τέλος του 1^{ου} σταδίου, αλλά και της ικανότητας ανάμειξής της τόσο στην υδατική φάση των ούρων όσο και στην οργανική φάση των οργανικών διαλυτών, γεγονός που ίσως επηρεάσει την ποσότητα των PBDEs που εκχυλίζεται στην οργανική φάση.

4.2.2. Μέθοδος βασισμένη στην προσθήκη μεθανόλης για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών:

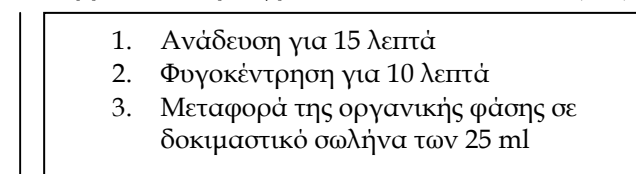
4.2.2.1. Αναλυτική διαδικασία:

Η δεύτερη μέθοδος στην οποία βασιστήκαμε, περιλαμβάνει την προσθήκη 10 ml μεθανόλης για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αναλυτικότερα, μετά και την τροποποίηση των ποσοτήτων των διαλυτών, το βήμα 1 της διαδικασίας έχει ως εξής:

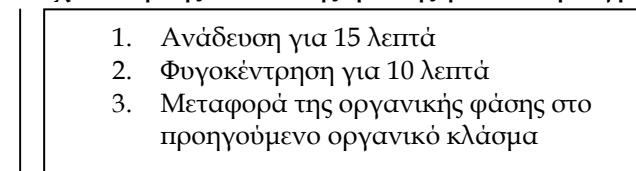
- Προσθήκη 10 ml ούρων και 10 ml μεθανόλης σε δοκιμαστικό σωλήνα των 30 ml



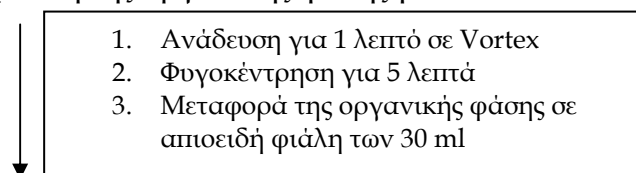
- Εκχύλιση με 10 ml μείγματος εξανίου:ΜtBE (1:1)



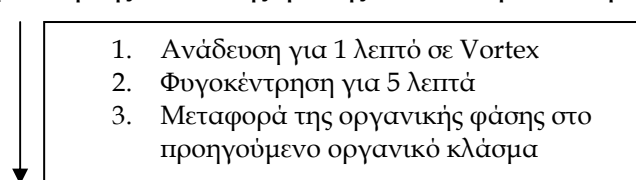
- Επανεκχύλιση της υδατικής φάσης με 8 ml μείγματος εξανίου:ΜtBE



- Εκχύλιση της οργανικής φάσης με 8 ml υδατικού δ/τος KCl 1% w/v



- Εκχύλιση της υδατικής φάσης του KCl με 6 ml μείγματος εξανίου:ΜtBE

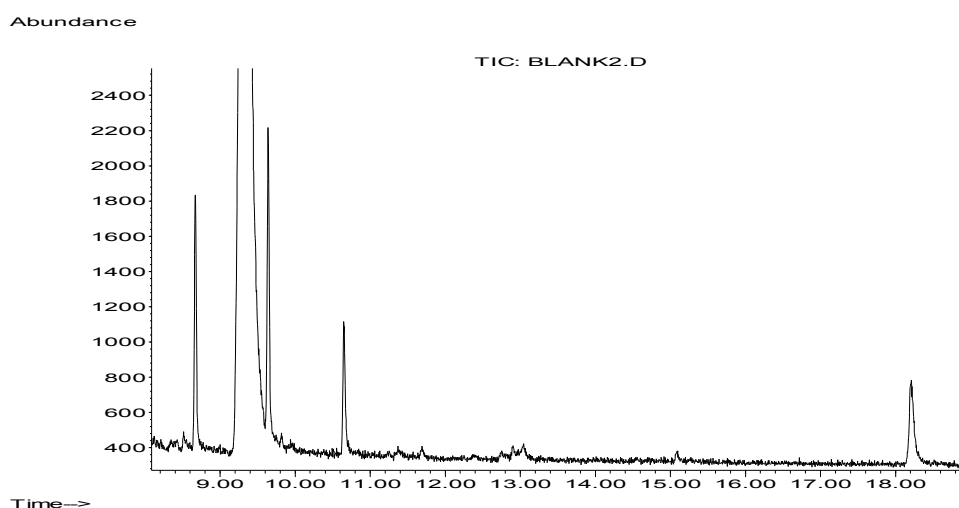


- Περιστροφική συμπύκνωση περίπου μέχρι το 0.5 ml μ'έναν rotar-varior
↓
- Προσθήκη 3 ml εξανίου στην αποξειδή φιάλη και επανασυμπύκνωση πάλι περίπου μέχρι το 0.5 ml

Τα βήματα 2, 3 και 4 παραμένουν ακριβώς ίδια με αυτά της προηγούμενης μεθόδου (4.2.1.).

4.2.2.2. Ανάλυση τυφλών δειγμάτων (blanks):

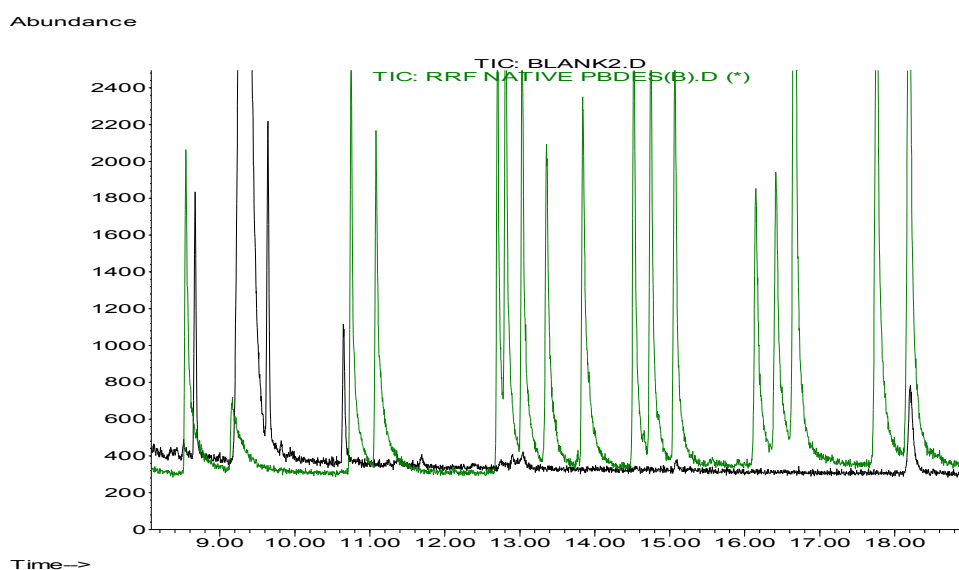
Για το σκοπό της ανάλυσης των τυφλών δειγμάτων αυτής της διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν 10 ml υπερκάθαρου νερού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 8 φορές και έδωσε το χαρακτηριστικό ακόλουθο χρωματογράφημα:



Εικόνα 29: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα τυφλού δειγματος της μεθόδου 4.2.2

Τα υπόλοιπα 7 χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα A-1. Παρατηρούμε ότι αυτό το χρωματογράφημα είναι ανάλογο με αυτό που προκύπτει με την κατεργασία της ισοπροπανόλης (αν και το τελευταίο είναι περισσότερο ζουμαρισμένο εδώ). Το γεγονός, επικυρώνει ότι καλώς δεν εξετάσαμε λεπτομερέστερα τη μέθοδο με την κατεργασία της ισοπροπανόλης για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στα ούρα.

Το χρωματογράφημα αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να εξετάσουμε εάν υπάρχει κάποια επιμόλυνση από τα τυφλά δείγματα, δηλαδή εάν υπάρχουν κάποια μέλη PBDEs σε αυτά. Για το ελέγξουμε αυτό, καταρχήν βάζουμε το χρωματογράφημα αυτό πάνω στο χρωματογράφημα του διαλύματος RRF της ημέρας, προκειμένου να ελέγξουμε πιθανή ταύτιση σε χρόνους έκλουσης.



Εικόνα 30: Σύγκριση χρωματογραφήματος τυφλού δείγματος της μεθόδου 4.2.2 με χρωματογράφημα διαλύματος RRF

Ξεκινώντας από τα δεξιά, στα 18.23 λεπτά εκλούεται σίγουρα το εσωτερικό πρότυπο, το οποίο υπάρχει στο διάλυμα RRF και το οποίο το προσθέσαμε εμείς και στο τυφλό δείγμα. Από εκεί και έπειτα, στο τυφλό δείγμα πιθανό είναι να υπάρχει καταρχήν το μέλος BDE-99 στα 15.08 λεπτά, αλλά και τα μέλη BDE-49, -71 και -47 που αντιστοιχούν στην τριάδα των κορυφών που εμφανίζεται στα 13 λεπτά, και συγκεκριμένα στα 12.71, τα 12.82 και τα 13.04 λεπτά αντίστοιχα. Τέλος, το μέλος BDE-15 που εκλούεται στα 9.17 λεπτά δεν υπάρχει λόγος να εξεταστεί περαιτέρω, διότι η τεράστια κορυφή που υπάρχει σε εκείνο το σημείο στο τυφλό δείγμα, δεν μπορεί να κάνει δυνατή την ποσοτικοποίησή του.

Για να εξετάσουμε τώρα ποιό η ποιά από τα 4 μέλη που υποψιαζόμαστε υπάρχει/χουν όντως στα τυφλά δείγματα, πρέπει να συγκρίνουμε το φάσμα μάζας τους στο συγκεκριμένο δείγμα με το αντίστοιχο φάσμα στο διάλυμα RRF εκείνης της ημέρας. Συνεπώς, ο άμεσος έλεγχος επιτυγχάνεται με σύγκριση της αναλογίας των κορυφών m/z στο φάσμα μάζας κάθε μέλους στο διάλυμα RRF, με την αντίστοιχη αναλογία στο τυφλό δείγμα. Σε πρώτη φάση λοιπόν, εξετάζεται η αναλογία των 5 κορυφών που έχουμε ορίσει να παρακολουθούμε με την μέθοδο SIM που εφαρμόζουμε.

Έπειτα, για να είμαστε σίγουροι, πρέπει να γίνει και ο έλεγχος ταύτισης όλων των θραυσμάτων κάθε μέλους σ' ένα διάλυμα RRF και σ' ένα τυφλό δείγμα, μετά από Full Scan. Προσπαθώντας να κάνουμε τον συγκεκριμένο έλεγχο, δεν καταλήξαμε σε κάποιο βοηθητικό αποτέλεσμα. Οι υπάρχουσες ακαθαρσίες που συνεκλούνται σε αυτό το τυφλό δείγμα, και εμφανίζονται με Full Scan, παρουσιάζουν τεράστιες αφθονίες συγκριτικά με τις κορυφές οι οποίες εμφανίζονται με τη μέθοδο SIM, με αποτέλεσμα η εμφάνιση των τελευταίων με τη μέθοδο Full Scan να είναι αδύνατη. Οπότε τελικά αρκεστήκαμε στα φάσματα μάζας που παρέχει η SIM μέθοδος. Όλα τα φάσματα μάζας που απαιτούνται για να αποφανθούμε για τα 4 αυτά μέλη, παρουσιάζονται στο παράρτημα A-1. Για να είμαστε σίγουροι για τα παρεχόμενα αποτελέσματα, πρέπει κάθε φορά να αφαιρούμε το σήμα κάθε κορυφής από αυτό του θορύβου.

Με βάση όλες τις πληροφορίες που λάβαμε από όλα αυτά τα θραύσματα μάζας, καταλήξαμε στο ότι μόνο τα μέλη BDE-47 και BDE-99 υπάρχουν στα τυφλά δείγματα. Αυτό είναι λογικό, εάν αναλογιστούμε τις σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις τους στην ατμόσφαιρα εσωτερικών χώρων και συνεπώς την πιθανή επιμόλυνση στα διάφορα στάδια εκχυλίσεων της αναλυτικής διαδικασίας, αλλά και την πιθανή εκχύλισή τους από τα πλαστικά καπάκια των δοκιμαστικών σωλήνων που χρησιμοποιούμε, όπου μπορεί να χρησιμοποιούνται σαν επιβραδυντικά φλόγας, αν και πρέπει να γίνει εμπεριστατωμένος αναλυτικός έλεγχος για να ειπωθεί με ακρίβεια κάτι τέτοιο.

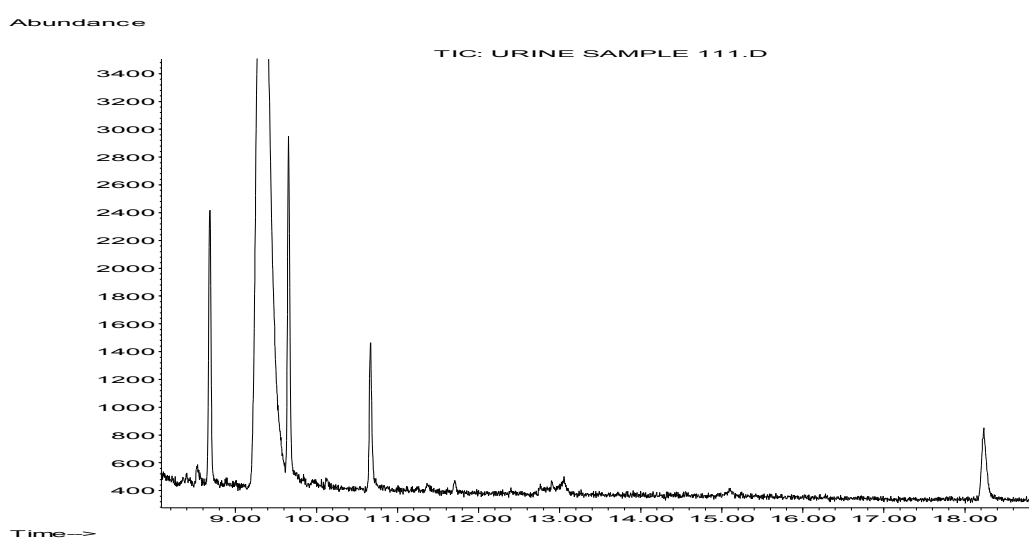
Μετά από όλα αυτά, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει η ποσοτικοποίηση των μελών BDE-47 και BDE-99 στα τυφλά δείγματα, με βάση τον τρόπο που περιγράψαμε στην ενότητα 3.5.2.2. Τα αποτελέσματα που λάβαμε παρουσιάζονται στον Πίνακα 20:

Πίνακας 20: ποσότητες των μελών PBDEs στα τυφλά δείγματα της μεθόδου 4.2.2

#blank	BDE-47 (pgr)	BDE-99 (pgr)	#blank	BDE-47 (pgr)	BDE-99 (pgr)
blank2	4,5	2,6	blank9	8	7
blank3	11,8	4,1	blank10	5,2	2,6
blank4	13,8	9,6	blank11	11,8	3,4
blank5	11,5	4,6			
blank6	5,6	2,6	mean blanks	9,0±3,6 pgr	4,6±2,5 pgr

4.2.2.3. Ανάλυση αγνώστων δειγμάτων (samples):

Για να είμαστε σίγουροι ότι η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των ουδέτερων PBDEs στα ανθρώπινα ούρα, σε πρώτη φάση αναλύσαμε 7 από τα δείγματα που παραλάβαμε στην πρώτη δειγματοληψία (Μάρτιος 2010). Τα δείγματα αυτά έδωσαν παρόμοια χρωματογραφήματα μεταξύ τους, τα οποία με τη σειρά τους ήταν εντελώς παρόμοια και με τα χρωματογραφήματα των τυφλών δειγμάτων. Ενδεικτικά, ακολούθως παρουσιάζεται ένα από αυτά. Τα υπόλοιπα 6 χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα A-2.



Εικόνα 31: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα αγνώστου δειγματος της μεθόδου 4.2.2 (Δείγμα #4: ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL)

4.2.2.4. Προσδιορισμός των ανακτήσεων (recoveries):

Προκειμένου να υπολογιστεί η ακρίβεια της μεθόδου εκφρασμένη σε ποσοστό ανάκτησης, κρίθηκε αναγκαίος ο εμβολιασμός (spike) 30 μl του προτύπου ανάκτησης σε 3 διαφορετικά τυφλά δείγματα που φυσικά περιείχαν 10 ml υπερκάθαρου νερού έκαστο. Ακολούθως, η όλη διαδικασία απομόνωσης των ιχνηθετημένων μελών ήταν ακριβώς η ίδια με αυτή για την ανάλυση των αγνώστων δειγμάτων. Τέλος, η εύρεση του ποσοστού ανάκτησης έγινε όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.7.1.2. Βέβαια, για τα μέλη που περιέχονται εξ' αρχής στα τυφλά δείγματα, η σχέση που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της %ανάκτησης πρέπει να μετατραπεί στην εξής σχέση:

$$\% \text{ανάκτηση} = \frac{\text{τελική.ποσότητα.στοτυφλό} - \text{αρχική.ποσότητα.στοτυφλό}}{\text{εμβολιασμένη.ποσότητα.στοτυφλό}} \cdot 100\%$$

όπου: αρχική ποσότητα στο τυφλό είναι η μέση τιμή της ποσότητας του μέλους που προϋπάρχει στο τυφλό δείγμα και τελική ποσότητα στο τυφλό είναι η συνολική ποσότητα του μέλους αυτού στο τυφλό δείγμα με το πέρας της ανάλυσης. Όπως καταλαβαίνουμε, αυτή η σχέση χρησιμοποιήθηκε στον υπολογισμό της %ανάκτησης των μελών BDE-47 και BDE-99.

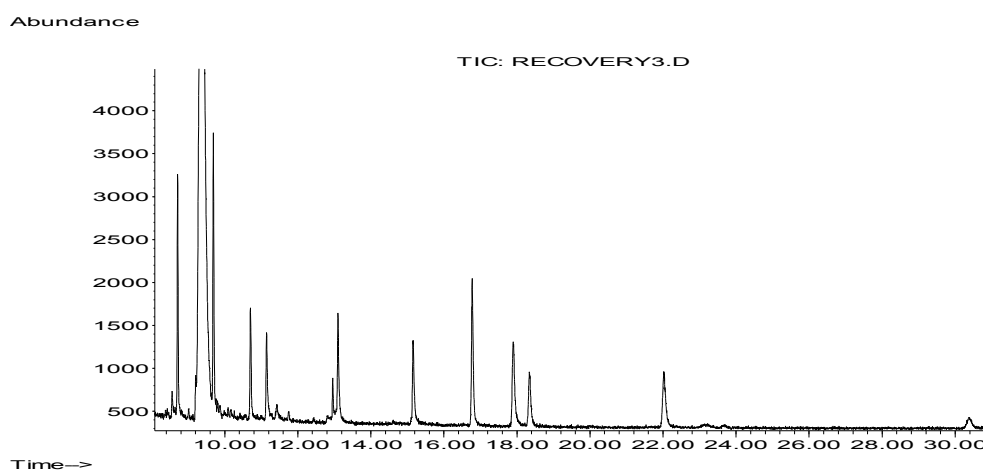
Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για την %ανάκτηση των ιχνηθετημένων μελών του προτύπου ανάκτησης στα 3 τυφλά δείγματα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 21:

Πίνακας 21: %ανάκτηση των μελών PBDEs στη μέθοδο 4.2.2

Μέλος PBDE	Recovery1(%)	Recovery2(%)	Recovery3(%)	Mean Recovery(%)
BDE-15	---	---	---	---
BDE-28	97,9	98,4	91,4	95,9±3,9
BDE-47	98,7	95,8	90,8	95,1±4,0
BDE-99	88,3	89,6	85,2	87,7±2,3
BDE-153	88,0	90,2	90,1	89,4±1,3
BDE-154	85,0	84,8	91,7	87,2±3,9
BDE-183	83,7	83,5	80,7	82,7±1,7
BDE-197	87,0	87,7	84,8	86,5±1,5

Παρατηρούμε καταρχήν, ότι η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει εξαιρετικές ανακτήσεις, γεγονός που ενισχύει την επιτυχία της. Βέβαια, όπως και στην περίπτωση των τυφλών δειγμάτων, το μέλος BDE-15 δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί εξαιτίας της συνέκλουσης μιας τεράστιας κορυφής. Ωστόσο, για τις υπόλοιπες κορυφές (εκτός των μελών BDE-47 και BDE-99) δεν υπάρχει πρόβλημα συνέκλουσης.

Στην Εικόνα 32 που ακολουθεί, παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα από τα 3 χρωματογραφήματα που προέκυψε από την ανάλυση ενός εμβολιασμένου με πρότυπο ανάκτησης τυφλού δείγματος. Τα άλλα 2 χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα A-3.



Εικόνα 32: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου με πρότυπο ανάκτησης τυφλού δείγματος της μεθόδου 4.2.2

4.2.2.5. Όρια ανίχνευσης της μεθόδου (MDL):

Κρίνεται πάντα σκόπιμη η εύρεση της μέγιστης δυνατότητας κάθε μεθόδου να ανιχνεύει ιχνοποσότητες από τους υπό μελέτη αναλύτες, δηλαδή του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου (MDL). Με βάση τη βιβλιογραφία των Geib et al. (2001), για τον προσδιορισμό του MDL καταρχήν είναι απαραίτητη η ανάλυση τριών τυφλών δειγμάτων.

Συγκεκριμένα, μετά την ανάλυση τριών τυφλών δειγμάτων της μεθόδου, για τα μέλη των οποίων γνωρίζουμε την ανάκτηση, αρχικά βρίσκουμε σε ποιο χρόνο αναμένεται να εκλουστεί κάθε μέλος, με βάση το μέσο όρο των χρόνων κατακράτησής του σε 2 χρωματογραφήματα του

διαλύματος RRF εκείνης της ημέρας. Έπειτα, ολοκληρώνουμε τις κορυφές κάθε μέλους και στα 3 τυφλά δείγματα σε εκείνο το χρονικό σημείο. Ακολούθως, υπολογίζουμε το νέο όριο ανίχνευσης του οργάνου (IDL') από την εξής σχέση:

$$IDL' = \frac{area(blank) \cdot amount(std)}{area(std)}$$

όπου: amount(std) και area(std), η ποσότητα και το εμβαδόν ολοκλήρωσης της κορυφής αντίστοιχα κάθε μέλους σε ένα πρότυπο διάλυμα, και area(blank) η τιμή που προκόπτει για κάθε μέλος από την εξής σχέση:

$$area(blank) = average(blank) + 3*SD$$

όπου: average(blank) η μέση τιμή του εμβαδού ολοκλήρωσης της κορυφής κάθε μέλους στα 3 τυφλά δείγματα και SD η τυπική απόκλιση αυτών των τιμών.

Με βάση αυτή τη λογική, υπολογίσαμε το IDL' που παρέχει η συγκεκριμένη μέθοδος και τα αποτελέσματα για κάθε μέλος παρουσιάζονται στον Πίνακα 22:

Πίνακας 22: Όρια ανίχνευσης του οργάνου που παρέχει η μέθοδος 4.2.2

Μέλος PBDE	Average(blank)	SD	Area(blank)	amount(std) [fgr in 2μl]	Area(std)	IDL' (fgr)
BDE-28	120	46	258	3320	100768	9
BDE-47	8257	1826	13734	3320	83523	546
BDE-99	6468	4597	20258	3320	102227	658
BDE-154	129	104	440	6639	201100	15
BDE-153	95	38	208	6639	195004	7
BDE-183	177	54	338	6639	162936	14
BDE-197	91	44	222	6639	74200	20

Σαν ένα πρώτο σχόλιο, μπορούμε να πούμε ότι γενικά η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει εξαιρετικά όρια ανίχνευσης, τα οποία όμως αντιστοιχούν σε ποσότητες που δεν μπορεί να ανιχνεύσει το όργανό μας με βάση τη βαθμονόμηση που έχουμε κάνει και η οποία να υπενθυμίσουμε ότι έδωσε τις ακόλουθες τιμές για το IDL:

Πίνακας 23: Σύγκριση των ορίων ανίχνευσης του οργάνου μετά από βαθμονόμηση και μετά από εφαρμογή της μεθόδου 4.2.2

Μέλος PBDE	IDL (fgr)	IDL' (fgr)
BDE-28	91	9
BDE-47	83	546
BDE-99	128	658
BDE-154	126	15
BDE-153	179	7
BDE-183	300	14
BDE-197	714	20

Όπως είναι αναμενόμενο, για τα μέλη BDE-47 και BDE-99 που προυπάρχουν στα τυφλά δείγματα, η τιμή του IDL' είναι υψηλότερη και μάλιστα ξεπερνά και τα όρια ποσοτικοποίησης του οργάνου (275 και 427 fgr αντίστοιχα). Και σε αυτή την περίπτωση όμως, η τιμή για το IDL' είναι υψηλότερη για το μέλος BDE-99 σε σχέση με αυτή για το μέλος BDE-47.

Όμως, οι τιμές για το IDL' που παρουσιάσαμε δεν αντιπροσωπεύουν τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (MDL). Τα MDL αντιστοιχούν στην ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση του κάθε αναλύτη που υπάρχει στο αρχικό δείγμα ούρων και που η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει. Για να υπολογίσουμε αυτή τη τιμή, απλά ακολουθήσαμε αντίστροφα τη συνολική διαδικασία που εφαρμόσαμε. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν καταγράφονται στον Πίνακα 24:

Πίνακας 24: Όρια ανίχνευσης της μεθόδου 4.2.2 εκφρασμένα σε MDL

PBDE-congener	IDL' (fgr)	Concentration in 2μl injection (fgr/μl)	Amount in ~40μl in vial (fgr)	%recovery	real amount in 40μl (fgr)	Concentration in 10ml urine (fgr/ml)	Concentration in 10ml urine (pg/ml)
BDE-28	9	4	170	95,9	178	18	0,018
BDE-47	546	273	10919	95,1	11481	1148	1,148
BDE-99	658	329	13159	87,7	15004	1500	1,500
BDE-154	15	7	291	87,2	333	33	0,033
BDE-153	7	4	142	89,4	159	16	0,016
BDE-183	14	7	275	82,7	333	33	0,033
BDE-197	20	10	397	86,5	459	46	0,046

Οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στη τελευταία στήλη αυτού του πίνακα, αντιστοιχούν στις τιμές MDL της μεθόδου. Βέβαια, καταλαβαίνουμε

ότι πάλι με βάση τα πραγματικά όρια ανίχνευσης του οργάνου, οι πραγματικά ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις των μελών αυτών στα ούρα αναμένεται να είναι κάπως μεγαλύτερες από τα MDL που παρουσιάστηκαν, εκτός από τις περιπτώσεις των μελών BDE-47 και BDE-99. Συγκεκριμένα:

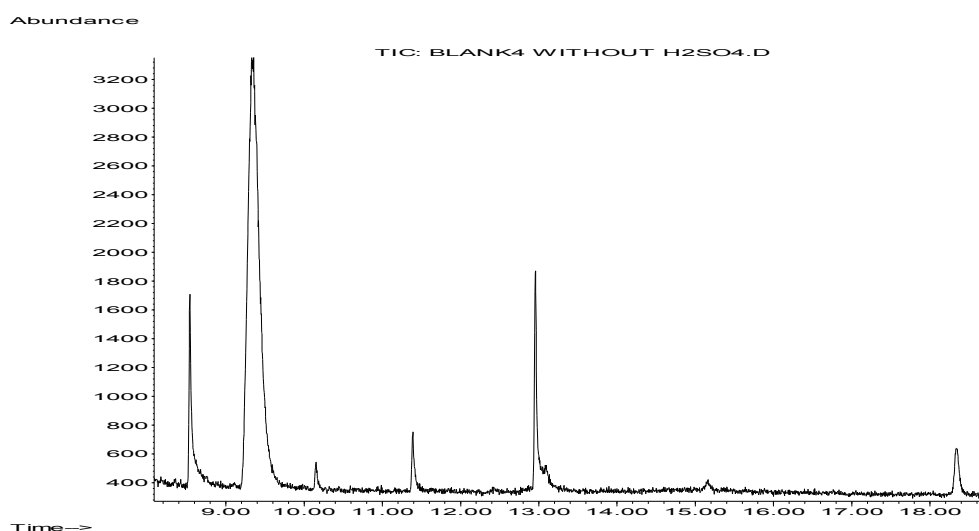
Πίνακας 25: Όρια ανίχνευσης του οργάνου εκφρασμένα σε MDL της μεθόδου 4.2.2

Μέλος PBDE	IDL (fgr)	Concentration in 10ml urine (pgr/ml)	Μέλος PBDE	IDL (fgr)	Concentration in 10ml urine (pgr/ml)
BDE-28	91	0,190	BDE-153	179	0,400
BDE-47	83	0,175	BDE-183	300	0,726
BDE-99	128	0,292	BDE-197	714	1,651
BDE-154	126	0,289			

4.2.2.6. Τροποποίηση της αναλυτικής διαδικασίας:

Προκειμένου πάλι να ελέγξουμε εάν είναι αναγκαία η προσθήκη του π. H_2SO_4 στη διαδικασία, και εάν παραβλέποντας αυτό το στάδιο μπορούμε να λάβουμε καλύτερα χρωματογραφήματα για τα δείγματα, αντικαταστήσαμε την απαιτούμενη κατεργασία με π. H_2SO_4 και τη μικροστήλη της εκχυλισμένης όξινης silica, με μια μικροστήλη που περιείχε εκχυλισμένο Na_2SO_4 , όπως ακριβώς περιγράφεται στην ενότητα 4.2.1.3.A.

