

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΑ
ΟΥΡΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥ ΑΝΔΡΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ**

ΓΚΑΪΤΑΤΖΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΥΡΙΠΙΔΗΣ ΣΤΕΦΑΝΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

**UNIVERSITY OF CRETE-DEPARTMENT OF CHEMISTRY
MASTER OF SCIENCE DEGREE
ENVIRONMENTAL SCIENCE AND ENGINEERING
ENVIRONMENTAL CHEMICAL PROCESSES LABORATORY**

**DETERMINATION OF PHTHALATE METABOLITES IN THE URINE
OF CHOSEN MALE POPULATION IN CRETE**

GKAITATZI CHRISTINA

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
της Μεταπτυχιακής Φοιτήτριας κας Γκαϊτατζή Χριστίνας-Ζαμπέτας,
για την Απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

Η κα Γκαϊτατζή Χριστίνα-Ζαμπέτα, μεταπτυχιακή φοιτήτρια 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 της εργασία με τίτλο :

«Προσδιορισμός μεταβολιτών φθαλικών εστέρων στα ούρα επιλεγμένου ανδρικού πληθυσμού στην Κρήτη»

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή (η οποία ορίσθηκε 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 Ειδίκευσης στις «Φυσικές Επιστήμες Περιβάλλοντος».

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Στεφάνου Ευριπίδης (Επιβλέπων)
Καθηγητής, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Περγαντής Σπυρίδων
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κατερινόπουλος Χαράλαμπος
Καθηγητής, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γκαϊτατζή Χριστίνα

Διεύθυνση κατοικίας: 8η πάροδος Αγ. Ονουφρίου, Κουνουπιδιανά, Χανιά, Τ.Κ: 73100.

Τηλέφωνα επικοινωνίας: 2821069989, 6978258512 E-mail: xristina.gk@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

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

Τίτλος μεταπτυχιακής διατριβής: Προσδιορισμός μεταβολιτών φθαλικών εστέρων στα ούρα επιλεγμένου ανδρικού πληθυσμού στη Κρήτη.

Βαθμός διατριβής: Άριστα

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Ευριπίδης Στεφάνου

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

Περιβαλλοντική Αναλυτική Χημεία I: Ανάλυση οργανικών Ρυπαντών (8/10)

Περιβαλλοντική Αναλυτική Χημεία II: Ιόντα και Στοιχεία (6,5/10)

Φασματοσκοπία NMR: Θεωρία και Εφαρμογές (8/10)

Φασματοσκοπία Υπερύθρου και RAMAN: (9/10)

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

Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων (8,5/10)

Σεμινάριο: Νομικά Περιβάλλοντος

2004-2009: Πτυχίο Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Βαθμός: 6,81/10 (Λίαν Καλώς)

Πτυχιακή Εργασία: Μελέτη ανάκτησης οργανοχλωριωμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων με αέρια χρωματογραφία (GC-ECD) σε καρποφόρα λαχανικά.

Βαθμός πτυχιακής εργασίας: 10/10

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ Νικόλαος Χανιωτάκης

2001-2004: 7^ο Ενιαίο Λύκειο Χανίων

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2009-2010 (Χειμερινό εξάμηνο): Βοηθός προπτυχιακού εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας ΙΙ

2009-2010 (Εαρινό εξάμηνο): Βοηθός προπτυχιακού εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας Ι

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων

Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών και δίδυμη φασματομετρία μαζών

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Άριστη γνώση (University of Michigan Certificate of Proficiency in English)

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

Microsoft Office, Open Office. Org, Origin, ChemBioDraw.

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

2010: 16^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Ελλάδας- Κύπρου

2011: 17^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

CURRICULUM VITAE

Gkaitatzi Christina

Home address: 8th street Ag. Onoufriou, Kounoupidiana, Chania, EL-73100
telephone: 2821069989, 6978258512 E-mail: xristina.gk@gmail.com

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: Determination of phthalate metabolites in the urine of chosen male population in Crete.

Grade: Excellent

Supervisor Professor: Euripides G. Stephanou

Courses:

Environmental Analytical Chemistry I: Analysis of Organic Pollutants (8/10)

Environmental Analytical Chemistry II: Ions and Elements (6,5/10)

NMR Spectroscopy: Theory and Applications (8/10)

IR and Raman Spectroscopy (9/10)

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

Liquid Waste Processing (8,5/10)

Seminar: Environmental Legislation

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

Grade: 6,81/10 (Very Good)

Diploma Thesis: Recovery study of organochlorine pesticides in fruit-bearing vegetables using gas chromatography- electron capture detector.

Grade: 10/10

Supervisor Professor: Dr. Nikolas. A. Chaniotakis

2001-2004: 7th High School Chania, Crete

TEACHING EXPERIENCE

2009-2010 (Winter semester): Laboratory assistant at Undergraduate Laboratory Analytical Chemistry II

2009-2010 (Summer semester): Laboratory assistant at Undergraduate Laboratory Analytical Chemistry I

ANALYTICAL TECHNIQUES

Gas chromatography- electron capture detector

Liquid chromatography- mass spectrometry and – tandem mass spectrometry

LANGUAGES

English: Excellent (University of Michigan Certificate of Proficiency in English)

COMPUTER SOFTWARE

Microsoft Office, Open Office. Org, Origin, ChemBioDraw.

CONFERENCES

2010: 16th Hellenic and Cypriot Chemistry Post Grads Conference

2011: 17th Hellenic Chemistry Post Grads Conference

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών και Χημικών Διεργασιών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών “ Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος”, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ευριπίδη Στεφάνου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ευριπίδη Στεφάνου, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριο του και με εμπιστεύθηκε σε μια δύσκολη στιγμή κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την συνεχή καθοδήγηση και στήριξη σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ. Σπύρο Περγαντή και κ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο που δέχτηκαν να είναι μέλη στην επιτροπή αξιολόγησης της διατριβής μου.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Μυριδάκη Αντώνη του οποίου η βοήθεια υπήρξε πολύτιμη ενώ ταυτόχρονα η συνεργασία μας υπήρξε άριστη.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου, Δρ. Μαρία Αποστολάκη, Τόνια Περράκη, Σοφία Καργάκη, Μαρίνα Διακομανώλη, Μηνά Ιακωβίδη για το πολύ ευχάριστο κλίμα που επικρατεί στο εργαστήριο. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον Δρ. Αντώνη Κουβαράκη για την βοήθεια του κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στους γονείς μου για όσα μου έχουν προσφέρει και συνεχίζουν να προσφέρουν.

Περίληψη

Οι φθαλικοί εστέρες είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία ως διαλύτες, πρόσθετα και πλαστικοποιητές. Αρκετοί φθαλικοί εστέρες είναι γνωστό ότι προκαλούν αναπαραγωγικά και αναπτυξιακά προβλήματα σε ζώα, ενώ μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και καρκίνο. Ωστόσο, τα δεδομένα που σχετίζονται με τις επιπτώσεις των φθαλικών στον άνθρωπο είναι ακόμα περιορισμένα.

Οι άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν σε φθαλικούς εστέρες μέσω της τροφής, του νερού και με τη χρήση καταναλωτικών προϊόντων. Μετά την έκθεση, οι φθαλικοί εστέρες μεταβολίζονται ταχύτητα στο κύριο μεταβολίτη του, το φθαλικό μονοεστέρα, ο οποίος μπορεί περαιτέρω να οξειδωθεί πριν εκκριθεί στα ούρα ή στα κόπρανα. Αυτοί οι μεταβολίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βιοδείκτες (biomarkers) έκθεσης σε φθαλικά.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός έξι μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων: φθαλικός αιθυλεστέρας (mEP), φθαλικός βουτυλεστέρας (mBP), φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-εξανόλης (mEHP), φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-υδροξυ-εξανόλης (mEHHP), φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-οξο-εξανόλης (mEOHP), και φθαλικός εστέρας της ισο-εννεανόλης (mNP). Δείγματα ούρων συλλέχθηκαν από 81 άνδρες οι οποίοι εργάζονται σε διάφορα επαγγέλματα σε σκοπό την εκτίμηση της έκθεσης της κάθε ομάδας ανάλογα με τον εργασιακό χώρο. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μαζών με ηλεκτροψεκασμό (HPLC-ESI-MS/MS).

Η υψηλότερη διάμεσος των αρχικών μεταβολιτών που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία βρέθηκε για το φθαλικό αιθυλεστέρας (mEP: 62,33 μg/g κρεατινίνης), ακολούθησε ο φθαλικός βουτυλεστέρας (mBP: 20,14 μg/g κρεατινίνης) και τέλος ο φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-εξανόλης (mEHP: 10,60 μg/g κρεατινίνης). Η διάμεσος που βρέθηκε για τους δευτερεύοντες μεταβολίτες του DEHP είναι 27,18 για το φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-υδροξυ-εξανόλης (mEHHP) και 15,46 μg/g για το φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-οξο-εξανόλης (mEOHP). Ο αρχικός μεταβολίτης του DiNP, ο φθαλικός εστέρας της ισο-εννεανόλης (mNP) δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα, οπότε δεν είναι κατάλληλος βιοδείκτης της έκθεσης σε DiNP.

Τα επίπεδα των φθαλικών μεταβολιτών δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες, με εξαίρεση την κατηγορία των κομμωτών, οι οποίοι εκτίθενται σε πολύ υψηλές ποσότητες φθαλικού διαιθυλεστέρα, DEP.

Abstract

Phthalates are a group of industrial chemicals used in consumer products as solvents, additives and plasticizers. Several phthalates are known to cause carcinogenic, reproductive and development toxicities in animals. However, data on the effects of phthalate exposure in humans are still limited.

Humans can be exposed to phthalates through food, water, air and using phthalate containing consumer products. After exposure, phthalates are rapidly metabolized to their respective hydrolytic monoesters. For some phthalates, the monoesters can be further metabolized to their oxidative products before excretion in urine or feces. These metabolites have been used as biomarkers of exposure to phthalates.

The aim of the present study was the qualitative and quantitative analysis of six phthalates metabolites including monoethyl phthalate (mEP), mono-2-ethylhexyl- phthalate (mEHP), mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (mEHHP), mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (mEOHP), mono-n-butyl-phthalate (mBP) and mono-iso-nonyl phthalate (mNP). Urine samples were collected by 81 men from various workplaces in order to assess their exposure to phthalates. The analytical procedure used in this study was liquid chromatography –electrospray ionization-tandem mass spectrometry.

The highest median values of primary metabolites found in this study were found for monoethyl phthalate (mEP: 62,33 $\mu\text{g/g}$ creatinine), followed by mono-n-butyl-phthalate (mBP: 20,14 $\mu\text{g/g}$ creatinine) and finally mono-2-ethylhexyl- phthalate (mEHP: 10,60 $\mu\text{g/g}$ creatinine). The median concentrations of the oxidized metabolites of DEHP were 27.18 $\mu\text{g/g}$ creatinine for mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (mEHHP) and 15,46 $\mu\text{g/g}$ creatinine for mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (mEOHP). The primary metabolite of DiNP was not detected in any sample and therefore is not a sensitive biomarker of DiNP exposure.

Phthalate metabolite levels did not significantly differ among the groups apart from the hairdressers who are highly exposed to diethyl phthalate, DEP.

Πίνακας Περιεχομένων

1	Θεωρητικό Μέρος	25
1.1	Εισαγωγή	25
1.2	Εμφάνιση και Χημεία των φθαλικών	26
1.3	Φυσικοχημικές ιδιότητες	29
1.3.1	Φυσική κατάσταση	29
1.3.2	Διαλυτότητα στο νερό	30
1.3.3	Συντελεστής λιποφιλίας: Συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού K_{ow}	32
1.3.4	Τάση ατμών	33
1.4	Τοξικολογία των φθαλικών εστέρων	33
1.5	Φθαλικοί Εστέρες – Περιβαλλοντική παρακολούθηση	37
1.5.1	Έκθεση αξιολόγησης από μοντέλα με χρήση δεδομένων περιβαλλοντικής παρακολούθησης	38
1.6	Μεταβολισμός των φθαλικών εστέρων στους ανθρώπους	40
1.6.1	DMP, DEP, DBP και BBzP	41
1.6.2	DEHP	42
1.6.3	DiNP	44
1.7	Ενδοκρινικές διαταραχές από φθαλικούς εστέρες στον άνθρωπο	45
1.8	Έκθεση εμβρύων και βρεφών σε φθαλικούς εστέρες	48
1.9	Κατανομή φθαλικών εστέρων σε άλλες μήτρες	50
1.10	Αντικείμενο και στόχοι	53
2	Πειραματικό Μέρος	54
2.1	Αντιδραστήρια	54
2.2	Πρότυπες ενώσεις	54
2.3	Διαλύματα	54
2.4	Δειγματοληψία	55
2.5	Επεξεργασία δειγμάτων	56

2.6	Αναλυτική μεθοδολογία	57
2.6.1	Εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE)	58
2.6.2	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC)	60
2.6.3	Τεχνική Ηλεκτροψεκασμού	61
2.6.4	Διαδοχική φασματομετρία μάζας	63
2.7	Παράμετροι Λειτουργίας Μεθόδου	63
2.7.1	Παράμετροι Λειτουργίας Υγρής Χρωματογραφίας.....	63
2.7.2	Ηλεκτροψεκασμός, Επιλογή θυγατρικών ιόντων για την τεχνική S.R.M.....	65
2.8	Χαρακτηριστικά Μεθόδου.....	67
2.8.1	Τυφλά δείγματα.....	67
2.8.2	Υπολογισμός ανακτήσεων	67
2.8.3	Υπολογισμός ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης συστήματος υγρής χρωματογραφίας.....	68
3	Αποτελέσματα.....	73
3.1	Δείγματα χημικών και βιολόγων που εργάζονται σε εργαστήρια του Πανεπιστημίου Κρήτης	74
3.2	Δείγματα εθελοντών που δεν εργάζονται σε ερευνητικά εργαστήρια στο Πανεπιστήμιο Κρήτης	77
3.3	Δείγματα εθελοντών διαφόρων επαγγελματιών	80
3.4	Δείγματα κομμωτών	83
3.5	Δείγματα τραπεζικών υπαλλήλων.....	85
3.6	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα	88
3.7	Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στις Διάφορες Ομάδες	90
3.7.1	Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Πειραματικούς Χημικούς και Βιολόγους	91
3.7.2	Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Εργαζόμενους Τμήματος Χημείας	91
3.7.3	Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Εργαζόμενους Διαφόρων Επαγγελματιών	92

3.7.4	Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Κομμωτές	92
3.7.5	Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Τραπεζικούς Υπαλλήλους	93
3.8	Συγκεντρωτικά Στατιστικά Στοιχεία.....	93
3.9	Στατιστική επεξεργασία.....	97
3.10	Σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά άλλων εργασιών	101
4	<i>Συμπεράσματα</i>	105
5	<i>Βιβλιογραφία</i>	107

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Φθαλικοί διεστέρες και οι μεταβολίτες τους	26
Πίνακας 2: Μερικοί φθαλικοί εστέρες και οι χρήσεις τους	28
Πίνακας 3: Φυσικές ιδιότητες 16 φθαλικών εστέρων	29
Πίνακας 4: Καθοριστικοί παράγοντες για την κατανομή των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον	30
Πίνακας 5: Πιθανές επιπτώσεις των φθαλικών εστέρων στον άνθρωπο (NTR-CERHR, 2000, 2003a-f).....	35
Πίνακας 6: Εκτίμηση Κινδύνων των Φθαλικών Εστέρων (ATSDR, US-EPA< EU-CSTEE, Health Canada).....	37
Πίνακας 7: Ημερήσια έκθεση σε οκτώ φθαλικούς εστέρες σε 5 καταναλωτικές ομάδες	39
Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών του DEHP, χρόνος έκκρισης της μέγιστης συγκέντρωσης (t_{max}) και χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$)	43
Πίνακας 9: Πλεονεκτήματα (+) και μειονεκτήματα (-) των βιοδεικτών του DEHP	43
Πίνακας 10: Μεταβολίτες του DiNP στα ούρα	44
Πίνακας 11: Συσχέτιση μεταξύ της απέκκρισης των επιπέδων των μητρικών φθαλικών εστέρων και των δεικτών της αναπαραγωγικής υγείας των βρεφών	47
Πίνακας 12: Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης	64
Πίνακας 13: Παράμετροι λειτουργίας αυτόματου δειγματολήπτη	65
Πίνακας 14: Επιλεγμένες αντιδράσεις των ενώσεων.....	66
Πίνακας 15: Ανακτήσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων	67
Πίνακας 16: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου σε ng/ml για κάθε μεταβολίτη.....	69
Πίνακας 17: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε ng/ml για κάθε μεταβολίτη.....	69
Πίνακας 18: Δείγματα ελέγχου ποιότητας	70
Πίνακας 19: Συγκεντρώσεις από 28 εθελοντές (πειραματικοί χημικοί και βιολόγοι) 73	
Πίνακας 20: Στατιστικά στοιχεία των 28 πειραματικών εθελοντών	74
Πίνακας 21: Διορθωμένες, ως προς τη κρεατινίνη, συγκεντρώσεις φθαλικών μεταβολιτών στα ούρα πειραματικών χημικών και βιολόγων	75

Πίνακας 22: Διορθωμένα ,ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία των πειραματικών χημικών και βιολόγων	76
Πίνακας 23: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στους 19 εθελοντές που εργάζονται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης	76
Πίνακας 24: Στατιστικά στοιχεία των 19 εθελοντών που εργάζονται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης	77
Πίνακας 25: Διορθωμένες, ως προς την κρεατινίνη, συγκεντρώσεις των 19 εθελοντών που εργάζονται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης	78
Πίνακας 26: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία των 19 εθελοντών που εργάζονται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης	79
Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στους 13 εθελοντές διαφόρων επαγγελμάτων	79
Πίνακας 28 Στατιστικά στοιχεία των 13 εθελοντών διαφόρων επαγγελμάτων	80
Πίνακας 29: Διορθωμένες, ως προς την κρεατινίνη, συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στους 13 εθελοντές διαφόρων επαγγελμάτων.....	81
Πίνακας 30: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία των 13 εθελοντών διαφόρων επαγγελμάτων	81
Πίνακας 31: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα 12 κομμωτών	82
Πίνακας 32: Στατιστικά στοιχεία των 12 κομμωτών	83
Πίνακας 33: Διορθωμένες, ως προς την κρεατινίνη, συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα 12 κομμωτών	83
Πίνακας 34: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία κομμωτών.	84
Πίνακας 35: Συγκεντρώσεις φθαλικών μεταβολιτών σε ούρα 9 τραπεζικών υπαλλήλων.....	85
Πίνακας 36:Στατιστικά στοιχεία των συγκεντρώσεων των ούρων των τραπεζικών υπαλλήλων.....	85
Πίνακας 37: Διορθωμένες, ως προς την κρεατινίνη συγκεντρώσεις των μεταβολιτών φθαλικών εστέρων στα ούρα των 9 τραπεζικών υπαλλήλων.....	86
Πίνακας 38: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία των τραπεζικών υπαλλήλων	86
Πίνακας 39: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από όλα τα δείγματα.....	92

Πίνακας 40: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των δειγμάτων.....	93
Πίνακας 41: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών σε ng/ml και μg/ κρεατινίνης χωρίς τους κομμωτές.....	94
Πίνακας 42: Συγκριτικά αποτελέσματα συγκεντρώσεων σε μg/g κρεατινίνης με και χωρίς κομμωτές.....	95
Πίνακας 43: Συνεισφορά % των τριών συνιστωσών σε κάθε φθαλικό μεταβολίτη...	98
Πίνακας 44: Σύγκριση συγκεντρώσεων σε (ng/ml).....	100
Πίνακας 45: Σύγκριση συγκεντρώσεων σε μg/g κρεατινίνης.....	100
Πίνακας 46: Σύγκριση στατιστικών στοιχείων σε ng/ml.....	101
Πίνακας 47: Σύγκριση στατικών στοιχείων σε μg/g κρεατινίνης.....	102

Πίνακας Σχημάτων

Σχήμα 1: Γενική δομή φθαλικών εστέρων.....	26
Σχήμα 2: Δομή μερικών φθαλικών διεστέρων	27
Σχήμα 3: Μεταβολικά μονοπάτια των φθαλικών εστέρων	40
Σχήμα 4: Μεταβολισμός του DEHP. Οι κύριοι μεταβολίτες του είναι τονισμένοι	42
Σχήμα 5: Τρόποι έκθεσης σε φθαλικούς εστέρες	49
Σχήμα 6: Τυπική διαδικασία SPE	59
Σχήμα 7: Διαγραμματική απεικόνιση μιας τυπικής διάταξης HPLC. Με τις διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται εξαρτήματα που είναι προαιρετικά σε μια τέτοια διάταξη.....	61
Σχήμα 8: Σχηματισμός ιόντων με ESI	62
Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση φασματομέτρου μάζας με τρία τετράπολα.....	63
Σχήμα 10: Σχηματική αναπαράσταση του βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης ...	64
Σχήμα 11: Χαρακτηριστική καμπύλη βαθμονόμησης του μεταβολίτη mEHP	71
Σχήμα 12: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών φθαλικών εστέρων σε ng/ml όλων των δειγμάτων	87
Σχήμα 13: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών φθαλικών εστέρων σε ng/ml χωρίς τα δείγματα των κομμωτών	87
Σχήμα 14: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών φθαλικών εστέρων όλων των δειγμάτων σε μg/g κρεατινίνης	88
Σχήμα 15: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών φθαλικών εστέρων χωρίς τα δείγματα των κομμωτών σε μg/g κρεατινίνης	88
Σχήμα 16: Συγκριτικά αποτελέσματα συγκεντρώσεων, χωρίς (ng/l) και με τη διόρθωση με την κρεατινίνη (ng/g), των φθαλικών μεταβολιτών σε όλα τα δείγματα	93
Σχήμα 17: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών σε ng/ml και μg/g κρεατινίνης χωρίς κομμωτές	94
Σχήμα 18: Συγκριτικά αποτελέσματα σε μg/g κρεατινίνης με και χωρίς κομμωτές...	95
Σχήμα 19: Ιδιοτιμές και συνιστώσες που εξάγονται από την PCA.....	96
Σχήμα 20: Επίδραση των συνιστωσών F1 και F2 στις μεταβλητές	97
Σχήμα 21: Επίδραση των συνιστωσών F1 και F3 στις μεταβλητές	97

Σχήμα 22: Προβολή των δεδομένων των συνιστωσών F1 και F2 που εξάγονται από την PCA.....	98
Σχήμα 23: Προβολή των δεδομένων των συνιστωσών F1 και F3 που εξάγονται από την PCA.....	99

1 Θεωρητικό Μέρος

1.1 Εισαγωγή

Οι φθαλικοί εστέρες είναι μια κατηγορία συνθετικών βιομηχανικών χημικών ενώσεων, οι οποίοι παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά μετά το 1920 και μέχρι το 1933 καθιερώθηκαν ως οι πιο ευρέως γνωστοί πλαστικοποιητές. Οι φθαλικοί εστέρες πλέον χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σε παγκόσμια κλίμακα όχι μόνο σαν πλαστικοποιητές αλλά και σαν πρόσθετα σε βιομηχανικά προϊόντα συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, των προϊόντων προσωπικής υγιεινής, των ιατρικών μηχανημάτων και της φαρμακευτικής [1,2,3,4,5,6,7,8,9].

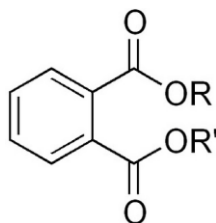
Οι φθαλικοί εστέρες είναι διεστέρες ή αλλυλικοί εστέρες του 1,2 βενζοδικαρβοξυλικού οξέος ή κοινώς του φθαλικού οξέος. Οι φυσικές τους ιδιότητες και άρα το πεδίο των εφαρμογών τους εξαρτάται από το μήκος και τις διακλαδώσεις των πλευρικών αλυσίδων. Πολλοί φθαλικοί εστέρες προστίθενται σε εμπορικά προϊόντα ώστε να διατηρούν το χρώμα και το άρωμα του προϊόντος, να παρέχουν γυαλάδα και στην περίπτωση της φαρμακευτικών προϊόντων παρέχουν μεγάλη διάρκεια χρόνου.

Ωστόσο, οι φθαλικοί εστέρες χρησιμοποιούνται κυρίως σαν πλαστικοποιητές προσδίδοντας ευκαμψία, επεξεργασιμότητα και αντοχή. Αυτοί οι πλαστικοποιητές εκλύονται με σταθερό ρυθμό από τα πλαστικά προϊόντα στο περιβάλλον με αποτέλεσμα να είναι ευρέως διασκορπισμένα στα οικοσυστήματα και να αποτελούν τους πιο άφθονους τεχνητούς ρυπαντές στο περιβάλλον.

Οι άνθρωποι εκτίθενται στους φθαλικούς εστέρες μέσω της κατάποσης, της εισπνοής και της δερματικής επαφής κατά τη διάρκεια της ζωής τους καθώς και κατά την εμβρυική τους ανάπτυξη.

1.2 Εμφάνιση και Χημεία των φθαλικών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι φθαλικοί εστέρες είναι διεστέρες ή αλλυλικοί εστέρες του φθαλικού οξέος με γενική δομή :



Σχήμα 1: Γενική δομή φθαλικών εστέρων

Τα χαρακτηριστικά και η αποσύνθεση του κάθε φθαλικού εστέρα εξαρτώνται από το μήκος και τις διακλαδώσεις των αλυσίδων. Όσες περισσότερες διακλαδώσεις έχει ,τόσες περισσότερες ισομερείς μορφές μπορεί να έχει και τόσο πιο υδρόφοβο γίνεται.

Στον Πίνακα 1 φαίνεται μια λίστα με φθαλικούς εστέρες, τους πιο συνηθισμένους μεταβολίτες τους και τις συντμήσεις τους.

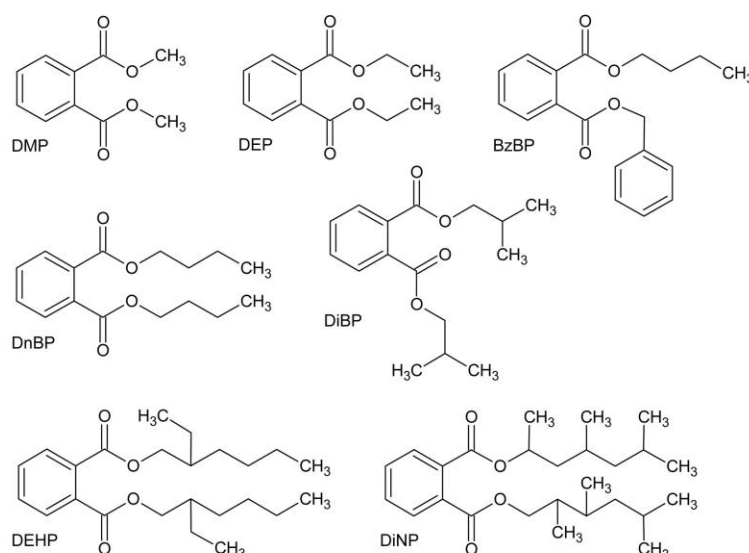
Πίνακας 1: Φθαλικοί διεστέρες και οι μεταβολίτες τους

Φθαλικοί διεστέρες		Μεταβολίτες	
Φθαλικός διμεθυλεστέρας	DMP	Φθαλικός μεθυλεστέρας	MMP
Φθαλικός διαιθυλεστέρας	DEP	Φθαλικός αιθυλεστέρας	MEP
Φθαλικός διβουτυλεστέρας	DBP	Φθαλικός βουτυλεστέρας	MBP
Φθαλικός δι-ισο-βουτυλεστέρας	DiBP	Φθαλικός ισο-βουτυλεστέρας	MiBP
Φθαλικός βουτυλοβενζυλεστέρας	BBzP	Φθαλικός βενζυλεστέρας	MBzP
Φθαλικός διεστέρας της 2-αίθυλο-εξανόλης	DEHP	Φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-εξανόλης	MEHP
		Φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-υδροξυ-εξανόλης	MEHP ή 5OH-MEHP
		Φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-οξο-εξανόλης	MEHP ή 5oxo-MEHP
		Φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-καρβόξυ-πεντανόλης	MECP ή 5cx-MEPP
		Φθαλικός εστέρας της 2-καρβόξυ-εξανόλης	MCMHP ή 2cx-MMHP

Πίνακας 1 (Συνέχεια): Φθαλικοί διεστέρες και οι μεταβολίτες τους

Φθαλικοί διεστέρες		Μεταβολίτες	
Φθαλικός διεστέρας της ισο-εννεανόλης	DiNP	Φθαλικός εστέρας της ισο-εννεανόλης	MiNP
		Φθαλικός εστέρας της υδρόξυ-ισο-εννεανόλης	MHiNP ή OH-MiNP
		Φθαλικός εστέρας της οξο-ισο-εννεανόλης	MOiNP ή οξο-MiNP
		Φθαλικός εστέρας της καρβόξυ-ισο-οκτανόλης	MCiOP ή cx-MiNP

Στο Σχήμα 2 φαίνεται η δομή μερικών από των πιο συνηθισμένων φθαλικών εστέρων που χρησιμοποιούνται στην Ευρώπη [10].



Σχήμα 2: Δομές μερικών φθαλικών διεστέρων

Οι φθαλικοί εστέρες χαμηλού μοριακού βάρους και με μικρές διακλαδώσεις όπως ο φθαλικός διμεθυλεστέρας (DMP) και ο φθαλικός διαιθυλεστέρας (DEP) χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στα καλλυντικά. Το DEP έχει βρεθεί σχεδόν σε όλα τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας για βρέφη, παιδιά και ενήλικους [11]. Επί πλέον, το DMP και το DBP είναι συνήθη πρόσθετα σε καλλυντικά για ενήλικους όπως τα αρώματα, τα σαμπουάν και τα προϊόντα περιποίησης νυχιών [10].

Οι φθαλικοί εστέρες υψηλού μοριακού βάρους και με μεγάλες διακλαδώσεις όπως ο φθαλικός βουτυλοβενζυλεστέρας (BBzP), το DEHP, και το DiNP αλλά και το DBP χρησιμοποιούνται σε πλαστικά προϊόντα 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 [10]. Μερικά μαλακά πλαστικά περιέχουν έως 40% DEHP [12]. Στην Ευρώπη, τα περισσότερα τρόφιμα που έρχονται σε επαφή με πλαστικά περιέχουν DEHP και DBP, ενώ τα DiBP, DEHP περιέχονται σε δημητριακά, ψωμί, κέικ, ξηρούς καρπούς, μπαχαρικά, λάδι σε ποσότητες περίπου μέχρι και τα 10mg/kg [10].

Αξίζει να σημειωθεί ότι παγκοσμίως παράγονται περισσότεροι από 8 δισεκατομμύρια τόνοι φθαλικών εστέρων ετησίως, από τα οποία τα 3-4 εκατομμύρια τόνων αντιστοιχούν στην παραγωγή του DEHP [13]. Το 2003, περισσότεροι από 800.000 τόνοι φθαλικών εστέρων χρησιμοποιήθηκαν στη Δυτική Ευρώπη, 24% DEHP και παραπάνω από 50% DiNP και DIDP (φθαλικός διεστέρας της ισο-δεκανόλης) [14].

Τελικά, σχεδόν όλα τα βιομηχανικά καταναλωτικά προϊόντα περιέχουν φθαλικούς εστέρες ή ίχνη φθαλικών εστέρων. Παρόλο που οι συγκεκριμένες ουσίες μεταβολίζονται πολύ γρήγορα, η επιμόλυνση του περιβάλλοντος είναι σημαντική εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης τους και της παρουσίας των φθαλικών εστέρων χαμηλού άλλα και υψηλού μοριακού βάρους στη σκόνη, στο έδαφος και στον αέρα [10,12,15].

Πίνακας 2: Μερικοί φθαλικοί εστέρες και οι χρήσεις τους

Φθαλικοί εστέρες	Χρήσεις
Φθαλικός διαιθυλεστέρας (DEP)	Προϊόντα προσωπικής φροντίδας, καλλυντικά
Φθαλικός βουτυλοβενζυλεστέρας (BBzP)	Πλακάκια βινυλίου, μάντες μεταφοράς τροφίμων, τεχνητό δέρμα, αυτοκινητοβιομηχανία, κώνοι κυκλοφορίας
Φθαλικός διβουτυλεστέρας (DBP)	Πλαστικά PVC, κόλλες, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, καλλυντικά, βαφές
Φθαλικός διεστέρας της 2-αιθυλοεξανόλης (DEHP)	Οικοδομικά υλικά (ταπετσαρίες, καλώδια, μονωτικά υλικά), PVC, προϊόντα αυτοκινήτων (ταπετσαρίες, καθίσματα), ρουχισμό (παπούτσια, αδιάβροχα), συσκευασίες τροφίμων, παιχνίδια, ιατρικές συσκευές
Φθαλικός διεστέρας της εξανόλης (DnHP)	Ιμάντες μεταφοράς τροφίμων, εργαλεία, δάπεδα
Φθαλικός διεστέρας της οκτανόλης (DnOP)	Μάνικες κήπων, πισίνες, πλακάκια, τσιμέντο, πώματα φιαλών, μάντες μεταφοράς τροφίμων
Φθαλικός διεστέρας της ισο-εννεανόλης (DiNP)	Μάνικες κήπων, πισίνες, πλακάκια, παιχνίδια
Φθαλικός διεστέρας της ισο-δεκανόλης (DiDP)	Πλαστικά PVC, καλώδια, τεχνητό δέρμα, παιχνίδια, πισίνες, χαλιά

1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

1.3.1 Φυσική κατάσταση

Οι φθαλικοί εστέρες που χρησιμοποιούνται ευρέως, είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Πίνακας 3). Σχεδόν όλα έχουν σημείο τήξης (ή σημείο ροής) χαμηλότερο από τους -25°C . Οι εξαιρέσεις είναι τα DMP, DUP με σημεία τήξης $+5,5^{\circ}\text{C}$ και -9°C αντίστοιχα. Οι φθαλικοί εστέρες έχουν σημείο βρασμού το οποίο κυμαίνεται από 230°C μέχρι 486°C . 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 μεταφοράς θερμότητας.

Πίνακας 3: Φυσικές ιδιότητες 16 φθαλικών εστέρων^a

Φθαλικός εστέρας	Χημικός τύπος ^b	Μήκος αλυσίδας αλκυλίου	Μοριακό βάρος	Σημείο τήξης ($^{\circ}\text{C}$)	Ειδικό βάρος ($^{\circ}\text{C}$)
DMP	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	1	194.2	5.5	1.192
DEP	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$	2	222.2	-40	1.118
DAP	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$	3	246.2	-	-
DPP	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$	3	250.2	-	-
DBP	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	4	278.4	-35	1.042
DiBP	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	4	278.4	-58	1.050 ^c
BBP	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_4$	4, 6 ^d	312.4	-35	1.111
DHP	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$	6	334.4	-27.4	1.011
DnOP	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$	8	390.4	-25	0.978
BOP	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$	6 ^a , 8	334.4 {278.4-390.6} ^e	.37	-
DEHP	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$	8	390.6	-47	0.986
DiOP	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$	8	390.6 {376.6-390.6} ^e	-46	0.986
DiNP	$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_4$	9	418.6 {418.6-432.6} ^e	-48	0.97
DiDP	$\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$	10	446.7 {432.7-446.7} ^e	-46	0.961
DUP	$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4$	11	447.7 {432.7-474.7} ^e	-9	0.96
DTDP	$\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_4$	13	530.8 {506.8-544.8} ^e	-37	0.953

^a Howard et al. (1985); Howard et al. (1989); Sears and Touchette (1982).

^b Για μίγματα, δίνεται ο χημικός τύπος του πιο αντιπροσωπευτικού ισομερούς.

^c Στους 15°C

^d Αρωματικός δακτύλιος

^e {εύρος μοριακού βάρους ισομερούς

1.3.2 Διαλυτότητα στο νερό

Η διαλυτότητα στο νερό είναι μια εξαιρετικά 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 υπεσέρχονται διάφορα πειραματικά προβλήματα. Στην περίπτωση των φθαλικών εστέρων, η αδυναμία να διαχωριστούν τα κολλοειδή γαλακτώματα από το υδατικό διάλυμα είναι ένα αρχικό πρόβλημα που εμποδίζει τον ακριβή υπολογισμό της διαλυτότητας [16]. Δεύτερον, υπάρχει επιμόλυνση από τη χρήση πλαστικών στο εργαστήριο [17]. Τρίτον, από τη στιγμή, που οι φθαλικοί εστέρες υψηλού μοριακού βάρους είναι ελαφρώς λιγότερο πυκνά υγρά από το νερό στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα στην επιφάνεια τους, οπότε καθίσταται δύσκολη η μεταφορά υδατικών διαλυμάτων δια μέσου των στρωμάτων αυτών [18].

