

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Π.Μ.Σ.: ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ  
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΩΝ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΑ ΟΥΡΑ  
ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΔΙΔΥΜΗΣ  
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΙΟΝΙΣΜΟ  
ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ**

**ΜΥΡΙΔΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΗΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΥΡΙΠΙΔΗΣ ΣΤΕΦΑΝΟΥ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011**

**UNIVERSITY OF CRETE – DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**MASTER OF SCIENCE DEGREE**

**ENVIRONMENTAL SCIENCE AND ENGINEERING**

**ENVIRONMENTAL CHEMICAL PROCESSES LABORATORY**

**QUANTITATIVE DETECTION OF URINARY PHTHALATE  
METABOLITES IN HUMANS USING LIQUID  
CHROMATOGRAPHY – ELECTROSPRAY IONIZATION  
TANDEM MASS SPECTROMETRY**

**MYRIDAKIS ANTONIS**

**SUPERVISOR PROFESSOR: EURIPIDES STEPHANOU**

**HERAKLION 2011**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Βούτες, Τ.Θ. 2208, 710 03 Ηράκλειο Κρήτης  
Τηλ.: +30 2810 545133, 5134 Fax: +30 2810 545166

Ηράκλειο, 28 Ιουλίου 2011

**Πρακτικά Εξεταστικής Επιτροπής**  
**του Μεταπτυχιακού Φοιτητή κ. Μυριδάκη Αντωνίου,**  
**για την Απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδικευσης**

Ο κος Μυριδάκης Αντώνιος, μεταπτυχιακός φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος» του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, παρουσίασε υπό μορφή σεμιναρίου σε ανοικτό ακροατήριο στις 28 Ιουλίου 2011 την ερευνητική του εργασία με τίτλο :

**«Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα με χρήση υγρής χρωματογραφίας-δίδυμης φασματομετρίας μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού»**

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή (η οποία ορίστηκε στις Γ.Σ.Ε.Σ. 7/12/2010) έκρινε την εν γένει παρουσίαση και ερευνητική εργασία της υποψήφιας «ΑΡΙΣΤΑ» και προτείνει ομόφωνα την απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδικευσης στις «Φυσικές Επιστήμες Περιβάλλοντος».

**Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Στεφάνου Ευριπίδης (Επιβλέπων)**  
Καθηγητής, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Περγαντής Σπυρίδων**  
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Θερμού Κυριακή**  
Καθηγήτρια, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### Μυριδάκης Αντώνης

Διεύθυνση κατοικίας: Κωνσταντινουπόλεως 10, Γιόφυρος, Ηράκλειο, Τ.Κ.: 71304.

Τηλέφωνα επικοινωνίας: 2810545014, 6974324047 E-mail: [met610@chemistry.uoc.gr](mailto:met610@chemistry.uoc.gr)

#### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ**

**2009-2011: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης** στις “Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος”, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Τίτλος μεταπτυχιακής διατριβής: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα με χρήση υγρής χρωματογραφίας-δίδυμης φασματομετρίας μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού. Βαθμός διατριβής: Άριστα Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Ευριπίδης Γ. Στεφάνου

Παρακολούθηση και επιτυχής εξέταση στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος των μαθημάτων:

Περιβαλλοντική Αναλυτική Χημεία I: Ανάλυση Οργανικών Ρυπαντών (9/10)

Περιβαλλοντική Αναλυτική Χημεία II: Ιόντα και Στοιχεία (8,5/10)

Φασματοσκοπία NMR: Θεωρία και εφαρμογές (9/10)

Φασματοσκοπία Υπερύθρου και RAMAN (9/10)

Χημεία και Φυσική της Ατμόσφαιρας: Κλιματικές Αλλαγές (9,5/10)

Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων (8,5/10)

Σεμινάριο: Νομικά Περιβάλλοντος

**2004-2009: Πτυχίο Χημείας**, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Βαθμός: 7,21/10 (Λίαν Καλώς)

Πτυχιακή Εργασία: Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός μονοκαρβοξυλικών και δικαρβοξυλικών οξέων σε αερολύματα περιοχής υποβάθρου της Ανατολικής Μεσογείου (Φινοκαλιά). Βαθμός: 10/10 Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Ευριπίδης Γ. Στεφάνου

**2001-2004: Ενιαίο Λύκειο Αγίου Νικολάου Κρήτης**

## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

**2009-.....** : Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα “Envirogenomarkers - Genomic Biomarkers of Environmental Health”

## **ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

**2009-2010 (Χειμερινό εξάμηνο)**: Βοηθός ασκήσεων προπτυχιακού μαθήματος Χημεία Περιβάλλοντος Ι: Υδατική Χημεία

**2010-2011 (Χειμερινό εξάμηνο)**: Προετοιμασία σεμιναρίου “Εφαρμογής υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με δίδυμη φασματομετρία μαζών στην ανάλυση μεταβολιτών φθαλικών εστέρων στα ανθρώπινα ούρα (Μεταπτυχιακό μάθημα: Περιβαλλοντική Αναλυτική Χημεία Ι: Ανάλυση Οργανικών Ρυπαντών )”

## **ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών

Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών και δίδυμη φασματομετρία μαζών

Φασματοσκοπία υπερύθρου

## **ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

**2010**: Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής 16<sup>ου</sup> Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Ελλάδας-Κύπρου

**2011**: Πρόεδρος Οργανωτικής Επιτροπής 17<sup>ου</sup> Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

## **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

**Αγγλικά**: First Certificate in English, University of Cambridge

**Γερμανικά**: Zertifikat Deutsch, Goethe Institut

## **ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ**

Πολύ καλή γνώση Windows 7, Internet, Office, Origin, ChemBioDraw, SPSS

## CURRICULUM VITAE

### Myridakis Antonis

*Home Adress: Konstantinoupoleos 10, Giofyros, Heraklion, EL-71304.*

*Telephone: 2810545014, 6974324047 E-mail: [met610@chemistry.uoc.gr](mailto:met610@chemistry.uoc.gr)*

#### **EDUCATION**

**2009-2011: Master of Science Degree** in “Environmental Science and Engineering”,  
Chemistry Department, Faculty of Sciences and Engineering, University of Crete.

M.Sc. Thesis: C detection of urinary phthalate metabolites in humans using liquid  
chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry Grade: Excellent  
Supervisor Professor: Dr. Euripides G. Stephanou

#### Courses:

Environmental Analytical Chemistry I: Analysis of Organic Pollutants (9/10)

Environmental Analytical Chemistry II: Ions and Elements (8,5/10)

NMR Spectroscopy: Theory and Applications (9/10)

IR and RAMAN Spectroscopy (9/10)

Atmospheric Chemistry and Physics: Climatic Changes (9,5/10)

Liquid Waste Processing (8,5/10)

Seminar: Environmental Legislation

**2004-2009: B.Sc. in Chemistry**, Faculty of Sciences and Engineering, University of Crete.

Grade: 7,21/10 (Very Good)

Diploma Thesis: Qualitative and quantitative detection of monocarboxylic and dicarboxylic  
acids in aerosol samples from a background area of Eastern Mediterranean (Finokalia).

Grade: 10/10 Supervisor Professor: Dr. Euripides G. Stephanou

**2001-2004: Agios Nikolaos High School, Crete**

## **RESEARCH EXPERIENCE**

**2009-.....** : Participation in research program “Envirogenomarkers - Genomic Biomarkers of Environmental Health”

## **TEACHING EXPERIENCE**

**2009-2010 (Winter semester)**: Teaching assistant at the courses of Environmental Chemistry I: Aquatic Chemistry

**2010-2011 (Winter semester)**: Preparation of seminar “Application of LC-MS/MS in analysis of phthalate metabolites in human urine (Postgraduate Course: Environmental Analytical Chemistry I: Analysis of Organic Pollutants)”

## **ANALYTICAL TECHNIQUES**

Gas chromatography-mass spectrometry

Liquid chromatography-mass spectrometry and –tandem mass spectrometry

IR spectroscopy

## **CONFERENCES**

**2010**: Member of Organizing Committee of 16<sup>th</sup> Hellenic and Cypriot Chemistry Post Grads Conference

**2011**: President of Organizing Committee of 17<sup>h</sup> Hellenic Chemistry Post Grads Conference

## **LANGUAGES**

**English**: First Certificate in English, University of Cambridge

**German**: Zertifikat Deutsch, Goethe Institut

## **COMPUTER SOFTWARE**

Windows 7, Internet, Office, Origin, ChemBioDraw, SPSS

## **Ευχαριστίες**

*Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών υπό την επίβλεψη του καθηγητή του Τμήματος Χημείας και πρύτανη του Πανεπιστημίου Κρήτης, Δρ. Ευριπίδη Στεφάνου. Ο κ. Στεφάνου είναι ο πρώτος που θα ήθελα να ευχαριστήσω, για αρκετά πράγματα, πέρα από ότι δέχτηκε να επιβλέψει τη διατριβή μου και θα πω μόνο ότι νιώθω πολύ τυχερός που είμαι μέλος του εργαστηρίου του.*

*Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δυο μέλη της επιτροπής που αξιολόγησε τη διατριβή μου, το Δρ. Σπύρο Περγαντή, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Χημείας και τη Δρ. Κυριακή Θερμού, καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη συμμετοχή τους στην επιτροπή και για τις συμβουλές τους.*

*Επίσης ευχαριστώ πολύ το Δρ. Μανόλη Κογεβίνα, ερευνητή και codirector του Centre for Research in Environmental Epidemiology, όπως και την ομάδα ΡΕΑ του Τομέα Κοινωνικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη συνεργασία στην παρούσα μελέτη.*

*Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει και στο Δρ. Αντώνη Κουβαράκη για τη στήριξη και βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, όπως και στη Χριστίνα Γκαϊτατζή για την ευχάριστη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια εκπόνησης των μεταπτυχιακών μας διατριβών.*

*Θα ήταν μεγάλη παράλειψη `να μην ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τη Δρ. Μαρία Αποστολάκη, την Τόνια Περράκη, τη Μαρίνα Διακομανόλη και ιδιέταιρα τη Δρ. Σοφία Καργάκη και το Μηνά Ιακωβίδη για το πολύ ευχάριστο και φιλικό κλίμα που επικρατεί πάντα στο εργαστήριο.*

*Τέλος, ευχαριστώ πάρα πολύ τη Νένα που με στηρίζει όλο αυτό το διάστημα και πάνω απ'όλα ευχαριστώ τη μητέρα και το θείο μου για όλα όσα έχουν κάνει και συνεχίζουν να κάνουν για μένα.*



## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή μιας μεθόδου ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε δείγματα ανθρώπινων ούρων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών με ηλεκτροψεκασμό (HPLC-ESI-MS/MS). Οι φθαλικοί διεστέρες χρησιμοποιούνται κυρίως σαν πλαστικοποιητές (πρόσθετα στα πλαστικά), βρίσκονται σε πάρα πολλά προϊόντα όπως και επίσης μέσω αυτών εκλύονται σε μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον.

Ο λόγος που αναπτύχθηκε αυτή η μέθοδος είναι η μελλοντική χρήση της, στην ανάλυση, για πρώτη φορά στην Ελλάδα και από τις πρώτες στην Ευρώπη, ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ανθρώπινων ούρων και εύρεση των επιπέδων των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες (biomarkers) έκθεσης σε φθαλικούς εστέρες στην περιβαλλοντική επιδημιολογία. Το ενδιαφέρον σε αυτές τις ενώσεις εστιάζεται στο ότι ενώ στα πειραματόζωα έχουν επιβεβαιωμένες δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία τους, στον άνθρωπο δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν προκαλούν παρόμοιες επιδράσεις.

Αναπτύχθηκε μια μέθοδος με ικανοποιητικά χαρακτηριστικά όπως η υψηλή διαχωριστική ικανότητα, η ευαισθησία, η επιλεκτικότητα, η επαναληψιμότητα, η ακρίβεια, οι υψηλές ανακτήσεις, οι συγκεντρώσεις των τυφλών δειγμάτων κάτω από τα όρια ανίχνευσης, η ικανότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων και ο σύντομος χρόνος ανάλυσης. Παρακολουθούνται έξι μεταβολίτες των φθαλικών εστέρων και τα όρια ανίχνευσης-ποσοτικοποίησης μεθόδου και οργάνου βρίσκονται στα χαμηλά ng/mL. Πραγματοποιήθηκαν δυο διεργαστηριακές συγκρίσεις της μεθόδου και τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά. Εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα για ανάλυση τόσο ελεύθερων (12 δείγματα) όσο και ολικών μεταβολιτών (24 δείγματα) και τα αποτελέσματα που μετρήθηκαν ήταν συγκρίσιμα με τη βιβλιογραφία.

## Abstract

The aim of this study was the development and application of an analytical method for the qualification and quantitation of phthalate ester metabolites in human urine samples using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization (HPLC-ESI-MS/MS). Phthalates are commonly used as plasticizers (additives in plastics), they are found in many products and via these are spread to the environment in high amounts.

The reason for the development of this method is its future use for the analysis and determination of phthalate metabolite levels in a large number of human urine samples for the first time in Greece and with only a few existing studies in Europe. The levels of phthalate metabolite concentrations are potential biomarkers of exposure in environmental epidemiology. Although it has been already shown in animals that exposure to phthalate esters causes defects, it is unclear whether human exposure results in adverse health effects.

A sensitive, accurate, repeatable, selective method with high recoveries and blank concentrations less than limits of detection, was developed for the monitoring of six phthalate metabolites. The analysis is rapid and it can be performed in number of samples. The instrumental and method limits of detection and quantification are in the low ng/mL levels. Two interlaboratory comparisons for the method were performed and the results were almost identical. The method was applied in real samples for analyzing both free (12 samples) and total (24 samples) phthalate metabolite. The results were comparable with literature reports.

# Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή .....	15
1.1	Φθαλικοί εστέρες .....	16
1.1.1	Δομή-Ονοματολογία.....	16
1.1.2	Χρήσεις-Εφαρμογές.....	18
1.1.3	Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	19
1.1.4	Κατανομή στο περιβάλλον .....	23
1.1.5	Τοξικότητα των φθαλικών .....	23
1.2	Μεταβολισμός των φθαλικών .....	26
1.2.1	Γενικά στοιχεία .....	26
1.2.2	DEP και DBP .....	27
1.2.3	DEHP και DiNP.....	28
1.3	Ενδοκρινικές διαταραχές στον άνθρωπο .....	29
1.4	Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε ανθρώπινα ούρα και άλλες μήτρες.....	32
1.5	Στόχοι της διατριβής.....	33
2	Πειραματικό μέρος .....	34
2.1	Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	34
2.2	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης .....	35
2.3	Διαδοχική φασματομετρία μαζών με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization tandem mass spectrometry).....	36
2.4	Τεχνική Σάρωσης με Παρακολούθηση Επιλεγμένης Αντίδρασης.....	38
2.5	Υλικά και Μέθοδοι.....	39
2.5.1	Πρότυπες ενώσεις .....	39
2.5.2	Αντιδραστήρια .....	39
2.5.3	Διαλύματα.....	40
2.5.4	Φυσίγγια(cartridges) για S.P.E.....	40
2.5.5	Ενόργανη Ανάλυση .....	40
2.6	Δειγματοληψίες .....	41
2.7	Επεξεργασία Δειγμάτων .....	41
3	Αποτελέσματα-Συζήτηση .....	43
3.1	Ανάπτυξη και Βελτιστοποίηση της μεθόδου.....	43
3.1.1	Υγρή Χρωματογραφία.....	43
3.1.2	Ηλεκτροψεκασμός, Επιλογή θυγατρικών ιόντων για την τεχνική S.R.M. και βελτιστοποίηση .....	49
3.1.3	Ισοτοπικές Αφθονίες Πρότυπων Ενώσεων.....	52
3.1.4	Ανακτήσεις και Τυφλά δείγματα .....	53
3.1.5	Όρια ανίχνευσης-Ποσοτικοποίησης Οργάνου και Μεθόδου .....	55
3.1.6	Ενζυμική Υδρόλυση.....	56
3.1.7	Έλεγχος Ύπαρξης Φαινομένου Μήτρας (Matrix Effect) .....	58
3.1.8	Ποσοτικοποίηση .....	59

3.1.9	Επαναληψιμότητα - Έλεγχος αξιοπιστίας κύκλων αναλύσεων- Διεργαστηριακά Πειράματα .....	60
3.2	Εφαρμογή Μεθόδου σε Πραγματικά Δείγματα .....	63
4	Συμπεράσματα .....	67
5	Βιβλιογραφία .....	69

## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Φθαλικοί διεστέρες και οι μεταβολίτες τους, που εστιάστηκε η παρούσα μελέτη .....	16
Πίνακας 2: Χρήσεις των πρόδρομων ενώσεων των μεταβολιτών της μελέτης.....	18
Πίνακας 3: Φυσικές ιδιότητες των πρόδρομων φθαλικών διεστέρων των μεταβολιτών που εστιάζεται η παρούσα μελέτη.....	19
Πίνακας 4: Καθοριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες για την κατανομή των φθαλικών διεστέρων στο περιβάλλον . .....	21
Πίνακας 6: Πιθανές επιπτώσεις των φθαλικών στον άνθρωπο (NTR-CERHR) .....	25
Πίνακας 7: Πλεονεκτήματα (+) και μειονεκτήματα (-) των βιοδεικτών του DEHP .....	29
Πίνακας 8: Συσχέτιση μεταξύ της απέκκρισης των επιπέδων των μητρικών φθαλικών και των δεικτών της αναπαραγωγικής υγείας των βρεφών .....	32
Πίνακας 9: Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης.....	45
Πίνακας 10: Αρχικό βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διάρκειας 15 min. ....	46
Πίνακας 11: Παράμετροι λειτουργίας αυτόματου δειγματολήπτη.....	48
Πίνακας 12: Επιλεγμένες αντιδράσεις αναλυόμενων ενώσεων.....	50
Πίνακας 13: Ανακτήσεις των αναλυόμενων ενώσεων.....	54
Πίνακας 14: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου των αναλυόμενων ενώσεων	55
Πίνακας 15: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου των αναλυόμενων ενώσεων	56
Πίνακας 16: Διεργαστηριακή σύγκριση G-EQUAS 46 .....	62
Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις σε ελεύθερους μεταβολίτες σε ng/mL 12 δειγμάτων. ....	63
Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις σε ολικούς μεταβολίτες σε ng/mL 24 δειγμάτων και σύγκριση με βιβλιογραφικές αναφορές. ....	64

## Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1:Γενική Δομή Φθαλικών Εστέρων.....	16
Εικόνα 2: Δομές μεταβολιτών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και των πρόδρομων διεστέρων τους .....	17
Εικόνα 3: Γενικό μεταβολικό μονοπάτι των φθαλικών.....	26
Εικόνα 4: Μεταβολισμός του DEHP. Οι κύριοι μεταβολίτες του είναι τονισμένοι. ....	28
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της εκχύλισης στερεάς φάσης .....	35
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ιονισμού σε πηγή ηλεκτροψεκασμού .....	37
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του αναλυτή μαζών με σύστημα τριών τετραπόλων..	38
Εικόνα 8: Γενική δομή ιχνηθετημένων μεταβολιτών των φθαλικών διεστέρων.....	39
Εικόνα 9A: Χρωματογράφημα μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε πραγματικό δείγμα ούρων. ....	43
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση του βαθμιδωτού προγράμματος έκλυσης .....	45
Εικόνα 11A: Χρωματογράφημα διαλύματος προτύπων ενώσεων και των επισημασμένων αναλόγων τους (με πλάγια γράμματα) με το αρχικό βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλυσης. ....	47
Εικόνα 12: Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης του mEHP, ληφθέν με απευθείας έγχυση. ....	49
Εικόνα 13: Διάγραμμα συσχέτισης σχετικής έντασης των 4 αφθονότερων θυγατρικών ιόντων του mEHP σε σχέση με την ενέργεια πρόσκρουσης. ....	51
Εικόνα 14: Χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος με τις τελικές βελτιστοποιήσεις στη μέθοδο. ....	52
Εικόνα 15:Τυπικό χρωματογράφημα τυφλού δείγματος. ....	53
Εικόνα 16:Χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος (με προσθήκη ενζύμου).....	57
Εικόνα 17:Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος στο οποίο δεν προστέθηκε ένζυμο. ....	58
Εικόνα 18: Καμπύλες βαθμονόμησης του mEP διαλυμένου σε νερό και σε αναλυμένο δείγμα.....	59
Εικόνα 19: Χρωματογράφημα εμβολιασμένου υπερκάθαρου νερού.....	61
Εικόνα 20: Διεργαστηριακή σύγκριση με την Ιατρική σχολή του πανεπιστημίου Lund .....	62
Εικόνα 21: Κατανομή συγκεντρώσεων ολικών μεταβολιτών φθαλικών εστέρων σε 12 δείγματα.....	65

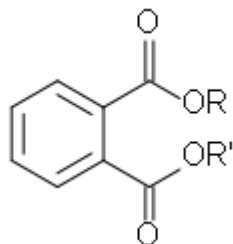
# 1 Εισαγωγή

Οι φθαλικοί εστέρες είναι όρθο-διεστέρες του φθαλικού οξέως και χρησιμοποιούνται κυρίως σαν πλαστικοποιητές. Επίσης περιέχονται σαν πρόσθετα σε ένα μεγάλο εύρος προϊόντων, όπως καλλυντικά, φάρμακα και φυτοφάρμακα. Είναι συνθετικές ενώσεις και χρησιμοποιούνται σε παγκόσμια κλίμακα αρκετές δεκαετίες [1,2,3]. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες όπως και οι εφαρμογές τους εξαρτώνται κυρίως από τις εστερικές ομάδες που φέρουν. Με την προσθήκη τους στα πλαστικά, προσφέρουν ευκαμψία, επεξεργασιμότητα και αντοχή. Παρόλα αυτά εκλύονται στο περιβάλλον σε μεγάλες ποσότητες και αποτελούν τους πιο άφθονους τεχνητούς ρυπαντές. Ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή με τους φθαλικούς εστέρες μέσω της κατάποσης, της εισπνοής, της δερματικής επαφής και προγεννητικά κατά τη διάρκεια της εμβρυακής ανάπτυξης [4,5].

Πειράματα σε αρουραίους έχουν δείξει σοβαρότατες επιδράσεις στην υγεία τους, προκαλώντας καρκίνο στο ήπαρ, αναπτυξιακές και αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες. Ακόμα δεν έχει αποδειχθεί αν οι φθαλικοί εστέρες επιδρούν στην ανθρώπινη υγεία με αντίστοιχο τρόπο και γι' αυτό υπάρχει ανάγκη εύρεσης των επιπέδων έκθεσης σε μεγάλα τμήματα του γενικού πληθυσμού. Οι φθαλικοί διεστέρες όταν εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό (όπως και στον αρουραίο) μεταβολίζονται ταχύτατα στους αντίστοιχους μονοεστέρες και απομακρύνονται κυρίως μέσω των ούρων και των κοπράνων. Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών αυτών στα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βιοδείκτες (biomarkers) έκθεσης σε φθαλικούς διεστέρες και είναι αξιοσημείωτο ότι η βιβλιογραφία είναι ιδιαίτερα περιορισμένη στην Ευρώπη [4,6], με τον κύριο όγκο των εργασιών να αφορά στις Η.Π.Α. [1,2,3].