Κάνοντας αυτήν την αλλαγή, αναλύσαμε 4 τυφλά δείγματα. Οι αναλύσεις αυτές έδωσαν το εξής χαρακτηριστικό χρωματογράφημα:



Εικόνα 33: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος της τροποποιημένης μεθόδου 4.2.2

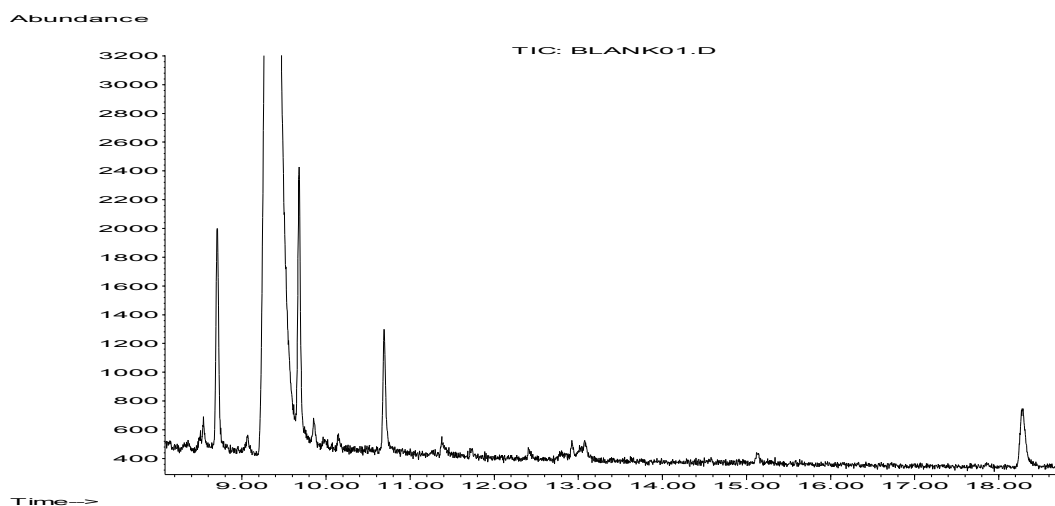
Τα υπόλοιπα 3 χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα A-1. Με βάση αυτό το χρωματογράφημα, παρατηρούμε ότι με την απουσία του π. H₂SO₄ εμφανίζεται μια οξεία κορυφή στην περιοχή των 13^{ων} λεπτών η οποία δεν εμφανίζεται παρουσία αυτού, και η οποία δυσκολεύει την ποσοτικοποίηση του μέλους BDE-47 το οποίο εκλύεται περίπου στα 13.09 λεπτά, και το οποίο λόγω της υψηλής εμφάνισής του στο περιβάλλον είναι το πιο πιθανό μέλος να βρεθεί. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη εναλλακτική πορεία δε θεωρήθηκε κατάλληλη για τις αναλύσεις των αγνώστων δειγμάτων.

4.2.3. Μέθοδος βασισμένη στην προσθήκη μεθανόλης και HCl για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών:

Προκειμένου να βελτιώσουμε την ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο 4.2.1. για τον προσδιορισμό των PBDEs με τη βοήθεια του NCl, επιχειρήσαμε να αντικαταστήσουμε την προσθήκη 6 ml ισοπροπανόλης με 6 ml μεθανόλης για το σκοπό της αποδιάταξης των πρωτεϊνών, διατηρώντας όμως την προσθήκη 1 ml δ/τος HCl 6M. Η αντικατάσταση αυτή, ήταν και η μοναδική αλλαγή που κάναμε σε όλη τη διαδικασία της μεθόδου 4.2.1. Αυτή η αλλαγή, εάν κατέληγε σε ευνοϊκότερο αποτέλεσμα για τις αναλύσεις μας (μέσω της ύπαρξης μικρότερων ποσοτήτων PBDEs στα τυφλά δείγματα και μέσω ακόμη καλύτερων ανακτήσεων συγκριτικά με τη μέθοδο 4.2.2.), θα οδηγούσε και στην εφαρμογή μιας μεθοδολογίας με λιγότερες απαιτήσεις στην κατανάλωση διαλυτών συγκριτικά με τη μέθοδο 4.2.2. Για τον έλεγχο όλων των παραπάνω, αναλύθηκαν αρκετά τυφλά καθώς και κάποια άγνωστα δείγματα, αλλά και υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις και τα όρια ανίχνευσης της νέας μεθόδου.

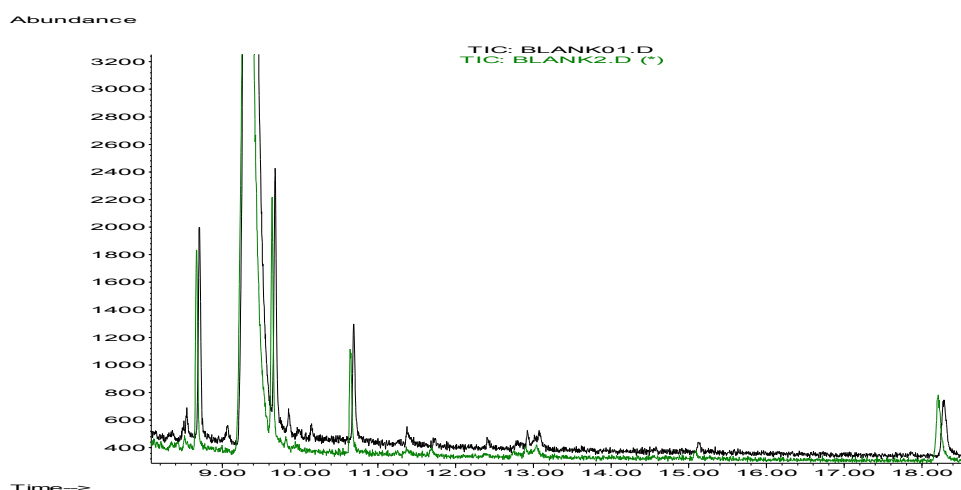
4.2.3.1. Ανάλυση τυφλών δειγμάτων (blanks):

Για το σκοπό της ανάλυσης των τυφλών δειγμάτων αυτής της διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν 5 ml υπερκάθαρου νερού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 7 φορές και έδωσε το χαρακτηριστικό ακόλουθο χρωματογράφημα:



Εικόνα 34: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα τυφλού δείγματος της μεθόδου 4.2.3

Τα υπόλοιπα 6 χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα Α-1. Παρατηρούμε καταρχήν, ότι αυτό το χρωματογράφημα είναι εντελώς αντίστοιχο με τα χρωματογραφήματα της προηγούμενης μεθόδου (4.2.2.). Για του λόγου το αληθές, θα βάλουμε τα χρωματογραφήματα αυτών των 2 μεθόδων το ένα πάνω στο άλλο:



Εικόνα 35: Σύγκριση χρωματογραφημάτων τυφλών δειγμάτων των μεθόδων 4.2.2 και 4.2.3

Λόγω αυτής της ομοιότητας, αναμένουμε ότι μετά τον έλεγχο της πιθανής ταύτισης χρόνων έκλουσης στο χρωματογράφημα του τυφλού δείγματος και του διαλύματος RRF, και μετά τη σύγκριση της αναλογίας των 5 κορυφών m/z που έχουμε ορίσει να παρακολουθούμε στο φάσμα μάζας

κάθε μέλους στο διάλυμα RRF με την αντίστοιχη αναλογία στο τυφλό δείγμα, μόνο τα μέλη BDE-47 και BDE-99 θα υπάρχουν στα τυφλά δείγματα. Μάλιστα, τα φάσματα μάζας των μελών αυτών (με εφαρμογή της μεθόδου SIM) παρουσιάζονται στο παράρτημα A-1. Ωστόσο, λόγω αυτής της ομοιότητας, δεν κρίθηκε αναγκαίος ο έλεγχος ταύτισης όλων των θραυσμάτων κάθε μέλους σ' ένα διάλυμα RRF και σ' ένα τυφλό δείγμα μετά από Full Scan, λαμβάνοντας υπόψη και ότι ο συγκεκριμένος έλεγχος δεν ήταν τελικά χρήσιμος στην περίπτωση μας.

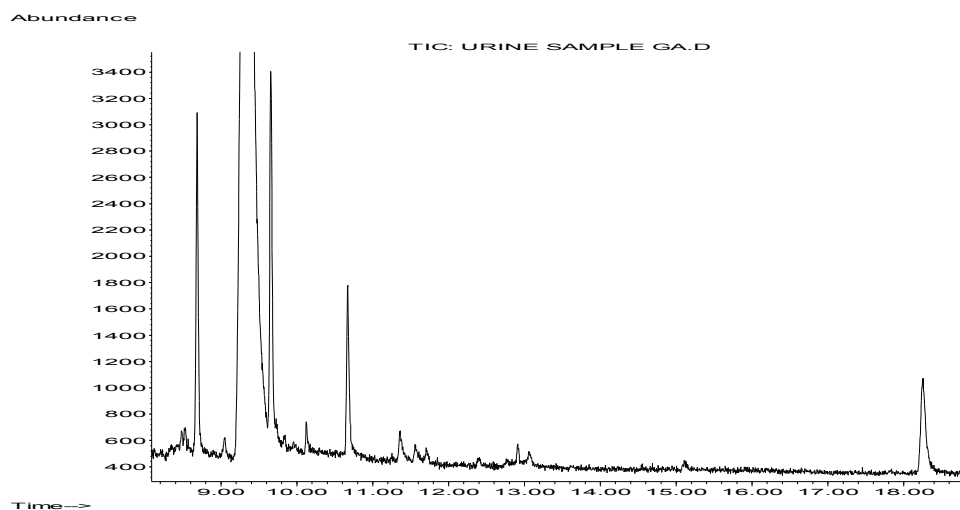
Μετά από όλα αυτά, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει η ποσοτικοποίηση των μελών BDE-47 και BDE-99 στα τυφλά δείγματα, με βάση τον τρόπο που περιγράψαμε στην ενότητα 3.5.2.2. Τα αποτελέσματα που λάβαμε παρουσιάζονται στον Πίνακα 26:

Πίνακας 26: ποσότητες των μελών PBDEs στα τυφλά δείγματα της μεθόδου 4.2.3

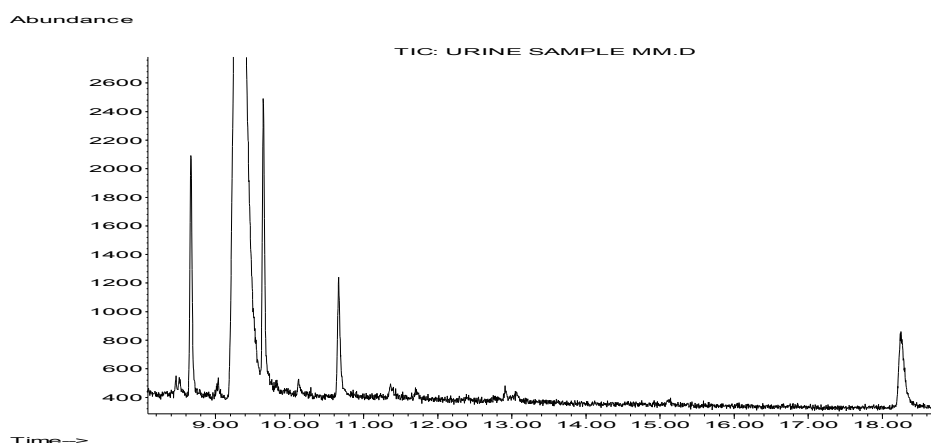
#blank	BDE-47 (pgr)	BDE-99 (pgr)	#blank	BDE-47 (pgr)	BDE-99 (pgr)
<i>blank01</i>	13,8	3,7	<i>blank07</i>	10,7	3,5
<i>blank02</i>	19	4,4	<i>blank08</i>	4,4	2,0
<i>blank03</i>	6,1	4,4			
<i>blank05</i>	5	5,4			
<i>blank06</i>	13	4,7	<i>mean blanks</i>	10,3±5,4 pgr	4,0±1,1 pgr

4.2.3.2. Ανάλυση αγνώστων δειγμάτων (samples):

Για να είμαστε σίγουροι ότι η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των ουδέτερων PBDEs στα ανθρώπινα ούρα, αναλύσαμε 2 πιθανώς εκτεθειμένα δείγματα ούρων (εξαιτίας της συχνής ενασχόλησης αυτών των ατόμων με σχετικά standards). Τα δείγματα αυτά έδωσαν παρόμοια χρωματογραφήματα μεταξύ τους, τα οποία με τη σειρά τους ήταν εντελώς παρόμοια και με τα χρωματογραφήματα των τυφλών δειγμάτων. Ακολούθως παρουσιάζονται και τα δύο.



Εικόνα 36(α): Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα αγνώστου δείγματος της μεθόδου 4.2.3 (ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL)



Εικόνα 36(β): Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα αγνώστου δείγματος της μεθόδου 4.2.3 (ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL)

4.2.3.3. Προσδιορισμός των ανακτήσεων (recoveries):

Προκειμένου να υπολογιστεί πάλι η ακρίβεια της μεθόδου εκφρασμένη σε ποσοστό ανάκτησης, κρίθηκε αναγκαίος ο εμβολιασμός (spike) 30 μl του προτύπου ανάκτησης σε 3 διαφορετικά τυφλά δείγματα που φυσικά περιείχαν 5 ml υπερκάθαρου νερού έκαστο. Ακολούθως, η όλη διαδικασία απομόνωσης των ιχνηθετημένων μελών ήταν ακριβώς η ίδια με αυτή για την ανάλυση των αγνώστων δειγμάτων. Τέλος, η εύρεση του ποσοστού ανάκτησης έγινε όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.7.1.2. Βέβαια, για τα μέλη που περιέχονται εσ'

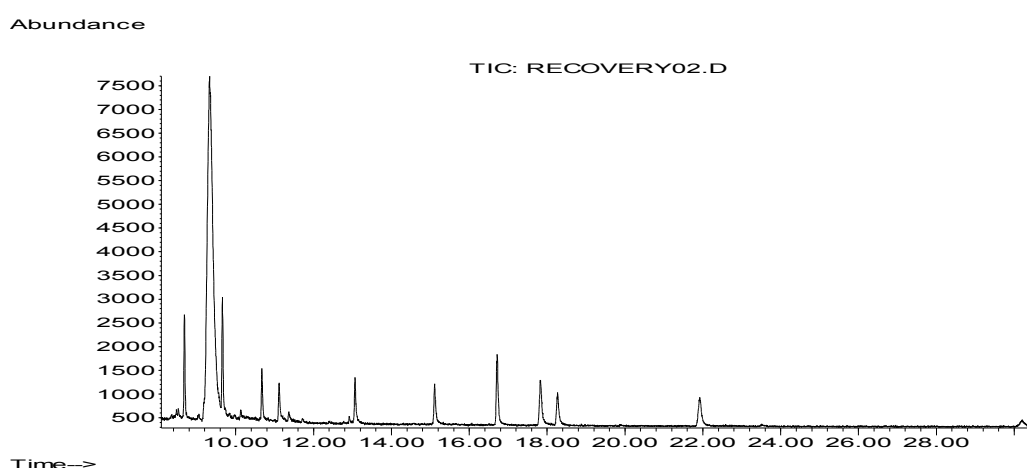
αρχής στα τυφλά δείγματα, η σχέση που χρησιμοποιείται στον υπολογισμό της %ανάκτησης πρέπει να μετατραπεί στη σχέση που καταγράφεται στην ενότητα 4.2.2.4.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για την %ανάκτηση των ιχνηθετημένων μελών του προτύπου ανάκτησης στα 3 τυφλά δείγματα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 27:

Πίνακας 27: %ανάκτηση των μελών PBDEs στη μέθοδο 4.2.3

Μέλος PBDE	Recovery02(%)	Recovery05(%)	Recovery06(%)	Mean Recovery(%)
BDE-15	---	---	---	---
BDE-28	97,8	91,3	97,5	95,5±3,6
BDE-47	74,3	67,9	77,6	73,3±5,0
BDE-99	89,4	78,0	89,5	85,6±6,6
BDE-153	97,2	81,6	97,6	92,1±9,1
BDE-154	92,5	81,0	97,0	90,2±8,3
BDE-183	88,5	77,0	90,6	85,4±7,3
BDE-197	90,0	77,7	90,4	86,0±7,2

Στην Εικόνα 37 που ακολουθεί, παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα από τα 3 χρωματογραφήματα που προέκυψε από την ανάλυση ενός εμβολιασμένου με πρότυπο ανάκτησης τυφλού δείγματος. Τα άλλα 2 χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα A-3.



Εικόνα 37: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου με πρότυπο ανάκτησης τυφλού δείγματος της μεθόδου 4.2.3

4.2.3.4. Όρια ανίχνευσης της μεθόδου (MDL):

Όπως αναφέραμε, για τον προσδιορισμό της μέγιστης δυνατότητας κάθε μεθόδου να ανιχνεύει ιχνοποσότητες από τους υπό μελέτη αναλύτες, είναι απαραίτητη η ανάλυση τριών τυφλών δειγμάτων και η ποσοτικοποίηση μελών των οποίων γνωρίζουμε την ανάκτηση. Η ακριβής διαδικασία που έπειτα ακολουθείται, είναι αυτή που περιγράφεται στην ενότητα 4.2.2.5.

Με βάση αυτή τη διαδικασία, πρέπει αρχικά να υπολογιστεί το νέο όριο ανίχνευσης του οργάνου (IDL') που παρέχει η συγκεκριμένη μέθοδος. Τα αποτελέσματα για κάθε μέλος παρουσιάζονται στον Πίνακα 28:

Πίνακας 28: Όρια ανίχνευσης του οργάνου που παρέχει η μέθοδος 4.2.3

Μέλος PBDE	Average(blank)	SD	Area(blank)	amount(std) [fgr in 2μl]	Area(std)	IDL' (fgr)
BDE-28	215	172	731	3320	72262	34
BDE-47	8222	4042	20348	3320	64115	1054
BDE-99	4012	1189	7578	3320	76419	329
BDE-154	105	119	461	6639	155400	20
BDE-153	60	19	117	6639	146997	5
BDE-183	129	92	405	6639	111430	24
BDE-197	77	28	160	6639	45372	23

Σαν ένα πρώτο σχόλιο, μπορούμε να πούμε ότι γενικά η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει εξαιρετικά όρια ανίχνευσης, τα οποία όμως αντιστοιχούν σε ποσότητες που δεν μπορεί να ανιχνεύσει το όργανό μας με βάση τη βαθμονόμηση που έχουμε κάνει και η οποία να υπενθυμίσουμε ότι έδωσε τις ακόλουθες τιμές για το IDL:

Πίνακας 29: Σύγκριση των ορίων ανίχνευσης του οργάνου μετά από βαθμονόμηση και μετά από εφαρμογή της μεθόδου 4.2.3

Μέλος PBDE	IDL (fgr)	IDL' (fgr)
BDE-28	91	34
BDE-47	83	1054
BDE-99	128	329
BDE-154	126	20
BDE-153	179	5
BDE-183	300	24
BDE-197	714	23

Όπως είναι αναμενόμενο, για τα μέλη BDE-47 και BDE-99 που προϋπάρχουν στα τυφλά δείγματα, η τιμή του IDL' είναι υψηλότερη. Ωστόσο, είναι περίεργο που αυτή τη φορά η τιμή για το IDL' είναι υψηλότερη για το μέλος BDE-47 σε σχέση με αυτή για το μέλος BDE-99 (μάλλον λόγω της υψηλής τιμής της τυπικής απόκλισης που προέκυψε για το μέλος BDE-47). Μάλιστα, είναι επίσης αξιοσημείωτο το ότι η τιμή αυτή για το μέλος BDE-99 δεν ξεπερνά το αντίστοιχο όριο ποσοτικοποίησης του οργάνου (427 fgr).

Όμως, αναφέραμε ότι αυτές οι τιμές για το IDL', δεν αντιπροσωπεύουν τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (MDL). Για να υπολογίσουμε αυτή τη τιμή, απλά ακολουθούμε αντίστροφα τη συνολική διαδικασία που εφαρμόσαμε. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν αναπαριστώνται στον Πίνακα 30:

Πίνακας 30: Όρια ανίχνευσης της μεθόδου 4.2.3 εκφρασμένα σε MDL

<i>PBDE-congener</i>	<i>IDL' (fgr)</i>	<i>Concentration in 2μl injection (fgr/μl)</i>	<i>Amount in ~40μl in vial (fgr)</i>	<i>%recovery</i>	<i>real amount in 40μl (fgr)</i>	<i>Concentration in 5ml urine (fgr/ml)</i>	<i>Concentration in 5ml urine (pgr/ml)</i>
<i>BDE-28</i>	34	17	672	95,5	704	141	0,141
<i>BDE-47</i>	1054	527	21074	73,3	28750	5750	5,750
<i>BDE-99</i>	329	165	6584	85,6	7692	1538	1,538
<i>BDE-154</i>	20	10	393	90,2	436	87	0,087
<i>BDE-153</i>	5	3	106	92,1	115	23	0,023
<i>BDE-183</i>	24	12	483	85,4	565	113	0,113
<i>BDE-197</i>	23	12	468	86	545	109	0,109

Οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στη τελευταία στήλη αυτού του πίνακα, αντιστοιχούν στις τιμές MDL της μεθόδου. Βέβαια, καταλαβαίνουμε πάλι ότι με βάση τα πραγματικά όρια ανίχνευσης του οργάνου, οι πραγματικά ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις των μελών αυτών στα ούρα αναμένεται να είναι κάπως μεγαλύτερες από τα MDL που παρουσιάστηκαν, εκτός όμως από τις περιπτώσεις των μελών BDE-47 και BDE-99. Συγκεκριμένα:

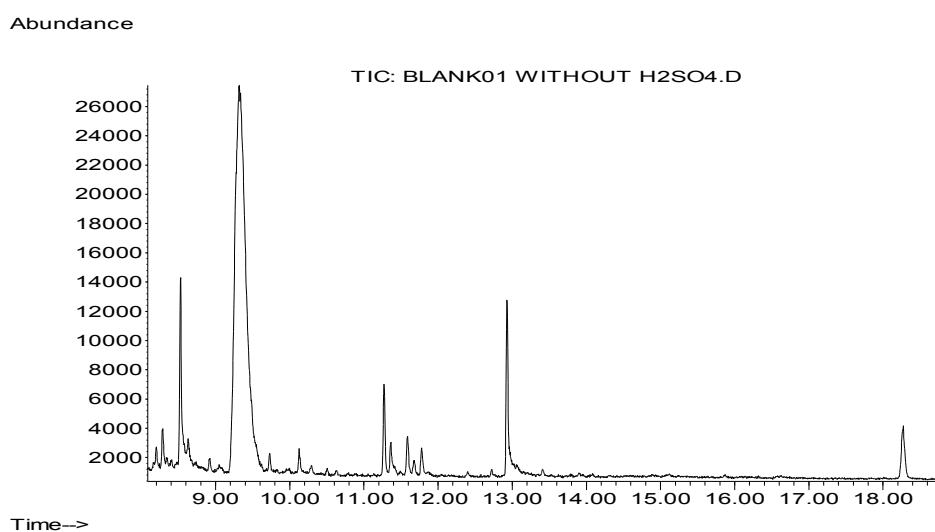
Πίνακας 31: Όρια ανίχνευσης του οργάνου εκφρασμένα σε MDL της μεθόδου 4.2.3

Μέλος PBDE	IDL (fgr)	Concentration in 5ml urine (pgt/ml)	Μέλος PBDE	IDL (fgr)	Concentration in 5ml urine (pgt/ml)
BDE-28	91	0,381	BDE-153	179	0,777
BDE-47	83	0,453	BDE-183	300	1,405
BDE-99	128	0,598	BDE-197	714	3,321
BDE-154	126	0,559			

4.2.3.5. Τροποποίηση της αναλυτικής διαδικασίας:

Προκειμένου πάλι να ελέγξουμε εάν είναι αναγκαία η προσθήκη του π. H_2SO_4 στη διαδικασία, και εάν παραβλέποντας αυτό το στάδιο μπορούμε να λάβουμε καλύτερα χρωματογραφήματα για τα δείγματα, αντικαταστήσαμε την απαιτούμενη κατεργασία με π. H_2SO_4 και τη μικροστήλη της εκχυλισμένης όξινης silica, με μια μικροστήλη που περιείχε εκχυλισμένο Na_2SO_4 , όπως ακριβώς περιγράφεται στην ενότητα 4.2.1.3.A.

Κάνοντας αυτήν την αλλαγή, αναλύσαμε 2 τυφλά δείγματα. Οι αναλύσεις αυτές έδωσαν το εξής χαρακτηριστικό χρωματογράφημα:



Εικόνα 38: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος της τροποποιημένης μεθόδου 4.2.3

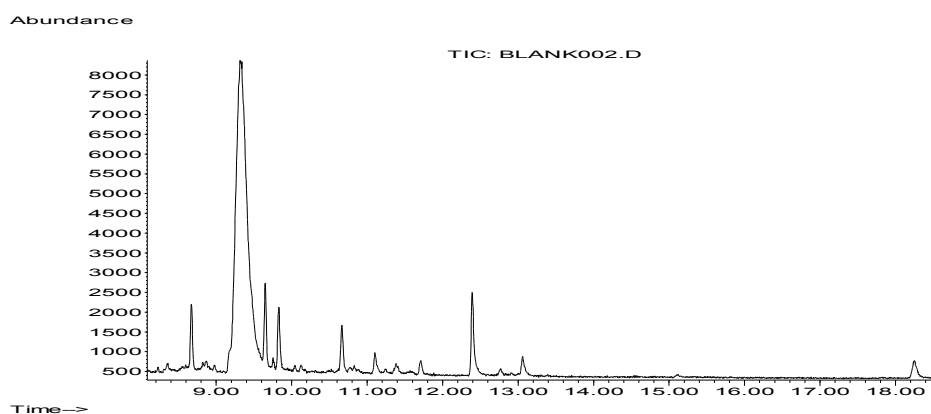
Με βάση αυτό το χρωματογράφημα, παρατηρούμε ότι με την απουσία του π. H_2SO_4 εμφανίζεται μια οξεία κορυφή στην περιοχή των 13^{ων} λεπτών η οποία δεν εμφανίζεται παρουσία αυτού, και η οποία δυσκολεύει την ποσοτικοποίηση του μέλους BDE-47, όπως στην περίπτωση της αντίστοιχης

τροποποιημένης μεθόδου 4.2.2.6. Το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο βάσει της γενικότερης ομοιότητας των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων μεταξύ των μεθόδων 4.2.2. και 4.2.3. Για το λόγο αυτό, η ανάλυση μόνο 2 τυφλών δειγμάτων της τροποποιημένης μεθόδου θεωρήθηκε αρκετή (το 2^ο χρωματογράφημα βρίσκεται στο παράρτημα A-1). Τέλος, το χρωματογράφημα αυτής της τροποποίησης είναι πιο «βρώμικο» σε σχέση με το αντίστοιχο παρουσία π. H₂SO₄, αφού παρουσιάζει επιπλέον κορυφές στην περιοχή των 11 λεπτών. Για όλους αυτούς τους λόγους, η συγκεκριμένη πορεία δε θεωρήθηκε κατάλληλη για τις αναλύσεις των αγνώστων δειγμάτων.