Γνωρίζοντας τα παραπάνω προβλήματα, στον Πίνακα 4 συνοψίζονται οι διαλυτότητες των φθαλικών εστέρων 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 (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Καθοριστικοί παράγοντες για την κατανομή των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον

Ένωση	Log K _{ow}		AQ SOL (mg/L)		VP (mm Hg, ~25°C)
DMP	1.46	1.61	2179 ^b	4280	1.65 10 ⁻³
	1.47	1.62	2810	4290	1.9 10 ⁻³
	1.48 ^a	1.62	3160	4320	5.4 10 ⁻³
	1.53	1.66 ^b	3300 ^a		5.5 10 ⁻³
	1.56	1.66	4000		2.9 10 ^{-2b}
	1.60	1.74			
	1.61	1.90			
		1,61		4200	2,0 10 ^{-3*}

Πίνακας 4 (Συνέχεια): Καθοριστικοί παράγοντες για την κατανομή των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον

Ένωση	Log K _{ow}		AQ SOL (mg/L)		VP (mm Hg, ~25°C)	
DEP	2.21	2.42	260 ^b	1080		
	2.21	2.47	400 ^a	1160-1240 20 °C	4.8 10 ⁻⁵	
	2.24	2.51 ^a	680	1340-1400 30 °C	3.9 10 ⁻⁴	
	2.29	2.65 ^b	720	7028	6.1 10 ⁻⁴	
	2.35	2.67	896		8.1 10 ⁻⁴	
	3.00		928	1100	1.2 10 ⁻³	
		2.38			1.65 10 ⁻³	
				5.0 10 ^{-3b}		
				1.0 10 ⁻³		
DAP	3.16 ^a	3.36 ^b	43	182 [*]	3.7 10 ⁻⁵	1.16 10 ^{-3b}
	3.23 [*]		100 ^a		1.6 10 ^{-4*}	
DPP	3.27 [*]	3.63 ^b	38 ^b	108 [*]	8.9 10 ⁻⁵	1.16 10 ⁻³
	3.57 ^a		47 ^a		1.04 10 ^{-3b}	
DnBP	3.74	4.57	1.5 ^b	10.5-11.1 20 °C	9.3 10 ⁻⁶	4.1 10 ⁻⁵
	4.08	4.61 ^b	3.2	11.2-11.5 30°C	1.7 10 ⁻⁵	7.3 10 ⁻⁵
	4.11	4.63 ^a	3.25	11.2	1.9 10 ⁻⁵	1.2 10 ⁻⁴
	4.13	4.72	4.9 ^a	13.0	2.08 10 ⁻⁵	2.5 10 ^{-4b}
	4.30	4.72	8.7-9.6		2.7 10 ⁻⁵	
	4.39	4.79	10.1	11.2	3.5 10 ⁻⁵	2.7 10 ⁻⁵
	4.50	5.15			3.6 10 ⁻⁵	
	4.56					
	4.45					
DiBP	4.11	4.46 ^b	5.1 ^b	20.0	1.8 10 ⁻⁶	
	4.31 ^a		6.2	20.3	5.8 10 ^{-4b}	
		4.11	9.6 ^a			
			20.0			
BBP	3.57	4.77	0.67 ^b	2.82	8.7 10 ⁻⁷	
	3.97	4.77	0.70	2.90	7.7 10 ^{-6b}	
	4.05	4.77 ^a	1.90	2.90	8.6 10 ⁻⁶	
	4.11	4.84 ^b	2.40 ^a	40.2	9.0 10 ⁻⁶	
	4.73	4.91	2.69		9.1 10 ⁻⁵	
	4.75			2.7		
		4.59			5.0 10 ^{-6*}	
DHP	5.65	6.67 ^a		0.019 ^b	1.9 10 ⁻⁸	
	5.93	6.82		0.049 ^a	1.8 10 ⁻⁶	
	6.57 ^b			0.24	1.4 10 ⁻⁵	
		6.30			1.2 10 ^{-5b}	
			0.05			
				5.0 10 ⁻⁶		
DnOP	5.22	8.10	0.00046 ^a	0.02	2.2 10 ⁻⁷	1.3 10 ⁻⁵
	7.06	8.30 ^a	0.0005 ^b	0.02	<3.4 10 ⁻⁷	1.9 10 ⁻⁴
	8.06	8.54 ^b	0.001	3.00	3.4 10 ^{-7b}	
		8.06		0.0005		1.0 10 ^{-7*}
DEHP	4.20-5.22	7.54 ^a	0.0006	0.285	4.1 10 ⁻⁸	<3.4 10 ⁻⁷
	5.11	7.80-8.90	0.0011 ^b	0.34	4.5 10 ⁻⁸	3.8 10 ⁻⁷
	7.06	7.86-8.15	0.041	0.40	7.2 10 ⁻⁸	7.1 10 ⁻⁷
	7.14±0.15	7.94	0.16	0.40	9.8 10 ⁻⁸	6.4 10 ⁻⁶
	7.27	8.06	0.27-0.36	1.16	2.8 10 ⁻⁷	1.4 10 ^{-6b}
	7.45	8.39 ^b		1.2	3.3 10 ⁻⁷	1.4 10 ⁻⁴
	7.45±0.006					
		7.50		0.003		1.0 10 ^{-7*}

Πίνακας 4 (Συνέχεια): Καθοριστικοί παράγοντες για την κατανομή των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον

Ένωση	Log K _{ow}		AQ SOL (mg/L)		VP (mm Hg, ~25°C)	
DiOP	8.00 ^{a*}		0.00024 ^b	0.09	3.4 10 ⁻⁷	1.4 10 ⁻⁶
	8.39 ^b		0.00081 ^a		1.4 10 ⁻⁶	5.6 10 ⁻⁶
				0.001 [*]		1.0 10 ⁻⁶
DiNP	>8.0 [*]	9.4 ^b	7.8 10 ^{-5a}	0.0006	<1.0 10 ⁻¹	5.4 10 ⁻⁷
	9.0		2.3 10 ^{-5b}	0.20	2.3 10 ^{-7b}	5.0 10 ^{-7*}
				<0.001		
DiDP	>8.0 [*]	10.3 ^b	2.2 10 ^{-6b}	0.28	5.1 10 ⁻⁸	3.7 10 ^{-8b}
	10.0 ^a		7.4 10 ^{-6a}	1.19	5.6 10 ⁻⁸	<1.0 10 ⁻¹
			<0.00013		<5.0 10 ⁻⁷	<5.0 10 ^{-7*}
				<0.001		
DUP	>8.0 [*]	11.5 ^b	1.7 10 ⁻⁷	1.10	<1.0 10 ⁻¹	5.3 10 ⁻⁷
	11.2		4.2 10 ⁻⁷		1.2 10 ^{-9b}	5.0 10 ^{-7*}
				<0.001	<5.0 10 ⁻⁷	
DTDP	>8.0 [*]	13.4 ^b	1.5 10 ^{-9b}	0.34	2.5 10 ^{-11b}	<5.0 10 ⁻⁷
	13.1 ^a		4.2 10 ^{-9a}		<1.0 10 ⁻¹	<5.0 10 ^{-7*}
			<0.3	<0.001		
BOP	6.28 ^{a*}		0.02 ^b	<1.0	1.1 10 ^{-7*}	1.2 10 ⁻⁴
	6.5 ^b		0.11 ^{a*}		2.4 10 ^{-5b}	

^aΥπολογίστηκε από SPARC Structure Activity Program .[23]

^bΥπολογίστηκε σύμφωνα με EPIWIN ¹⁹

* Προτεινόμενη τιμή

1.3.3 Συντελεστής λιποφιλίας: Συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού K_{ow}

Ο λιποφιλικός ή όχι χαρακτήρας μιας ένωσης, (πιθανότητα ενσωμάτωσης ή πρόσληψης από οργανισμούς, προσρόφησης σε στερεά που περιέχουν οργανική ύλη κ.α.) μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την περιβαλλοντική της συμπεριφορά. Ο λιποφιλικός χαρακτήρας μιας ένωσης 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” [20,21,22]. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει το σχηματισμό ισορροπίας μειώνοντας ταυτόχρονα τον σχηματισμό γαλακτωμάτων.

Μερικές τιμές K_{ow} φαίνονται στον Πίνακα 4. Για φθαλικούς εστέρες χαμηλού μοριακού βάρους, όπως το DMP, DEP, DBP και τοBBP εμφανίζονται αρκετά σταθερές τιμές. Όσο αυξάνεται το μέγεθος της αλκυλο αλυσίδας, το logK_{ow} αυξάνεται, υποδεικνύοντας την υψηλή υδροφοβία τους. Οι μεσαίες τιμές logK_{ow} των DMP, DEP, DBP και BBP ήταν 1.61, 2.38, 4.45 και 4.59 αντίστοιχα. Το DEHP αποτελεί έναν από τους φθαλικούς εστέρες

υψηλού μοριακού βάρους που έχουν μελετηθεί περισσότερο. Το $\log K_{ow}$ έχει υπολογιστεί 7.54 με χρήση HPLC [18], ενώ με χρήση της μεθόδου “αργής- ανάδευσης” υπολογίστηκε από 7.14 έως 7.45 [20,21,22]. Η EPA U.S έχει υπολογίσει το $\log K_{ow}$ 7.54 βασιζόμενη στη μοριακή του δομή με χρήση του μοντέλου SPARK [23]. Οι τιμές $\log K_{ow}$ για φθαλικούς εστέρες με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από του DiNP κυμαίνονται από 9 έως 13 [23].

1.3.4 Τάση ατμών

Η τάση ατμών παίζει ένα σημαντικό ρόλο για την πορεία των εκπομπών και άλλων εκλύσεων που προέρχονται από τους φθαλικούς εστέρες. Συνήθως, υπολογίζεται με απευθείας μέτρηση της πίεσης σε αυξανόμενες θερμοκρασίες. Με τα συγκεκριμένα αποτελέσματα και χρησιμοποιώντας τις εξίσωση Clausius-Clapeyron ή Antoine, είναι δυνατός ο υπολογισμός της τάσης ατμών.

Οι τιμές της τάσης ατμών που αναφέρεται στη βιβλιογραφία συνοψίζεται στον Πίνακα 4. Υπάρχουν αρκετές τιμές που διαφέρουν κατά αρκετές τάξεις μεγέθους. Ωστόσο, υπάρχει μια γενική τάση ότι η τάση ατμών των φθαλικών εστέρων μειώνεται περισσότερο από τέσσερις τάξεις μεγέθους καθώς αυξάνεται το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας.

1.4 Τοξικολογία των φθαλικών εστέρων

Εκτίμηση των κινδύνων που προέρχονται από τους φθαλικούς εστέρες έχουν γίνει από πολλές ερευνητικές ομάδες στην Ευρώπη και την Αμερική.

Συγκεκριμένα, οι φθαλικοί εστέρες εμφανίζουν ήπια τοξικότητα με τιμές LD_{50} 1-30g/kg βάρους σώματος ή και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. 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. Κανένας από τους φθαλικούς εστέρες δεν έχει μεταλλαξιγόνο δράση ή/και γονοτοξικότητα.

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. [24]. Τα περισσότερα από αυτά τα συμπτώματα καταλύονται από τον υποδοχέα PPAR-alpha. Έχει όμως αποδειχθεί ότι σε ποντίκια τα οποία είναι έτσι γενετικά σχεδιασμένα ώστε ένα ή περισσότερα γονίδια να είναι απενεργοποιημένα και ταυτόχρονα έχουν τον υποδοχέα PPAR-alpha, 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 [25,26,27,28,29,30,31]. Αυτό οδήγησε τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο να κατατάξει το DEHP από “πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο” σαν “μη ταξινομήσιμο σαν καρκινογόνος για τον άνθρωπο” [32].

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια οι τοξικολογικές ανησυχίες αυξήθηκαν εξαιτίας της πιθανής δράσης των φθαλικών εστέρων 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) [24,25,26,27,28,29,30]. 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 [24,25,26,27,28,29,30]. (Πίνακας 5).

Λόγω έλλειψης στοιχείων που αφορούν ανθρώπινες μελέτες πάνω στους φθαλικούς εστέρες, χρησιμοποιήθηκαν μελέτες που διεξήχθησαν σε πειραματόζωα και τα αποτελέσματα (NOAEL^a, LOAEL^b) 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.

^a 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.

^b 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.

Πίνακας 5: Πιθανές επιπτώσεις των φθαλικών εστέρων στον άνθρωπο (NTR-CERHR, 2000, 2003a-f)

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

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

Σε αναπτυξιακές μελέτες, βρέθηκαν αυξήσεις στην προγεννητική θνησιμότητα, μειωμένη ανάπτυξη και μειωμένο βάρος του βρέφους, σκελετικές και εξωτερικές 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 ιστοπαθολογικές αλλαγές στους όρχεις.

Όσον αφορά το DnHP, έγιναν έρευνες που χρησιμοποιήθηκαν υψηλές δόσεις (9900mg/kg βάρος σώματος/ημέρα, 380-1670mg/kg βάρος σώματος/ημέρα), οι οποίες παρουσίασαν αναπτυξιακά και αναπαραγωγικά προβλήματα. Όμως, εξαιτίας του μικρού αριθμού ερευνών με μικρότερες δόσεις, τα αποτελέσματα δεν ήταν επαρκή ώστε να αποσαφηνιστεί η πιθανότητα παρουσίασης αναπτυξιακών και αναπαραγωγικών προβλημάτων μετά από έκθεση σε DnHP.

Για το DnOP, διεξήχθησαν έρευνες σε πειραματόζωα όπου δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες παρενέργειες έως 7500mg/kg/ημέρα, αλλά σε μεγαλύτερες δόσεις (5000-10.000mg/kg/ημέρα) εμφανίστηκαν παρενέργειες σε όλα τις ομάδες πειραματόζωων.

Παρενέργειες στην ανάπτυξη του εμβρύου παρατηρήθηκαν σε έγκυα 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 (Πίνακας 5).

Με βάση τα επίπεδα NOAEL και LOAEL που προέρχονται από τις έρευνες στα πειραματόζωα, η Επιστημονική Επιτροπή για την Τοξικότητα, Οικοτοξικότητα και το Περιβάλλον (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment [33,34] όρισαν όρια ημερήσιας έκθεσης. Οι φθαλικοί εστέρες που χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον είναι αυτοί με τα χαμηλότερα όρια (TDI: tolerable daily intake) (Πίνακας 6) [33,34].

Τα ελάχιστα επίπεδα κινδύνου (MRL), ορίστηκαν από την Γραμματεία Υπηρεσίας Καταγραφής Τοξικών Ουσιών και Ασθενειών (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) και προκύπτουν από την εξέταση των πλέον ευαίσθητων ειδών, χρησιμοποιώντας τα επίπεδα NOAEL και LOAEL και λαμβάνοντας υπόψη διάφορους συντελεστές αβεβαιότητας. Άρα, το μικρότερο ελάχιστο όριο κινδύνου των 0.06mg/kg/ημέρα υπολογίστηκε για χρόνια έκθεση στο DEHP, με βάση το NOAEL των 5.8mg/kg που προκαλεί παρενέργειες στους όρχεις και με βάση το LOAEL των 140mg/kg βάρους σώματος για μειωμένη γονιμότητα [4]. Η Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (USA EPA), όρισε το επίπεδο δόσης αναφοράς (Rfd) ως 19mg/kg/ημέρα για ηπατικές επιπτώσεις στους χοίρους [35].

Πίνακας 6: Εκτίμηση Κινδύνων των Φθαλικών Εστέρων (ATSDR, US-EPA< EU-CSTEE, Health Canada)

	Χώρα, περιφέρεια	Επιτροπή, έτος	mg /kg βάρος σώματος/ημέρα.	MRL/TDI/Rfd	
DEP	ΗΠΑ	ATSDR, 1995	7	MRL οξεία έκθεση δια του στόματος	
			5	MRL χρόνια έκθεση δια του στόματος	
DBP	ΗΠΑ	US-EPA 1993a	0.8	Rfd χρόνια έκθεση	
		ATSDR, 2001	0.5	MRL οξεία έκθεση δια του στόματος	
BBzP	Καναδάς	US-EPA 1990	0.1	Rfd χρόνια έκθεση	
		Health Canada, 1994	0.06	TDI	
		CSTEE, 1998a,b	0.1	TDI	
DEHP	ΗΠΑ	US-EPA 1993b	0.2	Rfd χρόνια έκθεση	
		CSTEE, 1998a,b	0.2	TDI	
DnOP	ΗΠΑ	US-EPA 1991	0.020	Rfd χρόνια έκθεση	
		ATSDR, 2002	0.100	MRL μεσαία διάρκεια έκθεσης	
		Καναδάς	Health Canada, 1994	0,060	MRL χρόνια έκθεση
			CSTEE, 1998a,b	0.044	TDI
			ECB/EU (RAP-DEHP), 2004?	0.050	TDI
E.E	0.020	TDI για νεογέννητα< 3μηνών, γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία			
DnOP	ΗΠΑ	ATSDR, 1997	0.025	TDI βρέφη 3-12μηνών	
			0,041	TDI για γενικό πληθυσμό	
DiNP	ΗΠΑ	ATSDR, 1997	3	MRL οξεία έκθεση δια του στόματος	
			0.4	MRL μεσαία διάρκεια έκθεσης	
DiDP	ΗΠΑ	ATSDR, 1997	0.37	TDI	
			0.15	TDI	
DiDP	E.E	CSTEE, 1998a,b	0.25	TDI	

MRL: Ελάχιστα επίπεδα κινδύνου, Rfd: Επίπεδα δόσης αναφοράς

1.5 Φθαλικοί Εστέρες – Περιβαλλοντική παρακολούθηση

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

Πολλοί φθαλικοί εστέρες έχουν χαρακτηριστεί ως έμμεσα πρόσθετα των τροφίμων δηλαδή μπορεί να προέρχονται από το περιτύλιγμα των τροφίμων [36,37]. Σε είδη διατροφής, τα επίπεδα των φθαλικών εστέρων ποικίλλουν και τα υλικά συσκευασίας

θεωρούνται η πηγή εκπομπών [38,39]. Όμως, υπάρχουν και άλλες πηγές εκπομπών, όπως για παράδειγμα στην Ιαπωνία όπου εξετάστηκε η έκθεση μέσω της διατροφής σε δυο ίδια δείγματα τροφίμων το 1999 και το 2001. Οι πλαστικοποιητές που ανιχνεύθηκαν ήταν τα DBP, BBP, DEHP και το DiNP. Το 1999, την μεγαλύτερη συγκέντρωση την είχε το DEHP με τα επίπεδα να κυμαίνονται μεταξύ 10 και 4400ng/g. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή τη συγκέντρωση είναι η χρήση γαντιών από PVC κατά την προετοιμασία των γευμάτων, τα οποία περιέχουν μεγάλη ποσότητα DEHP. Σε αντίθεση, το 2001 τα επίπεδα DEHP ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με το 1999 (6-675ng/g) [40,41].

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 40-50 mg/kg και DEHP 400-700 mg/kg [42,43,44,45]. Για τον εσωτερικό αέρα των σπιτιών όμως, αυτές οι σχέσεις είναι αντίστροφες, και τα επίπεδα είναι: DEP > 350-650ng/m³, DBP 600-1200ng/m³ και DEHP 150-450ng/m³ [43,46,47].

Για βρέφη και νήπια, τα παιχνίδια που περιέχουν φθαλικούς εστέρες είναι μια πιθανή πηγή μόλυνσης 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 [4]. Λαμβάνοντας υπόψη τη τοξικότητα των φθαλικών εστέρων και το ρυθμό που απελευθερώνονται από τα παιχνίδια, απαγορεύτηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση το 1999 [48] η χρήση των DnBP, BBzP, DEHP, DiNP, DiDP σε παιχνίδια που προορίζεται για παιδιά κάτω των τριών ετών .

Ενώ, η χρήση διάφορων καταναλωτικών προϊόντων και άλλων είναι κυρίως υπεύθυνη για τη μόλυνση των εσωτερικών χώρων από τους φθαλικούς εστέρες : DMP, DEP, DBP, BBP, DiNP, DiDP, τα τρόφιμα αντιπροσωπεύουν την κύρια πηγή έκθεσης στα DiBP, DBP και DEHP [49,50].

1.5.1 Έκθεση αξιολόγησης από μοντέλα με χρήση δεδομένων περιβαλλοντικής παρακολούθησης

Με βάση τα δεδομένα της παραπάνω ενότητας, είναι δυνατή η εκτίμηση της έκθεσης των καταναλωτών σε φθαλικούς εστέρες. Η πρωταρχική έκθεση σε φθαλικούς εστέρες προέρχεται από την κατανάλωση τροφίμων, ιδίως λιπαρών τροφίμων όπως το γάλα, το βούτυρο και το κρέας, αλλά οι φθαλικοί εστέρες με μικρό μοριακό βάρος (DEP, DBP, BBzP) μπορούν να απορροφηθούν από το δέρμα, και οι πιο πτητικοί φθαλικοί εστέρες μπορούν να απορροφηθούν μέσω της εισπνοής [1]. Το Εθνικό Κέντρο Τοξικολογίας για την

αξιολόγηση των κινδύνων για την Ανθρώπινη Αναπαραγωγή [24,25,26,27,28,29,30] υπολόγισε την έκθεση σε DBP 2-10μg/kg βάρους σώματος/ημέρα, σε DnOP και DiDP 30μg/kg βάρους σώματος/ημέρα και σε DEHP μέχρι 30μg/kg βάρους σώματος/ημέρα.

Γενικά, η έκθεση των παιδιών στους φθαλικούς εστέρες υπερβαίνει την έκθεση των ενηλίκων. Στον Καναδά τη δεκαετία 1990 εκτιμήθηκε ότι η μέση ημερήσια έκθεση σε DEHP ήταν 9μg/kg βάρους σώματος/ημέρα για βρέφη, 19μg/kg βάρους σώματος/ημέρα για νήπια, 14μg/kg βάρους σώματος/ημέρα για παιδιά και 6μg/kg βάρους σώματος/ημέρα για ενήλικες [51].

Μια πιο λεπτομερής εκτίμηση της έκθεσης των Ευρωπαίων καταναλωτών έγινε σύμφωνα με ένα μοντέλο προσέγγισης με βάση την εκτίμηση των κινδύνων των φθαλικών εστέρων [10]. Μελετήθηκαν οι τρόποι έκθεσης οκτώ φθαλικών εστέρων, δηλαδή η στοματική οδός, η αναπνευστική και η δερματική οδός σε βρέφη, νήπια, παιδιά, έφηβους και ενήλικες. Επαληθεύτηκε το γεγονός ότι τα βρέφη και τα νήπια έρχονται σε μεγαλύτερη επαφή με φθαλικούς εστέρες από ότι οι άλλες ομάδες. Συγκεκριμένα, η μέση ημερήσια έκθεση σε DiDP και DiNP υπολογίστηκε μεγαλύτερη από την μέγιστη έκθεση των άλλων ομάδων σε αυτούς τους φθαλικούς εστέρες.

Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη από 100μg/kg βάρους σώματος/ημέρα και προέρχεται από την χρήση πλαστικών παιχνιδιών, τη τροφή και τη σκόνη (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Ημερήσια έκθεση σε οκτώ φθαλικούς εστέρες σε 5 καταναλωτικές ομάδες

Φθαλικοί εστέρες	Βρέφη 0-12 μηνών 5,5kg		Νήπια 1-3 ετών 13kg		Παιδιά 4-10ετών 27kg		Γυναίκες 18-80 ετών 60kg		Άνδρες 18-80 ετών 70kg	
	H.E	M.E	H.E	M.E	H.E	M.E	H.E	M.E	H.E	M.E
	DMP	1.81	23.46	0.76	9.72	0.49	6.28	0.22	2.54	0.22
DEP	3.48	19.74	1.49	8.31	0.76	4.44	1.43	64.93	1.15	50.94
DBP	1.57	5.58	0.68	2.62	0.29	1.25	0.41	1.45	0.45	1.61
DiBP	7.60	44.92	2.55	25.42	1.23	17.01	3.53	38.56	3.61	18.57
BBzP	0.76	7.56	0.31	3.67	0.06	1.24	0.27	1.65	0.31	1.89
DEHP	16.16	135.28	6.31	62.10	1.97	17.44	2.54	14.71	2.85	16.32
DiNP	21.98	135.02	7.07	67.19	0.19	5.61	0.00	0.26	0.00	0.29
DiDP	1.43	8.99	0.51	4.24	0.03	0.47	0.00	0.08	0.00	0.09
Σύνολο	54.80	380.57	19.68	183.28	5.00	53.73	8.42	124.17	8.59	92.38

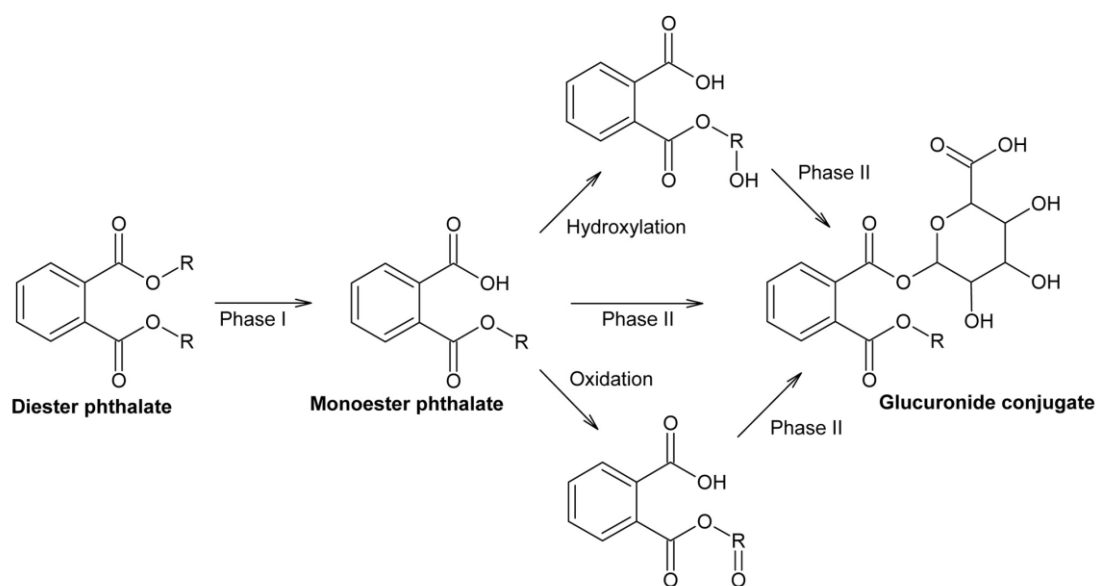
H.E: Ημερήσια έκθεση (μg/kg βάρους σώματος/ημέρα), M.E: Μέγιστη έκθεση (μg/kg βάρους σώματος/ημέρα)

Αναφορικά με τη συνεισφορά των διάφορων πηγών έκθεσης σε διαφορετικές καταναλωτικές ομάδες μπορούν να βγουν τα εξής συμπεράσματα για τους τέσσερις από τους οκτώ φθαλικούς εστέρες: ο εσωτερικός αέρας των σπιτιών είναι υπεύθυνος για την

έκθεση σε DMP, η χρήση προϊόντων προσωπικής φροντίδας όπως κρέμες, σαμπουάν ευθύνονται για το DEP, και τα τρόφιμα είναι πρωταρχική πηγή έκθεσης σε DBP και DEHP (>95%). Όμως, στα βρέφη και τα νήπια ένα ποσοστό της έκθεσης σε DBP και DEHP οφείλεται στην εισπνοή της σκόνης και στην εισαγωγή των παιχνιδιών στο στόμα τους (<20-30%). Όσον αφορά το BBzP, το DiNP και το DiDP οι πηγές έκθεσης είναι αρκετά διαφορετικές ανάμεσα στα βρέφη/νήπια και τους ενήλικες : η εισπνοή της σκόνης και η εισαγωγή των παιχνιδιών στο στόμα των βρεφών/νηπίων είναι η κύρια πηγή έκθεσης (>75% BBzP, >95% DiNP, DiDP), πηγή αμελητέα για τους ενήλικες [10].

1.6 Μεταβολισμός των φθαλικών εστέρων στους ανθρώπους

Οι φθαλικοί εστέρες μεταβολίζονται ταχύτατα στον οργανισμό του ανθρώπου σε δύο φάσεις: η πρώτη φάση είναι η υδρόλυση και η υδροξυλίωση ή οξειδωση που ακολουθείται από τη σύζευξη κατά την δεύτερη φάση(Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Μεταβολικά μονοπάτια των φθαλικών εστέρων

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 [52,53]. Κανονικά, στο πρώτο βήμα, η υδρόλυση θα έπρεπε να λειτουργούσε σαν ένα είδος αποτοξικοποίησης, δηλαδή θα έπρεπε να μειώνεται η τοξικότητα του διεστέρα, αλλά σε εσωσωματικές διαδικασίες (in vivo) και δοκιμασίες (in vitro) έχουν δείξει ότι οι φθαλικοί διεστέρες

γίνονται πιο βιοενεργοί όταν υδρολύονται προς τους αντίστοιχους μονοεστέρες [54]. Οι σχετικά πολικοί 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 οξειδωσης τους και στη συνέχεια εκκρίνονται στα ούρα ή τα κόπρανα με τη συζευγμένη μορφή τους (φάση II) (Σχήμα 3) [55],56]. Η δεύτερη φάση καταλύεται από ένα ένζυμο το ουριδινό-5- διφωσφογλυκουρο-μεταφοράση με την δράση του οποίου σχηματίζεται η γλυκουρονοιομένη ένωση.

1.6.1 DMP, DEP, DBP και BBzP

Οι φθαλικοί εστέρες χαμηλού μοριακού βάρους, όπως το DMP και το DEP συνήθως εκκρίνονται στα ούρα με τη μορφή του ελεύθερου μονοεστέρα : φθαλικός μονομεθυλεστέρας (MMP) και φθαλικός αιθυλεστέρας (MEP) αντίστοιχα. Στα ανθρώπινα ούρα το 70% του MEP που εκκρίνεται είναι χωρίς γλυκουρονίδιο, γεγονός το οποίο ισχύει και στη περίπτωση του πλάσματος [56,57].

Ο μεταβολισμός του DBP στους αρουραίους είναι γνωστός πολλά χρόνια [57,58]. 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 φθαλικοί εστέρες μονο-4-υδροξυβουτυλεστέρας, μονο-3-υδροξυβουτυλεστέρας και φθαλικό οξύ αντιστοιχούσαν στο 8.2% των εκκρινόμενων φθαλικών μεταβολιτών [58].

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η γλυκουρονοιομένη μορφή του MBP είναι ο κύριος μεταβολίτης στα ούρα των αρουραίων και των χάμστερ [52,58,59], ενώ το MBP και η γλυκουρονοιομένη μορφή του ήταν παρόντες σε όλους τους ιστούς συμπεριλαμβανομένων του πλακούντα, του εμβρύου και του αμνιακού υγρού σε εγκύους αρουραίους 30 λεπτά μετά την δόση. Το DBP αντιστοιχούσε στο λιγότερο από 1% [60]

Παρομοίως ανθρώπινες μελέτες έδειξαν ότι μόνο το 6% του συνολικού MBP εκκρίνεται με την ελεύθερη μορφή ενώ το υπόλοιπο με τη γλυκουρονοιομένη μορφή του [56].

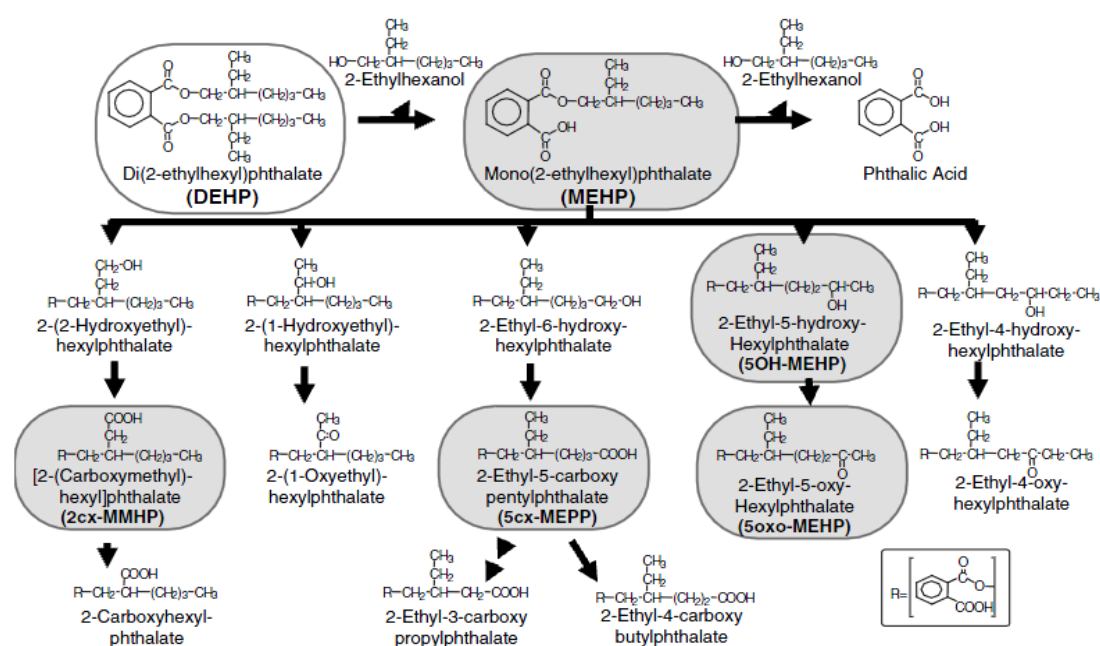
Το πολύ απλό μεταβολικό μονοπάτι και το γεγονός ότι το MBP είναι ο κύριος μεταβολίτης του DBP είναι ένας λόγος που όλες οι μελέτες χρησιμοποιούν το MBP σαν βιοδείκτη ^a για την έκθεση σε DBP. Παρόμοια μεταβολικά μονοπάτια έχουν και τα DiBP,

^a Βιοδείκτης (biomarker): Χαρακτηριστικό που μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά και να αξιολογηθεί ως δείκτης για φυσιολογικής ή παθολογικής εργασίας ή ως απόκριση σε μια θεραπευτική αγωγή.

BBzP. Για παράδειγμα, στα ανθρώπινα ούρα μόνο το 7% του συνολικού MBzP εκκρίνεται με την ελεύθερη μορφή του [56].

1.6.2 DEHP

Το DEHP είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος φθαλικός εστέρας και επιπλέον είναι αυτός που έχει μελετηθεί περισσότερο. Το DEHP μεταβολίζεται εκτενώς ανεξαρτήτως του τρόπου έκθεσης. Το πρώτο βήμα είναι ο ταχύτατος μεταβολισμός του DEHP σε MEHP, το οποίο με τη σειρά του μεταβολίζεται ταχύτατα μέσω διάφορων αντιδράσεων οξείδωσης [61]. Ο μεταβολισμός του DEHP παρουσιάζεται στο Σχήμα 4 [62].



Σχήμα 4: Μεταβολισμός του DEHP. Οι κύριοι μεταβολίτες του είναι τονισμένοι

Μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά του DEHP και των παραγόντων που επηρεάζουν την μετατροπή του DEHP στους κύριους μεταβολίτες του μετά από διάφορες δόσεις ισοτοπικά επισήμασμένου DEHP σε έναν υγιή άνδρα ηλικίας 63 ετών [62,63]. Του χορηγήθηκαν τρεις δόσεις, που καλύπτουν το εύρος έκθεσης του γενικού πληθυσμού αλλά ήταν πιο χαμηλά από το γνωστό NOAEL για το DEHP των 4.8mg/kg/ημέρα [64].

Μετά από 24 ώρες, το 67% (εύρος :64.6-70.5%) της δόσης του DEHP εκκρίθηκε στα ούρα με τη μορφή των 5 κύριων μεταβολιτών του : MEHP (23.3%, εύρος:22.7-24.15), MECPP (18.5%, εύρος:15.5-20.7%), MEOHP (15.0%, εύρος:13.0-17.3%), MEHP (5.9%, εύρος:

4.3-7.3%) και MCMHP(4.2%, εύρος:3.7-5.2%). Δεν παρατηρήθηκε καμία εξάρτηση του μεταβολισμού και της έκκρισης από την δόση. Τη δεύτερη μέρα, το 3.8% του DEHP εκκρίθηκε περιέχοντας : MCMHP (1.6%), MECPP (1.2%), MEHHP (0.6%) και MEOHP (0.4%).

Οι οξειδωμένοι μεταβολίτες του DEHP, MEHHP, MECPP, MEOHP, MCMHP παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής και εμφάνισαν την μέγιστη απέκκριση τους από τα ούρα αρκετά αργότερα από τον απλό μεταβολίτη MEHP. Οπότε, 24 ώρες μετά την έκθεση σε DEHP , η συνολική συγκέντρωση των οξειδωμένων μεταβολιτών του DEHP στα ούρα ήταν πολλαπλή από τη συγκέντρωση του MEHP. Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα.