## 1.1 Φθαλικοί εστέρες

### 1.1.1 Δομή-Ονοματολογία



Εικόνα 1:Γενική Δομή Φθαλικών Εστέρων

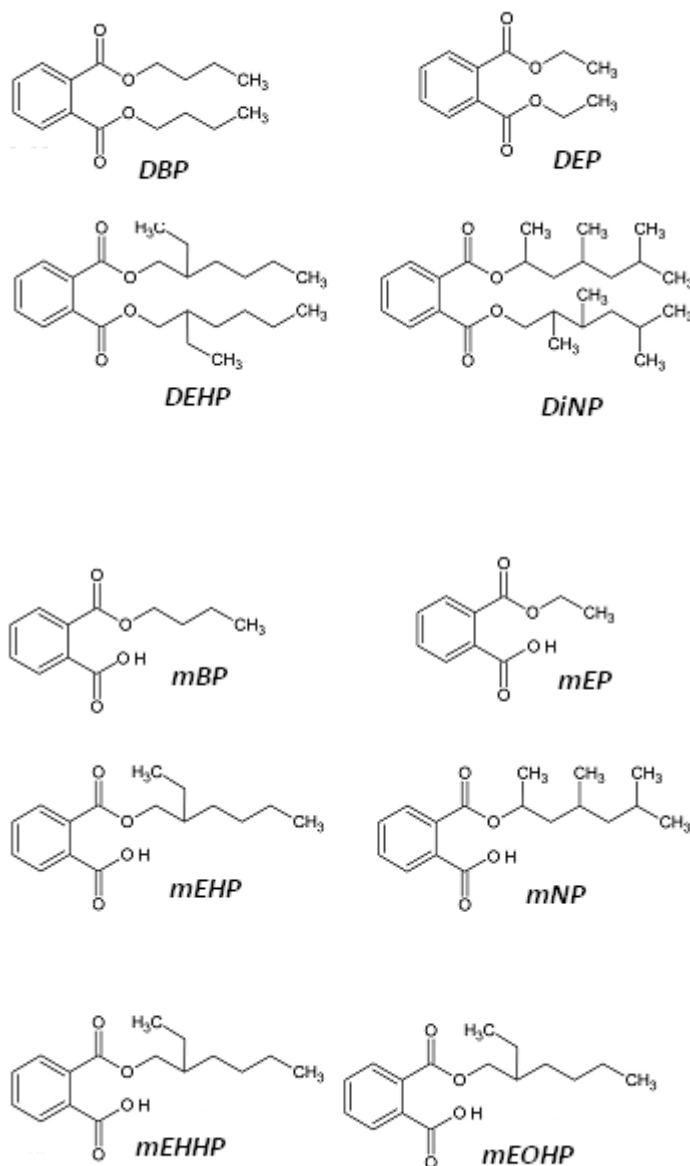
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι φθαλικοί εστέρες είναι όρθο-διστέρες του φθαλικού οξέως με τη γενική δομή τους να παρατίθεται στην Εικόνα 1.

Πίνακας 1: Φθαλικοί διστέρες και οι μεταβολίτες τους, που εστιάστηκε η παρούσα μελέτη

Φθαλικός διστέρας	Συντομογραφία	Μεταβολίτης	Συντομογραφία
Φθαλικός διαιθυλεστέρας	DEP	Φθαλικός αιθυλεστέρας	mEP
Φθαλικός διβουτυλεστέρας	DBP	Φθαλικός βουτυλεστέρας	mBP
Φθαλικός διστέρας της 2-αιθυλο-εξανόλης	DEHP	Φθαλικός εστέρας της 2-αιθυλο-εξανόλης	mEHP
		Φθαλικός εστέρας της 2-αιθυλο-5-υδρόξυ-εξανόλης	mEHHP ή 5OH-mEHP
		Φθαλικός εστέρας της 2-αιθυλο-5-οξο-εξανόλης	mEOHP ή 5oxo-mEHP
Φθαλικός διστέρας της ισο-εννεαόλης	DiNP	Φθαλικός εστέρας της υδρόξυ-ισο-εννεαόλης	mNP



Στον Πίνακα 1 παρατίθενται οι φθαλικοί διεστέρες, πρόδρομες ενώσεις των μεταβολιτών που εστιάστηκε η παρούσα διατριβή και στην Εικόνα 2 οι δομές τους, όπως και οι δομές των μεταβολιτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διεστέρες που παρατίθενται είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενοι στην Ευρώπη [4].



**Εικόνα 2:** Δομές μεταβολιτών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και των πρόδρομων διεστέρων τους

### 1.1.2 Χρήσεις-Εφαρμογές

Οι φθαλικοί εστέρες χαμηλού μοριακού βάρους και με μικρές διακλαδώσεις όπως ο φθαλικός διαιθυλεστέρας (DEP) χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στα καλλυντικά. Το DEP έχει βρεθεί σχεδόν σε όλα τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας για βρέφη, παιδιά και ενήλικους. Επιπλέον, το DBP είναι σύνθετος πρόσθετος σε καλλυντικά για ενήλικους όπως τα αρώματα, τα σαμπουάν και τα προϊόντα περιποίησης νυχιών [4, 7].

**Πίνακας 2:** Χρήσεις των πρόδρομων ενώσεων των μεταβολιτών της μελέτης

Φθαλικοί διεστέρες	Χρήσεις
Φθαλικός διαιθυλεστέρας (DEP)	Προϊόντα προσωπικής φροντίδας, καλλυντικά
Φθαλικός διβουτυλεστέρας (DBP)	Πλαστικά PVC, κόλλες, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, καλλυντικά, βαφές
Φθαλικός διεστέρας της 2-αιθυλοεξανόλης (DEHP)	Οικοδομικά υλικά (ταπετσαρίες, καλώδια, μονωτικά υλικά), προϊόντα αυτοκινήτων (ταπετσαρίες, καθίσματα), ρουχισμός (παπούτσια, αδιάβροχα), συσκευασίες τροφίμων, παιχνίδια, ιατρικές συσκευές
Φθαλικός διεστέρας της ισοεννεανόλης (DiNP)	Μάνικες κήπων, πισίνες, πλακάκια, παιχνίδια

Οι φθαλικοί εστέρες υψηλού μοριακού βάρους όπως ο φθαλικός βουτυλοβενζυλεστέρας (BBzP), το DEHP, και το DiNP αλλά και το DBP χρησιμοποιούνται σε πλαστικά, όπως τα δάπεδα από βινύλιο, οι βαφές και άλλα οικοδομικά υλικά, σε παιχνίδια, πλαστικές σακούλες, γάντια, παπούτσια και σε απομιμήσεις δέρματος. Επί πρόσθετα, το DEHP χρησιμοποιείται σαν πλαστικοποιητής σε κάποιες ιατρικές συσκευές όπως οι φιάλες αίματος και οι ενδοφλέβιοι σωλήνες [4]. Επίσης χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι μερικά μαλακά πλαστικά περιέχουν έως 40% DEHP [8]. Στην Ευρώπη, τα περισσότερα τρόφιμα που έρχονται σε επαφή με πλαστικά περιέχουν DEHP και DBP, ενώ το DEHP περιέχεται σε δημητριακά, ψωμί, κέικ, ξηρούς καρπούς, μπαχαρικά, λάδι σε ποσότητες περίπου μέχρι και τα 10mg/kg[4]. Αξίζει να σημειωθεί ότι παγκοσμίως παράγονται περισσότεροι από 8 δισεκατομμύρια τόνοι φθαλικών διεστέρων ετησίως, από τα οποία τα 3-4 εκατομμύρια τόνων αντιστοιχούν στην παραγωγή του DEHP [9]. Το 2003, περισσότεροι από 800.000

τόνοι φθαλικών χρησιμοποιήθηκαν στη Δυτική Ευρώπη, 24% DEHP και παραπάνω από 50% DiNP και DIDP ( φθαλικός διεστέρας της ισο-δεκανόλης) [10].

Τελικά, σχεδόν όλα τα βιομηχανικά καταναλωτικά προϊόντα περιέχουν φθαλικούς εστέρες ή ίχνη τους. Παρόλο που οι συγκεκριμένες ουσίες μεταβολίζονται πολύ γρήγορα, η επιμόλυνση του περιβάλλοντος είναι σημαντική εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης τους και της παρουσίας των φθαλικών χαμηλού άλλα και υψηλού μοριακού βάρους στη σκόνη, στο έδαφος και στον αέρα [4,8,11].

### 1.1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φθαλικών εξαρτώνται κυρίως από το μήκος και τις διακλαδώσεις των πλευρικών αλυσίδων που φέρουν. Ο υδρόφοβος χαρακτήρας τους αυξάνεται με την αύξηση του μήκους των αλυσίδων, και ο αριθμός των ισομερών αυξάνεται με την αύξηση της πολυπλοκότητας των αλυσίδων. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οι ενώσεις αυτές είναι υγρές και σχεδόν όλες έχουν σημείο τήξης χαμηλότερο από τους -25°C. Επίσης έχουν σημείο βρασμού το οποίο κυμαίνεται από 230 °C μέχρι 486 °C. Οι φθαλικοί εστέρες με μεγάλο μοριακό βάρος έχουν σημείο βρασμού που πρέπει να υπολογιστεί σε συνθήκες χαμηλών πιέσεων ώστε να αποτραπεί η θερμική διάσπασή τους. Τα χαμηλά σημεία τήξης και ταυτόχρονα τα υψηλά σημεία βρασμού συνεισφέρουν στην χρησιμότητά τους σαν πλαστικοποιητές και σαν υγρά μέσα μεταφοράς θερμότητας.

**Πίνακας 3:** Φυσικές ιδιότητες των πρόδρομων φθαλικών διεστέρων των μεταβολιτών που εστιάζεται η παρούσα μελέτη.

Φθαλικός εστέρας	Χημικός τύπος	Μήκος αλυσίδας αλκυλίου (Αριθμός ατόμων C)	Μοριακό Βάρος (Dalton)	Σημείο τήξης (°C)	Ειδικό βάρος (g/mL)
DEP	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	2	222.2	-40	1.118
DBP	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	4	278.4	-35	1.042
DEHP	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	8	390.6	-47	0.986
DiNP	C <sub>26</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9	418.6 (418.6-432.6)	-48	0.97

Για το DiNP που είναι μίγμα ισομερών φθαλικών διεστέρων της ισοεννανόλης, δίνεται ο χημικός τύπος του πιο αντιπροσωπευτικού ισομερούς και το εύρος των μοριακών βαρών [12,13,14].

Η διαλυτότητα στο νερό είναι ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα, η οποία επηρεάζει την πιθανότητα βιοδιάσπασης και βιοσυσσώρευσης μιας χημικής ουσίας, καθώς και την τοξικότητα της. Επίσης, η διαλυτότητα είναι ένας καθοριστικός παράγοντας που ελέγχει την κατανομή των χημικών ουσιών στο περιβάλλον.

Ωστόσο, ο υπολογισμός της διαλυτότητας υδρόφοβων ουσιών είναι αρκετά περίπλοκος αφού περιπλέκονται διάφορα πειραματικά προβλήματα. Στην περίπτωση των φθαλικών διεστέρων, η αδυναμία να διαχωριστούν τα κολλοειδή γαλακτώματα από το υδατικό διάλυμα είναι ένα αρχικό πρόβλημα που εμποδίζει τον ακριβή υπολογισμό της διαλυτότητας [15]. Επίσης υπάρχει επιμόλυνση από τη χρήση πλαστικών στο εργαστήριο και επίσης ,από τη στιγμή, που οι φθαλικοί εστέρες υψηλού μοριακού βάρους έχουν χαμηλότερη πυκνότητα από το νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα στην επιφάνεια τους, οπότε καθίσταται δύσκολη η μεταφορά υδατικών διαλυμάτων δια μέσου των στρωμάτων αυτών [13].

Γνωρίζοντας τα παραπάνω προβλήματα, στον Πίνακα 4 συνοψίζονται οι διαλυτότητες των φθαλικών στο νερό. Στα αποτελέσματα φαίνεται για τους φθαλικούς εστέρες χαμηλού μοριακού βάρους μια τάση μείωσης της διαλυτότητας καθώς αυξάνεται ο αριθμός των ανθράκων στο τμήμα OR' του διεστέρα.

Σε αντίθεση, οι φθαλικοί εστέρες υψηλού μοριακού βάρους δεν φαίνεται να εμφανίζουν παρόμοια τάση. Επί πλέον, μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες, συχνά, διαφέρουν αρκετές τάξεις μονάδων. Πιο πρόσφατες μετρήσεις είναι κατά ένα μεγάλο ποσοστό σύμφωνες με τις θεωρητικές προβλέψεις που βασίζονται στη δομή των μορίων. Ο λιπόφιλος ή όχι χαρακτήρας μιας ένωσης μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την περιβαλλοντική της συμπεριφορά (πιθανότητα ενσωμάτωσης ή πρόσληψης από οργανισμούς, προσρόφησης σε στερεά που περιέχουν οργανική ύλη κ.α.). Αυτή η ιδιότητα μπορεί να προσεγγιστεί μέσω της τάσης μιας ένωσης να κατανέμεται μεταξύ οκτανόλης και νερού.

Ένας απλός, αξιόπιστος και ακριβής τρόπος υπολογισμού του συντελεστή λιποφιλίας, ενώσεων με μικρή διαλυτότητα και υδρόφοβων όπως οι φθαλικοί διεστέρες είναι η μέθοδος “αργής ανάδευσης” [16,17,18]. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει το σχηματισμό ισορροπίας μειώνοντας ταυτόχρονα τον σχηματισμό γαλακτωμάτων.

**Πίνακας 4:** Καθοριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες για την κατανομή των φθαλικών διεστέρων στο περιβάλλον [19].

Ένωση	Log συντελεστή κατανομής Οκτανόλης-Νερού(Kow)		Διαλυτότητα στο νερό (mg/L)		Τάση ατμών (mm Hg, 25°C)	
DEP	2.21	2.42	260 [20]	1080		
	2.21	2.47	400 [21]	1160-1240 20 °C	4.8 10 <sup>-5</sup>	
	2.24	2.51 [21]	680	1340-1400 30 °C	3.9 10 <sup>-4</sup>	
	2.29	2.65 [20]	720	7028	6.1 10 <sup>-4</sup>	
	2.35	2.67	896		8.1 10 <sup>-4</sup>	
	3.00		928	1100*	1.2 10 <sup>-3</sup>	
		2.38*			1.65 10 <sup>-3</sup>	
					5.0 10 <sup>-3</sup> [20]	
					1.0 10 <sup>-3*</sup>	
DnBP	3.74	4.57	1.5 [20]	10.5-11.1 20 °C	9.3 10 <sup>-6</sup>	4.1 10 <sup>-5</sup>
	4.08	4.61 [20]	3.2	11.2-11.5 30°C	1.7 10 <sup>-5</sup>	7.3 10 <sup>-5</sup>
	4.11	4.63 [21]	3.25	11.2	1.9 10 <sup>-5</sup>	1.2 10 <sup>-4</sup>
	4.13	4.72	4.9 [21]	13.0	2.08 10 <sup>-5</sup>	2.5 10 <sup>-4</sup> [20]
	4.30	4.72	8.7-9.6		2.7 10 <sup>-5</sup>	
	4.39	4.79	10.1	11.2*	3.5 10 <sup>-5</sup>	2.7 10 <sup>-5*</sup>
	4.50	5.15			3.6 10 <sup>-5</sup>	
	4.56					
		4.45*				
DEHP	4.20-5.22	7.54 [21]	0.0006	0.285	4.1 10 <sup>-8</sup>	<3.4 10 <sup>-7</sup>
	5.11	7.80 8.90	0.0011 [20]	0.34	4.5 10 <sup>-8</sup>	3.8 10 <sup>-7</sup>
	7.06	7.86-8.15	0.041	0.40	7.2 10 <sup>-8</sup>	7.1 10 <sup>-7</sup>
	7.14±0.15	7.94	0.16	0.40	9.8 10 <sup>-8</sup>	6.4 10 <sup>-6</sup>
	7.27	8.06	0.27-0.36	1.16	2.8 10 <sup>-7</sup>	1.4 10 <sup>-6</sup> [20]

**Πίνακας 4(Συνέχεια):** Καθοριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες για την κατανομή των φθαλικών στο περιβάλλον[19].

Ένωση	Log συντελεστή κατανομής Οκτανόλης-Νερού(Kow)		Διαλυτότητα στο νερό (mg/L)	Τάση ατμών (mm Hg, 25°C)		
DEHP	7.45	8.39 [20]		1.2	$3.3 \cdot 10^{-7}$	$1.4 \cdot 10^{-4}$
	7.45±0.006					
		7.50 *		0.003 *		$1.0 \cdot 10^{-7} *$
DiNP	>8.0 *	9.4 [20]	$7.8 \cdot 10^{-5}$ [21]	0.0006	$<1.0 \cdot 10^{-1}$	$5.4 \cdot 10^{-7}$
	9.0		$2.3 \cdot 10^{-5}$ [20]	0.20	$2.3 \cdot 10^{-7}$ [20]	
						$5.0 \cdot 10^{-7} *$
				<0.001 *		

\*:προτεινόμενη τιμή

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4 για φθαλικούς εστέρες χαμηλού μοριακού βάρους, (π.χ. DEP και DBP) εμφανίζονται αρκετά σταθερές τιμές. Όσο αυξάνεται το μέγεθος της αλκυλικής αλυσίδας, το  $\log K_{ow}$  αυξάνεται, υποδεικνύοντας την αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα. Το DEHP αποτελεί ένα από τους φθαλικούς εστέρες υψηλού μοριακού βάρους που έχουν μελετηθεί περισσότερο. Το  $\log K_{ow}$  έχει υπολογιστεί 7.54 με χρήση HPLC [12], ενώ με χρήση της μεθόδου “αργής- ανάδευσης” υπολογίστηκε από 7.14 έως 7.45 [16, 17, 18]. Η EPA U.S έχει υπολογίσει το  $\log K_{ow}$  7.54 βασιζόμενοι στη μοριακή του δομή με χρήση του μοντέλου SPARK[21]. Οι τιμές  $\log K_{ow}$  για φθαλικούς εστέρες με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από του DiNP κυμαίνονται από 9 έως 13 [21].

Η τάση ατμών παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην πορεία των εκπομπών των φθαλικών. Συνήθως, υπολογίζεται με απευθείας μέτρηση της πίεσης σε αυξανόμενες θερμοκρασίες. Με τα συγκεκριμένα αποτελέσματα και χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις Clausius-Clapeyron ή Antoine είναι δυνατός ο υπολογισμός της τάσης ατμών. Οι τιμές της τάσης ατμών που αναφέρεται στη βιβλιογραφία παρατίθενται στον Πίνακα 4. Παρότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις σε επίπεδα κάποιων τάξεων μεγέθους, υπάρχει μια γενική τάση ότι η τάση ατμών των φθαλικών μειώνεται περισσότερο από τέσσερις τάξεις μεγέθους καθώς αυξάνεται το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας.

#### **1.1.4 Κατανομή στο περιβάλλον**

Εξαιτίας της τεράστιας χρήσης των φθαλικών σε πολυάριθμα προϊόντα και της ικανότητας τους να κατανέμονται σε διάφορα μέρη στο περιβάλλον, ανιχνεύονται όχι μόνο σε τρόφιμα και προϊόντα ευρείας κατανάλωσης αλλά και στο εσωτερικό περιβάλλον των σπιτιών, με αποτέλεσμα την επιμόλυνση της οικιακής σκόνης και του αέρα στο εσωτερικό των σπιτιών .

Στην οικιακή σκόνη, τα επίπεδα των DEHP και DiNP υπερέβαιναν αυτά των υψηλά πτητικών φθαλικών όπως των DEP και DBP. Σε διάφορες έρευνες, βρέθηκαν μεσαία επίπεδα στα: DEP<10mg/kg, DBP 40-50mg/kg και DEHP 400-700mg/kg [22,23,24,25]. Για τον εσωτερικό αέρα των σπιτιών όμως, αυτές οι σχέσεις είναι αντίστροφες, και τα επίπεδα είναι: DEP>350-650ng/m<sup>3</sup>, DBP 600-1200ng/m<sup>3</sup> και DEHP 150-450ng/m<sup>3</sup> [23,26,27].

Για βρέφη και νήπια, τα παιχνίδια που περιέχουν φθαλικούς εστέρες είναι μια πιθανή πηγή ρύπανσης μέσω της εισαγωγής των παιχνιδιών στο στόμα. Οι εκτιμήσεις της έκθεσης στο DiNP κυμαίνονται από 5 έως 44μg/kg βάρους σώματος/ημέρα, ενώ του DEHP φτάνουν έως τα 85μg/kg βάρους σώματος/ημέρα [3]. Λαμβάνοντας υπόψη τη τοξικότητα των φθαλικών και το ρυθμό που απελευθερώνονται από τα παιχνίδια, απαγορεύτηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση το 1999 η χρήση των DnBP, BBzP, DEHP, DiNP, DiDP σε παιχνίδια που προορίζεται για παιδιά κάτω των τριών ετών [28].

#### **1.1.5 Τοξικότητα των φθαλικών**

Σε έρευνες που έχουν γίνει για διάφορα χρονικά διαστήματα σε τρωκτικά, παρουσιάστηκαν ανεπιθύμητες παρενέργειες, οι οποίες εξαρτώνται από τις δόσεις, στο συκώτι, στο νεφρό και για συγκεκριμένους φθαλικούς εστέρες στον θυρεοειδή αδένα και στους όρχεις. Σημαντικές διαφορές υπάρχουν για διαφορετικά είδη τρωκτικών και ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά.

Σχετικά με την καρκινογένεση, η δράση του DEP είναι αμφισβητήσιμη. Για το DiNP δεν υπάρχουν σχετικές ενδείξεις, ενώ το DBP φαίνεται να συνδέεται με την ανάπτυξη όγκων. Η έκθεση σε DEHP δημιούργησε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα σε τρωκτικά μαζί με άλλα συμπτώματα όπως πολλαπλασιασμό των υπεροξυσωμάτων, αύξηση της δραστηριότητας των Cyp4A1 και PCoA κ.α. [29]. Τα περισσότερα από αυτά τα συμπτώματα καταλύονται από τον υποδοχέα PPAR-α. Έχει όμως αποδειχθεί ότι σε ποντίκια τα οποία είναι έτσι γενετικά τροποποιημένα ώστε ένα ή περισσότερα γονίδια να είναι

απενεργοποιημένα και ταυτόχρονα έχουν τον υποδοχέα PPAR- $\alpha$ , ότι η χορήγηση DEHP δεν οδήγησε σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα. Για διάφορους λόγους, παρενέργειες που σχετίζονται με την δράση του υποδοχέα PPAR στα ποντίκια, δεν υπάρχουν και στους ανθρώπους [30,31,32,33,34,35,36]. Αυτό οδήγησε τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (International Agency on Research on Cancer, IARC) να κατατάξει το DEHP από “πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο” σαν “μη ταξινομήσιμο σαν καρκινογενές για τον άνθρωπο”[37].

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια οι τοξικολογικές ανησυχίες αυξήθηκαν εξαιτίας της πιθανής δράσης των φθαλικών ως ενδοκρινικοί διαταράκτες. Η πιθανότητα ότι οι φθαλικοί εστέρες προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό και αναπτυξιακό σύστημα του ανθρώπου αξιολογήθηκε από το Εθνικό Κέντρο Τοξικολογίας για την αξιολόγηση των κινδύνων για την Ανθρώπινη Αναπαραγωγή (National Toxicology Program Center for the Evaluation Of Risks to Human Reproduction, NTP-CERHR,) [30]. Επιλέχθηκαν επτά φθαλικοί εστέρες για αξιολόγηση λόγω της μεγάλης παραγωγής τους, της έκθεσης των ανθρώπων σε αυτά, της χρήσης τους σε παιδικά παιχνίδια και λόγω των δημοσιευμένων στοιχείων για την αναπαραγωγική και αναπτυξιακή δράση τους (NTP-CERHR, 2000, 2003a-f,2005) (Πίνακας 5) [31,32,33,34,35,36].

Λόγω έλλειψης στοιχείων που αφορούν ανθρώπινες μελέτες πάνω στους φθαλικούς εστέρες, χρησιμοποιήθηκαν μελέτες που διεξήχθησαν σε πειραματόζωα και τα αποτελέσματα (NOAEL<sup>1</sup>, LOAEL<sup>2</sup>) συγκρίθηκαν με τα διαθέσιμα στοιχεία της ανθρώπινης έκθεσης. Βασιζόμενοι σε αυτά τα στοιχεία, εκφράστηκαν ανησυχίες ότι η ανθρώπινη έκθεση σε φθαλικούς εστέρες οδηγεί σε μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, σε ιστολογικές αλλαγές στους όρχεις και μειωμένη γονιμότητα.