4.2.4. Μέθοδος βασισμένη στην προσθήκη φορμικού οξέος για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών:

Η τελευταία δοκιμή που κάναμε για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, περιελάμβανε την προσθήκη 10 ml φορμικού οξέος. Η διαδικασία και οι ποσότητες των διαλυτών που χρησιμοποιήσαμε, ήταν ακριβώς οι ίδιες με αυτές που περιγράφονται στην ενότητα 4.2.2.1. με τη χρήση 10 ml μεθανόλης.

Για το σκοπό της ανάλυσης των τυφλών δειγμάτων αυτής της διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν 10 ml υπερκάθαρου νερού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές και έδωσε το ακόλουθο χρωματογράφημα:



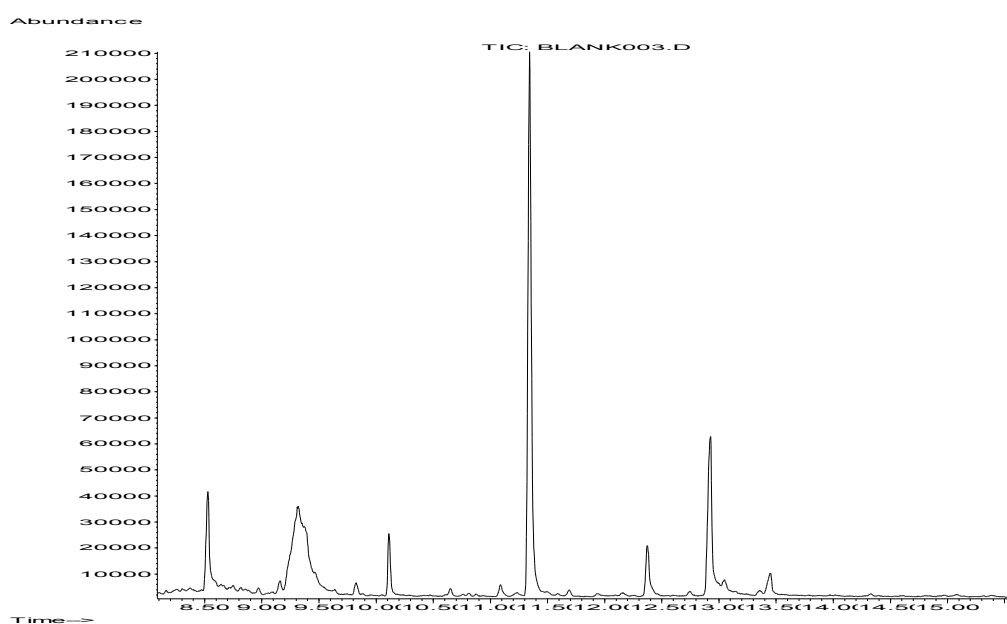
Εικόνα 39: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα τυφλού δειγματος της μεθόδου 4.2.4

Το δεύτερο χρωματογράφημα παρουσιάζεται στο παράρτημα A-1. Το συγκεκριμένο χρωματογράφημα παρατηρούμε ότι είναι πιο «βρώμικο» σε σχέση με τα αντίστοιχα των μεθόδων 4.2.2. και 4.2.3. αφού παρουσιάζει αρκετές επιπλέον κορυφές. Ακόμη και η κορυφή που εμφανίζεται στα 13,07

λειπτά και θα μπορούσε να ανήκει στο μέλος BDE-47, είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση με αυτήν στις 2 προηγούμενες μεθόδους, γεγονός που υποδεικνύει μεγαλύτερη επιμόλυνση από τα τυφλά δείγματα. Για αυτούς τους λόγους, η συγκεκριμένη εναλλακτική πορεία δε θεωρήθηκε κατάλληλη για τις αναλύσεις των αγνώστων δειγμάτων.

Ωστόσο, δοκιμάσαμε να αγνοήσουμε την προσθήκη του π. H_2SO_4 στη διαδικασία, για να ελέγξουμε εάν παραβλέποντας αυτό το στάδιο μπορούμε να λάβουμε καλύτερα χρωματογραφήματα για τα δείγματα. Έτσι, αντικαταστήσαμε την απαιτούμενη κατεργασία με π. H_2SO_4 και τη μικροστήλη της εκχυλισμένης όξινης silica, με μια μικροστήλη που περιείχε εκχυλισμένο Na_2SO_4 , όπως ακριβώς περιγράφεται στην ενότητα 4.2.1.3.A.

Κάνοντας αυτήν την αλλαγή, αναλύσαμε ένα τυφλό δείγμα το οποίο έδωσε το εξής χρωματογράφημα:



Εικόνα 40: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος της τροποποιημένης μεθόδου 4.2.4

Όπως αναμέναμε, αυτό το χρωματογράφημα είναι ακόμα χειρότερο απ' το προηγούμενο, αφού παρουσιάζει επιπλέον μια πολύ οξεία κορυφή λίγο μετά τα 11 λεπτά. Για το λόγο αυτό, ούτε η συγκεκριμένη εναλλακτική πορεία θεωρήθηκε κατάλληλη για τις αναλύσεις των αγνώστων δειγμάτων.

4.3. Τελική επιλογή μεθόδου για τον προσδιορισμό μη-μεταβολισμένων PBDEs σε ανθρώπινα ούρα και η εφαρμογή της:

Με βάση όλες τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στην ενότητα 4.2. για την εύρεση μιας κατάλληλης μεθόδου για τον προσδιορισμό μη μεταβολισμένων PBDEs σε ανθρώπινα ούρα, συμπεραίνουμε ότι οι δύο καταλληλότερες μέθοδοι είναι οι 4.2.2. και 4.2.3. Η σύγκριση των τιμών των ποσοτήτων των PBDEs στα τυφλά δείγματα, των ανακτήσεων και των ορίων ανίχνευσης αυτών των δύο μεθόδων, θα οδηγήσει τελικά στην ορθή επιλογή για την πιο επιτυχή μέθοδο για το σκοπό των συγκεκριμένων αναλύσεων.

Συγκρίνοντας αυτές τις δύο μεθόδους, παρατηρούμε καταρχήν ότι οι ποσότητες των μελών PBDEs που υπάρχουν στα τυφλά δείγματα αυτών των μεθόδων, βρίσκονται ουσιαστικά στα ίδια επίπεδα. Αυτό φαίνεται και στον Πίνακα 32:

Πίνακας 32: Σύγκριση τυφλών δειγμάτων των μεθόδων 4.2.2 και 4.2.3

	BDE-47	BDE-99	Αριθμός επαναλήψεων
Μέθοδος 4.2.2.	9,0±3,6 pgr	4,6±2,5 pgr	n=8
Μέθοδος 4.2.3.	10,3±5,4 pgr	4,0±1,1 pgr	n=7

Το γεγονός μας οδηγεί αμέσως στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος 4.2.2. είναι καταλληλότερη, διότι οι ποσότητες αυτές βρίσκονται σε 10 ml τυφλού δείγματος, ενώ οι αντίστοιχες ποσότητες της μεθόδου 4.2.3. βρίσκονται σε 5 ml τυφλού δείγματος, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στη δεύτερη περίπτωση.

Σε ότι αφορά τις μέσες τιμές των ανακτήσεων των δύο μεθόδων, μπορούμε να πούμε ότι σε γενικές γραμμές είναι παρόμοιες. Βέβαια, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 33, η μέθοδος 4.2.3. παρόλο που παρέχει ελαφρώς καλύτερες ανακτήσεις για τα μέλη με πάνω από 6 άτομα βρωμίου, υστερεί σε ακρίβεια για τα μέλη BDE-47 και BDE-99, τα οποία είναι και αυτά που

ουσιαστικά μας ενδιαφέρουν. Επίσης, εκφράζοντας τα αποτελέσματα των ανακτήσεων κάθε μεθόδου σε %RSD, παρατηρούμε ότι η μέθοδος 4.2.3. παρουσιάζει και μικρότερη επαναληψιμότητα (μεγαλύτερες τιμές %RSD).

Πίνακας 33: Σύγκριση των ανακτήσεων των μεθόδων 4.2.2 και 4.2.3

<i>Μέλος PBDE</i>	<i>Μέθοδος 4.2.2.</i>		<i>Μέθοδος 4.2.3.</i>	
	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
BDE-15	---	---	---	---
BDE-28	95,9±3,9	4,1	95,5±3,6	3,8
BDE-47	95,1±4,0	4,2	73,3±5,0	6,8
BDE-99	87,7±2,3	2,6	85,6±6,6	7,7
BDE-153	89,4±1,3	1,5	92,1±9,1	9,9
BDE-154	87,2±3,9	4,5	90,2±8,3	9,2
BDE-183	82,7±1,7	2,1	85,4±7,3	8,5
BDE-197	86,5±1,5	1,7	86,0±7,2	8,4

Τέλος, συγκρίνοντας τα όρια ανίχνευσης των δύο μεθόδων, εκφρασμένα τόσο σε όρια ανίχνευσης του οργάνου όσο και σε όρια ανίχνευσης κάθε μεθόδου, η μέθοδος 4.2.2. πλεονεκτεί, καθώς παρουσιάζει μικρότερα όρια ανίχνευσης και στις δύο περιπτώσεις.

Ωστόσο, η σύγκριση αυτή είναι ενδεικτική και βασίζεται ουσιαστικά μόνο στα μέλη BDE-47 και BDE-99, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 34, διότι για τα περισσότερα μέλη PBDEs, οι τιμές των ορίων αυτών είναι προδικασμένες βάσει της αναλυτικής ικανότητας του χρησιμοποιούμενου αναλυτικού συστήματος. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις μη αναμενόμενες μεγαλύτερες τιμές ορίων ανίχνευσης για το μέλος BDE-47 σε σχέση με το μέλος BDE-99 που παρέχει η μέθοδος 4.2.3., δίνουν στη μέθοδο 4.2.2. σημαντικό πλεονέκτημα.

Πίνακας 34: Σύγκριση των ορίων ανίχνευσης των μεθόδων 4.2.2 και 4.2.3

<i>PBDE- congener</i>	<i>Μέθοδος 4.2.2.</i>		<i>Μέθοδος 4.2.3.</i>	
	<i>IDL (fgr)</i>	<i>Concentration in 10ml urine (pgr/ml)</i>	<i>IDL (fgr)</i>	<i>Concentration in 5ml urine (pgr/ml)</i>
<i>BDE-28</i>	91	0,190	91	0,190
<i>BDE-47</i>	546	1,148	1054	5,750
<i>BDE-99</i>	658	1,500	329	1,538
<i>BDE-154</i>	126	0,289	126	0,289
<i>BDE-153</i>	179	0,400	179	0,400
<i>BDE-183</i>	300	0,726	300	0,726
<i>BDE-197</i>	714	1,651	714	1,651

Με βάση όλα τα παραπάνω, είναι ξεκάθαρο ότι η καταλληλότερη μέθοδος για τις αναλύσεις μας είναι η μέθοδος 4.2.2., η οποία χρησιμοποιεί 10 ml μεθανόλης για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στα ούρα.

Με βάση αυτή τη μέθοδο για τον προσδιορισμό των ουδέτερων PBDEs στα ανθρώπινα ούρα, σε πρώτη φάση αναλύσαμε 7 από τα δείγματα που παραλάβαμε στην πρώτη δειγματοληψία (Μάρτιος 2010). Έπειτα, αναλύσαμε άλλα 9 από τα δείγματα που παραλάβαμε στη δεύτερη δειγματοληψία (Οκτώβριος 2010). Σε κανένα δείγμα δεν βρέθηκε κάποιο άλλο μέλος των PBDEs πέρα των μελών BDE-47 και BDE-99, ασχέτως επαγγέλματος, ηλικίας και φύλου κάθε δότη. Μάλιστα, οι ποσότητες των μελών αυτών βρέθηκαν στα επίπεδα των τυφλών δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκεντρωμένα στον Πίνακα 35:

Πίνακας 35: Ανιχνεύσιμες ποσότητες μελών PBDEs σε ανθρώπινα ούρα

Δείγμα	Ανιχνεύσιμες ποσότητες	
	BDE-47 (pgr)	BDE-99 (pgr)
#1	11,9	2,2
#2	9,1	2,7
#3	4,2	2,7
#4	8,4	2,4
#5	8,3	3,2
#6	13,4	3,5
#7	9,3	3,4
#8	9,5	2,7
#9	3,4	1,2
#10	12,9	1,6
#11	12,8	1,4
#12	8,3	1,5
#13	12,3	1,2
#14	12,9	2,2
#15	8,5	2,4
#16	5,6	2,3
Μέση τιμή δειγμάτων ούρων	9,4±3,1	2,3±0,7
Μέση τιμή τυφλών δειγμάτων	9,0±3,6	4,6±2,5

Η γραμμή στη μέση αυτού του πίνακα, υποδηλώνει αλλαγή δειγματοληψίας. Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της ποσότητας του μέλους BDE-99 στη δεύτερη δειγματοληψία είναι πολύ χαμηλά, χαμηλότερα και από τα αντίστοιχα επίπεδα στα τυφλά δείγματα. Αυτό μάλλον οφείλεται στην σχάση της αντίστοιχης κορυφής που για άγνωστο λόγο προέκυψε στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα και η οποία περιόρισε την ολοκλήρωσή της. Όλα τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων παρουσιάζονται στο παράρτημα A-2.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Όλα τα δείγματα ούρων φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -30 °C, αμέσως μετά τη συλλογή τους.

Για να επιβεβαιώσουμε τέλος, ότι αυτή η μέθοδος όντως μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ποσοτικοποίηση μελών PBDEs στην περίπτωση που αυτά εμφανιστούν σε ανθρώπινα ούρα, σε ένα εύλογο εύρος συγκεντρώσεων, κάναμε εμβολιασμό (spiking) διαφόρων προτύπων διαλυμάτων (δηλαδή διαφόρων συγκεντρώσεων) φυσικών μελών PBDEs, σε ένα τυχαίο αλλά ίδιο κάθε φορά δείγμα ούρων της δεύτερης δειγματοληψίας.

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε προέρχονται από το γνωστό stock διάλυμα με τα 23 φυσικά μέλη PBDEs, χωρίς όμως την προσθήκη του εσωτερικού προτύπου. Βέβαια, εμείς επικεντρωθήκαμε μόνο στα μέλη των οποίων γνωρίζουμε την ανάκτηση και τα όρια ανίχνευσης. Ο εμβολιασμός ξεκίνησε από μια ποσότητα που να αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου για το μέλος BDE-47 (το οποίο παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή MDL σε σχέση με το μέλος BDE-99 που επίσης υπάρχει στα τυφλά δείγματα), δηλαδή στη συγκέντρωση ~1,1 pgr/ml ούρων. Αυξάνοντας σταδιακά τις ποσότητες που εμβολιάζαμε, φτάσαμε μέχρι τη συγκέντρωση ~1,5 ngr/ml ούρων για το συγκεκριμένο μέλος. Συνολικά, έγινε ο εμβολιασμός 7 προτύπων διαλυμάτων.

Οι ποσότητες των 7 μελών PBDEs που σταδιακά εμβολιάσαμε σε 10 ml του ίδιου δείγματος ούρων, καταγράφονται στον Πίνακα 36:

Πίνακας 36: Ποσότητες προτύπων διαλυμάτων PBDEs που εμβολιάστηκαν σε δείγμα ούρων για έλεγχο της εφαρμογής της μεθόδου 4.2.2

	<i>Spike1</i>	<i>Spike2</i>	<i>Spike3</i>	<i>Spike4</i>	<i>Spike5</i>	<i>Spike6</i>	<i>Spike7</i>
<i>BDE-28</i>	8,2 pgr	91,6 pgr	471 pgr	2178 pgr	5940 pgr	9306 pgr	17721 pgr
<i>BDE-47</i>	8,2 pgr	91,6 pgr	471 pgr	2178 pgr	5940 pgr	9306 pgr	17721 pgr
<i>BDE-99</i>	8,2 pgr	91,6 pgr	471 pgr	2178 pgr	5940 pgr	9306 pgr	17721 pgr
<i>BDE-154</i>	16,6 pgr	183,1 pgr	942 pgr	4356 pgr	11880 pgr	18612 pgr	35442 pgr
<i>BDE-153</i>	16,6 pgr	183,1 pgr	942 pgr	4356 pgr	11880 pgr	18612 pgr	35442 pgr
<i>BDE-183</i>	16,6 pgr	183,1 pgr	942 pgr	4356 pgr	11880 pgr	18612 pgr	35442 pgr
<i>BDE-197</i>	16,6 pgr	183,1 pgr	942 pgr	4356 pgr	11880 pgr	18612 pgr	35442 pgr

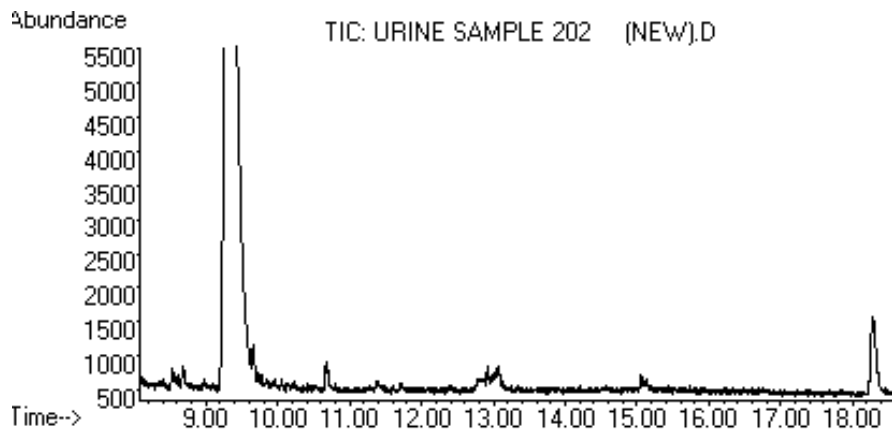
Έπειτα, οι ποσότητες αυτών των μελών PBDEs που ανιχνεύτηκαν μετά τον εμβολιασμό, καταγράφονται στον Πίνακα 37:

Πίνακας 37: Ποσότητες μελών PBDEs που ανιχνεύτηκαν μετά από εμβολιασμό δείγματος ούρων για έλεγχο της εφαρμογής της μεθόδου 4.2.2

	<i>Spike1</i>	<i>Spike2</i>	<i>Spike3</i>	<i>Spike4</i>	<i>Spike5</i>	<i>Spike6</i>	<i>Spike7</i>
<i>BDE-28</i>	8,0 pgr	89,4 pgr	421 pgr	1816 pgr	5130 pgr	8493 pgr	16498 pgr
<i>BDE-47</i>	16,2 pgr	104,0 pgr	412 pgr	1942 pgr	5432 pgr	8682 pgr	16736 pgr
<i>BDE-99</i>	18,0 pgr	86,3 pgr	365 pgr	1631 pgr	4974 pgr	7796 pgr	----
<i>BDE-154</i>	14,2 pgr	174,9 pgr	850 pgr	3375 pgr	10029 pgr	15774 pgr	26978 pgr
<i>BDE-153</i>	16,3 pgr	157,8 pgr	847 pgr	3228 pgr	9499 pgr	14769 pgr	26541 pgr
<i>BDE-183</i>	12,7 pgr	152,8 pgr	798 pgr	3290 pgr	9765 pgr	15092 pgr	28837 pgr
<i>BDE-197</i>	14,0 pgr	152,8 pgr	782 pgr	3459 pgr	10701 pgr	16032 pgr	29712 pgr

Παρατηρούμε, ότι γενικά οι ποσότητες που ανιχνεύονται μετά τον κάθε εμβολιασμό είναι αρκετά κοντά στις αρχικές, με ανακτήσεις πολύ κοντά στις αναμενόμενες για τη συγκεκριμένη μέθοδο. Βέβαια, στις χαμηλά εμβολιαζόμενες ποσότητες, όπου η επιμόλυνση των μελών BDE-47 και BDE-99 από τα τυφλά δείγματα είναι εντονότερη, οι αντίστοιχες ανακτήσεις μπορεί να ξεπεράσουν το 100%.

Επίσης, για να είμαστε σίγουροι ότι το δείγμα ούρων που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό παρουσιάζει τις αναμενόμενες ποσότητες για τα δύο αυτά μέλη (στην περιοχή των τυφλών δειγμάτων), αλλά και για να επιβεβαιώσουμε ότι το υπόβαθρο του δείγματος αυτού ήταν όμοιο με το αρχικό του, αναλύσαμε ξανά το συγκεκριμένο δείγμα. Το δείγμα αυτό ήταν εκείνο με τον αριθμό #10, το νέο χρωματογράφημα του οποίου παρουσιάζεται αμέσως τώρα:

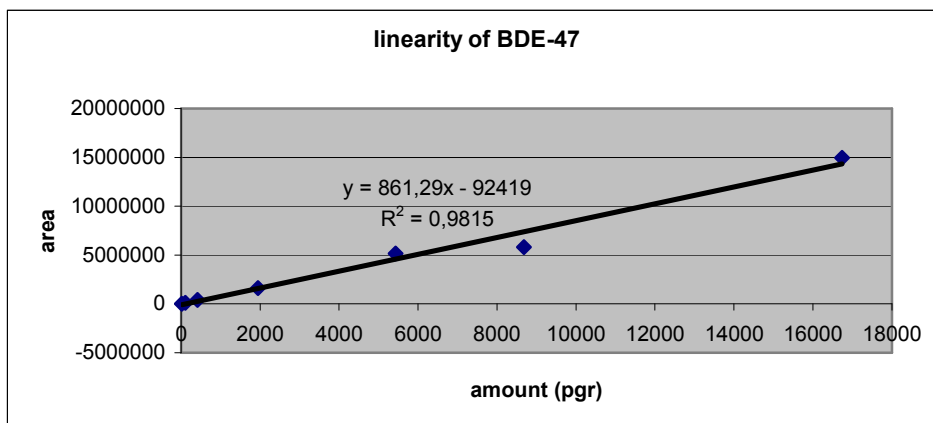


Εικόνα 41: Χρωματογράφημα της μεθόδου 4.2.2 που χρησιμοποιήθηκε ως υπόβαθρο για τον εμβολιασμό προτύπων διαλυμάτων PBDEs

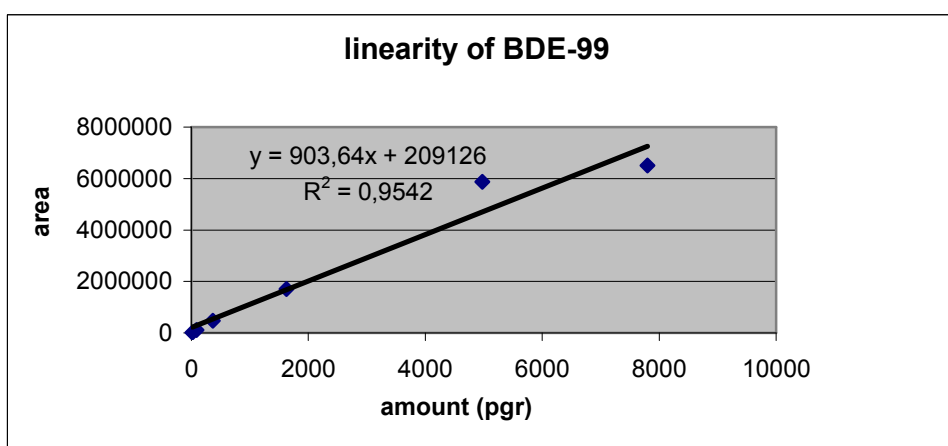
Το χρωματογράφημα αυτό είναι εντελώς αντίστοιχο με το αρχικό χρωματογράφημα για το συγκεκριμένο δείγμα (βλ. παράρτημα Α-2). Τα υπόλοιπα 7 χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά τον εμβολιασμό των διαφόρων προτύπων διαλυμάτων φυσικών μελών PBDEs στο συγκεκριμένο δείγμα ούρων, παρουσιάζονται στο παράρτημα Α-4.

Τέλος, μέσα από αυτή τη διαδικασία ελέγχου της εφαρμογής της μεθόδου 4.2.2. σε πραγματικό δείγμα, είναι δυνατή και η εύρεση της γραμμικότητας των μελών PBDEs που ποσοτικοποιήθηκαν. Με αυτό τον τρόπο, θα φανεί και κατά πόσο η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει καλή γραμμικότητα στη μεγάλη κλίμακα συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε.

Έχουμε αναφέρει ότι η εύρεση της γραμμικότητας βασίζεται στην κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης για το κάθε μέλος. Η καμπύλη αυτή (της μορφής $y=ax+b$) κατασκευάζεται βάσει του εμβαδού ολοκλήρωσης κάθε κορυφής (area) σε συνάρτηση με την ποσότητα (σε μg) κάθε μέλους σε καθένα από τα επτά εμβολιασμένα δείγματα. Ενδεικτικά, ακολούθως παρουσιάζουμε τις καμπύλες βαθμονόμησης για τα μέλη BDE-47 και BDE-99.



Εικόνα 42(α): Γραμμικότητα του μέλους BDE-47 βάσει της μεθόδου 4.2.2



Εικόνα 42(β): Γραμμικότητα του μέλους BDE-99 βάσει της μεθόδου 4.2.2

Οι υπόλοιπες 5 καμπύλες βαθμονόμησης παρουσιάζονται στο παράρτημα Α-4. Παρατηρούμε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει πολύ καλή γραμμικότητα ως προς τους μη μεταβολισμένους PBDEs, καθώς ο συντελεστής παλινδρόμησης (R^2) για όλα τα μέλη που μελετήσαμε είναι $>0,95$. Το γεγονός υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα συγκεντρώσεων μη μεταβολισμένων PBDEs.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η εφαρμογή της υγρής-υγρής εκχύλισης παρουσία μεθανολής για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στα ούρα, σε συνδυασμό με ένα σύστημα χρωματογραφικού διαχωρισμού και ανίχνευσης που λειτουργεί με αρνητικό χημικό ιοντισμό, αποδείχθηκε μια μέθοδος ικανή να προσδιορίσει μη-μεταβολισμένους PBDEs στην περίπτωση που αυτοί εμφανιστούν σε ανθρώπινα ούρα.

Όμως, μετά την ανάλυση κάποιων ανθρώπινων δειγμάτων, καταλήξαμε στο ότι είναι σπάνια η ανίχνευση μη-μεταβολισμένων PBDEs σε αυτά. Ακόμη και τα δύο μέλη που καταφέραμε να ανιχνεύσουμε με τη συγκεκριμένη μέθοδο, βρέθηκαν σε επίπεδα αντίστοιχα των τυφλών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή της ποσότητας του μέλους BDE-47 στα πραγματικά δείγματα βρέθηκε ίση με $9,4 \pm 3,1$ pgr, ενώ η αντιστοιχή τιμή του στα τυφλά δείγματα ήταν ίση με $9,0 \pm 3,6$ pgr. Αντίστοιχα, η μέση τιμή της ποσότητας του μέλους BDE-99 στα πραγματικά δείγματα βρέθηκε ίση με $2,3 \pm 0,7$ pgr, ενώ η αντιστοιχή τιμή του στα τυφλά δείγματα ήταν ίση με $4,6 \pm 2,5$ pgr. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα αυτά, προέκυψαν από δείγματα ούρων ατόμων διαφόρων ηλικιών και επαγγελμάτων, και από δότες που ανήκουν και στα δύο φύλα.