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών του DEHP, χρόνος έκκρισης της μέγιστης συγκέντρωσης (t_{max}) και χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$)

	Συγκέντρωση (%)	$t_{max}(h)$	$t_{1/2}(h)$
MEHP	5.9	2	5
MEHHP	23.3	4	10
MEOHP	15.0	4	10
MECPP	18.5	4	12-15
MCMHP	4.2	8-10, 24	24

Οι περισσότερες από τις παραπάνω μετρήσεις βασίζονται στο MEHP ως βιοδείκτη. Όμως, το MEHP σχηματίζεται επίσης και από άλλες διαδικασίες μετατρέποντας το σε περιβαλλοντικό ρυπαντή από μόνο του. Ένα άλλο μειονέκτημα του MEHP είναι ότι αντιπροσωπεύει μόνο το 10% του αρχικού DEHP και έχει το μικρότερο χρόνο αποβολής από όλους τους υπόλοιπους μεταβολίτες. Οπότε, ο μεγάλος χρόνος αποβολής των MEOHP και MEHHP τα καθιστούν εξαιρετους βιοδείκτες επιβάρυνσης του οργανισμού, ενώ τα MECPP και MCMHP αντανακλούν κυρίως την βραχυχρόνια έκθεση. Επιπλέον, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι οι οξειδωμένοι μεταβολίτες είναι ισχυρότατα τοξικοί για την ανάπτυξη.

Πίνακας 9: Πλεονεκτήματα (+) και μειονεκτήματα (-) των βιοδεικτών του DEHP

	Ανθεκτικότητα	Ποσότητα	$t_{1/2}$	Τοξικότητα
MEHP	-	-	-	?
MEHHP	+	+	+	+
MEOHP	+	+	+	+
MECPP	+	+	++	+
MCMHP	+	-/+	++	+

1.6.3 DiNP

Ο φθαλικός διεστέρας της ισο-εννεανόλης (DiNP) αποτελείται από μια ομάδα ισομερών εννεανολών, οι οποίες διαφέρουν στο μήκος και στις διακλαδώσεις. Σε αντίθεση με το DEHP, οι μελέτες 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 στα ούρα [65,66]. Σε ούρα αρουραίων, οι οποίοι έλαβαν μια δόση του DiNP, ανιχνεύθηκε μόνο 0.04% του αρχικού μεταβολίτη φθαλικού εστέρα της ισο-εννεανόλης (MiNP), ενώ το 81% των εκκρινόμενων μεταβολιτών ταυτοποιήθηκαν σαν δευτερεύοντες μεταβολίτες και κυρίως ο φθαλικός εστέρας της καρβόξυ-ισο-οκτανόλης (MCiOP ή cx-MiNP). Ανάμεσα στους δευτερεύοντες μεταβολίτες ανιχνεύθηκαν οι φθαλικοί μονοεστέρες της υδρόξυ-ισο-εννεανόλης (MHiNP ή OH-MiNP), της όξο-ισο-εννεανόλης (MOiNP ή oxo-MiNP) και της καρβόξυ-ισο-επτανόλης (MCiHP) σε ποσοστό 8, 3, 5% αντίστοιχα [65].

Σε ανθρώπους, το DiNP εκκρίνεται στα ούρα με τη μορφή των δευτερευόντων μεταβολιτών. Σε μια έρευνα που αναλύθηκαν ούρα από 129 ενήλικους εθελοντές που εκτέθηκαν σε άγνωστη ποσότητα DiNP ανιχνεύθηκαν τα MCiOP, MOiNP, MHiNP, ενώ ο αρχικός μεταβολίτης MiNP δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα. Ο κύριος μεταβολίτης MHiNP ανιχνεύθηκε και με τη γλυκουρονιομένη και την ελεύθερη μορφή του, το MCiOP κυρίως με την ελεύθερη και το MOiNP με τη γλυκουρονιομένη μορφή. Οι τρεις μεταβολίτες αντιπροσώπευαν το 55, 38, και 6% αντίστοιχα των εκκρινόμενων μεταβολιτών [66]. Σε μια παρόμοια μελέτη σε γερμανικό πληθυσμό βρέθηκαν επίσης αυτοί οι τρεις μεταβολίτες [67], αλλά το συνολικό επίπεδο ήταν τρεις φορές πιο υψηλό από αυτό της προηγούμενης έρευνας και οι τρεις μεταβολίτες ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 40, 37, 22% αντίστοιχα [66,67] (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Μεταβολίτες του DiNP στα ούρα

	Γερμανικός πληθυσμός ^a		Πληθυσμός Η.Π.Α. ^b	
	ng/mL ^c	% ^d	ng/mL ^c	% ^d
MHiNP	14.9	37.1	11.4	55.6
MOiNP	8.9	22.1	1.2	5.9
MCiOP	16.4	40.8	7.8	38.2

^a 25 εθελοντές τυχαία επιλεγμένοι

^b 129 εθελοντές τυχαία επιλεγμένοι

^c Γεωμετρικός μέσος

^d Το άθροισμα των κύριων μεταβολιτών ορίστηκε 100

Αν και η έκκριση των μεταβολιτών του DiNP στα ούρα είχε κάποιες διαφορές ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς, παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ των μεταβολιτών και στις δυο έρευνες [66,67].

Πρόσφατες έρευνες σε ανθρώπους και αρουραίους απέδειξαν ότι το MiNP δεν είναι ο κατάλληλος βιοδείκτης για την έκθεση σε DiNP και όταν χρησιμοποιείται τα αποτελέσματα της έκθεσης δεν θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη.

1.7 Ενδοκρινικές διαταραχές από φθαλικούς εστέρες στον άνθρωπο

Πολλές έρευνες σε ζώα έχουν δείξει ότι η περιγεννητική έκθεση σε DBP και σε άλλους φθαλικούς εστέρες με μεγαλύτερες διακλαδώσεις 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 [68,69,70,71,72,73,74,75]. Έκθεση σε φθαλικούς εστέρες με μικρότερες διακλαδώσεις όπως το DMP και το DEP, δεν οδηγεί σε παρόμοια συμπτώματα [71]. Η έκθεση σε DEHP των θηλυκών απογόνων στη μήτρα, καθώς και η έκθεση σε DEHP μέσω του θηλασμού προκαλεί καθυστέρηση στην έναρξη της εφηβείας [76]. 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 Δυσγενέσιας Όρχεων (TDS) [68,77,78].

Ωστόσο είναι ακόμα ασαφές το αν η έκθεση σε φθαλικούς εστέρες προκαλεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία αφού οι ανθρώπινες έρευνες δεν έχουν δείξει ένα σαφή σύνδεσμο μεταξύ της έκθεσης σε αυτούς και στην ανθρώπινη υγεία [79]. Όμως σε πρόσφατες έρευνες υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκθεση στις συγκεκριμένες ουσίες 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 [80,81]. 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 [80], εκτός και αν γίνει προσαρμογή του επιπέδου του MEHP με τους άλλους μεταβολίτες [82].

Οπότε όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος ΜΕΗΡ/ΜΕΗΗΡ ή ΜΕΗΡ/ΜΕΟΗΡ τόσο μεγαλύτερη είναι η βλάβη υποδεικνύοντας έτσι ότι ο περαιτέρω μεταβολισμός του ΜΕΗΡ στους άλλους μεταβολίτες προστατεύει από βλάβες στο DNA του σπέρματος. Ως εκ τούτου, προτάθηκε η σχέση μεταξύ ΜΕΗΡ και δευτερογενών μεταβολιτών να γίνει δείκτης για τον μεταβολισμό του ΔΕΗΡ σε λιγότερο τοξικούς μεταβολίτες. Σε μια πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του ΜΒΡ στα ούρα και της χαμηλής κινητικότητας και συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων ενώ δεν βρέθηκε καμία σχέση με το ΜΜΡ, το ΜΕΡ και τους κυριότερους μεταβολίτες του ΔΕΗΡ [83]. 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 ΔΒΡ και ΔΕΗΡ 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 ΔΒΡ και ΔΕΗΡ στα ούρα για την συγκεκριμένη ομάδα. Επίσης, δεν υπήρχε καμία διαφορά στα επίπεδα διάφορων ορμονών όπως της θυλακιοτρόπος 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 ΜΒΡ, ΜΒzΡ στα ούρα με τα επίπεδα των αναπαραγωγικών ορμονών θυλακιοτρόπος και ανασταλτίνης Β [84] στον ορό του αίματος.

Οι παραπάνω ανθρώπινες μελέτες αναφέρουν έκθεση ενήλικων ανδρών σε φθαλικούς εστέρες αλλά η πιο ευάλωτη περίοδος έκθεσης για το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα είναι η προγεννητική και περιγεννητική περίοδος. Σε δύο ανθρώπινες έρευνες, έχουν συνδεθεί αποτελέσματα που αφορούν την υγεία του εμβρύου ή του νεογνού με την έκθεση στους φθαλικούς εστέρες, [85,86,109]. Στην πρώτη έρευνα, χρησιμοποίησαν ένα δείκτη (anogenital index, AGI) ο οποίος βασίζεται στην απόσταση του πρωκτού από τη βάση των γεννητικών οργάνων (anogenital distance, AGD), ένα μέτρο που χρησιμοποιείται στην τοξικολογία ως μέτρο αρρενοποίησης. Ο παραπάνω δείκτης μετρήθηκε σε αγοράκια 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 ΜΕΡ, ΜΒΡ, ΜiΒΡ και ΜΒzΡ γέννησαν αγοράκια που είχαν μειωμένη την απόσταση AGD [85].

Η δεύτερη έρευνα είναι μια μελέτη ελέγχου αρσενικών νηπίων που παρουσίαζαν ή όχι κρυφορχίες. 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 την περιεκτικότητα έξι φθαλικών μονοεστέρων σε δείγματα μητρικού γάλακτος από τις αντίστοιχες μητέρες [109]. Αναλύθηκαν δείγματα ορού αίματος για να μετρηθούν τα επίπεδα τεστοστερόνης, LH, FSH, ανασταλτίνης Β. της ορμόνης binding globulin (SHBG) και μετρήθηκε και ο λόγος τεστοστερόνης/SHBG που ορίζεται σαν 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 κρυφορχίες δεν οφείλονται στους μεταβολίτες αλλά μέσω του μητρικού γάλακτος επηρεάζονται τα επίπεδα των αναπαραγωγικών ορμονών των νηπίων. 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 [87,109].

Συνολικά, όλες αυτές οι συσχετίσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης των ανδρογόνων στα αγοράκια που είχαν την υψηλότερη μητρική έκθεση. Τα αποτελέσματα από τις δύο έρευνες συνοψίζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Συσχέτιση μεταξύ της απέκκρισης των επιπέδων των μητρικών φθαλικών εστέρων 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	+ ^α	+ ^α
FAI	nc	nc	-		nc	nc	nc
AGD	nc	+	+	+	+	nc	

nc: καμία συσχέτιση, +: θετική συσχέτιση, -: αρνητική συσχέτιση

^α: μόνο αγοράκια χωρίς κρυφορχίες

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 [88] και μείωση της διάρκειας της κύησης [89].

1.8 Έκθεση εμβρύων και βρεφών σε φθαλικούς εστέρες

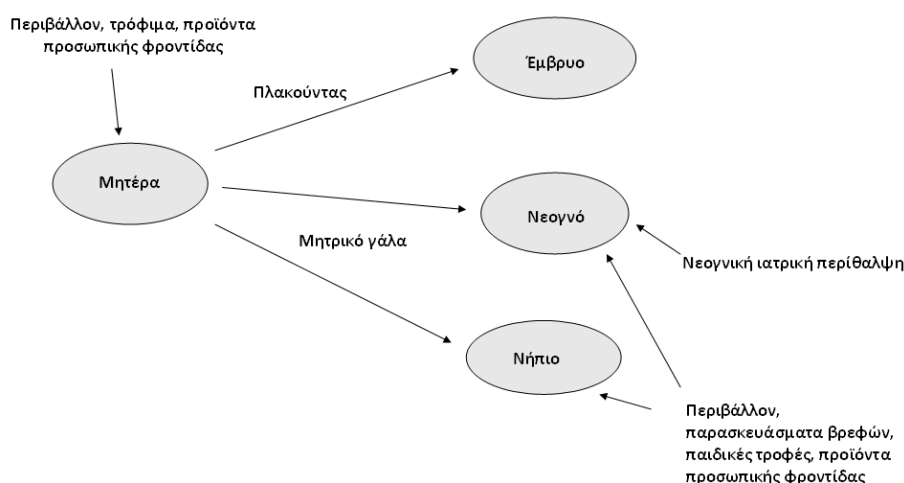
Η ανθρώπινη έκθεση σε φθαλικούς εστέρες έχει υπολογιστεί με βάση την περιεκτικότητα τους σε τρόφιμα, σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας και σε άλλα καταναλωτικά προϊόντα και από την έκκριση των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα [10,12,15,90,91]. Εξαιτίας των πολλών και διαφορετικών πηγών έκθεσης είναι πολύ δύσκολο να υπολογιστεί η ανθρώπινη έκθεση. Σύμφωνα με μια έρευνα σε γερμανικό πληθυσμό, οι μετρήσεις για τον υπολογισμό των μεταβολιτών δεν θα πρέπει να βασίζονται σε μετρήσεις μιας μόνο μέρας αλλά πολλών και θα πρέπει να υπολογίζονται εκτός από τους κύριους και οι δευτερεύοντες μεταβολίτες [92].

Πρόσφατες έρευνες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι τα παιδιά είναι περισσότερο εκτεθειμένα στους φθαλικούς εστέρες από τους ενήλικες. Για παράδειγμα, στα παιδιά (μέση ηλικία 4,7 ετών) τα επίπεδα των MBP και MBzP στα ούρα είναι δύο με τέσσερις φορές μεγαλύτερα από ότι στους ενήλικες [93]. Αυτή η έκθεση φαίνεται ότι γίνεται σε μικρότερες ηλικίες, οπότε η έκθεση σε DEHP και σε BBzP νηπίων ενός έτους υπολογίζεται τέσσερις φορές μεγαλύτερη από την έκθεση ενός αντιπροσωπευτικού πληθυσμού των Η.Π.Α.. Για παιδιά ηλικίας 6-11 ετών η πρόσληψη BBzP είναι διπλάσια από αυτή του γενικού πληθυσμού, ενώ για παιδιά μεγαλύτερης ηλικίας η πρόσληψη DEHP και DBP κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με τον γενικό πληθυσμό [93,94]. Η επίδραση της ηλικίας στο μεταβολικό διάγραμμα των φθαλικών εστέρων, είναι γνωστή από έρευνες σε ζώα όπου η κατανομή των αρχικών και δευτερευόντων μεταβολιτών διέφερε σημαντικά σε νέους και ηλικιωμένους αρουραίους [54,95,96]. Όμως μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν συστηματικές μελέτες για το μεταβολικό διάγραμμα των φθαλικών εστέρων στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες. Οπότε, θεωρητικά τα υψηλά επίπεδα των φθαλικών μονοεστέρων στα μικρότερα παιδιά μπορεί να οφείλονται στα διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια συγκριτικά με τους ενήλικες, οι οποίοι εκκρίνουν τους φθαλικούς εστέρες υψηλού μοριακού βάρους με τη μορφή των δευτερευόντων μεταβολιτών. Είναι απαραίτητη η συστηματική έρευνα ώστε να διευκρινιστούν τα μεταβολικά μονοπάτια των δευτερευόντων μεταβολιτών των παιδιών σε διάφορες ηλικίες ώστε να γίνει εκτίμηση του κινδύνου.

Δεδομένου ότι οι φθαλικοί εστέρες μπορεί να είναι σημαντικοί ενδοκρινικοί διαταράκτες για τους ανθρώπους, ιδιαίτερα κατά την εμβρυακή περίοδο και την πρώιμη παιδική ηλικία φαίνεται σημαντικό να διευκρινιστούν τα μεταβολικά μονοπάτια από τη μητέρα στο έμβρυο και στο νεογνό μέσω του πλακούντα και του μητρικού γάλακτος (Σχήμα

5). Λίγα είναι γνωστά για αυτές τις πορείες άλλα πλέον είναι επιβεβαιωμένο ότι τα έμβρυα και τα νεογνά είναι πολύ εκτεθειμένα σε φθαλικούς εστέρες.

Σε ένα μοντέλο αποδείχθηκε ότι οι φθαλικοί μονοεστέρες διανέμονται στον ομφάλιο λώρο, στον πλακούντα στο υγρό εγχύσεως της μητέρας και του εμβρύου ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ένωσης [97].



Σχήμα 5: Τρόποι έκθεσης σε φθαλικούς εστέρες

Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία, μελετήθηκε η προγεννητική έκθεση σε DEHP και MEHP στο αίμα του ομφάλιου λώρου σε 84 νεογέννητα και στο αίμα των μητέρων τους. Η μέση συγκέντρωση του DEHP στον ομφάλιο λώρο και στο μητρικό αίμα ήταν 2.05 και 1.15 µg/ml αντίστοιχα και η συγκέντρωση του MEHP ήταν 0.68 µg/ml και στα δύο [98] υποδεικνύοντας έτσι ότι το έμβρυο και η μητέρα μοιράζονται την ίδια έκθεση σε MEHP. Όσον αφορά τη διαφορά στα επίπεδα του DEHP είναι δύσκολο να μετρηθούν οι φθαλικοί εστέρες που δεν έχουν μεταβολιστεί σε βιολογικά δείγματα λόγω της πιθανής περιβαλλοντικής επιμόλυνσης.

Σε μια άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Αμερική, μελετήθηκαν οι φθαλικοί μεταβολίτες από 84 ανώνυμες εθελόντριες, στις οποίες βρέθηκαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών στα αμνιακά υγρά. Στην πραγματικότητα, από τους συνολικά δέκα φθαλικούς εστέρες, ανιχνεύθηκαν μόνο τα MEP, MBP, MEHP και οι ανώτερες συγκεντρώσεις ήταν 9.0, 264, 2,8 ng/ml αντίστοιχα [66]. Παρόμοια, οι συγκεντρώσεις των MEP και MEHP είναι αρκετά υψηλότερες στα μητρικά ούρα αρουραίων από ότι στα αμνιακά υγρά.

Τα νεογέννητα που χρειάζονται εκτεταμένη ιατρική φροντίδα εκτίθενται σε πολύ υψηλές ποσότητες, ιδίως DEHP, λόγω των ιατρικών μηχανημάτων. Ανιχνεύθηκαν τα MECPP

(10.2 mg.ml, ~66%), ΜΕΗΡ (2.4 mg.ml, ~15%) και ΜΕΟΗΡ (2.1 mg.ml, ~14%) αλλά και άλλοι μεταβολίτες του ΔΕΗΡ, ανάμεσα τους το ΜΕΗΡ σε ποσοστό 0.6% [66,99]. Τα νεογνά επίσης εκτίθενται σε ΜiNΡ και ΜΕΗΡ μέσω του θηλασμού [104,105,109].

Στο βρεφικό γάλα τα επίπεδα του ΜΒΡ και του ΜΕΗΡ ήταν 0.6-3.9 και 5.6-9.1 ng/ml αντίστοιχα και επίσης φθαλικοί εστέρες βρέθηκαν σε παιδικές τροφές, αγελαδινό γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα [39,106,108]. Τέλος τα νεογνά και τα νήπια εκτίθενται μέσω των προϊόντων προσωπικής φροντίδας, των παιχνιδιών και του περιβάλλοντος.

1.9 Κατανομή φθαλικών εστέρων σε άλλες μήτρες

Για την ανάλυση των φθαλικών εστέρων σε άλλες μήτρες έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αλλά δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες ακόμη. Μια μελέτη έδειξε ότι η κατανομή των φθαλικών μονοεστέρων στον ορό είναι παρόμοια με αυτή στα ούρα [56] αλλά η συνολική περιεκτικότητα είναι χαμηλότερη. Για παράδειγμα, το ΜΒzΡ δεν ανιχνεύθηκε στον ανθρώπινο ορό αλλά βρέθηκε στα ούρα, και μόνο ένα μικρό ποσοστό του ΜΕΡ βρέθηκε στον ορό σε αντίθεση με το αντίστοιχο ποσοστό στα ούρα. Στην ίδια έρευνα, το ποσοστό του ΜΕΗΡ ήταν το ίδιο στον ανθρώπινο ορό και στα ούρα [56] ενώ οι κύριοι μεταβολίτες του ΔΕΗΡ (ΜΕΗΡ, ΜΕΟΗΡ, ΜΕCΡΡ, ΜCΜΗΡ) ήταν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες στα ούρα από ότι στον ορό [47].

Η περιεκτικότητα των φθαλικών εστέρων στο αμνιακό υγρό έχει αναλυθεί σε μελέτες με τρωκτικά και έχει αναπτυχθεί μια μέθοδος για την ανάλυση του ανθρώπινου αμνιακού υγρού [100,101,102]. Σε μια μελέτη εγκύων ποντικών που τους χορηγήθηκε μια δόση ΔΒΡ, βρέθηκε ΜΒΡ στο μητρικό πλάσμα, στο πλάσμα του εμβρύου και στο αμνιακό υγρό [102]. Ο κύριος μεταβολίτης ήταν το ΜΒΡ και στο μητρικό και στο εμβρυικό πλάσμα και με μια αύξηση της δόσης (πενταπλάσια συγκέντρωση) βρέθηκε μη γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ΜΒΡ στο μητρικό και στο εμβρυακό πλάσμα. Σε πιο χαμηλές δόσεις, αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση του ΜΒΡ (ελεύθερο και γλυκουρονιομένο) ήταν τριπλάσια στο μητρικό πλάσμα, αλλά σε υψηλότερες δόσεις η συγκέντρωση ήταν παρόμοια στο μητρικό και στο εμβρυικό πλάσμα. Στο αμνιακό υγρό, το ΜΒΡ ήταν ο κύριος μεταβολίτης αρχικά αλλά μετά από 24 ώρες ο κύριος μεταβολίτης ήταν το γλυκουρονιομένο ΜΒΡ, το οποίο μετατράπηκε περαιτέρω σε διάφορες ισομερές μορφές. Ο χρόνος ημιζωής των δύο μορφών του ΜΒΡ ήταν αρκετά διαφορετικός στις τρεις μήτρες. Περίπου τρεις ώρες και για τους δύο μεταβολίτες στο μητρικό πλάσμα, περίπου 4,2-6,5 ώρες στο εμβρυικό πλάσμα και

6-11 ώρες στο αμνιακό υγρό, ενώ μέχρι 64 ώρες βρέθηκε ο χρόνος ημιζωής του γλυκουρονιομένου MBP στο αμνιακό υγρό μετά από υψηλή δόση σε DBP [102].

Σε μια άλλη έρευνα με ποντίκια, μετά από μια δόση DBP και DEHP σε έγκυα ποντίκια, αποδείχθηκε ότι με αύξηση της δόσης, αυξάνεται και η συγκέντρωση των μεταβολιτών στο αμνιακό υγρό αρκετά περισσότερο σε σύγκριση με τη συγκέντρωση στα ούρα. Σε αυτή της έρευνα, το MEHP και το MBP ήταν κυρίως με την ελεύθερη μορφή τους στο αμνιακό υγρό την ημέρα πριν την τελευταία δόση, ενώ το MEHP ήταν γλυκουρονιομένο στα μητρικά ούρα και το MBP ήταν και με τις δύο μορφές του στα μητρικά ούρα [100].

Τα ανθρώπινα αμνιακά υγρά έχουν αναλυθεί κυρίως για δέκα κοινούς μεταβολίτες φθαλικών εστέρων και δύο δευτερευόντων μεταβολιτών του DEHP [103]. Το MBP ανιχνεύθηκε σε όλα σχεδόν τα δείγματα (~93%). Το MEHP και το MEHP ανιχνεύθηκαν μόνο στο 39 και 24% των δειγμάτων αντίστοιχα ενώ οι συγκεντρώσεις των άλλων μεταβολιτών ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Τα επίπεδα του MBP ήταν δύο με τρεις φορές χαμηλότερα στο αμνιακό υγρό σε σχέση με τον ορό σε πληθυσμιακές μελέτες, το οποίο συμφωνεί και με τη σχέση του MBP στο μητρικό αίμα και το αμνιακό υγρό σε έρευνες με ποντίκια που έλαβαν χαμηλή δόση [102]. Τα επίπεδα του MBP στο αμνιακό υγρό ήταν επτά φορές πιο χαμηλά από ότι στα ούρα των παιδιών και τέσσερις φορές πιο χαμηλά από ότι στα ούρα των ενηλίκων [103].

Άλλο ένα αντικείμενο μελέτης ώστε να διευκρινιστούν οι φθαλικοί εστέρες και οι μεταβολίτες τους, είναι το μητρικό γάλα, τα αγελαδινό γάλα καθώς και τα βρεφικά παρασκευάσματα [104,105,106,107,108]. Όμως μόνο λίγες μελέτες έχουν δημοσιευθεί που αφορούν το ανθρώπινο μητρικό γάλα και δείχνουν ότι είναι μολυσμένο με φθαλικούς εστέρες [104,105,109,110]. Σε μια πρόσφατη έρευνα το DEP, το DBP και το DEHP ανιχνεύθηκαν σε 86 δείγματα μητρικού γάλακτος σε διάρκεια έξι μηνών στη Νότια Αμερική από μητέρες που θηλάζουν. Διαπιστώθηκε ότι το MEHP ήταν ο μεταβολίτης που κυριαρχούσε ενώ τα επίπεδα των φθαλικών ενώσεων είχαν διάφορες διακυμάνσεις κατά την περίοδο της συλλογής των δειγμάτων [105]. Κατά την επικύρωση της μεθόδου βρέθηκε ότι οι μεταβολίτες των φθαλικών εστέρων ήταν με την ελεύθερη μορφή τους σε αντίθεση με τον ορό. Τελικά, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των ερευνών αποδείχθηκε ότι οι φθαλικοί εστέρες με μεγάλες διακλαδώσεις όπως τα DBP, DEHP και DiNP εκκρίνονται χωρίς να μεταβολιστούν ή με την μορφή του αρχικού μονοεστέρα τους σε σχετικά υψηλά επίπεδα στο ανθρώπινο μητρικό γάλα και ίσως υπάρχει μια εναλλακτική μεταβολική οδός των φθαλικών εστέρων για τα συγκεκριμένα δείγματα.

Επίσης έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την ανάλυση των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στο σάλιο, στο σπέρμα και στο μηκόνιο αλλά κατά την επικύρωση των μεθόδων από τους 14 μεταβολίτες μόνο επτά βρέθηκαν στα δείγματα σάλιου, μόνο το MECPP και λίγοι ακόμη μεταβολίτες του DEHP βρέθηκαν στο μηκόνιο, ενώ στα δείγματα σπέρματος βρέθηκε μόνο MECPP [66,111].

1.10 Αντικείμενο και στόχοι

Οι φθαλικοί διεστέρες είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία σαν διαλύτες, πρόσθετα και σαν πλαστικοποιητές. Πολλοί φθαλικοί εστέρες είναι γνωστό ότι προκαλούν καρκίνο, αναπτυξιακά και αναπαραγωγικά προβλήματα στα ζώα. Αντίθετα με τον μεγάλο αριθμό ερευνών σε αυτό το πεδίο, τα δεδομένα σχετικά με την έκθεση των ανθρώπων σε αυτά είναι περιορισμένα.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των μεταβολιτών των φθαλικών διεστέρων σε δείγματα ανθρώπινων ούρων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών με ηλεκτροψεκασμό (HPLC-ESI-MS/MS). Τα ούρα προέρχονται από άνδρες εθελοντές οι οποίοι εργάζονται στο χώρο του Πανεπιστημίου Κρήτης σαν πειραματικοί Χημικοί και Βιολόγοι, από εργαζομένους του Τμήματος Χημείας, από εργαζομένους διαφόρων επαγγελματιών, από κομμωτές και από τραπεζικούς υπαλλήλους.

Στόχοι είναι :

- ❖ Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φθαλικών μονοεστέρων σε ανθρώπινα ούρα.
- ❖ Η σύγκριση των επιπέδων έκθεσης ανάλογα με τον εργασιακό χώρο.
- ❖ Η εκτίμηση των πιθανών πηγών έκθεσης.

2 Πειραματικό Μέρος

2.1 Αντιδραστήρια

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

Το ένζυμο E.Coli β -glucoronidase, 140 μονάδες ενεργότητας/mL, διατέθηκε 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 απιονισμένο νερό που χρησιμοποιήθηκε, παρασκευαζόταν στο εργαστήριο και είχε ειδική αντίσταση 18,2M Ω *cm.

2.2 Πρότυπες ενώσεις

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα :

Ο φθαλικός-μόνο-αιθυλεστέρας ,ο φθαλικός μόνο-κ-βουτυλεστέρας, ο φθαλικός μόνο-2-αιθυλο-εξυλεστέρας ,ο φθαλικός μόνο-2-αιθυλο-5-ύδροξυ-εξυλεστέρας, ο φθαλικός μόνο-2-αιθυλο-5-όξο-εξυλεστέρας ,ο φθαλικός μόνο-ίσο-εννεανουλοεστέρας, η 4-methyl-umbelliferrone και οι ανάλογες επισημασμένες με ¹³C ενώσεις, ήταν διαλυμένες σε ακετονιτρίλιο σε συγκέντρωση 100 μ g/ml και διατέθηκαν από την Cambridge Isotope Laboratories. Το 4-methyl-umbelliferyl glucoronide διατέθηκε από την Sigma Aldrich.

2.3 Διαλύματα

Τα διαλύματα των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων παρασκευάστηκαν σε υπερκάθαρο νερό με συγκέντρωση 2 μ g/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 2 μ g/mL-8

μg/mL σε γυάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια όγκου 4mL με καπάκια από teflon. Τα διαλύματα της 4-methyl-umbelliferone, της επισημασμένης 4-methyl-umbelliferone, του 4methyl-umbelliferyl 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 ρυθμίζοντας 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 ρυθμίζοντας το pH σε 2,0 προσθέτοντας φωσφορικό οξύ.

2.4 Δειγματοληψία

Ως δειγματοληψία ορίζεται η διαδικασία επιλογής, συλλογής, διατήρησης και μεταφοράς προς ανάλυση, μιας ενδεικτικής ποσότητας ενός υλικού. Η ποσότητα αυτή (δείγμα) πρέπει να ανταποκρίνεται στα χαρακτηριστικά του προς ανάλυση υλικού και να επιτρέπει την αναγωγή των παραμέτρων που θα προσδιορισθούν στο δείγμα.

Πριν τη δειγματοληψία, μελετάται το υλικό που πρόκειται να αναλυθεί, καθορίζονται οι απαιτούμενοι προσδιορισμοί και επιλέγονται οι ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν ως δείγμα. Το δείγμα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του αρχικού υλικού. Η αντιπροσωπευτικότητα εξασφαλίζεται με επιλογή κατάλληλων σημείων και του χρόνου δειγματοληψίας καθώς και τη διατήρηση αναλλοίωτου του δείγματος μέχρι την έναρξη της ανάλυσης.

Υπάρχουν τρεις τύποι δειγμάτων : *A) Στιγμαία δείγματα* : Με τον όρο στιγμαία δείγματα νοούνται τα δείγματα που συλλέγονται σε μια ορισμένη ώρα και θέση και αντιπροσωπεύουν τη συγκεκριμένη σύνθεση της πηγής, τη στιγμή της δειγματοληψίας.

B) Σύνθετα δείγματα : Ο όρος σύνθετα δείγματα αναφέρεται στη συλλογή και ανάμειξη ορισμένης ποσότητας στιγμαίων δειγμάτων που έχουν συλλεγεί από το ίδιο σημείο σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Γ) Ολοκληρωμένα δείγματα : Με τον όρο ολοκληρωμένα δείγματα νοείται η συλλογή και ανάμειξη δειγμάτων που έχουν συλλεγεί την ίδια χρονική στιγμή από διαφορετικά σημεία.

Στην παρούσα εργασία τα δείγματα ήταν στιγμιαία. Συλλέχθηκαν δείγματα από 28 άνδρες από το χώρο του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, οι οποίοι είναι πειραματικοί χημικοί και ίσως εκτίθενται παραπάνω στους φθαλικούς εστέρες, και από 19 άνδρες από το χώρο του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, οι οποίοι δεν είναι πειραματικοί χημικοί. Επίσης συλλέχθηκαν δείγματα από 13 άνδρες εκτός του χώρου του Πανεπιστημίου Κρήτης, οι οποίοι δεν είναι χημικοί, 9 δείγματα από άνδρες που εργάζονται σε τράπεζα και τέλος 12 δείγματα από άνδρες που εργάζονται σε κομμωτήρια.

2.5 Επεξεργασία δειγμάτων

Αρχικά το δείγμα αναδεύεται και με πιπέτα μεταφέρεται 1 mL σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρισης πολυπροπυλενίου (falcon tube) της Techno Plastic Products, όγκου 15 mL. Προστίθενται επίσης με πιπέτα, 50 μ L διαλύματος ιχνηθετημένων μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων, 50 μ L ιχνηθετημένης umbelliferone, 100 μ L διαλύματος 4methyl-umbelliferyl glucoronide, 250 μ L ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου/οξικού οξέως και 10 μ L E.Coli β -glucoronidase.

Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε φούρνο στους 37°C για 90min ώστε να ολοκληρωθεί η ενζυμική υδρόλυση των γλυκουρονικών ομάδων από τους συζευγμένους μεταβολίτες.

Ακολούθως, προστίθεται 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος υδροξειδίου του αμμωνίου και το δείγμα διαβιβάζεται σε φυσίγγιο SPE 60mg. Οι μεταβολίτες σε βασικό pH βρίσκονται στην αποπρωτονιωμένη τους μορφή και δεν συγκρατώνται 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 συγκρατώνται 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 οξικού 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 1 ml υπερκάθαρο νερό και αναλύεται με HPLC-ESI-MS/MS [112].

2.6 Αναλυτική μεθοδολογία

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων ούρων περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια :

- Εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE)
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.
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC)
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.
- Διαδοχική φασματομετρία μαζών με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization tandem mass spectrometry)
Ο φασματογράφος μάζας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας TSQ Quantum της Thermo Finnigan.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά οι τεχνικές επεξεργασίας, διαχωρισμού και ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

2.6.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη τεχνική προετοιμασίας του προς μέτρηση (δοκιμή ή ανάλυση) δείγματος. Η SPE αντικαθιστά αποτελεσματικά την εκχύλιση υγρού με υγρό και χρησιμοποιείται κυρίως για τις ακόλουθες αναλυτικές διαδικασίες.

- Προσυγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας (αναλύτη) από μεγαλύτερους όγκους δειγμάτων.
- Καθαρισμός δειγμάτων, όπου δεσμεύονται ουσίες από τα δείγματα οι οποίες παρεμποδίζουν μια διαδικασία μέτρησης.
- Χρονοπρογραμματιζόμενες δειγματοληψίες πεδίου, όπου πραγματοποιούνται αυτοποιημένες/προγραμματισμένες δειγματοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα με χρήση SPE.

Με την SPE επιλύονται πολλά προβλήματα της υγρής/υγρής εκχύλισης, όπως π.χ.

- ο ατελής διαχωρισμός φάσεων,
- η μη ποσοτική ανάκτηση των διαχωριζόμενων ουσιών,
- η χρήση ακριβού και εύθραυστου εξοπλισμού (διαχωριστικές χοάνες),
- χρήση και απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών και κατά κανόνα εύφλεκτων ή/και τοξικών οργανικών διαλυτών

Βασικές αρχές εκχύλισης στερεάς φάσης

SPE "αντίστροφης φάσης" : Οι διαχωρισμοί αντίστροφης φάσης πραγματοποιούνται με κατανομή της προσδιοριζόμενης ουσίας (δηλαδή του "αναλύτη") μεταξύ ενός πολικού ή μετρίως πολικού διαλύτη (συνήθως ύδατος) ή "μήτρας" (matrix) και μίας μη πολικής στατικής φάσης. Ο αναλύτης μπορεί να είναι ουσία μέσης πολικότητας ή μη πολική.

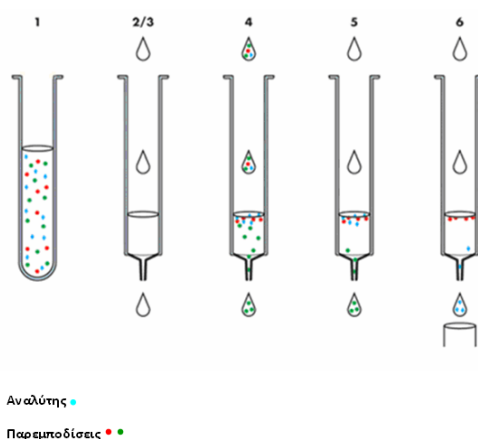
SPE "κανονικής φάσης" : Η πορεία αυτή περιλαμβάνει μία πολική προσδιοριζόμενη ουσία, μία μέσης πολικότητας ή μη πολική μήτρα (π.χ. ακετόνη, χλωριωμένοι διαλύτες, εξάνιο κ.α.) και μία πολική στατική φάση. Ως πληρωτικά υλικά χρησιμοποιείται οξειδίο του πυριτίου με

προσδεμένες πολικές ομάδες δηλαδή αντί απλών αλκυλομάδων, περιέχουν ομάδες όπως: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, που προσδίδουν στην πυριτία διάφορους βαθμούς πολικότητας.