Σε αναπτυξιακές μελέτες, βρέθηκαν αυξήσεις στην προγεννητική θνησιμότητα, μειωμένη ανάπτυξη και μειωμένο βάρος του βρέφους, σκελετικές και εξωτερικές

---

<sup>1</sup> **NOAEL:** No Observed Adverse Effect Level: Η υψηλότερη συγκέντρωση ή ποσότητα μιας ουσίας, που υπολογίζεται μέσω πειραμάτων ή παρακολούθησης, που δεν προκαλεί καμία δυσμενή αλλαγή στη μορφολογία, την λειτουργική ικανότητα, την ανάπτυξη και την διάρκεια ζωής ενός οργανισμού.

<sup>2</sup> **LOAEL:** Lowest Observed Adverse Effect Level: Η χαμηλότερη συγκέντρωση ή ποσότητα μιας ουσίας που υπολογίζεται μέσω πειραμάτων ή παρακολούθησης, και προκαλεί δυσμενείς αλλαγές στην μορφολογία, την λειτουργική ικανότητα, ανάπτυξη και διάρκεια ζωής ενός οργανισμού- στόχου σε αντίθεση με φυσιολογικούς οργανισμούς του ίδιου είδους, υπό καθορισμένες συνθήκες έκθεσης.



δυσμορφίες καθώς και δυσμορφίες στα σπλάχνα. Σε μελέτες δύο γενεών, βρέθηκαν πιθανές επιπτώσεις στο βάρος του βρέφους, μειωμένη απόσταση μεταξύ όρχεων και της βάσης των γεννητικών οργάνων των ανδρών, μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης, μείωση των σπερματοκυττάρων και άλλες ιστο-παθολογικές αλλαγές στους όρχεις.

**Πίνακας 5:** Πιθανές επιπτώσεις των φθαλικών στον άνθρωπο (NTR-CERHR)

Άνθρωπος	Έκθεση ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ $\text{bw}/\text{day}$ )	Επιπτώσεις					
		Σοβαρή ανησυχία	Ανησυχία	Μερική ανησυχία	Ελάχιστη ανησυχία	Μηδενική ανησυχία	Ανεπαρκή στοιχεία κινδύνου
BBP					DD	R (ενήλικοι άνδρες)	
DBP	2-10			D υψηλή έκθεση	D	R (ενήλικες)	
DEHP	1-30	D (άνδρες ,παιδιά)	R (παιδιά <1έτους)	R, υψηλές δόσεις αρσενικά παιδιά	R		
			D, αρσενικά έμβρυα εγκύων υπό ιατρική αγωγή	R, αρσενικά έμβρυα			
DnHP	?						D/R
DnOP	<30					R	D
DINP	?				D/R		
DIDP	<30				D	R	

*D: αναπτυξιακά προβλήματα R: αναπαραγωγικά προβλήματα bw: βάρος σώματος*

Παρενέργειες στην ανάπτυξη του εμβρύου παρατηρήθηκαν σε εγκυμονούντα ζώα μετά από έκθεση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100mg DBP/kg βάρους σώματος/ημέρα, 200mg DiDP/kg βάρους σώματος/ημέρα, 500-1000mg DiNP/kg βάρους σώματος/ημέρα, και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1000mg BBP/kg βάρους σώματος/ημέρα. Σε έρευνες δύο γενεών, παρουσιάστηκαν αναπαραγωγικά προβλήματα σε

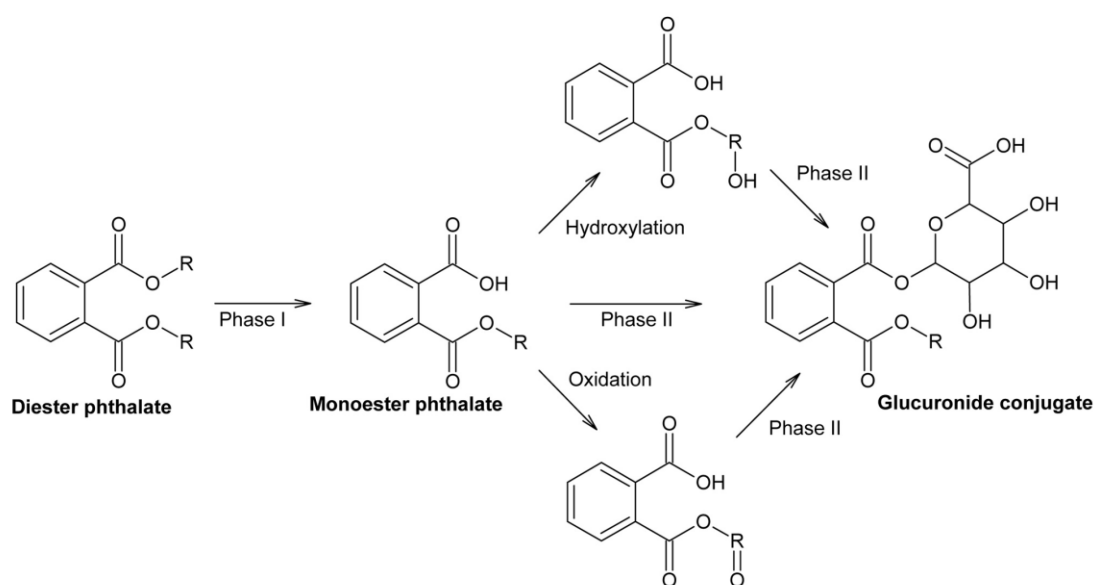
αρουραίους και ποντίκια με έκθεση σε 143-285mg DiNP/kg βάρους σώματος/ημέρα. Έκθεση σε DBP έδειξε αναπτυξιακή και αναπαραγωγική τοξικότητα από τα 100 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα.

Βασιζόμενοι κυρίως σε έρευνες που διεξήχθησαν σε πειραματόζωα, αποδείχθηκε ότι το DEHP είναι ο φθαλικός εστέρας με την μεγαλύτερη τοξικότητα, ιδίως σε συγκεκριμένες ομάδες ανθρώπων, όπως παιδιά μικρότερα του ενός έτους, άρρωστα παιδιά σε κρίσιμη κατάσταση και έγκυες γυναίκες που υποβάλλονται σε θεραπευτική αγωγή με χρήση ιατρικών συσκευών που περιέχουν DEHP (βλ. Πίνακας 5).

## 1.2 Μεταβολισμός των φθαλικών

### 1.2.1 Γενικά στοιχεία

Οι φθαλικοί διεστέρες μεταβολίζονται ταχύτατα στον οργανισμό του ανθρώπου σε δύο φάσεις: η πρώτη φάση είναι η υδρόλυση που ακολουθείται από τη δεύτερη φάση τη σύζευξη με μια γλουκρονική ομάδα (βλ. Εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** Γενικό μεταβολικό μονοπάτι των φθαλικών

Πιο αναλυτικά, στη πρώτη φάση ο φθαλικός διεστέρας υδρολύεται στο κύριο μεταβολίτη του, το φθαλικό μονοεστέρα, σε μια διαδικασία που καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τις λιπάσες και τις εστεράσες στο έντερο και στο παρέγχυμα [38,39]. Θεωρητικά η υδρόλυση θα έπρεπε να μειώνει τα επίπεδα τοξικότητας των φθαλικών αλλά in vivo και in vitro πειράματα έχουν δείξει ότι οι φθαλικοί διεστέρες γίνονται τοξικότεροι όταν

υδρολύονται προς τους αντίστοιχους μονοεστέρες [40]. Οι σχετικά πολικά και χαμηλού μοριακού βάρους φθαλικοί εστέρες εκκρίνονται κυρίως στα ούρα με τη μορφή των μονοεστέρων, ενώ οι φθαλικοί εστέρες υψηλότερου μοριακού βάρους υφίστανται πολλές βιομετατροπές, συμπεριλαμβανομένης της περαιτέρω υδροξυλίωσης και οξείδωσης τους και στη συνέχεια, εκκρίνονται στα ούρα ή τα κόπρανα με τη συζευγμένη μορφή τους (βλ. Εικόνα 3) [41,42]. Η δεύτερη φάση καταλύεται από ένα ένζυμο, την ουριδινό-5-διφωσφογλυκουρο-μεταφοράση από το οποίο σχηματίζεται η συζευγμένη ένωση.

### 1.2.2 DEP και DBP

Οι φθαλικοί εστέρες χαμηλού μοριακού βάρους συνήθως εκκρίνονται στα ούρα με τη μορφή του ελεύθερου μονοεστέρα. Στα ανθρώπινα ούρα το 70% του mBP που εκκρίνεται είναι σε ελεύθερη μορφή [6,43]. Ο μεταβολισμός του DBP στους αρουραίους είναι γνωστός πολλά χρόνια[44]. Με τη χορήγηση μιας απλής δόσης DBP στους αρουραίους, το 80-90% του DBP μεταβολίζεται και εκκρίνεται στα ούρα μέσα σε 48 ώρες και το 5% εκκρίνεται στα κόπρανα. Στα ούρα ανιχνεύθηκαν, κυρίως ο φθαλικός μονοβουτυλεστέρας (mBP) σε ποσοστό 88%, ενώ οι μεταβολίτες, μονο-4-υδροξυβουτυλεστέρας, μονο-3-υδροξυβουτυλεστέρας και φθαλικό οξύ αντιστοιχούσαν στο 8.2% των εκκρινόμενων φθαλικών μονοεστέρων.

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η γλυκουρονιομένη μορφή του mBP είναι ο κύριος μεταβολίτης στα ούρα των αρουραίων και των χάμστερ [45], ενώ το mBP και η γλυκουρονιομένη μορφή του ήταν παρόντες σε όλους τους ιστούς συμπεριλαμβανομένων του πλακούντα, του εμβρύου και του αμνιακού υγρού σε εγκύους αρουραίους 30 λεπτά μετά τη χορήγηση της δόσης. Το DBP αντιστοιχούσε στο λιγότερο από 1% [46]. Παρομοίως μελέτες στον άνθρωπο έδειξαν ότι μόνο το 6% του συνολικού mBP εκκρίνεται με την ελεύθερη μορφή ενώ το υπόλοιπο με τη γλυκουρονιομένη μορφή του[42]<sup>42</sup>.

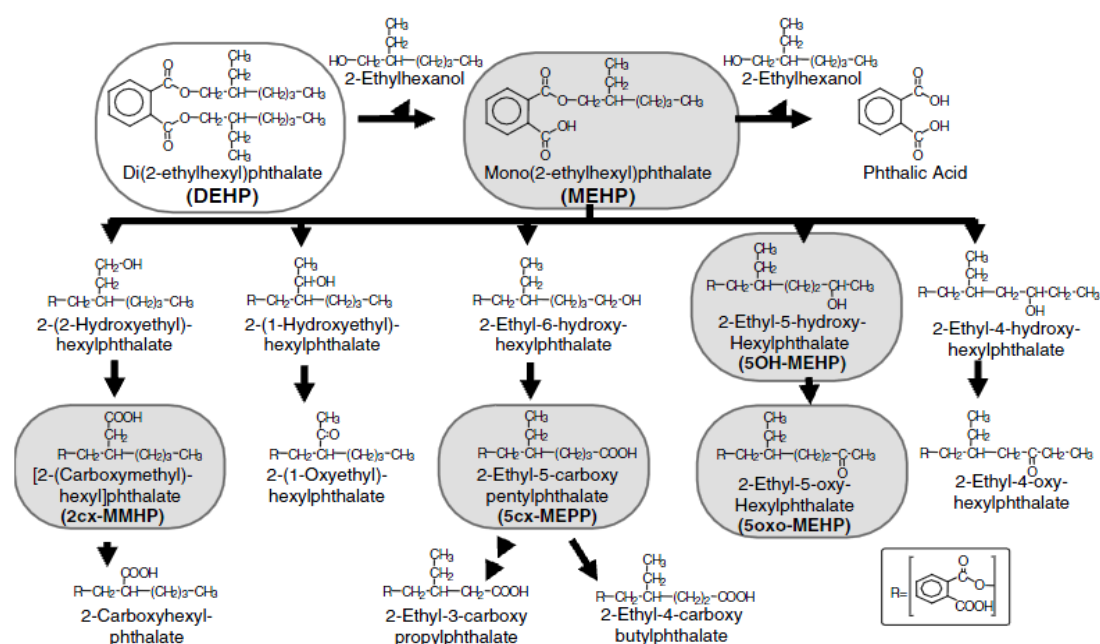
Το πολύ απλό μεταβολικό μονοπάτι και το γεγονός ότι το mBP είναι ο κύριος μεταβολίτης του DBP είναι ένας λόγος που όλες οι μελέτες χρησιμοποιούν το mBP σαν βιοδείκτη<sup>3</sup> για την έκθεση σε DBP.

---

<sup>3</sup> **Βιοδείκτης (biomarker):** Χαρακτηριστικό που μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά και να αξιολογηθεί ως δείκτης μια φυσιολογικής ή παθολογικής εργασίας ή ως απόκριση σε μια θεραπευτική αγωγή.

### 1.2.3 DEHP και DiNP

Το DEHP είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος φθαλικός εστέρας και επιπλέον είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο. Εισερχόμενο στον οργανισμό μεταβολίζεται ταχύτατα ανεξαιρέτως τον τρόπο έκθεσης. Το πρώτο βήμα είναι η μετατροπή του DEHP στον αντίστοιχο μονοεστέρα, ο οποίος με τη σειρά του μεταβολίζεται ταχύτατα μέσω διάφορων αντιδράσεων οξείδωσης [47]. Ο συνολικός μεταβολισμός του DEHP παρουσιάζεται στην Εικόνα 4 [48].



Εικόνα 4: Μεταβολισμός του DEHP. Οι κύριοι μεταβολίτες του είναι τονισμένοι[48].

Το mEHP δεν σχηματίζεται μόνο από υδρόλυση του DEHP αλλά μπορεί να εισέλθει στον οργανισμό και από άλλες πηγές. Επίσης αντιπροσωπεύει μόνο το 10% του αρχικού DEHP, έχοντας και το μικρότερο χρόνο αποβολής από όλους τους υπόλοιπους μεταβολίτες. Οπότε, ο μεγάλος χρόνος αποβολής των mEOHP και mEHHP τα καθιστούν εξαιρετικούς βιοδείκτες επιβάρυνσης του οργανισμού, ενώ τα mECPP και mCMHP δίνουν πληροφορίες για την βραχυχρόνια έκθεση. Οι παραπάνω πληροφορίες για τους μεταβολίτες του DEHP παρατίθενται σχηματικά στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6: Πλεονεκτήματα (+) και μειονεκτήματα (-) των βιοδεικτών του DEHP**

	Ανθεκτικότητα	Ποσότητα	t <sub>1/2</sub>	Τοξικότητα
mEHP	-	-	-	?
mEHHP	+	+	+	+
mEOHP	+	+	+	+
mECPP	+	+	++	+
mCMHP	+	-/+	++	+

Ο φθαλικός διεστέρας της ισο-εννεανόλης (DiNP) αποτελείται από μια ομάδα ισομερών εννεανολών, τα οποία διαφέρουν στο μήκος και στις διακλαδώσεις. Σε αντίθεση με το DEHP, οι μέletes που έχουν γίνει για το DiNP είναι σχετικά λίγες. Όπως και άλλοι φθαλικοί εστέρες υψηλού μοριακού βάρους, έτσι και το DiNP μεταβολίζεται σε διάφορους δευτερεύοντες μεταβολίτες πριν εκκριθεί από τον οργανισμό μέσω των ούρων [49,50].

### **1.3 Ενδοκρινικές διαταραχές στον άνθρωπο**

Πολλές έρευνες σε ζώα έχουν δείξει ότι η περιγεννητική έκθεση σε DBP και σε άλλους φθαλικούς εστέρες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος όπως τα BBzP, DEHP, DiNP καθώς και στους μεταβολίτες τους οδηγεί σε σεξουαλικές διαφοροποιήσεις σε αρσενικά ποντίκια. Οι επιδράσεις που παρατηρήθηκαν περιλαμβάνουν κρυψορχίες, μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης, ατροφία των όρχεων, ανωμαλίες των κυττάρων Sertoli, μείωση ημερήσιας παραγωγής σπέρματος και μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Έκθεση σε φθαλικούς εστέρες με μικρότερες διακλαδώσεις όπως το DMP και το DEP, δεν οδηγεί σε παρόμοια συμπτώματα [51,52,53,54,55,56,57,58]. Η έκθεση σε DEHP των θηλυκών απογόνων στη μήτρα, καθώς και η έκθεση σε DEHP μέσω του θηλασμού προκαλεί καθυστέρηση στην έναρξη της εφηβείας[59]. Πολλές από τις συνέπειες για την ανάπτυξη του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος που παρατηρήθηκαν σε αρσενικούς αρουραίους μετά από μητρική έκθεση σε φθαλικούς εστέρες, παρατηρούνται και σε άνδρες με Σύνδρομο Δυσγενέσις Όρχεων (Testicular Dysgenesis Syndrome, TDS) [ 51,60,61].

Ωστόσο είναι ακόμα ασαφές το αν η έκθεση σε φθαλικούς εστέρες προκαλεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία αφού οι έρευνες σε ανθρώπους δεν έχουν δείξει μια σαφή συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε φθαλικούς εστέρες και στην ανθρώπινη υγεία [62].

Όμως σε πρόσφατες έρευνες υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκθεση σε φθαλικούς εστέρες μάλλον είναι επικίνδυνη για τον άνθρωπο. Σε ενήλικους άνδρες παρατηρήθηκε μια συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου του mEP στα ούρα και των βλαβών του DNA στο σπέρμα, ενώ τα mMP, mBP, mBzP δεν συνδέονται σημαντικά με τη συγκεκριμένη παρενέργεια [63, 64]. Επίσης δεν υπάρχει καμία σχέση μεταξύ του mEHP στα ούρα και της βλάβης του DNA στο σπέρμα αν δεν ληφθούν υπόψη οι δευτερεύοντες μεταβολίτες του DEHP, εκτός και αν γίνει προσαρμογή του επιπέδου του mEHP με τους άλλους μεταβολίτες [65].

Οπότε όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος MEHP/MEHHP ή MEHP/ΜΕΟHP τόσο μεγαλύτερη είναι η βλάβη υποδεικνύοντας έτσι ότι ο περαιτέρω μεταβολισμός του MEHP στους άλλους μεταβολίτες προστατεύει από βλάβες στο DNA του σπέρματος. Ως εκ τούτου, προτάθηκε η σχέση μεταξύ MEHP και δευτερογενών μεταβολιτών να γίνει δείκτης για τον μεταβολισμό του DEHP σε λιγότερο τοξικούς μεταβολίτες. Σε μια πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του MBP στα ούρα και της χαμηλής κινητικότητας και συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων ενώ δεν βρέθηκε καμία σχέση με το MMP, το MEP και τους κυριότερους μεταβολίτες του DEHP [66]. Ο λόγος όμως που οι φθαλικοί μεταβολίτες προκαλούν βλάβες στην ποιότητα του σπέρματος δεν είναι ξεκάθαρος. Στις παραπάνω μελέτες, είναι πιθανό οι βλάβες στην ποιότητα του σπέρματος να μην προκαλούνται από τους φθαλικούς μεταβολίτες αλλά σε άλλους παράγοντες.

Υπάρχουν και άλλες μελέτες που εξετάζουν την έκθεση σε φθαλικούς εστέρες και τα επίπεδα των ορμονών που σχετίζονται με την αναπαραγωγή σε ενήλικους άνδρες. Άνδρες που έχουν υψηλή επαγγελματική έκθεση σε DBP και DEHP σε σύγκριση με μια ομάδα ελέγχου έχουν μια μικρή μείωση του επιπέδου της τεστοστερόνης αλλά δεν αποδείχθηκε καμία θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της τεστοστερόνης και στα επίπεδα του DBP και DEHP στα ούρα για την συγκεκριμένη ομάδα. Επίσης, δεν υπήρχε καμία διαφορά στα επίπεδα διάφορων ορμονών όπως της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) και της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος ανάμεσα στις δύο ομάδες. Αντίθετα, σε μια άλλη έρευνα συσχέτιζαν τα επίπεδα των MBP και MBzP στα ούρα με τα επίπεδα των αναπαραγωγικών ορμονών, θυλακιοτρόπου και ανασταλίνης B<sup>57</sup> στον ορό του αίματος.

Οι παραπάνω μελέτες εστιάζονται στην έκθεση ενήλικων ανδρών σε φθαλικούς εστέρες. Να σημειωθεί ότι η πιο ευάλωτη περίοδος έκθεσης για το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα είναι η προγεννητική και περιγεννητική περίοδος. Σε δύο έρευνες σε ανθρώπινους οργανισμούς, αναφέρονται αποτελέσματα που συνδέουν προβλήματα

στην υγεία του εμβρύου ή του νεογνού με την έκθεση στους φθαλικούς εστέρες [68, 69, 70]. Στην πρώτη μελέτη [68], χρησιμοποίησαν τον δείκτη (anogenital index, AGI) ο οποίος βασίζεται στην απόσταση του πρωκτού από τη βάση των γεννητικών οργάνων (anogenital distance, AGD), μια τιμή που χρησιμοποιείται στην τοξικολογία ως μέτρο αρρενοποίησης. Ο παραπάνω δείκτης μετρήθηκε σε αγόρια 2-30 μηνών και συγκρίθηκε με την έκθεση των μητέρων τους σε φθαλικούς εστέρες ευρείας χρήσεως κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης τους. Οι μητέρες που είχαν αυξημένη προγεννητική έκθεση σε DEP, DBP, DiBP και BBzP γέννησαν παιδιά που είχαν μειωμένη την απόσταση AGD.

Η δεύτερη έρευνα [69] αφορά μια μελέτη ελέγχου συχνότητας εμφάνισης κρυφορχίας σε αρσενικά νήπια. Σε αυτήν την έρευνα μετρήθηκαν σαν βιοδείκτες για την πρόωρη λειτουργία των όρχεων, οι αναπαραγωγικές ορμόνες των αρσενικών νηπίων στην ηλικία των τριών μηνών, και σχετίστηκαν με τη συγκέντρωση έξι φθαλικών μονοεστέρων σε δείγματα μητρικού γάλακτος από τις αντίστοιχες μητέρες [70]. Αναλύθηκαν δείγματα ορού αίματος για να μετρηθούν τα επίπεδα τεστοστερόνης, LH, FSH, ανασταλτίνης Β. της ορμόνης binding globulin (SHBG) ενώ μετρήθηκε και ο λόγος τεστοστερόνης/SHBG που ονομάζεται FAI (free androgen index) και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ανωμαλιών των ανδρογόνων στους ανθρώπους. Στα δείγματα μητρικού γάλακτος ανιχνεύθηκαν τα mEP, mMP, mBP, mBzP, mEHP και miNP. Παρατηρήθηκε ότι η εμφάνιση κρυφορχίας δεν σχετίζεται με τους μεταβολίτες αλλά τα επίπεδα των αναπαραγωγικών ορμονών των νηπίων επηρεάζονται μέσω του μητρικού γάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, το mEP και το mBP είχαν θετική συσχέτιση με τη SHBG, τα mEP, mMP και mBP με το λόγο LH/FAI, το miNP με τη LH ενώ το mBP είχε αρνητική συσχέτιση με το FAI. Στα παιδιά που δεν παρουσίαζαν κρυφορχίες το mEHP και το miNP επίσης είχαν θετική συσχέτιση με το λόγο LH/FAI[71].

Συνολικά, από όλες αυτές τις συσχετίσεις, σαν συμπέρασμα παρατηρείται μείωση της δράσης των ανδρογόνων στα αγόρια που είχαν υψηλή μητρική έκθεση. Τα αποτελέσματα από τις δύο έρευνες συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

Η έκθεση σε φθαλικούς εστέρες έχει, επίσης, συνδεθεί με άλλες αρνητικές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία εκτός από τις επιπτώσεις στον αναπαραγωγικό σύστημα. Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει συσχέτιση της έκθεσης σε DEHP με ενδομητρίωση [72] και μείωση της διάρκειας της κύησης [73].