Ωστόσο, έγινε κατανοητό ότι τόσο το σύστημα GC-MS που εφαρμόστηκε, όσο και η μέθοδος εκχυλίσεων και καθαρισμού των δειγμάτων, παρουσιάζουν εξαιρετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά, παρόλο που ο συνολικά απαιτούμενος χρόνος κάθε ανάλυσης είναι τελικά υψηλός.

Συγκεκριμένα, σε ότι αφορά το σύστημα GC-MS, η ακρίβεια που παρουσιάζει είναι περίπου 98%, ενώ η επαναληψιμότητά του μπορεί να είναι καλύτερη και από 1% (RSD) ακόμα και για διαφορετικές αναλυτικές ημέρες. Επίσης, η αποδοτικότητα της χρωματογραφικής στήλης ξεπερνά τις 10^6 θεωρητικές πλάκες, ενώ η διαχωριστική της ικανότητα είναι τουλάχιστον ίση με 5.0. Τέλος, η σταθερότητα του σήματος του ανιχνευτή είναι καλύτερη από 10% (RSD) μεταξύ διαφορετικών ημερών, ενώ οι καμπύλες βαθμονόμησης

παρουσιάζουν γραμμικότητα καλύτερη από 0,99. Σε ότι αφορά τώρα τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχυλίσεων και καθαρισμού των δειγμάτων, αυτή παρουσιάζει ανακτήσεις που κυμαίνονται στην περιοχή του 83-96%, όρια ανίχνευσης που κυμαίνονται στην περιοχή των 0,190-1,651 pgr/ml ούρων, ενώ η γραμμικότητά της από τις καμπύλες βαθμονόμησης σε μια περιοχή συγκεντρώσεων από 1 pgr/ml έως 1,5 ngr/ml ούρων, μπορεί να είναι καλύτερη και από 0,95.

Σε αυτό το σημείο, κρίνεται σωστό να προταθεί η προσαρμογή της μεθόδου που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την ανίχνευση των PBDEs στο σύστημα GC-MS, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση των υδρόξυ-μεταβολιτών των PBDEs και συγκεκριμένα των μεθυλιωμένων παραγώγων τους στη χρησιμοποιούμενη στήλη DB5-MS. Εναλλακτικά, προτείνεται αλλαγή της χρωματογραφικής στήλης σε μια περισσότερο πολική, αποκλειστικά για το συγκεκριμένο σκοπό. Όλα αυτά, εννοείται ότι προϋποθέτουν την στοχευμένη ανάλυση του υδατικού κλάσματος που παρέχει η μέθοδος εκχυλίσεων και καθαρισμού που προτείναμε, αφού εκεί βρίσκονται οι υδρόξυ-μεταβολίτες των PBDEs.

Η στροφή σε αυτήν την κατεύθυνση, προτείνεται διότι οι ενώσεις αυτές είναι περισσότερο υδατοδιαλυτές σε σχέση με τις μη-μεταβολισμένες, οπότε υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα αυτές να καταλήγουν στα ούρα. Αν υπάρξουν χρήσιμα αποτελέσματα από αυτές τις αναλύσεις, σίγουρα θα ξεκαθαριστεί περισσότερο το τοπίο σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα και την κατανομή στους διάφορους ιστούς, το μεταβολισμό, την απομάκρυνση και γενικά την τύχη των PBDEs στον ανθρώπινο οργανισμό...

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ackerman L. K., Wilson G. R., Simonich S. L., 2005, "Quantitative Analysis of 39 Polybrominated Diphenyl Ethers by Isotope Dilution GC/Low-Resolution MS", *Analytical Chemistry*, 77, 1979-1987

Ahlborg UG, Hakansson H, Waern F, Hanberg A., 1988, "Nordic Dioxin Risk Assessment [in Swedish]", *Miljörapport 7*, Copenhagen, Nordic Council of Ministers, 1988

Alaee M, Arias P, Sjödin A, Bergmand A, 2003, "An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release" *Environment International*, 29, 683- 689

Alaee, M., Luross, J., Sergeant, D.B., Muir, D.C.G., Whittle, D.M., Solomon, K., 1999, "Distribution of polybrominated diphenyl ethers in the Canadian environment", *Organohalogen Compounds*, 40, 347-350

Allchin CR, Law RJ, Morris S., 1999, "Polybrominated diphenylethers in sediments and biota downstream of potential sources in the UK", *Environmental Pollution*, 105, 197- 207

Allchin, C.R., Morris, S., Bennett, M., Law, R.J., Russell, I., 2000, "Polybrominated diphenyl ether residues in cormorant (*Phalacrocorax carbo*) livers from England, UK", *Organohalogen Compounds*, 47, 190-193

Atuma S. S., Aune M., 1999, "Method for the Determination of PCB Congeners and Chlorinated Pesticides in Human Blood Serum", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 8-15

Booij K, Zeagers BN, Boon JP, 2000, "Levels of some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants along the Dutch coast as derived from their accumulation in SPMDs and blue mussels (*Mytilus edulis*)", *Organohalogen Compounds*, 47, 89-92

Branchi I., Capone F., Alleva E., Costa L.G., 2003, "Polybrominated Diphenyl Ethers: Neurobehavioral Effects Following Developmental Exposure", *NeuroToxicology*, 24, 449-462

Brouwer A, Morse DC, Lans MC, Schuur AG, Murk AJ, Klasson-Wehler E, et al., 1998, "Interactions of persistent environmental organohalogens with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health", *Toxicol Ind Health*, 14, 59 - 84

Cai Q. Y., Mo C. H., Wu Q. T., Katsoyiannis A., Zeng Q. Y., 2008, "The status of soil contamination by semivolatile organic chemicals (SVOCs) in China: A review", *Science of the total environment*, 389, 209-224

Cai Z, Jiang G, 2006, "Determination of polybrominated diphenyl ethers in soil from e-waste recycling site", *Talanta*, 70, 88-90

Carlson GP., 1980, "Induction of xenobiotic metabolism in rats by brominated diphenyl ethers", *Toxicology Letters*, 5, 19- 25

Cetin B., Odabasi M., 2005, "Measurement of Henry's law constants of seven polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners as a function of temperature", *Atmospheric Environment*, 39, 5273-5280

Cetin, B., Odabasi, M., 2008, "Atmospheric concentrations and phase partitioning of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Izmir, Turkey", *Chemosphere*, 71, 1067-1078.

Chen G, Konstantinov AD, Chittim BG, Joyce EM, Bols NC, Bunce NJ, 2001, "Synthesis of polybrominated diphenyl ethers and their capacity to induce CYP1A by the Ah receptor mediated pathway", *Environmental Science Technology*, 35, 3749-3756

Covaci A, de Boer J, Ryan JJ, Voorspoels S, Schepens P, 2002, "Distribution of organobrominated and organochlorinated contaminants in Belgian human adipose tissue", *Environ Res*, 88, 210-218

Covaci A., Voorspoels S., De Boer J., 2003, "Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)

in environmental and human samples—a review”, *Environment International*, 29, 735–756

Darnerud, P.O., Atuma, S., Aune, M., Bjerselius, R., Glynn, A., Grawe, K.P., Becker, W., 2006, “Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market basket data”, *Food Chemical Toxicology*, 44, 1597–1606

Darnerud P.O., Atuma S, Aune M, Cnattingius S, Wernroth ML, Wicklund Glynn A, 1998, “Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast-milk from primiparous women in Uppsala country, Sweden”, *Organohalogen Compounds*, 35, 411–414

Darnerud P. A., Eriksen G. S., Jóhannesson T., Larsen P. B., Viluksela M., 2001, “Polybrominated Diphenyl Ethers: Occurrence, Dietary Exposure, and Toxicology”, *Environmental Health Perspectives*, 109, 49–68

De Boer J, van der Horest A, Wester P., 2000a, “PBDEs and PBBs in suspended particulate matter, suspended sediment, sewage treatment plant in- and effluents and biota from the Netherlands”, *Organohalogen Compounds*, 47, 85–88

De Boer J., Wester P. G., Van der Horst A., Leonards P. E. G., 2003, “Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands”, *Environmental Pollution*, 122, 63–74

De Wit C. A., 2002, “An overview of brominated flame retardants in the environment”, *Chemosphere*, 46, 583–624

Dodder, N.G., Strandberg, B., Hites, R.A., 2000, “Concentrations and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers in fish and air from the northeastern United States”, *Organohalogen Compounds*, 47, 69–72

Ebbing D. D., Gammon S. D., 2002, “Γενική Χημεία”, έκτη έκδοση

- Eisenreich S. J., Looney B. B., Thornton J. D., 1981, "Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem", *Environmental science and technology*, 15, 30-38
- El Dareer SM, Kalin JR, Tillery KF, Hill DL, 1987, "Disposition of decabromo-biphenyl ether in rats dosed intravenously or by feeding", *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 22, 405- 15
- Eljarrat E., Barcelo D., 2004, "Sample handling and analysis of brominated flame retardants in soil and sludge samples", *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 10-11
- Eljarrat E., Lacorte S., Barcelo D., 2002, "Optimization of congener-specific analysis of 40 polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography/mass spectrometry", *Journal of mass spectrometry*, 37, 76-84
- Frederiksen M., Vorkamp K., Thomsen M., Knudsen L. E., 2009, "Human internal and external exposure to PBDEs - A review of levels and sources", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212, 109-134
- Geib S., Einax J. W., 2001, "Comparison of detection limits in environmental analysis. is it possible? An approach on quality assurance in the lower working range by verification", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370, 673-678
- Ghosh M, Meerts IATM, Cook A, Bergman A, Brouwer A, Johnson LN, 2000, "Structure of human tranthyretin complexed with bromophnenols: a new mode of binding", *Acta Crystallography, Sect D*, 56, 1085-1095
- Gomara, B., Herrero, L., Gonzalez, M.J., 2006, "Survey of polybrominated diphenyl ether levels in Spanish commercial foodstuffs", *Environmental Science and Technology*, 40, 7541-7547
- Hagenmaier, H., She, J., Benz, T., Dawidowsky, N., Dusterhoft, L., Lindig, C., 1992, "Analysis of sewage sludge for polyhalogenated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and diphenylethers", *Chemosphere*, 25, 1457-1462

- Hagmar L, Bergman A, 2001, "Human exposure to BFRs in Europe", Proceedings of the second international workshop on brominated flame retardants, 14 - 16 May, 2001, Stockholm, Sweden: The Swedish Chemical Society, 107-111
- Hakk H, Huwe JK, Lorentzsen M, 2001, "A mass balance study of a commercial pentabromodiphenyl ether mixture in male Sprague-Dawley rats", *Organohalogen Compounds*, 52, 5- 8
- Hakk H., Larsen G., Klasson-Wehler E., 2002, "Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat", *Xenobiotica*, 32, 369-382
- Hakk H., Letcher R. J., 2003, "Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants – a review", *Environment International*, 29, 801-828
- Hale RC, LaGuardia MJ, Harvey E, Gaylor MO, Mainor TM, Duff WH., 2001, "Flame retardants: persistent pollutants in land-applied sludges. *Nature*", 412, 141-142
- Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Visser TJ, van Velzen MJM, et al., 2008, "Biotransformation of brominated flame retardants into potentially endocrine-disrupting metabolites, with special attention to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)", *Mol Nutr Food Res*, 52, 284-298
- Harrad, S., Wijesekera, R., Hunter, S., Halliwell, C., Baker, R., 2004, "Preliminary assessment of U.K. human dietary and inhalation exposure to polybrominated diphenyl ethers", *Environmental Science and Technology*, 38, 2345-2350
- Hassanin A., Breivik K., Meijer S. N., Steinnes E., Thomas G. O., Jones K. C., 2004, "PBDEs in European Background Soils: Levels and Factors Controlling Their Distribution", *Environmental science and technology*, 38, 738-745
- Hayakawa, K., Takatsuki, H., Watanabe, I., Sakai, S., 2004, "Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polybrominated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans

(PBDD/Fs) and monobromo-polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans (MoBPXDD/Fs) in the atmosphere and bulk deposition in Kyoto, Japan", *Chemosphere*, 57, 343-356

Herzke D, Kallenborn R, Nygard T, Sandanger T., 2001, "Species dependent distribution of polybrominated biphenyls and diphenyl ethers in eggs of Norwegian bird of prey", *The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants*. Stockholm: AB Firmatryck, 321-324

Hovander L., Athanasiadou M., Asplund L., Jensen S., Wehler E.K., 2000, "Extraction and Cleanup Methods for Analysis of Phenolic and Neutral Organohalogenes in Plasma", *Journal of analytical toxicology*, 24, 696-703

Huwe JK, Hakk H, Lorentzsen M, 2002, "A mass balance feeding study of a commercial octabromodiphenyl ether mixture in rats", *Organohalogen Compounds*, 58, 229-232

Hwang H. M., Park E. K., Young T. M., Hammock B. D., 2008, "Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in indoor dust", *Science of the total environment*, 404, 26-35

Hyoetyläinen T, Hartonen K, 2002, "Determination of brominated flame retardants in environmental samples" *trends in analytical chemistry*, 21, 13-30

Ikonomou, M.G., Fischer, M., He, T., Addison, R.F., Smith, T., 2000, "Congener patterns, spatial and temporal trends of polybrominated diphenyl ethers in biota samples from the Canadian west coast and the Northwest Territories", *Organohalogen Compounds*, 47, 77-80.

Ikonomou MG, Rayne S, Addison RF, 2002, "Exponential increase in brominated flame retardants, polybrominated diphenyl ethers in Canadian Arctic from 1981 to 2000", *Environmental Science and Technology*, 36, 1886-1892

Jansson, B., Andersson, R., Asplund, L., Litzen, K., Nylund, K., Sellstrom, U., Uvemo, U.-B., Wahlberg, C., Wideqvist, U., Odsjo, T., Olsson, M., 1993, "Chlorinated and brominated persistent organic compounds in biological

samples from the environment”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 1163–1174

Jones-Otazo, H.A., Clarke, J.P., Diamond, M.L., Archbold, J.A., Ferguson, G., Harner, T., Richardson, G.M., Ryan, J.J., Wilford, B., 2005, “Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs”, *Environmental Science and Technology*, 39, 5121–5130

Kalantzi O. I., Geens T., Covaci A., Siskos P. A., 2010, “Distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other persistent organic pollutants in human serum from Greece”, *Environment International*

Karlsson M., Julander A., Van Bavel B., Hardell L., 2007, “Levels of brominated flame retardants in blood in relation to levels in household air and dust”, *Environment International*, 33, 62–69

Keller J. M., Swarthout R. F., Carlson B. K. R., Yordy J., Guichard A., Schantz M. M., Kucklick J. R., 2009, “Comparison of five extraction methods for measuring PCBs, PBDEs, organochlorine pesticides, and lipid content in serum”, *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 393, 747–760

Kierkegaard, A., Sellström, U., Bignert, A., Olsson, M., Asplund, L., Jansson, B., de Wit, C., 1999b, “Temporal trends of a polybrominated diphenyl ether (PBDE), a methoxylated PBDE and hexabromocyclododecane (HBCD) in Swedish biota”, *Organohalogen Compounds*, 40, 367–370

Kierkegaard A., Sellström U., McLachlan M. S., 2009, “Environmental analysis of higher brominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane”, *Journal of Chromatography A*, 1216, 364–375

Kiviranta, H., Ovaskainen, M.L., Vartiainen, T., 2004, “Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and PBDEs in Finland”, *Environ. Int.*, 30, 923–932

Kruger C., 1988, "Polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers - detection and quantitation in selected foods", Ph.D. Thesis, University of Munster, Germany (in German)

Lacorte S., Ikonomou M. G., 2009, "Occurrence and congener specific profiles of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated derivatives in breast milk from Catalonia", *Chemosphere*, 74, 412-420

Law, R.J., Allchin, C.R., Bennett, M.E., Morris, S., 2000, "Polybrominated diphenyl ethers in the blubber of harbour porpoises (*Phocaena phocaena* L.) stranded on the coasts of England and Wales", *Organohalogen Compounds*, 47, 249-252

Leister D. L., Baker J. E., 1994, "ATMOSPHERIC DEPOSITION OF ORGANIC CONTAMINANTS TO THE CHESAPEAKE BAY", *Atmospheric Environment*, 28, 1499-1520

Leung AOW, Luksemburg WJ, Wong AS, Wong MH, 2007, "Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzop-dioxins and dibenzofurans in soil and combusted residue at Guiyu, an electronic waste recycling site in Southeast China", *Environmental Science and Technology*, 41, 2730-2737

Lind Y, Aune M, Atuma S, Becker W, Bjerselius R, Glynn A, et al., 2002, "Food intake of the brominated flame retardants PBDEs and HBCD in Sweden", *Organohalogen Compounds*, 58, 181-184

Lindström, G., Wingfors, H., Dam, M., van Bavel, B., 1999, "Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic", *Arch. Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 355-363

Lorber, M., 2008, "Exposure of Americans to polybrominated diphenyl ethers", *J. Exp. Science of Environmental Epidemiology*, 18, 2-19

Luckey F, Fowler B, Litten S., 2001, "Establishing baseline levels of polybrominated diphenyl ethers in Lake Ontario surface waters", *Proceedings*

of the second international workshop on brominated flame retardants, 14 - 16 May, 2001, Stockholm, Sweden: The Swedish Chemical Society 2001, 337-339

Luross JM, Alae M, Sergeant DB, Whittle DM, Solomon KR., 2000, "Spatial and temporal distribution of polybrominated diphenyl ethers in lake trout from the Great Lakes", *Organohalogen Compounds*, 47, 73 - 76

Luross JM, Alae M, Sergeant DB, Whittle DM, Solomon KR, Muir DCG., 2002, "Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls in lake trout from the Great lakes", *Chemosphere*, 45, 665-672

Mandalakis M., Atsarou V., Stephanou E. G., 2008, "Airborne PBDEs in specialized occupational settings, houses and outdoor urban areas in Greece", *Environmental Pollution*, 155, 375-382

Mandalakis M., Besis A., Stephanou E. G., 2009, "Particle-size distribution and gas/particle partitioning of atmospheric polybrominated diphenyl ethers in urban areas of Greece", *Environmental Pollution*, 157, 1227-1233

Meerts IATM, van Zanden JJ, Luijckx EAC, van Leeuwen I, Marsh G, Jakobsson E, et al., 2000, "Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro", *Toxicology Science*, 56, 95-104

Meironyte, D., Noren, K., 1999, "Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 58, 329-341

Meneses, M., Wingfors, H., Schumacher, M., Domingo, J.L., Lindstrom, G., van Bavel, B., 1999, "Polybrominated diphenyl ethers detected in human adipose tissue from Spain", *Chemosphere*, 39, 2271-2278

Mörck A, Klasson-Wehler E, 2001, "Metabolism of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in the rat", *Organohalogen Compounds*, 52, 9-12

MSD Agilent 5973, Instrument manual, p. 368-372

Norstrom RJ, Simon M, Moisey J, Wakeford B, Weseloh DVC, 2002, "Geographical distribution (2000) and temporal trends (1981 to 2000) of brominated diphenyl ethers in Great Lakes herring gull eggs", *Environmental Science and Technology*, 36, 4783-4789

Nylund, K., Asplund, L., Jansson, B., Jonsson, P., Litz_en, K., Sellström, U., 1992, "Analysis of some polyhalogenated organic pollutants in sediment and sewage sludge", *Chemosphere*, 24, 1721-1730

Ohta S, Ishizaki D, Nishimura H, Nakano T, Aozasa O, Shimidzu Y, et al., 2002b, "Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meats and levels in human milk of nursing women in Japan", *Chemosphere*, 46, 689-696

Orn U., Klasson-Wehler E., 1998, "Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse", *Xenobiotica*, 28, 199-211

Peters, A.J., Tomy, G.T., Stern, G.A., Asplund, L., Kierkegaard, A., Coleman, P., Jones, K.C., 1999b, "Persistent organic pollutants in the atmosphere of the United Kingdom", Poster. DIOXIN '99: 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Venice, Italy, September 12-17

Qiu X., Bigsby R. M., Hites R. A., 2009, "Hydroxylated Metabolites of Polybrominated Diphenyl Ethers in Human Blood Samples from the United States", *Environmental Health Perspectives*, 117, 93-98

Qiu X., Mercado-Feliciano M., Bigsby R. M., Hites R. A., 2007, "Measurement of Polybrominated Diphenyl Ethers and Metabolites in Mouse Plasma after Exposure to a Commercial Pentabromodiphenyl Ether Mixture", *Environmental Health Perspectives*, 115, 1052-1058

Raff J. D., Hites R. A., 2006, "Gas-Phase Reactions of Brominated Diphenyl Ethers with OH Radicals", *Journal of Physical Chemistry*, 110, 10783-10792

Rahman F, Langford K. H., Scrimshaw M. D., Lester J.N., 2001, "Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants", *The Science of the Total Environment*, 275, 1-17

Rice CP, Chernyak SM, Begnoche L, Quintal R, Hickey J., 2002, "Comparisons of PBDE composition and concentration in fish collected from the Detroit River, MI and Des Plaines River, IL", *Chemosphere*, 49, 731-737

Ryan JJ, Patry B, Mills P, Beaudoin N., 2002, "Recent trends in levels of brominated brominated diphenyl ethers (BDEs) in human milk from Canada", *Organohalogen Compounds*, 58, 173-177

Schechter, A., Papke, O., Harris, R., Tung, K.C., Musumba, A., Olson, J., Birnbaum, L., 2006, "Polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in an expanded market basket survey of us food and estimated PBDE dietary intake by age and sex", *Environmental Health Perspective*, 114, 1515-1520

Sellström, U., 1996, "Polybrominated diphenyl ethers in the Swedish environment", *Fil. lic. Thesis*, Stockholm University, Stockholm, Sweden.

Sellström, U., 1999, "Determination of some polybrominated flame retardants in biota, sediment and sewage sludge", *Ph.D. Dissertation*, Stockholm University, Stockholm, Sweden

Sellström U, Jansson B, Kiergaard A, de With C., 1993a, "Polybrominated diphenyl ethers PBDE in biological samples form the Swedish environment", *Chemosphere*, 26, 1703-1718

Sellström U, Kierkegaard A, Alsberg T, Jonson P, Wahlberg C, de Wit C., 1999, "Brominated flame retardants in sediments from European estuaries, the Baltic Sea and in sewage sludge", *Organohalogen Compounds*, 40, 383-386

Sellström U, Lindberg P, Haggberg L, de Wit C., 2001, "Higher brominated PBDEs found in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden." *The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants*. Stockholm: AB Firmatryck, 159-162

She J, Petreas M, Winkler J, Visita P, McKinney M, Kopec D., 2002, "PBDEs in the San Francisco Bay area: measurements in harbor seal blubber and human breast adipose tissue", *Chemosphere*, 46, 697– 708

Shoeib, M., Harner, T., Ikonou, M., Kannan, K., 2004, "Indoor and outdoor air concentrations and phase partitioning of perfluoralkyl sulfonamides and polybrominated diphenyl ethers", *Environmental Science and Technology*, 38, 1313–1320

Sjödin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Kronholm-Diab K, Jakobsson E, Bergman A., 1999, "Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers", *Environmental Health Perspective*, 107, 643–648

Sjödin A, Jakobsson E, Kierkegaard A, Marsh G, Sellström U., 1998, "Gas chromatographic identification of polybrominated diphenyl ethers in a commercial product, Bromkal 70-5DE", *Journal of Chromatography A*, 822, 83–89

Sjödin A, Patterson D, Bergman A, 2001, "Brominated flame retardants in serum from US blood donors", *Environmental Science and Technology*, 35, 3830–3833

Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., 2002, "Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης", πέμπτη έκδοση

Stefanou E. G., 2008, "Introduction to modern mass spectrometry", Environmental chemical processes laboratory, Department of Chemistry, University of Crete

Strandberg, B., Dodder, N.G., Basu, I., Hites, R.A., 2001, "Concentrations and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers and other organohalogen compounds in Great Lakes air", *Environmental Science and Technology*, 35, 1078–1083

- Strandman T, Koistinen J, Vartiainen T., 2000, "Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in placenta and human milk", *Organohalogen Compounds*, 47, 61-64
- Su Y., Wania F., Lei Y. D., Harner T., Shoeib M., 2007, "Temperature Dependence of the Air Concentrations of Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers in a Forest and a Clearing", *Environmental science and technology*, 41, 4655-4661
- Sudaryanto A., Kajiwara N., Tsydenova O. V., Isobe T., Yu H., Takahashi S., Tanabe S., 2008, "Levels and congener specific profiles of PBDEs in human breast milk from China: Implication on exposure sources and pathways", *Chemosphere*, 73, 1661-1668
- Ter Schure A. F. H., Larsson P., 2002, "Polybrominated diphenyl ethers in precipitation in Southern Sweden (Skane, Lund)", *Atmospheric Environment*, 36, 4015-4022
- Thomsen C., Smastuen-Haug L., Leknes H., Lundanes E., Becher G., Lindstrom G., 2002, "Comparing electron ionization high-resolution and electron capture low-resolution mass spectrometric determination of polybrominated diphenyl ethers in plasma, serum and milk", *Chemosphere*, 46, 641-648
- Tittlemier S. A., Halldorson T., Stern G. A., Tomy G. T., 2002, "VAPOR PRESSURES, AQUEOUS SOLUBILITIES, AND HENRY'S LAW CONSTANTS OF SOME BROMINATED FLAME RETARDANTS", *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1804-1810
- Toms L. M. L., Harden F. A., Symons R. K., Burniston D., Furst P., Muller J. F., 2007, "Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in human milk from Australia", *Chemosphere*, 68, 797-803
- Ueno D., Darling C., Alae M., Pacepavicius G., Teixeira C., Campbell L., Letcher R. J., Bergman A., Marsh G., Muir D., 2008, "Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers (OH-PBDEs) in the Abiotic Environment:

Surface Water and Precipitation from Ontario, Canada", *Environmental science and technology*, 42, 1657-1664

Van Bavel, B., Sundelin, E., Lillback, J., Dam, M., Lindstrom, G., 1999, "Supercritical fluid extraction of polybrominated diphenyl ethers, PBDEs, from long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic", *Organohalogen Compounds*, 40, 359-362

Von Meyerinck L, Hufnagel B, Schmoldt A, Benthe HF, 1990, "Induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 by the pentabromo-diphenyl ether Bromkal 70 and half-lives of its components in the adipose tissue", *Toxicology*, 61, 259-274

Vonderheide A. P., Mueller K. E., Meija J., Welsh G. L., 2008, "Polybrominated diphenyl ethers: Causes for concern and knowledge gaps regarding environmental distribution, fate and toxicity", *Science of the total environment*, 400, 425-436

Wang DL, Cai ZW, Jiang GB, Leung A, Wong MH, Wong WK, 2005b, "Determination of polybrominated diphenyl ethers in soil and sediment from an electronic waste recycling facility", *Chemosphere*, 60, 810-816

Wania F., Dugani C. B., 2003, "ASSESSING THE LONG-RANGE TRANSPORT POTENTIAL OF POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS: A COMPARISON OF FOUR MULTIMEDIA MODELS", *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1252-1261

Watanabe I., Sakai S., 2003, "Environmental release and behavior of brominated flame retardants", *Environment International*, 29, 665- 682

WHO, 1997, *Environmental Health Criteria 192, Flame retardants: A general introduction*, International program on chemical safety, World health organization, Geneva, Switzerland

Wijsekera R, Halliwell C, Hunter S, Harrad S, 2002, "A preliminary assessment of UK human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)", *Organohalogen Compounds*, 55, 239-242

Wong A, Duan Lei Y., Alae M., Wania F., 2001, "Vapor Pressures of the Polybrominated Diphenyl Ethers", *Journal of chemical and engineering data*, 46, 239-242

Zegers BN, Lewis WE, Boon JP., 2000, "Levels of some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in dated sediment cores", *Organohalogen Compounds*, 47, 229-232