SPE με ιοντοανταλλαγή : Η εκχύλιση στερεάς φάσης με ιοντοανταλλαγή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ουσίες οι οποίες σε διάλυμα (συνήθως υδατικό, σπανιότερα σε οργανικό διαλύτη) διαθέτουν ηλεκτρικό φορτίο, είναι δηλαδή ιόντα. Ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης της ουσίας βασίζεται στην ηλεκτροστατική έλξη της φορτισμένης δραστικής ομάδας της ουσίας προς την φορτισμένη ομάδα η οποία είναι συνδεδεμένη στο πυριτικό υπόστρωμα.

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.



Σχήμα 6: Τυπική διαδικασία SPE

2.6.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC)

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. Στην περίπτωση αυτή το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο και με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης αυξάνει ο χρόνος έκλουσης.

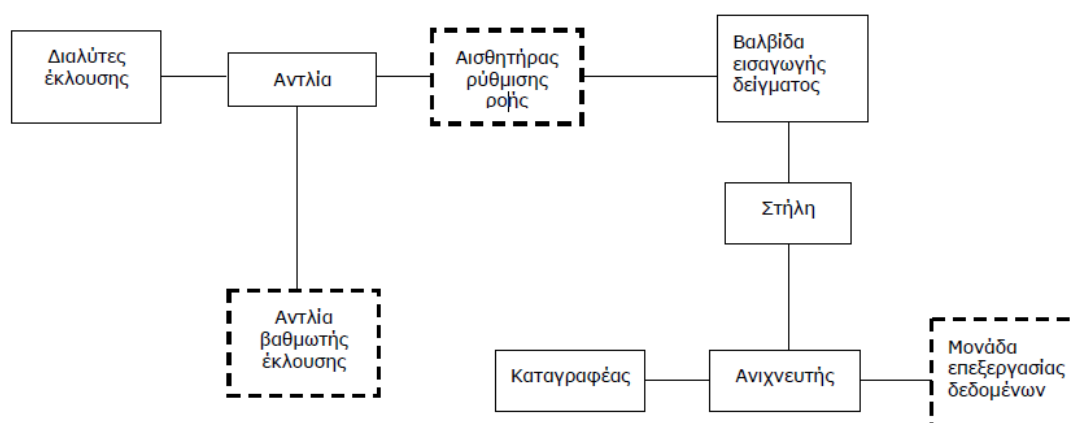
Η κατακράτηση μιας ένωσης εξαρτάται από την πολικότητα της και τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες όπως η σύσταση της κινητής φάσης, το είδος του πληρωτικού υλικού και τη θερμοκρασία.

Η έκλουση της κάθε ουσίας μπορεί να είναι είτε ισοκρατική είτε βαθμιδωτή. Στην ισοκρατική έκλουση αντλείται σταθερή σύσταση διαλύτη (κινητής φάσης) μέσω της στήλης κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Στην περίπτωση της βαθμιδωτής έκλουσης, η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται σύμφωνα με το πρόγραμμα της ανάλυσης.

Μια τυπική διάταξη HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

4. Αντλία (LC pump): πρόκειται για ένα σύστημα που παρέχει συνεχή και επαναλήψιμη ροή κινητής φάσης υπό υψηλή πίεση
5. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector): αποτελείται από μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης με βρόγχο.
6. Στήλη (column): είναι ένας ευθύγραμμος χαλύβδινος σωλήνας που περιέχει τη στατική φάση.

7. Ανιχνευτής (detector): με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία των ενώσεων που εξέρχονται από τη στήλη και μετράται η συγκέντρωσή τους στην κινητή φάση.
8. Καταγραφικό (data logger): αποτελεί το μέσο συλλογής, αποθήκευσης και παρουσίασης των αποτελεσμάτων της ανάλυσης και είναι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής εφοδιασμένος με το κατάλληλο λογισμικό.



Σχήμα 7: Διαγραμματική απεικόνιση μιας τυπικής διάταξης HPLC. Με τις διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται εξαρτήματα που είναι προαιρετικά σε μια τέτοια διάταξη.

2.6.3 Τεχνική Ηλεκτροψεκασμού

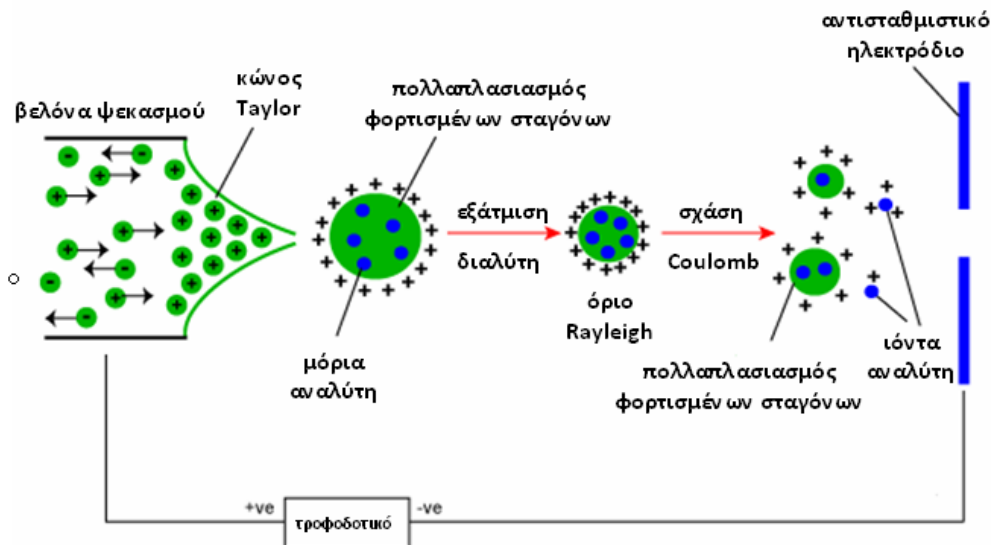
Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση πολικών ενώσεων, όπου τα ιόντα του διαλύματος της προσδιοριζόμενης ουσίας μεταβαίνουν στην αέρια φάση. Με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού καθίσταται δυνατή η ανάλυση θερμικά ασταθών ενώσεων ή ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος. Η διαδικασία αποτελείται από τρία στάδια:

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

Το διάλυμα της προσδιοριζόμενης ένωσης απελευθερώνεται στην άκρη της βελόνας ηλεκτροψεκασμού, όπου εφαρμόζεται ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο. Μόλις το διάλυμα έρθει σε επαφή με το ηλεκτρικό πεδίο σχηματίζεται ένα νέφος από σταγόνες ισχυρά φορτισμένες στην επιφάνεια τους. Τα θετικά ιόντα συσσωρεύονται στην επιφάνεια σχηματίζοντας ένα κώνο (Taylor cone).

Καθώς το νέφος από σταγόνες κατευθύνεται προς τον αναλυτή μαζών αρχικά εξατμίζεται ο διαλύτης οπότε και μικραίνει η διάμετρος της σταγόνας και ταυτόχρονα αυξάνει η πυκνότητα του φορτίου στην επιφάνεια κάθε σταγόνας μέχρι ένα κρίσιμο σημείο, γνωστό ως όριο Rayleigh. Στη συνέχεια γίνεται σχάση της σταγόνας σε μικρότερα σταγονίδια, περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη και σχάσεις με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολύ μικρών σταγονιδίων και λόγω της ηλεκτροστατικής άπωσης εκτινάσσονται τα ιόντα της εξεταζόμενης ένωσης στην αέρια κατάσταση.

Για πιο εύκολη εκνέφωση του διαλύματος από τη βελόνα του ηλεκτροψεκασμού διαβιβάζεται ένα αέριο εκνέφωσης (sheath gas), το οποίο επίσης διευκολύνει και την εξάτμιση του διαλύτη (auxiliary gas).

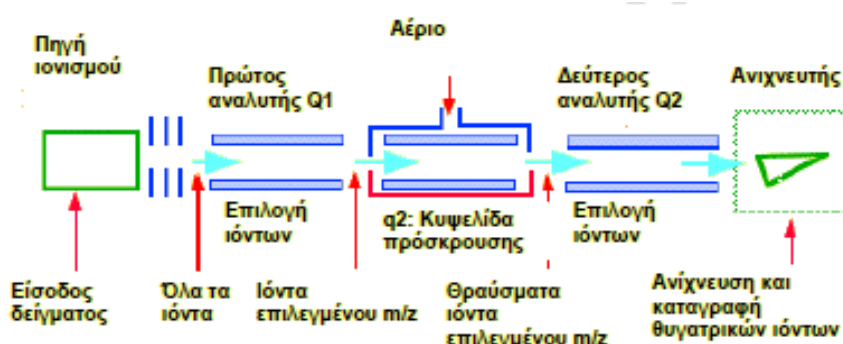


Σχήμα 8: Σχηματισμός ιόντων με ESI

2.6.4 Διαδοχική φασματομετρία μάζας

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας είναι συνδυασμένο με ένα φασματόμετρο μάζας, που φέρει αναλυτή μάζας με τρία τετράπολα. Πρόκειται για μια διάταξη από τρία τετράπολα από τα οποία το πρώτο και το τρίτο είναι αναλυτές μαζών και λειτουργούν με συνδυασμό και των δύο δυναμικών, ραδιοσυχνότητας και σταθερού δυναμικού, έτσι ώστε να επιτρέπουν την δίοδο μόνο των επιθυμητών ιόντων με κατάλληλη επιλογή του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z).

Στο δεύτερο τετράπολο εφαρμόζεται μόνο ένα σταθερό δυναμικό. Στην περίπτωση αυτή, ιόντα οποιουδήποτε λόγου m/z μπορούν να περάσουν από το τετράπολο, το οποίο λειτουργεί ως κυψελίδα πρόσκρουσης με ιδιότητες εστίασης ιόντων. Ο εστιασμός των ιόντων οφείλεται στην επίδραση του δυναμικού. Τα ιόντα υφίστανται προσκρούσεις με ένα ευγενές αέριο που διοχετεύεται μέσα στην κυψελίδα, η μεταβολή της πολικότητας όμως τα αναγκάζει να επανέλθουν πίσω στο κέντρο της διάταξης. Τα εξερχόμενα ιόντα από το τετράπολο Q2, διέρχονται από το τρίτο τετράπολο Q3, το οποίο επιτρέπει τη δίοδο μόνο συγκεκριμένων ιόντων με κατάλληλη επιλογή του λόγου m/z (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση φασματομέτρου μάζας με τρία τετράπολα

2.7 Παράμετροι Λειτουργίας Μεθόδου

2.7.1 Παράμετροι Λειτουργίας Υγρής Χρωματογραφίας

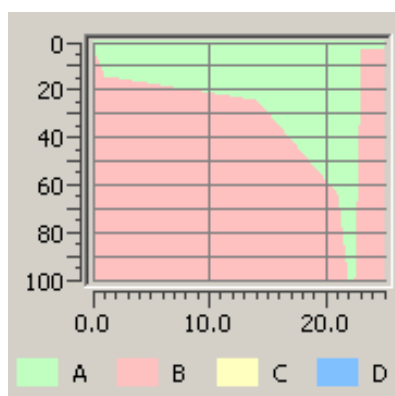
Λόγω της παρεμφερούς δομής των προς ανάλυση ενώσεων ήταν επιβεβλημένη η χρήση μια στήλης με υψηλή διαχωριστική ικανότητα και η εφαρμογή βαθμιδωτής έκλουσης της κινητής φάσης, ώστε να υπάρχει διαχωρισμός σε μια σχετικά σύντομης χρονικής διάρκειας ανάλυση. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε, επιλέχθηκε λόγω του λεπτόκοκκου-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.

Ο βέλτιστος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με ροή 0,350 mL/min, κινητές φάσεις νερό και ακετονιτρίλιο με 0,1% οξικό οξύ και το ακόλουθο πρόγραμμα έκλουσης [113].

Πίνακας 12: 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



Σχήμα 10: Σχηματική αναπαράσταση του βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (A:οξικό οξύ σε ακετονιτρίλιο, B: Οξικό οξύ σε νερό)

Η λήψη του δείγματος πραγματοποιείται με αυτόματο δειγματολήπτη (Auto Sampler). Το μοντέλο εισαγωγής δείγματος ήταν πλήρους βρόγχου (full loop). Οι παράμετροι λειτουργίας του παρατίθενται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: 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 ₃ 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

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.

2.7.2 Ηλεκτροψεκασμός, Επιλογή θυγατρικών ιόντων για την τεχνική S.R.M

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 MS¹ 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 MS² 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.

Αρχικά παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 2μg/ml όλων των αναλυτών και λαμβάνονται φάσματα μάζας ώστε να προσδιοριστεί το πιο άφθονο ιόν,

όπου για όλους τους φθαλικούς εστέρες ήταν το μητρικό και στη συνέχεια επιλέγονται τα θυγατρικά ιόντα με την παρακολούθηση συγκεκριμένης αντίδρασης. Στον Πίνακα 14 φαίνονται οι επιλεγμένες αντιδράσεις των ενώσεων προς ανάλυση.

Πίνακας 14: Επιλεγμένες αντιδράσεις των ενώσεων

Μεταβολίτης	SRM	SRM
	μη-επισημασμένου	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	175→133	179→135
4methyl-umbelliferyl glucoronide	350→175	Μη διαθέσιμο αντιδραστήριο

Επίσης ορίστηκε το δυναμικό ηλεκτροψεκασμού, το οποίο εφαρμόζεται στη βελόνα και επηρεάζει τη μεταφορά ιόντων του αναλύτη στα -4000V 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 στα 20 mTorr. 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 στα 45 mTorr και στο τέταρτο στα 49 mTorr. 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.

2.8 Χαρακτηριστικά Μεθόδου

2.8.1 Τυφλά δείγματα

Για την αποφυγή του κινδύνου επιμόλυνσης των δειγμάτων από τα γυαλικά ή από κάποιο πειραματικό σφάλμα είναι απαραίτητη η ανάλυση τυφλών δειγμάτων, όπου αναλύεται 1ml υπερκάθαρου νερού με την ίδια διαδικασία που αναλύονται τα πραγματικά δείγματα. Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των φθαλικών βρέθηκαν όλες κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Οι τελικές αναλύσεις έγιναν σε πέντε διαφορετικά δείγματα.

2.8.2 Υπολογισμός ανακτήσεων

Ο υπολογισμός των ανακτήσεων γίνεται με ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων με γνωστή συγκέντρωση, η οποία πρέπει να είναι συγκρίσιμη με τις αναμενόμενες σε πραγματικά δείγματα.

Σε κάθε δείγμα νερού γίνεται αρχικά εμβολιασμός όλων των ενώσεων εκτός από τις μη επισημασμένες, οι οποίες προστίθενται στο τέλος της ανάλυσης και ακολουθείται η πειραματική διαδικασία όπως και στα πραγματικά δείγματα. Τελικά έγιναν αναλύσεις σε τρία δείγματα που εμβολιάστηκαν με 100ng και σε άλλα τρία που εμβολιάστηκαν με 500ng των μη επισημασμένων ενώσεων.

Στον Πίνακα 15 παρατίθενται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 15: Ανακτήσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων

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

2.8.3 Υπολογισμός ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης συστήματος υγρής χρωματογραφίας

2.8.3.1 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου

Ο γενικά αποδεκτός ορισμός του ορίου ανίχνευσης (detection limit) είναι, ότι αποτελεί την συγκέντρωση ή μάζα του αναλύτη, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με καθορισμένη στάθμη (ή επίπεδο) εμπιστοσύνης.

Για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης του οργάνου παρασκευάστηκε ένα διάλυμα με τους μεταβολίτες των φθαλικών συγκέντρωσης 10ng/ml και αναλύθηκε 7 φορές. Η επιλογή της συγκέντρωσης έγινε σύμφωνα με τα αναμενόμενα όρια ανίχνευσης που προκύπτουν από τον τύπο [114]:

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

όπου

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

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

Με παρόμοιο τρόπο υπολογίστηκε και το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (Instrumental Limit of Quantification), το οποίο ορίζεται σαν την ελάχιστη ποσότητα μιας ένωσης, η οποία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με καθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης αλλά με τιμή t ίση με 10.

Στον Πίνακα 16 παρατίθενται τα LOD και LOQ του οργάνου για τις συγκεκριμένες συνθήκες λειτουργίας.

Πίνακας 16: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου σε ng/ml για κάθε μεταβολίτη

Ένωση	LOD οργάνου (ng/ml)	LOQ οργάνου (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

2.8.3.2 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου είναι η ελάχιστη ποσότητα σε πραγματικό δείγμα που μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί αντίστοιχα.

Ο υπολογισμός τους γίνεται λαμβάνοντας υπόψη το I.D.L, το επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης της μεθόδου και τέλος τον βαθμό συμπύκνωσης του δείγματος. Στην συγκεκριμένη μέθοδο ξεκινά την ανάλυση με 1ml δείγματος και στο τέλος της ανάλυσης επαναδιασπείρεται σε 1ml νερό, οπότε δεν υπάρχει συμπύκνωση.

Στον Πίνακα 17 παρατίθενται τα LOD και LOQ της μεθόδου για τις συγκεκριμένες συνθήκες λειτουργίας.

Πίνακας 17: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε ng/ml για κάθε μεταβολίτη

Ένωση	LOD μεθόδου (ng/ml)	LOQ μεθόδου (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

2.8.3.3 Έλεγχος ποιότητας μετρήσεων (Quality Control-QC)

Προκείμενου να εξασφαλισθεί η αντιπροσωπευτικότητα των μετρήσεων και αναλύσεων σε κάθε κύκλο αναλύσεων προστίθενται άλλα δύο δείγματα. Σε αυτά τα δείγματα αναλύεται 1ml νερού με την πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιείται στα πραγματικά δείγματα, στα οποία γίνεται εμβολιασμός με 20 και 100ng πρότυπων φθαλικών μεταβολιτών. Τελικά ποσοτικοποιούνται και συγκρίνονται με τις αναμενόμενες τιμές.

Στον Πίνακα 18 παρατίθενται τα αποτελέσματα από ένα κύκλο αναλύσεων που χρησιμοποιήθηκαν τέτοια δείγματα.

Πίνακας 18: Δείγματα ελέγχου ποιότητας

Ένωση	Εμβολιασμός 20ng πρότυπων	Εμβολιασμός 100ng πρότυπων
mEP	18,21	90,19
mBP	22,42	91,80
mEHHP	19,19	87,78
mEOHP	20,63	97,36
mEHP	17,14	76,98
mNP	14,11	72,06

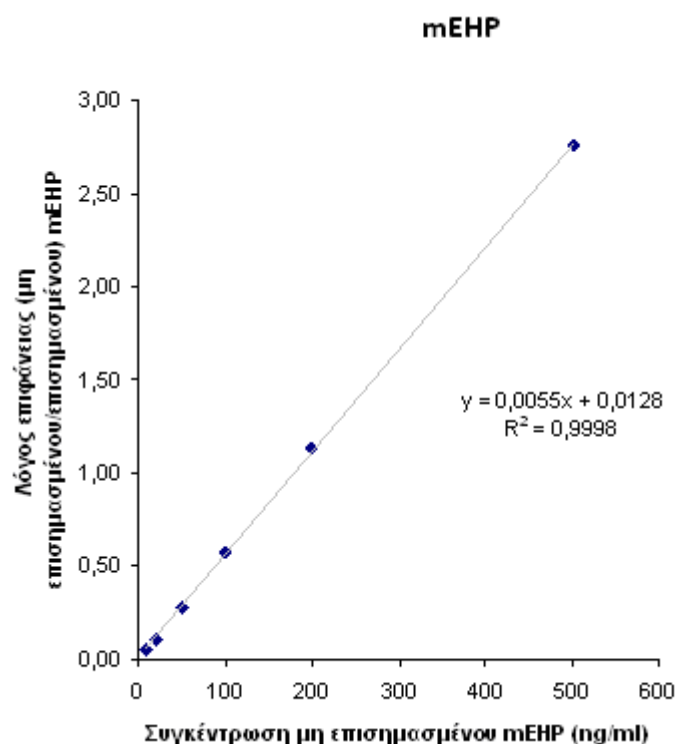
2.8.3.4 Καμπύλες Βαθμονόμησης

Κατά την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων παρασκευάστηκαν εσωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης αντί για εξωτερικές λόγω της μεταβολής της πυκνότητας των δειγμάτων και για αποφυγή του φαινομένου μήτρας. Πιο αναλυτικά παρασκευάστηκαν έξι πρότυπα διαλύματα στα οποία έγινε εμβολιασμός από 100 έως 400ng από κάθε επισημασμένη ένωση, ανάλογα με την αναμενόμενη συγκέντρωση στα πραγματικά δείγματα. Επίσης, έγινε εμβολιασμός με μη επισημασμένους μεταβολίτες ώστε η συγκέντρωση των δειγμάτων να είναι 10, 20, 50, 100, 200, 500ng/ml.

Κατά την παρασκευή των καμπύλων βαθμονόμησης στον άξονα ψ χρησιμοποιήθηκε ο λόγος της επιφάνειας του μη επισημασμένου μεταβολίτη προς την επιφάνεια του επισημασμένου, αντί την επιφάνεια του μη επισημασμένου μεταβολίτη όπως στην

εξωτερική βαθμονόμηση. Με τον συγκεκριμένο τρόπο αποφεύγεται η διόρθωση της ανάκτησης αφού οι απώλειες που εμφανίζονται στις μη επισημασμένες ενώσεις, εμφανίζονται και στις επισημασμένες. Δεύτερον, αστάθειες που μπορεί να εμφανίζονται στην λειτουργία του οργάνου δεν επηρεάζουν τις μετρήσεις και τρίτον η χρήση των επισημασμένων ενώσεων ενισχύεται η ήδη μεγάλη επιλεκτικότητα της τεχνική σάρωσης με παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης, SRM.

Παρακάτω παρατίθεται μια χαρακτηριστική καμπύλη βαθμονόμησης.



Σχήμα 11: Χαρακτηριστική καμπύλη βαθμονόμησης του μεταβολίτη mEHP

3 Αποτελέσματα

Συνολικά ελήφθησαν 81 δείγματα, τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με το επάγγελμα του εκάστοτε εθελοντή. Ο σκοπός αυτής της κατηγοριοποίησης είναι η εκτίμηση της έκθεσης σε φθαλικούς εστέρες ανάλογα με τον επαγγελματικό χώρο. Οπότε οι κατηγορίες που προέκυψαν είναι :

- I. Δείγματα χημικών και βιολόγων που εργάζονται σε εργαστήρια του Πανεπιστημίου Κρήτης
- II. Δείγματα εθελοντών που δεν εργάζονται σε ερευνητικά εργαστήρια στο Πανεπιστήμιο Κρήτης αλλά εργάζονται στο τμήμα Χημείας
- III. Δείγματα εθελοντών διαφόρων επαγγελμάτων
- IV. Κομμωτές
- V. Τραπεζικοί Υπάλληλοι

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν χημικοί και βιολόγοι οι οποίοι εργάζονται σε ερευνητικά εργαστήρια στο Πανεπιστήμιο Κρήτης. Η συλλογή των συγκεκριμένων δειγμάτων έγινε ώστε να διευκρινιστεί αν η συγκεκριμένη ομάδα εκτίθεται παραπάνω σε φθαλικούς εστέρες λόγω αντιδραστηρίων, ενώσεων, οργάνων και πάγκων εργασίας (οι οποίοι περιέχουν PVC). Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν εθελοντές οι οποίοι δεν εργάζονται σε ερευνητικά εργαστήρια αλλά βρίσκονται και αυτοί εντός του Πανεπιστημίου Κρήτης ώστε να γίνει μια σύγκριση με την παραπάνω ομάδα. Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν εθελοντές οι οποίοι δεν έχουν κάποιο κοινό σημείο αναφοράς μεταξύ τους ή με τις άλλες ομάδες. Στην τέταρτη κατηγορία ανήκουν κομμωτές, οι οποίοι εργάζονται είτε σε γυναικεία είτε σε ανδρικά κομμωτήρια, οπότε χρησιμοποιούν προϊόντα τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φθαλικών εστέρων. Τέλος, η τελευταία κατηγορία είναι οι τραπεζικοί υπάλληλοι, οι οποίοι δεν χρησιμοποιούν αντικείμενα που να περιέχουν υψηλές ποσότητες από τις ουσίες προς ανάλυση.

3.1 Δείγματα χημικών και βιολόγων που εργάζονται σε εργαστήρια του Πανεπιστημίου Κρήτης

Λήφθηκαν δείγματα από 28 εθελοντές από τον χώρο του Πανεπιστημίου Κρήτης οι οποίοι είναι πειραματικοί χημικοί και βιολόγοι. Τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων για τους έξι μεταβολίτες φαίνονται στον Πίνακα 19.

Πίνακας 19: Συγκεντρώσεις από 28 εθελοντές (πειραματικοί χημικοί και βιολόγοι)

Δείγμα	mEP (ng/ml)	mBP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mEOHP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mNP (ng/ml)
Π1	69,05	49,05	142,37	92,81	55,08	Δ.Α
Π2	95,84	83,31	91,58	56,71	31,36	Δ.Α
Π3	15,62	Δ.Π	43,73	30,34	8,44	Δ.Α
Π4	36,93	38,85	184,95	114,95	38,03	Δ.Α
Π5	171,84	32,40	13,52	10,22	7,08	Δ.Α
Π6	120,10	29,89	137,72	74,99	30,67	Δ.Α
Π7	198,73	79,06	159,91	110,28	33,01	Δ.Α
Π8	241,52	50,15	68,85	43,74	15,46	Δ.Α
Π9	225,74	113,18	101,87	66,84	31,40	Δ.Α
Π10	148,45	Δ.Π	25,96	22,16	12,21	Δ.Α
Π11	56,31	31,33	92,52	66,69	12,84	Δ.Α
Π12	96,43	58,67	31,13	12,72	3,00	Δ.Α
Π13	109,65	129,08	84,55	57,84	22,26	Δ.Α
Π14	6,87	93,62	47,13	35,80	22,66	Δ.Α
Π15	39,74	27,58	91,54	70,86	23,42	Δ.Α
Π16	24,07	Δ.Π	117,54	56,09	35,55	Δ.Α
Π17	288,24	26,58	14,56	10,54	Δ.Α	Δ.Α
Π18	150,25	35,87	185,03	84,40	58,47	Δ.Α
Π19	36,06	13,15	90,66	50,75	12,20	Δ.Α
Π20	111,14	61,38	125,87	71,71	56,14	Δ.Α
Π21	76,11	25,41	105,22	58,46	25,57	Δ.Α

Πίνακας 19 (Συνέχεια): Συγκεντρώσεις από 28 εθελοντές (πειραματικοί χημικοί και βιολόγοι)

Δείγμα	mEP (ng/ml)	mBP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mEOHP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mNP (ng/ml)
Π22	196,77	Δ.Π	48,03	26,58	13,30	Δ.Α
Π23	161,75	20,62	90,82	45,96	25,82	Δ.Α
Π24	63,21	26,46	111,16	63,46	38,28	Δ.Α
Π25	79,24	26,81	14,01	Δ.Π	Δ.Α	Δ.Α
Π26	71,14	21,91	13,81	Δ.Π	Δ.Α	Δ.Α
Π27	321,84	31,44	58,12	39,35	9,35	Δ.Α
Π28	856,55	Δ.Π	72,90	48,16	26,36	Δ.Α

Δ.Α: Δεν ανιχνεύθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Δ.Π: Δεν ποσοτικοποιήθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης και πάνω από το όριο ανίχνευσης.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα και τα στατιστικά στοιχεία φαίνονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Στατιστικά στοιχεία των 28 πειραματικών εθελοντών

	Μέσος όρος (ng/ml)	Τυπική απόκλιση (ng/ml)	Διάμεσος (ng/ml)	Γεωμετρικός μέσος(ng/ml)
mEP	145,33	161,96	103,04	94,49
mBP	41,84	31,46	30,61	32,99
mEHP	84,47	50,25	90,74	66,06
mEOHP	51,20	29,73	53,42	39,79
mEHP	23,17	16,58	23,04	13,11

Λόγω όμως των διακυμάνσεων της πυκνότητας των ούρων είναι απαραίτητο να μετρηθεί η κρεατινίνη των ούρων ώστε να γίνει διόρθωση τιμών σύμφωνα με τις παραμέτρους αναφοράς. Έτσι και για τους 28 εθελοντές μετρήθηκαν οι τιμές της κρεατινίνης και έγινε διόρθωση των συγκεντρώσεων των φθαλικών μεταβολιτών στα ούρα. Οι συγκεντρώσεις της κρεατινίνης στα ούρα είναι μεταξύ 0,47 και 3,04 g/l και η διάμεση τιμή είναι 1,73g/l.

Στους Πίνακες 21,22 φαίνονται τα διορθωμένα, με τις τιμές της κρεατινίνης, αποτελέσματα και τα συγκεντρωτικά αντίστοιχα.

Πίνακας 21: Διορθωμένες, ως προς τη κρεατινίνη, συγκεντρώσεις φθαλικών μεταβολιτών στα ούρα πειραματικών χημικών και βιολόγων

Δείγμα	mEP (μg/g)	mBP (μg/g)	mEHP (μg/g)	mEOHP (μg/g)	mEHP (μg/g)
Π1	35,97	25,54	74,15	48,34	28,69
Π2	53,84	46,80	51,45	31,86	17,62
Π3	15,02	12,64	42,05	29,17	8,11
Π4	15,07	15,86	75,49	46,92	15,52
Π5	166,83	31,46	13,12	9,92	6,88
Π6	71,49	17,79	81,97	44,64	18,25
Π7	65,37	26,01	52,60	36,28	10,86
Π8	113,92	23,65	32,48	20,63	7,29
Π9	104,99	52,64	47,38	31,09	14,61
Π10	176,73	15,65	30,90	26,39	14,54
Π11	27,47	15,28	45,13	32,53	6,26
Π12	96,43	58,67	31,13	12,72	3,00
Π13	54,02	63,58	41,65	28,49	10,97
Π14	2,54	34,68	17,46	13,26	8,39
Π15	13,07	9,07	30,11	23,31	7,71
Π16	51,21	27,98	250,09	119,35	75,64
Π17	228,76	21,09	11,56	8,36	0,20
Π18	242,34	57,85	298,43	136,14	94,30
Π19	21,34	7,78	53,64	30,03	7,22
Π20	45,18	24,95	51,17	29,15	22,82
Π21	52,49	17,52	72,56	40,32	17,63
Π22	144,68	9,67	35,31	19,54	9,78
Π23	86,04	10,97	48,31	24,45	13,74
Π24	22,50	9,42	39,56	22,58	13,62
Π25	95,47	32,30	16,88	6,81	0,30
Π26	59,29	18,26	11,51	4,71	0,21
Π27	206,31	20,15	37,26	25,22	5,99
Π28	481,21	7,39	40,95	27,06	14,81

Πίνακας 22: Διορθωμένα ,ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία των πειραματικών χημικών και βιολόγων

	Μέσος όρος (μg/g)	Τυπική απόκλιση (μg/g)	Διάμεσος (μg/g)	Γεωμετρικός μέσος (μg/g)
mEP	98,20	100,88	62,33	60,51
mBP	25,52	16,42	20,62	21,12
mEHHP	58,37	64,18	41,85	42,30
mEOHP	33,19	29,16	27,77	25,48
mEHP	16,25	20,68	10,91	8,40

Συνολικά, στα 28 δείγματα, το mEP ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα, το mBP στο 82% των δειγμάτων, οι δευτερεύοντες μεταβολίτες mEHHP και mEOHP στο 100% και 92% των δειγμάτων αντίστοιχα, το mEHP στο 92% των δειγμάτων και τέλος ο αρχικός μεταβολίτης mNP δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα.

3.2 Δείγματα εθελοντών που δεν εργάζονται σε ερευνητικά εργαστήρια στο Πανεπιστήμιο Κρήτης

Λήφθηκαν 19 δείγματα από εθελοντές οι οποίοι εργάζονται στο χώρο του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης ή είναι φοιτητές εκεί. Τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των φθαλικών μεταβολιτών φαίνονται στον Πίνακα 23.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στους 19 εθελοντές που εργάζονται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δείγμα	mEP (ng/ml)	mBP (ng/ml)	mEHHP (ng/ml)	mEOHP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mNP (ng/ml)
NP001	83,39	35,10	56,62	26,04	Δ.Α	Δ.Α
NP002	83,05	25,79	65,89	46,41	13,67	Δ.Α
NP003	374,79	74,29	72,86	37,21	11,81	Δ.Α
NP004	426,72	45,42	76,70	46,91	21,99	Δ.Α
NP005	92,04	93,63	71,04	39,44	9,72	Δ.Α
NP006	176,34	144,79	128,95	62,67	55,58	Δ.Α
NP007	199,71	29,91	25,22	15,26	7,98	Δ.Α
NP008	99,49	82,42	99,92	56,08	13,37	Δ.Α

Πίνακας 23 (Συνέχεια): Αποτελέσματα συγκεντρώσεων των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στους 19 εθελοντές που εργάζονται Τμήμα Χημείας

Δείγμα	mEP (ng/ml)	mBP (ng/ml)	mEHHP (ng/ml)	mEOHP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mNP (ng/ml)
NP009	31,63	Δ.Π	29,61	15,51	14,03	Δ.Α
NP010	351,34	64,05	39,50	36,43	Δ.Α	Δ.Α
NP011	16,20	Δ.Π	27,24	14,41	12,55	Δ.Α
NP012	70,45	39,23	28,52	19,67	Δ.Α	Δ.Α
NP013	96,78	53,44	28,84	20,13	24,01	Δ.Α
NP014	97,39	47,60	71,76	44,28	30,98	Δ.Α
NP015	21,25	21,24	60,22	40,33	4,60	Δ.Α
NP016	93,66	42,35	116,96	43,19	37,98	Δ.Α
NP017	Δ.Π	Δ.Π	28,86	17,32	8,49	Δ.Α
NP018	31,20	32,16	20,68	11,43	Δ.Α	Δ.Α
NP019	597,36	39,68	44,08	29,37	8,22	Δ.Α

Δ.Α: Δεν ανιχνεύθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Δ.Π: Δεν ποσοτικοποιήθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης και πάνω από το όριο ανίχνευσης.

Στον Πίνακα 24 παρατίθενται τα στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών στα ούρα.

Πίνακας 24: Στατιστικά στοιχεία των 19 εθελοντών που εργάζονται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης

	Μέσος όρος (ng/ml)	Τυπική απόκλιση (ng/ml)	Διάμεσος (ng/ml)	Γεωμετρικός μέσος(ng/ml)
mEP	155,04	164,08	93,66	85,18
mBP	47,92	32,83	39,68	39,00
mEHHP	57,55	32,13	56,62	49,66
mEOHP	32,74	15,32	36,43	29,08
mEHP	14,53	14,38	11,81	6,24

Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων υπολογίστηκαν ξανά λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές της κρεατινίνης στα ούρα, οι οποίες κυμαίνονται από 0,53

έως 3,78g/l και η διάμεση τιμή είναι 1,99g/l. Στον Πίνακα 25 φαίνονται οι καινούριες συγκεντρώσεις που προέκυψαν από τον υπολογισμό της κρεατινίνης.

Πίνακας 25: Διορθωμένες, ως προς την κρεατινίνη, συγκεντρώσεις των 19 εθελοντών που εργάζονται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δείγμα	mEP (μg/g)	mBP (μg/g)	mEHP (μg/g)	mEOHP (μg/g)	mEHP (μg/g)
NP001	40,28	16,95	27,35	12,58	0,12
NP002	40,51	12,58	32,14	22,64	6,67
NP003	128,35	25,44	24,95	12,74	4,05
NP004	112,89	12,02	20,29	12,41	5,82
NP005	34,87	35,47	26,91	14,94	3,68
NP006	88,61	72,76	64,80	31,49	27,93
NP007	122,52	18,35	15,47	9,36	4,90
NP008	41,98	34,77	42,16	23,66	5,64
NP009	21,81	9,07	20,42	10,69	9,67
NP010	140,54	25,62	15,80	14,57	0,10
NP011	21,04	17,08	35,37	18,72	16,30
NP012	51,42	28,64	20,82	14,35	0,18
NP013	54,68	30,19	16,29	11,37	13,56
NP014	36,89	18,03	27,18	16,77	11,73
NP015	13,12	13,11	37,17	24,90	2,84
NP016	43,36	19,61	54,15	19,99	17,58
NP017	5,66	24,81	54,46	32,68	16,03
NP018	33,55	34,58	22,24	12,29	0,27
NP019	481,74	32,00	35,55	23,69	6,63

Στον Πίνακα 26 παρατίθενται τα στατιστικά που προκύπτουν από τις διορθωμένες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών.