**Πίνακας 7:** Συσχέτιση μεταξύ της απέκκρισης των επιπέδων των μητρικών φθαλικών και των δεικτών της αναπαραγωγικής υγείας των βρεφών

	mMP	mEP	mBP	miBP	mBzP	mEHP	miNP
LH	nc	nc	nc		nc	nc	+
SHBG	nc	+	+		nc	nc	nc
LH/FAI	+	+	+		nc	+ <sup>α</sup>	+ <sup>α</sup>
FAI	nc	nc	-		nc	nc	nc
AGD	nc	+	+	+	+	nc	

*nc:* καμία συσχέτιση, *±:* θετική συσχέτιση, *-:* αρνητική συσχέτιση, *α:* μόνο αγόρια χωρίς κρυφορχίες

#### **1.4 Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε ανθρώπινα ούρα και άλλες μήτρες**

Υπάρχουν ήδη στη βιβλιογραφία μια σειρά δημοσιεύσεων με μεθόδους για ανάλυση μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε ανθρώπινα ούρα. Οι περισσότερες δημοσιεύσεις προέρχονται από Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, U.S.A.. Αυτές οι μελέτες χρησιμοποιούν καθαρισμό των δειγμάτων των ούρων με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), είτε αυτοματοποιημένη είτε όχι, και στη συνέχεια ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μαζών (High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS), είτε με πηγή ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI) είτε με χημικό ιονισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) [90]. Επίσης δυο άλλες παρεμφερείς εργασίες έχουν δημοσιευθεί από μια άλλη ερευνητική ομάδα (Institute and Outpatient Clinic of Occupational, Social and Environmental Medicine, University of Erlangen-Nuremberg) όπου επίσης χρησιμοποιούν HPLC-MS/MS και καθαρισμό των δειγμάτων μέσω μιας προστήλης συνδεδεμένης πριν την αναλυτική στήλη [74,75]. Τέλος ακόμα μια ομάδα έχει δημοσιεύσει μια εργασία ανάπτυξης μεθόδου με συζευγμένη (online) SPE-HPLC-MS/MS [76] βασισμένη σ'ένα βαθμό στην προαναφερόμενη μέθοδο [87]. Επίσης παραλλαγές των παραπάνω μεθόδων έχουν χρησιμοποιηθεί για ανάλυση επιπέδων των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στο ανθρώπινο μητρικό γάλα [77], σε συσκευασμένο αγελαδινό γάλα [78], σε ανθρώπινα αμνιακά υγρά [79], σάλιο [80], ορό



αίματος [81], μηκώνιο και σπέρμα [82]. Επίσης έχουν αναφερθεί και αρκετές εργασίες σε με αναλύσεις βιολογικών υγρών από πειραματόζωα για εύρεση των επιπέδων των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων [83,84,85,86].

### **1.5 Στόχοι της διατριβής**

Ο κύριος στόχος της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη και εφαρμογή μιας μεθόδου ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των κυριότερων μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε δείγματα ανθρώπινων ούρων με χρήση HPLC-ESI-MS/MS. Λόγω του μεγάλου κόστους των προτύπων ενώσεων, ιχνηθετημένων και μη, οι μεταβολίτες που θα παρακολουθεί η μέθοδος θα είναι οι σημαντικότεροι από επιδημιολογικής σκοπιάς.

Η μέθοδος θα πρέπει να είναι ικανή να μετράει ελευθέρους και ολικούς μεταβολίτες των φθαλικών εστέρων ώστε μελλοντικά να εφαρμοστεί σε ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά της μεθόδου θα πρέπει να είναι η υψηλή διαχωριστική ικανότητα, η ευαισθησία, η επιλεκτικότητα, η επαναληψιμότητα, η ακρίβεια, οι υψηλές ανακτήσεις, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, τα χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα μεταβολιτών στα τυφλά δείγματα, η ικανότητα ταυτόχρονης ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων, η απλότητα, ο σύντομος χρόνος ανάλυσης και η ελάχιστη κατανάλωση αντιδραστηρίων και διαλυτών. Επίσης θα πρέπει να εξακριβωθεί η αξιοπιστία της μεθόδου.

Τέλος, θα πρέπει να εφαρμοστεί σε μια σειρά πραγματικών δειγμάτων, τόσο για ανάλυση ελεύθερων όσο και ολικών μεταβολιτών και να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα σε σχέση με τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές.

## 2 Πειραματικό μέρος

Οι τεχνικές επεξεργασίας, διαχωρισμού και ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη περιγράφονται στη συνέχεια.

### 2.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) αποτελεί μια από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους επεξεργασίας δειγμάτων με την οποία επιτυγχάνεται είτε καθαρισμός είτε και συμπύκνωση ή αλλαγή διαλύτη. Το δείγμα διέρχεται από προσροφητικό υλικό, το οποίο συγκρατείται σε μια διάταξη που ονομάζεται φυσιγγίο (cartridge), και κατακρατούνται οι υπό ανάλυση ενώσεις ενώ απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες ή το αντίστροφο.

Ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την κατακράτηση των ουσιών στο προσροφητικό υλικό μπορεί να είναι:

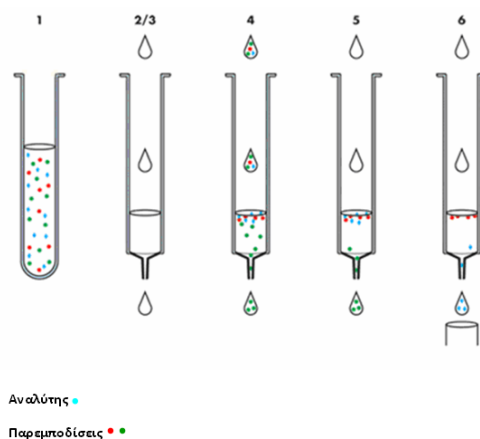
- Κανονικής φάσης, όπου οι εν λόγω ουσίες κατακρατούνται από μια πολικότερη στατική φάση (πληρωτικό υλικό) σε σχέση με το διαλύτη έκλουσης.
- Ανάστροφης φάσης, όπου οι εν λόγω ουσίες κατακρατούνται από μια πιο άπολη στατική φάση (πληρωτικό υλικό) σε σχέση με το διαλύτη έκλουσης.
- Ιονανταλλαγής, όπου πραγματοποιείται ανταλλαγή ιόντων μεταξύ στατικής φάσης και διαλύτη έκλουσης.

Τα πλεονεκτήματα της SPE περιλαμβάνουν την απλότητα, τις υψηλές ανακτήσεις, τον αποτελεσματικό καθαρισμό των δειγμάτων, την ενδεχόμενη συμπύκνωση που μπορεί να μειώσει ιδιαίτερα τα όρια ανίχνευσης μιας μεθόδου, την ελαχιστοποίηση κατανάλωσης οργανικών διαλυτών και τη συμβατότητα με τις διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού υλικού με διέλευση κατάλληλου διαλύτη ή χρήση προενεργοποιημένων φυσιγγίων (preconditioned cartridges).
2. Διέλευση του δείγματος από τη στήλη και κατακράτηση είτε των επιθυμητών ουσιών είτε των προσμίξεων.

3. Έκπλυση του φυσιγγίου για απομάκρυνση προσμίξεων
4. Σε περίπτωση που οι προς ανάλυση ουσίες βρίσκονται προσροφημένες στη στήλη, ακολουθεί η έκλουση τους με κατάλληλο διαλύτη.



**Εικόνα 5:** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της εκχύλισης στερεάς φάσης

## 2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC) είναι μια ευρύτατα διαδεδομένη τεχνική διαχωρισμού και χρησιμοποιείται στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ουσιών σε πολύπλοκα δείγματα.

Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής βασίζεται στους διαφορετικούς συντελεστές κατανομής των συστατικών ενός δείγματος μεταξύ μιας υγρής κινητής φάσης και μιας στατικής φάσης, η οποία βρίσκεται καθηλωμένη σε μια στήλη. Το δείγμα κινείται μέσα σε αυτήν τη στήλη κάτω από υψηλή πίεση παρασυρόμενο από την κινητή φάση. Οι διαφορές στους συντελεστές κατανομής των προς ανάλυση ουσιών σε σχέση με την κινητή και στερεή φάση έχουν σαν αποτέλεσμα, ενώ οι ουσίες εισέρχονται την ίδια στιγμή στη στήλη, να εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους.

Ο τύπος χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης. Σε αυτήν την περίπτωση η κινητή φάση είναι πιο πολική από τη στατική και οι πολικότερες ενώσεις εξέρχονται ταχύτερα από τη στήλη.

Ο χρόνος κατακράτησης της κάθε ένωσης εξαρτάται από την πολικότητα της ένωσης αυτής, τη σύσταση της κινητής φάσης, το είδος της στατικής φάσης και τη θερμοκρασία. Όσον αφορά στην έκλουση των ουσιών γίνεται είτε ισοκρατικά (isocratic elution), όπου η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της

ανάλυσης είτε βαθμιδωτά (gradient elution), όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

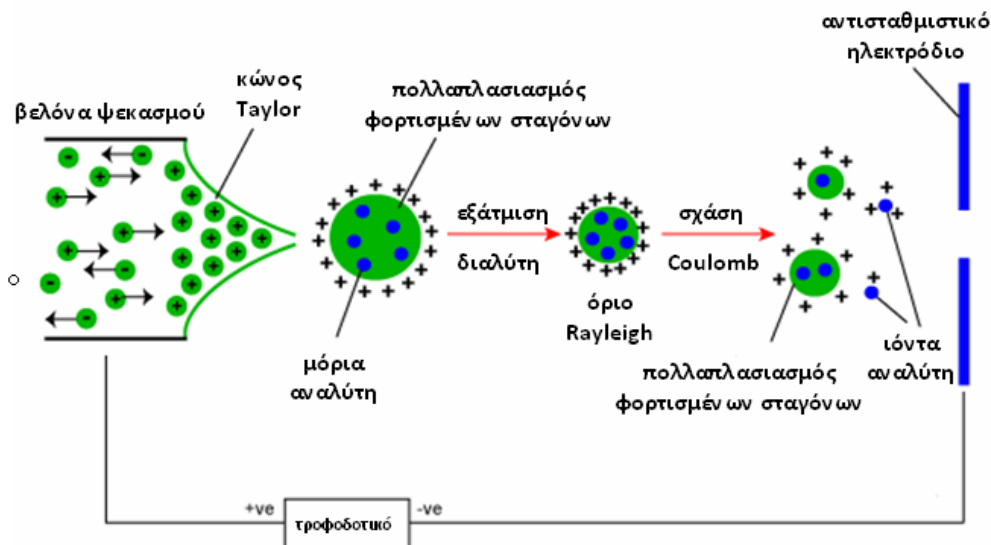
Μια τυπική διάταξη HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

1. Αντλία (LC pump): πρόκειται για ένα σύστημα που παρέχει συνεχή και επαναλήψιμη ροή κινητής φάσης υπό υψηλή πίεση
2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector): αποτελείται από μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης με βρόγχο.
3. Στήλη (column): είναι ένας ευθύγραμμος χαλύβδινος σωλήνας που περιέχει τη στατική φάση.
4. Ανιχνευτής (detector): με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία των ενώσεων που εξέρχονται από τη στήλη και μετράται η συγκέντρωσή τους στην κινητή φάση.
5. Καταγραφικό (data logger): αποτελεί το μέσο συλλογής, αποθήκευσης και παρουσίασης των αποτελεσμάτων της ανάλυσης και είναι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής εφοδιασμένος με το κατάλληλο λογισμικό.

### **2.3 Διαδοχική φασματομετρία μαζών με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization tandem mass spectrometry)**

Η φασματομετρία μαζών με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμό περιγράφηκε πρώτη φορά το 1984 και σήμερα αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις πολικών οργανικών ενώσεων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, ολιγονουκλεοτιδίων, ακόμα και με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 100.000 amu. Επίσης σε αντίθεση με τις κλασσικές πηγές ιονισμού επιτρέπει την ανάλυση μη πτητικών ή θερμικά ασταθών ενώσεων και βρίσκει εφαρμογές στο χαρακτηρισμό ανόργανων ουσιών και συνθετικών πολυμερών. Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία σε τρία στάδια:

1. Σχηματισμός σταγόνας
2. Συρρίκνωση της σταγόνας
3. Παραγωγή ιόντων στην αέρια φάση



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ιονισμού σε πηγή ηλεκτροψεκασμού

Το διάλυμα της προσδιοριζόμενης ένωσης αντλείται μέσω ενός τριχοειδούς από silica σε μια ανοξειδωτή βελόνα με ταχύτητα μερικών  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Το διάλυμα του δείγματος εξέρχεται από τη βελόνα σε μορφή νέφους, όπου εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό. Τα σταγονίδια φορτίζονται και τα εντός του διαλύματος ιόντα συσσωρεύονται στην επιφάνεια και σχηματίζουν ένα κώνο (Taylor cone). Σε αρκετά ισχυρό πεδίο, ο κώνος παράγει θετικά φορτισμένες σταγόνες όταν η εφαρμοζόμενη ηλεκτροστατική δύναμη υπερβεί την επιφανειακή τάση του διαλύτη. Η διάμετρος της σταγόνας εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο δυναμικό, την ταχύτητα ροής του διαλύματος και τη φύση του διαλύτη. Το νέφος των σταγονιδίων κατευθυνόμενο προς τον αναλυτή μαζών διασχίζει μια βαθμιδωτή μεταβολή της πίεσης και λαμβάνει χώρα η σταδιακή εξάτμιση του διαλύτη, η οποία επιφέρει μείωση της διαμέτρου των σταγονιδίων και αύξηση της πυκνότητας του φορτίου τους. Η πυκνότητα του φορτίου στην επιφάνεια κάθε σταγόνας αυξάνει συνεχώς μέχρι ενός κρίσιμου σημείου, που ονομάζεται όριο Rayleigh. Τότε πραγματοποιείται σχάση των σταγονιδίων (σχάση Coulomb) σε πολύ μικρότερα, ο διαλύτης εξατμίζεται περαιτέρω και ιόντα περνάνε στην αέρια φάση και οδηγούνται στον αναλυτή μαζών. Για την ευκολότερη εκνέφωση του διαλύματος καθώς αυτό εξέρχεται από τη βελόνα, συνήθως διαβιβάζεται ένα αέριο εκνέφωσης (sheath gas). Παράλληλα το αέριο αυτό δρα και σαν αέριο ξήρανσης (auxiliary gas).

Λόγω του ότι ο ηλεκτροψεκασμός είναι μαλακή (soft) τεχνική ιονισμού, δεν υπάρχει έντονη θραυσματοποίηση και είναι αρκετά σύνηθες το φάσμα μάζας μια ένωσης

να περιέχει μόνο το μοριακό ιόν. Αυτό το γεγονός περιορίζει την επιλεκτικότητα αυτών των μεθόδων και για να λυθεί αυτό το πρόβλημα χρησιμοποιούνται τεχνικές διαδοχικής φασματομετρίας μαζών, οι οποίες παρουσιάζουν εξαιρετικά αυξημένη επιλεκτικότητα. Σαν αναλυτής μαζών στην παρούσα εργασία υπάρχει ένα σύστημα με τρία τετράπολα. Από αυτά το πρώτο και το τρίτο είναι αναλυτές μαζών και το δεύτερο, που σχηματίζει γωνία, χρησιμεύει σαν κυψελίδα πρόσκρουσης ώστε να έχουμε περαιτέρω θραυσματοποίηση των αρχικών ιόντων που πέρασαν από το πρώτο τετράπολο και θα ξανααναλυθούν στο τρίτο.



**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση του αναλυτή μαζών με σύστημα τριών τετραπόλων. Να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία, ο φασματογράφος μάζας που χρησιμοποιείται (TSQ Quantum, Thermo Finnigan) είναι εφοδιασμένος με γωνιακό δεύτερο τετράπολο (κυψελίδα πρόσκρουσης) και όχι ευθύγραμμο όπως στην εικόνα.

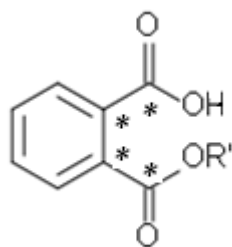
## 2.4 Τεχνική Σάρωσης με Παρακολούθηση Επιλεγμένης Αντίδρασης

Κατά την σάρωση με παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring, S.R.M.), μελετάται μια χαρακτηριστική αντίδραση ή ομάδα αντιδράσεων για κάθε αναλυόμενη ένωση. Αρχικά επιλέγεται ένα πρόδρομο ιόν από το  $MS^1$  φάσμα μάζας, όπως και στη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, S.I.M.). Σε αντίθεση όμως με τη μέθοδο SIM που σταματάει σ' αυτό το στάδιο, το επιλεγμένο ιόν θραυσματοποιείται ξανά, και παρακολουθείται κάποιο θυγατρικό ιόν ή ιόντα από το  $MS^2$  φάσμα μάζας. Έτσι η επιλεκτικότητα της μεθόδου αυξάνεται κατακόρυφα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές φασματομετρίας μάζας και λόγω της παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων μόνο, δεν υπάρχει μεγάλη μείωση στην ευαισθησία της μεθόδου.

## 2.5 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.5.1 Πρότυπες ενώσεις

Ο φθαλικός-μόνο-αιθυλεστέρας, ο φθαλικός μόνο-κ-βουτυλεστέρας, ο φθαλικός μόνο-2αίθυλ-εξανεστέρας, ο φθαλικός μόνο-2έθυλ-5ύδροξυ-εξανεστέρας, ο φθαλικός μόνο-2αίθυλ-5όξο-εξανεστέρας, ο φθαλικός μόνο-ίσο-εννεανοεστέρας, η 4-methylumbelliferrone και οι ανάλογες ενώσεις επισημασμένες με  $^{13}\text{C}$ , ήταν διαλυμένες σε ακετονιτρίλιο σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  και προμηθεύτηκαν από την Cambridge Isotope Laboratories. Το 4-methylumbelliferyl glucoronide προμηθεύτηκε από την Sigma Aldrich. Στην Εικόνα 8 παρατίθεται η γενική δομή των ιχνηθετημένων μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων. Με αστερίσκο φαίνονται σε ποιες θέσεις της κάθε ένωσης(1, 2 του δακτυλίου και στις καρβοξυλομάδες) έχει χρησιμοποιηθεί  $\text{C}_{13}$  στις επισημασμένες πρότυπες ενώσεις.



Εικόνα 8: Γενική δομή ιχνηθετημένων μεταβολιτών των φθαλικών διεστέρων

### 2.5.2 Αντιδραστήρια

Το ένζυμο E.Coli  $\beta$ -glucoronidase, 140 μονάδες ενεργότητας/mL, προμηθεύτηκε από τη Roche. Το οξικό αμμώνιο και το όξινο φωσφορικό νάτριο προμηθεύτηκαν από τη Fluka. Το οξικό οξύ(παγόμορφο) προμηθεύτηκε από την Carlo Erba. Το φωσφορικό οξύ, 85%, προμηθεύτηκε από τη Riedel de Haen. Το υδροξείδιο του αμμωνίου, 28% και οι διαλύτες(ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και οξικός αιθυλεστέρας), ήταν τύπου ChromaSoln for HPLC, και προμηθεύτηκαν από τη Sigma Aldrich. Το απιοντισμένο υπερκάθαρο νερό που χρησιμοποιήθηκε, είχε ειδική αντίσταση 18,2M $\Omega$ \*cm, το οποίο είναι μέτρο του πόσο αποτελεσματικά έχουν απομακρυνθεί τα ιόντα από το απιοντισμένο νερό και κατά συνέπεια της καθαρότητας του.

### 2.5.3 Διαλύματα

Τα διαλύματα των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων παρασκευάστηκαν σε υπερκάθαρο νερό με συγκέντρωση 2μg/ml σε γυάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια όγκου 4mL με καπάκια από teflon. Επίσης τα διαλύματα των ιχνηθετημένων μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων παρασκευάστηκαν σε υπερκάθαρο νερό με συγκέντρωση 2μg/mL-8 μg/mL σε γυάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια όγκου 4mL με καπάκια από teflon . Τα διαλύματα της 4-methylumbelliferone, της επισημασμένης 4-methylumbelliferone, του 4-methylumbelliferyl glucoronide παρασκευάστηκαν σε υπερκάθαρο νερό με συγκέντρωση 2μg/ml σε γυάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια όγκου 4mL με καπάκια από teflon.

Το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου/οξικού οξέως παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 1M, διαλύοντας 3,854g οξικό αμμώνιο σε 50mL υπερκάθαρο νερό και ρυθμίστηκε το pH σε 6.5 με προσθήκη οξικού οξέως. Το ρυθμιστικό διάλυμα υδροξειδίου του αμμωνίου παρασκευάστηκε προσθέτοντας 535 μL υδροξειδίου του αμμωνίου 28% σε 50 mL υπερκάθαρο νερό και 50 mL ακετονιτρίλιο. Το ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου/φωσφορικού οξέως παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 0,14M διαλύοντας 4,366g όξινο φωσφορικό νάτριο σε 200mL υπερκάθαρο νερό και ρύθμιστηκε το pH σε 2,0 προσθέτοντας φωσφορικό οξύ.

### 2.5.4 Φυσίγγια (cartridges) για S.P.E.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα φυσίγγια Varian Nexus 60 και 200 mg. Τα συγκεκριμένα φυσίγγια μπορούν να συμπεριφερθούν είτε ως κανονικής φάσης είτε ως ανάστροφης ανάλογα με το pH των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στις εκλούσεις. Το πληρωτικό τους υλικό είναι ένα μίγμα συμπολυμερών, σφαιρικού σχήματος με διάμετρο 70 μm.

### 2.5.5 Ενόργανη Ανάλυση

Η HPLC που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από μια αντλία (Surveyor LC pump) και ένα αυτόματο δειγματολήπτη (Surveyor Autosampler) της εταιρείας Thermo Finnigan. Ο βρόγχος είχε όγκο 20 μL. Η αναλυτική στήλη ήταν μια Betasil Phenyl της Thermo Scientific, με μήκος 100mm, εσωτερική διάμετρο 2,1 mm και με διάμετρο πληρωτικού υλικού 3 μm.



Ο φασματογράφος μάζας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας TSQ Quantum της Thermo Finnigan. Η πηγή ιονισμού ήταν ηλεκτροψεκασμός, οι αναλυτές μαζών ένα σύστημα τριών τετραπόλων σε γωνιακή διάταξη και ο ανιχνευτής ήταν ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής.

## **2.6 Δειγματοληψίες**

Τα δείγματα που αναλύθηκαν αρχικά κατά τη διάρκεια ανάπτυξης βελτιστοποίησης πάρθηκαν εθελοντικά από μέλη του ECPL. Λήφθηκαν κατά την πρώτη πρωινή ούρηση σε πλαστικά αποστειρωμένα δοχεία (ουροσυλλέκτες) των 100mL κατασκευασμένα από πολυπροπυλένιο/πολυστερίνη. Τα υπόλοιπα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονται από τη μελέτη μητέρας-παιδιού “Ρέα” του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Συγκεκριμένα προέρχονται από έγκυες μητέρες, για τις οποίες υπάρχουν δημογραφικά στοιχεία όπως και ιατρικό ιστορικό μέσω ερωτηματολογίων που συμπλήρωναν.

## **2.7 Επεξεργασία Δειγμάτων**

Η διαδικασία επεξεργασίας των δειγμάτων βασίστηκε σε μια παρεμφερή εργασία [87], όπου τροποποιήθηκε σε αρκετά σημεία. Αρχικά το δείγμα αναδεύεται και με πιπέτα μεταφέρεται 1mL σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρησης πολυπροπυλενίου (falcon tube) της Techno Plastic Products, όγκου 15mL. Προστίθενται επίσης με πιπέτα, 50μL διαλύματος ιχνηθετημένων μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων, 50μL ιχνηθετημένης umbelliferone, 100μL διαλύματος 4-methylumbelliferyl glucoronide, 250μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου/οξικού οξέως και 10 μL E.Coli β-glucoronidase.

Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε φούρνο στους 37°C για 90min ώστε να ολοκληρωθεί η ενζυμική υδρόλυση των γλουκορονικών ομάδων από τους συζευγμένους μεταβολίτες. Η μέθοδος μπορεί να μετρήσει και ελεύθερους και ολικούς μεταβολίτες. Η διαφορά στο αν θα μετρηθούν όλοι, ελεύθεροι και συζευγμένοι, ή μόνο ελεύθεροι, βρίσκεται στο στάδιο της προσθήκης του ενζύμου και του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, ώστε να λειτουργήσει το ένζυμο. Χωρίς να προστεθεί ένζυμο, οι συζευγμένοι μεταβολίτες δεν υδρολύονται και μετρούνται μόνο οι ελεύθεροι. Με προσθήκη ενζύμου-ρυθμιστικού διαλύματος, οι συζευγμένοι μεταβολίτες υδρολύονται σε ελεύθερους και μετρώνται μαζί με τους υπόλοιπους ελεύθερους. Υπογραμμισμένα είναι τα βήματα που αφορούν στην ενζυμική υδρόλυση.