Zhou T, Ross DG, De Vito MJ, Crofton KM, 2001, "Effects of short-term exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats", *Toxicology Science*, 61, 76- 82

Μεσαρχάκη Ε., 2009, "Καρβονυλικές ενώσεις στην ατμόσφαιρα της ανατολικής μεσογείου", Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μπέσης Α., 2008, "Μελέτη των φυσικοχημικών διεργασιών των πολυβρωμιωμένων διφαινυλαιθέρων στην ατμόσφαιρα", Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στεφάνου Ε. Γ., Κανακίδου Μ., Μανδαλάκης Μ., Κουβαράκης Α., 2006, "Χημεία Περιβάλλοντος Ι: Υδατική Χημεία", Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χατζηγιάννου Θ. Π., Κουππάρης Μ. Α., 2000, "Ενόργανη Ανάλυση"

Παραρτήματα:

- ✚ *Παράρτημα A-1:* χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας τυφλών δειγμάτων

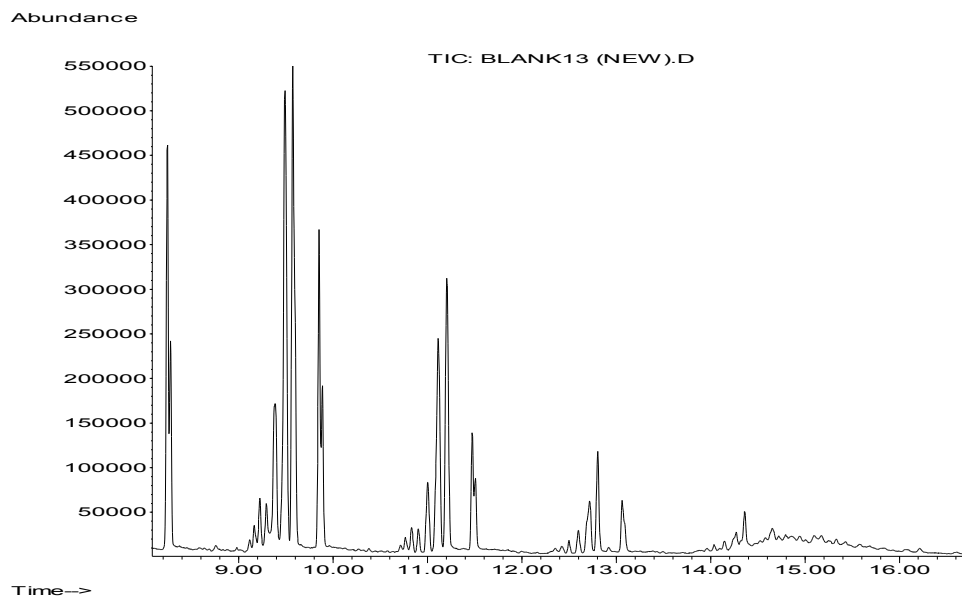
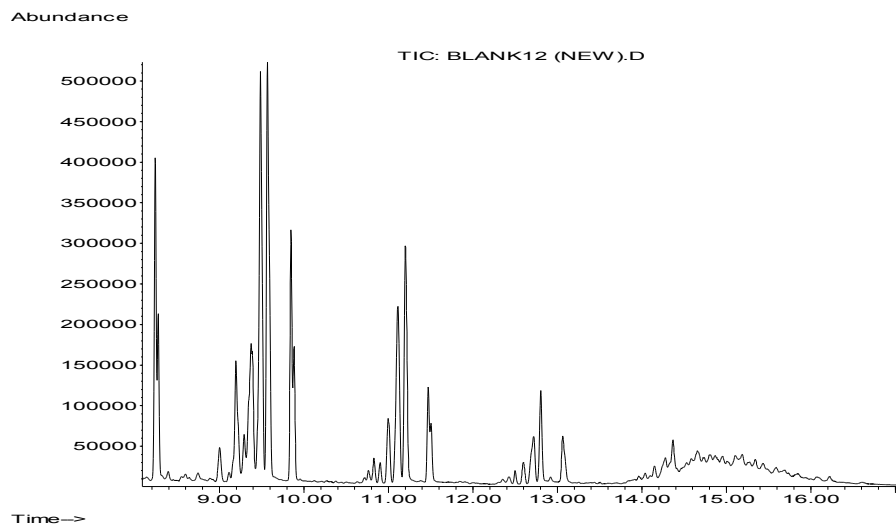
- ✚ *Παράρτημα A-2:* χρωματογραφήματα αγνώστων (πραγματικών) δειγμάτων

- ✚ *Παράρτημα A-3:* χρωματογραφήματα ανακτήσεων μεθόδων

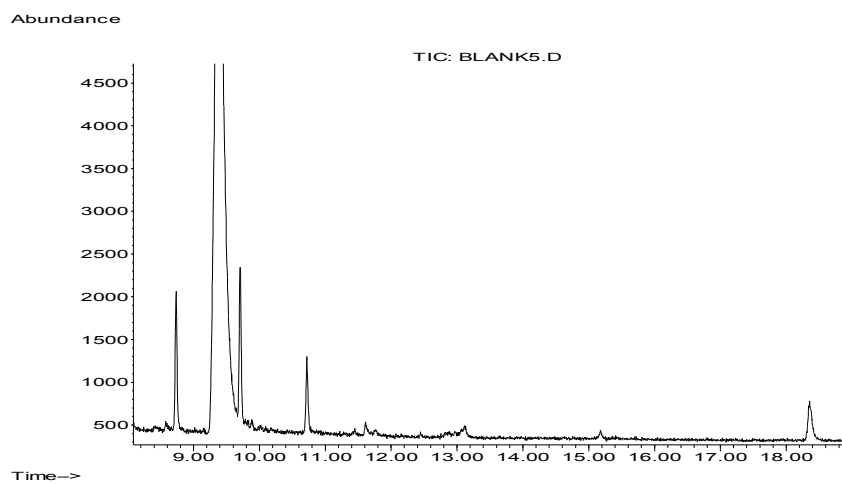
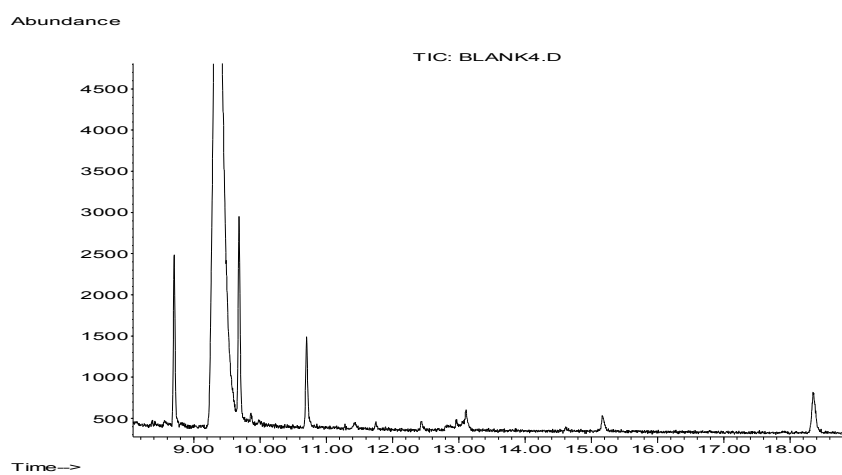
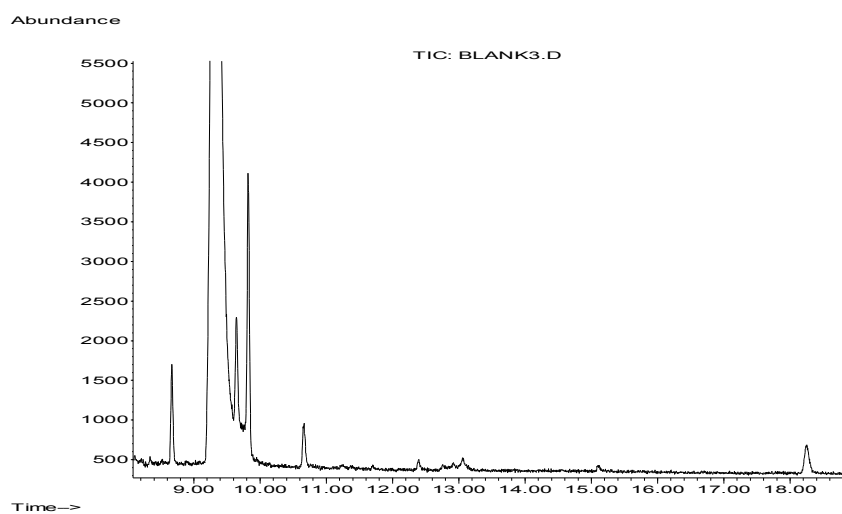
- ✚ *Παράρτημα A-4:* χρωματογραφήματα από εμβολιασμό PBDEs σε πραγματικό δείγμα και καμπύλες βαθμονόμησης για τους PBDEs σε αυτό το δείγμα

I. Παράρτημα A-1: χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας τυφλών δειγμάτων:

- Τυφλά δείγματα της μεθόδου 4.2.1.:

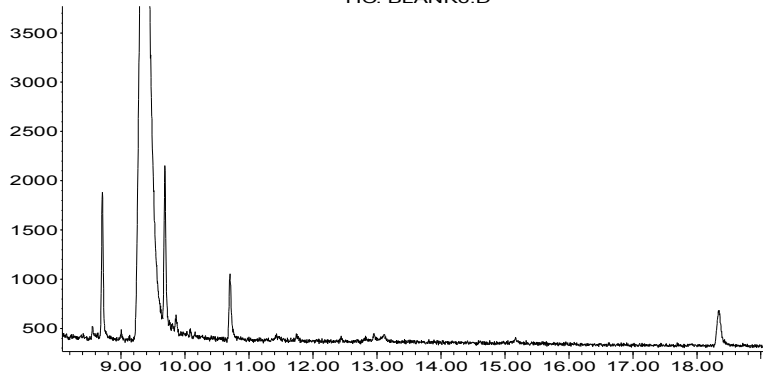


■ Τυφλά δείγματα της μεθόδου 4.2.2.:



Abundance

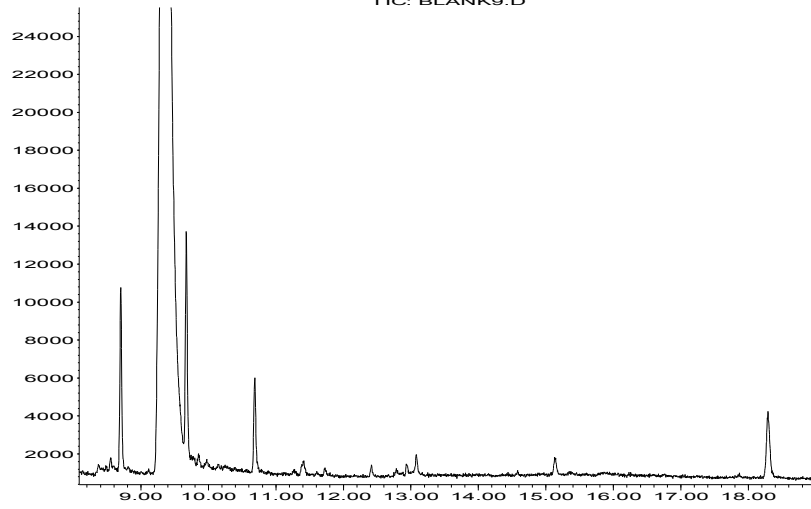
TIC: BLANK6.D



Time-->

Abundance

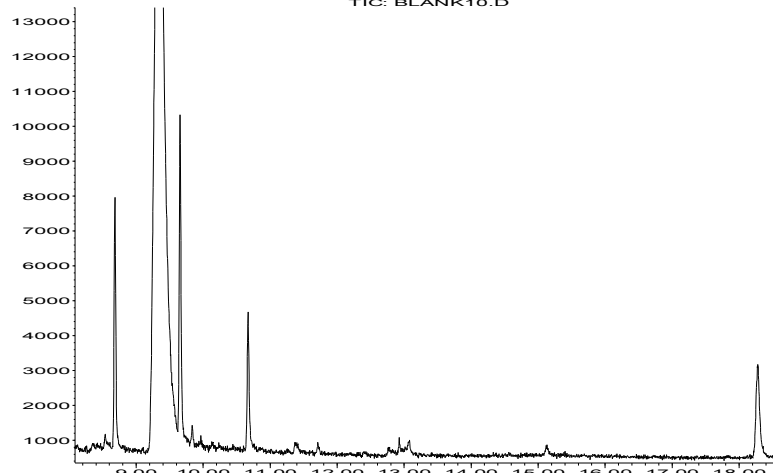
TIC: BLANK9.D



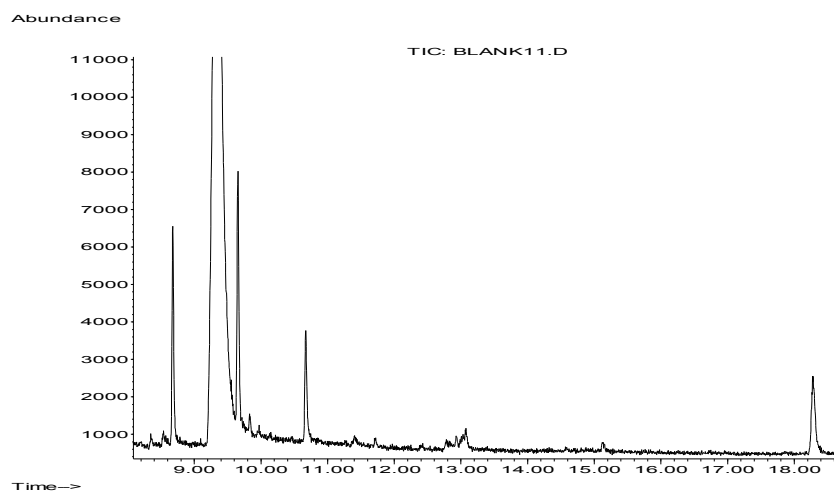
Time-->

Abundance

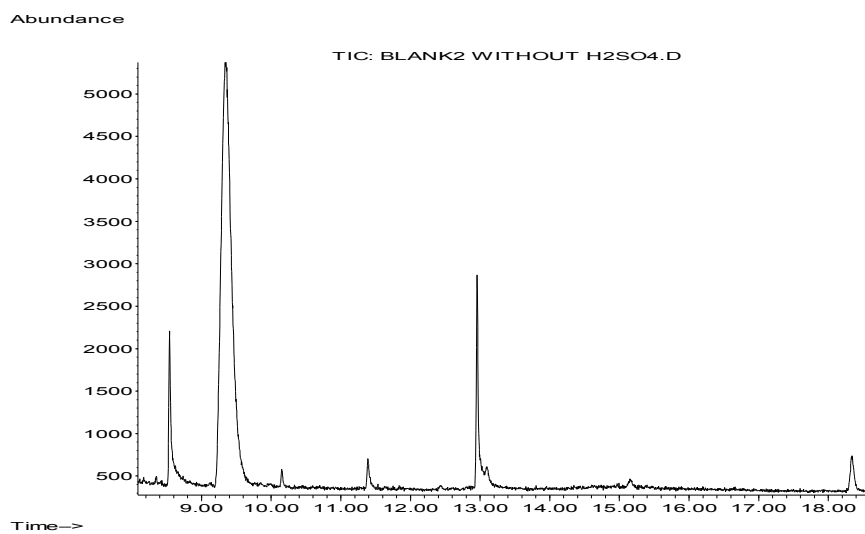
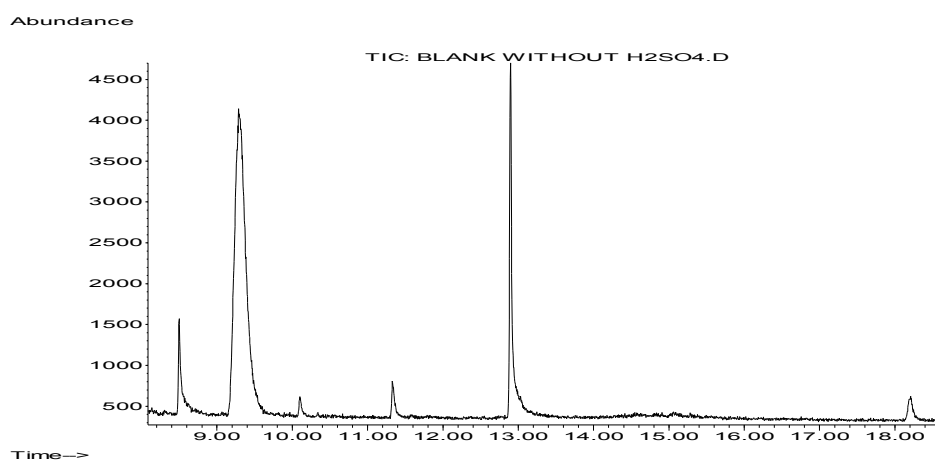
TIC: BLANK10.D

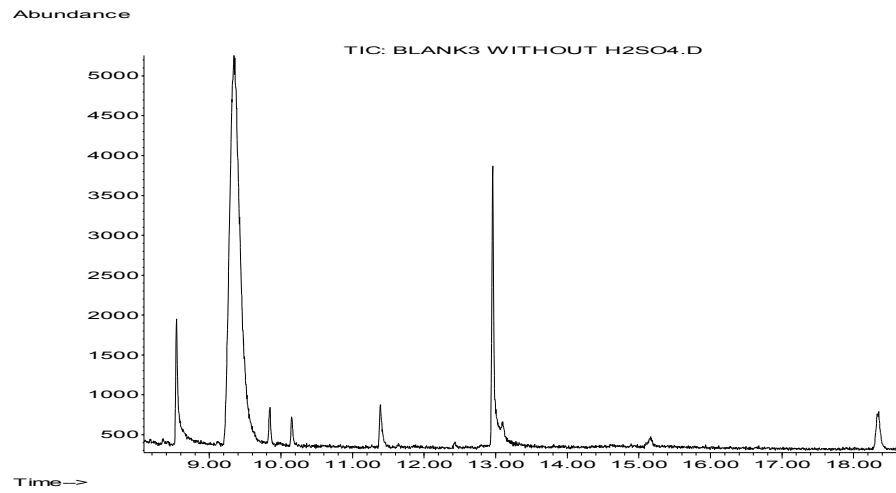


Time-->

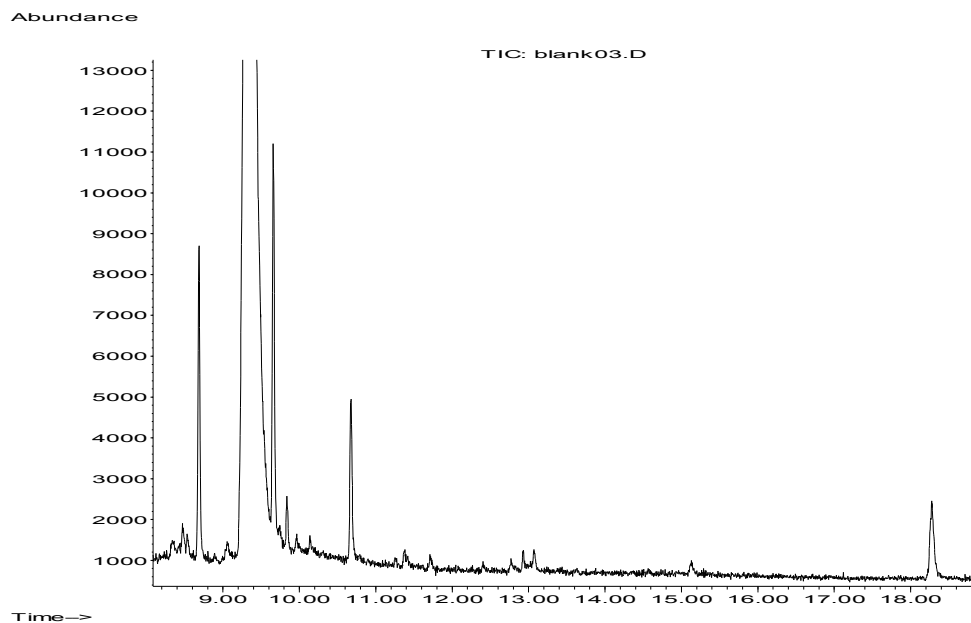
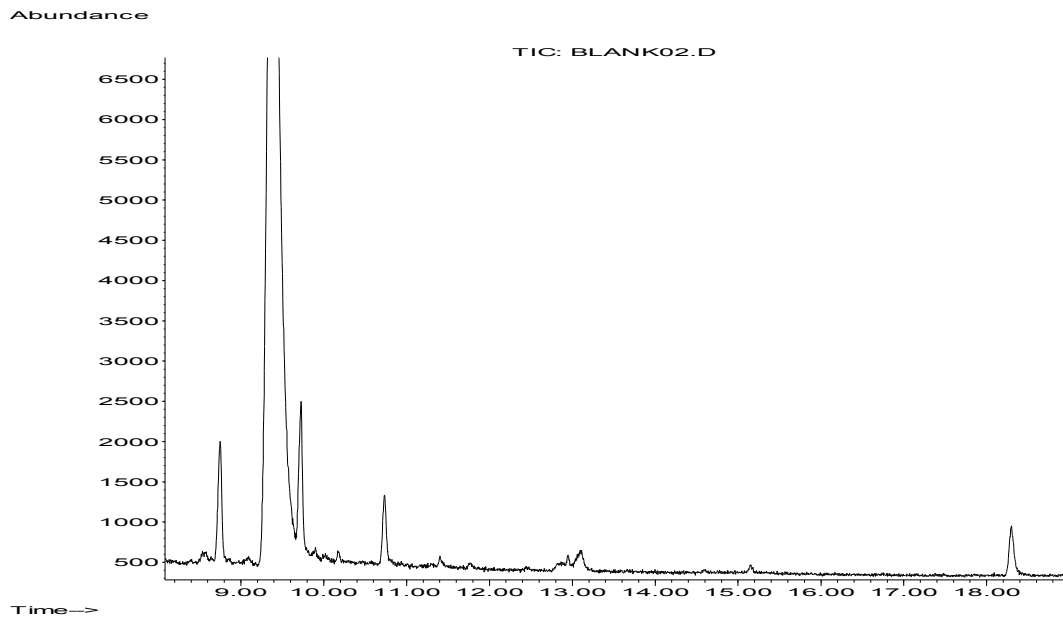


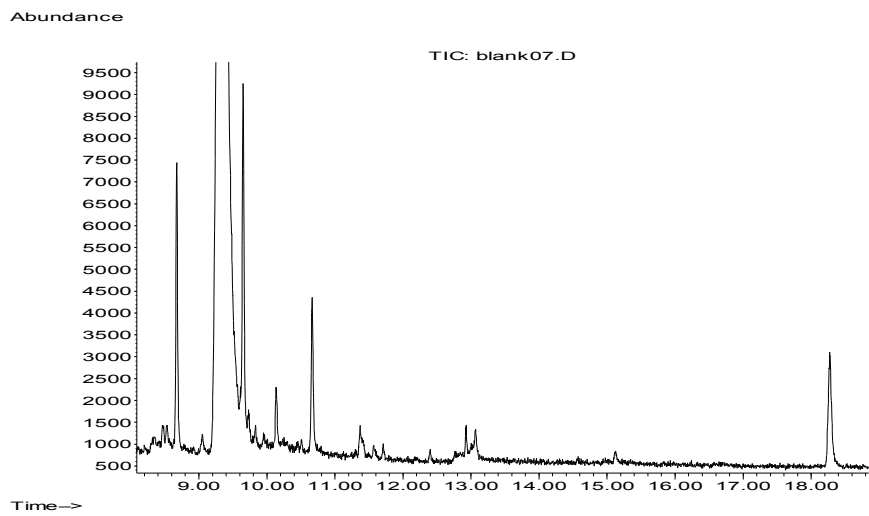
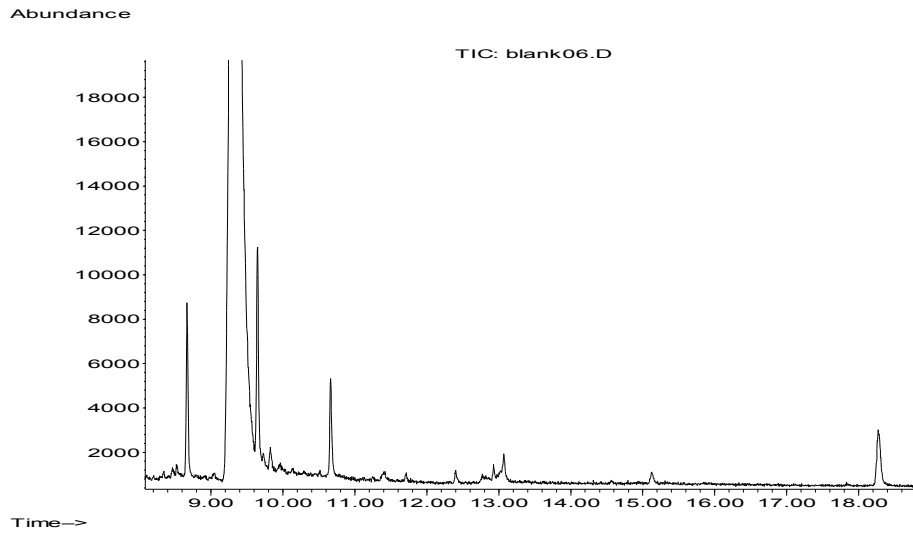
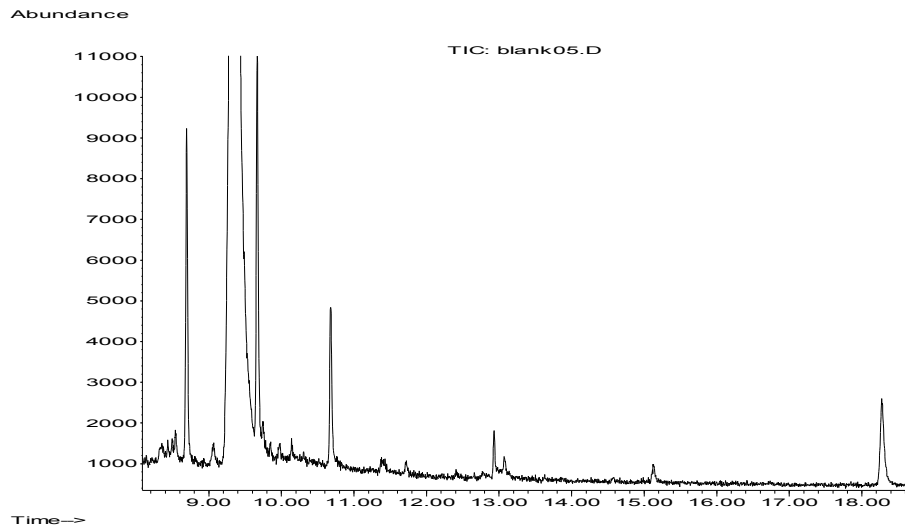
- Τυφλά δείγματα της τροποποιημένης μεθόδου 4.2.2.:

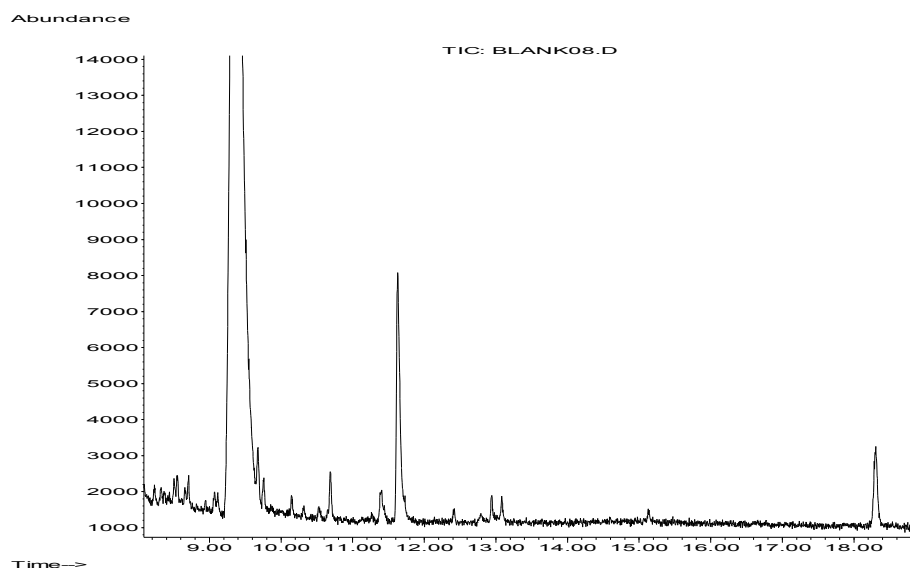




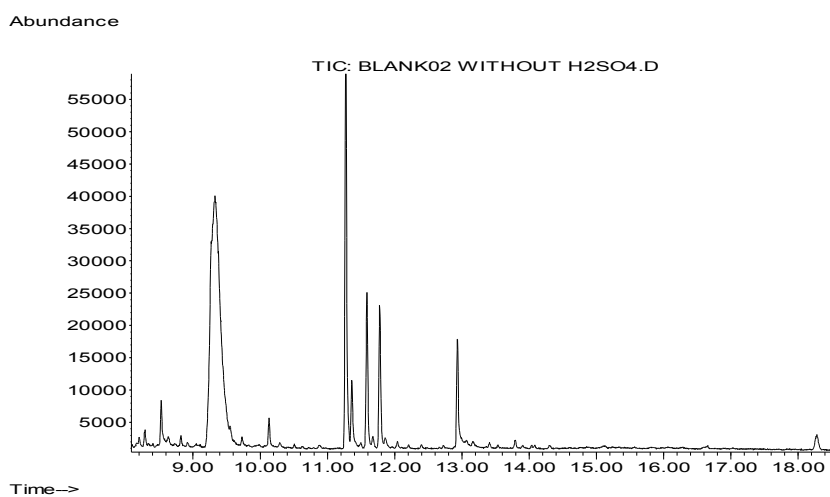
- Τυφλά δείγματα της μεθόδου 4.2.3.:



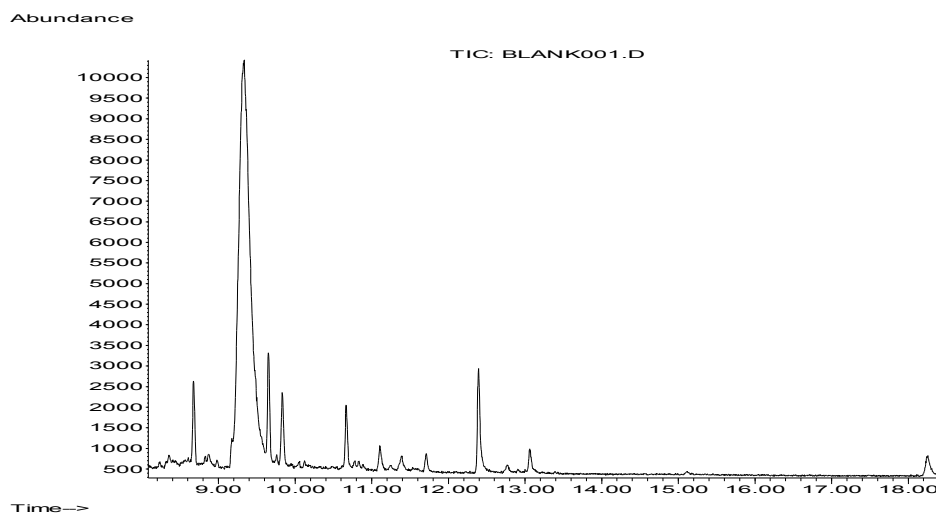




- Τυφλά δείγματα της τροποποιημένης μεθόδου 4.2.3.:



- Τυφλά δείγματα της μεθόδου 4.2.4.:

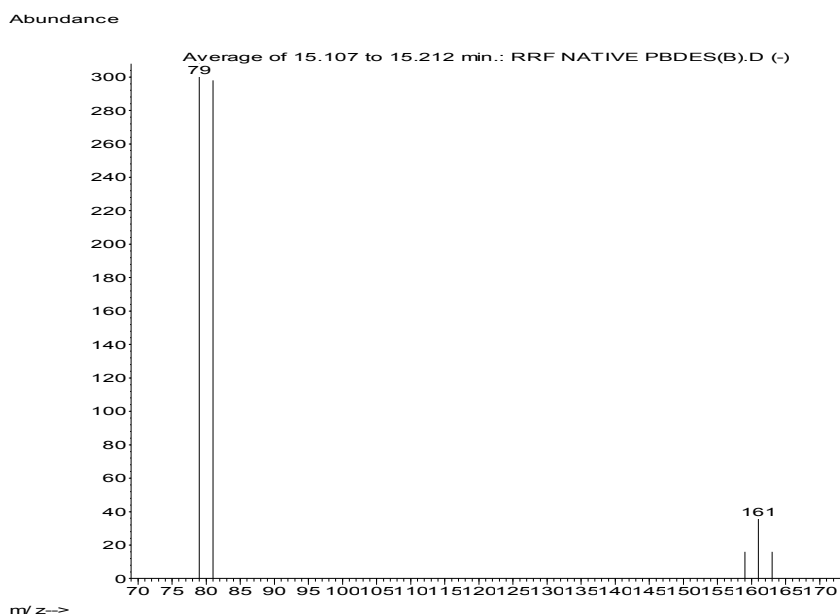


- Ταυτοποίηση κορυφών στα τυφλά δείγματα της μεθόδου 4.2.2.:

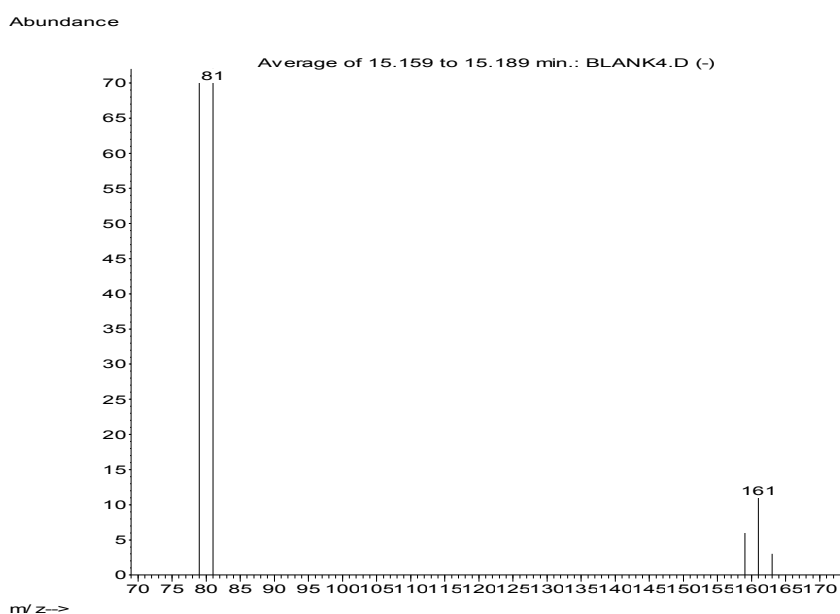
- ❖ Μέθοδος SIM:

A) Χρόνος έκλουσης: 15,15 λεπτά, πιθανό μέλος: BDE-99

Φάσμα μάζας του μέλους BDE-99 στο πρότυπο διάλυμα του RRF:



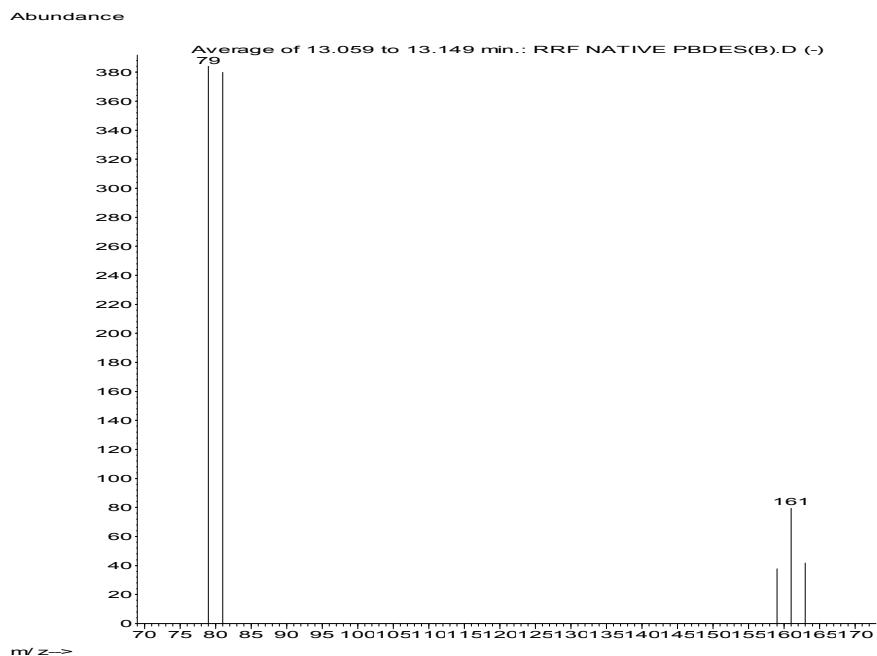
Φάσμα μάζας του πιθανού μέλους BDE-99 στο τυφλό δείγμα (blank4):



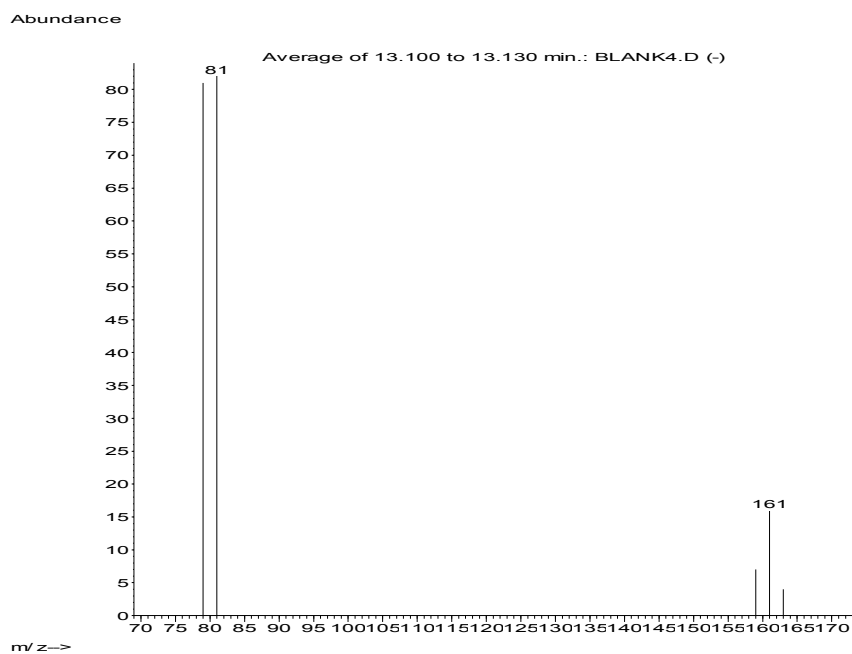
Παρατηρούμε μια μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δύο φασμάτων και των χρόνων κατακράτησης, ωστόσο θα πρέπει να σιγουρευτούμε από τα αντίστοιχα φάσματα Full Scan, τα οποία όπως αναφέραμε δε μας βοήθησαν.

B) Χρόνος έκλουσης: 13,11 λεπτά, πιθανό μέλος: BDE-47

Φάσμα μάζας του μέλους BDE-47 στο πρότυπο διάλυμα του RRF:



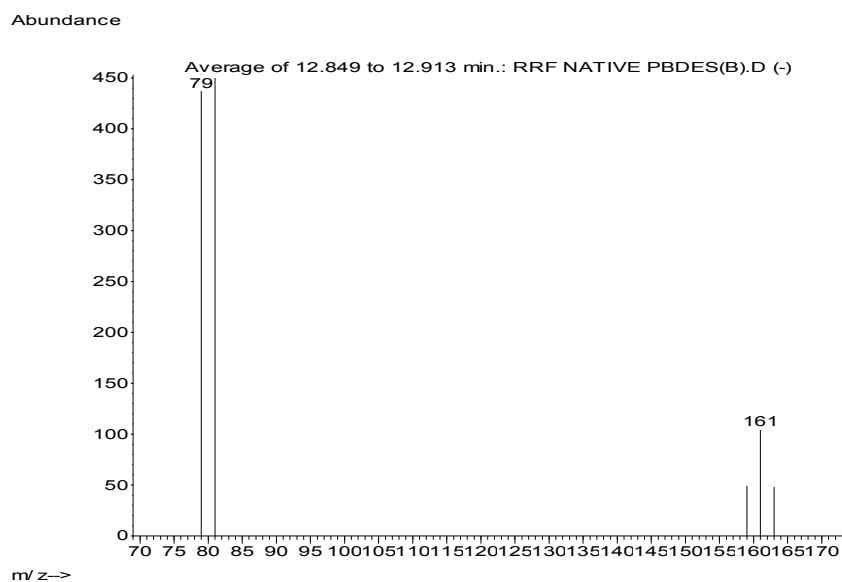
Φάσμα μάζας του πιθανού μέλους BDE-47 στο τυφλό δείγμα (blank4):



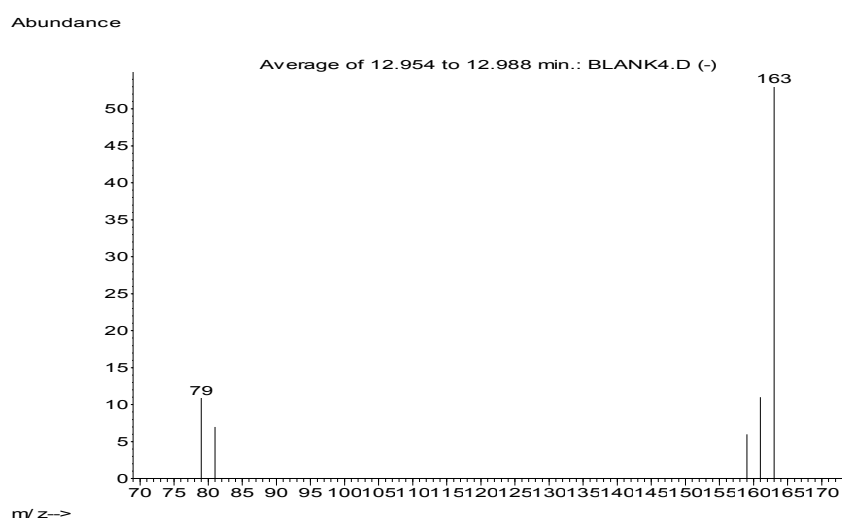
Επίσης παρατηρούμε μια μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δύο φασμάτων και των χρόνων κατακράτησης, ωστόσο θα πρέπει να σιγουρευτούμε από τα αντίστοιχα φάσματα Full Scan, τα οποία όπως αναφέραμε δε μας βοήθησαν.

Γ) Χρόνος έκλυσης: 12,88 λεπτά, πιθανό μέλος: BDE-71

Φάσμα μάζας του μέλους BDE-71 στο πρότυπο διάλυμα του RRF:



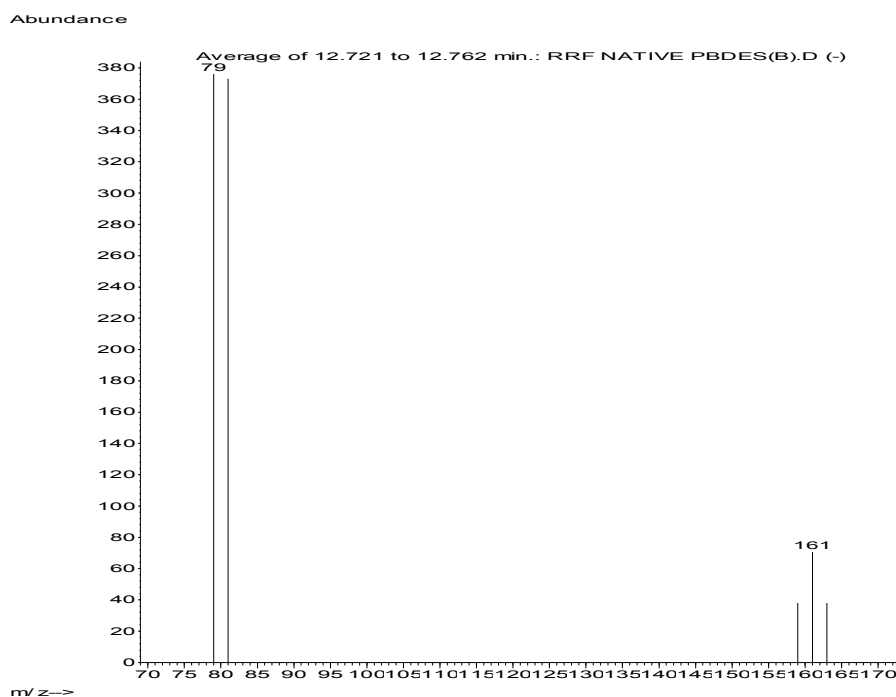
Φάσμα μάζας του πιθανού μέλους BDE-71 στο τυφλό δείγμα (blank4):



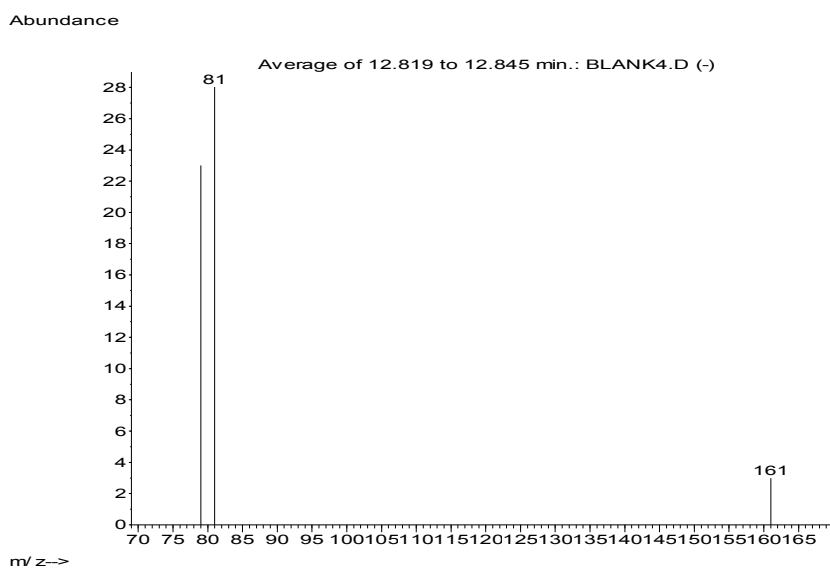
Δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση μεταξύ των χρόνων κατακράτησης στις δύο αυτές περιπτώσεις, και φυσικά ούτε μεταξύ των φασμάτων μάζας. Συνεπώς, η συγκεκριμένη ένωση στο τυφλό δείγμα πρόκειται για κάποια επιμόλυνση και η παρουσία της δεν εξετάζεται περαιτέρω.

Δ) Χρόνος έκλυσης: 12,74 λεπτά, πιθανό μέλος: BDE-49

Φάσμα μάζας του μέλους BDE-49 στο πρότυπο διάλυμα του RRF:

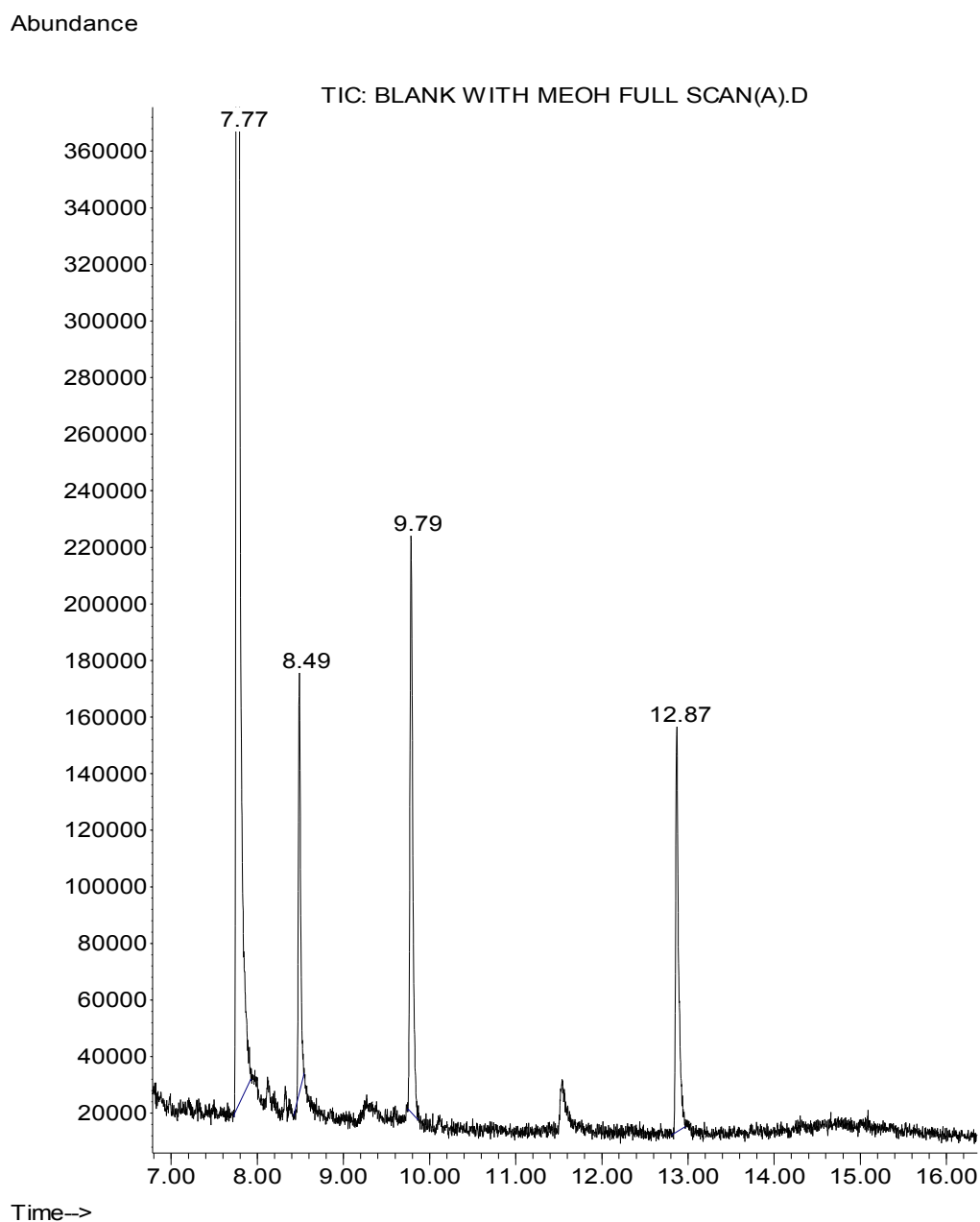


Φάσμα μάζας του πιθανού μέλους BDE-49 στο τυφλό δείγμα (blank4):



Επίσης, δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση μεταξύ των χρόνων κατακράτησης στις δύο αυτές περιπτώσεις, αλλά ούτε και μεταξύ των φασμάτων μάζας. Συνεπώς, η συγκεκριμένη ένωση στο τυφλό δείγμα πρόκειται για κάποια επιμόλυνση και η παρουσία της δεν εξετάζεται περαιτέρω.

❖ Μέθοδος Full Scan:



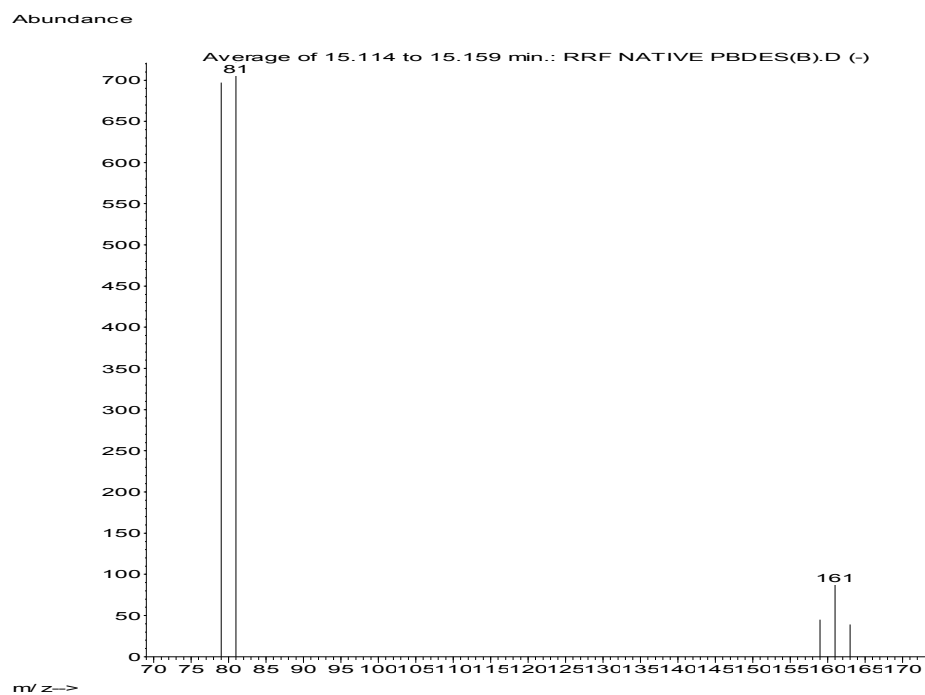
Είναι ξεκάθαρο, ότι οι συνεκλούμενες βρωμιές που εμφανίζονται με Full Scan, δε μπορούν να βοηθήσουν στην ταυτοποίηση των κορυφών των πιθανών μελών PBDEs που εμφανίζονται με τη μέθοδο SIM και οι οποίες παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερες αφθονίες.