Πίνακας 26: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία των 19 εθελοντών που εργάζονται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης

	Μέσος όρος (μg/g)	Τυπική απόκλιση (μg/g)	Διάμεσος (μg/g)	Γεωμετρικός μέσος (μg/g)
mEP	79,67	105,58	41,98	49,02
mBP	25,32	14,21	24,81	22,44
mEHP	31,24	14,16	27,18	28,58
mEOHP	17,89	6,93	14,94	16,74
mEHP	8,09	7,45	5,82	3,59

Συνολικά, το mEP ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα αλλά ποσοτικοποιήθηκε στο 95% των δειγμάτων, το mBP ποσοτικοποιήθηκε στο 84% των δειγμάτων, το mEHP ανιχνεύθηκε στο 84% των δειγμάτων, τα mEHP και mEOHP ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα και τέλος το mNP δεν βρέθηκε σε κανένα δείγμα.

3.3 Δείγματα εθελοντών διαφόρων επαγγελμάτων

Λήφθηκαν δείγματα από 10 εθελοντές που εργάζονται σε διάφορα τμήματα του Πανεπιστημίου Κρήτης (Φυσικό, Τμήμα Υπολογιστών) και από τρία παιδιά. Τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων φαίνονται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στους 13 εθελοντές διαφόρων επαγγελμάτων

Δείγμα	mEP (ng/ml)	mBP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mEOHP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mNP (ng/ml)
E001	342,81	Δ.Π	30,23	17,56	7,30	Δ.Α
E002	56,85	23,22	52,11	40,15	2,56	Δ.Α
E003	39,45	Δ.Π	64,07	45,11	4,72	Δ.Α
E004	118,30	Δ.Π	16,33	9,61	5,27	Δ.Α
E005	61,98	22,73	89,81	31,90	26,67	Δ.Α
E006	323,01	Δ.Π	50,17	33,02	17,17	Δ.Α

Πίνακας 27 (Συνέχεια): Συγκεντρώσεις μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στους 13 εθελοντές διαφόρων επαγγελματιών

Δείγμα	mEP (ng/ml)	mBP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mEOHP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mNP (ng/ml)
E007	17,77	Δ.Π	Δ.Π	Δ.Α	2,23	Δ.Α
E008	406,10	30,16	28,99	20,96	3,05	Δ.Α
E009	101,15	22,69	69,61	33,35	14,46	Δ.Α
E010	81,87	84,86	41,22	29,05	4,93	Δ.Α
E011	238,51	46,03	86,04	51,19	28,43	Δ.Α
E012	17,16	29,03	52,09	30,87	14,30	Δ.Α
E013	53,29	28,52	151,89	75,74	13,58	Δ.Α

Δ.Α: Δεν ανιχνεύθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Δ.Π: Δεν ποσοτικοποιήθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης και πάνω από το όριο ανίχνευσης.

Τα στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών παρατίθενται στον Πίνακα 28.

Πίνακας 28: Στατιστικά στοιχεία των 13 εθελοντών διαφόρων επαγγελματιών

	Μέσος όρος (ng/ml)	Τυπική απόκλιση (ng/ml)	Διάμεσος (ng/ml)	Γεωμετρικός μέσος(ng/ml)
mEP	142,94	135,72	81,87	89,53
mBP	26,38	20,63	22,73	20,46
mEHP	57,03	37,59	52,09	45,62
mEOHP	32,30	18,93	31,90	24,35
mEHP	11,13	8,90	7,30	8,02

Έγινε διόρθωση των τιμών των συγκεντρώσεων με τις τιμές της κρεατινίνης στα ούρα οι οποίες κυμαίνονται από 0,50 έως 3,31 g/l και η διάμεση τιμή είναι 2,05g/l. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 29.

Πίνακας 29: Διορθωμένες, ως προς την κρεατινίνη, συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στους 13 εθελοντές διαφόρων επαγγελμάτων

Δείγμα	mEP (μg/g)	mBP (μg/g)	mEHHP (μg/g)	mEOHP (μg/g)	mEHP (μg/g)
E001	132,36	5,08	11,67	6,78	2,82
E002	46,22	18,88	42,37	32,64	2,08
E003	26,84	8,95	43,58	30,68	3,21
E004	155,66	17,30	21,49	12,65	6,94
E005	41,32	15,15	59,87	21,27	17,78
E006	146,82	5,98	22,81	15,01	7,81
E007	35,55	6,30	17,60	2,70	4,45
E008	158,01	11,73	11,28	8,16	1,18
E009	49,34	11,07	33,96	16,27	7,05
E010	32,11	33,28	16,17	11,39	1,93
E011	72,06	13,91	25,99	15,46	8,59
E012	9,64	16,31	29,27	17,34	8,03
E013	25,13	13,45	71,65	35,72	6,40

Τα καινούρια στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από τις διορθωμένες συγκεντρώσεις παρατίθενται στον Πίνακα 30.

Πίνακας 30: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία των 13 εθελοντών διαφόρων επαγγελμάτων

	Μέσος όρος (μg/g)	Τυπική απόκλιση (μg/g)	Διάμεσος (μg/g)	Γεωμετρικός μέσος (μg/g)
mEP	71,62	55,38	46,22	52,68
mBP	13,64	7,38	13,45	12,04
mEHHP	31,36	18,55	25,99	26,84
mEOHP	17,39	10,18	15,46	14,33
mEHP	6,02	4,38	6,40	4,72

Συνολικά, το mEP ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα, το mBP ποσοτικοποιήθηκε στο 61% των δειγμάτων, ο δευτερεύον μεταβολίτης mEHHP ποσοτικοποιήθηκε στο 92% των δειγμάτων, ενώ το mEOHP ανιχνεύθηκε στο 92% των δειγμάτων. Το mEHP ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα, ενώ το mNP σε κανένα.

3.4 Δείγματα κομμωτών

Από τις πιο ενδιαφέρουσες κατηγορίες εθελοντών υπήρξαν οι κομμωτές. Συλλέχθηκαν 12 δείγματα από άνδρες κομμωτές από το κέντρο του Ηρακλείου, από τους οποίους πολλοί εργάζονται σε γυναικεία κομμωτήρια, οπότε εκτίθενται αρκετά παραπάνω σε βαφές, σαμπουάν και κρέμες. Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα φαίνονται στον Πίνακα 31.

Πίνακας 31: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα 12 κομμωτών

Δείγμα	mEP (ng/ml)	mBP (ng/ml)	mEHHP (ng/ml)	mEOHP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mNP (ng/ml)
K01	934,80	27,08	51,52	27,26	32,00	Δ.Α
K02	141,18	24,17	168,74	103,84	41,09	Δ.Α
K03	973,07	Δ.Π	17,01	Δ.Π	3,70	Δ.Α
K04	355,85	49,88	42,75	26,07	5,85	Δ.Α
K05	423,92	28,67	242,99	122,37	99,24	Δ.Α
K06	55,47	122,85	40,25	29,13	29,64	Δ.Α
K07	255,99	Δ.Π	40,20	24,25	15,66	Δ.Α
K08	3649,81	52,25	40,66	30,39	28,18	Δ.Α
K09	396,54	121,59	50,49	35,14	21,04	Δ.Α
K10	327,67	102,57	129,86	65,50	87,87	Δ.Α
K11	94,53	29,17	181,69	97,04	57,60	Δ.Α
K12	210,47	26,15	27,56	22,73	9,00	Δ.Α

Δ.Α: Δεν ανιχνεύθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Δ.Π: Δεν ποσοτικοποιήθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης και πάνω από το όριο ανίχνευσης.

Στον Πίνακα 32 παρατίθενται τα στατιστικά στοιχεία των συγκεντρώσεων των φθαλικών μεταβολιτών.

Πίνακας 32: Στατιστικά στοιχεία των 12 κομμωτών

	Μέσος όρος (ng/ml)	Τυπική απόκλιση (ng/ml)	Διάμεσος (ng/ml)	Γεωμετρικός μέσος(ng/ml)
mEP	651,61	989,00	341,76	342,39
mBP	50,89	41,07	28,92	38,27
mEHHP	86,14	74,66	46,62	62,14
mEOHP	49,12	38,24	29,76	36,49
mEHP	35,91	31,07	28,91	23,94

Είναι απαραίτητο να γίνει ξανά η διόρθωση των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών με τις τιμές της κρεατινίνης στα ούρα. Οι τιμές κυμαίνονται από 0,65 έως 2,64g/l και η διάμεση τιμή είναι 2,25g/l. Οι διορθωμένες συγκεντρώσεις φαίνονται στον Πίνακα 33.

Πίνακας 33: Διορθωμένες, ως προς την κρεατινίνη, συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα 12 κομμωτών

Δείγμα	mEP (μg/g)	mBP (μg/g)	mEHHP (μg/g)	mEOHP (μg/g)	mEHP (μg/g)
K01	417,32	12,09	23,00	12,17	14,28
K02	55,58	9,51	66,43	40,88	16,18
K03	1497,04	20,23	26,17	8,69	5,69
K04	135,30	18,97	16,25	9,91	2,22
K05	428,21	28,96	245,44	123,61	100,24
K06	39,34	87,13	28,54	20,66	21,02
K07	182,85	9,39	28,71	17,32	11,19
K08	1614,96	23,12	17,99	13,45	12,47
K09	157,98	48,44	20,12	14,00	8,38
K10	128,50	40,22	50,93	25,69	34,46
K11	45,45	14,03	87,35	46,65	27,69
K12	79,72	9,91	10,44	8,61	3,41

Στον Πίνακα 34 παρατίθενται τα στατιστικά στοιχεία από τις διορθωμένες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 34: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία κομμάτων

	Μέσος όρος (μg/g)	Τυπική απόκλιση (μg/g)	Διάμεσος (μg/g)	Γεωμετρικός μέσος (μg/g)
mEP	398,52	556,55	146,64	186,04
mBP	26,83	22,72	19,60	20,80
mEHP	51,78	65,13	27,35	33,77
mEOHP	28,47	32,42	15,66	19,82
mEHP	21,44	26,62	13,38	13,01

Συνολικά, το mEP όπως ήταν αναμενόμενο ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα όπως το mEHP και ο δευτερεύον μεταβολίτης του DEHP, το mEHP, ενώ ο δευτερεύον μεταβολίτης του DEHP, το mEOHP ποσοτικοποιήθηκε στο 91% των δειγμάτων. Το mBP ποσοτικοποιήθηκε στο 83% των δειγμάτων ενώ το mNP δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέγιστη συγκέντρωση του mEP βρέθηκε στο δείγμα 8 που αντιστοιχεί σε 1614,96 μg/g και στο δείγμα 3 βρέθηκε 1497,04 μg/g.

3.5 Δείγματα τραπεζικών υπαλλήλων

Σε σύγκριση με την κατηγορία των κομμάτων, των οποίων η έκθεση σε φθαλικούς εστέρες είναι μεγάλη, λήφθηκαν δείγματα από 9 υπαλλήλους τράπεζας στο κέντρο του Ηρακλείου, οι οποίοι λόγω εργασίας εκτίθενται αρκετά λιγότερο σε φθαλικούς εστέρες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα αντικείμενα που χρησιμοποιούν δεν περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό τις συγκεκριμένες ουσίες οπότε και ο αέρας που βρίσκεται στον εργασιακό τους χώρο είναι λιγότερο ρυπασμένος από φθαλικές ενώσεις. Τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των φθαλικών μεταβολιτών στα ούρα των 9 τραπεζικών υπαλλήλων φαίνονται στον Πίνακα 35.

Πίνακας 35: Συγκεντρώσεις φθαλικών μεταβολιτών σε ούρα 9 τραπεζικών υπαλλήλων

Δείγμα	mEP (ng/ml)	mBP (ng/ml)	mEHHP (ng/ml)	mEOHP (ng/ml)	mEHP (ng/ml)	mNP (ng/ml)
T01	145,32	21,73	19,26	16,48	16,74	Δ.Α
T02	61,93	59,78	75,81	45,04	10,41	Δ.Α
T03	33,85	Δ.Π	11,83	9,35	6,77	Δ.Α
T04	21,65	45,22	47,47	34,08	23,52	Δ.Α
T05	340,34	22,23	27,63	16,34	18,45	Δ.Α
T06	23,31	71,23	35,07	23,04	13,40	Δ.Α
T07	310,17	44,99	21,06	15,90	20,28	Δ.Α
T08	110,94	58,84	107,61	58,18	27,30	Δ.Α
T09	106,92	Δ.Π	30,23	16,78	19,71	Δ.Α

Δ.Α: Δεν ανιχνεύθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Δ.Π: Δεν ποσοτικοποιήθηκε, η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης και πάνω από το όριο ανίχνευσης.

Τα στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από τις συγκεντρώσεις των φθαλικών μεταβολιτών στα ούρα των τραπεζικών υπαλλήλων παρατίθενται στον Πίνακα 36.

Πίνακας 36: Στατιστικά στοιχεία των συγκεντρώσεων των ούρων των τραπεζικών υπαλλήλων

	Μέσος όρος (ng/ml)	Τυπική απόκλιση (ng/ml)	Διάμεσος (ng/ml)	Γεωμετρικός μέσος(ng/ml)
mEP	128,27	119,79	106,92	83,27
mBP	38,92	21,95	44,99	32,69
mEHHP	41,77	31,10	30,23	33,59
mEOHP	26,13	16,28	16,78	22,33
mEHP	17,40	6,41	18,45	16,15

Έγινε ξανά διόρθωση των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών με τις τιμές της κρεατινίνης που βρέθηκαν στα ούρα, οι οποίες κυμαίνονται από 0,71 έως 2,26g/l και η διάμεση τιμή είναι 1,65g/l. Τα διορθωμένα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 37.

Πίνακας 37: Διορθωμένες, ως προς την κρεατινίνη συγκεντρώσεις των μεταβολιτών φθαλικών εστέρων στα ούρα των 9 τραπεζικών υπαλλήλων

Δείγμα	mEP (μg/g)	mBP (μg/g)	mEHHP (μg/g)	mEOHP (μg/g)	mEHP (μg/g)
T01	64,30	9,61	8,52	7,29	7,41
T02	30,66	29,59	37,53	22,30	5,15
T03	31,94	12,41	11,16	8,82	6,39
T04	9,75	20,37	21,38	15,35	10,60
T05	272,27	17,78	22,10	13,08	14,76
T06	16,77	51,25	25,23	16,58	9,64
T07	187,98	27,27	12,77	9,64	12,29
T08	66,04	35,03	64,05	34,63	16,25
T09	150,59	18,52	42,58	23,63	27,76

Τα στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από τις διορθωμένες συγκεντρώσεις των φθαλικών μεταβολιτών στα ούρα των τραπεζικών υπαλλήλων παρατίθενται στον Πίνακα 38.

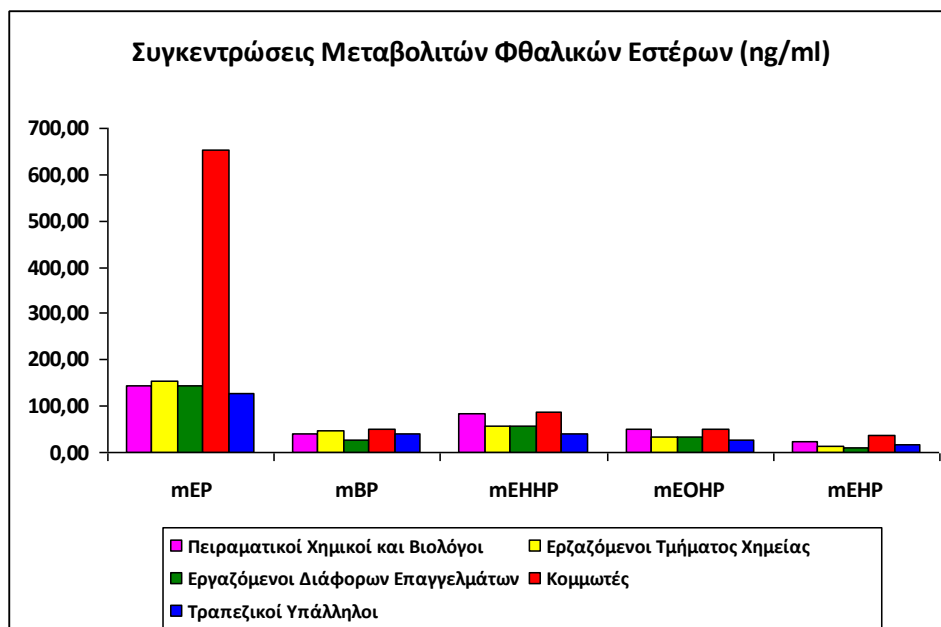
Πίνακας 38: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, στατιστικά στοιχεία των τραπεζικών υπαλλήλων

	Μέσος όρος (μg/g)	Τυπική απόκλιση (μg/g)	Διάμεσος (μg/g)	Γεωμετρικός μέσος (μg/g)
mEP	92,26	91,09	64,30	55,80
mBP	24,65	12,87	20,37	21,90
mEHHP	27,26	17,96	22,10	22,51
mEOHP	16,81	8,78	15,35	14,96
mEHP	12,25	6,90	10,60	10,82

Συνολικά, τα mEP, mEHHP, mEOHP, mEHP ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα, το mBP ποσοτικοποιήθηκε στο 77% των συνολικών δειγμάτων, ενώ το mNP δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα.

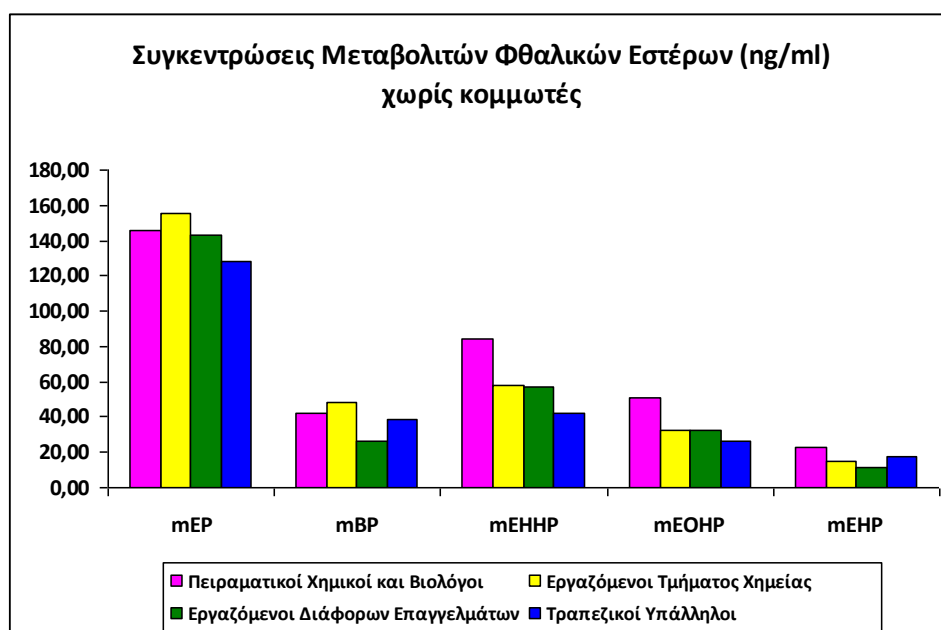
3.6 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Οι συγκεντρώσεις των φθαλικών μεταβολιτών των δειγμάτων φαίνονται στο Σχήμα 12.



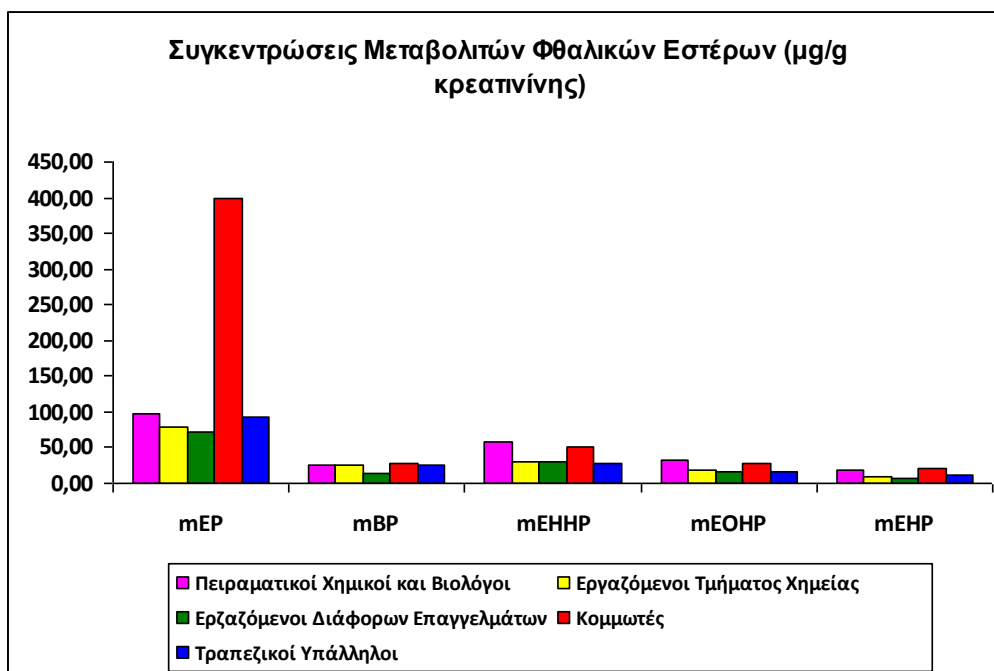
Σχήμα 12: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών φθαλικών εστέρων σε ng/ml όλων των δειγμάτων

Όμως για μια πιο ξεκάθαρη εικόνα της ποιοτικής κατανομής των φθαλικών μεταβολιτών θα ήταν χρήσιμο να αφαιρεθούν οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που βρέθηκαν στους κομμωτές, οι οποίοι έχουν πολύ μεγάλη έκθεση σε φθαλικούς εστέρες συγκριτικά με τις υπόλοιπες κατηγορίες (Σχήμα 13).

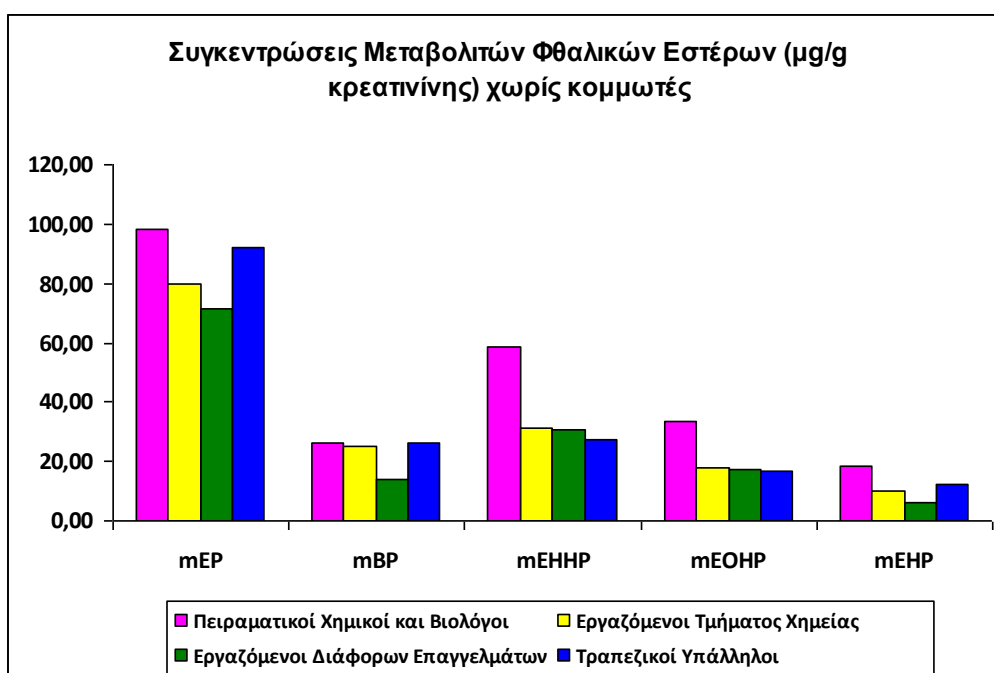


Σχήμα 13: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών φθαλικών εστέρων σε ng/ml χωρίς τα δείγματα των κομμωτών

Όπως όμως αναφέρθηκε στην προηγούμενη υποενότητα είναι απαραίτητο να μετρηθεί η κρεατινίνη των ούρων σε κάθε δείγμα, ώστε να απαλειφθούν οι διαφορές που οφείλονται στην διαφορετική πυκνότητα των ούρων. Οπότε οι νέες συγκεντρώσεις με και χωρίς τους κομμωτές φαίνονται στα Σχήματα 14 και 15 αντίστοιχα.



Σχήμα 14: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών φθαλικών εστέρων όλων των δειγμάτων σε μg/g κρεατινίνης



Σχήμα 15: Συγκεντρώσεις μεταβολιτών φθαλικών εστέρων χωρίς τα δείγματα των κομμωτών σε μg/g κρεατινίνης

3.7 Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στις Διάφορες Ομάδες

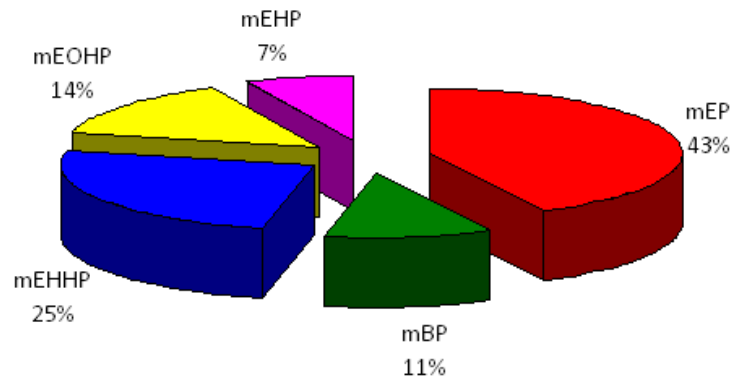
Όπως φαίνεται και στα παρακάτω διαγράμματα η κατανομή των φθαλικών μεταβολιτών στις διάφορες ομάδες είναι παρόμοια. Ο μεταβολίτης που κυριαρχεί σε όλες τις ομάδες είναι το mEP, λόγω της αυξημένης χρήσης του DEP στα προϊόντα προσωπικής φροντίδας και στα καλλυντικά. Επίσης λόγω του μικρού μοριακού βάρους, το DEP είναι πολύ πτητικό με αποτέλεσμα να υπάρχει στην ατμόσφαιρά σε μεγάλες ποσότητες και μέσω εισπνοής να περνάει στον άνθρωπο. Στους κομμωτές ιδίως το mEP κυριαρχεί σε ποσοστό 76%, γεγονός που επιβεβαιώνει τις αρχικές υποψίες ότι οι κομμωτές έχουν μεγαλύτερη έκθεση σε DEP το οποίο βρίσκεται στις βαφές, στα σαμπουάν, στις κρέμες και στις λακ.

Οι μεταβολίτες του DEHP, mEHP, mEHHP και mEOHP βρίσκονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά με αυτό του mEHHP να επικρατεί έναντι των άλλων. Όπως αναφέρεται και στην υποενότητα “1.6.2 DEHP” το DEP αρχικά μεταβολίζεται σε mEHP και στη συνέχεια μέσω διαφόρων αντιδράσεων σε mEOHP και mEHHP. Όμως ο αρχικός μεταβολίτης αντιπροσωπεύει μόνο το 10% του αρχικού DEHP και είναι λιγότερο ανθεκτικός από του δύο δευτερεύοντες μεταβολίτες. Άρα είναι αναμενόμενο το mEHP να έχει το μικρότερο ποσοστό στις διάφορες ομάδες.

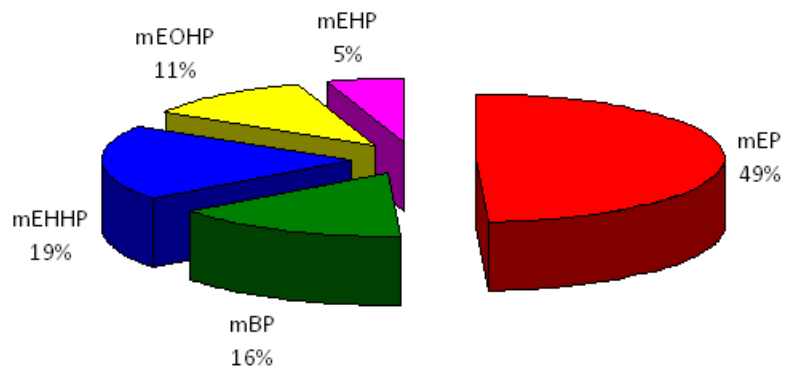
Το mBP βρίσκεται σε αρκετά χαμηλά ποσοστά σε όλες τις ομάδες σε σχέση με τους δευτερεύοντες μεταβολίτες του DEHP, αφού το DBP χρησιμοποιείται λιγότερο στην βιομηχανία σε σχέση με το DEHP.

Όσον αφορά το mNP δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα. Όπως αναφέρθηκε και στη υποενότητα “1.6.3 DiNP” το mNP δεν είναι κατάλληλος βιοδείκτης έκθεσης σε DiNP αφού στους ανθρώπους εκκρίνεται στα ούρα με τη μορφή των δευτερεύοντων μεταβολιτών του, όπως προέκυψε από διάφορες έρευνες.

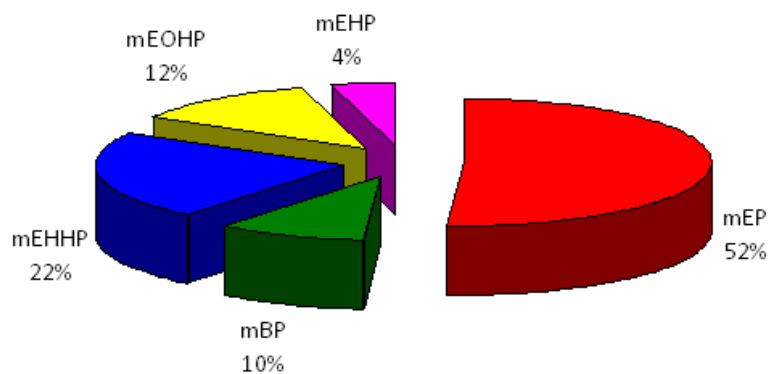
3.7.1 Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Πειραματικούς Χημικούς και Βιολόγους



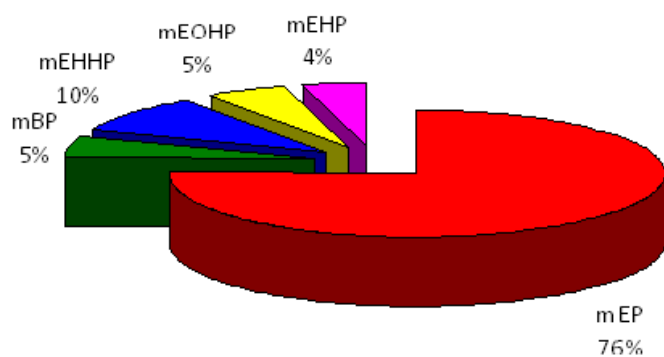
3.7.2 Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Εργαζόμενους Τμήματος Χημείας



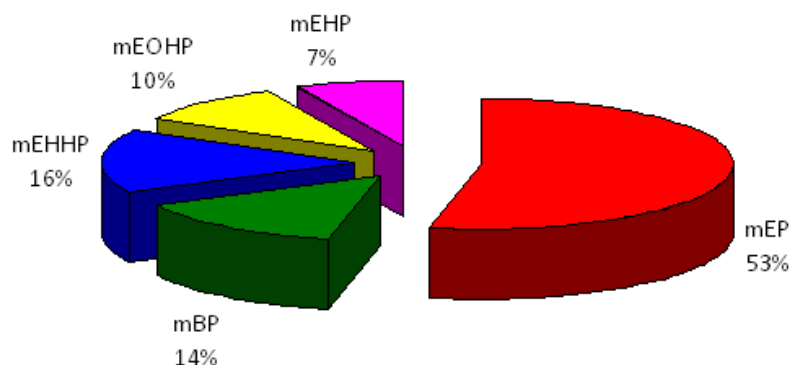
3.7.3 Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Εργαζομένους Διαφόρων Επαγγελμάτων



3.7.4 Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Κομμωτές



3.7.5 Κατανομή Φθαλικών Μεταβολιτών στους Τραπεζικούς Υπαλλήλους



3.8 Συγκεντρωτικά Στατιστικά Στοιχεία

Τα στατιστικά στοιχεία από όλα τα δείγματα, στα οποία όμως δεν έχει υπολογιστεί η κρεατινίνη φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 39.

Πίνακας 39: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από όλα τα δείγματα

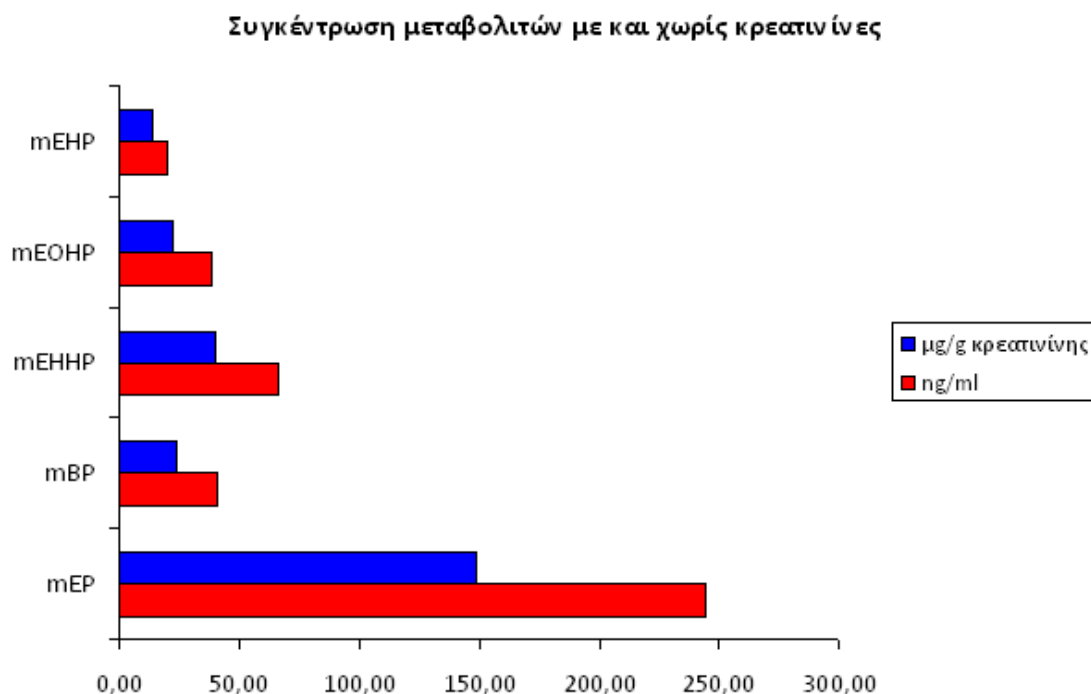
	Μέσος όρος (ng/ml)	Διάμεσος (ng/ml)	Γεωμετρικός μέσος (ng/ml)	Μέσος όρος %
mEP	244,65	103,04	115,91	46,38
mBP	41,70	30,61	32,95	14,25
mEHP	65,34	52,09	49,63	20,89
mEOHP	38,34	31,90	29,31	12,36
mEHP	21,74	18,45	15,73	6,59

Λόγω όμως των διακυμάνσεων της πυκνότητας των ούρων είναι απαραίτητο να μετρηθεί η κρεατινίνη των ούρων ώστε να γίνει διόρθωση τιμών σύμφωνα με τις παραμέτρους αναφοράς. Υπολογίζοντας όμως τις νέες συγκεντρώσεις λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές της κρεατινίνης τα επίπεδα των συγκεντρώσεων είναι αρκετά χαμηλότερα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 40.

Πίνακας 40: Διορθωμένα, ως προς την κρεατινίνη, συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των δειγμάτων

	Μέσος όρος (μg/g)	Διάμεσος (μg/g)	Γεωμετρικός μέσος (μg/g)	Μέσος όρος %
mEP	148,08	62,33	69,75	54,25
mBP	23,61	20,14	19,83	11,32
mEHHP	39,90	27,18	29,87	18,39
mEOHP	22,78	15,46	17,64	10,56
mEHP	13,62	10,60	9,34	5,90

Τα αποτελέσματα φαίνονται συγκριτικά στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16: Συγκριτικά αποτελέσματα συγκεντρώσεων, χωρίς (ng/l) και με τη διόρθωση με την κρεατινίνη (ng/g), των φθαλικών μεταβολιτών σε όλα τα δείγματα

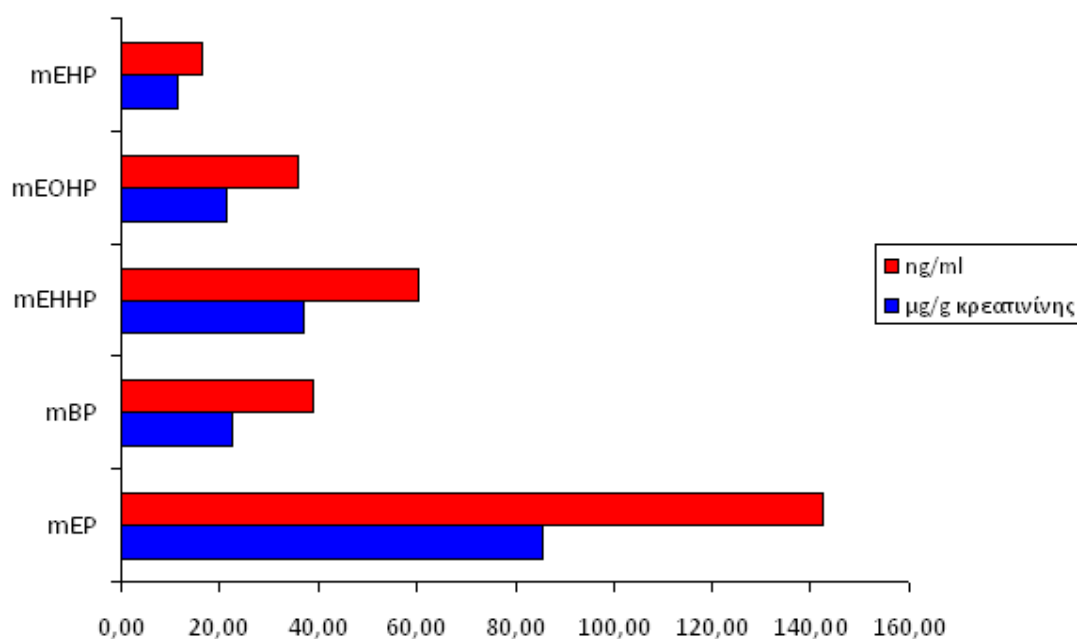
Όπως φαίνεται από το Σχήμα 16 τα επίπεδα του mEP είναι αρκετά μεγαλύτερα από τους υπόλοιπους μεταβολίτες, το οποίο οφείλεται στις αυξημένες συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου μεταβολίτη που εκτίθενται οι κομμωτές.

Αν αφαιρεθούν οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών των κομμωτών από τις υπόλοιπες ομάδες, τα συνολικά αποτελέσματα θα είναι πολύ χαμηλότερα όπως φαίνεται στον Πίνακα 41 και στο Σχήμα 17:

Πίνακας 41: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών σε ng/ml και µg/ κρεατινίνης χωρίς τους κομμωτές

	Μέσος όρος (ng/ml)	Μέσος όρος (µg/g)
mEP	142,91	85,47
mBP	39,30	22,72
mEHHP	60,14	36,93
mEOHP	35,61	21,32
mEHP	18,19	11,66

Μέσος όρος συγκεντρώσεων χωρίς κομμωτές

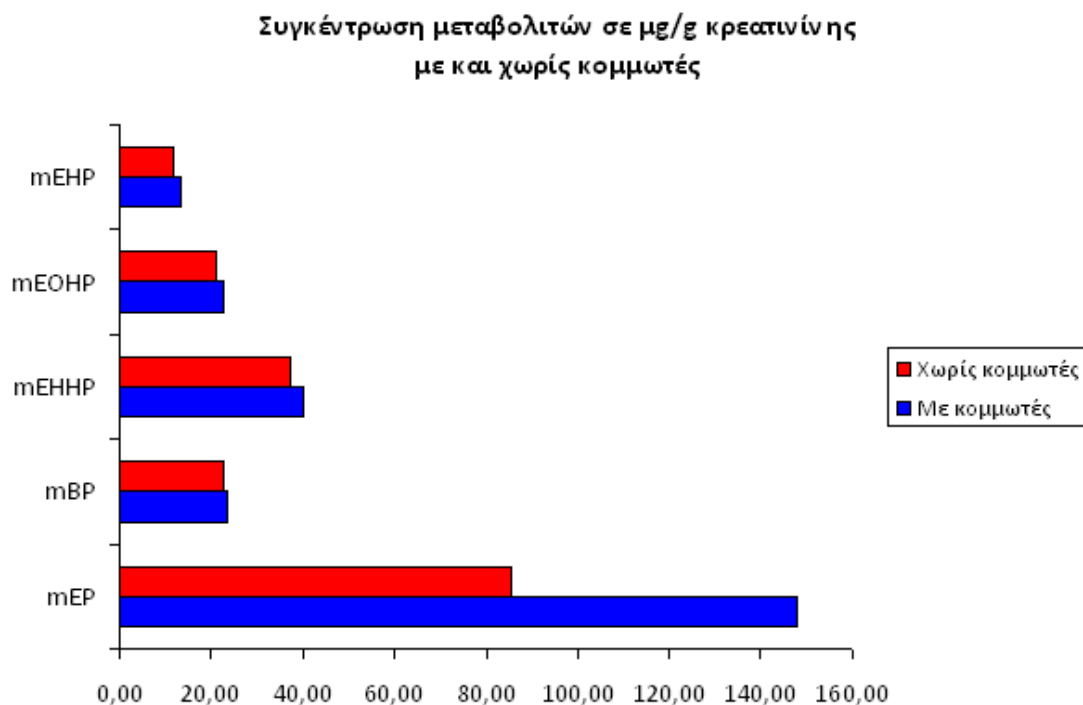


Σχήμα 17: Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών σε ng/ml και µg/g κρεατινίνης χωρίς κομμωτές

Συγκριτικά τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 42 και στο Σχήμα 18.

Πίνακας 42: Συγκριτικά αποτελέσματα συγκεντρώσεων σε $\mu\text{g/g}$ κρεατίνης με και χωρίς κομμωτές

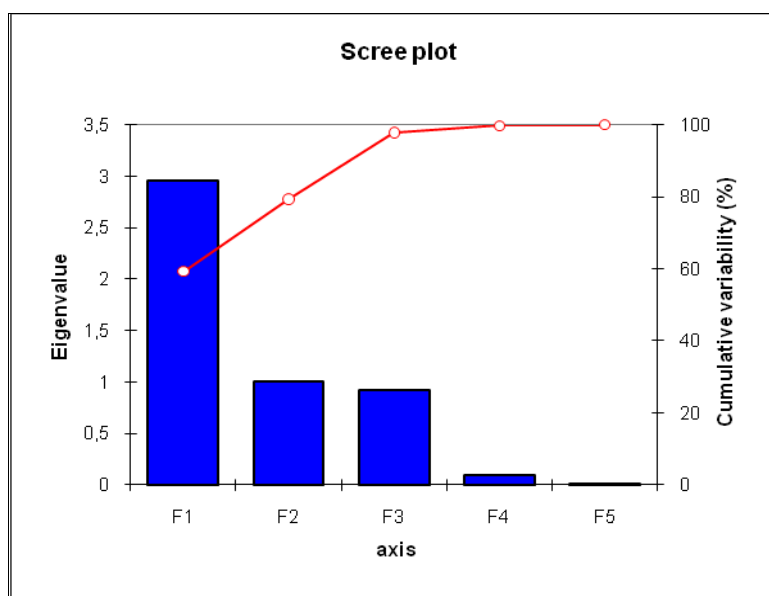
	Συγκέντρωση σε $\mu\text{g/g}$ κρεατίνης με κομμωτές	Συγκέντρωση σε $\mu\text{g/g}$ κρεατίνης χωρίς κομμωτές
mEP	85,47	148,08
mBP	22,72	23,61
mEHHP	36,93	39,90
mEOHP	21,32	22,78
mEHP	11,66	13,62



Σχήμα 18: Συγκριτικά αποτελέσματα σε $\mu\text{g/g}$ κρεατίνης με και χωρίς κομμωτές

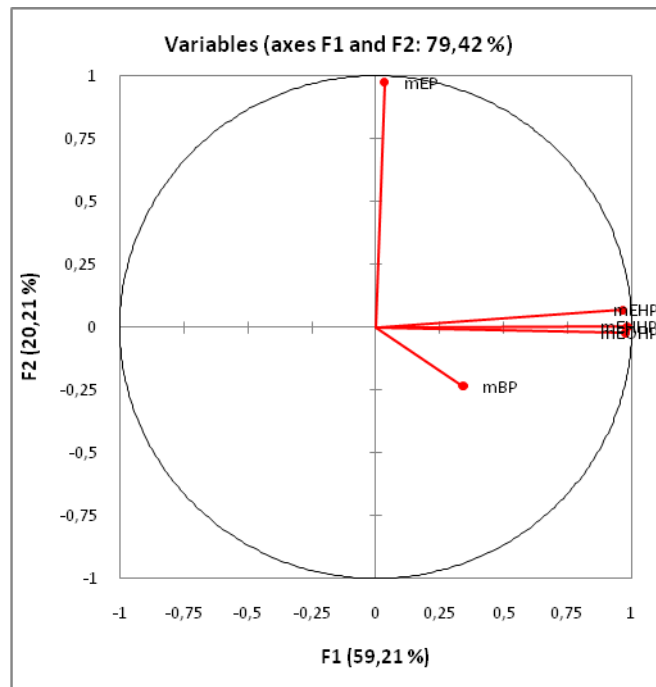
3.9 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA). Όπως φαίνεται από το Σχήμα 19 εξάγονται τρεις συνιστώσες με ιδιοτιμές (eigenvalues) μεγαλύτερες από το 1.

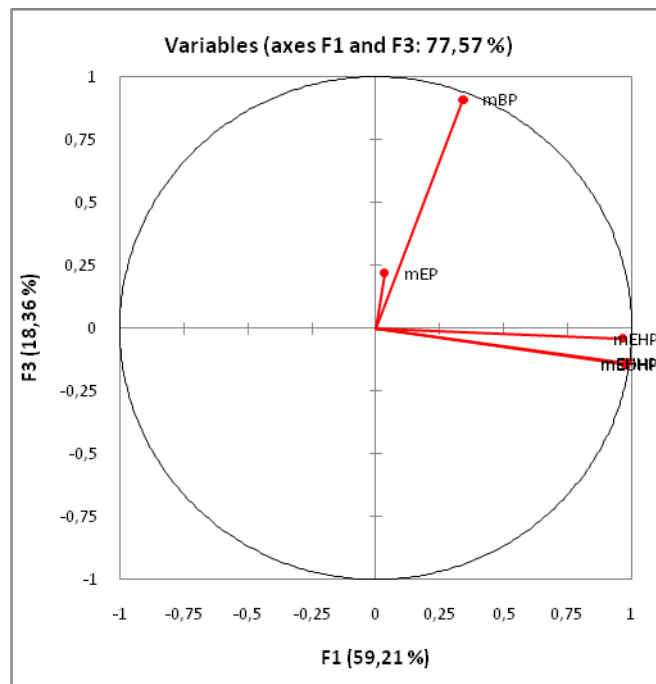


Σχήμα 19: Ιδιοτιμές και συνιστώσες που εξάγονται από την PCA

Από αυτές τις συνιστώσες, οι F1 , F2 και F3 περιγράφουν το 97,75% της ολικής διακύμανσης και είναι αυτές που επιλέχθηκαν να μελετηθούν . Όπως φαίνεται στα Σχήματα 20 και 21 η πρώτη συνιστώσα (Factor 1) έχει θετική συσχέτιση με του τρεις μεταβολίτες του DEHP, η δεύτερη συνιστώσα (Factor 2) επιδρά θετικά στο mEP και η τρίτη συνιστώσα (Factor 3) επιδρά θετικά στο mBP.



Σχήμα 20: Επίδραση των συνιστωσών F1 και F2 στις μεταβλητές



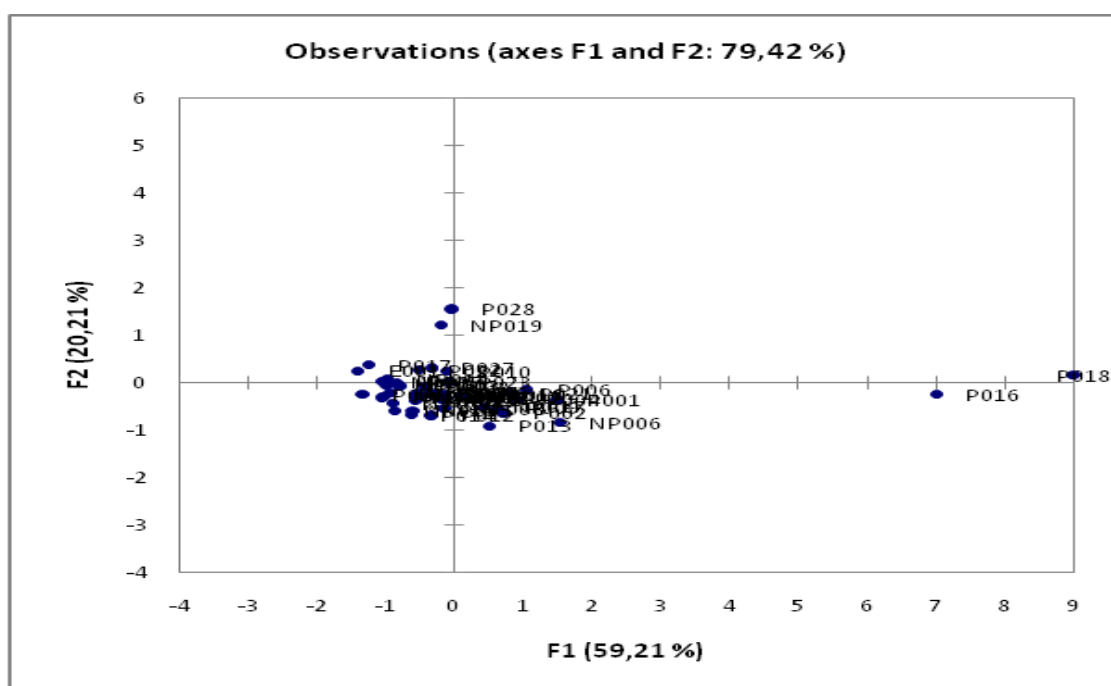
Σχήμα 21: Επίδραση των συνιστωσών F1 και F3 στις μεταβλητές

Στον Πίνακα 43 φαίνονται οι συνεισφορές των τριών μεταβλητών σε κάθε μεταβολίτη ξεχωριστά.

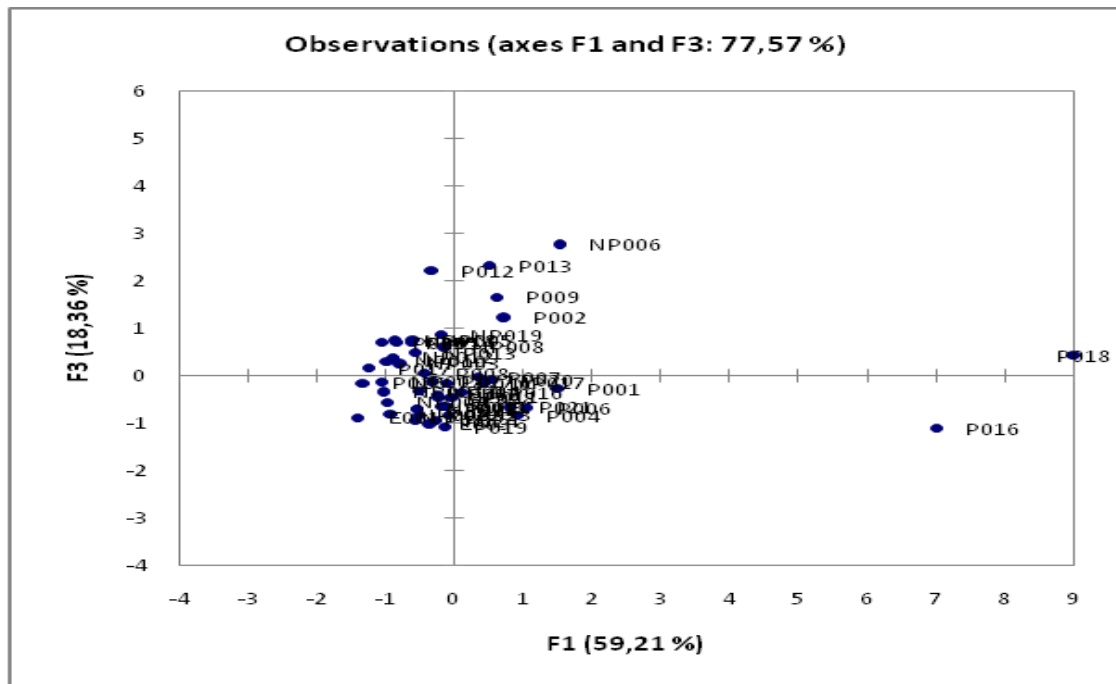
Πίνακας 43: Συνεισφορά % των τριών συνιστωσών σε κάθε φθαλικό μεταβολίτη

	F1	F2	F3
mEP	0,039	94,038	5,225
mBP	3,931	5,449	90,196
mEHHP	32,558	0,000	2,095
mEOHP	32,102	0,046	2,294
mEHP	31,370	0,467	0,190

Στο Σχήμα 22 παρουσιάζεται η προβολή των δεδομένων στις δύο πρώτες συνιστώσες (F1, F2) που είναι αποτέλεσμα της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA) και στο Σχήμα 23 παρουσιάζεται η προβολή των δεδομένων των συνιστωσών F1 και F3. Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια κατηγοριοποίηση των δειγμάτων.



Σχήμα 22: Προβολή των δεδομένων των συνιστωσών F1 και F2 που εξάγονται από την PCA



Σχήμα 23: Προβολή των δεδομένων των συνιστωσών F1 και F3 που εξάγονται από την PCA

3.10 Σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά άλλων εργασιών

Στους Πίνακες 44 και 45 συγκρίνονται η διάμεσος και ο γεωμετρικός μέσος με άλλες μελέτες σε ng/ml και µg/g κρεατινίνης αντίστοιχα. Στα αποτελέσματα από τη συγκεκριμένη μελέτη δεν περιλαμβάνονται τα δείγματα των κομμωτών, οι οποίοι δεν αποτελούν ένα τυπικό δείγμα. Η πρώτη μελέτη [92] περιλαμβάνει την ανάλυση 23 δειγμάτων και η δεύτερη μελέτη [115] ανάλυση 369 δειγμάτων.

Πίνακας 44: Σύγκριση συγκεντρώσεων σε (ng/ml)

Μεταβολίτης	Παρούσα εργασία, Ελλάδα		[92] Γερμανία	[115] Η.Π.Α	
	Διάμεσος	Γεωμετρικός μέσος	Διάμεσος	Διάμεσος	Γεωμετρικός μέσος
mEP	98,35	88,41	N.R	128	149
mBP	35,15	31,53	49,8	13,6	13,3
mEHHP	54,36	46,92	22,7	N.R	N.R
mEOHP	34,17	27,62	15,9	N.R	N.R
mEHP	15,91	14,16	5,1	5,2	5,7

(N.R: Not Reported, Δεν αναλύθηκε ο μεταβολίτης)

Πίνακας 45: Σύγκριση συγκεντρώσεων σε µg/g κρεατινίνης

Μεταβολίτης	Παρούσα εργασία, Ελλάδα		Γερμανία [92]
	Ελλάδα		Γερμανία [92]
	Διάμεσος		Διάμεσος
mEP	54,27		N.R
mBP	20,14		41,4
mEHHP	26,59		18,5
mEOHP	15,41		12,1
mEHP	8,63		4,3

(N.R: Not Reported, Δεν αναλύθηκε ο μεταβολίτης)

Στους Πίνακες 46 και 47 γίνεται σύγκριση διάφορων στατιστικών στοιχείων σε ng/ml και σε µg/g κρεατινίνης.

Πίνακας 46: Σύγκριση στατιστικών στοιχείων σε ng/ml

	Μελέτη	mEP	mBP	mEHP	mEOHP	mEHP
Min	Παρούσα εργασία, [92]	3,00	3,15	8,80	1,35	0,25
	Γερμανία	N.R	24,6	10	7,8	1,8
Max	Παρούσα εργασία, [92]	856,55	144,79	185,03	114,95	58,47
	Γερμανία	N.R	113,7	40,4	26,8	11,8
10° εκατοστημόριο	Παρούσα εργασία, [92]	21,57	13,15	18,68	11,25	1,83
	Γερμανία [115]	N.R	26,5	12,5	9,1	2,4
	Η.Π.Α	22,7	2,9	N.R	N.R	0,5
90° εκατοστημόριο	Παρούσα εργασία, [92]	340,83	82,59	126,48	71,03	36,04
	Γερμανία [115]	N.R	91,6	32,9	24,8	8,9
	Η.Π.Α	1144	50,4	N.R	N.R	63,6
95° εκατοστημόριο	Παρούσα εργασία, [92]	393,58	93,63	148,08	80,94	48,36
	Γερμανία [115]	N.R	103,6	39,9	25,3	9,1
	Η.Π.Α	1879	73,1	N.R	N.R	110

(N.R: Not Reported, Δεν αναλύθηκε ο μεταβολίτης)

Πίνακας 47: Σύγκριση στατιστικών στοιχείων σε µg/g κρεατινίνης

	Μελέτη	mEP	mBP	mEHHP	mEOHP	mEHP
Min	Παρούσα εργασία, [92]	2,54	5,08	8,52	2,70	0,10
	Γερμανία	N.R	22,9	8,7	6,7	1,4
Max	Παρούσα εργασία, [92]	481,74	72,76	298,43	136,14	94,30
	Γερμανία	N.R	86,9	24,4	20,3	7,5
10° εκατοστημόριο	Παρούσα εργασία, [92]	15,06	9,07	13,05	8,73	1,01
	Γερμανία	N.R	29,2	12,3	8,4	2,4
90° εκατοστημόριο	Παρούσα εργασία, [92]	178,98	37,73	66,17	35,83	17,88
	Γερμανία	N.R	72,3	23,6	16,1	6,5
95° εκατοστημόριο	Παρούσα εργασία, [92]	236,91	55,77	74,95	46,01	27,86
	Γερμανία	N.R	73,6	24,3	18,6	7,1

(N.R: Not Reported, Δεν αναλύθηκε ο μεταβολίτης)

Τα παραπάνω στατιστικά στοιχεία παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες αλλά και διαφορές.

Αρχικά, ο μεταβολίτης MEP στην παρούσα εργασία εμφανίζει λίγο μικρότερη διάμεσο τιμή από ότι στην μελέτη [115], ενώ η διάμεσος του κύριου μεταβολίτη του DBP, του mBP βρίσκεται ανάμεσα στις δύο μελέτες. Όσον αφορά τους τρεις μεταβολίτες του DEHP, τα mEHP, mEHHP και mEOHP εμφανίζουν λίγο υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τις άλλες μελέτες. Παρόμοια τάση εμφανίζεται και για τον γεωμετρικό μέσο.

Στον Πίνακα 45 όμως όπου έχει γίνει διόρθωση των τιμών σύμφωνα με τις τιμές της κρεατινίνης, τα επίπεδα των συγκεντρώσεων πλησιάζουν πολύ τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που παρατηρήθηκαν στην Γερμανία.

Στον Πίνακα 46 παρατηρούμε ότι οι ελάχιστες συγκεντρώσεις σε ng/ml που ανιχνεύθηκαν σε αυτή την εργασία είναι σε λίγο πιο χαμηλά επίπεδα από ότι στην Γερμανία αντίθετα με τις μέγιστες τιμές που παρατηρήθηκαν οι οποίες είναι πολύ πιο υψηλές από ότι στην Γερμανία. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην διαφορά του αριθμού των δειγμάτων που αναλύθηκαν σε κάθε εργασία, αφού στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν 81 δείγματα και στην Γερμανία 23.

Αυτό επιβεβαιώνεται και από την σύγκριση των τιμών με χρήση εκατοστημορίων. Οι τρεις έρευνες διαφέρουν σημαντικά στον αριθμό των δειγμάτων. Οι ελάχιστες τιμές που παρατηρούνται καθώς και οι τιμές στα χαμηλά εκατοστημόρια κυμαίνονται στα ίδια

επίπεδα. Όμως οι μέγιστες τιμές καθώς και οι τιμές στα υψηλά εκατοστημόρια, τα οποία αντιπροσωπεύουν τις υψηλές συγκεντρώσεις κάθε μελέτης, έχουν μεγάλες διαφορές. Αναλύοντας λίγα δείγματα, η πιθανότητα εύρεσης κάποιας ακραίας τιμής είναι αρκετά χαμηλότερη από ότι αναλύοντας μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Έτσι, για παράδειγμα, στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Γερμανία, η συγκέντρωση του mEHP που παρατηρείται στο 95^ο εκατοστημόριο είναι 6,5ng/ml, στην παρούσα εργασία είναι 48,36 ng/ml και στις Η.Π.Α. είναι 110 ng/ml.

Συμπερασματικά, οι τιμές της διαμέσου και του γεωμετρικού μέσου των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών σε ng/ml δεν διαφέρουν πολύ και η διαφορά αυτή μειώνεται ακόμα περισσότερο όταν γίνεται υπολογισμός των συγκεντρώσεων χρησιμοποιώντας τις τιμές της κρεατινίνης, οπότε και απαλείφονται οι διαφορές που οφείλονται στην πυκνότητα των ούρων.

Μεγάλες διαφορές εμφανίζονται στις μέγιστες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα εργασία σε σύγκριση με την πρώτη μελέτη. Οι τρεις κύριοι μεταβολίτες του DEHP εμφανίζουν πολλαπλάσια συγκέντρωση στην παρούσα εργασία, ενώ οι ελάχιστες συγκεντρώσεις είναι παρόμοιες.

Συμπεράσματα

- ❖ Τα δείγματα ούρων που αναλύθηκαν είχαν παρόμοιες κατανομές φθαλικών μονοεστέρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκθεση σε φθαλικούς διεστέρες είναι παρόμοια για τις διαφορετικές κατηγορίες εθελοντών.
- ❖ Από την ανάλυση κυρίων συνιστωσών αποδεικνύεται ότι οι πηγές έκθεσης σε φθαλικούς εστέρες είναι οι ίδιες για όλες τις κατηγορίες των εθελοντών.
- ❖ Η κατηγορία των κομμωτών αποδείχθηκε ότι εκτίθενται σε μεγάλες ποσότητες του φθαλικού διεστέρα DEP. Η αυξημένη έκθεση μπορεί να οφείλεται στην εισπνοή και την δερματική επαφή με το ιδιαίτερα πτητικό DEP, αφού οι κομμωτές έρχονται σε συνεχή επαφή με προϊόντα τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες του συγκεκριμένου φθαλικού.
- ❖ Οι πειραματικοί χημικοί και βιολόγοι έχουν διπλάσια έκθεση σε DEHP από τις υπόλοιπες ομάδες, γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη χρήση πλαστικών και διαλυτών στα ερευνητικά εργαστήρια καθώς και στους πάγκους εργασίας, οι οποίοι περιέχουν PVC.
- ❖ Υπάρχουν πολύ μεγάλες διακυμάνσεις στα επίπεδα του mEP, οι οποίες οφείλονται στην προσωπική έκθεση του εκάστοτε εθελοντή σε DEP, το οποίο περιέχεται σε προϊόντα προσωπικής υγιεινής και φροντίδας. Εξάιρεση αποτελεί η κατηγορία των κομμωτών, των οποίων η έκθεση στον συγκεκριμένο φθαλικό εστέρα οφείλεται και στον εργασιακό τους χώρο.
- ❖ Το mNP δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σαν βιοδείκτης αφού έρευνες έχουν αποδείξει, όπως και η συγκεκριμένη μελέτη, ότι δεν ανιχνεύεται στα ούρα. Το DiNP εκκρίνεται στα ούρα με τη μορφή των δευτερευόντων μεταβολιτών του.
- ❖ Το DEHP εκκρίνεται στα ούρα με τη μορφή του αρχικού μεταβολίτη του, mEHP και με τη μορφή των δευτερευόντων μεταβολιτών mEHHP και mEOHP. Κατάλληλοι βιοδείκτες όμως για την έκθεση σε DEHP, είναι οι δευτερεύοντες μεταβολίτες που έχουν μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής και είναι ταυτόχρονα πιο ανθεκτικοί.

Παράλληλα το mEHP αντιπροσωπεύει μόνο το 10% του συνολικού DEHP και μπορεί να σχηματιστεί και από άλλες διαδικασίες καθιστώντας έτσι ρυπαντή από μόνο του.

- ❖ Λόγω της μεταβολής της πυκνότητας των ούρων στους διάφορους εθελοντές είναι απαραίτητο να μετρηθεί η κρεατινίνη των ούρων ώστε να γίνει διόρθωση τιμών σύμφωνα με τις παραμέτρους αναφοράς.
- ❖ Είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη των επιπτώσεων της έκθεσης σε φθαλικούς διεστέρες στους ανθρώπους αφού οι επιπτώσεις τους δεν είναι σαφείς.

4 Βιβλιογραφία

¹ 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.

² ATSDR. Toxicological profile for di-n-octylphthalate, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 1997.

³ 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.

⁴ 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.

⁵ Blount BC, Milgram KE, Silva MJ, et al. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* 2000;72:4127–34.

⁶ Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, et al. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect* 2000;108:972–82.

⁷ Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR). NTP-CERHR Expert Panel Report on Di(2-ethylhexyl) Phthalate. Alexandria, VA: Science International, Inc., 2000.

⁸ National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTP-CERHR Expert Panel Report on Di(2-Ethylhexyl) Phthalate. Alexandria, VA: Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, US Department of Health and Human Services; 2000. Available at: <http://cerhr.niehs.nih.gov/news/index.html>. Accessed March 27, 2003.

⁹ Hauser R, Duty S, Godfrey-Bailey L, Calafat AM. Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environ Health Perspect* 2004;112:751–3.

¹⁰ 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.

¹¹ 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.

¹² 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>.

¹³ Wams, T.J.U., Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant – a review. *Sci. Tot. Environ.* 1987, 66, 1–16

- ¹⁴ ECPI (European Council for Plasticizers and Intermediates), 2004. Personal communication between D.F. Cadogan, Director of ECPI secretariat Brussels, and H.N. Koch researcher at the University of Nuremberg-Erlangen, March 2004.
- ¹⁵ Müller, A. K., Nielsen, E., Ladefoged, O., Human exposure to selected phthalates in Denmark, The Danish Veterinary and Food Administration, *FødevareRapport 2003*, 15 (1st Edition), 1–156, <http://www.foedevarestyrelsen.dk/Fdir/Publications/2003015/Rapport.pdf>.
- ¹⁶ Yalkowsky, S.H., S. Banerjee. *Aqueous Solubility- Methods of Estimation for Organic Compounds*, Marcel Dekker, Inc. New York, 1992, 264 pp.
- ¹⁷ Yalkowsky, S.H., S. Banerjee. *Aqueous Solubility- Methods of Estimation for Organic Compounds*, Marcel Dekker, Inc. New York, 1992, 264 pp.
- ¹⁸ 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.* 4(5): 1985, 653-661.
- ¹⁹ Meylan, W. M., P. H. Howard. 1995. User's Guide for EPIWIN, Syracuse Research Corporation, Syracuse, NY, USA.
- ²⁰ DeBruijn, J., J. Hermens. Determination of Kow's for Hydrophobic Organic Chemicals with the Slow Stirring Method. *Environ. Toxicol. Chem.* 1989, 8(6): 499-512.
- ²¹ Brooke, D., I. Nielsen, J. DeBruijn, J. Hermens.. An Interlaboratory Evaluation of the Stir-Flask Method for the Determination of Octanol-Water Partition Coefficients (Log Pow). *Chemosphere* 1990, 21(1/2):119-133
- ²² Ellington, J.J., T. Floyd. In Press. Octanol/Water Partition Coefficients of Eight Phthalate Esters. U.S. Environmental Protection Agency, Athens, Georgia.
- ²³ Long, J.M.. SPARC Estimations of Kow's and Solubilities for a Series of Phthalate Esters. Personal communication. U.S. Environmental Protection Agency, NERL, Athens, Georgia. 1995
- ²⁴ NTP-CERHR, 2000. NTP-CERHR expert panel report on di(2-ethylhexyl) phthalate. NTP-CERHR-DEHP.
- ²⁵ NTP-CERHR, 2003a. Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-isononyl phthalate (DINP). NIH Publ No. 03-4484.
- ²⁶ NTP-CERHR, 2003b. Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-isodecyl phthalate (DIDP). NIH Publ No. 03-4485.
- ²⁷ NTP-CERHR, 2003c. Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-butyl phthalate (DBP). NIH Publ No. 03-4486.
- ²⁸ NTP-CERHR, 2003d. Monograph on the potential human reproductive and developmental effects butyl benzyl phthalate (BBP). NIH Publ No. 03-4487.

- ²⁹ NTP-CERHR, 2003e. Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-octyl phthalate (DnOP). NIH Publ No. 03-4488.
- ³⁰ NTP-CERHR, 2003f. Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-hexyl phthalate (DnHP). NIH Publ No. 03-4489.
- ³¹ NTP-CERHR, 2005. Expert panel re-evaluation of DEHP, Meeting summary, October 14, 2005, /www.noharm.org/ details.cfm?ID=1130&type=documentS.
- ³² IARC (International Agency for Research on Cancer), 2000. Some industrial chemicals. IARC Monographs 77, 41–148.
- ³³ CSTE (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment), 1998a. Phthalate migration from soft PVC toys and child-care articles. Opinion expressed at the CSTE third plenary meeting, Brussels, April 24, 1998.
- ³⁴ CSTE, Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment, 2004. Opinion on the results of a second risk assessment of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human health part. Adopted by the CSTE during the 41th Plenary Meeting of 8 January 2004.
- ³⁵ IRIS, 2001. Integrated Risk Information System: di(2-ethylhexyl) phthalate, /http://www.epa.gov/subst/0014.htmS.
- ³⁶ US FDA (US Food and Drug Administration), 2000. Indirect food additives: adhesives and components of coatings adhesives, /http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx-00/21cfr175-00.htmlS.
- ³⁷ US FDA (US Food and Drug Administration), 2003. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD <http://www.access-data.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>.
- ³⁸ Page, B.D., Lacroix, G.M., The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985–1989: a survey. *Food Addit. Contam.* 1995, 12, 129–151.
- ³⁹ Petersen, J.H., Breindahl, T., Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit. Contam.* 2000, 17, 133–141.
- ⁴⁰ Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Saito, I., Sakai, H., Kobayashi, Y., Tonogai, Y.,. Eleven phthalate esters and di(2- ethylhexyl) adipate in one-week duplicate diet samples obtained from hospitals and their estimated daily intake. *Food Addit. Contam.* 2001, 18, 449–640.
- ⁴¹ Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Saito, I., Sakai, H., Tsuchida, Y., Tonogai, Y., Estimated daily intake of plasticizers in 1-week duplicate diet samples following regulation of DEHP-containing PVC gloves in Japan. *Food Addit. Contam.* 2003, 20, 317–334.
- ⁴² 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 (Indoor Air 02) 4*, 2002, 883–887.

- ⁴³ Fromme, H., Lahrz, T., Piloty, M., Gebhart, H., Oddoy, A., Rüdten, H., Occurrence of phthalates and musk fragrances in indoor air and dust from apartments and kindergartens in Berlin (Germany). *Indoor Air* 14, 2004, 188–195.
- ⁴⁴ Kersten, N.E., Reich, T., 2003. Schwer flüchtige organische Umweltchemikalien in Hamburger Hausstäuben. *Gefahrst. Reinh. Luft* 63, 85–91.
- ⁴⁵ Pöhlner, A., Simrock, S., Thumulla, J., Weber, S., Wirkner, T., 1998. Hintergrundbelastung des Hausstaubs von Privathaushalten mit mittel- und schwerflüchtigen organischen Schadstoffen. *Z. Umweltmed.* 6, 337–345.
- ⁴⁶ Holstrup, O., Butte, W., 2001. Endocrin Wirksame Xenobiotika in Haushalten. Konzentrationen in der Luft und im Hausstaub. Bericht im Auftrag des Niedersächsischen Ministeriums für Frauen, Arbeit und Soziales, Oldenburg.
- ⁴⁷ Sheldon, L., Whitaker, D., Keever, J., Clayton, A., Perritt, R., 1993. Phthalates and PAHs in indoor and outdoor air in a southern California community. In: *Proceedings of Indoor Air 93*, vol. 3.
- ⁴⁸ COM, European Commission, 1999. *Official Journal L 315*, 09/12/1999, pp. 46–49.
- ⁴⁹ 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.
- ⁵⁰ Schettler, T., Human exposure to phthalates via consumer products. *Int. J. Androl.* 2006, 29, 134–139 discussion 181–5.
- ⁵¹ Meek, M.E., Chan, P.K.L., Bis(2-ethylhexyl)phthalate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *J. Environ. Sci. Health Part C* 1994, 12, 179–194.
- ⁵² Calafat, A. M., Ye, X., Silva, M. J., Kuklenyik, Z., et al., Human exposure assessment to environmental chemicals using biomonitoring, *Int. J. Androl.* 2006, 29, 166–171.
- ⁵³ 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.
- ⁵⁴ 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.
- ⁵⁵ 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.
- ⁵⁶ 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.
- ⁵⁷ Albro, P. W., Moore, B., Identification of the metabolites of simple phthalate diesters in rat urine, *J. Chromatogr.* 1974, 94, 209–218.

- ⁵⁸ 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.
- ⁵⁹ 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.
- ⁶⁰ 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.
- ⁶¹ 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.
- ⁶² 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.
- ⁶³ Koch, H. M., Bolt, H. M & Angerer, J. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium labelled DEHP. *Archives of Toxicology* 2004c, 78, 123–130.
- ⁶⁴ Wolfe, G. W. & Layton, K. A. Multigeneration Reproduction Toxicity Study in Rats (unaudited draft): Diethylhexylphthalate: Multigenerational Reproductive Assessment by Continuous Breeding when Administered to Sprague–Dawley Rats in the Diet. TherImmune Research Corporation, Gaithersburg, MD, USA, TRC Study No. 2003 7244-200.
- ⁶⁵ Silva, M. J., Kato, K., Wolf, C., Samandar, E., et al., Urinary biomarkers of di-isononyl phthalate in rats, *Toxicology* 2006, 223, 101–112.
- ⁶⁶ 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.
- ⁶⁷ Koch, H. M., Muller, J., Angerer, J., Determination of secondary, oxidised di-isononylphthalate (DINP) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial DINP plasticizers, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol Biomed. Life Sci.* 2007, 847, 114–125.
- ⁶⁸ 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.
- ⁶⁹ 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>.
- ⁷⁰ 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.

- ⁷¹ 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.
- ⁷² 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.
- ⁷³ 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.
- ⁷⁴ Parks, L. G., Ostby, J. S., Lambright, 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.
- ⁷⁵ 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.
- ⁷⁶ 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.
- ⁷⁷ 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.
- ⁷⁸ Skakkeby, N. E., Jørgensen, N., Main, K. M., Rajpert-De Meyts, E., et al., Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* 2006, 29, 2–11.
- ⁷⁹ 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.
- ⁸⁰ 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.
- ⁸¹ 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.
- ⁸² 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.
- ⁸³ 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.

- ⁸⁴ 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.
- ⁸⁵ 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.
- ⁸⁶ 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.
- ⁸⁷ 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.
- ⁸⁸ 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.
- ⁸⁹ 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.
- ⁹⁰ McKee, R. H., Butala, J. H., David, R. M., Gans, G., NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: Addressing the data gaps, *Reprod. Toxicol.* 2004, 18, 1–22.
- ⁹¹ Hauser, R., Calafat, A. M., Phthalates and human health, *Occup. Environ. Med.* 2005, 62, 806–818.
- ⁹² Fromme, H., Bolte, G., Koch, H. M., Angerer, J., et al., Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2007, 210, 21–33.
- ⁹³ Fabjan, E., Hulzebos, E., Mennes, W., Piersma, A. H., A category approach for reproductive effects of phthalates, *Crit. Rev. Toxicol.* 2006, 36, 695–726.
- ⁹⁴ Koch, H. M., Becker, K., Wittassek, M., Seiwert, M., et al., Di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalate – urinary metabolite levels and estimated daily intakes: Pilot study for the German Environmental Survey on children, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 2006, DOI: 10.1038/sj.jes.7500526.
- ⁹⁵ Albro, P.W., Tondeur, I., Marbury, D., Jordan, S., et al., Polar metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the rat, *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 760, 283–292.
- ⁹⁶ 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.
- ⁹⁷ Mose, T., Mortensen, G. K., Hedegaard, M., Knudsen, L. E., Phthalate monoesters in perfusate from a dual placenta perfusion system, the placenta tissue and umbilical cord blood, *Reprod. Toxicol.* 2006, 23, 83–91.

- ⁹⁸ Latini, G., De Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A., et al., Exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report, *Biol. Neonate* 2003, 83, 22–24.
- ⁹⁹ Calafat, A. M., Needham, L. L., Silva, M. J., Lambert, G., Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit, *Pediatrics* 2004, 113, e429 –e434.
- ¹⁰⁰ 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.
- ¹⁰¹ 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.
- ¹⁰² Fennell, T. R., Krol, W. L., Sumner, S. C., Snyder, R. W., Pharmacokinetics of dibutylphthalate in pregnant rats, *Toxicol. Sci.* 2004, 82, 407–418.
- ¹⁰³ 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.
- ¹⁰⁴ 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.
- ¹⁰⁵ Zhu, J., Phillips, S. P., Feng, Y. L., Yang, X., Phthalate esters in human milk: Concentration variations over a 6-month postpartum time, *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 5276 –5281.
- ¹⁰⁶ 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.
- ¹⁰⁷ Giust, J. A., Seipelt, C. T., Anderson, B. K., Deis, D. A., et al., Determination of bis(2-Ethylhexyl) phthalate in cows milk and infant formula by high-performance liquid-chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 415 –418.
- ¹⁰⁸ Sorensen, L. K., Determination of phthalates in milk and milk products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20, 1135 – 1143.
- ¹⁰⁹ 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.
- ¹¹⁰ Latini, G., De Felice, C., Verrotti, A., Plasticizers, infant nutrition and reproductive health, *Reprod. Toxicol.* 2004, 19, 27–33.
- ¹¹¹ 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.

¹¹² 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.

¹¹³ 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.

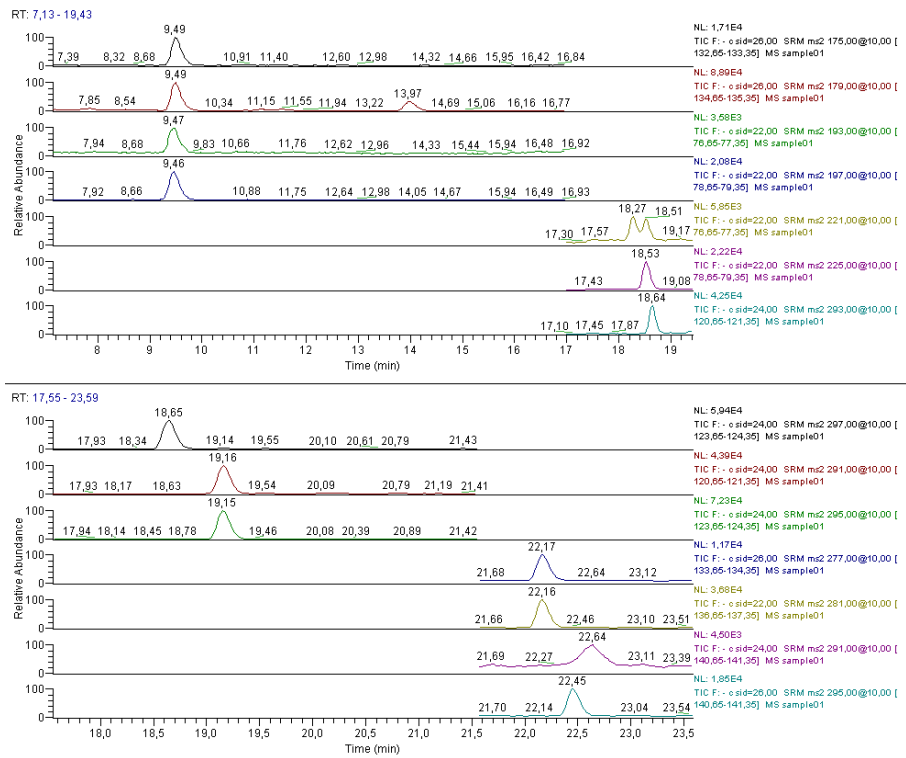
¹¹⁴ Method 300.1: Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography, Revision 1.0, National Exposure Research Laboratory, Office Of Research And Development, U.S. Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268.

¹¹⁵ Hauser R., Meeker J.D., Park S., M.J. Silva, Calafat A.M., Temporal Variability of Urinary Phthalate Metabolite Levels in Men of Reproductive Age, Environ. Health Perspect, 2004,117,1734-1740

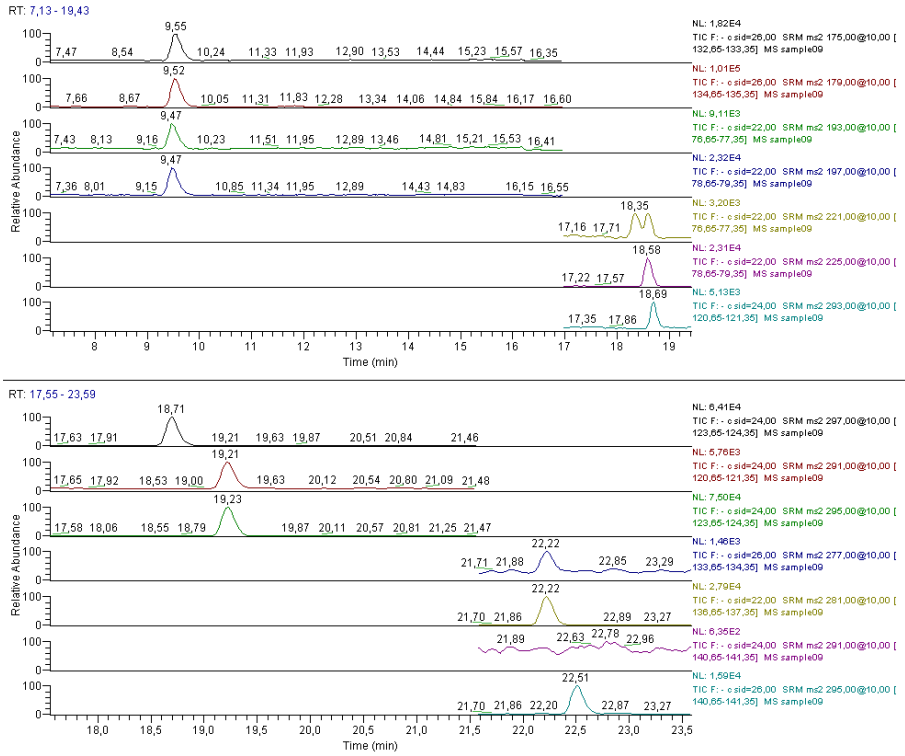
6 Παράρτημα I

Χρωματογραφήματα

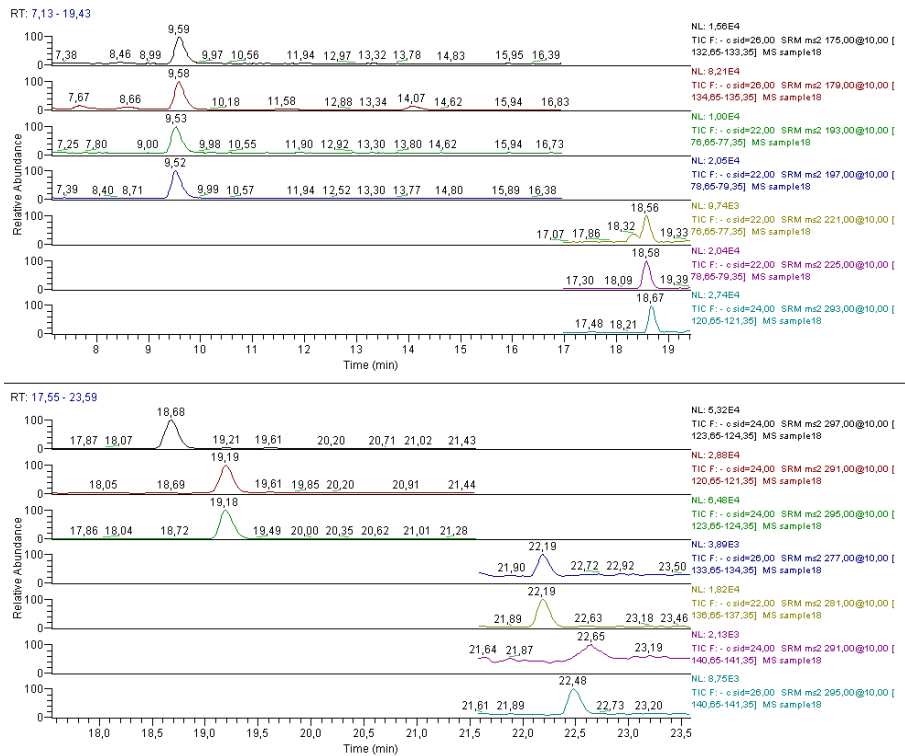
Δείγμα P001



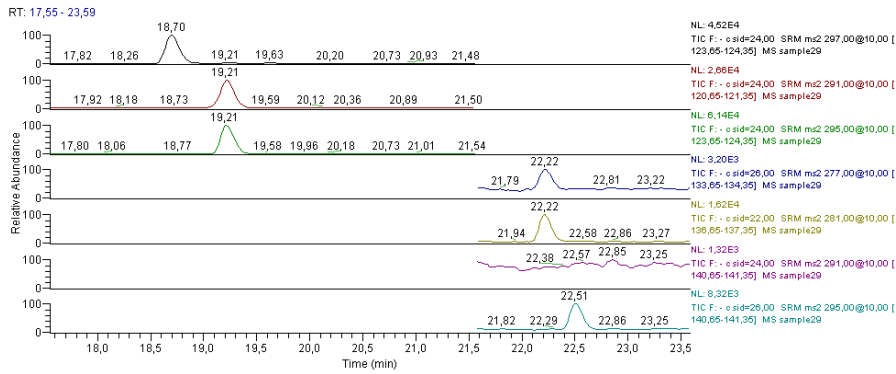
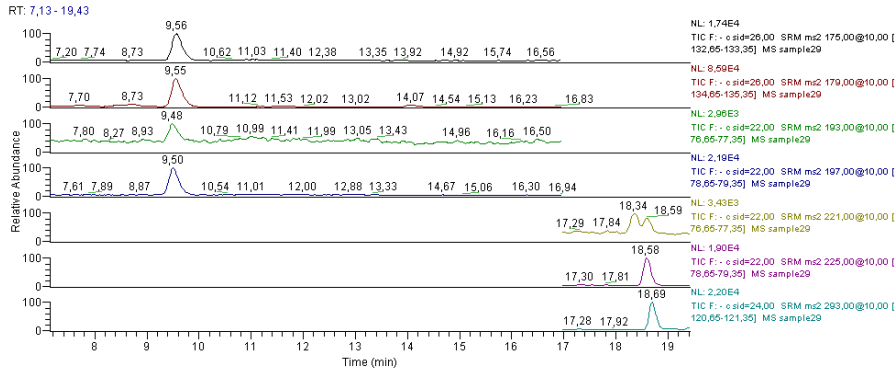
Δείγμα P005



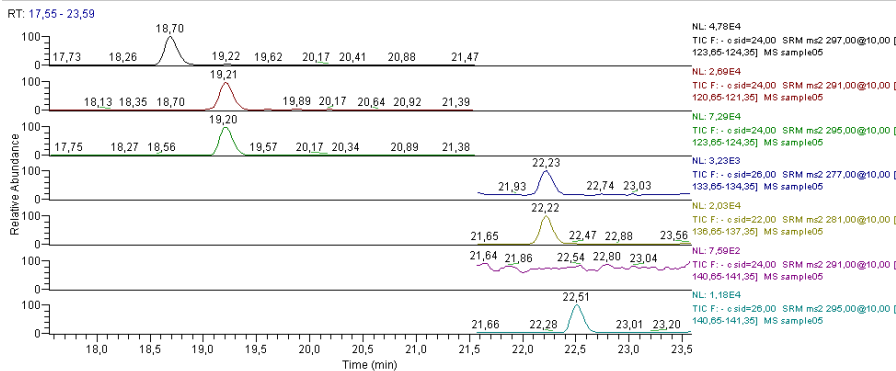
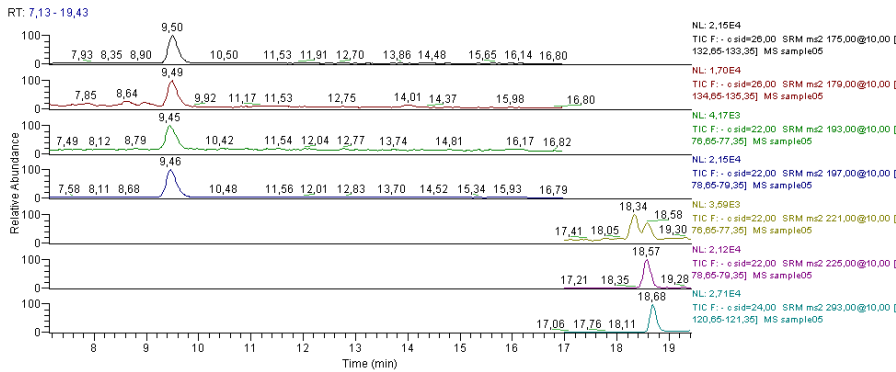
Δείγμα P009



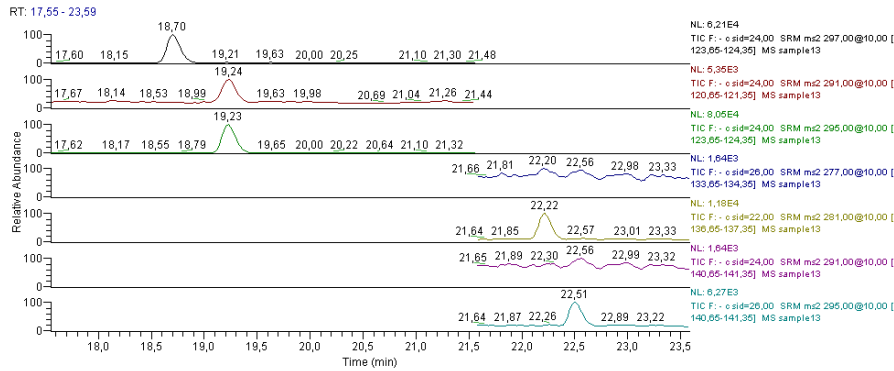
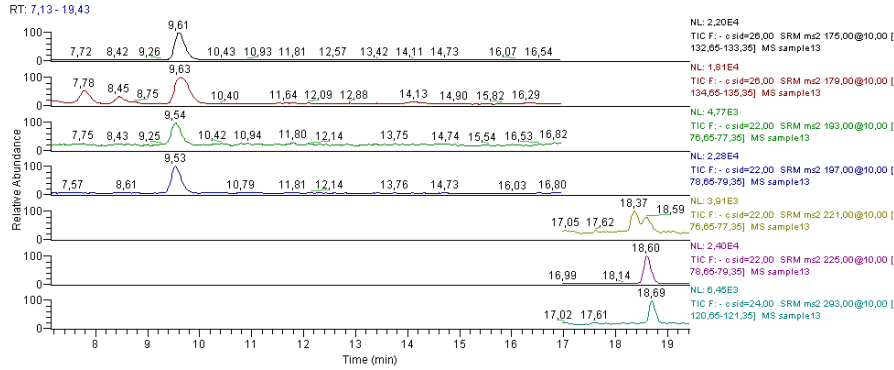
Δείγμα P015



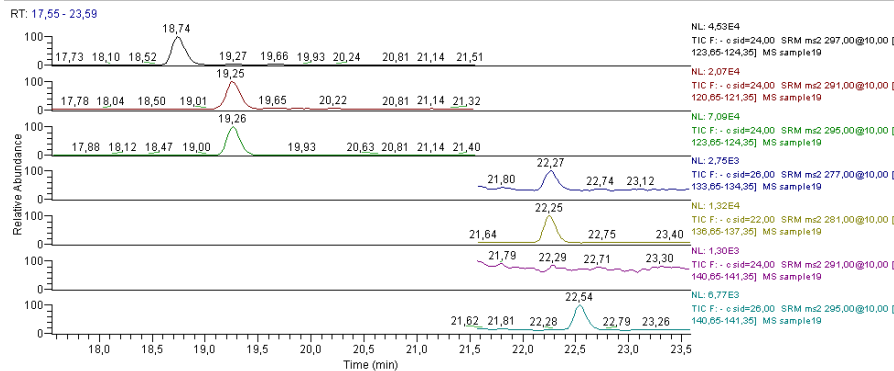
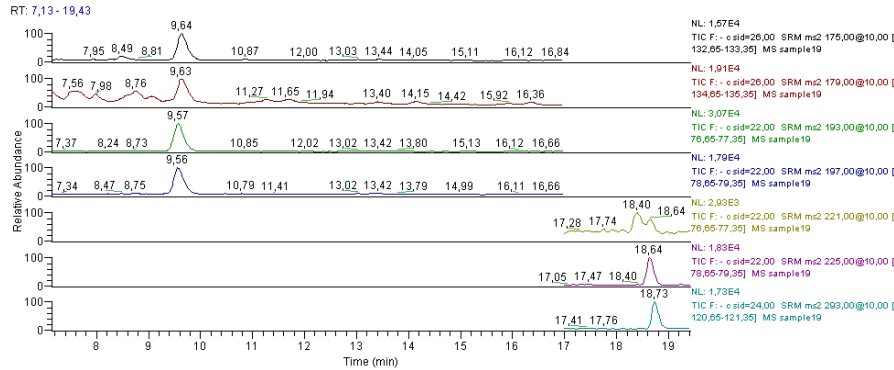
Δείγμα P021



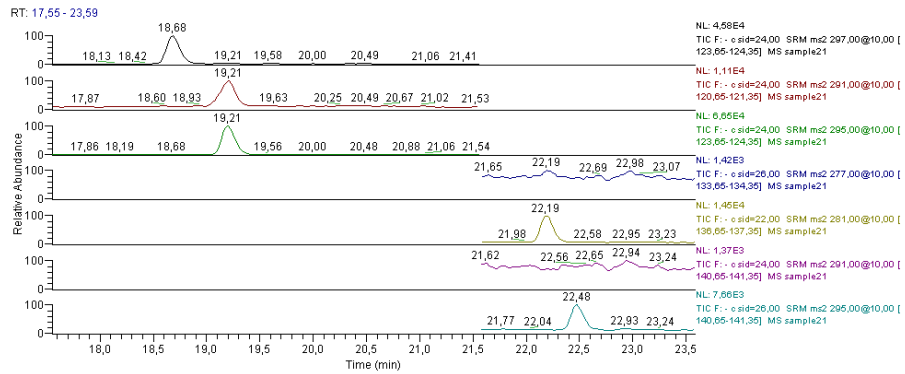
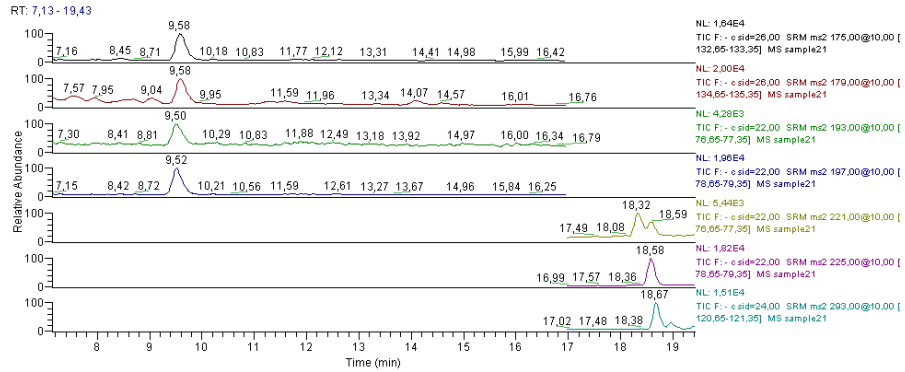
Δείγμα P025



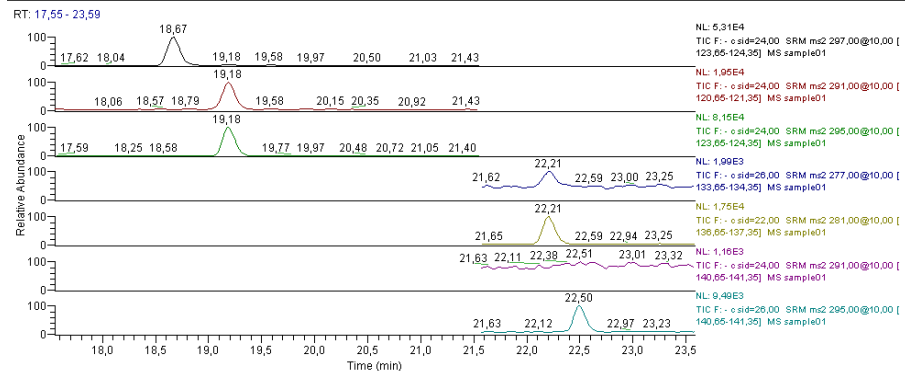
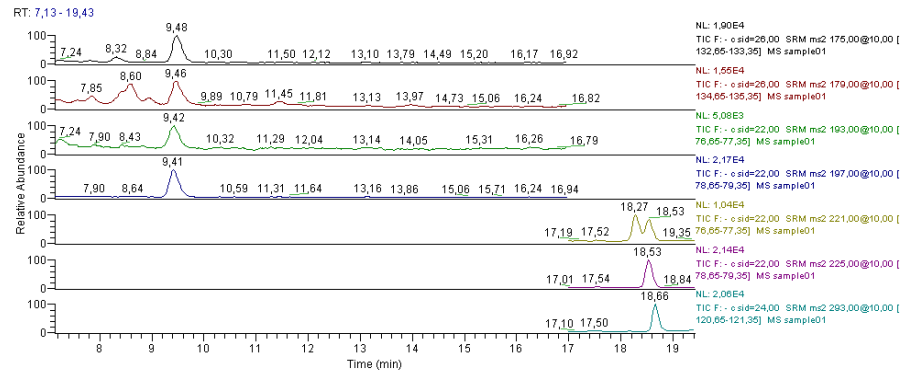
Δείγμα P028



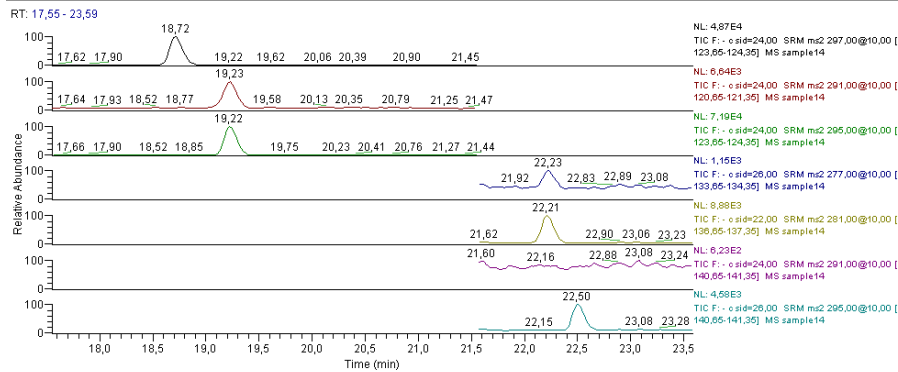
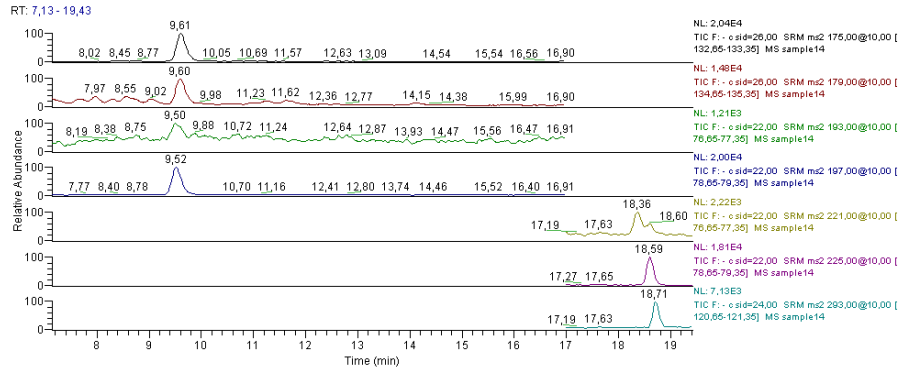
Δείγμα NP001



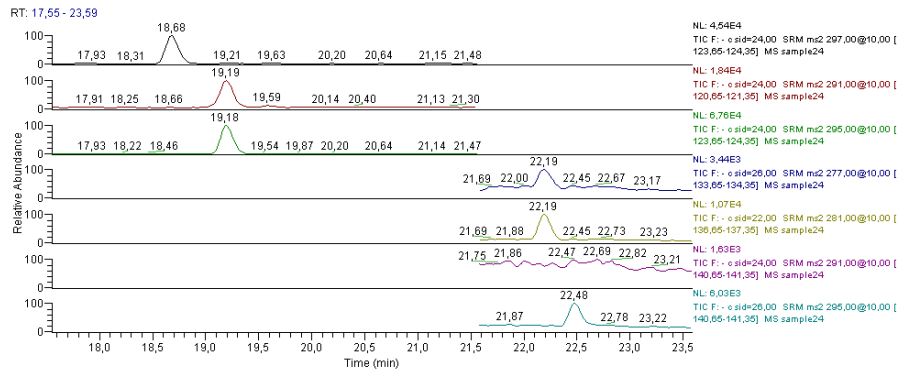
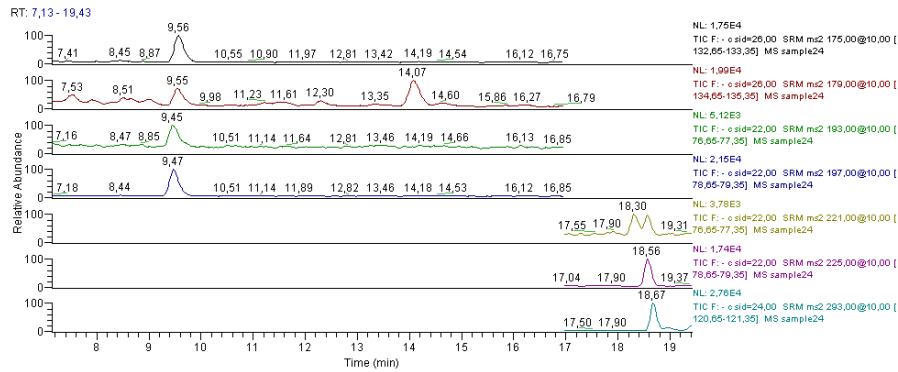
Δείγμα NP005



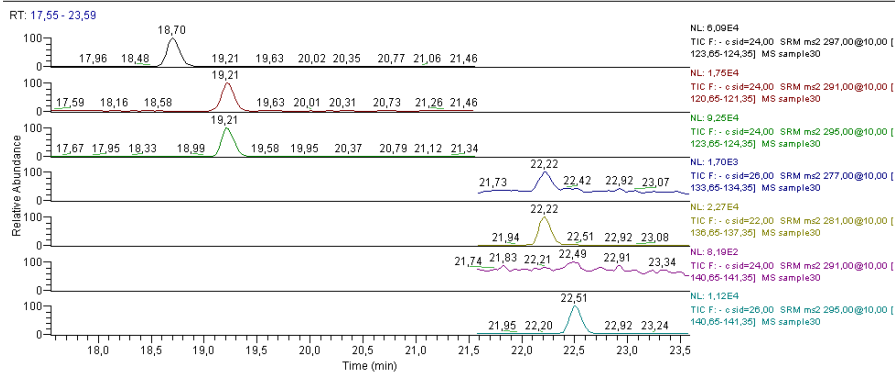
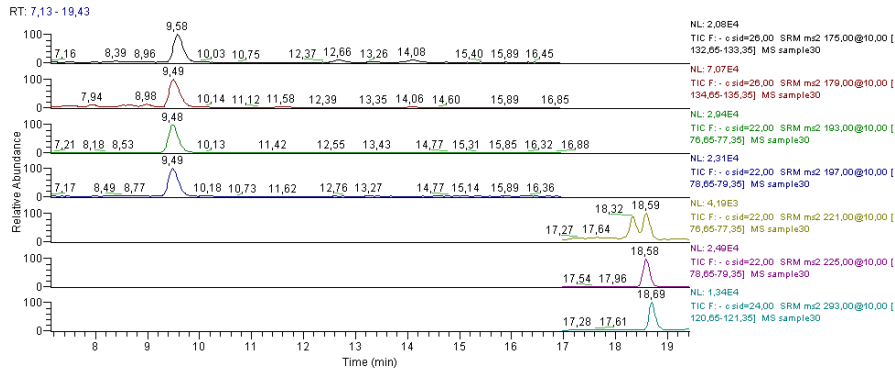
Δείγμα NP011



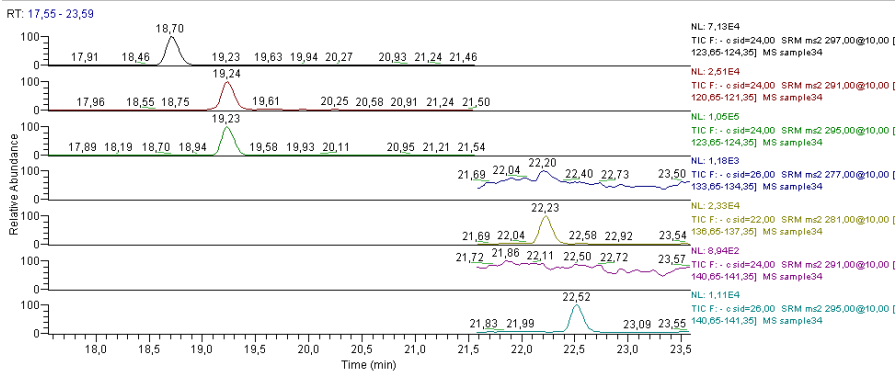
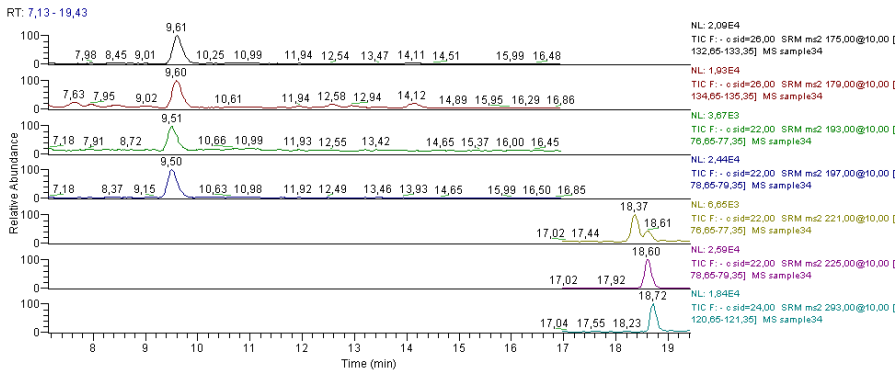
Δείγμα NP016



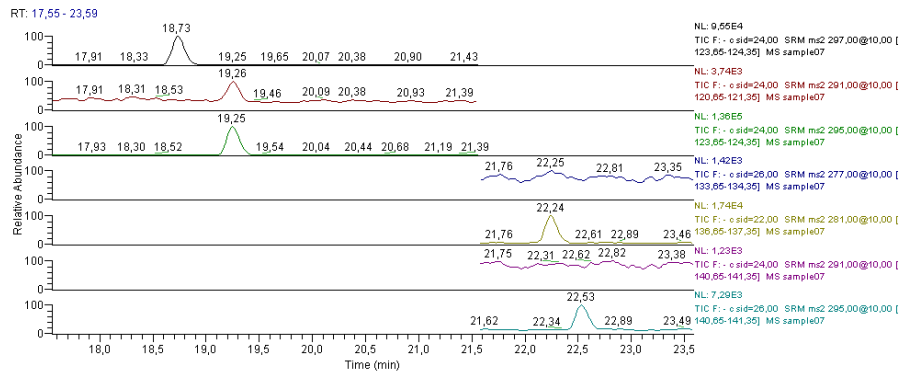
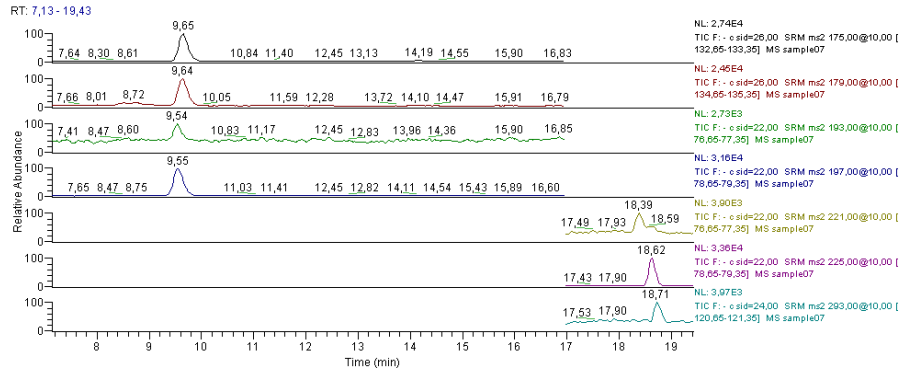
Δείγμα NP019



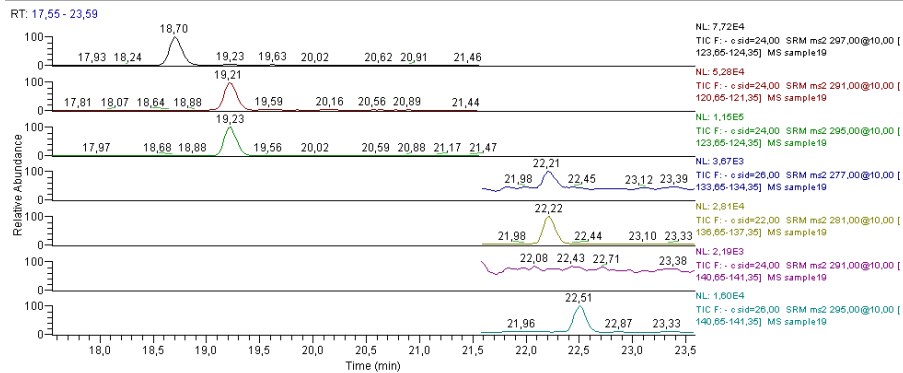
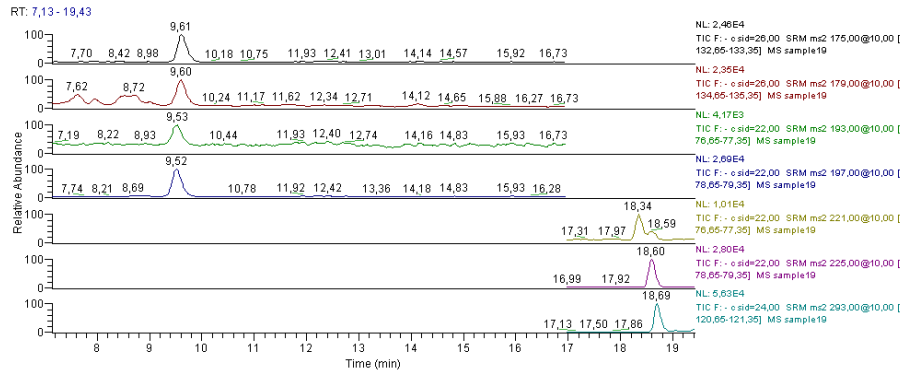
Δείγμα E002



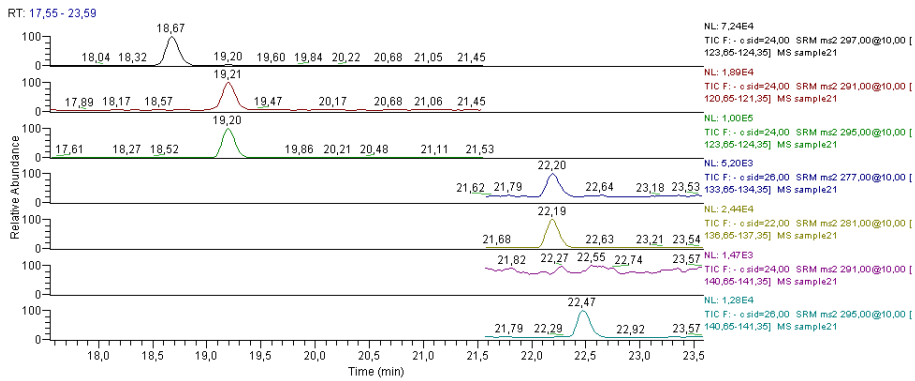
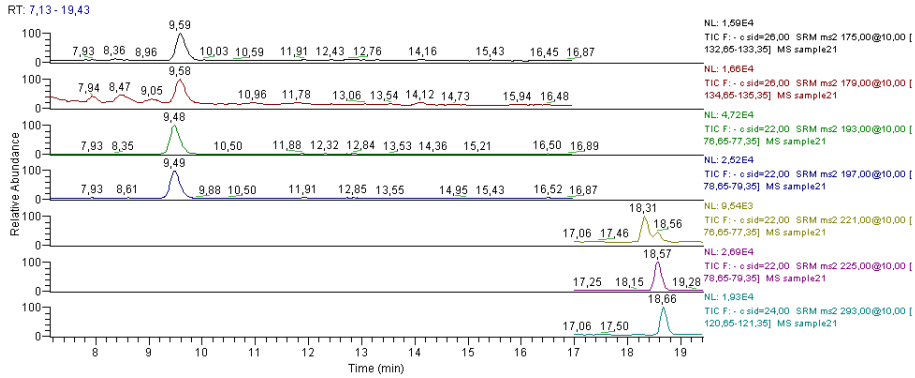
Δείγμα E007



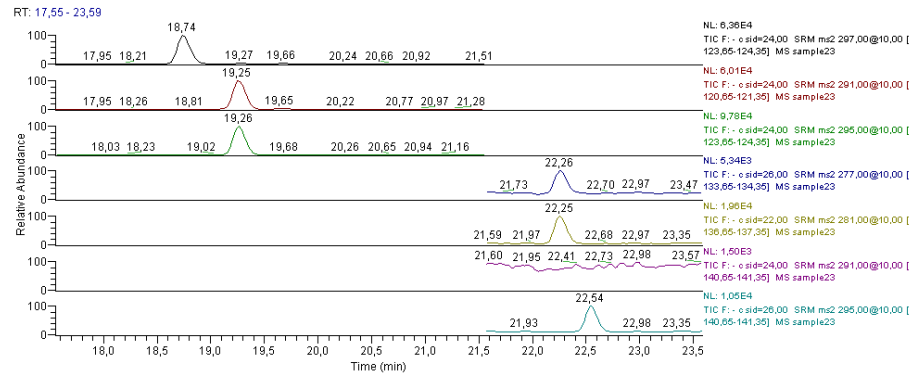
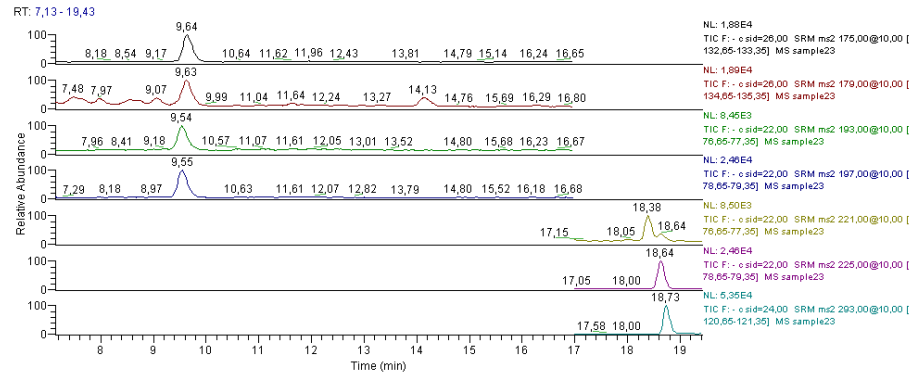
Δείγμα E013



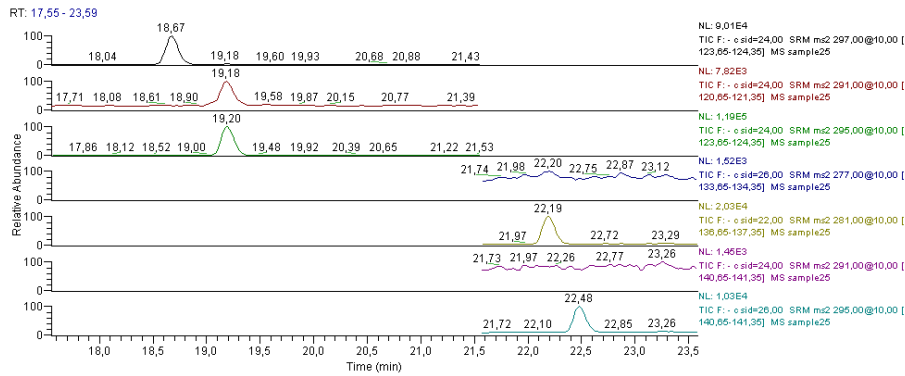
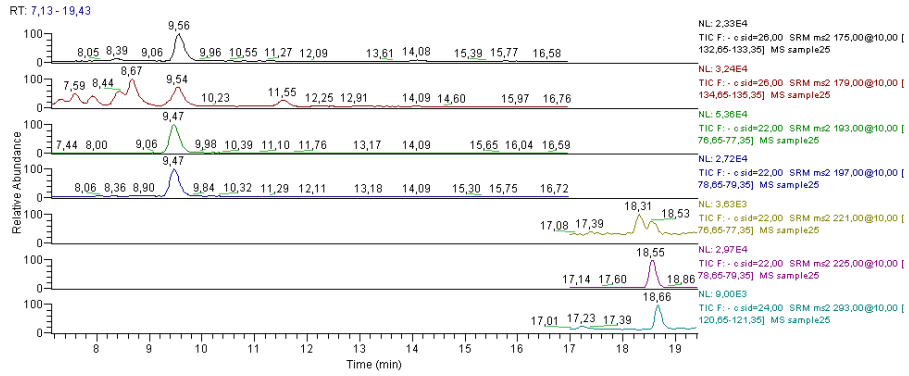
Δείγμα K01



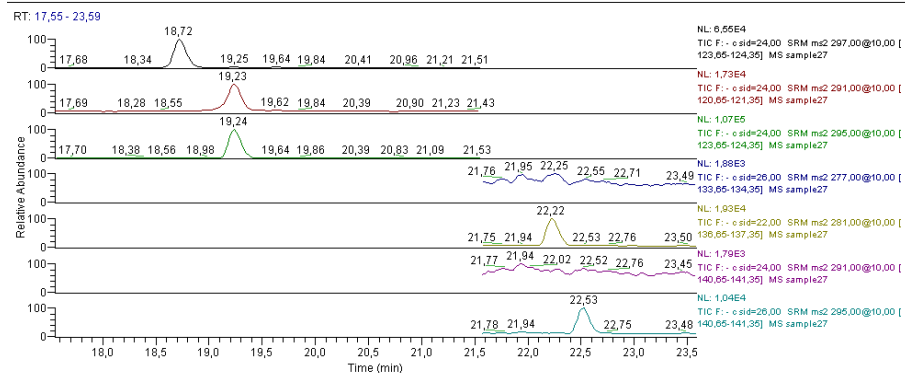
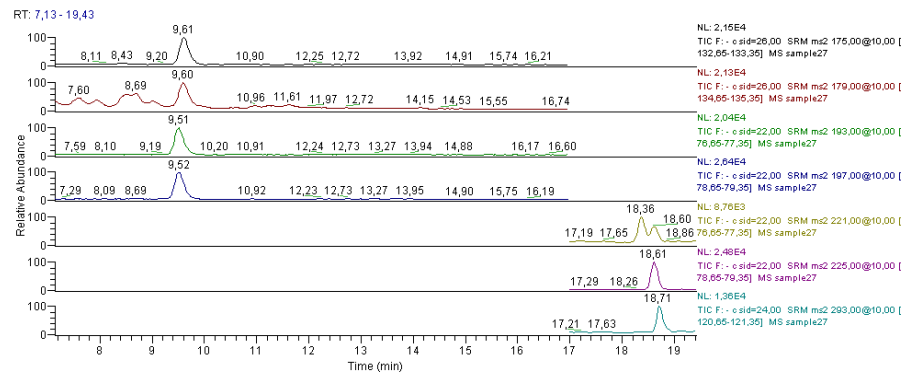
Δείγμα K02



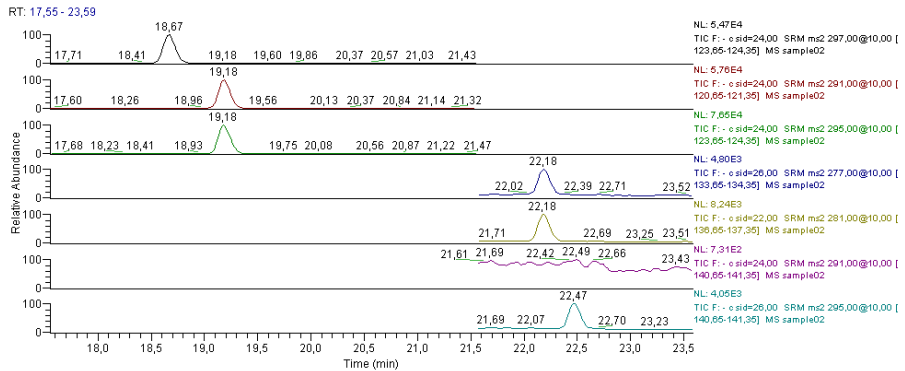
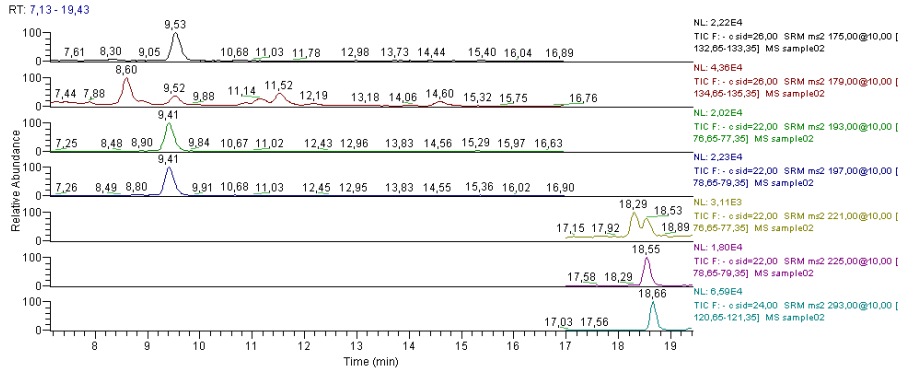
Δείγμα Κ03



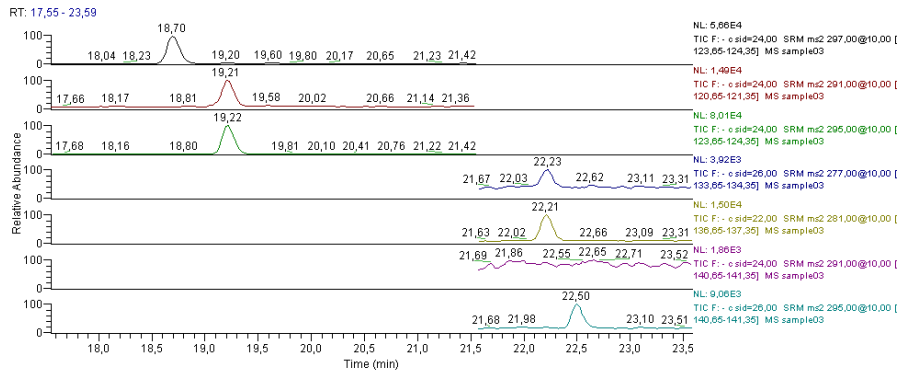
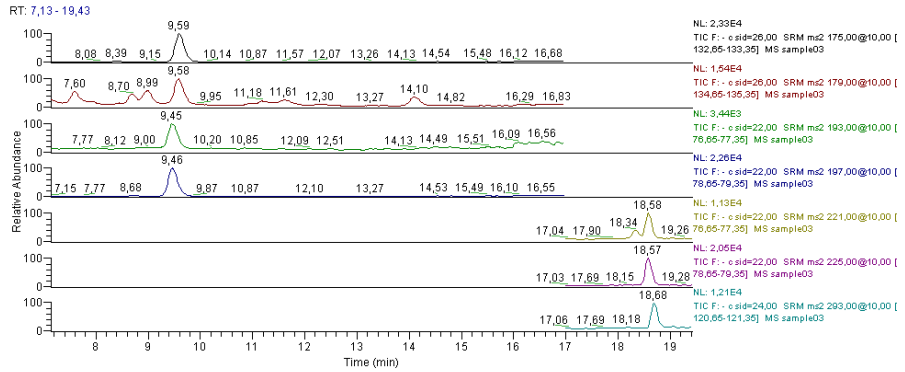
Δείγμα Κ04



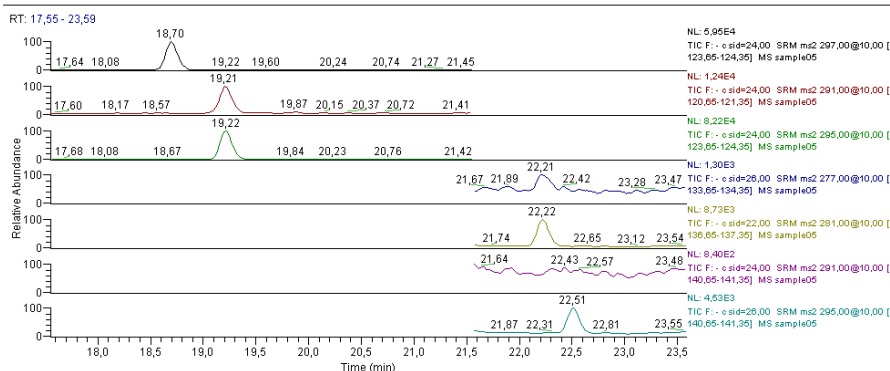
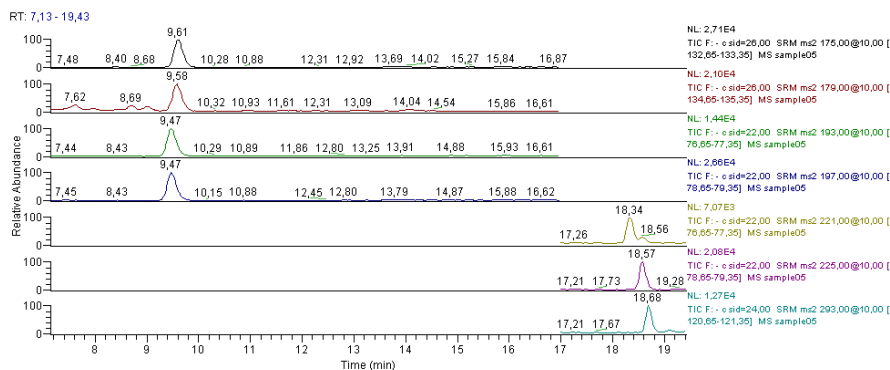
Δείγμα Κ05



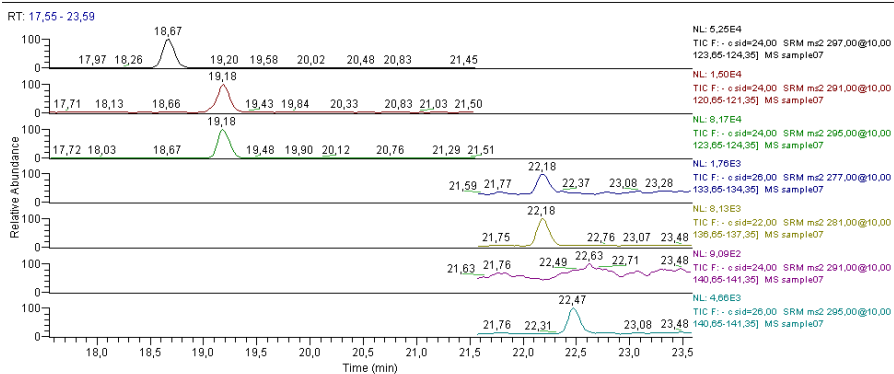
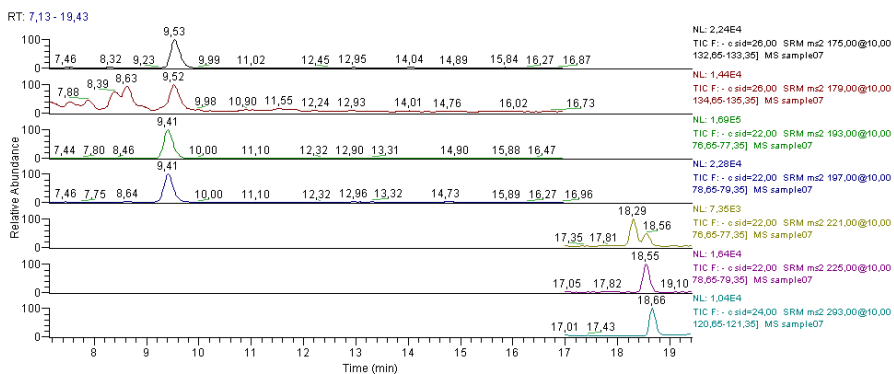
Δείγμα Κ06



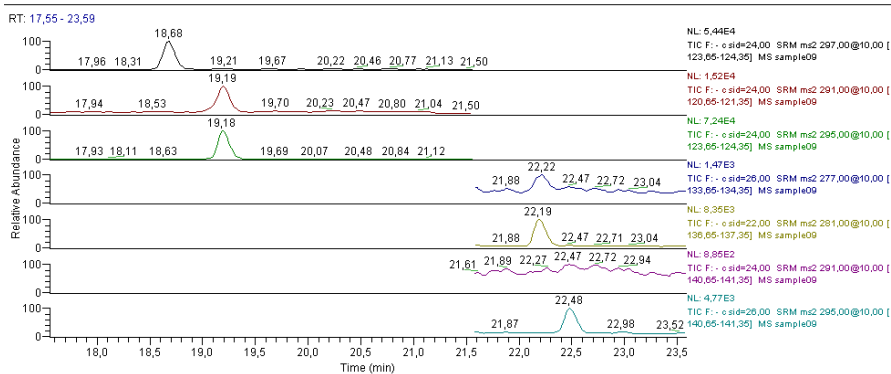
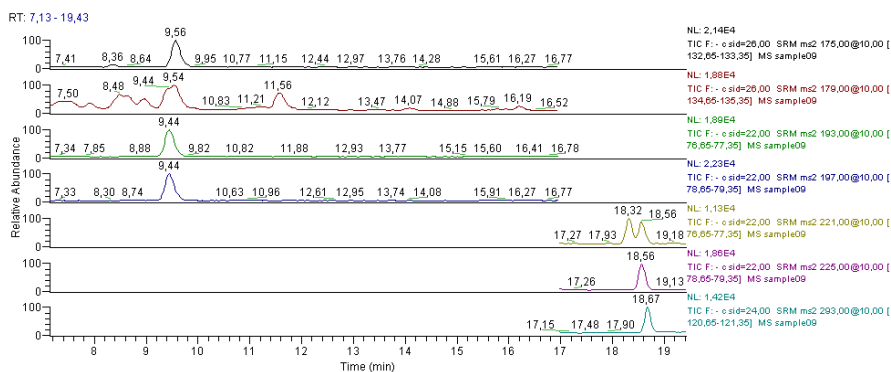
Δείγμα K07



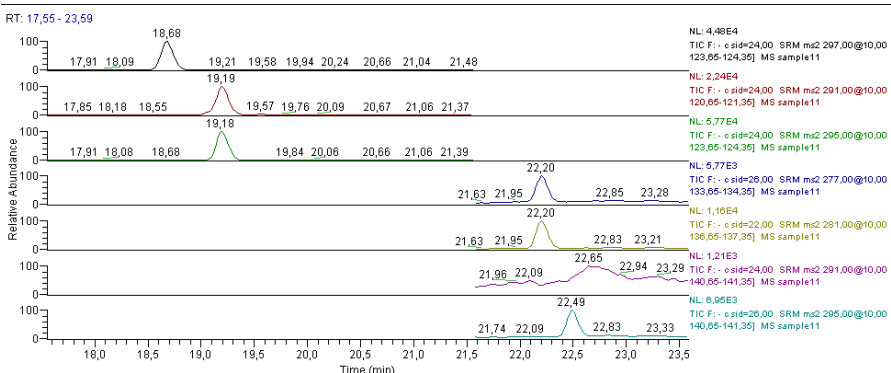
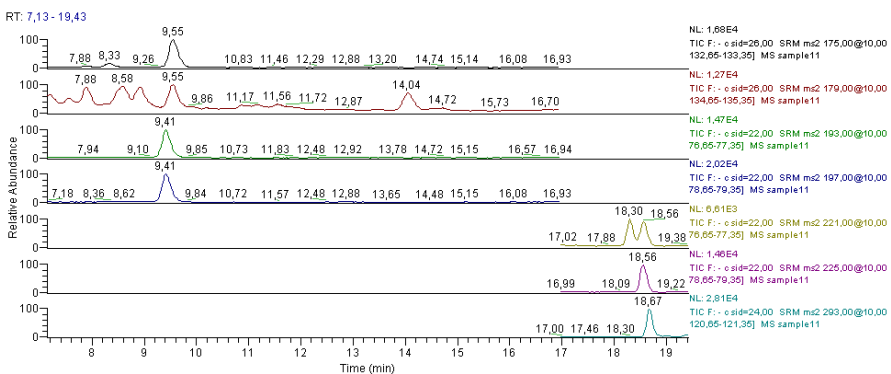
Δείγμα K08



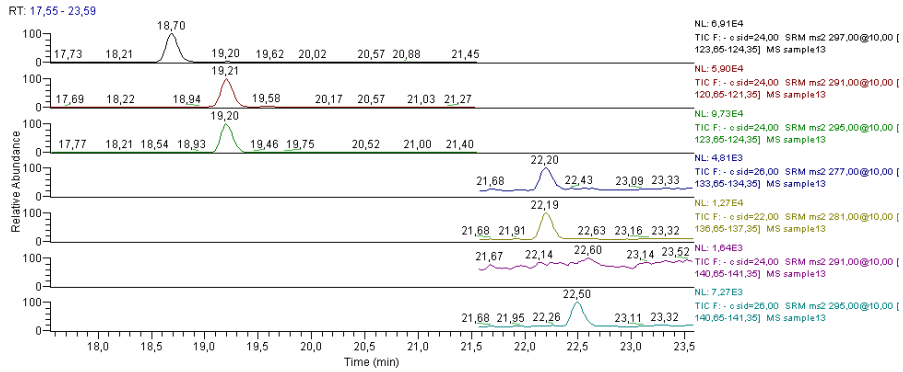
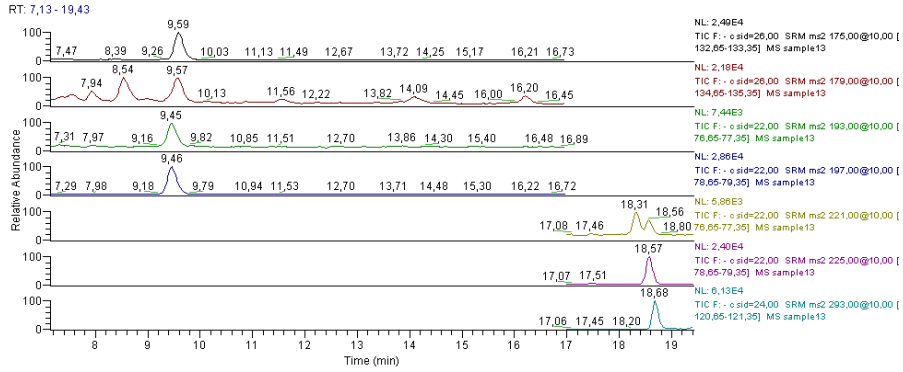
Δείγμα K09



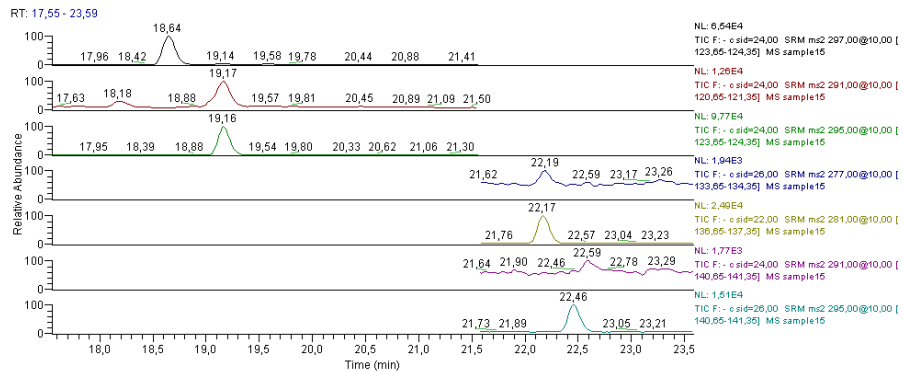
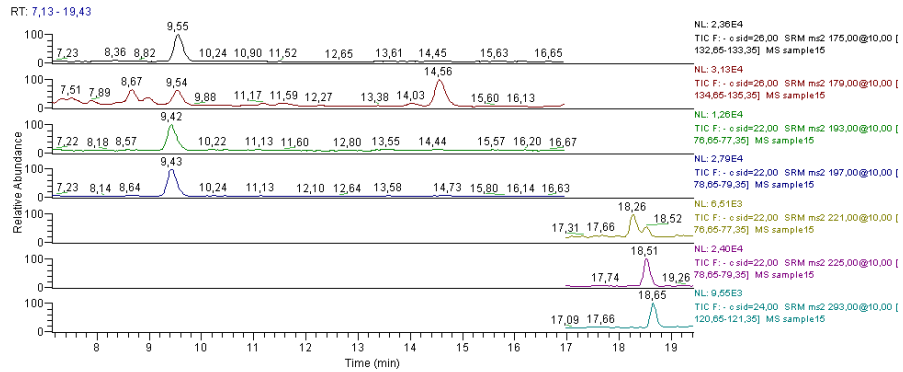
Δείγμα K10



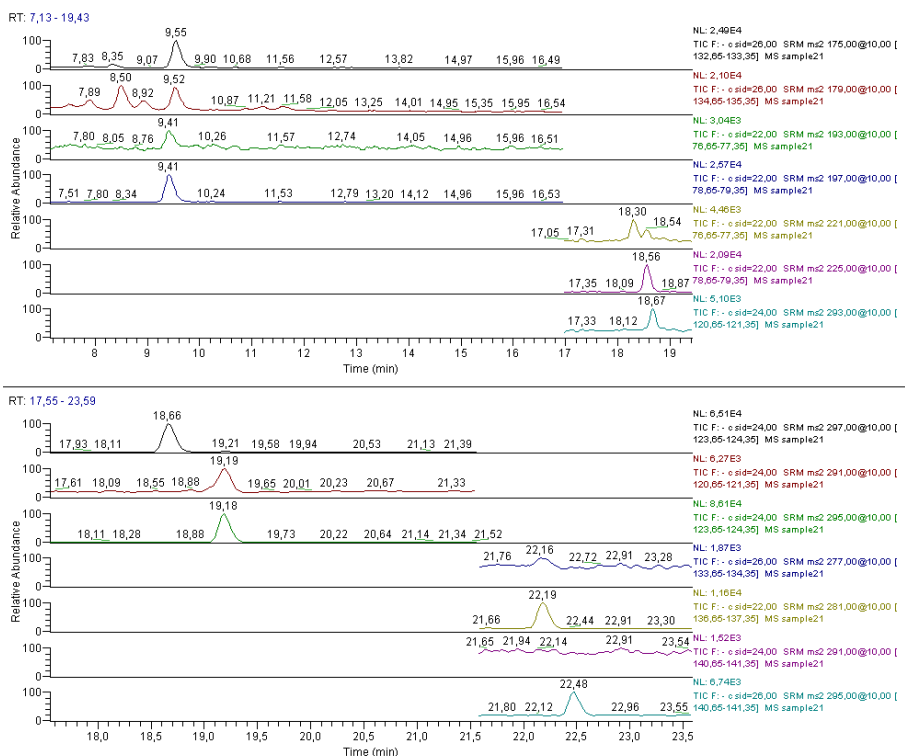
Δείγμα K11



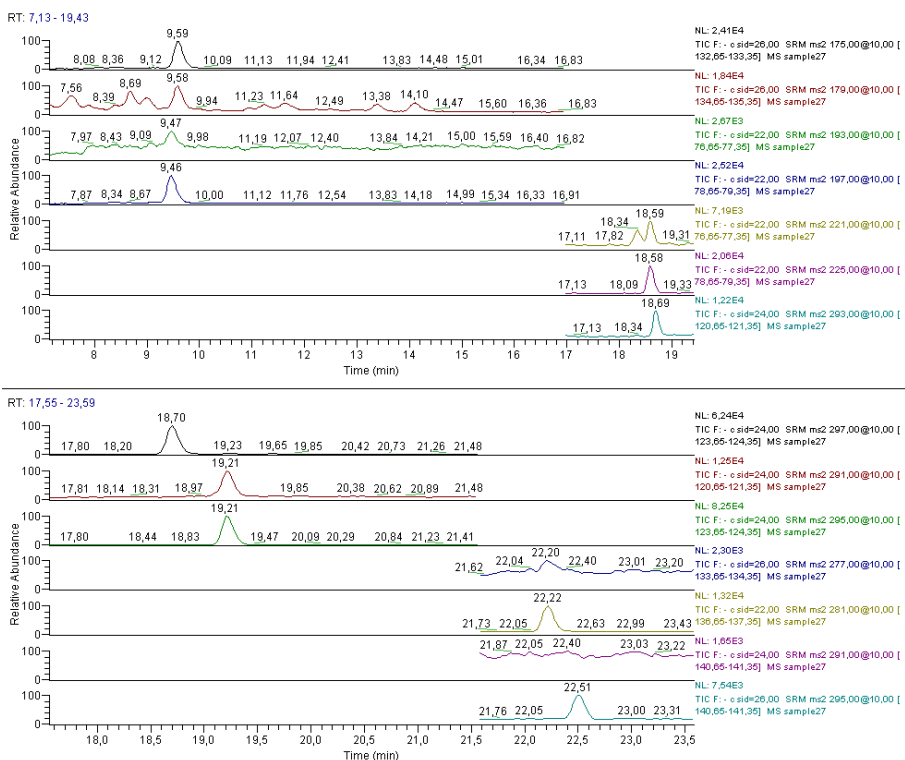
Δείγμα K12



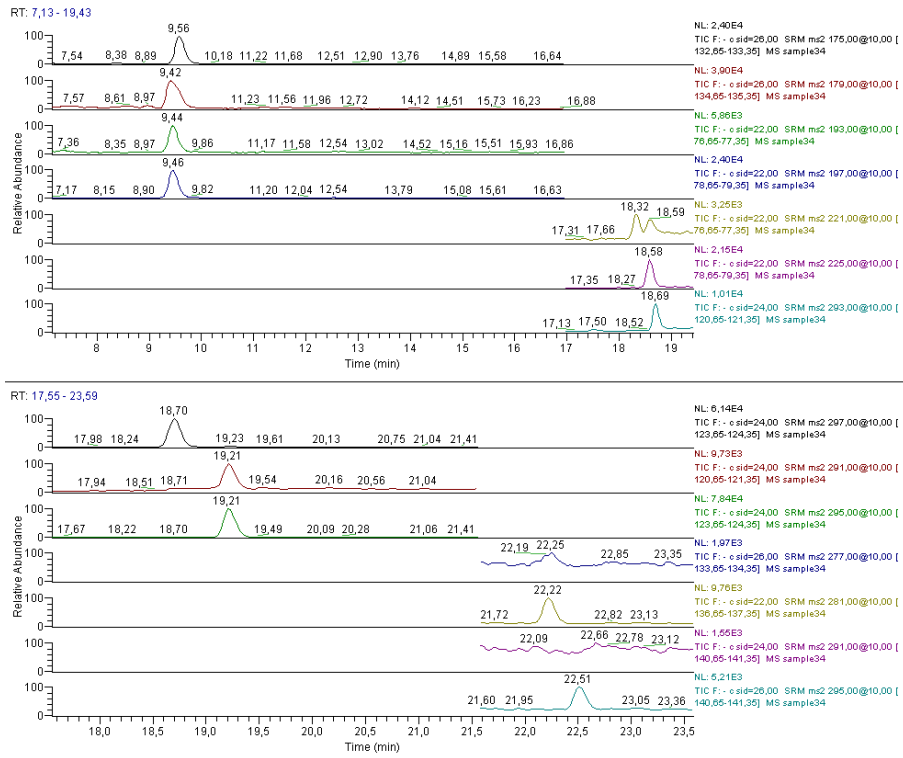
Δείγμα T03



Δείγμα T06



Δείγμα T09



Παράρτημα II

Συντμήσεις

Φθαλικός εστέρας

Φθαλικός διμεθυλεστέρας

Σύντμηση

DMP

Φθαλικός διαιθυλεστέρας

DEP

Φθαλικός διβουτυλεστέρας

DBP

Φθαλικός δι-ισο-βουτυλεστέρας

DiBP

Φθαλικός βουτυλοβενζυλεστέρας

BBzP

Φθαλικός διεστέρας της 2-αίθυλο-εξανόλης

DEHP

Φθαλικός διεστέρας της ισο-εννεανόλης

DiNP

Μεταβολίτης φθαλικού εστέρα

Σύντμηση

Φθαλικός μεθυλεστέρας

MMP

Φθαλικός αιθυλεστέρας

MEP

Φθαλικός βουτυλεστέρας

MBP

Φθαλικός ισο-βουτυλεστέρας

MiBP

Φθαλικός βενζυλεστέρας

MBzP

Φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-εξανόλης

MEHP

Φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-υδρόξυ-εξανόλης

MEHHP ή
5OH-MEHP

Φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-οξο-εξανόλης	MEOHP ή 5oxo-MEHP
Φθαλικός εστέρας της 2-αίθυλο-5-καρβόξυ-πεντανόλης	MECPP ή 5cx-MEPP
Φθαλικός εστέρας της 2-καρβόξυ-εξανόλης	MCMHP ή 2cx-MMHP
Φθαλικός εστέρας της ισο-εννεανόλης	MiNP
Φθαλικός εστέρας της υδρόξυ-ισο-εννεανόλης	MHiNP ή OH-MiNP
Φθαλικός εστέρας της οξο-ισο-εννεανόλης	MOiNP ή oxo-MiNP
Φθαλικός εστέρας της καρβόξυ-ισο-οκτανόλης	MCiOP ή cx-MiNP