Ακολούθως, προστίθεται 1mL ρυθμιστικού διαλύματος υδροξειδίου του αμμωνίου και το δείγμα διαβιβάζεται σε φυσίγγιο SPE 60mg. Οι μεταβολίτες σε βασικό pH βρίσκονται στην αποπρωτονιωμένη τους μορφή και δε συγκρατούνται στο φυσίγγιο σε αντίθεση με τις άπολες παρεμποδιστικές ενώσεις.

Έπειτα, στο έκλουσμα προστίθενται 3mL ρυθμιστικού διαλύματος όξινου φωσφορικού νατρίου/φωσφορικού οξέως και το δείγμα διαβιβάζεται σε φυσίγγιο SPE 200mg. Οι μεταβολίτες σε όξινο pH βρίσκονται στην πρωτονιωμένη τους μορφή και συγκρατούνται στο φυσίγγιο σε αντίθεση με τις πολικές παρεμποδιστικές ενώσεις. Τέλος οι μεταβολίτες εκλούνται από το φυσίγγιο των 200mg με 3mL ακετονιτρίλιο και 3mL οξικό αιθυλεστέρα. Επίσης λόγω του ότι κάποιοι μεταβολίτες μένουν προσροφημένοι στο πρώτο φυσίγγιο, και σε αυτό διαβιβάζονται 3mL ακετονιτρίλιο και 3mL οξικό αιθυλεστέρα.

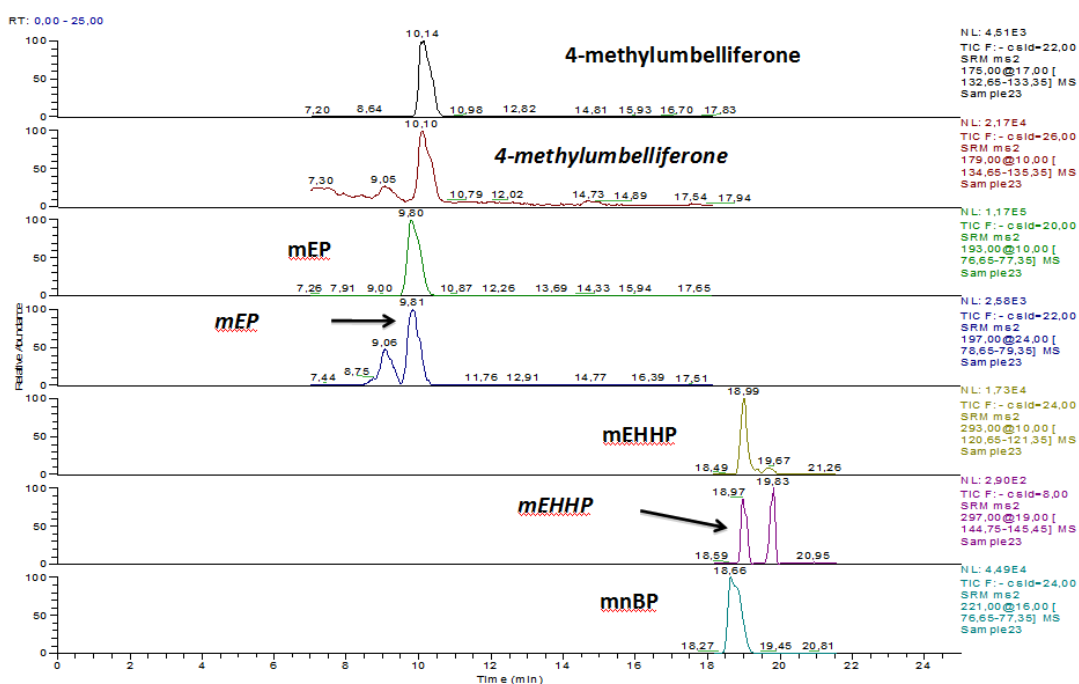
Στο τελικό στάδιο της επεξεργασίας τα εκλούσματα μεταφέρονται σε falcon tube 15mL και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού σε περιστροφικό σύστημα συμπύκνωσης υπό κενό (rotational vacuum concentrator, RVC 2-25 Martin Christ). Ο συμπυκνωτής ήταν ρυθμισμένος σε θερμοκρασία 60 °C και πίεση 45mbar. Το δείγμα επαναδιασπείρεται σε 1mL υπερκάθαρο νερό και αναλύεται με HPLC-ESI-MS/MS.

### 3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

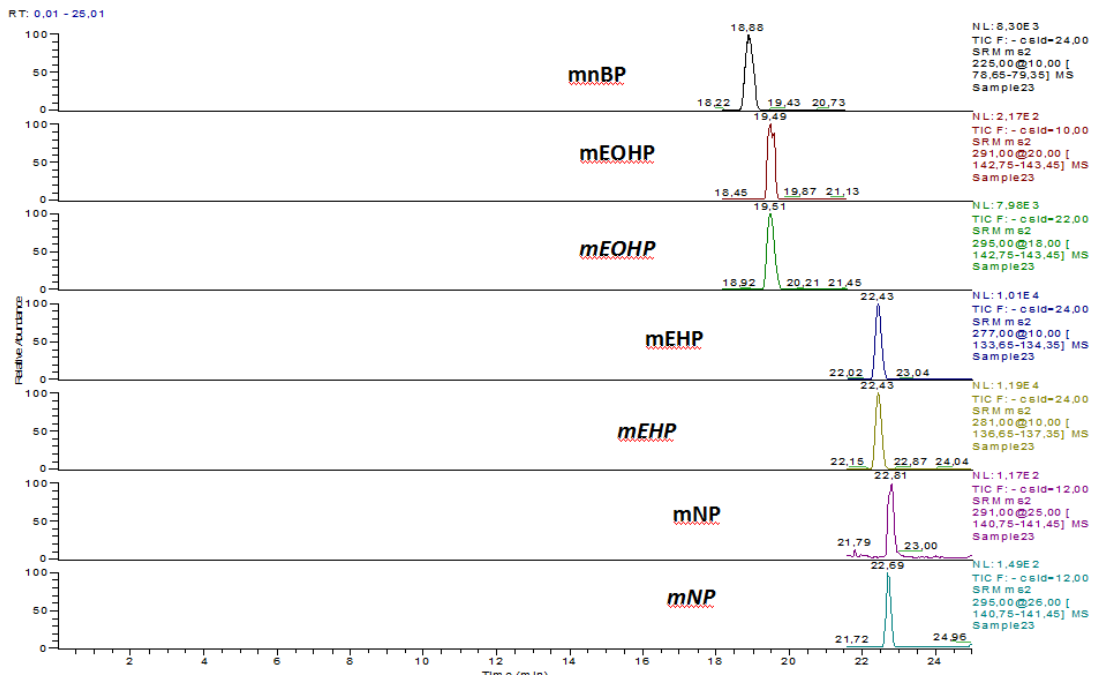
#### 3.1 Ανάπτυξη και Βελτιστοποίηση της μεθόδου

##### 3.1.1 Υγρή Χρωματογραφία

Λόγω της παρεμφερούς δομής των προς ανάλυση ενώσεων ήταν επιβεβλημένη η χρήση μια στήλης με υψηλή διαχωριστική ικανότητα και η εφαρμογή βαθμιδωτής έκλουσης της κινητής φάσης, ώστε να υπάρχει διαχωρισμός σε μια σχετικά σύντομης χρονικής διάρκειας ανάλυση. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε, επιλέχθηκε λόγω της μικρής διαμέτρου του πληρωτικού υλικού που φέρει, το οποίο αυξάνει την ικανότητα διαχωρισμού, και λόγω της δομής των δραστικών ομάδων που φέρει (βενζυλικές ομάδες προσδεμένες σε πυριτικό πολυμερές) που είναι συγγενείς με τη δομή των προς ανάλυση ενώσεων και κατακρατούν ισχυρά τις προς διαχωρισμό ενώσεις. Έγιναν διάφορες δοκιμές και ο βέλτιστος διαχωρισμός επετεύχθη με ροή 0.350 mL/min, κινητές φάσεις νερό και ακετονιτρίλιο με 0.1% οξικό οξύ και το πρόγραμμα έκλουσης που περιγράφεται στον Πίνακα 8 [88] και την Εικόνα 10.



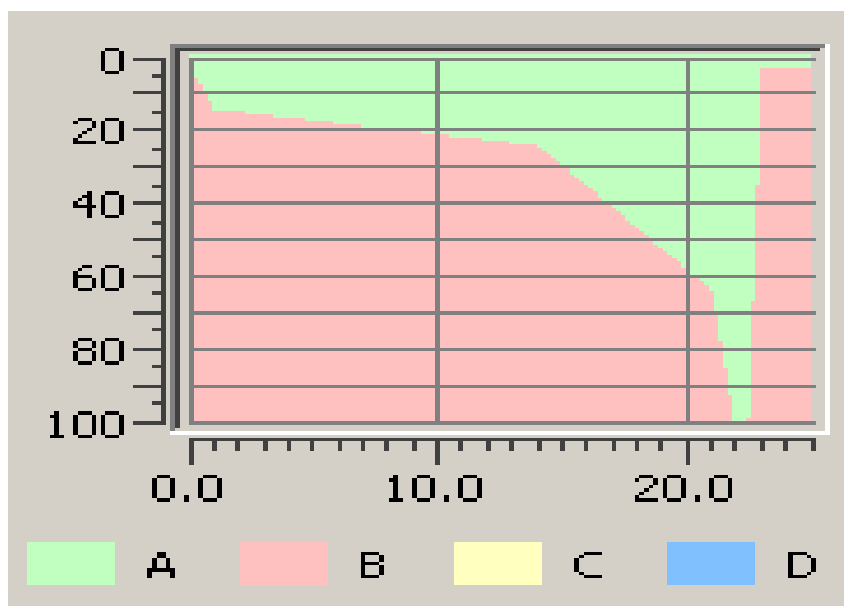
Εικόνα 9Α: Χρωματογράφημα μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε πραγματικό δείγμα ούρων.



**Εικόνα 9B:** Χρωματογράφημα μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε πραγματικό δείγμα ούρων.

Το βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης για να πετύχει ικανοποιητικό διαχωρισμό, ξεκινάει με ελάχιστη περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο (4%), ώστε η εκλουστική ισχύς της κινητής φάσης να είναι χαμηλή και οι μεταβολίτες να περάσουν όσο το δυνατό περισσότερο χρόνο μέσα στη στήλη ώστε να διαχωριστούν αποτελεσματικά. Στη συνέχεια αυξάνεται προοδευτικά στο 100% η περιεκτικότητα σε οργανική φάση (ακετονιτρίλιο) στα 22.5 min ώστε η εκλουστική ισχύς να μεγιστοποιηθεί και οι διαχωρισμένες ενώσεις πλέον να εξέλθουν από τη στήλη. Τέλος η αναλογία διαλυτών μέχρι το τέλος του βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης επανέρχονται στις αρχικές συνθήκες (4% ακετονιτρίλιο-96%νερό) ώστε το σύστημα να είναι έτοιμο για την επόμενη ανάλυση.

Στην Εικόνα 9 (A και B) παρατίθεται χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος όπου ανιχνεύονται όλοι μεταβολίτες που παρακολουθεί η παρούσα μέθοδος. Φαίνονται οι κορυφές των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων που βρίσκονται στο δείγμα, όπως και οι κορυφές των επισημασμένων αναλόγων τους (με πλάγια γράμματα) που εμβολιάστηκαν στο δείγμα πριν την ανάλυση. Επίσης φαίνονται και οι κορυφές της 4-methylumbelliferrone και του επισημασμένου αναλόγου της, η οποία χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ενζυμικής υδρόλυσης των συζευγμένων μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων. Να σημειωθεί ότι είναι το μοναδικό δείγμα όπου το mNP βρίσκεται πάνω από τα όρια ποσοτικοποίησης.



**Εικόνα 10:** Σχηματική αναπαράσταση του βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (χ άξονας: χρόνος σε min, γ άξονας: %αναλογία διαλύτη, Α: ακετονιτρίλιο, Β: νερό)

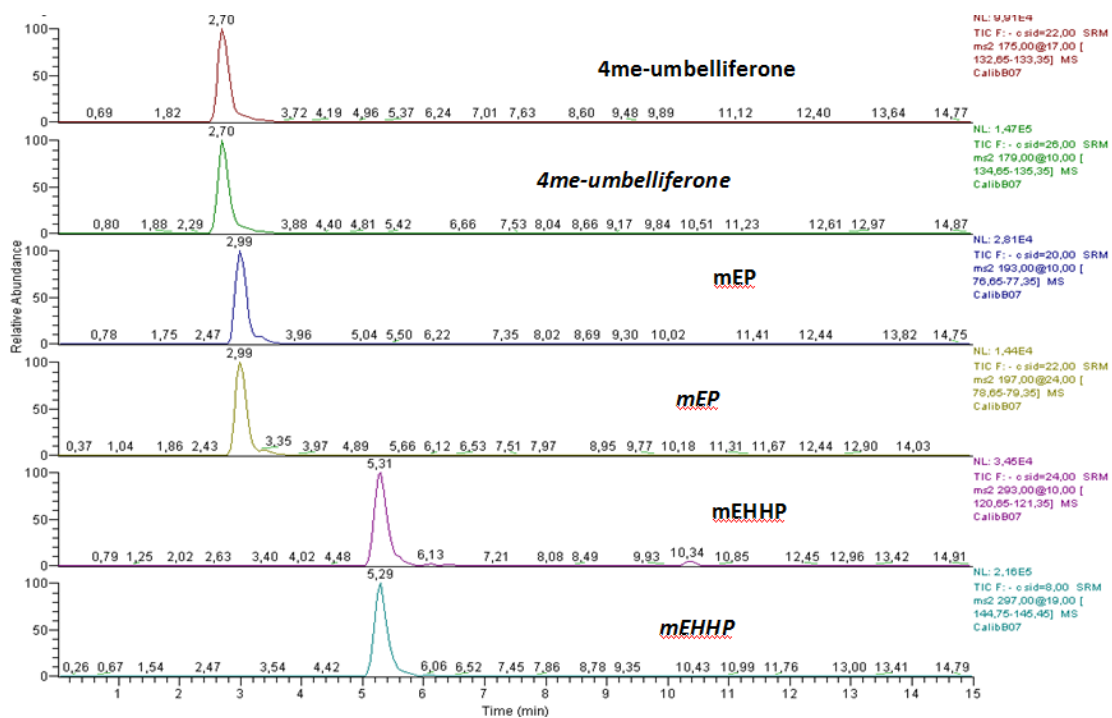
**Πίνακας 8:** Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης

Χρόνος (min)	% (0,1% Οξικό οξύ σε Ακετονιτρίλιο)	% (0,1% Οξικό οξύ σε Νερό)	mL/min
0	4	96	0.350
0.1	4	96	0.350
1.0	15	85	0.350
14.0	25	75	0.350
21.0	65	35	0.350
22.0	100	0	0.350
22.5	100	0	0.350
23.0	4	96	0.350
25.0	4	96	0.350

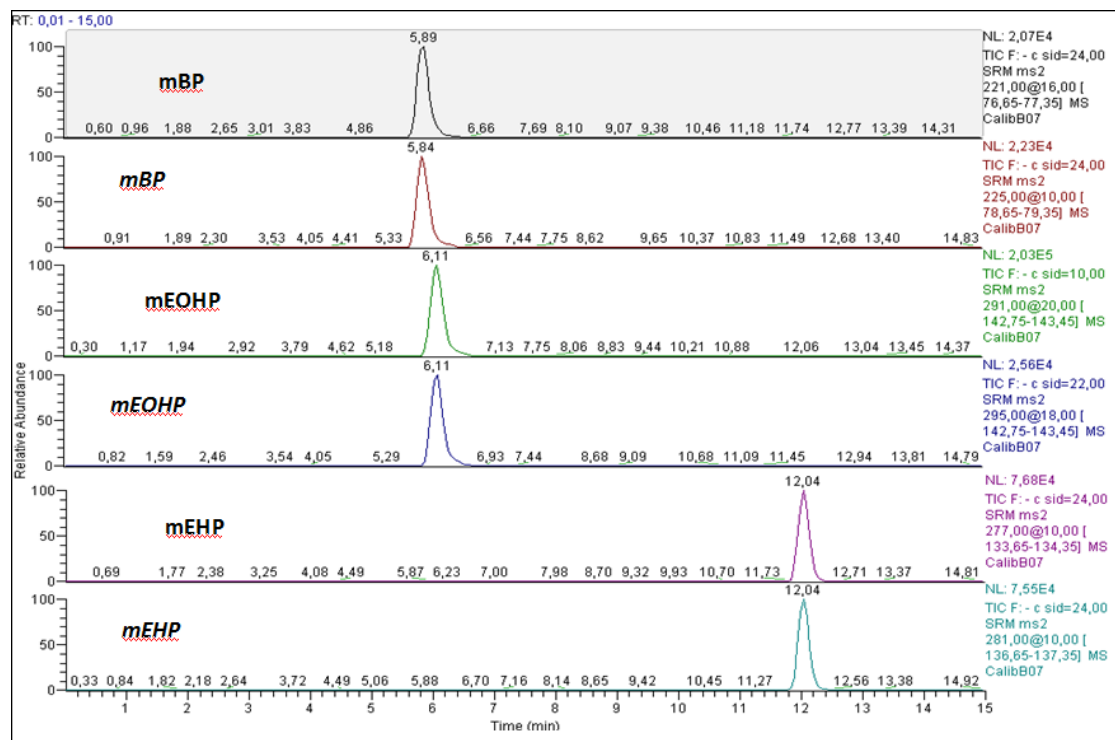
Αρχικά είχε χρησιμοποιηθεί ένα συντομότερο βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης, το οποίο είχε αναπτυχθεί στο εργαστήριο μας με εξαιρετικό διαχωρισμό των προς ανάλυση ενώσεων σε 12 min (τελευταία κορυφή) και 15 min συνολική διάρκεια (Πίνακας 9). Όμως σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δυο ισομερείς ενώσεις των δυο μεταβολιτών από αυτούς που μελετώνται στην παρούσα διατριβή, έχουν πανομοιότυπα SRM και παρόμοιους χρόνους έκλουσης(ίσο- και κ- διβουτυλεστέρας του φθαλικού οξέως, διαιθυλ-εξυλεστέρας και διοκτυλεστέρας του φθαλικού οξέως) στο βαθμιδωτό πρόγραμμα του [88]. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι το αρχικό βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης το οποίο είναι αρκετά πιο “ήπιο” όσον αφορά στη διαχωριστική του ικανότητα, σε ανάλυση πραγματικών δειγμάτων δεν θα διαχώριζε τις κορυφές των ισομερών και θα λαμβάνονταν υπερεκτιμημένα αποτελέσματα για αυτές τις ενώσεις. Συνεπώς επιλέχθηκε η λύση του πιο χρονοβόρου βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης. Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά ένα χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος με το αρχικό βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης (βλ. Εικόνα 11 Α και Β). Το mNP δεν υπάρχει επειδή δεν ήταν ακόμα διαθέσιμο εκείνη την περίοδο στο εργαστήριο.

**Πίνακας 9:** Αρχικό βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διάρκειας 15 min.

<b>Χρόνος (min)</b>	<b>% (0,1% Οξικό οξύ σε Ακετονιτρίλιο)</b>	<b>% (0,1% Οξικό οξύ σε Νερό)</b>	<b>mL/min</b>
0	30	70	0.350
10.0	50	50	0.350
11.0	100	0	0.350
12.0	100	0	0.350
13.0	30	30	0.350
15.0	30	30	0.350



Εικόνα 11A: Χρωματογράφημα διαλύματος προτύπων ενώσεων και των επισημασμένων αναλόγων τους (με πλάγια γράμματα) με το αρχικό βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης.



Εικόνα 11B: Χρωματογράφημα διαλύματος προτύπων ενώσεων και των επισημασμένων αναλόγων τους (με πλάγια γράμματα) με το αρχικό βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης.

Η λήψη του δείγματος πραγματοποιείται με αυτόματο δειγματολήπτη (Auto Sampler). Το μοντέλο εισαγωγής δείγματος ήταν πλήρους βρόχου (full loop). Οι βελτιστοποιημένες παράμετροι λειτουργίας του παρατίθενται στον Πίνακα 10. Πέραν του προγράμματος λειτουργίας του αυτόματου δειγματολήπτη, έχει αναπτυχθεί και πρόγραμμα για το ξέπλυμα της σύριγγας του και οι επίσης βελτιστοποιημένες παράμετροι παρατίθενται στον Πίνακα 10. Σκοπός ήταν οι εκμηδένιση φαινομένων μεταφοράς υπολειμμάτων από δείγμα σε δείγμα, με τη χρήση του κατάλληλου διαλύτη έκπλυσης και εύρεση των καταλληλότερων συνθηκών έκπλυσης.

Επίσης, είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι πριν από την κάθε έναρξη διαδικασίας μετρήσεων, πραγματοποιούνταν απαέρωση των διαλυτών, αποσυνδέοντας τη στήλη και αυξάνοντας τη ροή στα 2mL/min για 10min. Τέλος μετά από κάθε κύκλο αναλύσεων, εφαρμοζόταν 50μL/min ροή μεθανόλης στη στήλη για τουλάχιστον 12 ώρες ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα.

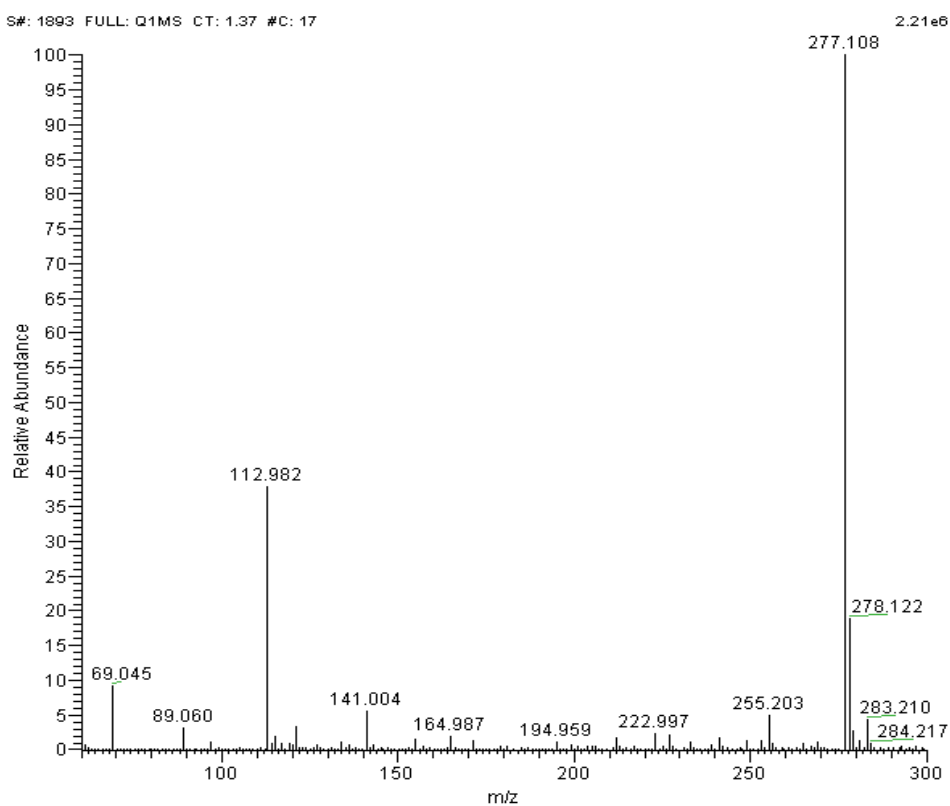
**Πίνακας 10:** Παράμετροι λειτουργίας αυτόματου δειγματολήπτη

Παράμετρος (μονάδες)	Τιμή
Όγκος ένεσης (μL)	20
Απόσταση βελόνας από τον πυθμένα του φιαλιδίου με το δείγμα (mm)	2.0
Ταχύτητα εισαγωγής του δείγματος (μL/s)	6.0
Διαλύτης έκπλυσης	CH <sub>3</sub> OH HPLC grade
Όγκος διαλύτη έκπλυσης πριν κάθε ένεση (μL)	1600
Όγκος διαλύτη έκπλυσης μετά από κάθε ένεση (μL)	1600
Ταχύτητα έκπλυσης (μL/s)	100.0



### 3.1.2 Ηλεκτροψεκασμός, Επιλογή θυγατρικών ιόντων για την τεχνική S.R.M. και βελτιστοποίηση

Οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης και επιλεκτικής μεθόδου ηλεκτροψεκασμού-διαδοχικής φασματομετρίας μαζών ποικίλουν. Παρακάτω θα περιγραφεί όλη η διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών για τη συγκεκριμένη μελέτη. Αρχικά φτιάχτηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 2μg/ml όλων των αναλυτών και λήφθηκαν φάσματα μάζας με απευθείας έγχυση στο φασματογράφο μάζας με ροή 10μL/min. Παρακάτω παρατίθεται ένα τέτοιο φάσμα (βλ. Εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης του mEHP, ληφθέν με απευθείας έγχυση.

Στη συνέχεια, το πρόδρομο ιόν, το οποίο ήταν μακράν το πιο άφθονο σε όλες τις ενώσεις, επαναθραυσματοποιήθηκε και κατασκευάστηκαν καμπύλες σχετικής έντασης των θυγατρικών ιόντων σε σχέση με την ενέργεια πρόσκρουσης (collision energy). Η ενέργεια πρόσκρουσης αντιστοιχεί στην ενέργεια εκείνη, η οποία εφαρμόζεται στο δεύτερο τετράπολο για τη θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος. Επίσης παρατίθεται χαρακτηριστικό διάγραμμα (βλ. Εικόνα 13). Οι βέλτιστες επιλεγμένες αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 11. Να σημειωθεί ότι δεν κρίθηκε

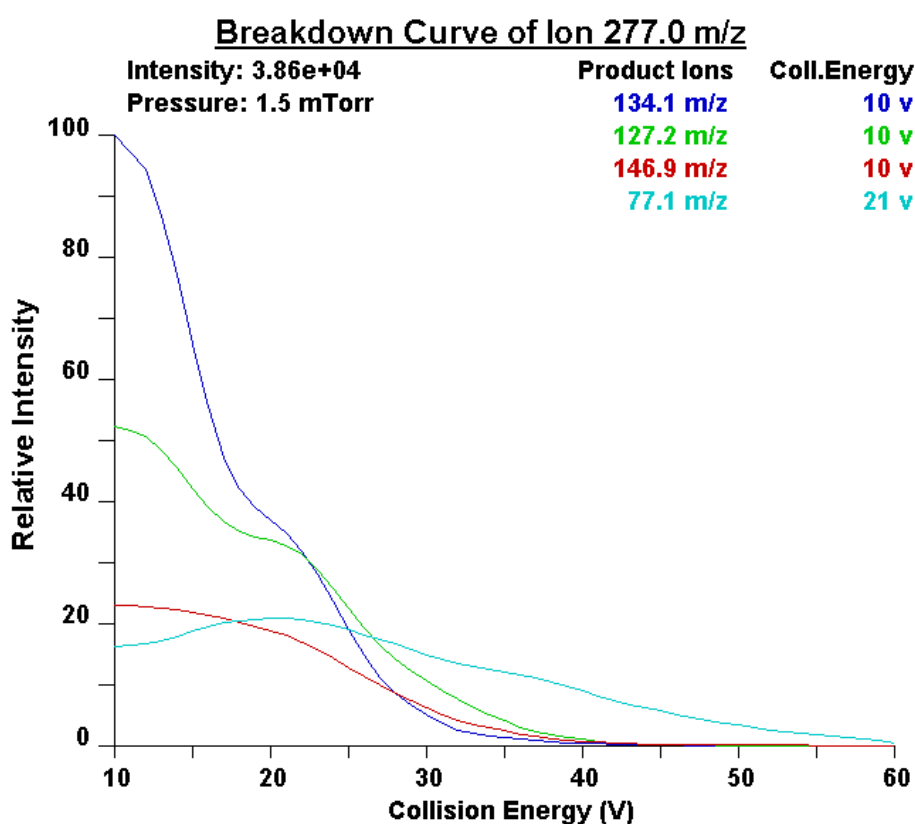
απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν περισσότερα του ενός S.R.M. ανά μεταβολίτη, στην τελική μορφή της μεθόδου, από τη στιγμή που υπάρχει μείωση της ευαισθησίας με την παρακολούθηση περισσοτέρων. Αρχικά έγιναν κάποιες δοκιμές σε πραγματικά δείγματα με περισσότερα SRM ανά ένωση, αλλά δεν βρέθηκαν παρεμποδοστικές ενώσεις με ταυτόσημους χρόνους έκλουσης και επιλεγμένες αντιδράσεις ιόντων. Επίσης και στη βιβλιογραφία χρησιμοποιείται μια επιλεγμένη αντίδραση ανά μεταβολίτη [90].

**Πίνακας 11:** Επιλεγμένες αντιδράσεις αναλυόμενων ενώσεων

Μεταβολίτης	SRM μη επισημασμένου	SRM επισημασμένου
mEP	193→77	197→79
mEHP	293→121	297→124
mBP	221→77	225→79
mEOHP	291→121	291→124
mEHP	277→134	281→137
mNP	291→141	295→141
Umbelliferone	177→133	179→135
4-methylumbelliferyl glucoronide	350→175	Μη διαθέσιμο αντιδραστήριο

Η σύσταση της κινητής φάσης επηρεάζει ιδιαίτερα την απόδοση του ηλεκτροψεκασμού. Γενικά προτιμώνται υψηλής περιεκτικότητας σε οργανικούς διαλύτες, κινητές φάσεις, με χαμηλή επιφανειακή τάση και με κάποια περιεκτικότητα σε ιόντα (π.χ. οξικό οξύ). Για να επιτευχθούν ταυτόσημες συνθήκες με τη χρωματογραφική ανάλυση, ελέγχθηκαν στο χρόνο κατακράτησης της κάθε ένωσης, τι αναλογία διαλυτών είχε το βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης και εφαρμόστηκε ακριβώς η ίδια αναλογία διαλυτών και ροή στην απευθείας έγχυση. Αρχικά μελετήθηκε το δυναμικό ηλεκτροψεκασμού (spray voltage), το οποίο εφαρμόζεται στη βελόνα και επηρεάζει τη μεταφορά ιόντων του αναλύτη από την υγρή φάση και ορίστηκε στα -4000V ως βέλτιστη τιμή για όλες τις ενώσεις. Η θερμοκρασία του τριχοειδούς που μεταφέρει τα ιόντα από το θάλαμο ιονισμού στο πρώτο

τετράπολο ρυθμίστηκε στους 330°C και η πίεση του αερίου ξήρανσης στις 20A.M.(Αυθαίρετες Μονάδες). Επίσης δεν παρακολουθούνταν όλα τα SRM ταυτόχρονα, αλλά χωρίστηκαν σε 4 ομάδες με βάση τους χρόνους κατακράτησης (segments) ώστε να αυξηθεί όσο το δυνατό περισσότερο η ευαισθησία και σε και κάθε segment είχε οριστεί η βέλτιστη τιμή της πίεσης για το αέριο εκνέφωσης (sheath gas). Στα τρία πρώτα segment ορίστηκε στις 45A.M. και στο τέταρτο στις 49A.M.. Το αέριο ήταν άζωτο υψηλής καθαρότητας 99%. Επίσης βελτιστοποιήθηκαν άλλοι δυο παράμετροι, το δυναμικό φακών εστίασης (tube lens offset) και η διάσπαση από επαγόμενη σύγκρουση στην πηγή (Source Collision Induced Dissociation, Source CID ), στις οποίες υπάρχει η δυνατότητα να οριστούν για κάθε SRM οι βέλτιστες τιμές, όπως και έγινε.



**Εικόνα 13:** Διάγραμμα συσχέτισης σχετικής έντασης των 4 αφθονότερων θυγατρικών ιόντων του mEHP σε σχέση με την ενέργεια πρόσκρουσης.

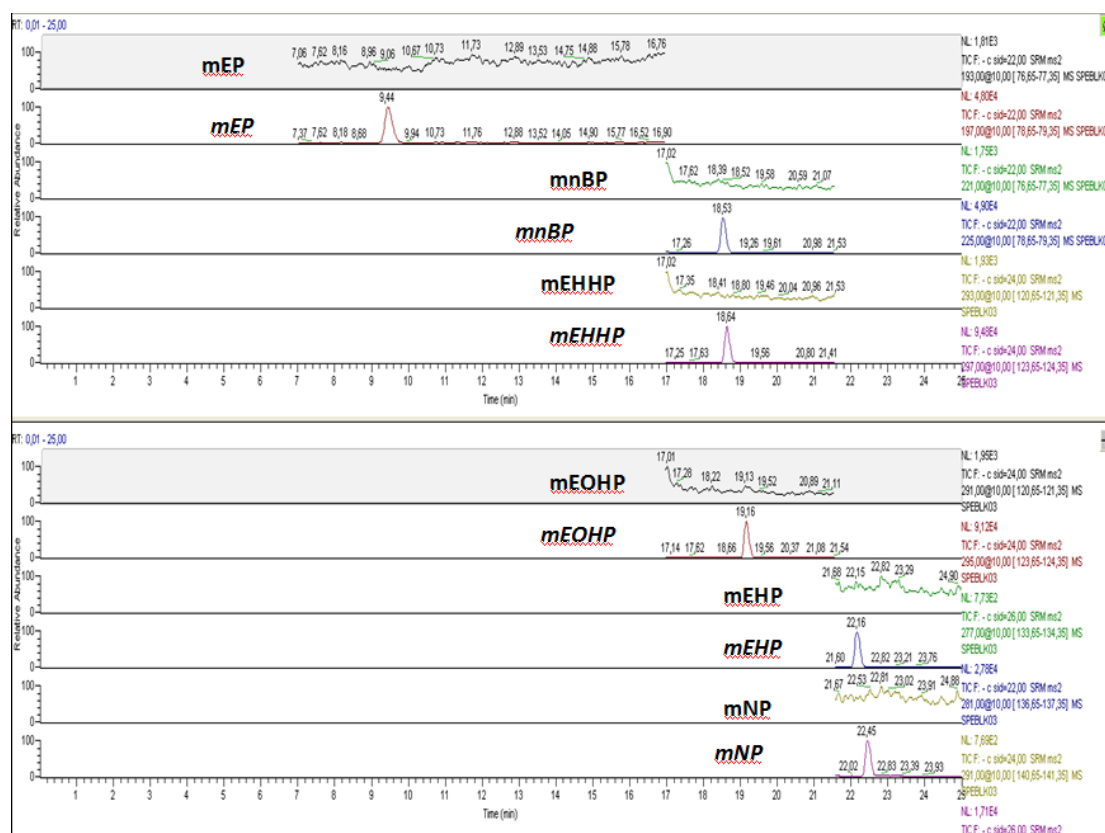
Μετά τις τελικές αλλαγές στη μέθοδο και τη βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων σε συνθήκες ταυτόσημες με τις χρωματογραφικές (βελτιστοποίηση με αναλογία διαλυτών και ροή ίδιες με αυτές που επικρατούν κατά την έκλουση της κάθε ένωσης) παρατηρήθηκε καλύτερη εικόνα στα χρωματογραφήματα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 14, όπου ανιχνεύονται όλοι οι μεταβολίτες που παρακολουθούνται εκτός από το mNP. Με πλάγια



200ng/mL, αναλύθηκαν στο HPLC-ESI-MS/MS και ολοκληρώθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι κορυφές για τις ενώσεις και για τα ισοτοπικά ισομερή όπου βρέθηκαν, με βάση καμπύλες βαθμονόμησης.

### 3.1.4 Ανακτήσεις και Τυφλά Δείγματα

Αρχικά αναλύθηκαν τυφλά δείγματα, ώστε να εντοπιστούν τυχόν επιμολύνσεις κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Έτσι αντί για 1mL ούρων, αναλύθηκε 1mL υπερκάθαρου νερού ανά δείγμα και ακολουθήθηκε ακριβώς η διαδικασία που εφαρμόστηκε και στα πραγματικά δείγματα. Ενώ στα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εντοπιζόταν μικροποσότητες κυρίως mEHP και mBP, στη συνέχεια όταν η μέθοδος τελειοποιήθηκε, οι συγκεντρώσεις μεταβολιτών στα τυφλά δείγματα βρέθηκαν όλες κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Οι τελικές αναλύσεις έγιναν σε 5 διαφορετικά δείγματα. Τα παραπάνω φαίνονται και στην Εικόνα 15, όπου παρατίθεται τυπικό χρωματογράφημα τυφλού δείγματος. Χαρακτηριστική είναι η απουσία οποιασδήποτε κορυφής μεταβολίτη, ενώ οι κορυφές των ιχνηθετημένων μεταβολιτών φαίνονται ξεκάθαρα. Να σημειωθεί ότι αυτή η εικόνα είναι πλήρως επαναλήψιμη σε κάθε κύκλο ανάλυσης όπου ελέγχεται.



Εικόνα 15: Τυπικό χρωματογράφημα τυφλού δείγματος.

Ακόλουθα, έγινε έλεγχος ανακτήσεων. Ο έλεγχος ανακτήσεων περιλαμβάνει την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων με γνωστή συγκέντρωση και συγκρίσιμη με τις αναμενόμενες στα πραγματικά δείγματα. Έτσι εντοπίζεται τι απώλειες υπάρχουν από τις ποσοτικοποιούμενες ενώσεις κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, πόσο επαναλήψιμες είναι αυτές οι απώλειες και εφαρμόζονται αντίστοιχες διορθώσεις στα πραγματικά δείγματα. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν επισημασμένα ανάλογα και η διόρθωση της ανάκτησης γινόταν ξεχωριστά σε κάθε δείγμα όπως θα αναλυθεί στο κεφάλαιο ποσοτικοποίηση. Οι ανακτήσεις χρησιμοποιήθηκαν ώστε να βελτιστοποιηθεί η απόδοση της διαδικασίας στην επαναληψιμότητα και στα όρια ανίχνευσης-ποσοτικοποίησης της μεθόδου. Με τη μέθοδο στην τελική της μορφή έγιναν αναλύσεις σε 3 δείγματα που εμβολιάστηκαν με 100ng και σε άλλα τρία που εμβολιάστηκαν με 500ng. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 12. Οι ανακτήσεις ιδιαίτερα με τον εμβολιασμό των 500ng είναι αρκετά υψηλές και επαναλήψιμες εκτός από το mNP. Από τη στιγμή που δεν χρησιμοποιούνται στη διόρθωση των αποτελεσμάτων στα πραγματικά δείγματα, λόγω των ιχνηθετημένων εσωτερικών προτύπων και το mNP γενικά δεν ανιχνεύεται στα δείγματα, συνολικά τα επίπεδα των ανακτήσεων κρίνονται ικανοποιητικά.

**Πίνακας 12:** Ανακτήσεις των αναλυόμενων ενώσεων

Ένωση	%Ανάκτηση (100ng)	%Ανάκτηση (500ng)
mEP	62±6	84±3
mEHHP	67±2	85±4
mBP	76±4	80±3
mEOHP	72±2	80±3
mEHP	37±7	82±6
mNP	32±8	31±6
Umbelliferone	68±2	83±2

### 3.1.5 Όρια ανίχνευσης-Ποσοτικοποίησης Οργάνου και Μεθόδου

Το όριο ανίχνευσης οργάνου (instrumental limit of detection, iLOD) είναι η ελάχιστη ποσότητα μιας ένωσης, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί από το όργανο με καθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Για να υπολογιστεί, παρασκευάστηκε διάλυμα των μεταβολιτών συγκέντρωσης 10ng/ml και αναλύθηκε 7 φορές στο όργανο. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε ώστε να είναι κοντά στα αναμενόμενα όρια ανίχνευσης και αυτά υπολογίστηκαν από τον τύπο[89]:

$$iLOD=(t) \times (S)$$

όπου,

**(t):** student's value για 99% όριο εμπιστοσύνης, τυπική απόκλιση με n-1 βαθμούς ελευθερίας (3,14 για 7 επαναλήψεις) και

**(S):** τυπική απόκλιση των συγκεντρώσεων των 7 επαναλήψεων του διαλύματος των μεταβολιτών.

**Πίνακας 13:** Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου των αναλυόμενων ενώσεων

Ένωση	iLOD(ng/mL)	iLOQ(ng/mL)
mEP	0.9	2.8
mEHHP	2.8	9.0
mBP	4.8	15.2
mEOHP	1.9	6.2
mEHP	0.2	0.6
mNP	2.0	6.0

Ομοίως υπολογίστηκε και το όριο ποσοτικοποίησης οργάνου (instrumental limit of quantification, iLOQ), το οποίο είναι η ελάχιστη ποσότητα μιας ένωσης, η οποία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί από το όργανο με καθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης αλλά σ' αυτήν την περίπτωση η τιμή t είναι ίση με 10. Τα iLOD και iLOQ παρατίθενται στον Πίνακα 13 σε

συγκεντρώσεις, για τις προαναφερθείσες συνθήκες του οργάνου (όγκος και τύπος βρόγχου κλπ).

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου (mLOD και mLOQ), που είναι η ελάχιστη ποσότητα σε πραγματικό δείγμα που μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί αντίστοιχα αφού αναλυθεί με τη συγκεκριμένη μέθοδο το δείγμα. Ο υπολογισμός γίνεται με βάση τα αντίστοιχα όρια του οργάνου, τα οποία διορθώνονται με βάση τη συμπύκνωση ή αραιώση που υπόκειται το δείγμα και με βάση τις υπολογισμένες ανακτήσεις της μεθόδου. Να σημειωθεί ότι η παρούσα ανάλυση ξεκινάει με 1mL ούρων και το δείγμα επαναδιασπείρεται στο τέλος της ανάλυσης σε 1mL νερό, άρα δεν υπάρχει συμπύκνωση ή αραιώση. Τα mLOD και mLOQ παρατίθενται στον Πίνακα 14. Τα όρια ανίχνευσης-ποσοτικοποίησης και της μεθόδου και του οργάνου καλύπτουν τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, αφού είναι αρκετά χαμηλότερα από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις στα δείγματα και είναι στα ίδια επίπεδα με τη βιβλιογραφία [86,87].

**Πίνακας 14:** Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου των αναλυόμενων ενώσεων

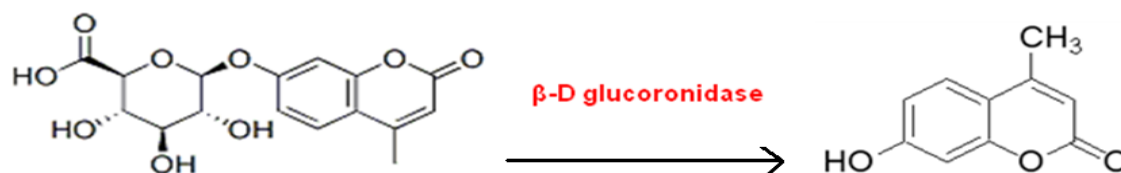
Ένωση	mLOD(ng/mL)	mLOQ(ng/mL)
mEP	1.4	4.6
mEHHP	4.2	13.4
mBP	6.3	20.0
mEOHP	2.7	8.6
mEHP	0.5	1.6
mNP	5.8	18.5

### 3.1.6 Ενζυμική Υδρόλυση

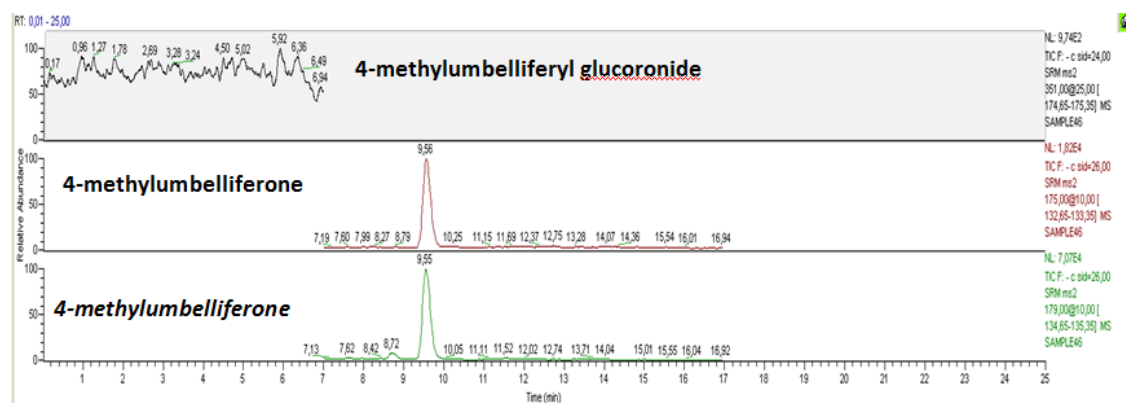
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [90] η ολοκλήρωση της ενζυμικής αντίδρασης και κατά συνέπεια η πλήρης μετατροπή των συζευγμένων μεταβολιτών σε ελεύθερους, παρακολουθείται ως εξής. Αρχικά στο δείγμα πριν αναλυθεί προστίθεται μια ποσότητα 4-methylumbelliferyl glucoronide, η οποία φέρει την ίδια ομάδα που φέρουν και οι συζευγμένοι μεταβολίτες, καταλύεται η υδρόλυση της από το ένζυμο και παράγεται Umbelliferone, της οποίας η αναμενόμενη ποσότητα υπολογίζεται με βάση την αρχική



προσθήκη 4-methylumbelliferyl glucoronide. Η βιβλιογραφία αναφέρει πλήρη υδρόλυση, η οποία ποτέ δεν επετεύχθη στην παρούσα μελέτη με τα ίδια αντιδραστήρια ακριβώς, παρά την πληθώρα δοκιμών σε ποικίλες συνθήκες.



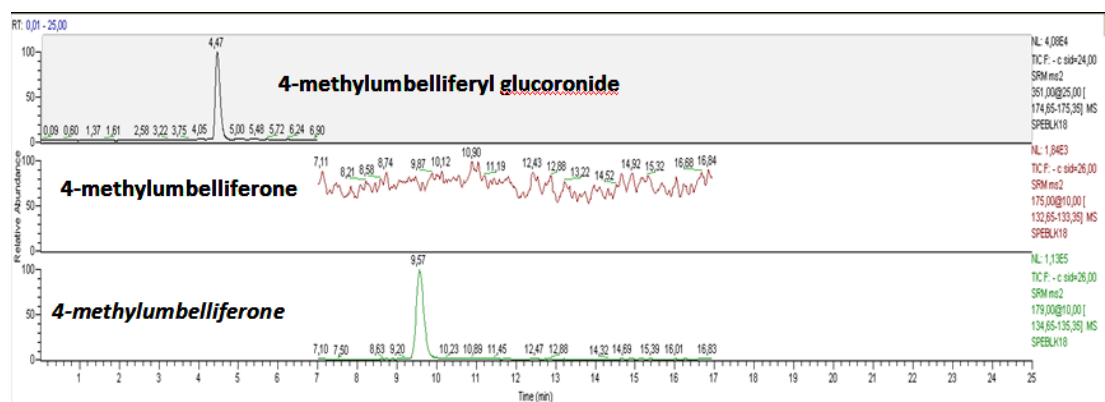
Η απόδοση ήταν επαναλήψιμη και χαρακτηριστικά παρατίθεται μια σειρά τριών επαναλήψεων όπου η απόδοση ήταν  $83 \pm 1\%$ . Έτσι ελέγχθηκε τελικά η καταστροφή του 4-methylumbelliferyl glucoronide και όχι η παραγωγή της umbelliferone, σαν μέτρο ελέγχου της ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Για αυτό το λόγο η παρακολούθηση του 4-methylumbelliferyl glucoronide εντάχθηκε στη μέθοδο και πλέον η απόδοση μετράται με αυτό τον τρόπο. Αυτό το παράδοξο συμβαίνει κατά πάσα πιθανότητα, λόγω της αδιευκρίνιστης περιεκτικότητας σε νερό του πρότυπου 4-methylumbelliferyl glucoronide. Χαρακτηριστικά χρωματογράφημα παρατίθενται στις Εικόνες 16 και 17.



**Εικόνα 16:**Χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος (με προσθήκη ενζύμου)

Φαίνεται ξεκάθαρα στην Εικόνα 16, όπου παρατίθεται χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος, η απουσία κορυφής του 4-methylumbelliferyl glucoronide, το οποίο σημαίνει ότι η ενζυμική υδρόλυση ολοκληρώθηκε πλήρως από τη στιγμή που έχει αντιδράσει πλήρως το 4-methylumbelliferryl glucoronide. Στα τυφλά δείγματα που αναλύονται σε κάθε κύκλο ανάλυσης δειγμάτων, δεν προστίθεται ένζυμο ώστε να επιβεβαιωθεί η ανίχνευση του το 4-methylumbelliferryl glucoronide. Στην Εικόνα 17 παρατίθεται χρωματογράφημα τυφλού δείγματος. Επίσης φαίνεται ξεκάθαρα η κορυφή του 4-methylumbelliferyl glucoronide και η απουσία κορυφής της 4-methylumbelliferone,

το οποίο σημαίνει ότι η υδρόλυση δεν πραγματοποιήθηκε έστω και μερικώς. Με πλάγια γράμματα φαίνεται η ιχνηθετημένη 4-methylumbelliferone και στα δυο χρωματογραφήματα.



Εικόνα 17:Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος στο οποίο δεν προστέθηκε ένζυμο.

### 3.1.7 Έλεγχος Ύπαρξης Φαινομένου Μήτρας (Matrix Effect)

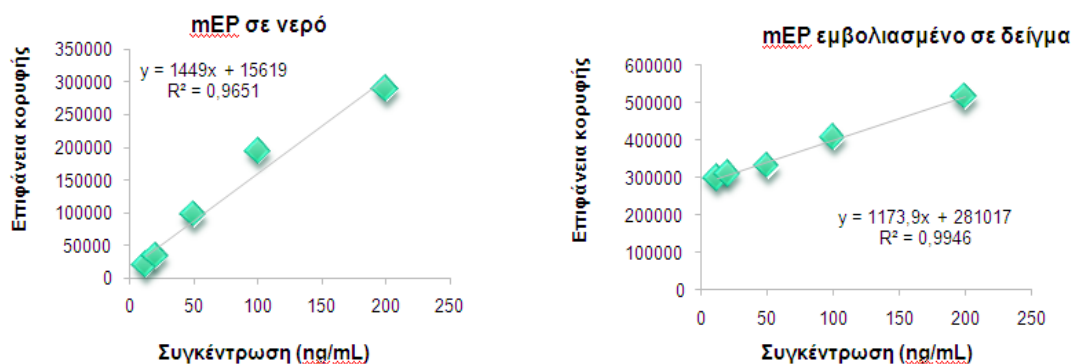
Φαινόμενο μήτρας ονομάζονται οι φυσικές παρεμποδίσεις (επίδραση μήτρας) που οφείλονται στις διαφοροποιήσεις των φυσικών ιδιοτήτων του διαλύματος του δείγματος σε σχέση με τα πρότυπα διαλύματα (ιξώδες, πυκνότητα, επιφανειακή τάση, τάση ατμών). Οι αλλαγές αυτές συνεπάγονται μεταβολές στην αποδοτικότητα της εκνεφώσεως και του ψεκασμού και έτσι το σήμα που καταγράφεται στο όργανο είναι μικρότερο σε σχέση με ένα πρότυπο διάλυμα ίδιας συγκέντρωσης. Κατά συνέπεια είναι απαραίτητος ο έλεγχος ύπαρξης του, αφού αν παρουσιάζεται και αγνοηθεί, η ίδια ποσότητα ένωσης όταν θα εισέρχεται για ανάλυση στο όργανο, όταν βρίσκεται σε πρότυπο διάλυμα, θα έχει διαφορετική απόκριση από ότι αν βρίσκεται διαλυμένη στη μήτρα του δείγματος. Αυτό σημαίνει ότι με χρήση εξωτερικών καμπυλών βαθμονόμησης (χωρίς τη χρήση ιχνηθετημένων εσωτερικών προτύπων), θα λαμβάνονται εσφαλμένες μετρήσεις. Ο έλεγχος ύπαρξης αυτού του φαινομένου κρίθηκε αναγκαίος και έγινε ως εξής:

1. Κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης ( $y=ax+b$ ) με πρότυπα διαλύματα σε συγκεντρώσεις 12, 20, 50, 100 και 200ng/mL.
2. Στη συνέχεια αναλύθηκε 6 φορές το ίδιο δείγμα ούρων και στο τελευταίο στάδιο της ανάλυσης αντί τα δείγματα να επαναδιαλυθούν σε 1mL νερό το καθένα, επαναδιαλύθηκαν σε πρότυπο διάλυμα με συγκεντρώσεις 12, 20,

50, 100 και 200ng/mL και ένα μόνο σε νερό(για να χρησιμοποιηθεί σαν μηδενικό σημείο στην καμπύλη).

3. Τέλος κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης με τα διαλύματα του δεύτερου σταδίου και συγκρίθηκε η κλίση των ευθειών σε σχέση με την καμπύλη αναφοράς (πρώτο στάδιο).
4. Το φαινόμενο μήτρας ποσοτικοποιείται ως η ποσοστιαία απόκλιση της καμπύλης των δειγμάτων σε σχέση με την πρότυπη και αν υπερβαίνει το 10% θεωρείται σημαντική και η ποσοτικοποίηση δεν μπορεί να γίνει με εξωτερική βαθμονόμηση.

Σε όλες τις ενώσεις βρέθηκε αξιοσημείωτο φαινόμενο μήτρας (πάνω από 10%), όπως φαίνεται και στις παρακάτω καμπύλες (βλ. Εικόνα 18) για το mEP. Η αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος περιγράφεται στην επόμενη ενότητα (3.1.8 Ποσοτικοποίηση).



**Εικόνα 18:** Καμπύλες βαθμονόμησης του mEP διαλυμένου σε νερό και σε αναλυμένο δείγμα.

### 3.1.8 Ποσοτικοποίηση

Λόγω της ύπαρξης του φαινομένου μήτρας, το οποίο δεν είναι επαναλήψιμο λόγω της μεταβαλλόμενης πυκνότητας των ούρων, ο ακριβής υπολογισμός του είναι αδύνατος. Κατά συνέπεια η χρήση εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης θα έδινε ιδιαίτερα ανακριβή αποτελέσματα. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτικοποίηση εσωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης. Σε κάθε δείγμα πριν αναλυθεί προστέθηκε μια ποσότητα από όλες τις επισημασμένες ενώσεις και το ίδιο γινόταν και πρότυπα που χρησιμοποιούνταν στην κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης. Πιο συγκεκριμένα ο εμβολιασμός γινόταν με 100-400ng (ανάλογα με τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις στα δείγματα) από κάθε

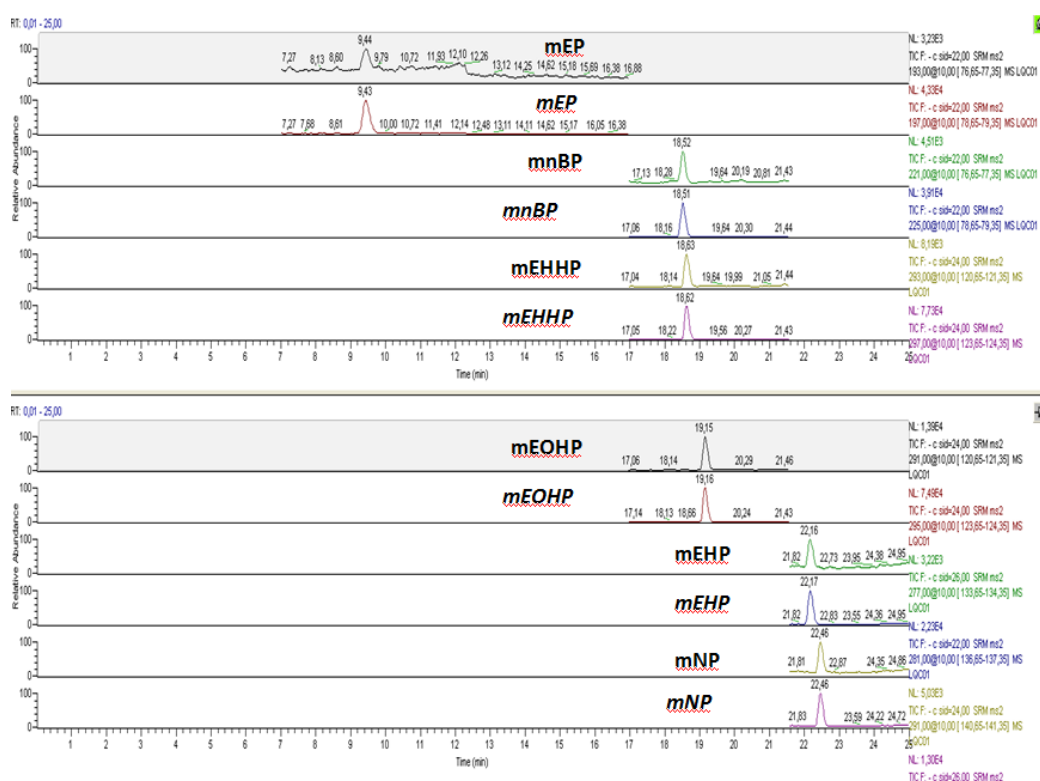
επισημασμένη ένωση στα δείγματα και ακριβώς η ίδια ποσότητα εμβολιαζόταν στα πρότυπα των καμπυλών που είχαν τις εξής συγκεντρώσεις σε μη επισημασμένους φθαλικούς μεταβολίτες(10, 20, 50, 100, 200 και 500ng/mL). Στον άξονα γ των καμπυλών, αντί να χρησιμοποιηθεί η επιφάνεια του μη επισημασμένου μεταβολίτη όπως στην εξωτερική βαθμονόμηση, χρησιμοποιούνταν ο λόγος της επιφάνειας του μη επισημασμένου μεταβολίτη προς την επιφάνεια του επισημασμένου. Αυτός ο τρόπος ποσοτικοποίησης προσφέρει τα εξής πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα, τα οποία πηγάζουν από τις παρεμφερείς φυσικοχημικές ιδιότητες των ισοτοπικών ισομερών(επισημασμένων και μη):

1. Η επίδραση του matrix effect εκμηδενίζεται αφού όπως επιδρά στις μη επισημασμένες ενώσεις με ακριβώς τον ίδιο τρόπο επιδρά και στις επισημασμένες.
2. Δε χρειάζεται διόρθωση ανάκτησης αφού θεωρητικά ότι απώλειες υπάρχουν στις μη επισημασμένες ενώσεις, υπάρχουν και στις επισημασμένες. Έτσι απλοποιείται και η ποσοτικοποίηση αφού γίνεται αυτόματα η διόρθωση της ανάκτησης ενώ είναι και πολύ πιο αξιόπιστη.
3. Τυχόν αστάθειες στο λαμβανόμενο σήμα του οργάνου (που στα συστήματα LC-MS είναι καθημερινό φαινόμενο), δεν επηρεάζουν τις μετρήσεις. Για παράδειγμα αν σε κάποια ανάλυση το mEP δώσει χαμηλότερο σήμα, στην ίδια ανάλυση και το επισημασμένο mEP θα δώσει αντίστοιχα χαμηλότερο σήμα και το σφάλμα μηδενίζεται.
4. Τέλος με τη χρήση των επισημασμένων ενώσεων, που έχουν ακριβώς τους ίδιους χρόνους κατακράτησης, η ήδη μεγάλη επιλεκτικότητα της SRM ενισχύεται ακόμα περισσότερο και αν κάποια ανάλυση αποτύχει, θα είναι εμφανές από τη μειωμένη ένταση των κορυφών των επισημασμένων ή και την απουσία τους.

### **3.1.9 Επαναληψιμότητα - Έλεγχος αξιοπιστίας κύκλων αναλύσεων - Διεργαστηριακά Πειράματα**

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά μιας μεθόδου είναι η επαναληψιμότητα της. Για να ελεγχθεί αναλύθηκαν τρία διαφορετικά δείγματα, δυο φορές το καθένα και τα αποτελέσματα σε όλες τις ενώσεις και στα τρία δείγματα διέφεραν λιγότερο από 7%. Οπότε η μέθοδος κρίνεται επαναλήψιμη.

Επίσης λόγω της μελλοντικής εφαρμογής της μεθόδου σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, σε κάθε κύκλο ανάλυσης, αναλύονται και δύο δείγματα με 1mL νερό αντί για ούρα, εμβολιασμένο με 20 και 100ng προτύπων φθαλικών μεταβολιτών. Αναλύονται κανονικά, ποσοτικοποιούνται και ελέγχεται το κατά πόσον διαφέρουν από τις αναμενόμενες τιμές (20 και 100 ng/mL). Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα παρατίθεται στην Εικόνα 19. Έτσι αν κάτι συμβεί στην ανάλυση (πειραματικό ή υπολογιστικό σφάλμα), θα αντικατοπτριστεί στην απόκλιση των μετρούμενων τιμών από τις θεωρητικές στα δείγματα ελέγχου. Στην Εικόνα 19 παρατίθεται χρωματογράφημα δείγματος, όπου αναλύθηκε 1 mL υπερκάθαρου νερού που εμβολιάστηκε με 20ng από τον καθένα από τους μεταβολίτες που παρακολουθεί η μέθοδος και αναλύθηκε όπως και τα πραγματικά δείγματα.



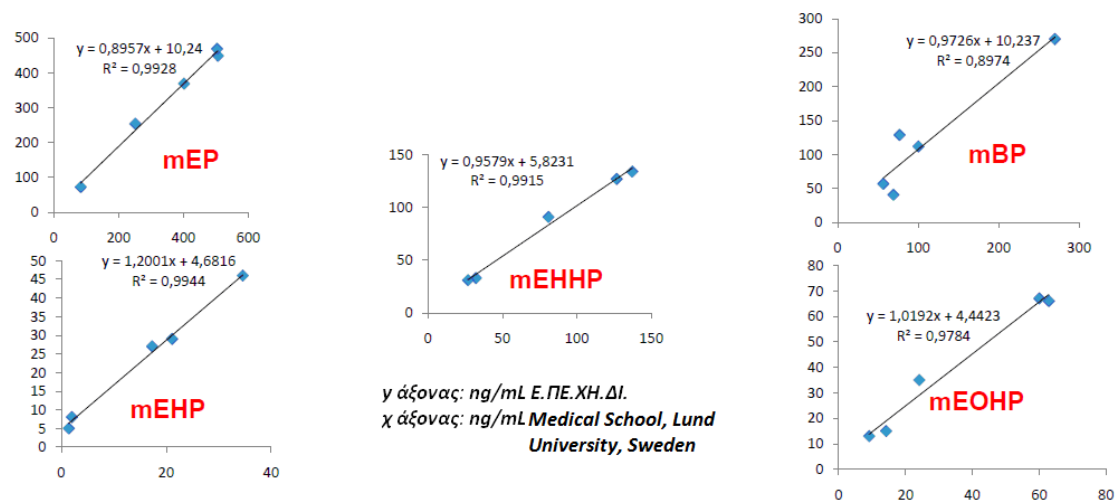
**Εικόνα 19:** Χρωματογράφημα εμβολιασμένου υπερκάθαρου νερού με 20 ng 6 μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων.

Τέλος για να χαρακτηριστεί μια μέθοδος αξιόπιστη, είναι απαραίτητο να αναλυθούν τα ίδια δείγματα σε διαφορετικά εργαστήρια. Πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικές διεργαστηριακές αναλύσεις ώστε η αξιοπιστία της μεθόδου να επιβεβαιωθεί πλήρως.

Η πρώτη διεργαστηριακή μελέτη έγινε με το Institute and Out-Patient Clinic for Occupational, του πανεπιστημίου του Erlangen (Γερμανία) και αφορά στο mBP στα πλαίσια του προγράμματος διεργαστηριακών πειραμάτων που οργανώνεται σε εξαμηνιαία βάση (G-EQUAS 46). Δυο δείγματα, ένα υψηλής και ένα χαμηλής συγκέντρωσης, στάλθηκαν στο εργαστήριο μας και αφού αναλύθηκαν και δόθηκαν τα αποτελέσματα, λάβαμε πιστοποιημένες τις δικές τους μετρήσεις. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 15. Από το G-EQUAS θεωρούνται αποδεκτές μετρήσεις εντός του  $\pm 30\%$  από τις δικές τους τιμές και οι μετρήσεις του εργαστηρίου μας απέχουν λιγότερο από 8,3%.

**Πίνακας 15:** Διεργαστηριακή σύγκριση G-EQUAS 46

Εργαστήριο	Δείγμα χαμηλής συγκέντρωσης	Δείγμα υψηλής συγκέντρωσης
Ε.ΠΕ.ΧΗ.ΔΙ.	48.1	204.9
G-EQUAS 46	44.4	203.0



**Εικόνα 20:** Διεργαστηριακή σύγκριση με την ομάδα της Ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου Lund.

Η δεύτερη διεργαστηριακή σύγκριση έγινε με μια ερευνητική ομάδα που συμμετέχει στο Envirogenomarkers της Ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου Lund, στη Σουηδία (Medical School, Lund University, Sweden) και αφορά στα mEP, mBP, mEHP, MEHP και mEOHP. Πέντε δείγματα που λήφθηκαν από μέλη του εργαστηρίου μας, στάλθηκαν στο συνεργαζόμενο εργαστήριο και παράλληλα αναλύθηκαν από εμάς. Τα

αποτελέσματα παρατίθενται στην Εικόνα 20 ανά μεταβολίτη. Υπάρχει πολύ καλή ταύτιση των διεργαστηριακών αποτελεσμάτων και στις 5 ενώσεις που συγκρίθηκαν. Στους γ άξονες είναι οι μετρήσεις του Ε.ΠΕ.ΧΗ.ΔΙ. και στους x οι μετρήσεις της ερευνητικής ομάδας της Ιατρικής σχολής, του πανεπιστημίου Lund. Υπάρχει ιδιαίτερα καλή συμφωνία στις μετρήσεις από τη στιγμή που η κλίση των ευθειών είναι πολύ κοντά στη μονάδα ( $1 \pm 0,1$ ) και στις 5 ενώσεις. Συνολικά οι διεργαστηριακές συγκρίσεις κρίνονται ιδιαίτερα επιτυχείς.

### 3.2 Εφαρμογή Μεθόδου σε Πραγματικά Δείγματα

Αρχικά να σημειωθεί ότι στα τυφλά δείγματα που αναλύθηκαν μαζί με τα πραγματικά δείγματα δεν βρέθηκαν μεταβολίτες πάνω από τα όρια ανίχνευσης και όσον αφορά στους ελέγχους αξιοπιστίας της μεθόδου οι μετρούμενες τιμές διέφεραν σε όλες τις περιπτώσεις λιγότερο από 10% από τις θεωρητικές.

Αναλύθηκαν δώδεκα δείγματα για ελεύθερους φθαλικούς μεταβολίτες και οι συγκεντρώσεις παρατίθενται στον Πίνακα 16.

**Πίνακας 16:** Συγκεντρώσεις σε ελεύθερους μεταβολίτες σε ng/mL 12 δειγμάτων.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
mEP	305	2876	83	1202	1974	2364	19	1937	247	479	84	30
mEHHP	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Π.	18	Δ.Α.	Δ.Π.	Δ.Α.
mBP	Δ.Α.	Δ.Π.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Π.	Δ.Π.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
mEOHP	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
mEHP	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Π.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	2	3	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
mNP	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.

Όπου Δ.Α.(Δεν Ανιχνεύτηκε), η συγκέντρωση ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Όπου Δ.Π.(Δεν Ποσοτικοποιήθηκε), η συγκέντρωση ήταν κάτω από τα όρια ποσοτικοποίησης και πάνω από τα όρια ανίχνευσης

Ουσιαστικά μόνο το mEP ανιχνεύεται στην ελεύθερη μορφή του και μάλιστα σε επίπεδα της τάξης των  $\mu\text{g/mL}$  σε κάποια δείγματα. Επίσης ποσοτικοποιείται σε όλα τα δείγματα. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι είναι ο μόνος μεταβολίτης από αυτούς που παρακολουθούνται στην παρούσα μελέτη που αποβάλλεται μέσω των ούρων στην

ελεύθερη μορφή του σε μεγάλες ποσότητες. Αναφέρεται ότι μέσω των ούρων, το 70% του mEP αποβάλλεται στην ελεύθερη μορφή του [6,43]. Κυρίως χρησιμοποιείται σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας και καλλυντικά, όποτε πιθανώς μέσω χρήσης τέτοιου είδους προϊόντων οι δότες των δειγμάτων εκτέθηκαν στην πρόδρομη ένωση του, το DEP.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν 24 δείγματα για ολικούς μεταβολίτες και τα αποτελέσματα παρατίθενται επίσης μαζί με κάποιες βιβλιογραφικές αναφορές για σύγκριση στον Πίνακα 17. Αρχικά παρατηρείται ότι το mEP είναι μακράν το πιο άφθονο σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταβολίτες. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στη βιβλιογραφία, και τα επίπεδα συγκεντρώσεων της παρούσας μελέτης πλησιάζουν περισσότερο τα επίπεδα των Η.Π.Α. , τα οποία είναι τα υψηλότερα μεταξύ των άλλων [91]. Βέβαια να τονιστεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων της παρούσας μελέτης είναι μικρός και τα όποια συμπεράσματα είναι κυρίως ενδεικτικά για τη δυνατότητα εφαρμογής της αναλυτικής μεθόδου εν όψει της μέλουσας μελέτης σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

**Πίνακας 17:** Συγκεντρώσεις σε ολικούς μεταβολίτες σε ng/mL 24 δειγμάτων και σύγκριση με βιβλιογραφικές αναφορές.

Μεταβολίτης	Μέσος Όρος	Μεσαία τιμή	Γεωμετρικός μέσος	Μέσος Όρος	Γεωμετρικός Μέσος	Μέσος Όρος	Διάμεσος
mEP	709	196	227	310.0	112.0	968.5	90.2
mEHP	155	64	76	21,9	14.3	33.6	46.8
mBP	184	74	102	41.1	43.2	39.7	181.0
mEOHP	48	24	28	21.6	15.0	26.9	36.5
mEHP	32	16	19	22.3	6.9	14.32	10.3
mNP	Ποσοτικοποιήθηκε σε 2 δείγματα (55 και 23 ng/mL)			-	-	-	-
Μελέτη	Ε.ΠΕ.ΧΗ.ΔΙ. Ελλάδα			[91] Νορβηγία	[91] Ολλανδία	[91] Η.Π.Α	[92] Γερμανία

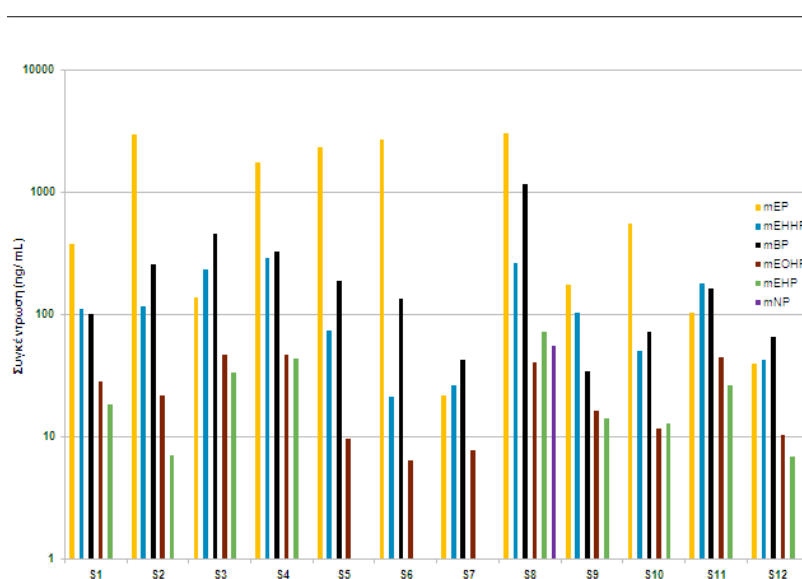
Όπου Δ.Α.(Δεν Ανιχνεύτηκε), η συγκέντρωση ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Όπου Δ.Π.(Δεν Ποσοτικοποιήθηκε), η συγκέντρωση ήταν κάτω από τα όρια ποσοτικοποίησης και πάνω από τα όρια ανίχνευσης.



Επίσης το mBP, η πρόδρομη ένωση του DBP, βρίσκεται στα επίπεδα της Γερμανίας [92], τα οποία είναι επίσης τα υψηλότερα, μεταξύ των υπολοίπων. Το DBP, όπως και το mEP, χρησιμοποιείται σε είδη προσωπικής φροντίδας και καλλυντικά αλλά και σε κάποια πλαστικά σαν πλαστικοποιητής, σε κόλλες, στο PVC κ.λ.π. οπότε υποδηλώνεται και αυξημένη τέτοιου τύπου έκθεση.

Το mEHP, mEOHP, και mEHHP έχουν κοινή πρόδρομη ένωση το DEHP το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως σε οικοδομικά υλικά, σε τμήματα αυτοκινήτων (ταπεταρίες, καθίσματα), συσκευασίες τροφίμων κ.λ.π.. Επίσης και στους τρεις μεταβολίτες παρατηρούνται οι υψηλότερες τιμές στην παρούσα μελέτη σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Όσον αφορά στο miNP, πρόδρομη ένωση του DiNP, που έχει παρεμφερείς εφαρμογές με το DEHP, δεν ανιχνεύθηκε παρά μόνο σε δυο δείγματα και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές γι' αυτό. Αυτό πιθανόν εξηγείται με το ότι δεν χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα όσο τα υπόλοιπα όσο τα υπόλοιπα, αλλά και από το ότι οξειδώνεται σε άλλες μορφές σχετικά γρήγορα [50].



**Εικόνα 21:** Κατανομή συγκεντρώσεων ολικών μεταβολιτών φθαλικών εστέρων σε 12 δείγματα.

Η συνολική κατανομή των επιπέδων των συγκεντρώσεων παρατίθεται στην Εικόνα 21 και λόγω των μεγάλων διαφοροποιήσεων των συγκεντρώσεων ο άξονας ψ είναι βαθμονομημένος σε λογαριθμική κλίμακα. Αφθονότερο όλων είναι το mEP και κατά σειρά ακολουθούν τα mBP, mEHHP, mEOHP και mEHP. Αυτή είναι μια γενική τάση και

ακολουθείται στα περισσότερα δείγματα. Παρόμοια κατανομή παρουσιάζουν δε γενικές γραμμές και οι μελέτες της βιβλιογραφίας. Το κύριο συμπέρασμα που προκύπτει από τα αποτελέσματα είναι ότι βρίσκονται στα ίδια επίπεδα με τις βιβλιογραφικές αναφορές και σχετικά υψηλότερα. Αυτό βέβαια δεν είναι απόλυτο λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων.

## 4 Συμπεράσματα

Παρακάτω παρατίθενται συνοπτικά τα βασικά συμπεράσματα που εξάγονται από την αναλυτική διαδικασία.

1. Αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μια ιδιαίτερα ευαίσθητη και επιλεκτική μέθοδος για την ανάλυση έξι φθαλικών μεταβολιτών, του mEP, του mBP, του mNP, του mHP και δύο παραγώγων του mHP, του mEHP και του mEOHP. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ανάλυση με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μαζών με πηγή ηλεκτροψεκασμό.
2. Βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του αυτόματου δειγματολήπτη ώστε να εκμηδενιστεί το φαινόμενο επιμόλυνσης από δείγμα σε δείγμα (carry over) στον ελάχιστο χρόνο και με την ελάχιστη κατανάλωση διαλύτη.
3. Η εύρεση των βέλτιστων τιμών λειτουργίας του φασματογράφου μάζας έγινε σε συνθήκες ροής και σύστασης κινητής φάσης ταυτόσημες με τις αντίστοιχες χρωματογραφικές στο χρόνο έκλουσης της κάθε ένωσης.
4. Τα όρια ανίχνευσης-ποσοτικοποίησης μεθόδου και οργάνου βρίσκονται στα χαμηλά ng/mL.
5. Χρησιμοποιήθηκε ένα βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης, σχετικά χρονοβόρο αλλά εξασφαλίζει όμως το διαχωρισμό μεταβολιτών με κοινά SRM (ίσο- και κ- διβουτυλεστέρας του φθαλικού οξέως, διαιθυλ-εξυλεστέρας και διοκτυλεστέρας του φθαλικού οξέως).
6. Η χρωματογραφική συμπεριφορά είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική.
7. Με τροποποιήσεις σε σχέση με τη βιβλιογραφία, επιτεύχθηκαν ικανοποιητικές ανακτήσεις και μηδενικά επίπεδα μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα τυφλά δείγματα.
8. Μετρήθηκε με εναλλακτικό τρόπο σε σχέση με τη βιβλιογραφία η απόδοση της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης υδρόλυσης των συζευγμένων μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων προς ελεύθερους.

9. Στη συμπύκνωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός συμπυκνωτής υπό κενό που επιτρέπει την ταυτόχρονη συμπύκνωση 18 δειγμάτων σε αντίθεση με τη συνήθη χρήση ρεύματος  $N_2$ , όπου κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό.
10. Εντοπίστηκε έντονο φαινόμενο μήτρας και αντιμετωπίστηκε με χρήση επισημασμένων αναλόγων των μετρούμενων ενώσεων. Με τη χρήση επίσης αυτών των ενώσεων κάθε δείγμα είχε τη δική του διόρθωση της ανάκτησης.
11. Έγινε έλεγχος σε όλα τα αντιδραστήρια για ισοτοπικά ισομερή, ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα της μεθόδου και σε κάθε κύκλο ανάλυσης επιβεβαιωνόταν η καλή λειτουργία της με ανάλυση τυφλών και προτύπων διαλυμάτων.
12. Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν με την επιτυχή έκβαση των δυο διεργαστηριακών συγκρίσεων που πραγματοποιήθηκαν.
13. Όσον αφορά στα δείγματα που αναλύθηκαν, οι συγκεντρώσεις και στους ελεύθερους και στους ολικούς μεταβολίτες ήταν απόλυτα αναμενόμενες και συγκρίσιμες με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, σε ελεύθερη μορφή σε σημαντικές ποσότητες εντοπίζεται μόνο το mEP. Στους ολικούς μεταβολίτες τα επίπεδα και η κατανομή των συγκεντρώσεων βρίσκονται σε συμφωνία με τις βιβλιογραφικές αναφορές αν και είναι σχετικά υψηλότερες.
14. Για να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα, πρέπει να αναλυθεί αρκετά μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων.

## 5 Βιβλιογραφία

---

<sup>1</sup> ATSDR. Toxicological profile for diethylphthalate, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 1995.

<sup>2</sup> ATSDR. Toxicological profile for di-n-butyl phthalate, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 2001.

<sup>3</sup> ATSDR. Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 2002.

<sup>4</sup> Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M., Hungerbühler, K., What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal.* 2006, 26, 803–824.

<sup>5</sup> Hauser, R., Calafat, A. M., Phthalates and human health, *Occup. Environ. Med.* 2005, 62, 806–818.

<sup>6</sup> Silva, M. J., Barr, D. B., Reidy, J. A., Kato, K., et al., Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites, *Arch. Toxicol.* 2003, 77, 561–567.

<sup>7</sup> Preiksa, R. T., Zilaitiene, B., Matulevicius, V., Skakkebaek, N. E., et al., Higher than expected prevalence of congenital cryptorchidism in Lithuania: A study of 1204 boys at birth and 1 year follow-up, *Hum. Reprod.* 2005, 20, 1928–1932.

---

<sup>8</sup> CDC, Third national report on human exposure to environmental chemicals, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2005, <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/thirdreport.pdf>.

<sup>9</sup> Wams, T.J., Diethylhexylphthalate as an Environmental Contaminant - a Review. *Sci. Total Environ.* 1987.66: 1-16.

<sup>10</sup> ECPI (European Council for Plasticisers and Intermediates), 2004. The phthalates information centre

<sup>11</sup> Muller, A. K., Nielsen, E., Ladefoged, O., Human exposure to selected phthalates in Denmark, The Danish Veterinary and Food Administration, Foedevare Rapport 2003, 15 (1st Edition), 1–156, <http://www.foedevarestyrelsen.dk/Fdir/Publications/2003015/Rapport.pdf>

<sup>12</sup> Howard, P. H., S. Banerjee, K. H. Robillard. Measurement of Water Solubilities, Octanol/Water Partition Coefficients and Vapor Pressures of Commercial Phthalate Esters. *Environ. Toxicol. Chem.* 1985, 4(5), 653-661.

<sup>13</sup> Howard, P.H. 1989. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals: Vol. I Large Production and Priority Pollutants. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI.

<sup>14</sup> Sears, J. K., N. W. Touchette. Plasticizers, in: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, eds. H.F. Mark, D.F. Othmer, C.G. Overberger and G.T. Seaborg, Vol. 18, 3rd ed., John Wiley and Sons, New York, pp. 1982, 738-746.

<sup>15</sup> Yalkowsky, S.H., S. Banerjee. Aqueous Solubility- Methods of Estimation for Organic Compounds, Marcel Dekker, Inc. New York, 1992. 264 pp.

---

<sup>16</sup> De Bruijn, J.F., Busser, W. Seinen and J. Hermens. Determination of octanol/water partition coefficients for hydrophobic organic chemicals with the "slow-stirring" method. *Environ. Toxicol. Chem.* 1989.8: 499-512.

<sup>17</sup> Brooke, D., I. Nielsen, J. De Bruijn and J. Hermens, "An interlaboratory evaluation of the stir-flask method for the determination of octanol-water partition coefficients (Log P)", *Chemosphere*, 1990,21(1-2), 119-133.

<sup>18</sup> Ellington, J.J. and T.L. Floyd. 1996. Octanol/water partition coefficients for eight phthalate esters. EPA/600/S-96/006, Sept. 1996; Athens, GA: USEPA (National Exposure Research Lab).

<sup>19</sup> Staples C., Peterson C., Parkerton T. and Adams W., The environmental fate of phthalate esters: A literature review. 1997, *Chemosphere*, 35, 667-749.

<sup>20</sup> Meylan, W. M., P. H. Howard. User's Guide for EPIWIN, Syracuse Research Corporation, 1995. Syracuse, NY, USA.

<sup>21</sup> Long, J.M. SPARC Estimations of KowS and Solubilities for a Series of Phthalate Esters. Personal communication, 1995.. U.S. Environmental Protection Agency, NERL, Athens, Georgia.

<sup>22</sup> Becker, K., Seiwert, M., Kraus, S., et al., German Environmental Survey 1998 (GerES III): pesticides and other pollutants in housedust. Proceeding of the Ninth International Conference on Indoor Air and Climate, 2002. (*Indoor Air* 02) 4, 883–887.

<sup>23</sup> Fromme, H., Lahrz, T., Piloty, M., Gebhart, H., Oddoy, A., Ruden, H., Occurrence of phthalates and musk fragrances in indoor air and dust from apartments and kindergartens in Berlin (Germany). 2004, *Indoor Air* 14, 188–195.

---

<sup>24</sup> Kersten, N.E., Reich, T., Schwer fluchtige organische Umweltchemikalien in Hamburger Hausstaub. *Gefahrst. Reinh. Luft*, 2003, 63, 85–91.

<sup>25</sup> Pohner, A., Simrock, S., Thumulla, J., Weber, S., Wirkner, T., Hintergrundbelastung des Hausstaubs von Privathaushalten mit mittel- und schwerfluchtigen organischen Schadstoffen. *Z. Umweltmed.* 1998, 6, 337–345.

<sup>26</sup> Holstrup, O., Butte, W., Endocrin Wirksame Xenobiotika in Haushalten. Konzentrationen in der Luft und im Hausstaub. Bericht im Auftrag des Niedersächsischen Ministeriums für Frauen, Arbeit und Soziales, Oldenburg 2001.

<sup>27</sup> Sheldon, L., Whitaker, D., Keever, J., Clayton, A., Perritt, R., Phthalates and PAHs in indoor and outdoor air in a southern California community. In: *Proceedings of Indoor Air*, 1993. 93, vol. 3.

<sup>28</sup> COM, European Commission, Official Journal L 315, 09/12/1999, pp. 46–49.

<sup>29</sup> NTP-CERHR, NTP-CERHR expert panel report on di(2-ethylhexyl) phthalate. NTP-CERHR-DEHP, 2000.

<sup>30</sup> NTP-CERHR, Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-isononyl phthalate (DINP), 2003a. NIH Publ No. 03-4484.

<sup>31</sup> NTP-CERHR, Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-isodecyl phthalate (DIDP), 2003b, NIH Publ No. 03-4485.



---

<sup>32</sup> NTP-CERHR, Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-butyl phthalate (DBP), 2003c. NIH Publ No. 03-4486.

<sup>33</sup> NTP-CERHR, Monograph on the potential human reproductive and developmental effects butyl benzyl phthalate (BBP), 2003d, NIH Publ No. 03-4487.

<sup>34</sup> NTP-CERHR, Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-octyl phthalate (DnOP), 2003e, NIH Publ No. 03-4488.

<sup>35</sup> NTP-CERHR, Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-hexyl phthalate (DnHP), 2003f, NIH Publ No. 03-4489.

<sup>36</sup> NTP-CERHR, 2005. Expert panel re-evaluation of DEHP, Meeting summary, October 14, 2005, /www.noharm.org/ details.cfm?ID=1130&type=documentS.

<sup>37</sup> IARC (International Agency for Research on Cancer), Some industrial chemicals. IARC Monographs 77, 41–148, 2000.

<sup>38</sup> Calafat, A. M., Ye, X., Silva, M. J., Kuklennyik, Z., et al., Human exposure assessment to environmental chemicals using biomonitoring, *Int. J. Androl.* 2006, 29, 166–171.

<sup>39</sup> Rusyn, I., Peters, J. M., Cunningham, M. L., Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver, *Crit. Rev. Toxicol.* 2006, 36, 459–479.

---

<sup>40</sup> Heindel, J. J., Powell, C. J., Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: Effects of phthalate side chain and age of animal, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992, 115, 116 – 123.

<sup>41</sup> Koch, H. M., Bolt, H. M., Preuss, R., Angerer, J., New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP, *Arch. Toxicol.* 2005, 79, 367 –376.

<sup>42</sup> Silva, M. J., Barr, D. B., Reidy, J. A., Kato, K., et al., Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites, *Arch. Toxicol.* 2003, 77, 561–567.

<sup>43</sup> Albro, P. W., Moore, B., Identification of the metabolites of simple phthalate diesters in rat urine, *J. Chromatogr.* 1974, 94, 209–218.

<sup>44</sup> Williams, D. T., Blanchfield, B. J., The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate-7-14 C in the rat, *J. Agric. Food Chem.* 1975, 23, 854 –858.

<sup>45</sup> Foster, P. M., Cook, M. W., Thomas, L. V., Walters, D. G., et al., Differences in urinary metabolic profile from di-n-butyl phthalate-treated rats and hamsters. A possible explanation for species differences in susceptibility to testicular atrophy, *Drug Metab. Dispos.* 1983, 11, 59–61.

<sup>46</sup> Saillenfait, A. M., Payan, J. P., Fabry, J. P., Beydon, D., et al., Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of Di-n-butyl phthalate administered to pregnant rats, *Toxicol. Sci.* 1998, 45, 212–224.

---

<sup>47</sup> Albro, P. W., Corbett, J. T., Schroeder, J. L., Jordan, S. T. & Matthews, H. B. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environmental Health Perspectives*, 1982, 45, 19–25.

<sup>48</sup> Koch, H. M., Bolt, H. M., Preuss, R. & Angerer, J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium labelled DEHP. *Archives of Toxicology*, 2005b, 79, 367–376.

<sup>49</sup> Silva, M. J., Kato, K., Wolf, C., Samandar, E., et al., Urinary biomarkers of di-isononyl phthalate in rats, *Toxicology*, 2006, 223, 101–112.

<sup>50</sup> Silva, M. J., Reidy, J. A., Preau, J. L., Jr., Needham, L. L., et al., Oxidative metabolites of diisononyl phthalate as biomarkers for human exposure assessment, *Environ. Health Perspect.* 2006, 114, 1158–1161.

<sup>51</sup> Foster, P. M., Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters, *Int. J. Androl.* 2006, 29, 140–147.

<sup>52</sup> CDC, Third national report on human exposure to environmental chemicals, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2005, <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/thirdreport.pdf>.

<sup>53</sup> Foster, P. M., Cattley, R. C., Mylchreest, E., Effects of di-nbutyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: Implications for human risk assessment, *Food Chem. Toxicol.* 2000, 38, S97–S99.

---

<sup>54</sup> Gray, L. E., Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., et al., Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat, *Toxicol. Sci.* 2000, 58, 350–365.

<sup>55</sup> Lee, K. Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., et al., Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation, *Toxicology* 2004, 203, 221–238.

<sup>56</sup> Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R. C., Foster, P. M., Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999, 156, 81–95.

<sup>57</sup> Parks, L. G., Ostby, J. S., Lambricht, C. R., Abbott, B. D., et al., The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat, *Toxicol. Sci.* 2000, 58, 339–349.

<sup>58</sup> Dalsenter, P. R., Santana, G. M., Grande, S. W., Andrade, A. J., et al., Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats, *Hum. Exp. Toxicol.* 2006, 25, 297–303.

<sup>59</sup> Grande, S. W., Andrade, A. J., Talsness, C. E., Grote, K., et al., A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: Effects on female rat reproductive development, *Toxicol. Sci.* 2006, 91, 247–254.

<sup>60</sup> Fisher, J. S., Macpherson, S., Marchetti, N., Sharpe, R. M., Human “testicular dysgenesis syndrome”: A possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate, *Hum. Reprod.* 2003, 18, 1383–1394.

---

<sup>61</sup> Skakkebyk, N. E., Jørgensen, N., Main, K. M., Rajpert-De Meyts, E., et al., Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* 2006, 29, 2–11.

<sup>62</sup> Sharpe, R. M., Phthalate exposure during pregnancy and lower anogenital index in boys: Wider implications for the general population? *Environ. Health Perspect.* 2005, 113, A504–A505.

<sup>63</sup> Duty, S. M., Singh, N. P., Silva, M. J., Barr, D. B., et al., The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay, *Environ. Health Perspect.* 2003, 111, 1164–1169.

<sup>64</sup> Hauser, R., Meeker, J. D., Singh, N. P., Silva, M. J., et al., DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites, *Hum. Reprod.* 2007, 22, 688–695.

<sup>65</sup> Hauser, R., Meeker, J. D., Singh, N. P., Silva, M. J., et al., DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites, *Hum. Reprod.* 2007, 22, 688–695.

<sup>66</sup> Hauser, R., Meeker, J. D., Duty, S., Silva, M. J., et al., Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites, *Epidemiology* 2006, 17, 682–691.

<sup>67</sup> Duty, S. M., Calafat, A. M., Silva, M. J., Ryan, L., et al., Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men, *Hum. Reprod.* 2005, 20, 604–610.

---

<sup>68</sup> Swan, S. H., Main, K. M., Liu, F., Stewart, S. L., et al., Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure, *Environ. Health Perspect.* 2005, 113, 1056–1061.

<sup>69</sup> Marsee, K., Woodruff, T. J., Axelrad, D. A., Calafat, A. M., et al., Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance, *Environ. Health Perspect.* 2006, 114, 805–809.

<sup>70</sup> Main, K. M., Mortensen, G. K., Kaleva, M. M., Boisen, K. A., et al., Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age, *Environ. Health Perspect* 2006, 114, 270–276.

<sup>71</sup> Lottrup, G., Andersson, A. M., Leffers, H., Mortensen, G. K., et al., Possible impact of phthalates on infant reproductive health, *Int. J. Androl.* 2006, 29, 172–180.

<sup>72</sup> Cobellis, L., Latini, G., De Felice, C., Razzi, S., et al., High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis, *Hum. Reprod.* 2003, 18, 1512 – 1515.

<sup>73</sup> Latini, G., De Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A. et al., In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy, *Environ. Health Perspect.* 2003, 111, 1783–1785.

<sup>74</sup> Koch H., Gonzalez-Reche L., Angerer J., On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine, *J. Chromatogr. B*, 2003, 784, 169–182.

---

<sup>75</sup> Preuss R., Koch H., Angerer J., Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 2005, 816, 269–280.

<sup>76</sup> Kato K., Shoda S., Takahashi M., Doi N., Yoshimura Y., Nakazawa H., Determination of three phthalate metabolites in human urine using on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 2003, 788, 407–411.

<sup>77</sup> Calafat, A. M., Slakman, A. R., Silva, M. J., Herbert, A. R., et al., Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004, 805, 49–56.

<sup>78</sup> Mortensen, G. K., Main, K. M., Andersson, A.-M., Leffers, H. et al., Determination of phthalate monoesters in human breast milk, consumer milk and infant formula by tandem mass spectrometry(LC/MC/MS), *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 1084 –1092.

<sup>79</sup> Silva, M. J., Reidy, J. A., Herbert, A. R., Preau, J. L., Jr., et al., Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2004, 72, 1226 –1231.

<sup>80</sup> Özer E. and Güçer Ş., Determination of some phthalate acid esters in artificial saliva by gc–ms after activated carbon enrichment, *Talanta*, 2011, 84, 362-367.

<sup>81</sup> Kato K, Silva MJ, Brock JW, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Quantitative detection of nine phthalate metabolites in human serum using reversed-phase high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 2003, 27, 284–289.

---

<sup>82</sup> Kato, K., Silva, M. J., Needham, L. L., Calafat, A. M., Quantifying phthalate metabolites in human meconium and semen using automated off-line solid-phase extraction coupled with on-line SPE and isotope-dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 2006, 78, 6651–6655.

<sup>83</sup> Calafat, A. M., Brock, J. W., Silva, M. J., Gray, L. E., Jr., et al., Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate, *Toxicology* 2006, 217, 22–30.

<sup>84</sup> Gollamudi, R., Prasanna, H. R., Rao, R. H., Lawrence, W. H., et al., Impaired metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in old rats – an in vitro study, *J. Toxicol. Environ. Health* 1983, 12, 623–632.

<sup>85</sup> Foster, P. M., Cook, M. W., Thomas, L. V., Walters, D. G., et al., Differences in urinary metabolic profile from di-n-butyl phthalate-treated rats and hamsters. A possible explanation for species differences in susceptibility to testicular atrophy, *Drug Metab. Dispos.* 1983, 11, 59–61.

<sup>86</sup> Foster, P. M., Cook, M. W., Thomas, L. V., Walters, D. G., et al., Differences in urinary metabolic profile from di-n-butyl phthalate-treated rats and hamsters. A possible explanation for species differences in susceptibility to testicular atrophy, *Drug Metab. Dispos.* 1983, 11, 59–61.

<sup>87</sup> Silva M.J, Malek N.A., Hodge C.C., Reidy J.A., Kato K., Barr D.B., Needham L.L., Brock J.W., Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 2003, 789, 393.



---

<sup>88</sup> Silva M., Slakman R., Reidy J., Preau J. Jr., Herbert A., Samandar E., Needham L., Calafat A., Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B*, 2004, 805, 161-167.

<sup>89</sup> Method 300.1: Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography, Revision 1.0, National Exposure Research Laboratory, Office Of Research And Development, U.S. Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268.

<sup>90</sup> Silva M., Preau J. Jr., Needham L., Calafat A., Cross validation and ruggedness testing of analytical methods used for the quantification of urinary phthalate metabolites, *J. Chromatogr. B*, 2008, 873, 180-186.

<sup>91</sup> Ye X., Pierik F., Angerer J., Meltzer H., Jaddoe V., Tiemeier H., Hoppin J., Longnecker M., Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa), *Int.J. of Hyg. and Env. Health*, 2009, 212, 481-491.

<sup>92</sup> Koch H., Rossbach B., Drexler H. and Angerer J., Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates—determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine, *Env. Research* 93, 2003, 177–185.