- Ταυτοποίηση κορυφών στα τυφλά δείγματα της μεθόδου 4.2.3.:

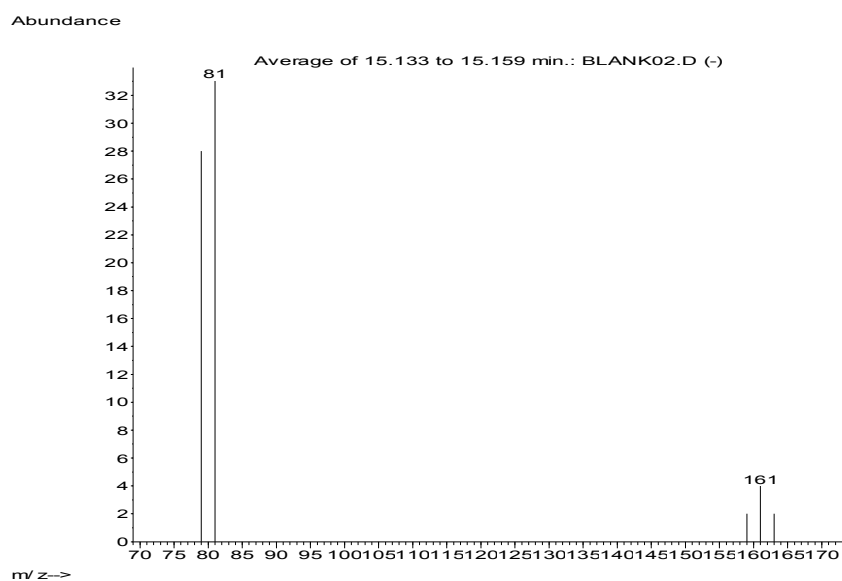
- ❖ Μέθοδος SIM:

A) Χρόνος έκλουσης: 15,14 λεπτά, πιθανό μέλος: BDE-99

Φάσμα μάζας του μέλους BDE-99 στο πρότυπο διάλυμα του RRF:

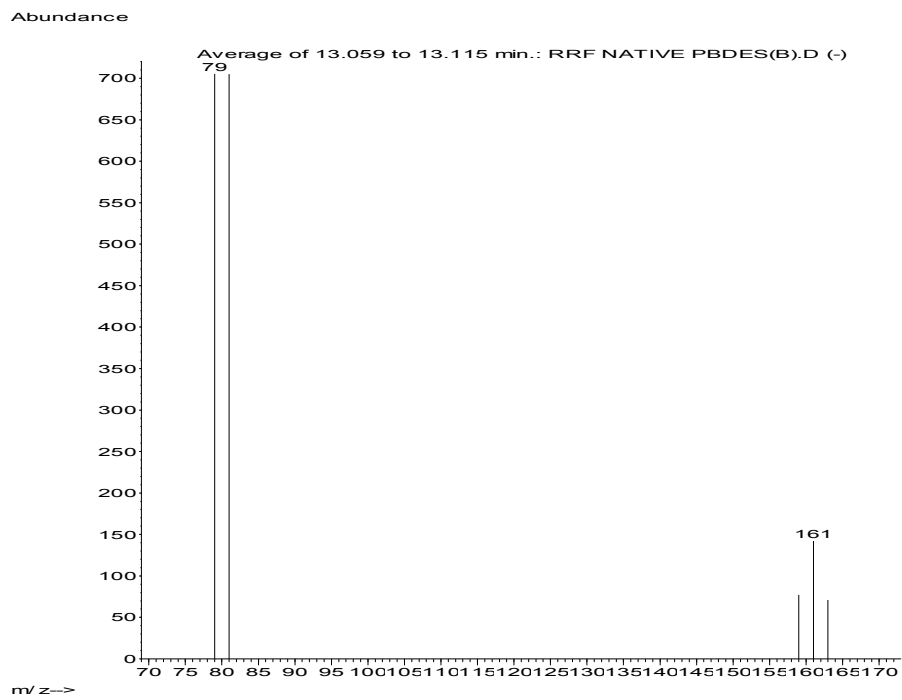


Φάσμα μάζας του πιθανού μέλους BDE-99 στο τυφλό δείγμα (blank02):

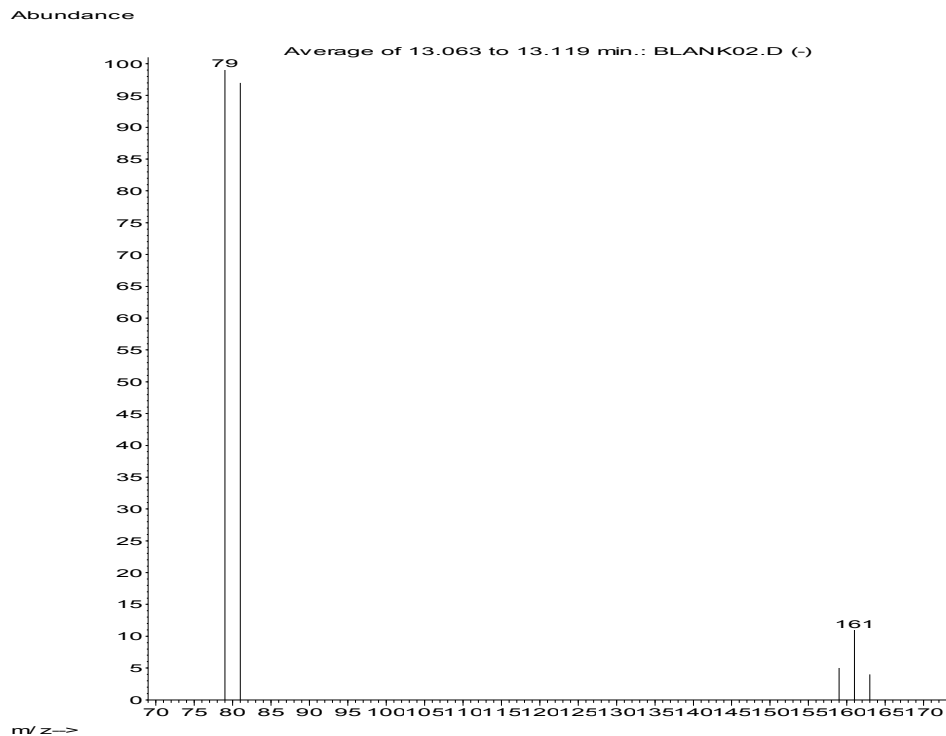


B) Χρόνος έκλυσης: 13,09 λεπτά, πιθανό μέλος: BDE-47

Φάσμα μάζας του μέλους BDE-47 στο πρότυπο διάλυμα του RRF:



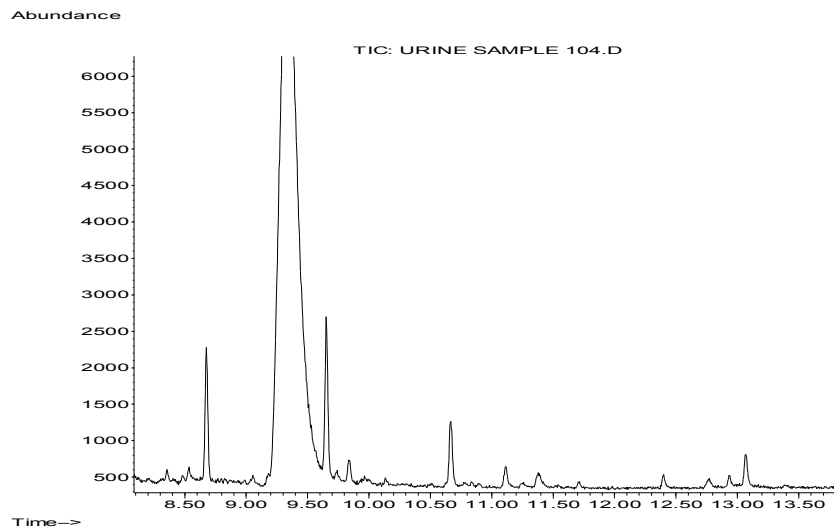
Φάσμα μάζας του πιθανού μέλους BDE-47 στο τυφλό δείγμα (blank02):



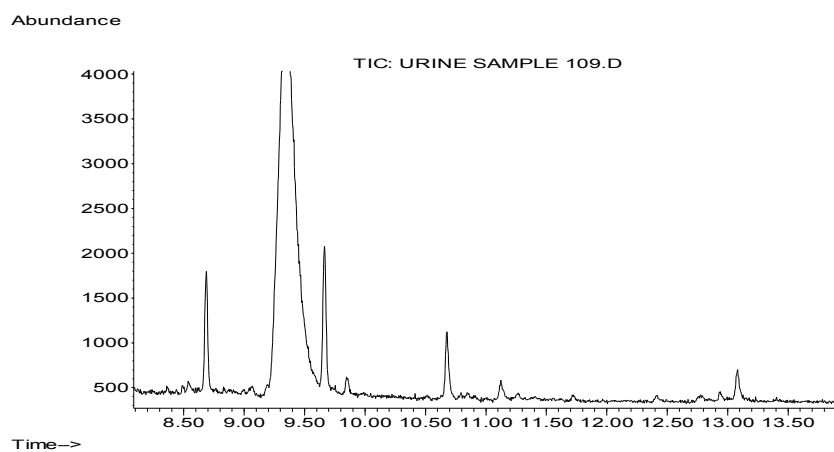
Π. Παράρτημα A-2: χρωματογραφήματα αγνώστων (πραγματικών) δειγμάτων:

- Άγνωστα δείγματα της μεθόδου 4.2.1.:

❖ Μάρτιος 2010:

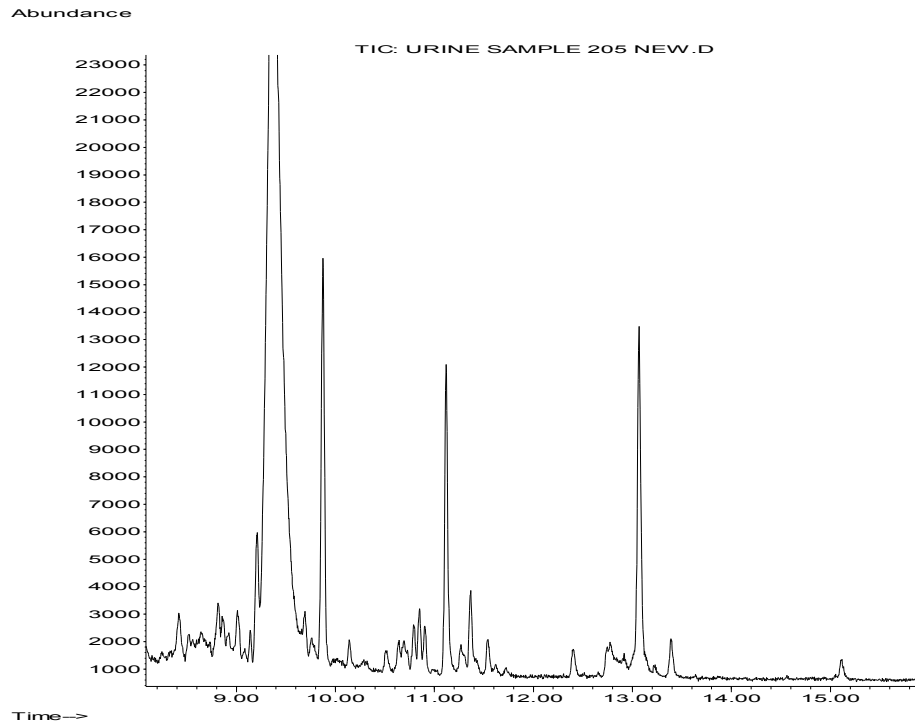


Ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL

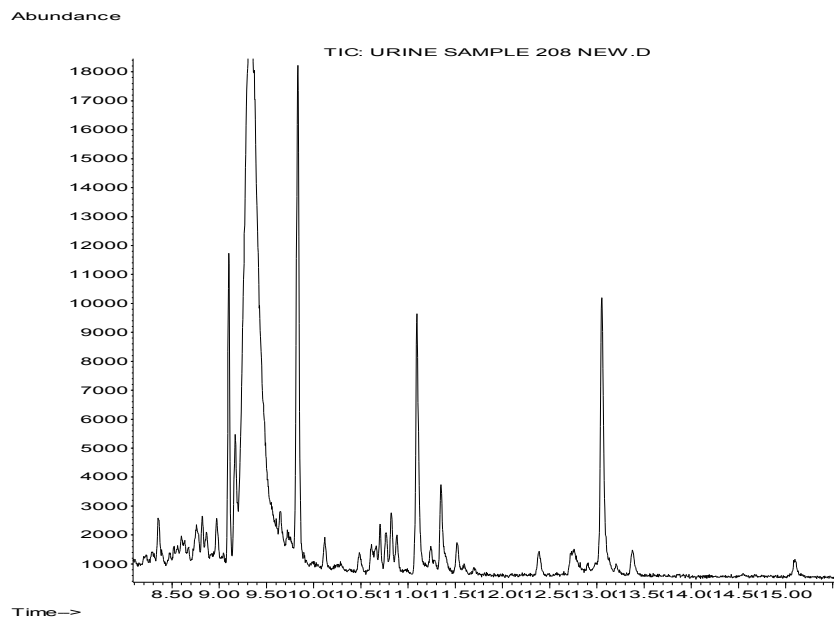


Ενήλικη γυναίκα, βιολόγος

❖ Οκτώβριος 2010:



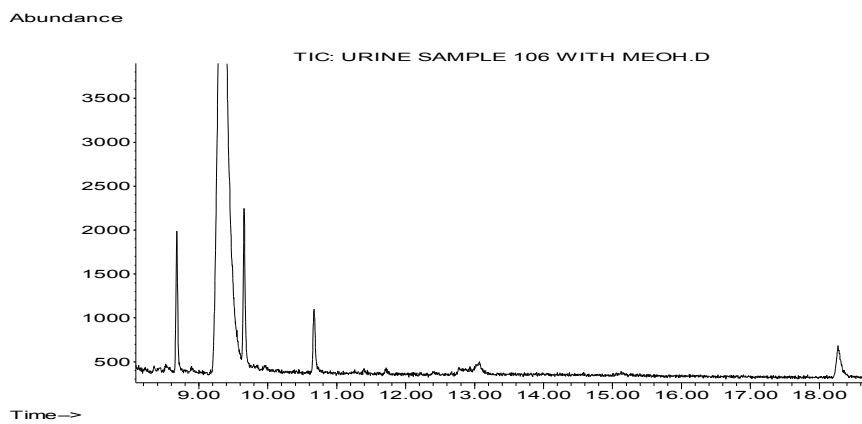
Ενήλικη γυναίκα, μέλος ECPL



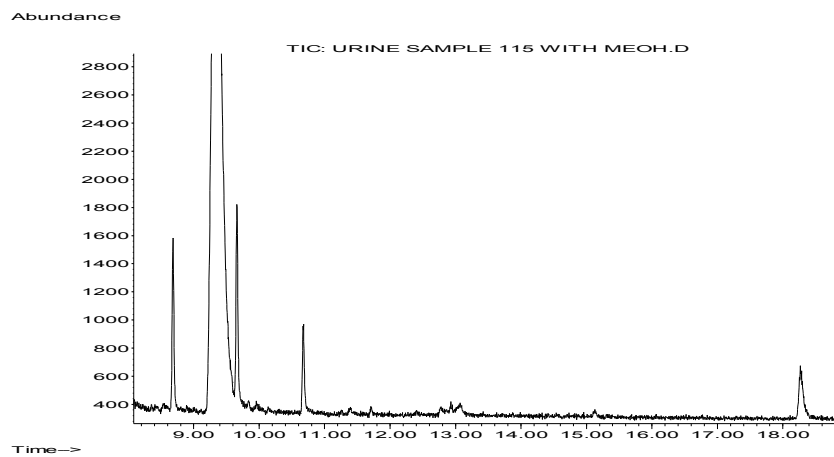
Ενήλικη γυναίκα, μέλος ECPL

- Άγνωστα δείγματα της μεθόδου 4.2.2.:

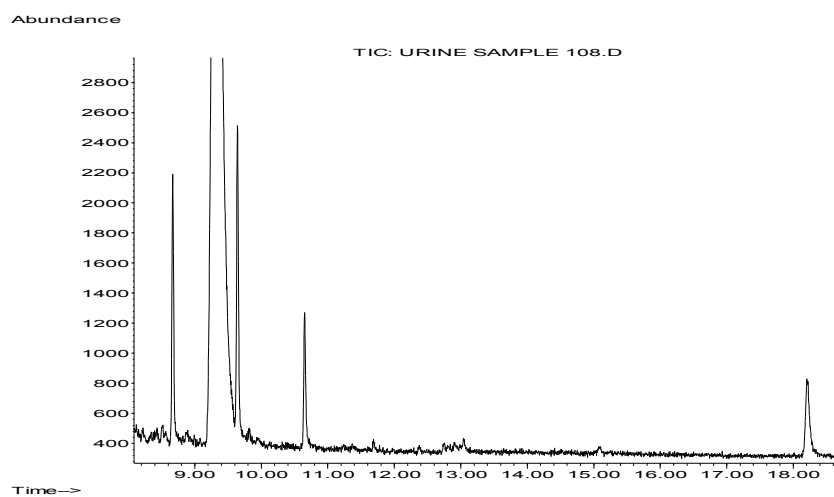
❖ Μάρτιος 2010:



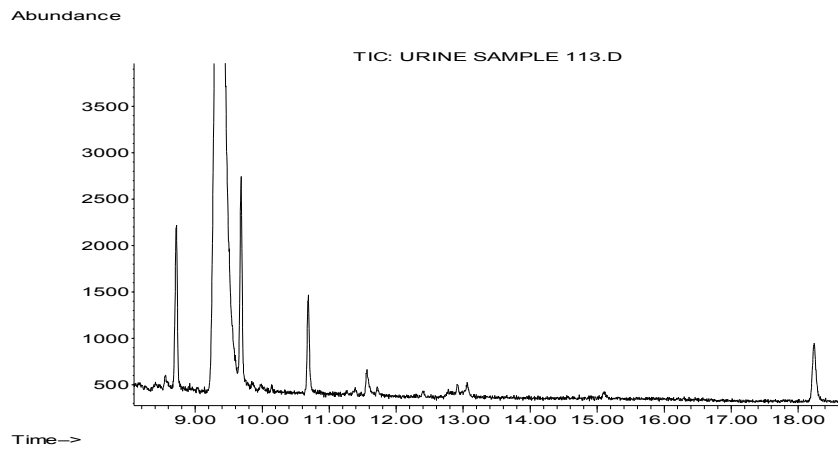
Δείγμα #1: Ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL



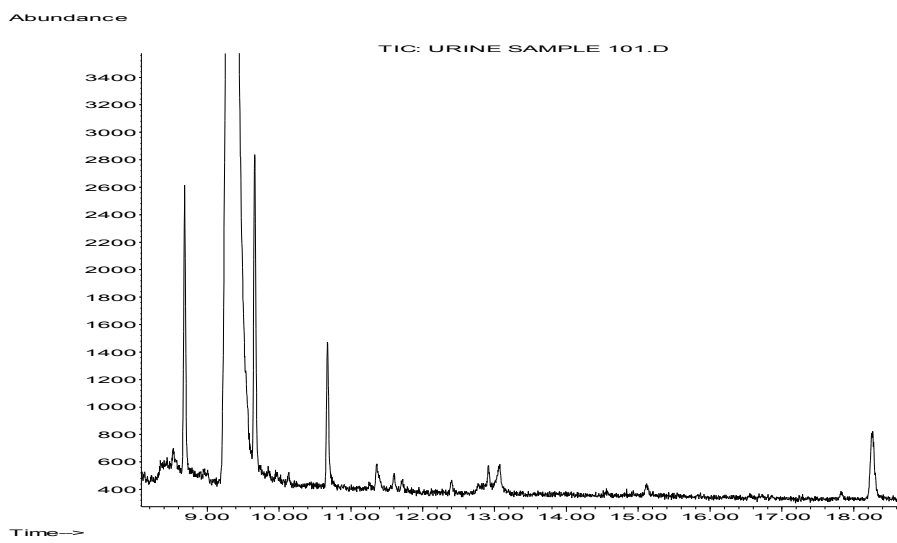
Δείγμα #2: Ανήλικο αγόρι, μαθητής



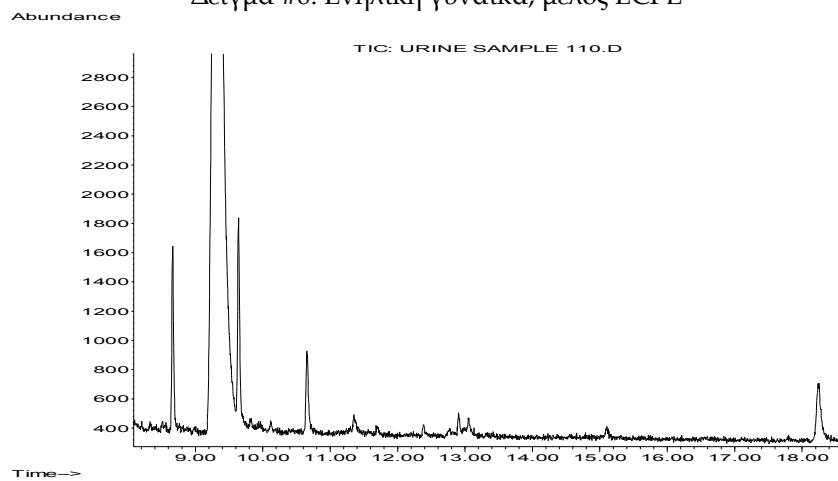
Δείγμα #3: Ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL



Δείγμα #5: Ενήλικη γυναίκα, μέλος ECPL

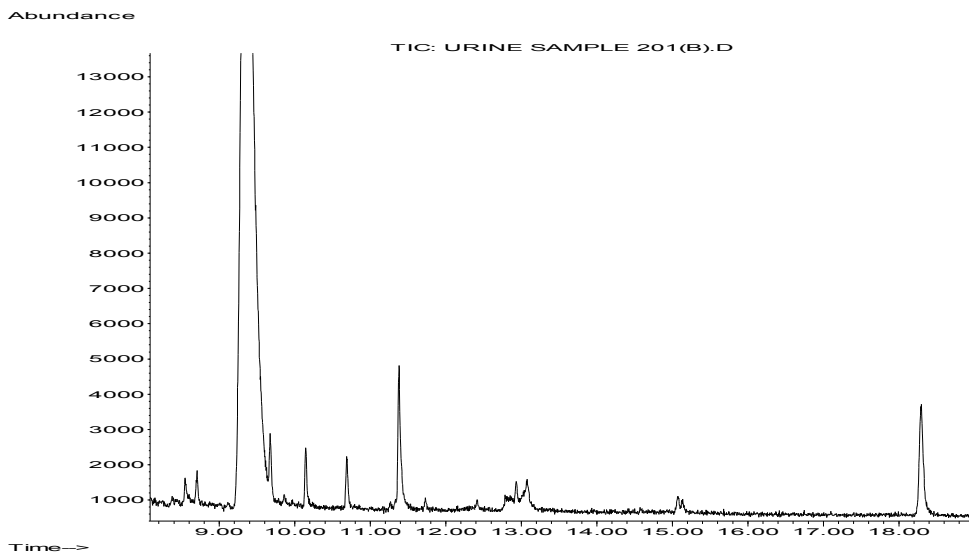


Δείγμα #6: Ενήλικη γυναίκα, μέλος ECPL

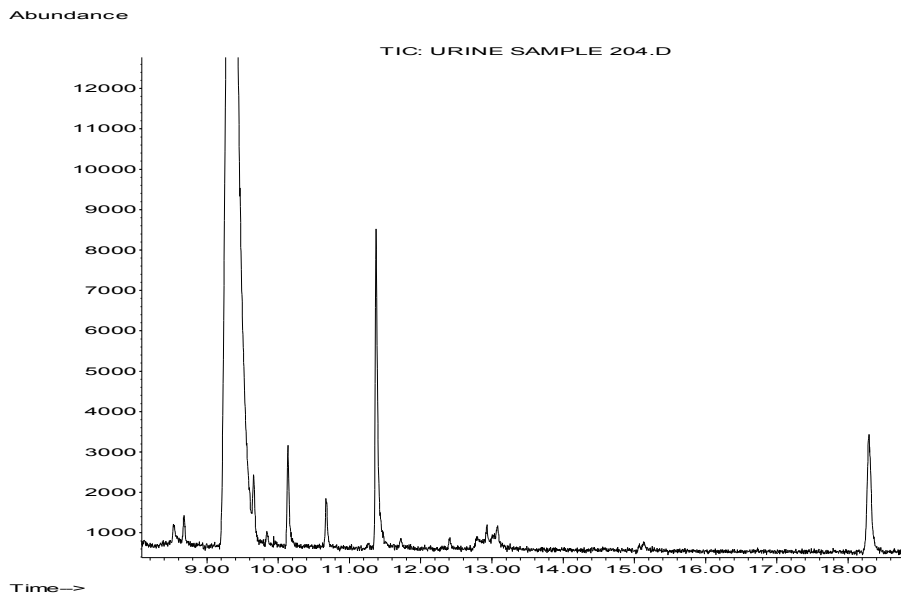


Δείγμα #7: Ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL

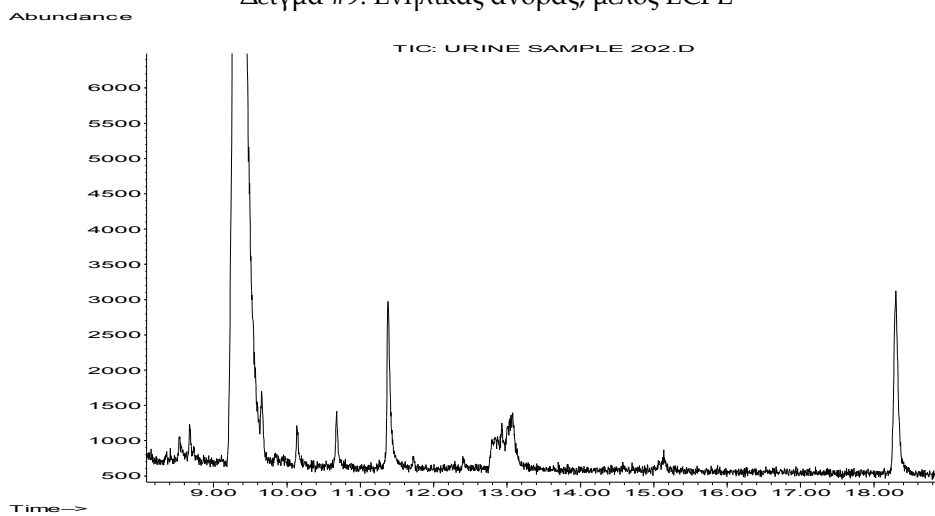
❖ Οκτώβριος 2010:



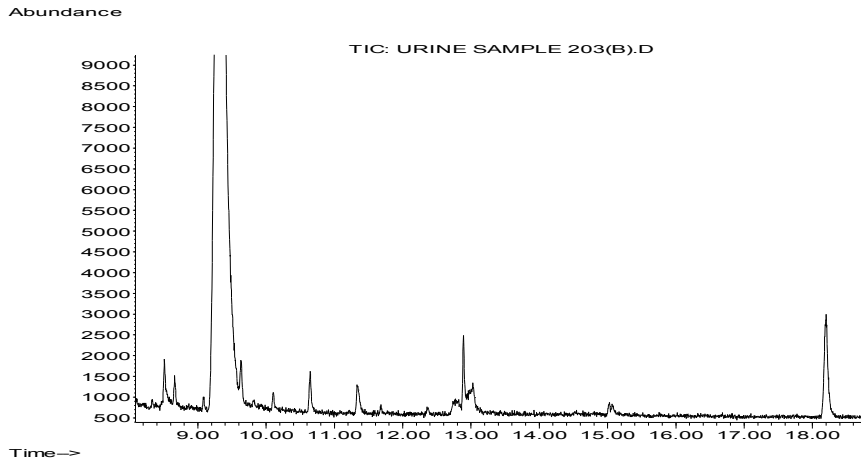
Δείγμα #8: Ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL



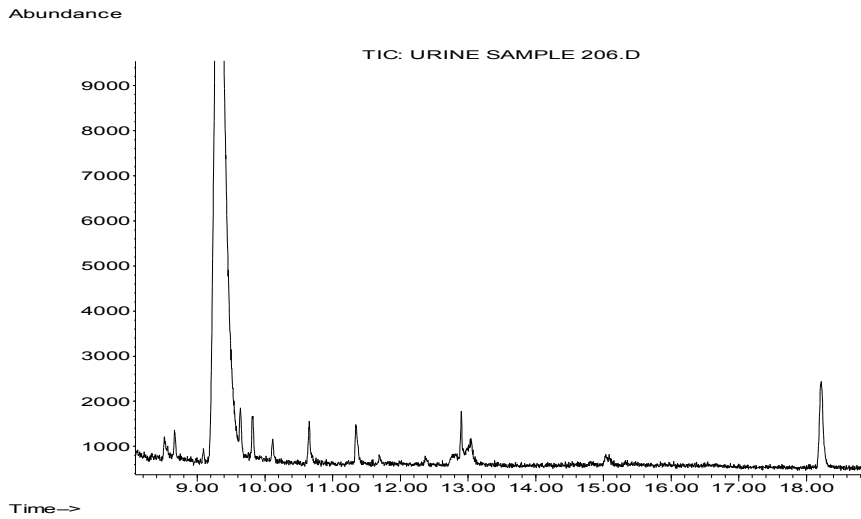
Δείγμα #9: Ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL



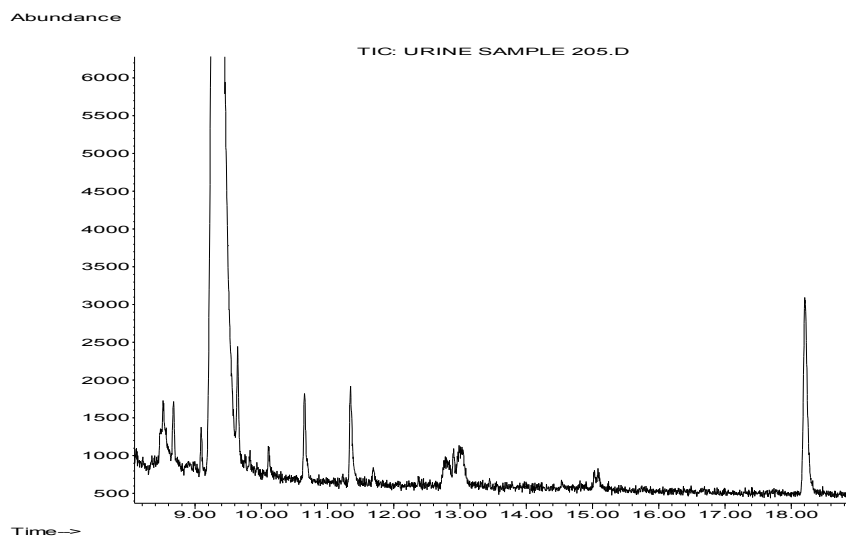
Δείγμα #10: Ενήλικας άνδρας, εργασία σε εργαστήριο



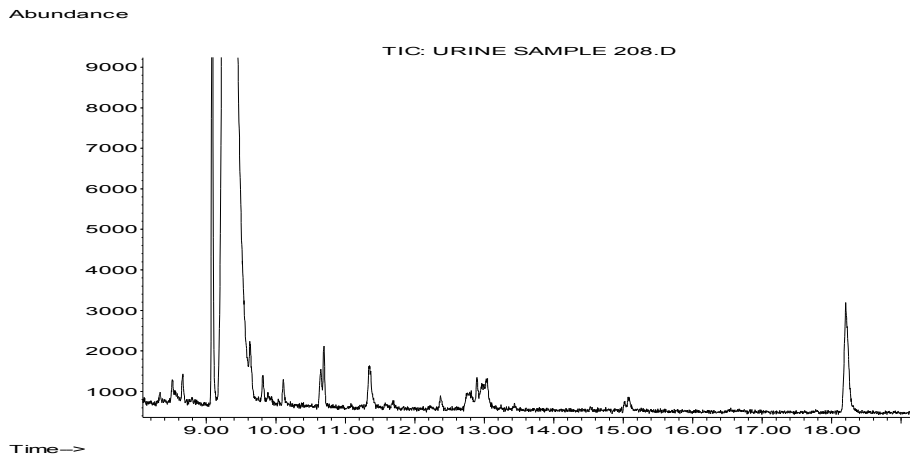
Δείγμα #11: Ενήλικη γυναίκα, μέλος ECPL



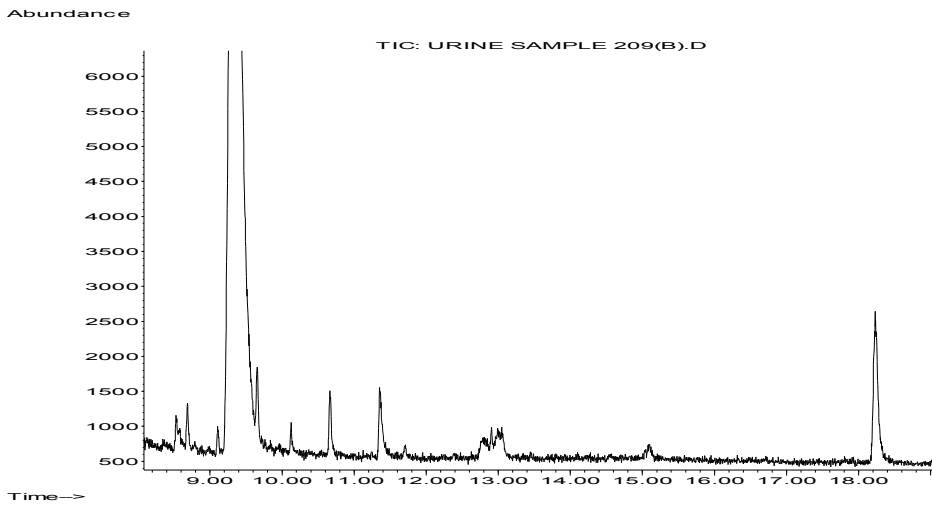
Δείγμα #12: Ενήλικη γυναίκα, μέλος ECPL



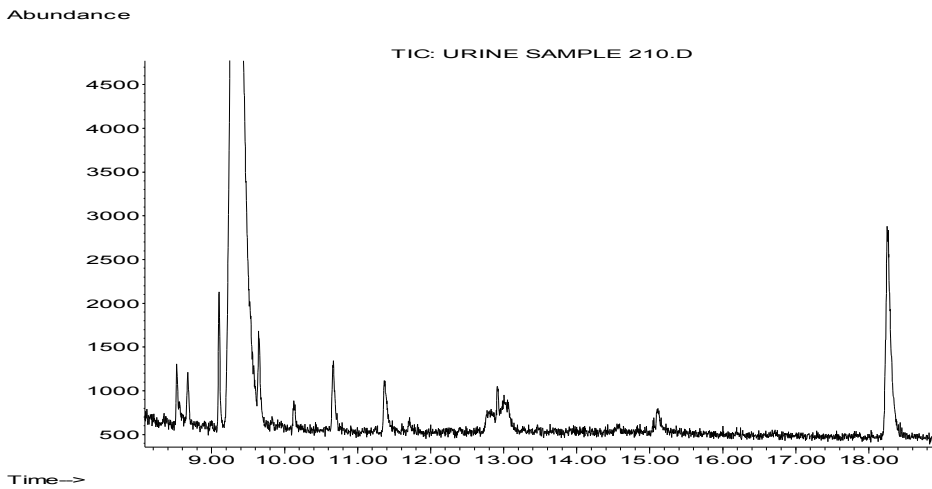
Δείγμα #13: Ενήλικη γυναίκα, μέλος ECPL



Δείγμα #14: Ενήλικη γυναίκα, μέλος ECPL



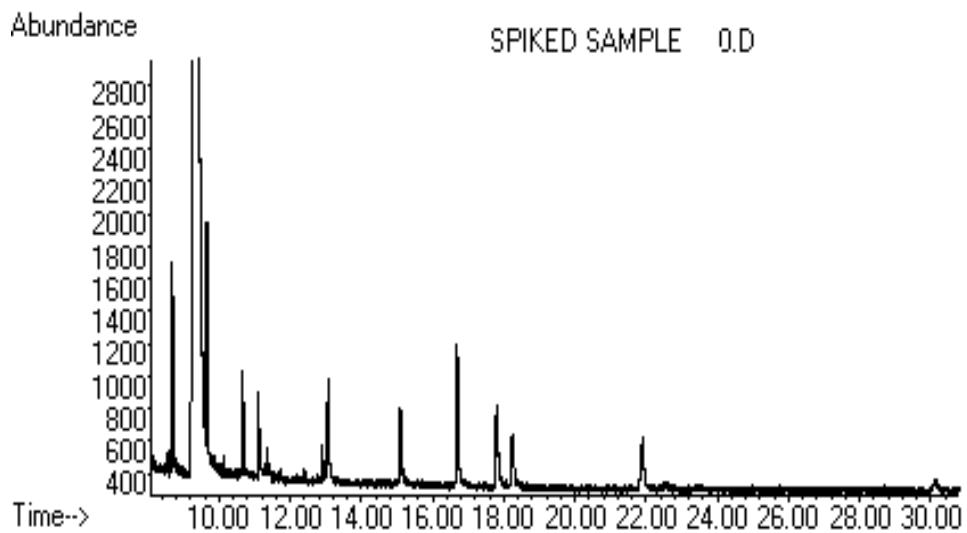
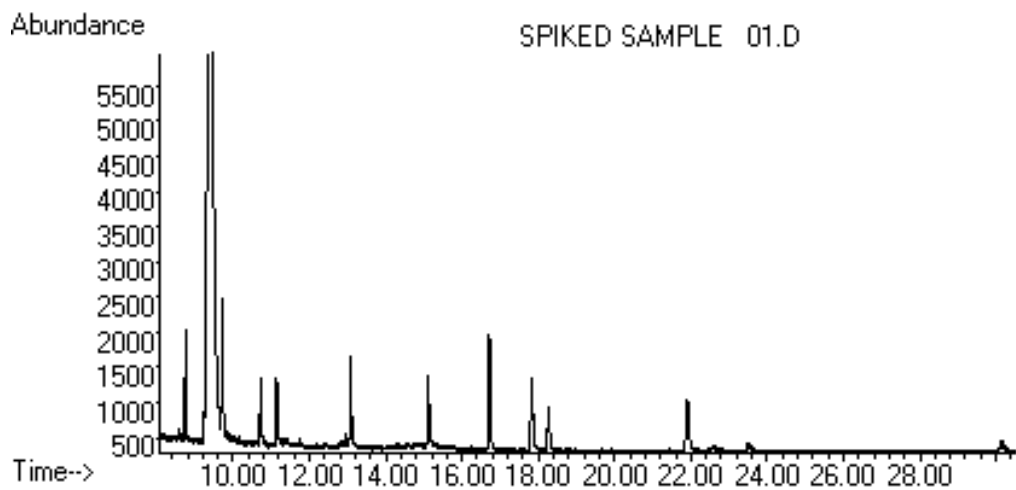
Δείγμα #15: Ενήλικας άνδρας, μέλος ECPL



Δείγμα #16: Ενήλικη γυναίκα, εργασία σε εργαστήριο

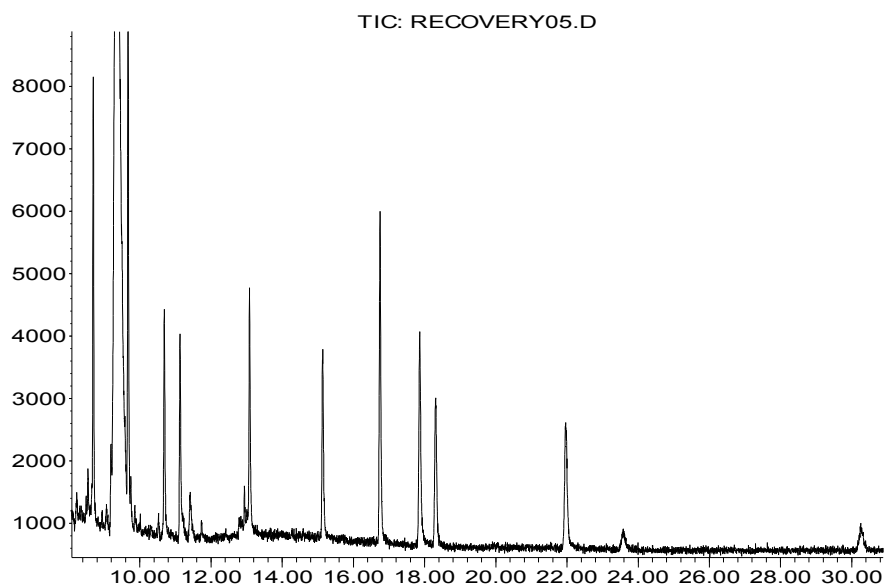
III. Παράρτημα Α-3: χρωματογραφήματα ανακτήσεων μεθόδων:

- Χρωματογραφήματα ανακτήσεων της μεθόδου 4.2.2.:

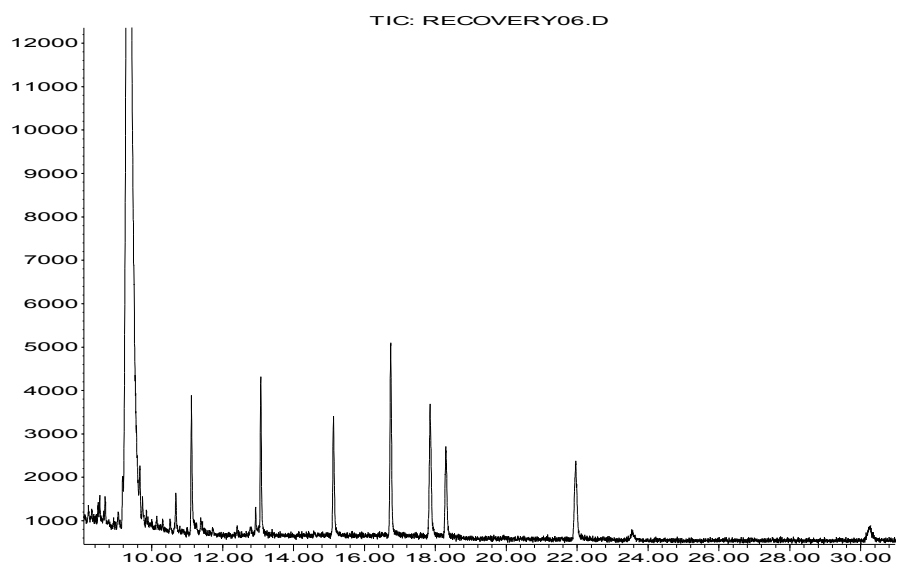


■ Χρωματογραφήματα ανακτήσεων της μεθόδου 4.2.3.:

Abundance

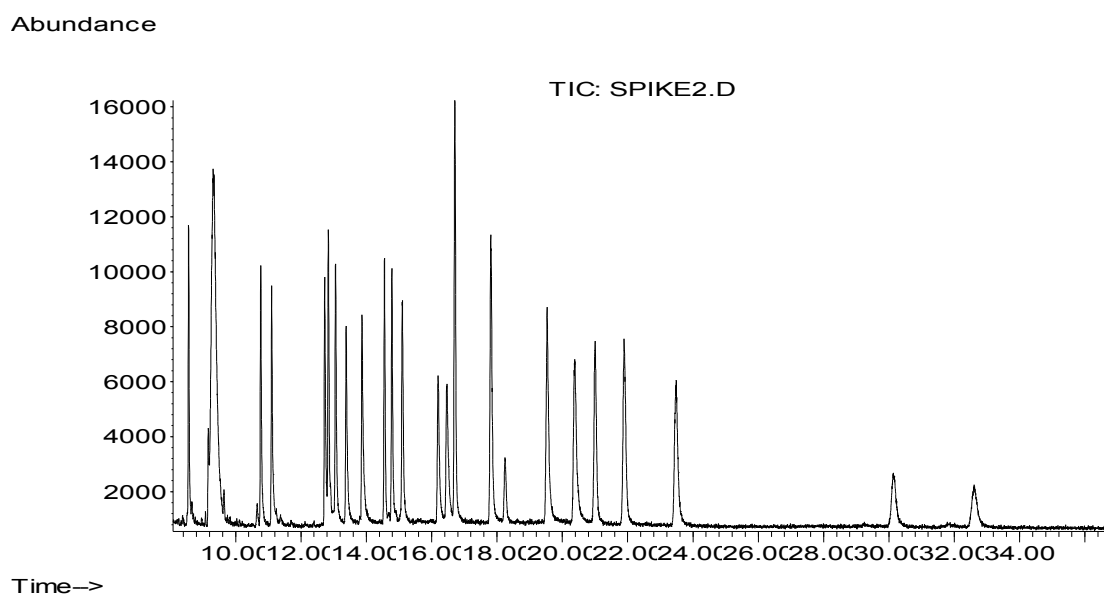
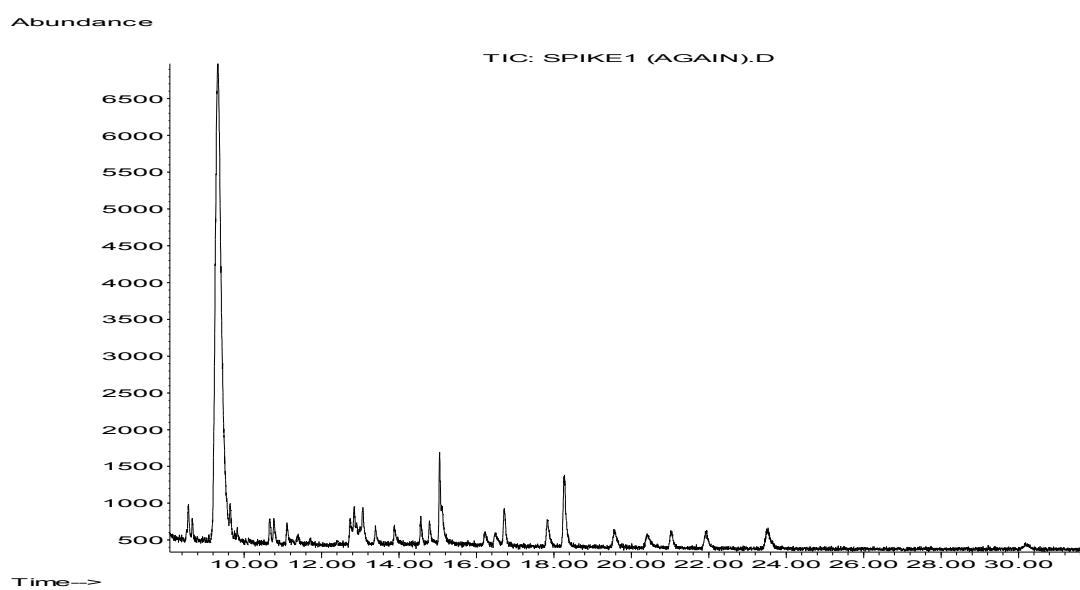


Abundance



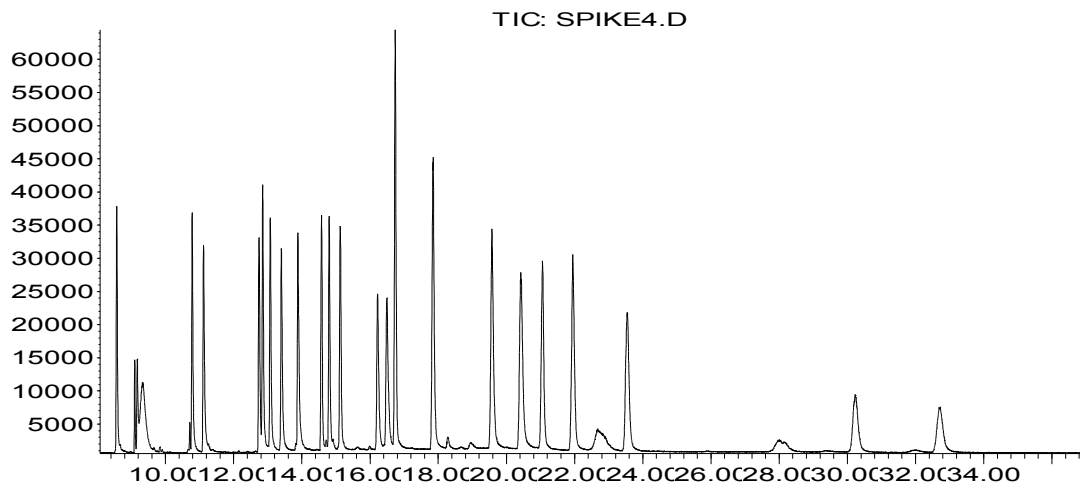
IV. Παράρτημα A-4: χρωματογραφήματα από εμβολιασμό PBDEs σε πραγματικό δείγμα και καμπύλες βαθμονόμησης για τους PBDEs σε αυτό το δείγμα:

- Χρωματογραφήματα από εμβολιασμό PBDEs σε πραγματικό δείγμα με βάση την επιλεγμένη μέθοδο 4.2.2.:



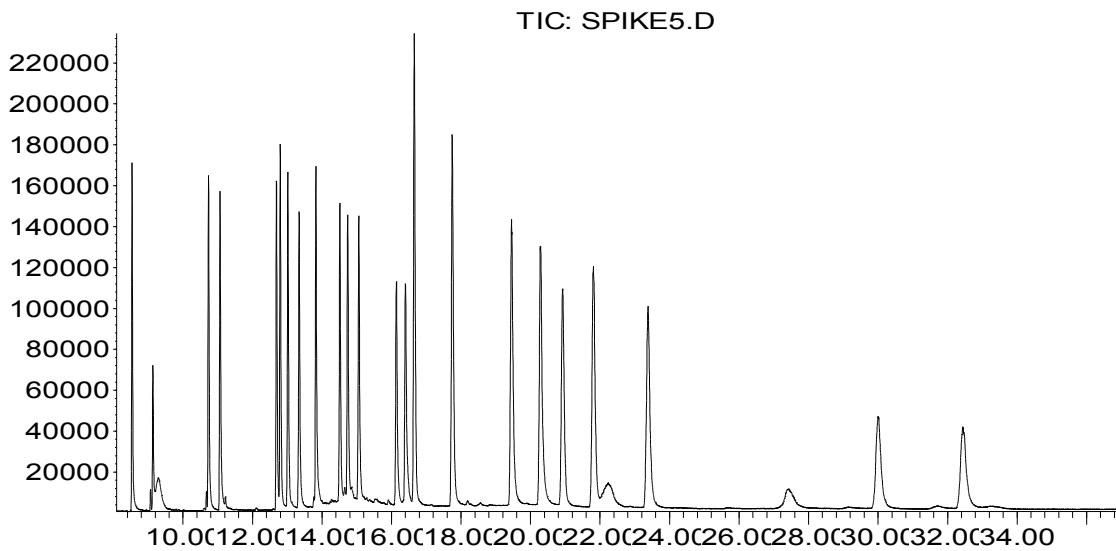
(Από εδώ και κάτω, οι τιμές αρίθμησης των εμβολιασμών -spike- είναι κατά ένα αριθμό μεγαλύτερες από αυτές που έχουμε βάλει στον συγκεντρωτικό μας πίνακα. Πχ. ο εμβολιασμός spike4 εδώ, αντιστοιχεί στην τιμή spike3 του Πίνακα 37).

Abundance



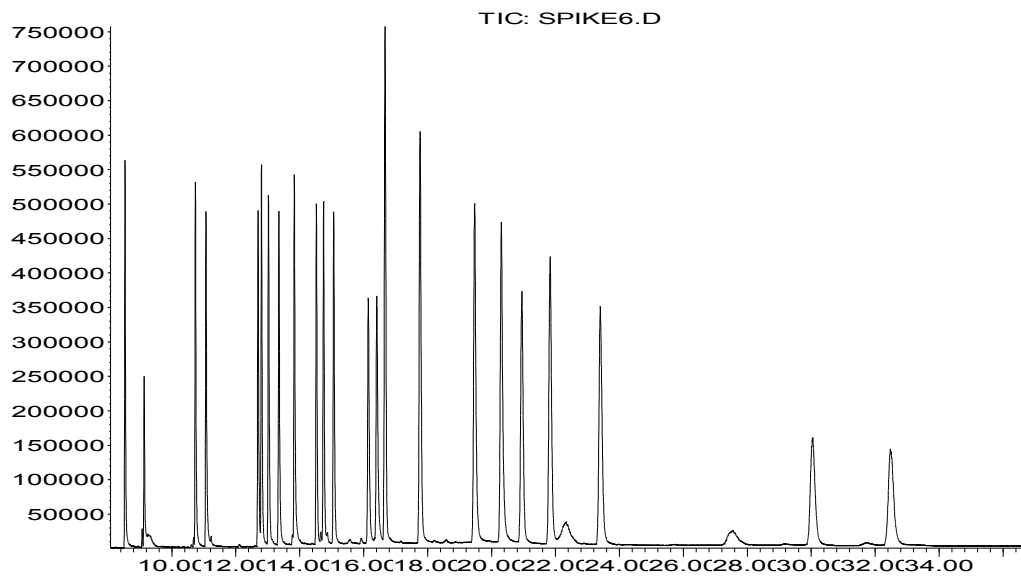
Time-->

Abundance

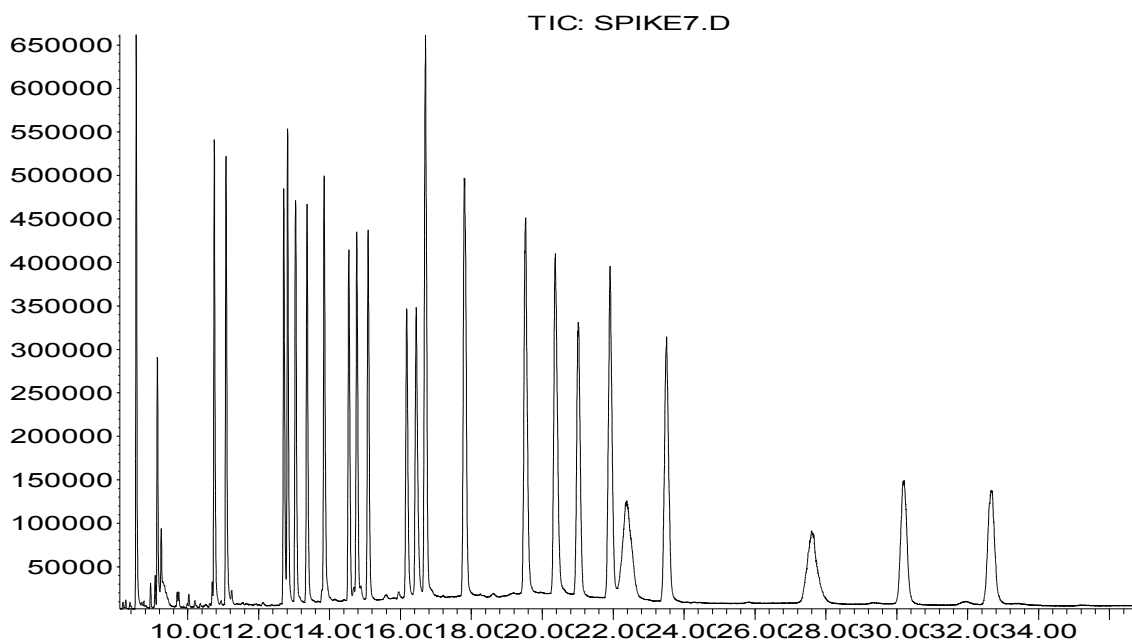


Time-->

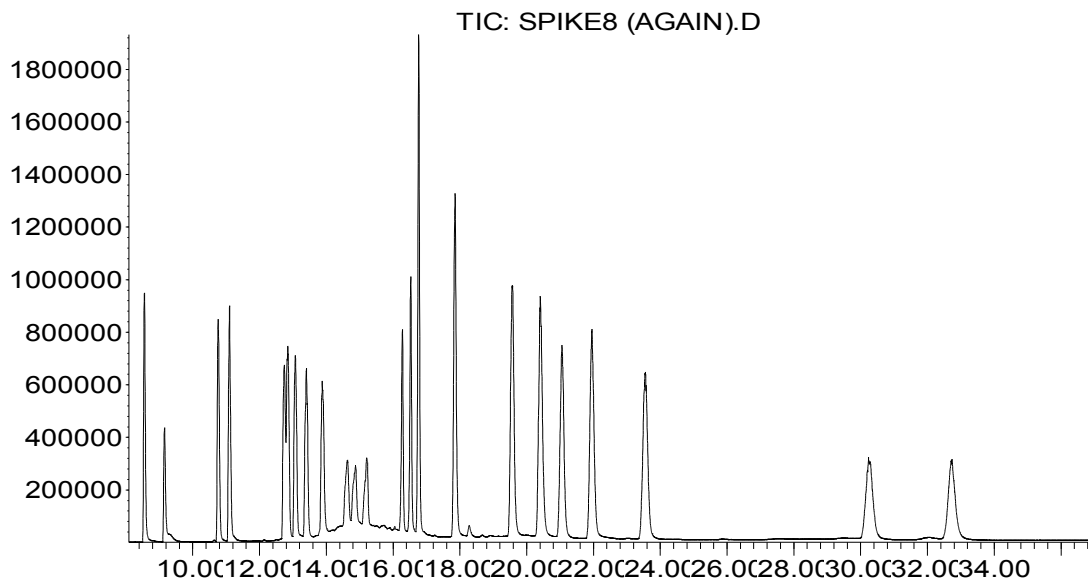
Abundance



Abundance



Abundance



Time→

- Καμπύλες βαθμονόμησης από εμβολιασμό PBDEs σε πραγματικό δείγμα με βάση την επιλεγμένη μέθοδο 4.2.2.:

